

Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
Ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk, Polska
Tel.: (58) 347 15 96
Fax: (+48) (58) 347 11 44
e-mail: chemmbag@pg.gda.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk, 8.07.2016

**Recenzja pracy doktorskiej
Mgr. Macieja Baranowskiego**

Pt.:

Structural analysis of substrate binding region of Hsp40 molecular chaperones

Przedstawiona do recenzji praca stanowi omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr. Baranowskiego pod kierunkiem Dr hab. S. Ołdzieja, prof. UG w Laboratorium Struktur Biopolimerów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Celem pracy *sensu largo* było ustalenie czy istnieją jakieś wspólne wymagania strukturalne istotne dla wiązania substratu w domenie C-terminalnej (CTD) białek Hsp40. Praca miała charakter zarówno teoretyczny jak i zawierała część eksperymentalną co zasługuje na pochwałę gdyż mało jest tego typu prac interdyscyplinarnych wykonywanych przez jedną osobę. W części teoretycznej wykonano szeroko pojętą analizę bioinformatyczną i strukturalną oraz wykonano symulację dynamiką molekularną wybranych układów, które to badania dały podstawę do sformułowania nowych hipotez co do wymogów substratowych miejsc wiążących białek Hsp40. W części eksperymentalnej autor próbował zweryfikować te nowe zaproponowane hipotezy. Niestety ze względu na problemy z izolacją odpowiednich białek nie udało mu się wykonać zaplanowanych eksperymentów potwierdzających słuszność przyjętych założeń. Warto w tym miejscu jednak podkreślić, że mimo iż cel pracy nie został w pełni osiągnięty, praca wnosi bardzo duży element nowości naukowej w zagadnienie rozumienia mechanizmu rozpoznawania substratów przez białka Hsp40 i ich kooperację z białkami Hsp70.

Prowadzone przez Doktoranta badania mieszczą się w szeroko pojętym obszarze badań podstawowych związanych z mechanizmem działania białek opiekuńczych, a w szczególności mechanizmem rozpoznawania przez te białka substratów jakimi są inne białka. Mechanizm ten wciąż jest tylko częściowo poznany, i mimo szeregu dostępnych struktur białek Hsp wymogi strukturalne i selektywność rozpoznawania substratów nie jest wyjaśniona na poziomie molekularnym. Badania prowadzone przez mgr. Baranowskiego odnośnie białek Hsp wpisują się też w szerszym kontekście w obszar badawczy zespołów naukowych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, które od lat zajmują się biologią molekularną białek opiekuńczych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje element nowości naukowej zaprezentowany w pracy. Są to co prawda jedynie hipotezy, ale oparte są ona na bardzo solidnej analizie strukturalnej popartej również modelowaniem molekularnym. Otóż autor zaproponował w swojej pracy zupełnie nową hipotezę na temat ewolucyjnego pochodzenia domeny C-terminalnej białka Hsp40, która według niego pochodzi od białka immunoglobuliny i powstała ogólnie mówiąc poprzez utratę pewnych motywów białka immunoglobulinowego. Drugim ważnym elementem nowości naukowej było zaproponowanie wymogów strukturalnych miejsca wiążącego w domenie CTD białka Hsp40. W szczególności autor podkreśla znaczenie drugiej (tak zwanej lewej) wnęki hydrofobowej oraz znaczenie otoczenia polarnego obu wnęk. Do tej pory istotna rola drugiej wnęki hydrofobowej dla rozpoznania substratu nie była proponowana w literaturze. Niejako trzecim elementem nowości naukowej, wartym podkreślenia, jest nie tyle hipoteza, co zaproponowanie objaśnienia na poziomie molekularnym mechanizmu współdziałania białek Hsp40 i Hsp70. W objaśnieniu tym istotną rolę stanowi podanie niejako ogólnej zasady rozpoznawania przez białka Hsp40 niezwinionych białek poprzez rozpoznawanie pewnego hydrofobowego motywu pojawiającego się, gdy na przykład białko jest źle zwinięte lub też doznało rozfaldowania na skutek stresu i hydrofobowe jądro zaczyna być ekspozycyjne na zewnątrz białka przez co może być rozpoznane przez białka opiekuńcze.

