



UNIwersytet GDAŃSKI



Gdańsk, 26.05.2017r.

Dr hab. Robert Czajkowski
 Katedra Biotechnologii
 Międzyuczelniany
 Wydział Biotechnologii
 UG i GUMed
 Tel: +48 58 5236329
 Fax: +48 58 5236426
 E-mail: Robert.czajkowski@biotech.ug.edu.pl

Strona | 1

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Gumowskiego zatytułowanej:
 "Specyficzność substratowa białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*", wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Krzysztofa Liberka**

Bez białek życie jakie znamy, prowadzimy i badamy nie mogłoby istnieć. Białka występują we wszystkich komórkach wszystkich organizmów żywych i pełnią w nich różnorakie funkcję, istotne dla wszystkich procesów metabolicznych.

Przeszło pół wieku temu, w 1962 roku włoski badacz Ferruccio Ritossa zaobserwował, (dzisiaj określane jako charakterystyczne), pęcznienie chromosomów muszki owocowej (*Drosophila melanogaster* Meigen) w odpowiedzi na szok temperaturowy, doprowadzając w ten sposób do odkrycia białek nazwanych białkami szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*). Dzisiaj wiadomo, że indukcja syntezy białek szoku termicznego następuje nie tylko w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę, ale także w różnych warunkach stresowych, jak niedotlenienie, niedokrwienie, promieniowanie UV, obecność wolnych rodników, czy ekspozycja na substancje chemiczne albo kombinację tych czynników. Niektóre białka szoku termicznego posiadają właściwości białek opiekuńczych i zaliczają się do tej grupy.

Wszystkie do tej pory scharakteryzowane białka opiekuńcze są ewolucyjnie konserwowane co oznacza, że nie tylko prawdopodobnie pojawiły się w toku ewolucji relatywnie wcześnie, ale też, że bardzo wolno ewoluują, bo nagłe zmiany w ich sekwencji kodującej, a co za tym idzie, w ich strukturze przestrzennej i aktywności komórkowej, powstające spontanicznie na drodze mutacji, są najczęściej letalne. Wysoka niezmiennosc sekwencji kodujących białek opiekuńczych stanowi dowód na udział tych białek w najbardziej elementarnych dla życia funkcjach i procesach. I tak, białka opiekuńcze pełnią kluczową rolę w komórkowych procesach związania się nowo syntetyzowanych polipeptydów w natywne białka, kontroli utrzymywania poprawnej konformacji przestrzennej białek już powstałych i obecnych w komórce, dezagregacji białek o konformacjach innych niż natywne i proteolizie białek obecnych w komórce, których konformacje z różnych względów, nie mogą zostać naprawione.

Co warto dodatkowo podkreślić, utrata natywnej (oczekiwanej) funkcji danego białka w komórce w wyniku nieprawidłowego związania się łańcucha polipeptydowego prowadzi nie tylko, do utraty funkcji tego białka (co można założyć wprost), ale może wywierać także inne,

MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII UG i GUMed

ul. Antoniego Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

tel. +48 58 523 63 20, fax. +48 58 523 64 30, e-mail: dziedkanat@biotech.ug.edu.pl





niebezpośrednie efekty w komórce, np. poprzez oddziaływanie z innymi białkami, zaburzać inne szlaki metaboliczne i procesy. Również z tego względu funkcja białek opiekuńczych jako systemu kontroli zwijania się białek w komórce jest niezwykle istotna.

W komórkach organizmu modelowego drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen) współpraca białek opiekuńczych z rodzin Hsp70 i Hsp100 odgrywa kluczową rolę w ochronie tych komórek przed efektami stresu prowadzącego do rozfałdowania i agregacji białek. Białko Hsp104 należy do rodziny heksamerycznych AAA⁺-ATPaz Hsp100/ClpP i jest przedmiotem badań od więcej niż dziesięciu lat, kiedy to Susan Lindquist z University of Chicago, USA w publikacji w czasopiśmie Cell w 1998 zaprezentowała dowody na poparcie tezy o zdolności białka Hsp104 do rozwijania agregatów białkowych. Co warto podkreślić, funkcją białka Hsp104 nie jest kontrola zwijania się białek powstających w fizjologicznych warunkach wzrostu komórek drożdży, ale właśnie dezagregacja białek, powstających w warunkach stresowych.

