



Instytut Genetyki i Biotechnologii

**UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. PAWIŃSKIEGO 5A, 02-106 WARSZAWA

TEL: (+22) 592-22-44, FAX: (+22) 658-41-76

<http://www.igib.uw.edu.pl>



Warszawa, 04.11.2013

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Lipińskiej pt. „Nowe elementy regulatorowe dezagregujące białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Praca doktorska Pani mgr Natalii Lipińskiej dotyczy strukturalnych uwarunkowań regulacji aktywności drożdżowego białka Hsp104 przez oddziaływania jonowe pomiędzy resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi na pograniczu pierwszej domeny wiążącej nukleotydy oraz potencjalnej domeny regulatorowej (M). Praca wpisuje się w nurt badań nad funkcją białek opiekuńczych, w której to dziedzinie ośrodek z Uniwersytetu Gdańskiego cieszy się zasłużoną światową renomą. Białko Hsp104 pełni istotną rolę w reaktywacji białek zdenaturowanych w wyniku działania czynników stresowych (np. wysokiej temperatury), a także w utrzymywaniu struktury cytoszkieletu, propagacji białek prionowych oraz segregacji uszkodzonych białek podczas podziału komórki. Są to procesy o podstawowym znaczeniu biologicznym, jednak mechanizmy regulujące aktywność białka Hsp104, a w szczególności rola, jaką pełni w nich domena M i jej interakcje z domenami katalitycznymi nie zostały dotychczas zbadane. Temat pracy został zatem wybrany właściwie, gdyż dotyczy zagadnienia mieszczącego się w głównym nurcie badań biologii molekularnej, gdzie istnieją znaczące luki w wiedzy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma postać liczącego 85 stron (wraz z bibliografią) wydruku komputerowego i układ typowy dla takich opracowań. Rozpoczynający pracę wstęp omawia zagadnienia dotyczące ogólnej roli białek opiekuńczych oraz przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący struktury i funkcji białka Hsp104. We wstępie zabrakło mi jedynie przedyskutowania bardzo interesującej kwestii dystrybucji filogenetycznej ortologów Hsp104, które występują u bakterii, grzybów i roślin, brak ich jednak w komórkach zwierzęcych – jestem ciekaw tego, co na ten temat sądzi Doktorantka.

Informacje dotyczące wykorzystanych materiałów biologicznych, odczynników i metod badawczych wyodrębnione zostały w rozdziale „Materiały i metody”, który jest w zasadzie kompletny i wystarcza dla jednoznacznie pozytywnej oceny warsztatu metodycznego pracy. Nie znalazłem w nim jedynie informacji o przeciwciałach wykorzystywanych w metodzie Western Blot (np. ryc. 7.4 czy 7.21).

Opis uzyskanych wyników i omawiająca je zwięzła dyskusja zajmują większą część pracy. Podstawą do przeprowadzonych eksperymentów było modelowanie struktury Hsp104p *in silico* przeprowadzone w zespole, w którym pracowała Doktorantka (na wyróżnienie zasługuje to, że Doktorantka jasno przedstawia, które z wyników uzyskała samodzielnie, a które przy udziale współpracowników). Na podstawie tych analiz sformułowana została hipoteza o istotności oddziaływań jonowych pomiędzy resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi na pograniczu pierwszej domeny wiążącej nukleotyd oraz potencjalnej domeny regulatorowej (M). Hipoteza ta została przez Doktorantkę zweryfikowana przez konstrukcję szczepów wyrażających białka z wprowadzonymi metodą mutagenyzy ukierunkowanej podstawieniami aminokwasowymi w wytypowanych pozycjach. Fenotyp uzyskanych w ten sposób alleli okazał się niezwykle interesujący. Jeden z wariantów (D184K) okazał się być typowym mutantem utraty funkcji, natomiast fenotyp dwóch pozostałych (K358E i D484K) wyraźnie sugerował, że ich ekspresja jest dla komórek toksyczna, a niosące je plazmidy podlegają silnej selekcji negatywnej. Na podkreślenie zasługuje tu staranna i dogłębna ilościowa analiza genetyczna zjawiska eliminacji niosących te allele plazmidów z drożdży. Dalsze badania wykazały, że ekspresja tych alleli w istotny sposób zaburza morfologię komórek i organizację cytoszkieletu.

Przeprowadzone następnie bardzo wszechstronne i staranne analizy biochemicznych właściwości zmienionych wariantów Hsp104p wykazały, że zmutowane allele mają charakter hipermorficzny – kodowane przez nie białka wykazują nadmiernie wysoką aktywność, która jest toksyczna dla wyrażających je komórek. Podwyższona aktywność objawia się podwyższoną szybkością hydrolizy ATP, zwiększoną aktywnością dezagregacji chemicznie zdenaturowanych białek reporterowych, jak i zniesieniem zależności tej aktywności od obecności białek systemu Hsp40/70. Jest to niezmiernie interesujący wynik, gdyż prawdziwe mutacje hipermorficzne (gdzie aktywność produktu zmutowanego allelu wzrasta nie na skutek zwiększenia poziomu ekspresji, ale wzmocnienia aktywności białka) są w genetyce obserwowane stosunkowo rzadko.

