



Wrocław, 29 września 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Huberta Wyszkwoskiego
"Role of J-domain proteins in regulation of Hsp70-mediated protein disaggregation"

Proteostaza (homeostaza białkowa) w komórce jest wynikiem ściśle powiązanych procesów regulacji transkrypcji, translacji, zwijania i degradacji białek, zapewniających równowagę i obecność jedynie funkcjonalnych i rozpuszczalnych białek. W przypadku komórek narażonych na czynniki stresowe lub procesy starzenia dochodzi do przekroczenia wydolności powyższych systemów regulacyjnych i do nagromadzenia niewłaściwie zwiniętych białek w formie agregatów białkowych. Nie jest to jednak proces nieodwracalny – deagregacja białek jest procesem bardzo istotnym dla zachowania proteostazy. Poznanie mechanistycznych podstaw deagregacji białek i roli jego poszczególnych komponentów jest przedmiotem intensywnych badań, zaś przedstawiona przez Pana mgr Huberta Wyszkwoskiego praca doktorska dostarcza ważnych informacji na temat roli białek J w deagregacji białek. Praca doktorska wykonana została pod opieką naukową profesora Krzysztofa Liberka, w Zakładzie Biochemii Białek, jednostki o wieloletnim doświadczeniu w tematyce podjętej w prezentowanej pracy doktorskiej.

Układ pracy właściwy jest rozprawom doktorskim; praca napisana jest w języku angielskim, starannie przygotowana pod względem merytorycznym i edycyjnym. Wstęp teoretyczny (*Introduction*) wprowadza w tematykę realizowanej pracy badawczej, podejmując ogólne kwestie mechanizmów rządzących procesami zwijania się białek, roli, jaką w tym procesie pełnią białka opiekuńcze (szoku cieplnego), jak również bardziej szczegółowe aspekty maszynierii molekularnej opartej o białka Hsp70. Zgodnie z główną tematyką przedstawionych wyników, szczegółowo opisane zostały białka zawierające domeny J (z grupy białek Hsp40), współpracujące z Hsp70. Charakteryzowane są one na przykładzie białek drożdżowych (Ydj1 i Sis1), na których wykonana była większość przedstawionych eksperymentów. Przedstawione we wstępie różnice między klasą A i B białek zawierających domeny J zyskałoby na klarowności, gdyby na Fig. 7 uwzględniony był również diagram przedstawiający schemat budowy białek klasy A i B. W obecnej formie rysunek uwzględnia jedynie strukturalną reprezentację domen, dla których mamy dostępne struktury NMR/krytalograficzne, podczas gdy w tekście pojawiają się również odniesienia do rejonu bogatego w reszty Gly i Phe w Sis1, nieobecnego



na Fig. 7.

Rozdziały *Materials* i *Methods* w zwarty i jasny sposób opisują techniczne aspekty wykonywanych eksperymentów. W szczególności opisane zostały procedury/protokoły uzyskania rekombinowanych poszczególnych białek - zarówno z grupy Hsp40, Hsp70 jak i Hsp110. Przez niedopatrzenie zabrakło najwyraźniej opisu otrzymania rekombinowanego białka Hsp104.

Warto zauważyć, że dużym wyzwaniem metodologicznym jest badanie agregatów białkowych metodami kinetycznymi opartymi o immobilizację tychże na nośniku stałym. Opracowana technika przygotowania agregatów białek modelowych (lucyferazy, GFP) czy też agregatów różnobiałkowych pochodzących ze zdenaturowanych termicznie białek frakcji rozpuszczalnej lizatu komórek drożdżowych pozwala na dynamiczne śledzenie asocjacji i dysocjacji poszczególnych komponentów systemu Hsp70. Pozwala to ominąć ograniczenia szeroko stosowanych metod deagregacji różnego rodzaju modelowych substratów białkowych i patrzeć na odczyt funkcjonalny charakterystyczny dla nich (luminescencję w przypadku lucyferazy, fluorescencję w przypadku GFP). Biochemiczne metody tego typu pozwoliły odpowiedzieć na wiele pytań o szczegóły procesu deagregacji, jednak przy ich użyciu nie mamy dostępu do informacji o wiązaniu się poszczególnych komponentów systemu do agregatów, a dodatkowo odczyt końcowy jest wypadkową dwóch procesów - deagregacji, jak i ponownego zwijania białek (refoldingu), co słusznie zostało zaznaczone w nazwach stosowanych metod biochemicznych.