Przedłożona do recenzji Rozprawa Doktorska Pana mgr Krzysztofa Gumowskiego, wykonana pod kierunkiem Pana Prof. Krzysztofa Liberka w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku, podejmuje temat analizy specyficzności substratowej białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *S. cerevisiae*, a poprzez analizę substratów (partnerów interakcyjnych) białka Hsp104, określenia funkcji komórkowych tego białka, innych niż dezagregacja agregatów białek powstających w wyniku działania szoku termicznego i agregatów prionowych. Chociaż podstawowa funkcja białka Hsp104 była i jest przedmiotem wielu badań i została dobrze poznana i scharakteryzowana w literaturze, ciągle niewiele jest wiadomo o innych niż dezagregacja rolach białka Hsp104 w komórce i dlatego temat podjęty przez Doktoranta uważam za istotny i nowatorski.

Rozprawa doktorska Pana Krzysztofa Gumowskiego została przygotowana w języku polskim i ma klasyczną i przyjętą formę dla tego typu opracowań naukowych. Składa się z 98 stron, na których kolejno Autor przedstawia rozdziały pracy takie, jak Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Bibliografię i dodatkowy Załącznik, zawierający listę genów, których produkty zostały zidentyfikowane, jako białka oddziałujące z białkiem Hsp104 w eksperymentach immunoprecypitacji kompleksów białkowych. Ponadto, rozprawa doktorska jest bogato ilustrowana (zawiera 32 ryciny i 3 tabele) i obejmuje 68 pozycji literatury, licznie cytowanych w tekście.

Streszczenie - zawiera syntetyczne omówienie celu pracy, zastosowanych metod i otrzymanych wyników, oraz krótkie podsumowanie najważniejszych obserwacji i wniosków

Wstęp - wprowadza czytelnika w zagadnienia syntezy i zwijania się białek w komórkach eukariotycznych, przedstawia rolę systemów kontroli poprawności fałdowania białek w komórkach (rola białek opiekuńczych) w posttranslacyjnej kontroli jakości białek, opisuje szlaki degradacji białek niepoprawnie sfalutowanych i rolę białek opiekuńczych w trakcie szoku termicznego. Ponadto, Autor przedstawia w tym rozdziale wpływ jaki wywierają białka opiekuńcze na priony oraz krótko sygnalizuje i przedstawia funkcje białka Hsp104 niezwiązane z dezagregacją agregatów białkowych. Doktorant bardzo dobrze opisuje dotychczasowy stan wiedzy i wynikające





z niego nowe pytania badawcze, które będzie później definiował dokładnie w następnym rozdziale pracy. Nie mam żadnych krytycznych uwag merytorycznych do tego rozdziału.

Cel pracy - jest przedstawiony w sposób syntetyczny i klarowny

Materiały i Metody - rozdział ten składa się z dwóch logicznie po sobie następujących i spójnych podrozdziałów (podrozdział Materiały i podrozdział Metody), które w sposób niezwykle jasny i bardzo szczegółowy przedstawiają opisy wszystkich materiałów i metod wykorzystywanych w pracy doktorskiej. Dokładne i rozbudowane opisy przeprowadzonych doświadczeń uwidaczniają dodatkowo ogrom pracy włożonej przez Doktoranta w przygotowanie eksperymentów, a liczne kontrole na prawie każdym etapie, każdego doświadczenia, pokazują dodatkowo wysoką skrupulatność i jakość pracy oraz dbanie o takie przygotowanie doświadczeń, aby otrzymane wyniki były jednoznaczne. Takie podejście do przygotowania doświadczeń zasługuje na duże uznanie. Rozdział ten jest w dużej mierze wyczerpujący.

