

Wrocław, 15 września 2020 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. Igora Obuchowskiego zatytułowanej:

„Small heat shock proteins IbpA and IbpB cooperate in sequestration of misfolded substrates
to promote their refolding”

Utrzymanie homeostazy białkowej jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania komórki i rozwoju organizmu. Białka nieprawidłowo zwinięte wykazują silną tendencję do agregacji, co może prowadzić do tworzenia toksycznych agregatów i rozwoju licznych chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych. Dlatego badanie mechanizmów proteostazy dostarcza odpowiedzi na intrygujące pytanie, jak możliwe jest utrzymanie w zatłoczonym wnętrzu komórki licznych natywnie zwiniętych białek, a także przyczynia się do rozwoju nowych terapii.

Praca doktorska mgr. Igora Obuchowskiego dotyczy wczesnych etapów ochrony komórki bakteryjnej przed spontaniczną agregacją białek. Funkcja ta jest spełniana przez małe białka szoku cieplnego (sHSPs). W odróżnieniu od szczegółowo poznanych białek opiekuńczych Hsp70 i Hsp100, aktywność białek sHSP nie zależy od ATP. Większość γ -protobakterii posiada tylko jedno białko sHSP, zwane IbpA, a tylko niektóre posiadają dwa białka IbpA oraz IbpB, które powstały w wyniku duplikacji genu sHSP. Główne wyniki uzyskane w doktoracie dostarczają odpowiedzi na pytanie o znaczenie dwuskładnikowego systemu IbpA/IbpB poprzez porównanie go z jednoskładnikowym systemem IbpA. Praca została zrealizowana w zespole Profesora Liberka, wybitnego specjalisty od biochemii, biologii komórkowej i biologii molekularnej białek opiekuńczych.

Oceniana rozprawa doktorska została napisana po angielsku i liczy 84 strony. Manuskrypt podzielony jest na klasyczne rozdziały: *Introduction, Aim of the Project, Materials, Methods, Results, Discussion*. Ponadto, autor załącza listę stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis cytowanej literatury oraz dwa rysunki uzupełniające.

Rozdział *Introduction* zestawia wszystkie informacje potrzebne do zrozumienia rozprawy. Są tu zawarte dane o mechanizmie formowania agregatów białkowych, roli białek opiekuńczych, Hsp70 i Hsp100, w zapobieganiu agregacji. Jest także obszerne omówienie małych białek opiekuńczych z uwzględnieniem ich struktury, mechanizmu oddziaływania z rozwiniętymi substratami białkowymi oraz ochrony białek enzymatycznych. Doktorant zestawia także pewne nietypowe aktywności bakteryjnych białek sHSP. Dla

zrozumienia doktoratu istotny jest ostatni rozdział, w którym autor, cytując pracę zespołu Profesora Liberka z *EMBO J.*, przedstawia model współdziałania systemu sHSP z systemem Hsp70/Hsp100 w dezagregacji białek. W kontekście tego modelu wyjaśnienie na poziomie biochemicznym współzależności białek IbpA i IbpB *E. coli* poprzez porównanie z systemami posiadającymi tylko jedno białko sHSP jest dobrze uzasadnione.

Doktorant rozpoczął badania od analizy filogenetycznej białek sHSP. Na podstawie uzyskanych danych doktorant wybrał trzy systemy bakteryjne: z *Vibrio harveyi* (pojedyncze białko IbpA), *E. coli* (obecne białka IbpA i IbpB) ora *Erwinia amylovora* (obecne tylko białko IbpA, białko IbpB zostało ewolucyjnie utracone). Stosując testy biochemiczne (test dezagregacji lucyferazy) i biofizyczne (analiza statycznego i dynamicznego rozproszenia światła, pomiary sedymentacji, eksperymenty interferencji biowarstwowej), autor zaproponował mechanizm funkcjonowania obu białek IbpA i IbpB. Oba białka wykazują odmienną charakterystykę biochemiczną. Podczas gdy IbpA zdolne jest do tworzenia stabilnych kompleksów z rozwiniętym substratem białkowym, IbpB słabo oddziałuje z rozwiniętymi białkami, nie tworząc stabilnych kompleksów. Natomiast włączane jest ono do kompleksów [IbpA - rozwinięte białko] poprzez oddziaływanie z IbpA w tych kompleksach. Oddziaływanie białek IbpA i IbpB ułatwia ich dysocjację w czasie następującego potem wiązania Hsp70. Dzięki temu obecność IbpB jest wysoce korzystna i zmniejsza zapotrzebowanie komórki na Hsp70 w warunkach silnego i długotrwałego stresu. Co więcej, dla pewnej grupy białek obecność obu białek sHSP jest wymagana do tworzenia kompleksu z substratem białkowym, jak doktorant pokazał dla dehydrogenazy jabłczanowej.

Praca doktorska mgr. Obuchowskiego stanowi dojrzałe opracowanie naukowe, a prezentowane dane stanowią istotny wkład w naukę. Praca jest napisana poprawną angielszczyzną i estetycznie zilustrowana. Liczba błędów interpunkcyjnych, czy tzw. literówek jest mała. Rozdział *Discussion* jest wnikliwy, nie stanowi prostego powielenia treści zawartych we wcześniejszych rozdziałach, a raczej w interesujący sposób analizuje i interpretuje uzyskane wyniki.

Moje drobne uwagi:

- pierwsza strona rozdziału Streszczenie:

„duże powinowactwo”, lepiej „wysokie powinowactwo”;

„słaba zdolność”, lepiej „obniżona zdolność”;

- str. 15: K_{ON}/K_{OFF} – stałe szybkości zapisujemy używając małej litery „k”,

- str. 12: „The lower the energy of the folder state the more stable it is and the harsher conditions it can persist through.” Problem w rzeczywistości jest dużo bardziej złożony, gdyż tzw. krzywe stabilności białek (zależność zmiany swobodnej entalpii denaturacji od temperatury) mają różne przebiegi, zależnie od bardziej podstawowych funkcji termodynamicznych (ΔH , ΔS i przede wszystkim ΔC_p). Najogólniej: zależą one od wielkości powierzchni hydrofobowej eksponowanej do roztworu w wyniku denaturacji i wielkości białka. Dlatego nie ma prostej zależności między ΔG stabilności w temperaturze, powiedzmy, pokojowej, a odpornością na podwyższoną temperaturę, czy inne czynniki denaturujące. Problemem zajmował się wnikliwie P. Privalov i odsyłam do jego świetnych prac.

- str. 18: „Bacterial sHSPs being the main topic of this dissertation, I decided to introduce their functions...”, zdanie wadliwe syntaktycznie.

- prosiłbym o wyjaśnienie w czasie obrony doktoratu systemu cytowania (zarówno w spisie literatury, jak i w tekście) stosowanego przez doktoranta. Wydaje się on niejednolity.

Warto podkreślić, że jak wynika z danych Web of Science na dzień 8 września, wyniki doktoratu zostały opublikowane w postaci dwóch prac: przeglądowej (*Cell Stress & Chaperones*) oraz doświadczalnej (*PLOS Genetics*). Ponadto doktorant jest współautorem dwóch innych prac zamieszczonych w prestiżowych czasopismach *J. Mol. Biol.* i *EMBO J.* Ta ostatnia publikacja stanowiła punkt wyjścia dla ocenianego doktoratu.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr. Igora Obuchowskiego zatytułowanej: „Small heat shock proteins lbpA and lbpB cooperate in sequestration of misfolded substrates to promote their refolding” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego mgr. Obuchowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski