

dr Dorota Żurawa-Janicka

Autoreferat

Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.....	2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy	
a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.....	2
b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia.....	2
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	14
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	
a) Osiągnięcia dydaktyczne.....	16
b) Działalność w zakresie popularyzacji nauki.....	18
c) Uzyskane nagrody za działalność dydaktyczną.....	18
d) Działalność organizacyjna.....	18
7. Inne informacje dotyczące kariery naukowej	
a) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych.....	19
b) Uzyskane nagrody za działalność naukową.....	28

1. Imię i Nazwisko

Dorota Żurawa-Janicka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Tytuł magistra biotechnologii – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, czerwiec 1998

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Instytut Biologii, 14 listopada 2008. Tytuł rozprawy doktorskiej – „Udział białek HtrA1 i HtrA2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz w nefrokancerogenezie estrogenozależnej u chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*)”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

01.04.1999 – 31.03.2000: asystent I rok, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Katedra Biochemii

01.10.2004 – 30.09.2005: starszy technik, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Katedra Biochemii

01.10.2005 – 31.01.2009: asystent, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Katedra Biochemii

01.02.2009 – do chwili obecnej: adiunkt, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy**a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

Molekularny mechanizm działania proteaz HtrA człowieka oraz ich związek z patogenezą chorób nowotworowych

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

[1]. Żurawa-Janicka D., Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2010). HtrA proteins as targets in therapy of cancer and other diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14(7): 665-679.

IF₂₀₁₀=3.649; MNISW=32

- [2]. **Żurawa-Janicka D.***, Kobiela J., Gałczyńska N., Stefaniak T., Lipińska B., Łachiński A., Skórko-Glonek J., Narkiewicz J., Proczko-Markuszczyńska M., Śledziński Z. (2012). Changes in expression of human serine proteases *HtrA1*, *HtrA2* and *HtrA3* genes in benign and malignant thyroid tumors. *Oncology Reports* 28(5): 1838-1844.

IF₂₀₁₂=2.297; MNiSW=20

- [3]. **Żurawa-Janicka D.**, Jarząb M., Polit A., Skórko-Glonek J., Lesner A., Gitlin A., Giełdoń A., Ciarkowski J., Glaza P., Lubomska A., Lipińska B. (2013). Temperature-induced changes of HtrA2(Omi) protease activity and structure. *Cell Stress and Chaperones* 18(1): 35-51.

IF₂₀₁₃=2.537; MNiSW=20

- [4]. Jarząb M., Wenta T., **Żurawa-Janicka D.**, Polit A., Giełdoń A. J., Wysocka M., Glaza P., Skórko-Glonek J., Ciarkowski J., Lesner A., Lipińska B. (2016). Intra- and intersubunit changes accompanying thermal activation of the HtrA2(Omi) protease homotrimer. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1864: 283-296.

IF₂₀₁₆=2.773; MNiSW=30

- [5]. Giełdoń A., **Żurawa-Janicka D.**, Jarząb M., Wenta T., Golik P., Dubin G., Lipińska B., Ciarkowski J. (2016). Distinct 3D Architecture and Dynamics of the Human HtrA2(Omi) Protease and Its Mutated Variants. *PLoS One* 11(8): e0161526.

IF₂₀₁₆=2.806; MNiSW=35

- [6]. **Żurawa-Janicka D.***, Wenta T., Jarząb M., Skórko-Glonek J., Glaza P., Giełdoń A., Ciarkowski J., Lipińska B. (2017). Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 621: 6-23.

IF₂₀₁₇=3.118; MNiSW=30

- [7]. **Żurawa-Janicka D.***, Kobiela J., Ślebioda T., Pęksa R., Stanisławowski M., Wierzbicki P.M., Wenta T., Lipińska B., Kmiec Z., Biernat W., Łachiński A.J., Śledziński Z. (2020). Expression of *HTRA* Genes and Its Association with Microsatellite Instability and Survival of Patients with Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3947.

