



Prof. dr hab. Agnieszka Chacińska

a.chacinska@imol.institute

+48 885014011

Laboratorium Biogenezy Mitochondriów

IMol Polska Akademia Nauk

Warszawa, 31.08.2024

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pani mgr Wiktorii Sztangierskiej

„Role of yeast nucleotide exchange factor (Sse1) in functioning of Hsp70 chaperone system in protein disaggregation”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Liberka

dr Agnieszki Kłosowskiej

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Białka opiekuńcze stanowią ważną klasę białek, zaangażowanych w utrzymanie komórkowej homeostazy białek. To działanie przekłada się na wiele procesów, a także jest ważnym elementem odporności oraz odpowiedzi na stres. Fundamentalne znaczenie dla komórkowej homeostazy białek ma proces agregacji białek. Wiele czynników i mechanizmów modyfikuje przebieg agregacji i ilość agregatów białkowych w komórce. System białek opiekuńczych z centralną rolą Hsp70 jest uniwersalnym systemem obecnym w organizmach zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych, i jego rola w procesie fałdowania się białek, a także reaktywacji zagregowanych białek jest znana od dawna i opisana w literaturze. Niemniej jednak wiele pytań, zarówno mechanistycznych jak i tych zakresu fizjologii i patologii komórki pozostaje bez odpowiedzi, mimo intensywnych prac badawczych prowadzonych w tej



tematyce. Z racji uniwersalności zagadnień związanych z białkami opiekuńczymi, badania wykonywane na prostym modelu eukariotycznym *Saccharomyces cerevisiae* niezmiennie dostarczają podstawowej wiedzy, w szczególności na poziomie zrozumienia mechanizmów. Poznanie procesu reaktywacji zagregowanych białek ma kluczowe znaczenie dla wiedzy nie tylko efektów stresu na komórkę, ale także ma olbrzymie znaczenie dla zrozumienia i opracowania strategii terapeutycznych w chorobach powiązanych z zaburzeniami homeostazy białek, takich jak choroby neurodegeneracyjne.

W tę ważną tematykę mechanizmów reaktywacji zagregowanych białek wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Wiktorii Sztangierskiej.

Formalny opis rozprawy oraz ocena strony edytorskiej

Podstawą rozprawy doktorskiej są opisy i wyniki eksperymentów, które tworzą spójną całość, i stanowią podstawę publikacji w czasopiśmie eLife. Rozprawa rozpoczyna się streszczeniami w wersjach językowych polskim i angielskim. Streszczenia te w sposób bardzo dobry charakteryzują zarówno luki w wiedzy będące podstawą działań eksperymentalnych, jak i wyniki. Całość rozprawy jest napisana w języku angielskim. Opis formalny przeplatam z różnymi uwagami, które mam nadzieję pomogą w przygotowaniu ciekawej prezentacji, wspomagając dyskusję w trakcie obrony pracy.

Praca ma klasyczną strukturę. W obszernym wstępie kandydatka zamieściła solidny zestaw informacji na białek opiekuńczych, w szczególności Hsp70, i współdzielących z tym białkiem innych białek opiekuńczych, a także wiedzy na temat mechanizmów reaktywacji agregatów. Wiedza przedstawiona we wstępie jest zaprezentowana w sposób uporządkowany i opatrzona jasnymi i estetycznymi rycinami, najczęściej zaadaptowanych z ważnych dla tej dziedziny prac. Z jednej strony jest zrozumiałe zagłębienie się w dość wyspecjalizowaną tematykę, w sposób, który właściwie przygotowuje czytelnika na śledzenie eksperymentów i interpretacji wyników. Z drugiej strony, można sobie pozwolić na pewną krytykę dotyczącą dość wąskiego ujęcia tematyki, w szczególności braku wykazania wagi opisywanych procesów



dla fizjologii komórki, a także powiązań z chorobami ludzkimi. Taką tematykę chciałabym podjąć w trakcie dyskusji w ramach obrony.

