



dr hab. Mikołaj Olejniczak, prof. UAM

Zakład Biochemii

20 maja 2019, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Artura Piróga zatytułowanej**

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

Praca doktorska Pana mgr Artura Piróga została wykonana pod opieką promotora prof. dr hab. Krzysztofa Liberka na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Tematyka pracy dotyczy struktury i funkcji białek opiekuńczych IbpA i IbpB należących do rodziny małych białek szoku cieplnego. W swoich badaniach Doktorant zastosował metody biochemiczne oraz biofizyczne, m.in. spektrometrię mas, mikroskopię sił atomowych i spektroskopię dynamicznego rozpraszania światła, do opisanie budowy dimerów i oligomerów złożonych z tych białek opiekuńczych.

W ponad 20-stronicowym wstępie literaturowym Doktorant omówił funkcje biologiczne i mechanizmy działania najważniejszych grup białek opiekuńczych, które utrzymują lub przywracają prawidłowe zwinięcie białek, albo umożliwiają przywrócenie rozpuszczalności białek zagregowanych. Ze względu na dużą liczbę rodzin białek opiekuńczych oraz ich różnorodne mechanizmy działania takie wprowadzenie do świata białek opiekuńczych jest bardzo pomocne dla czytelnika, podkreśla wagę prowadzonych w pracy doktorskiej badań, oraz stanowi tło umożliwiające wyjaśnienie roli małych białek szoku cieplnego.

Małe białka szoku cieplnego spełniają funkcję pomocniczą w przywracaniu rozpuszczalności białek poprzez łączenie się z nimi w agregaty podatne na działanie białek opiekuńczych. Doktorant kompetentnie omówił ich strukturę i funkcję w różnych grupach organizmów. Należą one do konserwowanej ewolucyjnie rodziny białek, których przedstawicielem jest też α -krystalina zapobiegająca agregacji białek w gałce ocznej u ludzi. Szczególnie obszernie wyjaśnił stan wiedzy na temat budowy i funkcji białek IbpA

oraz IbpB z bakterii *Escherichia coli*. Pozwoliło mu to na nakreślenie najważniejszych pytań dotyczących sposobów działania i funkcji tych białek.

Celem pracy jest wyjaśnienie cech strukturalnych, które leżą u podłoża funkcji białek IbpA i IbpB u *E. coli*. Białka te zapobiegają nieodwracalnej agregacji białek komórkowych. Główną rolę w tym procesie odgrywają białka Hsp70 (DnaK/J) i Hsp100 (ClpB), jednakże IbpA i IbpB łącząc się z agregującymi białkami komórkowymi zapewniają tworzenie mniejszych agregatów, których struktura ułatwia przywrócenie agregowanych białek do stanu natywnego przez białka Hsp70 i Hsp100. Ciekawe jest, że chociaż białko IbpA jest wystarczające do tworzenia mniejszych agregatów, to dla ich wydajnego rozpuszczania przez białka Hsp potrzebne jest także białko IbpB, które prawdopodobnie obniża powinowactwo IbpA do zagregowanych białek. Jak z tego wynika zaplanowane w pracy doktorskiej badania struktury kompleksów złożonych z białek IbpA i IbpB są ważne dla poznania ich mechanizmu działania.

Opis materiałów i metod stosowanych w pracy jest dokładny, dobrze wyjaśnia stosowane metody oraz uwzględnia opis napotkanych problemów eksperymentalnych, przez co stanowi doskonale dopełnienie opisu wyników pracy.

Wyniki badań zawartych w pracy dotyczą trzech głównych zagadnień jakimi są: i) określenie dominującej formy dimerów tych białek; ii) określenie struktury oligomerów; oraz iii) poznanie struktury kompleksów z substratem. Najbardziej obszerne są wyniki dotyczące tej pierwszej części. Charakterystyka białek IbpA i IbpB w testach biochemicznych potwierdziła, że oba białka są konieczne dla efektywnego przywrócenia formy natywnej modelowego białka substratowego, którym była lucyferaza. Ponieważ białka z tej rodziny tworzą formy dimeryczne, Doktorant postanowił zbadać jaki jest skład tych dimerów w przypadku IbpA i IbpB. Główna część tych badań została wykonana z zastosowaniem skróconych białek zawierających stabilną domenę α -kryształiny bez nieuporządkowanych regionów N- i C-końcowych. Zarówno analiza dimerów (stabilizowanych przez fotozszywanie z zastosowaniem DMS) w żelu poliakrylamidowym, jak i analiza metodą spektrometrii mas pokazały tworzenie zarówno heterodimerów IbpA/IbpB jak i homodimerów IbpA/IbpA oraz IbpB/IbpB. Nie jestem jednak przekonany, czy dane te jednoznacznie pokazują, że forma heterodimeryczna jest stabilniejsza niż homodimeryczna. Na przykład, żele na rysunkach 32 i 35 pokazują dużą