IF₂₀₂₀=4.556; MNiSW=140

* - autor korespondujący

Współczynnik oddziaływania (IF) oraz punktacja MNiSW ww. publikacji zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **21.736**

Index Hirscha ww. publikacji według bazy *Scopus* – 6

Index Hirscha ww. publikacji według bazy *Web of Science* – 5

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Celem naukowym wyżej wymienionych prac było poszerzenie wiedzy na temat molekularnego mechanizmu działania białek HtrA człowieka oraz związku tych proteaz z karcynogenezą.

Białka HtrA (*High temperature requirement A*) tworzą rodzinę zachowanych w ewolucji proteaz serynowych, będącymi homologami proteazy HtrA *Escherichia coli*. Należą do białek szoku termicznego (*Heat shock proteins*, HSPs), które indukowane są w warunkach stresu komórkowego i chronią komórkę przed skutkami jego działania. HtrA są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych, od bakterii po człowieka. Charakterystyczną cechą ich struktury jest obecność domeny proteazowej (PD) z triadą katalityczną His-Ser-Asp, charakterystyczną dla proteaz serynowych, oraz przynajmniej jednej domeny PDZ (PSD-95, *mammalian postynaptic density of 95kDa*; DLG, *Drosophila discs large tumor suppressor*, ZO-1; *zonula occludens 1*) na końcu karboksylowym, która uczestniczy w oddziaływaniach białko-białko. Domena proteazowa pod względem strukturalnym przypomina chymotrypsynę; zbudowana jest z dwóch bezułek β , z których każda składa się z naprzemianległych sześciu struktur β , a te połączone są pętlami LA, L1, L2, L3 i LD, pełniącymi funkcje istotne w regulacji aktywności proteazy [Krojer *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2013]. Monomery tworzą struktury oligomeryczne, których podstawową jednostką jest trimer. Proteazy HtrA stanowią istotny element systemu kontroli jakości białek w komórce; rozpoznają białka nieodwracalnie uszkodzone lub błędnie zwinięte i przeprowadzają ich degradację. Niektóre z białek HtrA wykazują także aktywność opiekuńczą wobec białek o nieprawidłowej strukturze, zapobiegając tworzeniu toksycznych agregatów. Dzięki tym właściwościom zwiększają szansę komórki na przetrwanie w warunkach stresowych. Ponadto, proteazy HtrA wykazują aktywność wobec specyficznych białek o strukturze natywnej, dzięki czemu regulują wiele procesów fizjologicznych. U bakterii patogennych pełnią rolę czynników wirulencji i stanowią element systemu obrony patogenu przed stresem indukowanym przez gospodarza w odpowiedzi na zakażenie. U organizmów eukariotycznych regulują homeostazę komórkową a zaburzenia ich funkcji związane są w rozwoju stanów patologicznych. U człowieka zidentyfikowano cztery homologiczne białka HtrA (HtrA1-4). Proteazom HtrA1 i HtrA3 przypisuje się rolę supresorową w rozwoju nowotworów poprzez ich udział w promowaniu apoptozy, są inhibitorami szlaku sygnalizacyjnego TGF- β a także uczestniczą w reorganizacji macierzy pozakomórkowej. Proteaza HtrA2 jest białkiem mitochondrialnym, które bierze udział w utrzymaniu homeostazy mitochondrialnej, odpowiedzi na działanie czynników stresowych, wykazuje też właściwości proapoptotyczne – promuje apoptozę na różnych jej etapach. W warunkach indukowanej apoptozy HtrA2 ulega translokacji z mitochondrium do cytozolu, gdzie degraduje białka o funkcji antyapoptotycznej, w tym IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*), oraz aktywuje białka proapoptotyczne. Ponadto, dzięki aktywności proteolitycznej HtrA2 przyczynia się do śmierci komórki na drodze niezależnej od aktywności kaspaz. Z kolei zaburzenie aktywności HtrA2 prowadzi do upośledzenia funkcji mitochondriów, co powiązано z rozwojem zmian neurodegeneracyjnych [Skórko-Glonek *et al.*, 2013]. HtrA4 należy do najsłabiej opisanych białek HtrA człowieka; udokumentowano związek HtrA4 z implantacją zarodka oraz patogenezą stanu

