

Dziedziczenie MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 04.11.2013.....

L.dz. nr 60/2013 *ps*

Wrocław, 27 października 2013 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Lipińskiej

pt. „Nowe elementy regulatorowe dezagregującego białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Liberka oraz dr Szymona Ziętkiewicza na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa doktorska mgr Natalii Lipińskiej dotyczy poznania molekularnych mechanizmów regulujących aktywność białek opiekuńczych stanowiących niezwykle istotny element systemu zapewniającego homeostazę białek w komórkach, zwłaszcza w warunkach stresu komórkowego. Obiektem badań doktorantki było białko opiekuńcze Hsp104 z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*, należące do nadrodziny ATPaz AAA+ i rodziny białek Hsp100, występujących u bakterii, grzybów i roślin. Hsp104 razem z białkami z rodziny Hsp70 i 40 przeprowadza reaktywację zdenaturowanych białek uwieczonych w agregatach, które powstały w wyniku działania wysokiej temperatury. Stąd też główną fizjologiczną funkcją białka Hsp104 jest nadawanie komórkom drożdży tolerancji na szok cieplny. Ponadto udowodniono, że dezagregaza Hsp104 uczestniczy we fragmentacji drożdżowych prionów, co jest niezbędne do przekazywania prionów do komórek potomnych. Według aktualnie obowiązującego modelu działania układu białek opiekuńczych Hsp104/Hsp70, białko Hsp70 pełni funkcję kierowania agregatów białkowych do heksameru Hsp104, który tworzy trójwarstwowy pierścień z wąskim kanałem w środku, przez który przeciągane są białka w celu ich rozfałdowania. Funkcja dezagregazy kompleksu Hsp104 zależy od zdolności do wiązania i hydrolizy ATP przez domeny NBD1 i NBD2 oraz od obecności małych mobilnych tzw. środkowych domen M, które są skierowane na zewnątrz struktury pierścienia. Wcześniejsze analizy mutacyjne domeny M wskazały jednoznacznie na kluczowe znaczenie tego regionu dla aktywności dezagregazy białek z rodziny Hsp100. Ponadto sugerowano, że domena M jest miejscem przyłączenia białek Hsp70. Jednakże dokładny mechanizm regulacji aktywności dezagregazy przez domenę M pozostawał nieznany.

Na podstawie wyników modelowania *in silico* białka Hsp104, dr Szymon Ziętkiewicz zaproponował, że na styku domeny M i NBD1 istnieje potencjalna możliwość tworzenia i zrywania mostków solnych między konserwatywnymi resztami kwasu asparaginowego w pozycjach 184 i 484, leżącymi odpowiednio w domenach NBD1 i M, a resztą lizyny w pozycji 358 w domenie NBD1. Celem tej pracy stała się weryfikacja hipotezy o istotności oddziaływań jonowych między domenami M i NBD1 dla regulacji aktywności dezagregazy. Dobór odpowiednich metod i logiczna sekwencja przeprowadzonych eksperymentów oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników i wyciągania właściwych wniosków pozwoliła na pełną realizację postawionego celu. Doktorantka wykazała, że zaburzenie oddziaływań jonowych między domenami M i NBD1 na skutek wprowadzenia mutacji punktowych K358E i D485K prowadzi do otrzymania hiperaktywnej wersji białka Hsp104 o zwiększonej aktywności ATPazowej i zdolności do reaktywacji zdenaturowanych białek, częściowo niezależnej od aktywatora Hsp70, co potwierdzono w serii eksperymentów *in vitro* i *in vivo*. Dodatkowo pokazano, że ekspresja mutantów Hsp104 K358E i D485K jest toksyczna zarówno dla drożdży jak i bakterii, co spowodowane jest rozwijaniem natywnych białek, niezbędnych do życia komórek. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano nowy model regulacji aktywności dezagregazy Hsp104, w którym postuluje się, że istnienie oddziaływań jonowych pomiędzy domenami NBD1 i M, co utrzymuje białko w stanie nieaktywnym i dopiero przyłączenie białka Hsp70 do domeny M powoduje zerwanie istniejącej sieci mostków solnych, co aktywuje białko Hsp104. Uważam, że jest to znaczące osiągnięcie naukowe doktorantki oraz całego zespołu. Warto podkreślić, że wypływające z tej pracy wnioski są zgodne z modelami regulacji aktywności białek z rodziny Hsp100 opublikowanymi niezależnie w tym samym czasie przez zespoły Bernda Bukau z Uniwersytetu w Heidelbergu (Oguchi i wsp., 2012, Nat. Struct. Mol. Biol.) i Francis Tsai z Baylor College of Medicine (Lee i wsp., 2013, PNAS), a publikacja Lipińskiej i współ. w *Journal of Biological Chemistry* cytowana jest w najnowszych pracach na temat białka Hsp104.

