



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

INSTYTUT BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ

ul. Kanonia 7/5
50-128 Wrocław

tel. 71 345 4118

fax 71 345 4118

do@uni.wroc.pl | www.uni.wroc.pl

Dziękuję MWB LG i GUMed

Wpłynęło dnia 12.07.2017

L.dz. nr 18/2017

Wrocław, 12 lipca 2017 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Krzysztofa Gumowskiego
pt. „Specyficzność substratowa białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży
Saccharomyces cerevisiae” wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa
Liberka w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej na Międzyuczelnianym
Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego**

Rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Gumowskiego dotyczy poszerzenia wiedzy o fizjologicznych funkcjach białka opiekuńczego Hsp104 w komórkach modelowego organizmu drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Wiadomo, że białko Hsp104 pełni funkcję dezagregazy i uczestniczy w oddzielaniu od agregatów białkowych pojedynczych rozfałdowanych polipeptydów, które mogą być ponownie sfałdowane lub zdegradowane. Do tej pory wykazano rolę Hsp104 w dezagregacji agregatów białkowych powstających w wyniku szoku cieplnego oraz we fragmentacji i dziedziczeniu agregatów prionowych. Na podstawie doniesień literaturowych o zaangażowaniu Hsp104 u drożdży w asymetryczne dziedziczenie uszkodzonych białek między komórką matczyną a komórką potomną w czasie pączkowania Pan Krzysztof Gumowski podjął się identyfikacji substratów Hsp104 w warunkach fizjologicznych. Biorąc pod uwagę stale rosnącą ilość danych o kluczowej roli zaburzeń proteostazy w procesach starzenia, chorobach neurodegeneracyjnych i szeregu innych, realizacja takiego tematu wpisuje się w aktualne trendy badawcze i może mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne i medyczne.

W celu identyfikacji nowych substratów Hsp104 Autor pracy wykorzystał mutantą Hsp104 HAP zdolnego do interakcji z bakteryjną proteazą ClpP. W rezultacie jednoczesnej ekspresji obu białek w komórkach drożdży powstała modułowa proteaza o specyficzności substratowej białka Hsp104. Wykonane przez Doktoranta porównawcze analizy proteomiczne o charakterze ilościowym pozwoliły na wytypowanie puli 64 białek, potencjalnych fizjologicznych substratów białka Hsp104, na podstawie znaczącego obniżenia ich ilości w komórkach po ekspresji modułowej proteostazy Hsp104 HAP/ClpP w porównaniu do komórek typu dzikiego w normalnych warunkach hodowli. Na podstawie analizy in silico Autor pracy wysnuł wniosek, że substratami dla Hsp104 są głównie białka



cytosolowe i mitochondrialne, o stosunkowo małej hydrofobowości i bardziej ustrukturyzowane, tworzące często kompleksy i multimery oraz biorące udział w przemianach energetycznych.

W pierwszym rozdziale w oparciu o najnowsze dane literaturowe Doktorant opisał szczegółowo aktualny stan wiedzy o komórkowych mechanizmach zapewniających homeostazę białek, ze szczególnym uwzględnieniem roli białek opiekuńczych w fałdowaniu polipeptydów, kontroli jakości i degradacji białek w stanach fizjologicznych oraz podczas stresu cieplnego. Rozdział ten stanowi doskonale wprowadzenie do problematyki rozprawy i stanowi właściwie gotowy materiał na pracę przeglądową, także ze względu na starannie opracowane ilustracje, ale po uwzględnieniu poniższych uwag. W rozdziałach dotyczących roli białek opiekuńczych w trakcie szoku cieplnego oraz we fragmentacji fibryli prionowych (str. 19-25) w tekście nie jest cytowana literatura źródłowa, nie licząc odnośników w opisie rycin. Ponadto w legendzie do ryciny nr 3 stosowana jest nomenklatura białek szoku cieplnego w oparciu o nazwy rodzin, odpowiednio Hsp40, Hsp70 i Hsp90, natomiast na rysunku są podane nazwy własne białek drożdżowych i nie wiadomo jakim rodzinom białek Hsp one odpowiadają; te informacje są podane w tekście znacznie dalej. Podobnie na rycinie nr 8 jest białko Hsp104, a w opisie stosuje się nazwę Hsp100, a na rycinie nr 13 (w rozdziale Wyniki) jest odwrotnie: na rycinie jest Hsp100, a w opisie rysunku jest Hsp104. Dla osoby, która nie jest specjalistą w tej dziedzinie jest to dosyć mylące.