Wyniki zebrane w rozdziale *Results* w metodyczny i spójny logicznie sposób wyjaśniają, w jak odmienny sposób wpływa na proces deagregacji obecność białka Sis1 lub też Ydj1. Białka klasy A (Ydj1) i klasy B (Sis1) różnią się między sobą względną aktywnością (niezależnie od badanego substratu), zdolnością do wiązania agregatów przy nieobecności Hsp70, stechiometrią działania, zdolnością do remodelowania agregatów. Doktorant poprawnie stawia hipotezy na podstawie otrzymanych wyników i dobiera zarówno układy pomiarowe, jak i narzędzia (mutacyjne warianty Sis1, Ssa1, Hsp104) aby je zweryfikować. Graficzne schematy eksperymentów prezentowane równoległe z wynikami ułatwiają interpretację często złożonych danych, gdy sekwencyjnie dodawane są poszczególne komponenty systemu Hsp70.

Końcowa sekcja zawiera również wyniki dla ludzkich komponentów systemu Hsp70, gdzie mimo istotnych inherentnych różnic (brak białek Hsp104, dużo większa zależność od aktywności Hsp110) można również zauważyć podobny schemat działania jak w przypadku



drożdżowych białek J, jednak do stwierdzenia czy zaobserwowane różnice w białkach J są zachowane w ludzkim systemie deagregacji białek konieczne byłoby równie szczegółowa seria pomiarów jak ta przedstawiona dla Sis1 i Ydj1.

Wyniki omówione są w odniesieniu do obecnej wiedzy w sekcji *Discussion*, gdzie w wystarczająco wyczerpujący sposób doktorant opisał różnice funkcjonalne między białkami J klasy A i B, zarówno te wynikające z przeprowadzonych przez niego badań, jak i z wcześniejszych doniesień literaturowych. W ramach dyskusji doktorant zawarł również sekcję *Perspectives*, w których trafnie analizuje różne aspekty kinetyczne, stechiometryczne i funkcjonalne systemu Hsp70, które wciąż czekają na wyjaśnienie. Poruszone tam kwestie opatrzone są również propozycjami podejść eksperymentalnych, które pozwoliłyby szukać odpowiedzi na otwarte wciąż pytania o szczegóły działania systemu deagregacji przez Hsp70 i towarzyszące mu białka opiekuńcze.

Przedstawioną pracę oceniam pozytywnie – prezentuje ona spójny ciąg badań o właściwej metodologii, poprawny sposób prezentacji i analizy danych, zaś uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat roli białek J w procesie deagregacji białek. Jest to tym bardziej istotne, iż przez długi czas różne klasy białek J uważane były za zastępowalne w rekonstrukcji deagregacji *in vitro*, co stało w sprzeczności z istotnie różnymi fenotypami (np. drożdżowymi) otrzymywanymi przy braku białek klasy A lub B.

Dodatkowo chciałabym prosić Doktoranta o odpowiedź na następujące pytania:

- Dla ludzkich białek J (i w mniejszym stopniu również dla drożdżowych białek J) pokazane zostało, iż użycie *in vitro* mieszaniny białek z klasy A i B powoduje znaczący wzrost aktywności deagregacyjnej (Nillegoda et al., 2015); ten synergiczny efekt jest jedną z hipotez mogących wyjaśnić jak przy nieobecności białek z grupy Hsp104 komórki wyższych eukariontów wydajnie przeprowadzają proces deagregacji. Czy prowadzone były pomiary, w których obecna byłaby mieszanina DNAJA2 i DNAJB4 (lub Sis1 i Ydj1)?

- Interesujące jest podejście, w którym zamiast modelowego białka, podlegającego agregacji (jak lucyferaza lub GFP) stosowane są agregaty białek z lizatów drożdżowych. W warunkach stresowych w komórce agregaty często zawierają również białka towarzyszące z grupy małych białek szoku cieplnego (sHsp), tak więc ich architektura może być odmienna, niż termicznie indukowanych agregatów lucyferazy/GFP. We frakcji rozpuszczalnej lizatu drożdżowego powinny znajdować się również sHsps, co teoretycznie dawałoby szansę na choć częściowe odzwierciedlenie agregatów komórkowych. Czy zauważył pan różnice w pracy z agregatami z



lizatu i ich podatności na deagregację (w pracy tylko w jednym miejscu znalazłam wynik się ich dotyczący [Fig. 12])?

- Jednym z aktywnie badanych i dość specyficznych agregatów białkowych są amyloidy; czy obserwacja, że Sis1 ma zdolność remodelowania agregatów białkowych, która nie została zaobserwowana dla Ydj1, może zostać odniesiona do potencjalnego (zróżnicowanego) zaangażowania tych białek (lub też ich ludzkich homologów) w deagregacji tego typu "trudnych" substratów jak amyloidy?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska mgra Huberta Wyszkwoskiego pt. "Role of J-domain proteins in regulation of Hsp70-mediated protein disaggregation - Rola białek z domeną J w regulacji dezagregacji agregatów białkowych przez system Hsp70" spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z wymaganiami Artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgra Huberta Wyszkwoskiego oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Szlachcic