Strona | 3

- Pojawia się tutaj pytanie o zastosowaną metodę statystyczną (i określenie istotności statystycznej otrzymanych wyników analizy różnicowej proteomu drożdży) w analizach danych otrzymanych ze spektrometrii mas (Rozdział Materiały i Metody 3.2.13.4, strona 43 rozprawy doktorskiej). Ponieważ metody statystyczne nie są opisane w tej części pracy, proszę Doktoranta o komentarz wyjaśniający wybór i zastosowane metod statystycznych do analiz wyników otrzymanych z analizy różnicowej proteomu drożdży.

Wyniki - ta część pracy obok rozdziału Dyskusja, jest najbardziej interesującym fragmentem pracy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Gumowskiego. Rozdział ten, (choć Autor tylko sygnalizuje to w tekście), można podzielić na dwie odrębne części, którymi są: **część pierwsza** - przygotowanie tzw. warsztatu pracy, czyli wszystkich niezbędnych konstruktów i eksperymentów dodatkowych (kontrolnych), których wyniki wydają się być kluczowe dla wnioskowania w następnych doświadczeniach, oraz **część druga** - w której, Autor przeprowadza eksperymenty, mające już na celu określenie potencjalnych substratów białka Hsp104 (partnerów interakcyjnych) w komórkach drożdży.

W tym rozdziale (w części pierwszej) w zależności od postawionego szczegółowego pytania badawczego, Doktorant, wykorzystuje hiperaktywne mutanty białka Hsp104 (Hsp104 K358E i Hsp104 D484K) z mutacjami pojedynczych aminokwasów w pozycjach 358 (zamiana lizyny na kwas glutaminowy) i 484 (zamiana kwasu asparaginowego na lizynę) w regionie regulatorowym, aby określić toksyczność hiperaktywnych wariantów białka Hsp104 w komórce. Kontrolowaną ekspresję genów kodujących białko Hsp104 lub kodujących hiperaktywne wersje tego białka: Hsp104 K358E i Hsp104 D484K umieszczonych pod indukowanym promotorem i dostarczonych na plazmidzie do komórek drożdży *Δhsp104* w celu określenia, czy i w jaki sposób te warianty mogą wpływać na wzrost komórek w warunkach umiarkowanego stresu termicznego. Doktorant zaplanował także eksperyment, w którym sprawdził stabilność białka Hsp104 i jego hiperaktywnego mutantu Hsp104 D484K *in vivo*, w celu określenia mechanizmu obniżenia stężenia białka Hsp104 D484K w komórkach względem stężenia białka Hsp104 typu dzikiego, co pozwoliło





między innymi ustalić, że mutacja D484K nie wpływa znacząco na skłonność białka Hsp104 do agregacji. Doktorant zbadał także kinetykę degradacji białka Hsp104 i jego wariantu D484K w komórce, przy pomocy eksperymentu typu „cycloheximide chase” i wykazał, że wariant Hsp104 D484K ulega degradacji w sposób zbliżony do tempa degradacji białka Hsp104 typu dzikiego. W badaniach termotolerancji, Autor wykonał doświadczenia, mające na celu wykazanie jak krótko- i długotrwały szok termiczny będą wpływały na fenotyp: (1) drożdży niosących gen kodujący białko Hsp104 typu dzikiego na chromosomie, (2) pod indukowanym promotorem na plazmidzie w szczepie $\Delta hsp104$ lub (3) gen kodujący białko Hsp104 D484K pod indukowanym promotorem na plazmidzie w szczepie $\Delta hsp104$. Wyniki tego eksperymentu pokazały, że ekspresja genu *hsp104 D484K* w trakcie szoku termicznego może mieć pozytywny wpływ na przeżywalność komórek drożdży.

