



Wrocław, 16 maja 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Artura Piróga

„Analiza struktury kompleksów tworzonych przez małe białka szoku cieplnego IbpA i IbpB oraz kompleksów tych białek z substratami”

Homeostaza białkowa, nazywana również proteostazą jest kluczowa dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania organizmu. Za utrzymanie integralności proteomu odpowiadają między innymi białka opiekuńcze oraz proteazy. Większość białek w organizmach wyższych do przyjęcia natywnej konformacji wymaga asysty białek opiekuńczych ale nawet w prostych, prokariotycznych organizmach, część białek nie zwiną się do postaci natywnej bez pomocy chaperonów. Co więcej, rola białek opiekuńczy nie ogranicza się jedynie do udziału w procesie zwijania.

W odpowiedzi na bodźce stresowe w komórkach znacząco wzrasta stężenie białek szoku cieplnego (grupy białek opiekuńczych). Białka szoku cieplnego (HSP) pełnią różnorakie molekularne funkcje. Ich podział opiera się na rodzaju ich aktywności (holdazy, dezagregazy, foldazy) lub też na masie cząsteczkowej. Małe białka szoku cieplnego (sHSP) wiążą się do rozwiniętego polipeptydu, zabezpieczają substrat przed nieodwracalną denaturacją i utrzymują go w stanie umożliwiającym procesowanie przez kolejne białka HSP.

Molekularny mechanizm działania sHSP jest poznany w niewielkim stopniu. Nieznana jest budowa oligomerów, nie ma również informacji o kompleksach sHSP:substrat. Zrozumienie mechanizmów działania białek opiekuńczych w *E.coli* oprócz znaczenia poznawczego, ma również duże znaczenie aplikacyjne. To w tej bakterii nadprodukowana jest olbrzymia większość rekombinowanych białek o zastosowaniu do badań naukowych oraz komercyjnym. Poprawa efektywności nadprodukcji i zwijania białek w *E.coli* ma niebagatelne znaczenie praktyczne.

Celem badań prowadzonych przez mgr. Artura Piróga było określenie podstawowej jednostki budulcowej oligomeru sHSP z *E.coli*, zbadanie morfologii oraz struktury oligomerów oraz próba zdefiniowania architektury koagregatów sHsp:substrat. Praca

badawcza została przeprowadzona pod opieką prof. Krzysztofa Liberka, znanego specjalisty w obszarze białek opiekuńczych, promotorem pomocniczym rozprawy był dr Szymon Ziętkiewicz.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 105 stron i została napisana w języku angielskim. Rozprawa została podzielona w sposób tradycyjny. Rozdział Wstęp liczy 19 stron. Autor rozprawy rozpoczyna go od ogólnego omówienia aktywności białek opiekuńczych. Następnie przechodzi do opisu poszczególnych rodzin tych białek w organizmach prokariotycznych oraz eukariotycznych. Jako pierwsze przedstawia białka Hsp70 (DnaK u *E.coli*) oraz dezagregazy Hsp100, następnie białka Hsp60/Hsp10 (GroEL/GroES w bakteriach), Hsp90, proteazy z rodziny AAA+ oraz białka związane z rybosomami. Kolejna część Wstępu poświęcona jest małym białkom szoku termicznego (sHSPs). Autor opisuje różnorodne struktury jakie mogą być tworzone przez te białka, podstawowe konformacje dimeru oraz złożone struktury oligomeryczne. Następnie przechodzi do opisu regulacji aktywności tych białek. Jest to skomplikowany, kontrolowany na wielu poziomach mechanizm, którego wiele elementów jest niejasne.

W dalszej części Wstępu, autor opisuje małe białka szoku termicznego występujące w *E.coli* – IbpA oraz IbpB. Przedstawia złożony mechanizm regulacji ich ekspresji oraz degradacji, a następnie modele struktur wolnych białek oraz ich dimerów. Następnie opisuje fenotypowe efekty delecji białek IbpA oraz IbpB w warunkach szoku termicznego oraz stresu oksydacyjnego. Ostatnia część Wstępu poświęcona jest na przedstawienie mechanizmu powstawania oraz dezagregacji nienatywnych kompleksów białek w *E.coli*. Opisana została rola IbpA i IbpB oraz współpraca z białkami opiekuńczymi z rodziny Hsp70 oraz Hsp100 w kontekście tworzenia agregatów oraz ponownego zwijania białek do postaci natywnej.

Rozdział Wyniki został starannie przygotowany oraz dobrze udokumentowany rysunkami. Do najważniejszych wyników otrzymanych przez mgr. Artura Piróga zaliczam:

- Otrzymanie homogennych preparatów rekombinowanych białek bakteryjnych IbpA i IbpB, domen α -krystalinowych IbpA i IbpB, 26 mutein IbpA i IbpB zawierających nienaturalny fotoreaktywny aminokwas, p-benzoilo-L-fenylalaninę (Bpa) oraz znakowany ^{15}N -IbpA. Białka zostały otrzymano w systemie bakteryjnym z dużą czystością, ponadto każde z białek wymagało zwijania do postaci natywnej. Potwierdzenie aktywność biochemicznej

preparatów IbpA i IbpB jak również wskazanie, że pomiędzy białkami IbpA and IbpB może dochodzić do oddziaływania.