Hipoteza, że za zmianę właściwości uzyskanych wariantów Hsp104p odpowiada zaburzenie oddziaływań jonowych, została następnie potwierdzona przez dalszą analizę, obejmującą wymianę reszt aminokwasowych uczestniczących w postulowanej sieci oddziaływań na aminokwasy pozbawione ładunku, co dało mniej wyraźny, lecz wciąż istotny efekt zwiększenia aktywności. Natomiast pełne przywrócenie oddziaływań przez wprowadzenie mutacji kompensujących dało efekt pseudorewersji i odtworzenie właściwości dzikiej formy białka. Przeprowadzona seria doświadczeń pozwoliła zatem na przekonujące wsparcie sformułowanej na początku hipotezy o znaczeniu wiązań jonowych tworzonych

przez wytypowane na podstawie modelowania struktury reszty aminokwasowe dla regulacji aktywności białka.

Uzyskane wyniki opisane są wyczerpująco i imponują wszechstronnością zastosowanych metod oraz konsekwencją w testowaniu stawianych hipotez. Wyniki uzyskiwane w kolejnych eksperymentach stanowią podstawę do uściślenia hipotez badawczych i projektowania dalszych eksperymentów, aż do zgromadzenia przekonujących dowodów wspierających wyjściową tezę. Nie mam w z związku z tym żadnych wątpliwości, że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat naukowy i wykazała się bogatą wiedzą w zakresie genetyki i biologii molekularnej, a także umiejętnością interpretowania uzyskiwanych rezultatów, stawiania kolejnych hipotez i projektowania dalszych eksperymentów. Liczne ilustracje pozwalają na stwierdzenie, że doświadczenia zostały przeprowadzone w sposób poprawny pod względem zastosowanych metod i interpretacji wyników oraz opatrzone niezbędnymi kontrolami. Odnosnie prezentowanych wyników mam jedynie kilka wymienionych poniżej pytań:

- W części 7.2 wpływ wprowadzonych mutacji był testowany w szczepie *hsp104Δ*. Interesujące byłoby też zbadanie fenotypu tych alleli w kontekście szczepu dzikiego, niosącego funkcjonalny gen *HSP104*. Jeżeli uzyskane allele mają charakter hipermorficzny, to fenotyp powinien być wówczas nawet silniejszy, niż w szczepie delecyjnym.
- Przy badaniu morfologii komórek i organizacji cytoszkieletu (ryc. 7.5 i 7.7) nie przedstawiono jako kontroli, jak wygląda pod tym względem fenotyp szczepu delecyjnego, który nie wyraża żadnego allelu *HSP104* – zilustrowano jedynie szczep dziki i szczepy wyrażające zmutowane warianty.
- Jeżeli obserwowany fenotyp mutantów związany jest z nadmierną aktywnością Hsp104p, to podobny obraz powinno się uzyskać przy nadekspresji dzikiego wariantu genu (np. z plazmidu o wysokiej liczbie kopii) – czy dostępne są wyniki takiego doświadczenia?
- Na Ryc. 7.11, 7.13, 7.15, 7.17, 7.19, 7.24, 7.28 na wykresach brakuje słupków błędów (lub odchyień), choć stosowane metody pozwalają na ich uzyskanie (np. ryc. 7.3, 7.9). Jest to tym bardziej dziwne, że w wersji, która trafiła do publikacji (Lipińska i wsp. 2013) słupki błędów na tych samych wykresach są zamieszczone.

Pracę zamyka zwięzła (8 stron) dyskusja. Wszystkie opisane w rozprawie wyniki zostały właściwie przedyskutowane, częściowo na bieżąco w sekcji „Wyniki”, a częściowo w dyskusji. Dyskusja zawiera też ogólne podsumowanie uzyskanych rezultatów w kontekście aktualnego stanu wiedzy i postulowany model wyjaśniający mechanizmy regulacji aktywności białka Hsp104. Mam jednak wątpliwości co do tego,

czy właściwe jest zamieszczanie w dyskusji kolejnych wyników eksperymentalnych i surowych danych, np. testów wzrostowych czy obrazów żeli (Ryc. 8.2, 8.5, 8.6, 8.7 i 8.8). Rozumiem, że zamiarem Autorki było wyodrębnienie w ten sposób rezultatów eksperymentów wykonanych przez innych członków zespołu badawczego, jednak taki sposób prezentacji nie jest zgodny z powszechnie przyjętymi zasadami, mówiącymi iż w dyskusji należy unikać wprowadzania nowych wyników. Właściwsze byłoby raczej dodanie do sekcji „Wyniki” rozdziału przedstawiającego istotne rezultaty uzyskane przez innych członków zespołu (tak, jak zrobiono to dla otwierających tę sekcję wyników modelowania), a ograniczenie sekcji „Dyskusja” do podsumowania i omówienia znaczenia zebranych wyników.

Wymienione w recenzji uwagi nie wpływają jednak na zasadniczą, wysoce pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej. Dodatkowym i bardzo dobitnym potwierdzeniem wartości naukowej przedstawionych badań jest publikacja w renomowanym czasopiśmie *The Journal of Biological Chemistry*, w której Doktorantka jest pierwszą autorką.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Natalii Lipińskiej zatytułowana „Nowe elementy regulatorowe dezagregującego białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, spełnia zawiązki wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych z dnia 18 marca 2011, i może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Lipińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Paweł Golik
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Wydział Biologii U.W.