Wyniki całościowe zebrane w tej części (część pierwsza: wyniki wstępne do pracy właściwej) pozwoliły bardzo dokładnie określić cechy białka Hsp104, które mogą być użyteczne w scharakteryzowaniu substratów białka Hsp104, które to wyniki przedstawia w dalszej części rozdziału (część druga).

W części drugiej rozdziału Wyniki, Doktorant skupił się na dwóch strategiach badawczych poszukiwania substratów białka Hsp104 to jest: (1) wykorzystania immunoprecypitacji kompleksów Hsp104 z substratami oraz (2) identyfikacji substratów białka Hsp104 w analizie porównawczej proteomu drożdży z wykorzystaniem spektrometrii mas ze znakowaniem próbek białek stabilnymi izotopami pierwiastków, w celu ilościowego oszacowania zmiany mas peptydów powstałych w wyniku proteolizy (metoda SILAC - ang. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* - znakowanie izotopami poprzez wbudowywanie aminokwasów w białka w trakcie hodowli). Również w tej części pracy, Autor przeprowadził szereg eksperymentów przygotowawczych, np. skonstruował białka fuzyjne Hsp104-GFP i Hsp104 D484F - GFP, gdzie białko zielonej fluorescencji pełniło rolę znacznika, dla którego istnieją i są komercyjnie dostępne wysoce specyficzne przeciwciała. Eksperymenty te dowiodły, że białko fuzyjne Hsp104-GFP zachowuje funkcję białka Hsp104 typu dzikiego i że obecność znacznika nie wpływa na jego stabilność, ani nie powoduje toksyczności (obserwowanej w przypadku białka Hsp104 D484K-GFP). Z tego względu, białko fuzyjne mogło zostać wykorzystane w eksperymentach immunoprecypitacji kompleksów białek Hsp104 i jego substratów. Drugie podejście badawcze polegało na wykorzystaniu tzw. modułowej proteazy białka Hsp104 (mutanta Hsp104 HAP). Mutant Hsp104 HAP powstał w ramach pracy zespołu Prof. Bukau na Uniwersytecie w Heidelbergu, w Niemczech, poprzez wprowadzenie do białka Hsp104 motywu aminokwasowego z białka ClpA, który umożliwił oddziaływanie białka Hsp104 z bakteryjną proteazą ClpP - powodując powstanie modułowej proteazy (HAP/ClpP) o specyficzności substratowej białka Hsp104, która nie ma zdolności dezagregacji kompleksów białek, ale może hydrolizować białka w komórce. Doktorant przygotował konstrukt kodujący białko fuzyjne HAP-GFP, umieścił ten konstrukt na plazmidzie pod kontrolą indukowanego promotora i wprowadził do komórek *S. cerevisiae* $\Delta hsp104$, a następnie zbadał czy ten wariant białka powstaje w komórkach drożdży hodowanych na podłożu indukującym ekspresję. Co więcej, w kilku następnych eksperymentach bardzo dokładnie zbadał, czy białko fuzyjne HAP-GFP jest białkiem, pełniącym funkcje analogiczne, jak białko Hsp104 typu dzikiego i otrzymał wyniki, które potwierdziły, że wprowadzone mutacje punktowe w białku Hsp104 (powodujące powstanie



wariantu HAP), jak i dołączenie znacznika GFP nie wpłynęły na funkcjonalność tego białka w komórkach drożdży. W kolejnych eksperymentach Autor zbadał interakcję białka Hsp104-GFP i białka HAP-GFP z białkiem ClpP i otrzymał wyniki, sugerujące, że obecność białka ClpP nie wpływa na stężenie ani białka Hsp104-GFP ani białka HAP-GFP w komórce.