zawartość homodimeru IbpB oprócz heterodimeru. Natomiast widma spektrometrii mas pokazują dużą zawartość zarówno homodimerów IbpA/IbpA jak i IbpB/IbpB, chociaż mniejszą niż heterodimeru. Jak duże zdaniem Doktoranta powinny być różnice w stabilności kompleksów IbpA/IbpA, IbpB/IbpB oraz IbpA/IbpB aby wyjaśnić różnice w proporcjach homodimerów do heterodimeru obserwowane w widmach spektrometrii mas? Co do badań metodą spektroskopii NMR, czy można wykluczyć możliwość, że obserwowane zmiany przesunięć chemicznych po dodaniu IbpB do próbki z IbpA mogą wynikać także z oddziaływań homodimerów ze sobą?

W badaniach oligomeryzacji białek IbpA i IbpB Doktorant zastosował białka modyfikowane fotozszywalnym analogiem fenyloalaniny, wprowadzanym w wybranych miejscach sekwencji w pozycjach kodonów amber. Drobna uwaga to, że na rys. 37 w mRNA powinien być wskazany kodon UAG a nie TAG. Ta część badań wymagała od Doktoranta szczególnie dużej ilości pracy w związku z koniecznością otrzymania i oczyszczenia 26 wariantów tych białek różniących się miejscem wbudowania fotozszywalnego analogu, których aktywność biochemiczna była przez niego potwierdzana przed rozpoczęciem badań strukturalnych. Miejsca fotozszywania zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas posłużyły Doktorantowi jako więzy strukturalne do modelowania struktury heterodimerów za pomocą symulacji dynamiki molekularnej. Spośród miejsc fotozszywania zidentyfikowanych przez Doktoranta niektóre były spójne z oddziaływaniami wewnątrz monomerów, a inne z oddziaływaniami pomiędzy IbpA i IbpB, potwierdzając możliwość tworzenia heterodimerów także w strukturach oligomerycznych. Czy zidentyfikowano także miejsca fotozszywania charakterystyczne dla oddziaływań w ramach homodimerów?

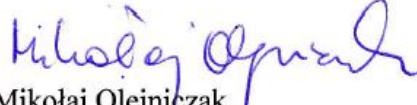
W ostatniej części pracy Doktorant podjął próbę scharakteryzowania oddziaływań pomiędzy białkami IbpA i IbpB a modelowym substratem, lucyferazą. Wyniki tych badań pokazały, że IbpA ulega fotozszywaniu z lucyferazą tylko gdy została wcześniej poddana agregacji, co jest spójne z funkcją tego białka. Ponadto, badania wykazały, że IbpB ulega silniejszemu fotozszywaniu z lucyferazą w obecności białka IbpA, co potwierdza ich funkcjonalne oddziaływanie. Natomiast wyniki tych badań nie pozwoliły na zidentyfikowanie dobrze zdefiniowanych miejsc wiązania substratu w białkach IbpA i



IbpB, co może odzwierciedlać różnorodność możliwych sposobów oddziaływania tych białek z substratem.

Podsumowując, Pan mgr Artur Piróg udowodnił, że białka IbpA i IbpB mogą wydajnie tworzyć heterodimery oraz zaproponował budowę złożonych z nich struktur wyższego rzędu. Stwierdzenie, że białka te oddziałują bezpośrednio ze sobą w obrębie heterodimeru jest ważne dla zrozumienia ich zależności funkcjonalnych w chronieniu białek komórkowych przed nieodwracalną agregacją i może stanowić podstawę do planowania dalszych eksperymentów dotyczących poznania mechanizmu tego procesu. Warto podkreślić, że badania białek mających zdolność do oligomeryzacji są szczególnie trudnym wyzwaniem badawczym. Imponuje zarówno ogromna ilość pracy eksperymentalnej włożonej przez Doktoranta w ten projekt, jak i różnorodność metod badawczych stosowanych wspólnie z współpracownikami. Chciałbym też dodać, że praca jest napisana wyjątkowo klarownie a szczególnie podobało mi się precyzyjne dyskusowanie ograniczeń stosowanych metod i interpretacji wyników, które świadczy o bardzo dobrym zrozumieniu stosowanej metodyki. Należy także zaznaczyć, że Doktorant jest współautorem publikacji w czasopiśmie *EMBO Journal*.

Przedstawiona mi do oceny praca Pana mgr Artura Piróga spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o nadanie Panu mgr Arturowi Pirógowi stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.


Mikołaj Olejniczak