Pracę doktorską mgr Lipińskiej otwiera Wstęp, który w sposób jasny i zwięzły wprowadza czytelnika w temat tej rozprawy. Autorka opisała aktualny stan wiedzy o białkach opiekuńczych z rodzin Hsp100, -70 i -40, a w szczególności ich strukturę, mechanizm działania oraz fizjologiczne funkcje w termotolerancji i propagacji prionów, wspomagając się dobrze dobranymi ilustracjami. W tej części pracy brakuje mi tylko choć krótkiego akapitu na temat białek ludzkich pełniących funkcję dezagregaz. Prosiłbym doktorantkę o krótką wypowiedź na ten temat podczas obrony.

Następnie doktorantka sformułowała krótki i jednoznaczny cel pracy, który wynika bezpośrednio z analizy modelowania *in silico* białka Hsp104 przeprowadzonego przez dr Szymona Ziętkiewicza, co wydaje mi się powinno być chociaż częściowo opisane w końcowej części Wstępu przed sformulowaniem celu, a nie dopiero w pierwszym rozdziale Wyników. Rozdziały Materiały i Metody napisane zostały jasno i szczegółowo, co pozwala innemu badaczowi bez trudu powtórzyć przeprowadzone przez doktorantkę eksperymenty, chociaż brakuje mi w tej części kilku ważnych informacji, które wymieniam w końcowej części tej recenzji.

Postawiona w pracy hipoteza o istnieniu sieci oddziaływań jonowych pomiędzy domenami M i NBD1 w białku Hsp104 i ich roli w regulacji aktywności dezagregazy została zweryfikowana w serii logicznie ułożonych i dobrze zaprojektowanych eksperymentów obejmujących mutagenezę ukierunkowaną reszt aminokwasów wytypowanych na podstawie modelowania *in silico* oraz kompletną analizę funkcjonalną uzyskanych mutantów białka Hsp104. Uzyskane w pracy wyniki przedstawiono w postaci czytelnych rycin, których interpretacja nie budzi zastrzeżeń. Każdy podrozdział rozpoczyna się od uzasadnienia podjęcia kolejnego zadania badawczego, a kończy się wyważoną konkluzją. Ponadto autorka często dodaje opisy podstaw teoretycznych zastosowanych metod. Wszystko to sprawia, że praca staje się zrozumiała dla każdego biologa i czyta się ją z przyjemnością. Poczucie niedosytu pozostawiła mi jednak część rozdziału Wyniki opisująca toksyczny efekt ekspresji wariantów białka Hsp104 w komórkach drożdży. Zastosowanie natywnego promotora genu *HSP104* bez możliwości regulacji produkcji toksycznego białka znacznie ograniczyła zakres możliwych do wykonania eksperymentów w bardziej kontrolowanych i powtarzalnych warunkach. W przypadku ekspresji toksycznych białek standardowym i „eleganckim” podejściem badawczym jest użycie promotora, którego aktywność może być ściśle kontrolowana, np. promotora z serii *GAL* indukowanych przez galaktozę a hamowanych przez glukozę. Można w ten sposób uzyskać stabilne transformanty drożdżowe, a zatem i dostateczną liczbę komórek do badań, w których można z łatwością badać różne aspekty fizjologii komórki po indukcji syntezy toksycznego białka. Na przykład doktorantka mogłaby wtedy ocenić wpływ ekspresji hiperaktywnych form Hsp104 na zjawisko termotolerancji i porównać je z wariantami zawierającymi mutacje kompensujące (patrz Ryc. 7.25, str. 66).