Jako recenzent muszę powiedzieć, że zaproponowane hipotezy i objaśnienia na poziomie molekularnym są niezwykle eleganckie, logicznie uzasadnione, poparte badaniami strukturalnymi i bioinformatycznymi. Otwierają one pole do opisu dla grup eksperymentalnych i dają możliwości dalszego ich rozwijania. Sam autor próbował eksperymentalnie zweryfikować jedną z tych hipotez, ale niestety nie udało mu się tego dokonać mimo szeregu podjętych różnych prób izolacji białka Sis1.

Układ pracy:

Na początku chciałbym nadmienić, że pracę bardzo dobrze czyta się mimo, że jest ona napisana w j. angielskim i nie ma ona klasycznego układu. Praca zawiera bardzo dobrze napisane streszczenie, po którym następuje wstęp. Wstęp jest niejako teoretycznym opisem całej rodziny białek opiekuńczych i zawiera również proponowane mechanizmy działania białek Hsp40 i Hsp70. Po wstępie następuje rozdział przedstawiający cel pracy. Przy czym, sformułowanie celu pracy nie jest poprawne. Jako recenzent wielu różnych prac, muszę w tym miejscu odnotować, że coraz częściej doktoranci i magistranci nie potrafią poprawnie opisać celu pracy myląc go z zakresem pracy, tak jak to ma miejsce również w tym przypadku. Celem pracy bowiem nie było, jak zostało napisane przez mgr. Baranowskiego, wykonanie analizy bioinformatycznej i otrzymanie jak największej ilości danych. Celem pracy było, co napisałem we wstępie postawienie pewnych hipotez i ich weryfikacja. A te wszystkie analizy i badania strukturalne były jedynie drogą do osiągnięcia tych celów.

Następnym rozdziałem w pracy są materiały i metody. Niestety ten rozdział został potraktowany przez Doktoranta po macoszemu. Zawiera zaledwie dwie strony tekstu opisującego bardziej postępowanie numeryczne w przypadku metod teoretycznych, niż same metody. Można oczywiście założyć, że Doktorant rozumie wszystkie te teoretyczne podejścia, ale takie przedstawienie rozdziału metodycznego może też nasuwać przypuszczenie, że oprogramowanie z jakiego korzystał stanowiło dla niego używanie przysłowiowych „czarnych skrzynek”. Warto też zaznaczyć, że rozdział metodyczny nie zawiera w ogóle opisu metod eksperymentalnych, który to opis znajduje się dopiero w rozdziale z wynikami tam gdzie nieudane wyniki eksperymentów izolacji białka Sis1 są przedstawiane. Nie jest to spójne i klasyczne podejście, gdzie wszystkie metody i techniki są grupowane w jednym miejscu. Co prawda podejście autora trochę ułatwia czytanie pracy bo niejako opisy eksperymentów są przedstawiane wraz z ich wynikami.

Na wyróżnienie zasługuje rozdział z dyskusją wyników, który stanowi wyczerpujące zestawienie otrzymanych wyników, zaproponowanie i opis hipotez oraz mechanizmów rozpoznawania przez białka Hsp40 i Hsp70 substratów. Ta część pracy stanowi o dojrzałości naukowej autora i umiejętności wyciągania wniosków.

W całej pracy znajduje się też bardzo wiele odniesień do źródłowej (trochę starszej) i bieżącej literatury (nawet prace z 2016 r są cytowane) co wskazuje na rozległą wiedzę Doktoranta w obszarze prowadzonych badań. Przegląd literaturowy i analiza danych w dziedzinie objętej badaniami jest bardzo wnikliwa i ściśle związana z poszczególnymi zagadnieniami podejmowanymi w pracy doktorskiej.

Warto też pochwalić edytorski aspekt pracy związany z prezentacją rysunków strukturalnych oraz schematów. Wszystkie te rysunki są profesjonalnie przedstawione i posiadają bardzo dobre opisy, w których używa się w nowatorski sposób kolorów dla ułatwienia czytania informacji na rysunku.