Po sprecyzowaniu celu pracy następuje wyczerpujący opis materiałów i metod, używanych w pracy. Poza standardowymi metodami biologii komórki i klonowania, kolejne podrozdziały metodologiczne są poświęcone opisom procedur oczyszczania białek używanych w systemach eksperymentalnych *in vitro*, a także samych procedur eksperymentalnych. Właściwie wszystkie białka są oczyszczone za pomocą znaczników. Znaczniki te nie zawsze są odcinane. Czy nie interferują one z funkcją białek? Z racji mojej zupełnie podstawowej ekspertyzy dotyczącej czyszczenia białek i używania ich do eksperymentów *in vitro*, ciekawi mnie też używanie fuzji z białkiem SUMO, prosiłabym o komentarz jaki jest sens takiego działania.

Rozdział zawierający opis wyników opatrzony jest wieloma rycinami o wysokiej jakości. Brakuje podsumowujących schematów, które pozwolą skutecznie śledzić eksperymentalne podejścia i co z nich wynika na kolejnych etapach. To ułatwiłoby zrozumienie pracy przez niespecjalistę.

Rozdział poświęcony dyskusji wyników jest napisany w sposób interesujący i wyczerpujący. Jedyna rycina w tym rozdziale przedstawia schematycznie część wyników otrzymanych przez doktorantkę. Dla większej przejrzystości, model ten powinien być uproszczony graficznie tak, aby bardziej uwypuklić główne odkrycia kandydatki. Generalnie zachęcam kandydatkę do graficznych podsumowań wyników poszczególnych etapów prac. Literatura jest zacytowana właściwie, choć przedstawienie i dyskusja w kontekście aktualnej wiedzy mogłaby być bardziej przejrzysta dla czytelnika, niebędącego specjalistą w dziedzinie.

Teksty w języku angielskim czyta się bardzo dobrze. Rozprawa napisana jest w sposób poprawny; nie zaważyłam zbyt dużo błędów edytorskich, literówek itd. Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona mi rozprawa doktorska jest w pełni satysfakcjonująca i pozwala na zapoznanie się i ocenę dokonań kandydata do stopnia doktora nauk biologicznych.



Ocena merytoryczna

Głównym celem jaki postawiła sobie doktorantka Wiktoria Sztangińska było lepsze poznanie procesu reaktywacji zagregowanych białek w eksperymentalnych układach *in vitro*. Renoma laboratorium, w którym wykonywane były prace, gwarantuje rygorystyczne podejście eksperymentalne. Tematyka podjętych prac jest ważna i na czasie, choć to stwierdzenie opieram po części na własnej wiedzy, a nie na opisie doktorantki.

Za dekompozycję agregatów odpowiadają złożony system białek opiekuńczych, w których w komórkach drożdży *S. cerevisiae* trzon stanowią białka z rodziny Hsp70 i Hsp100 (w komórkach ludzkich i innych wyższych Eukaryota białka z rodziny Hsp100 nie występują). Białka z rodziny Hsp70 do aktywności wymagają białek DJP z domeną J (ang. J-Domain Protein) oraz białek NEF (ang. Nucleotide Exchange Factor), które to z kolei występują w różnych odmianach. Ich wybór do pewnego stopnia determinuje aktywności i specyficzność substratów Hsp70. Proces ten można podzielić na etapy, takie jak wiązanie się do białek chaperonowych do agregatów, zmiany w ich strukturach oraz ekstrakcje oraz fałdowanie białek do stanu natywnego.

Kandydatka w swojej pracy skupiła się na Hsp70 oraz roli jego partnera białka JDP o nazwie Sse1, a także dwóch białkach NEF w kontekście wiązania się do agregatów i reaktywacji zagregowanych białek. W serii eleganckich eksperymentów, doktorantka dokonała ważnych obserwacji, które doprowadziły do następujących głównych konkluzji:

- białko Sse1 stymuluje rozpad agregatów przez Hsp70 na wczesnych etapie, czyli wiązania się Hsp70 do agregatów,

- stymulacja wiązania się Hsp70 do agregatów przez Sse1 wymaga odpowiednich białek JDP z klasy B (w wym. przypadku Sis1), posiadających dodatkowe miejsce wiązania Hsp70 (nieobecne w innych JDP).