Ostatnim i najważniejszym doświadczeniem przeprowadzonym przez Doktoranta była analiza różnicowa proteomu drożdży, to jest identyfikacja białek, których stężenie ulega zmniejszeniu w obecności proteazy modułowej HAP/ClpP względem sytuacji, w której w komórkach drożdży jest obecne białko Hsp104 typu dzikiego. Wykorzystał w tym celu metodę SILAC i analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas. W eksperymentach tych, mgr Gumowski używał podłoży wzrostowych dla drożdży z wyznakowaną izotopem ^{15}N lizyną albo hodował kultury drożdży na podłożach z lizyną niezmodyfikowaną (niewyznakowaną izotopem azotu ^{15}N). W badaniach tych, drożdże z genem kodującym białko Hsp104 typu dzikiego rosły na podłożu z niewyznakowaną lizyną, natomiast drożdże z genem kodującym białko HAP rosły na podłożu z lizyną wyznakowaną ciężkim azotem (^{15}N). Następnie Doktorant przygotował lizaty komórkowe drożdży z kultur rosnących w różnych warunkach, lizaty te zmieszał w stosunku 1:1 i przygotował próby (redukcja wiązań dwusiarczkowych, alkilacje grup tiolowych i trawienie białek na peptydy za pomocą proteazy Lys-C) do dalszych analiz. Przygotowane peptydy zostały poddane analizom z wykorzystaniem mikrokapilarnej chromatografii odwróconej fazy, jonizacji za pomocą metody elektrospreju i tandemowej spektrometrii mas. W wyniku przeprowadzenia tych eksperymentów,

- **nasuwa się tutaj pytanie, czy możliwe byłoby zastosowanie odwrotnej strategii badawczej: mianowicie czy można byłoby zaproponować eksperyment, w którym to drożdże z genem kodującym białko Hsp104 typu dzikiego rosną na podłożu z lizyną wyznakowaną izotopem azotu, a drożdże z genem kodującym białko HAP rosną na podłożu z lizyną niewyznakowaną ciężkim azotem? Czy wyniki takiego eksperymentu, mogłyby służyć za niezależne potwierdzenie rezultatów otrzymanych w eksperymencie przeprowadzonym przez Doktoranta?**

W eksperymentach tych, Autor założył, że aby zakwalifikować białko proteomu drożdży jako substrat (partner interakcyjny) białka Hsp104, białko to musiało zostać zidentyfikowane niezależnie przynajmniej na podstawie trzech peptydów i przynajmniej w dwóch z trzech eksperymentów, a stężenie takiego białka musiało zostać obniżone przynajmniej o 20% jego stężenia początkowego.

- **Proszę Doktoranta o komentarz, czy takie założenia wynikają z wcześniejszych danych eksperymentalnych, czy są warunkami ustalonymi teoretycznie dla tych doświadczeń?**

Autor zidentyfikował 3462 białka, co jak sam napisał stanowi około 52% proteomu *S. cerevisiae*.

- **Czy Doktorant mógłby skomentować, dlaczego z zastosowaną metodą udało się zidentyfikować tylko około połowę białek występujących w proteomie drożdży? I czy takie „pokrycie” proteomu w eksperymencie jest wystarczające, żeby**

wnioskować o partnerach interakcyjnych białka Hsp104 i jego funkcjach innych niż dezagregacja?

Doktorant zidentyfikował 64 białka jako substraty (partnerzy interakcyjni) białka Hsp104, między innymi, białka metabolizmu podstawowego (5 białek). Wyniki prezentuje Tabela 1 na stronie 64 rozprawy doktorskiej, która zawiera nazwy genów kodujących białka, razem z procentowym oszacowaniem stosunku stężeń każdego białka w komórkach drożdży z fenotypem HAP/ClpP względem drożdży z fenotypem Hsp104 typu dzikiego.

Strona | 6

- Analizę tabeli niewątpliwie ułatwiłoby zamieszczenie w niej nazw białek razem z ich funkcją komórkową (a nie tylko skrótów nazw genów). Podobnie, na tym etapie, Doktorant mógłby pogrupować geny/białka w Tabeli 1 w grupy funkcjonalne.

Doktorant zidentyfikował między innymi 5 białek metabolizmu podstawowego jako substraty białka Hsp104 (wyniki prezentuje Tabela 2 na stronie 65).