Cel pracy sformułowano jasno i jednoznacznie oraz zgodnie z tematem rozprawy. W kolejnym rozdziale zatytułowanym Materiały i Metody opisano dokładnie i wyczerpująco używane w pracy szczepy, plazmidy, startery i przeciwciała oraz wszystkie stosowane metody genetyczne, biochemiczne i proteomiczne. W tej części brakuje mi tylko informacji w jakich rozcieńczeniach używano przeciwciał, ile razy powtarzano analizy Western blot dla różnych form białka Hsp104 oraz jak długo trwała inkubacja komórek drożdży w temp. 42°C podczas procedury transformacji.

Wyniki uzyskane w pracy opisane są jasno i precyzyjnie, każdy etap badań jest szczegółowo uzasadniony, zarówno w zakresie strategii badawczej, wyboru materiału jak i techniki badawczej, a wyciągane wnioski są poprawne. Uzyskane w pracy dane przedstawiono w postaci czytelnych rycin i tabel, ich jakość nie budzi zastrzeżeń. Mam tylko uwagę do opisu rycin nr 15, 20 i 23, w których napisano nieprecyzyjnie, że komórki były wysiewane na płytki SC (-Ura) bez lub z galaktozą, a powinno być na płytce SC z dodatkiem glukozy lub galaktozy jako źródła węgla. W wersji zawartej w pracy nie wiadomo wprost co jest źródłem węgla na pożywce minus galaktoza. Z drugiej strony zapis minus/plus galaktoza może sugerować, że w obu przypadkach została zastosowana standardowa pożywka minimalna z glukozą z dodatkiem galaktozy lub bez galaktozy. Odnośnie danych dotyczących ekspresji różnych form białka Hsp104 przy jednoczesnej

ko-ekspresji proteazy ClpP mam pytanie czy monitorowano poziom ekspresji tego bakteryjnego białka w komórkach drożdży? Rycina nr 18 przedstawiająca przeżywalność szczepów drożdżowych po zastosowaniu szoku cieplnego powinna być uzupełniona o analizę statystyczną. Analizując wyniki proteomiczne Autor pracy pisze raz o identyfikacji 64 substratów Hsp104, a innym razem mówi o potencjalnych substratach białka Hsp104. Na tym etapie badań ta druga wersja wydaje mi się poprawna. W związku z tym mam pytanie do Autora pracy: jakie eksperymenty powinny być wykonane, żeby sprawdzić czy zidentyfikowane w pracy białka są "bone fide" substratami Hsp104?

Pierwsza część rozdziału Dyskusja poświęcona jest analizie funkcjonalnej hiperaktywnego mutantu Hsp104 D484K, a Doktorant stara się znaleźć odpowiedź na pytanie dlaczego nie udało się uzyskać zadawalającego poziomu ekspresji tego wariantu. Ze względu na brak zaburzeń strukturalnych oraz zmian w tempie degradacji czy zwiększonej agregacji, Autor stawia hipotezę, że hiperaktywne białko Hsp104 D484K wpływa negatywnie na proces transkrypcji. Mam w związku z tym pytanie do Autora pracy jak w sposób eksperymentalny można by przetestować tę hipotezę. W Dyskusji odniesiono się też do wyników Jackrel'a i wsp. (Cell, 2014), którzy również skonstruowali hiperaktywne mutanty Hsp104 A503V oraz A503S, a ich ekspresja nie była toksyczna w temperaturze permissyjnej. Zastanawiam się czy Doktorant nie próbował wykorzystać takich mutantów w swojej pracy badawczej. W drugiej części Dyskusji Doktorant analizuje cechy wspólne zidentyfikowanych przez siebie potencjalnych substratów białka Hsp104 i biorąc pod uwagę wyniki własne oraz najnowsze dane literaturowe stawia interesującą hipotezę o fizjologicznej roli Hsp104 w dezagregacji oksydacyjnie uszkodzonych białek cytosolowych i mitochondrialnych będących efektem starzenia się komórek drożdży, a także wskazuje jakie eksperymenty mogłyby zweryfikować tę hipotezę. W tym kontekście zastanawiam się jakie jest znaczenie obniżenia poziomu wielu białek normalnie zlokalizowanych w mitochondriach w wyniku ekspresji wariantu Hsp104 HAP w sytuacji gdy Hsp104 lokalizuje się w cytosolu. Czy możliwe jest działanie Hsp104 wobec uszkodzonych białek na terenie mitochondriów? Czy może rola Hsp104 polegałaby na dezagregacji nowo powstałych białek mitochondrialnych, które ulegają oksydacyjnym uszkodzeniom w starych komórkach jeszcze przed importem do mitochondriów? A może w warunkach fizjologicznych Hsp104 pomaga w imporcie białek mitochondrialnych do tych organelli?