Uwagi i komentarze ogólne:

Myślę, iż nie będę odosobniony w opinii stwierdzając, że praca jest bardzo ciekawa, a jej wyniki istotne ze względu na postęp wiedzy w dziedzinie rozumienia mechanizmu działania białek opiekuńczych. Autor wykonując rozległą analizę strukturalną zaproponował szereg nowych hipotez bardzo solidnie uzasadnionych wynikami tej analizy oraz otworzył pole do dalszych badań w tym kierunku. Praca z tego względu niesie bardzo duży element nowości naukowej. Do części pracy będącej dyskusją i takiego przedstawienia wyników nie mam jako recenzent zastrzeżeń. Wyniki tej pracy zwłaszcza, jeżeli zostaną choć w części zweryfikowane doświadczalnie mogą być przedmiotem publikacji w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym. Niestety Doktorant nie zamieszcza w rozprawie spisu swoich osiągnięć, więc nie jestem w stanie ocenić, czy np. część tych wyników nie była już przedmiotem publikacji chociażby w postaci doniesień konferencyjnych. Chociaż autor wspomina w pracy o realizacji projektu grantowego więc jak rozumiem ma zamiar opublikować swoje wyniki.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zwrócić uwagę, że czytając pracę znalazłem kilka różnych miejsc gdzie nie w pełni byłem usatysfakcjonowany opisem, gdyż tekst nie zawierał wystarczającego opisu lub zawierał taki, który nie był w pełni zrozumiały. Stąd też poniżej przedstawiam kilka uwag mniej lub bardziej szczegółowych (w tym edytorskich) wymagających komentarza.

Uwagi i komentarze szczegółowe:

Rozdział 3.1:

Autor podaje, że białka opiekuńcze istotne są dla „pathologies” – jest to zbyt ogólne określenie i w takich przypadkach oprócz cytowania literatury warto podać jakich patologii to dotyczy.

Strona 24:

W zdaniu: „... to elevated levels of intracellular NO” nie jest jednoznacznie określone czy chodzi o jakiś skrót NO czy np. o związek chemiczny.

Rys. 12:

Miejsce łącznika DVVVD, którego nie widać na rysunku można było wskazać strzałką.

Strona 39:

W ramach przygotowania struktur do symulacji dynamiką molekularną usunięto cząsteczki wody obecne w strukturze pobranej z bazy pdb. Ze względu na to, że ilość cząsteczek wody

obecna w regionie otaczającym fragment hydrofobowy była istotna (Rys. 36 i 37) można zadać pytanie, czy niektóre z tych usuniętych cząsteczek wody nie są tak zwanymi wodami strukturalnymi. Czy np. autor porównywał konkretne wody (ich lokalizację) obecne w symulacji i oddziałujące z badanymi polarnymi regionami pokazanymi na Rys. 36 z tymi usuniętymi cząsteczkami wody ze struktury krystalograficznej?

Strona 40:

Autor wspomina, że niektóre analizy wykonywane były z użyciem skryptów napisanych w języku Perl w pracowni. Czy skrypty te były napisane osobiście przez Doktoranta?

Rysunek 26 i 27:

Oba rysunki nie mają opisu osi pionowej i podanej jednostki powierzchni.

Generalna uwaga co do cytowania literatury w tekście:

Literatura w treści pracy nie jest spójnie cytowana. Czasami podawane są jedno lub dwa nazwiska i dodatek 'et al.' a czasami Doktorant podaje bardzo wielu autorów. Takie cytowanie wielu autorów nie jest spotykane w pracach naukowych i niepotrzebnie wydłuża tekst.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych uwag krytycznych przedstawionych powyżej, z których część ma jedynie charakter dyskusji naukowej lub uwag korekcyjnych, bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę Pana mgr. Macieja Baranowskiego pt.: "Structural analysis of substrate binding region of Hsp40 molecular chaperones". Zwłaszcza duży wkład intelektualny i nowatorskie podejście prowadzące do zaproponowania nowych hipotez jest przeze mnie wysoko ocenione. Sama praca stanowi dokumentację oryginalnych badań prowadzonych przez Doktoranta, o wysokich walorach naukowych i dużym wkładzie nowości naukowej.

Moim zdaniem praca doktorska Pana Macieja Baranowskiego całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w pkt. 13 Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorant posiada wiedzę teoretyczną w dziedzinie Chemii Fizycznej i praktyczną w dziedzinie Biologii Molekularnej, w szczególności co do mechanizmów działania białek opiekuńczych. W toku realizacji pracy wykazał On również umiejętność samodzielnego prowadzenia skomplikowanych badań naukowych zarówno teoretycznych jak i eksperymentalnych. Z podanych wyżej względów wnioskuję do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr. Macieja Baranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