- Określenie morfologii białek IbpA, IbpB oraz kompleksu IbpA/IbpB w warunkach normalnych oraz podwyższonej temperatury. Badania wykazały, że kompleksy IbpA lub IbpB tworzą mniejsze struktury inne niż IbpA:IbpB. Te obserwacje zostały również potwierdzone za pomocą AFM.
- Wykazanie, że podstawową formą budowy oligomerów małych białek opiekuńczych, pochodzących z *E.coli* jest dimer IbpA:IbpB. Wniosek ten został wysnuty na podstawie następujących eksperymentów: tworzenia kompleksów przez domeny α -krystalinowe (eksperymenty DLS), sieciowania domen α -krystalinowych lub całych białek połączone z analizą SDS-PAGE/Urea, spektrometrii mas w stanie natywnym oraz NMR z użyciem znakowanego izotopowo białka.
- Zaproponowanie struktury oligomerów IbpA/IbpB zbudowanych z tetrameru, w skład którego wchodzi dwa dimery IbpA:IbpB. W badaniach z użyciem sieciowania chemicznego wykorzystano 19 mutein zawierających Bpa. Identyfikacja za pomocą spektrometrii mas 40 sieciowanych fragmentów IbpA:IbpB oraz IbpA/IbpB połączona z analizą bioinformatyczną, która pozwoliła na określenie przypuszczalnego przestrzennego ułożenia IbpA/IbpB w oligomerze. Ponadto za pomocą analizy MS potwierdzono strukturę monomeru otrzymaną z modelowania homologicznego.
- Zaproponowanie sposobu oddziaływania IbpA/IbpB z modelowym substratem. Na podstawie analizy MS sieciowania kompleksów mutein IbpA/IbpB zawierających Bpa ze denaturowanymi białkiem zaproponowano, że heterodimery IbpA/IbpB oddziałują z nim całą dostępną powierzchnią. Wyniki sugerują, że białka te ulegają deoligomeryzacji podczas wiązania substratu oraz uczestniczą w koagregacji.

Autor rozprawy krytycznie komentuje otrzymane wyniki, wykazując że zdaje sobie sprawę z ograniczeń używanych metod pomiarowych. Uważam takie podejście za bardzo dojrzałe naukowo.

Moje uwagi oraz pytania

1. Na stronie 13 autor pisze o wysokiej stabilności nieprawidłowo zwiniętej konformacji (high stability of misfolded conformation). Co to oznacza?
2. Na stronie 18 znajduje się informacja, że białka sHSP i α -crystaliny są homologami, czy rzeczywiście wywodzą się od wspólnego przodka?

3. W rozdziale 6.2.3 pojawia się informacja “From each run, 5 best measurements were averaged”. Jakie było kryterium wyboru „najlepszych” pomiarów?
4. Na ile powtarzalne jest otrzymywanie agregatów lucyferazy. Jakie było OD wyjściowego roztworu agregatów?
5. Czy rzeczywiście lizaty komórek podczas produkcji IbpA były wirowane z 81000 g przez 45 min (rozdział 6.2.6.)?
6. Jakie były wydajności ekspresji oraz zwijania rekombinowanych IbpA oraz IbpB?
7. Dlaczego po odcinaniu metki His-tag białka były dializowane do buforu z 6 M mocznikiem a potem ponownie zwijane do postaci natywnej?
8. Czy liofilizacja nie powodowała utraty aktywności lub częściowej denaturacji preparatów, czy było to sprawdzane przed eksperymentami MS?
9. Czy można potwierdzić natywną konformację rekombinowanych białek IbpA / IbpB metodami spektroskopowymi lub np. przez wiązanie ANS?
10. Jak wygląda wykres DLS dla natywnej lucyferazy? Powinien znaleźć się jako kontrola na rys. 18.
11. Na rysunku 19 brakuje opisu, gdzie znajdują się wolne IbpA / IbpB, a gdzie w kompleksie z lucyferazą.
12. Czy białka (preparaty białek) IbpA / IbpB są stabilne, czy w czasie zmienia się promień hydrodynamiczny oligomerów?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca jest na bardzo dobrym poziomie. Poszczególne eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób przemyślany a otrzymane wyniki są wartościowe. Autor rozprawy w dojrzały naukowo sposób podchodzi do otrzymanych rezultatów a na ich podstawie wyciąga racjonalnie wnioski.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Artura Piróga „Analiza struktury kompleksów tworzonych przez małe białka szoku cieplnego IbpA i IbpB oraz kompleksów tych białek z substratami” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr. Artura Piróga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Daniel Krowarsch