Na koniec wywiązując się z obowiązków recenzenta muszę wymienić kilka drobnych błędów i niedociągnięć, które jednak nie mają wpływu na wysoką wartość naukową pracy:

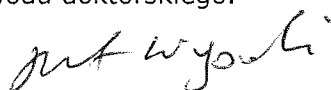
- w rozdziale Materiały i Metody nie podano producentów dla niektórych odczynników i składników pożywek, nie opisano składu buforu TE, nie wyjaśniono niektórych skrótów

(np. EDTA czy LiAc), nie podano bibliografii dla niektórych stosowanych metod (np. dla metod transformacji bakterii i drożdży)

- brak konsekwencji w stosowaniu jednostek czasu, raz jest to minuta, innym razem min. (niepoprawnie z kropką) albo apostrof
- brak w bibliografii dziewięciu publikacji, które były cytowane w pracy: Balchim i wsp., Science, 2016; Cox i Mann, 2008; Kirschke i wsp., Cell, 2014; He i Klionsky, Annu Rev Genet, 2009; Liberek i wsp. EMBO J, 2008; Kamping i Craig, Mat Rev Mol Cell Biol, 2010; Carroni i wsp., Elife, 2014; Mogk i wsp., Front Mol Biosci, 2015; Khan i Kumar, J Biophys, 2009)
- z drugiej strony w spisie literatury znajdują się trzy pozycje, tj. Mayer (Mol Cell, 2010), Miot i wsp. (PNAS, 2011) oraz Ong i wsp. (2002, Mol Cell Proteomics), które nie są cytowane w tekście rozprawy; ponadto pozycja Duttler i wsp. (Mol Cell, 2013) pojawia się dwukrotnie w bibliografii
- błędne cytowania w tekście, np. chyba nie istniejące publikacje Lipińskiej i wsp. (J Mol Biol, 2013 i 2015), Samecz i wsp. zamiast Szamecz i wsp. (Plos Biol, 2014), Lindquist i Sanchez (Science, 1990) zamiast Sanchez i Lindquist
- wiele drobnych błędów edytorskich we wszystkich częściach pracy, w tym jeden anegdotyczny "proteza Pim1" (str. 80) oraz kilka błędów językowych, w tym kalki z języka angielskiego, np. dedykowany bufor czy membrana retikulum; wydaje mi się, że tłumaczenie słów "mother cell" jako "komórka macierzysta" nie jest poprawne i powinno być raczej "komórka matczyzna" dla odróżnienia od komórek macierzystych czyli "stem cells".

Podsumowując, Autor pracy podjął się rozwiązać oryginalny problem badawczy z zakresu badań podstawowych, ale niezwykle istotny ze względu na potencjalną możliwość wykorzystania uzyskanych danych w terapii chorób neurodegeneracyjnych czy w opóźnianiu procesów starzenia. Do realizacji postawionego celu Doktorant wykorzystał pomysłową strategię badawczą oraz posłużył się nowoczesnymi technikami badawczymi, a uzyskane wyniki znacząco poszerzyły naszą wiedzę o funkcjach białka Hsp104. Widać, że Pan mgr Krzysztof Gumowski jest samodzielnym i w pełni ukształtowanym badaczem, który posiada szeroką wiedzę i umiejętności z zakresu biochemii i biologii molekularnej.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska w pełni odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882) i składam wniosek do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUM o dopuszczenie mgra Krzysztofa Gumowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Robert Wysocki