Dyskusja pracy doktorskiej mgr Natalii Lipińskiej napisana jest jasno i zwięźle, ma logiczny układ. Uzyskane przez doktorantkę wyniki dyskutowane są głównie w świetle dwóch równocześnie opublikowanych prac z zespołów Tsai i Bukau, w których niezależnie zaproponowano podobny model regulacji białek z rodziny Hsp100. Świadczy to dobitnie o

poprawności wysuwanych przez doktorantkę wniosków oraz o wysokim poziomie naukowym prowadzonych badań. Ponadto doktorantka wykonała analizę porównawczą własnych danych z wynikami podobnych badań nad białkiem ClpB, bakteryjnym ortologiem Hsp104, które zostały wykonane również w zespole profesora Liberka i zawarte w tej samej publikacji Lipińskiej i wsp. (2013). Analiza ta w pełni potwierdziła, że model regulacji aktywności drożdżowego białka Hsp104 jest prawdziwy dla innych dezagregaz z rodziny Hsp100. W tej części pracy brakuje mi tylko dyskusji na temat przyczyn toksyczności ekspresji hiperaktywnego mutantu Hsp104 w komórkach drożdży, tym bardziej, że doktorantka wykonała kilka eksperymentów mających na celu zbadać przyczyny tego zjawiska (Ryc. 7.2-7.7). Prosiłbym doktorantkę o szerszą dyskusję na ten temat w świetle własnych wyników i istniejącej literatury na ten temat, zwłaszcza w zakresie potencjalnych substratów dla hiperaktywnej dezagregazy Hsp104.

Wywiązując się z obowiązków recenzenta muszę wymienić kilka drobnych błędów oraz braków, które jednak nie mają wpływu na wysoką wartość naukową pracy:

- niepełny opis genotypu używanego w pracy szczepu drożdżowego; nie wiadomo czy jest to szczep typu *MATa* czy *MAT α* ,
- brak opisu używanych w pracy plazmidów; np. ważna jest informacja jakie jest pochodzenie plazmidu pHS313-HSP104, czy jest to plazmid centromeryczny czy wielokopijny, pod jakim promotorem został sklonowany gen *HSP104*; informacje te znalazłem dopiero w publikacji,
- str. 28, uracyl nie jest aminokwasem,
- str. 29, w sekwencji starterów do ukierunkowanej mutagenezy warto by zaznaczyć nukleotydy, które zostały zmienione w stosunku do sekwencji wyjściowej,
- brak informacji o przeciwciałach zastosowanych w analizie western blot,
- brak informacji o metodach statycznych użytych do analizy niektórych wyników (np. Ryc. 7.3),
- w rozdziale „Metody” nie jest cytowana żadna literatura źródłowa,
- brak konsekwencji w używaniu skrótów, np. raz jest stosowana pełna forma „minuta”, innym razem skrót „min”,
- zbyt częste i nie zawsze uzasadnione dzielenie tekstu na akapity,
- niefortunne sformułowania, np. preszok

- bibliografia nie została opracowana według jednego wzoru, np. część tytułów zapisana jest wielką literą, nie we wszystkich pozycjach podany jest numer wydania a tylko numer tomu, numery stron zapisane są również na kilka sposobów.

W konkluzji stwierdzam, że mgr Natalia Lipińska okazała się dojrzałą i samodzielną badaczką, która posiada szeroką wiedzę z zakresu biochemii i biologii molekularnej oraz swobodnie posługuje się różnorodnymi i zaawansowanymi technikami badawczymi, co zaowocowało uzyskaniem wielu ciekawych wyników, które istotnie wzbogaciły naszą wiedzę o mechanizmie działania białek opiekuńczych z rodziny Hsp100 i stanowią znaczący wkład w poznaniu podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym. Warto podkreślić, że uzyskane w tej pracy wyniki stały się podstawą publikacji naukowej w renomowanym czasopiśmie *The Journal of Biological Chemistry* (Tom 288, Nr 4, str. 2857-2869), a doktorantka jest pierwszym autorem tego artykułu.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska w pełni odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim i występuję do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Natalii Lipińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie recenzowanej pracy.



Prof. dr hab. Robert Wysocki