- W Tabeli tej Doktorant podaje dla genu *MSC1*: w kategorii: lokalizacja i funkcja - określenie: nieznana, chociaż baza danych *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (www.yeastgenome.org) dla tego genu (*MSC1*, *YML128C*) podaje lokalizację: mitochondria - proszę Doktoranta o komentarz.

W dalszych badaniach, Autor analizuje i porównuje swoje wyniki z danymi zgromadzonymi w bazach danych *Panther Classification System* oraz *Gene Ontology* i na tej podstawie próbuje zdefiniować szlak metaboliczny, w którym substraty białka Hsp104 znalezione przez Doktoranta w prowadzonych przez niego badaniach, mogą brać udział. Taka strategia pozwoliła na wyszczególnienie aż 8 możliwych szlaków metabolicznych, ale bez wskazania na jeden główny. Wskazuje to, że substraty białka Hsp104 biorą udział w wielu bezpośrednio niepowiązanych funkcjonalnie procesach metabolicznych albo, że z uwagi na „pokrycie” proteomu drożdży tylko w 52%, żaden szlak metaboliczny nie jest dostatecznie istotnie reprezentowany. W dalszej części pracy Doktorant analizuje właściwości wyselekcjonowanych substratów białka Hsp104 pod kątem ich lokalizacji komórkowej, właściwości fizyko-chemicznych, stabilności konformacyjnych i innych.

Analiza potencjalnych substratów białka Hsp104, które Doktorant opisał w swoich badaniach, prowadzona z wykorzystaniem programów bioinformatycznych (*in silico*) pozwoliła Doktorantowi na wnioskowanie o komórkowej lokalizacji interakcji białka Hsp104 i jego substratów. I tak, (1) największą pulę substratów dla białka Hsp104 stanowiły białka mitochondrialne i białka cytoplazmatyczne (choć białko Hsp104 jest uznawane za białko cytoplazmatyczne, które może być transportowane do jądra komórkowego, ale nie jest uznawane za białko mitochondrialne), (2) białka te w przeważającej większości tworzą natywnie funkcjonalne podjednostki kompleksów białkowych albo oligomery w komórce, (3) większość substratów Hsp104 to białka o małej masie.

- W tym wypadku Doktorant, jak sam pisze, posłużył się analizą statystyczną częstości występowania białek w zakresie mas co 10 kDA, co rodzi pytanie o metodę statystyczną, którą zastosował. Proszę Doktoranta o przybliżenie tej metody i jej syntetyczne omówienie.

(4) białko Hsp104 ma preferencję względem białek hydrofilnych, a nie hydrofobowych, a także (5) substraty białka Hsp104 posiadają mniej krótkich rejonów nieuporządkowanych niż inne białka komórkowe *S. cerevisiae*. Te dane zostały przez Doktoranta dodatkowo potwierdzone analizami kompleksów białka Hsp104 z białkami komórkowymi drożdży z wykorzystaniem metody immunoprecypitacji i znacznika GFP jako partnera interakcji dla używanych przeciwciał. Używając takich samych jak w analizach proteomicznych kryteriów identyfikacji białek, Doktorant zidentyfikował 488 białek, z czego 4, były białkami wspólnymi dla obu analiz (Tabela 3, strona 72). Taka rozbieżność wyników, jak sugeruje sam Autor, może wynikać z faktu (bardzo możliwe, że tak właśnie jest), że nie każde białko, które oddziałuje z białkiem Hsp104 w komórce, musi być jego substratem.