Dodatkowo kandydatka wykazała, że zależność pierwszego etapu, czyli wiązania się Hsp70 do agregatów od Hsp110 (NEF), była również zaobserwowana w eksperymentach z użyciem białek ludzkich

W pracy zastosowane zostały nowoczesne metody biochemiczne. Przedstawienie eksperymentów, a także wniosków z nich płynących oraz interpretacje wyników na poziomie



biochemicznym, są wzorowe w większości przypadków. Jedyne, odnotowałam pewien problem w zrozumieniu konkluzji płynących z eksperymentów z udziałem Hsp104.

Oceniając wyniki pracy, dochodzę do wniosku, że mają one bardzo duże znaczenie dla środowiska uczonych zainteresowanych mechanizmami akcji białek opiekuńczych, a w szczególności procesami radzenia sobie z agregatami białkowymi na poziomie molekularnym. Nie jest to jednak jedyne znaczenie. Trzeba zauważyć, że kontekst komórkowy, fizjologiczny i związany z procesami patologicznymi został przedstawiony zbyt minimalistycznie.

W tym kontekście chciałabym poruszyć następujące sprawy, do których mam nadzieję doktorantka ustosunkuje się w czasie obrony w sposób syntetyczny:

- 1) Dlaczego ta tematyka jest tak ważna?
- 2) Jakie mogą być konsekwencje fizjologiczne i/lub patologiczne zidentyfikowanej przez doktorantkę roli Sse1? Czy istnieje poparcie w literaturze dla potencjalnych rozważań i spekulacji?
- 3) Czy znane są przykłady negatywnego lub, odwrotnie, pozytywnego wpływu braku Sse1 na zdrowie komórek. Zastanawiam się, na ile skuteczne rozdrabnianie agregatów w komórkach przez system Hsp70 z udziałem chaperonów typu Sse1 będzie korzystne dla komórki, w warunkach, gdy całkowite ich rozpuszczenie bądź likwidacja jest limitowane, np. na skutek niewystarczającej aktywności Hsp104.

Podsumowując, wyniki zebrane, opisane i zinterpretowane przez kandydatkę, p. Wiktorię Sztangierską prezentują znaczącą wartość poznawczą. Miałam wgląd i prowadziłam proces recenzji kandydatki działając jako edytor w czasopiśmie eLife – w eLife tego typu procedury są transparentne i dostępne do wglądu dla zainteresowanych czytelników po zakończeniu procesu. Trójka recenzentów, będących ekspertami światowej klasy w tej dziedzinie, wypowiedziała się jednogłośnie pozytywnie na temat jakości tej pracy. To utwierdza mnie jako niespecjalistę w bardzo wysokiej ocenie naukowej kandydatki. Jestem też przekonana, że jej odkrycia będą docenione przez społeczność naukową. Przedstawione powyżej uwagi są



zdeteminowane chęcią poszerzenia dyskusji, a także zwrócenia uwagi na to, jak ważne jest przedstawianie odkryć, jak i ich znaczenia w sposób niehermetyczny i czytelny dla niespecjalistów. Krytyczne uwagi przewijające się w tekście tej recenzji nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę naukowej wartości pracy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Wiktorii Sztangierskiej to dogłębna analiza biochemiczna poszczególnych etapów reaktywacji agregatów białkowych i rozpuszczania dekompozycji agregatów białkowych w układach *in vitro* z użyciem oczyszczonych białek oraz nowoczesnych metod badania tego procesu.

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie pracy i dopuszczenie pani mgr Wiktorii Sztangierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii przedstawiona mi do oceny rozprawa, w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora biotechnologii. Ponadto w oparciu o wysoką ocenę badań zaprezentowane przez kandydatkę i ich wyników, opublikowanych w postaci recenzowanego preprintu eLife, wnoszę o wyróżnienie pracy.



Agnieszka Chacińska