Dyskusja - ten rozdział rozprawy doktorskiej jest, obok części Wyniki, najbardziej interesujący. Doktorant krytycznie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi. Dyskusja ma logiczny i spójny bieg, jest napisana w sposób czytelny, co uwidacznia bardzo dobrą znajomość tematyki badawczej Doktoranta. Autor najpierw dyskutuje wyniki doświadczeń wstępnych, służących do przygotowania tzw. warsztatu badawczego, a później wyniki otrzymane w eksperymentach już właściwych, bezpośrednio związanych z celem badawczym. Dyskusja kończy się podsumowaniem, w którym Doktorant jednoznacznie wskazuje następne problemy i cele badawcze, które zostały zdefiniowane w oparciu o prezentowaną pracę. Dobór literatury jest więcej niż poprawny, co więcej, publikacje cytowane przez Autora są aktualne (ostatnia z 2016 roku), co oznacza, że Autor na bieżąco śledzi literaturę w temacie rozprawy doktorskiej oraz adekwatnie modyfikuje swoją pracę naukową poprzez analizy prac badawczych innych grup na świecie. Liczba cytowanych prac w rozdziale Dyskusja może być przez kogoś uznana za zbyt małą, wynika to jednak tylko i wyłącznie z faktu, niewielkiej liczby badań nad innymi funkcjonalnościami białka Hsp104, co dodatkowo podkreśla istotność prowadzonych przez Doktoranta badań. Podsumowując, uważam, że dyskusja wyników jest przeprowadzona w sposób prawidłowy i rzetelny.

Bibliografia (literatura) - rozdział zawiera spis 68 pozycji literaturowych. Jako recenzent nie znalazłem publikacji będących na tej liście, które nie byłyby cytowane w tekście, albo odwrotnie takich, które są cytowane, ale nie znajdują się na tej liście.

Przygotowanie rozprawy doktorskiej i uwagi edytorskie - Pod względem przygotowania edytorskiego i graficznego, a także używanego przez Doktoranta języka, oceniam pracę bardzo wysoko. Jednakże, Doktorant nie ustrzegł się w kilku miejscach używania tzw. żargonu laboratoryjnego i określił mało precyzyjnych np. strona 32 - „termocykler został ustawiony”, strona 43 - „wytworzenie wyników”, strona 53 „dzika wersja genu”, strona 76 „stworzyłem gen” i

parę innych. Doktorant również, muszę przyznać, że z niesamowitą konsekwencją i uporem, używa w treści rozprawy doktorskiej błędnego sformułowania „ilość” do kategoryzacji rzeczowników policzalnych. Czasami też „ilość” oznacza „stężenie” jakiegoś białka, ale również czasami odnosi się w treści pracy do „liczby” np. białek czy też innych czynników np. doniesień literaturowych (strona 81).

- Dlatego bardzo proszę Doktoranta o wskazanie liczby błędnego użycia określenia „ilość” i komentarz wyjaśniający.

Strona | 8

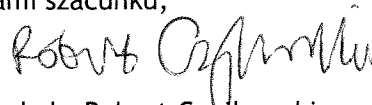
Z całą stanowczością podkreślam, że te drobne uchybienia edytorskie nie wpływają na merytoryczną jakość pracy naukowej Doktoranta, którą oceniam bardzo wysoko, i zostały przywołane przeze mnie w tej recenzji tylko i wyłącznie z uwagi na obowiązki recenzenta.

Podsumowanie i Wniosek Końcowy:

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Gumowskiego stanowi oryginalny i ważny wkład Autora w tematykę badań białek opiekuńczych, a szczególnie w tematykę analiz funkcjonalności białka Hsp104. Praca doktorska została prawidłowo i merytorycznie zaplanowana, przedstawia spójny ciąg myślowy, oraz prowadzi do istotnych odkryć. Autor posłużył się w swojej pracy szerokim warształem metodycznym z zakresu biologii molekularnej i mikrobiologii. A jakość przeprowadzonych badań pozwala stwierdzić, że Autor cechuje się dużą biegłością w stosowaniu tego warsztatu. Jak każda dobra praca naukowa, także ta, pozwala na wyznaczenie nowych celów badawczych i analizę nowych problemów naukowych.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311), dlatego też, wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Gumowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



Dr hab. Robert Czajkowski