rzucawkowego u ciężarnych [Chen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2018]. Zaburzenie funkcji proteaz HtrA przyczynia się do rozwoju chorób, w tym nowotworowych, artretycznych oraz schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym – choroby Parkinsona i Alzheimerera [Skórko-Glonek *et al.*, 2013].

Moje zainteresowanie proteazami HtrA człowieka stanowi kontynuację badań rozpoczętych w trakcie realizacji tematu rozprawy doktorskiej, która dotyczyła związku HtrA1 i HtrA2 z odpowiedzią na stres oraz rozwojem nowotworu nerki u chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*). Z moich doświadczeń wynikało, że ekspresja genów *HTRA* zmienia się pod wpływem estrogenizacji; indukowany estradiolem stres oksydacyjny stymulował ekspresję *HTRA1*, natomiast długotrwała estrogenizacja powodowała wzrost ekspresji *HTRA2* i spadek ekspresji *HTRA1*, co wskazywało pośrednio na związek białek HtrA zarówno z ochroną komórki przed skutkami działania czynników stresowych, jak i z karcynogenezą hormonozależną.

Wstępem do kontynuacji badań stał się przegląd literatury dotyczącej białek HtrA, który zaowocował napisaniem pracy przeglądowej [1]. Chociaż wiedza na temat białek HtrA człowieka była w tym czasie ograniczona, zebrane dane wskazały na istotne zaangażowanie proteaz HtrA człowieka w utrzymanie homeostazy komórkowej poprzez regulację szlaków sygnalizacji i odpowiedzi na działanie czynników stresowych. Z drugiej strony, wyniki prac dowiodły, że proteazy HtrA są jednymi z kluczowych regulatorów apoptozy i anoikis – mechanizmów śmierci, których zaburzenie otwiera drogę transformacji nowotworowej i metastazie, oraz wskazały na istnienie korelacji między upośledzeniem funkcji lub utratą proteaz HtrA a rozwojem stanów patologicznych. Tak zróżnicowane funkcje białek HtrA w fizjologii komórki nasunęło pytanie o molekularny mechanizm ich działania, dzięki któremu w zależności od obecności specyficznego czynnika następuje aktywacja lub wyłączenie proteazy, co w konsekwencji inicjuje przejście między stanem promującym przetrwanie komórki a skierowaniem jej na drogę apoptozy. Zrozumienie tego mechanizmu mogłoby mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale też aplikacyjne dzięki wykorzystaniu proapoptotycznych właściwości proteaz HtrA w terapii chorób.

W roku 2002 po raz pierwszy poznano strukturę białka HtrA człowieka. Na podstawie analizy krystalograficznej rozwiązano strukturę przestrzenną białka HtrA2 w formie nieaktywnej [Li *et al.*, 2002]. Został też zaproponowany teoretyczny model aktywacji tej proteazy. Model ten został wsparty o nieliczne dostępne wówczas dane eksperymentalne, biochemiczne i biofizyczne. HtrA2 jest homotrimerem o kształcie piramidy z domenami proteazowymi tworzącymi rdzeń struktury i domenami PDZ u jej podstawy. Zgodnie z założeniami modelu aktywność HtrA2 jest regulowana allosterycznie z udziałem domeny PDZ. W konformacji nieaktywnej („zamkniętej”) C-końcowy fragment domeny PDZ oddziałuje z domeną proteazową blokując dostęp do centrum aktywnego. Związanie peptydu do hydrofobowej szczeliny wiążącej w domenie PDZ powoduje zmiany konformacyjne prowadzące do odsłonięcia przez domenę PDZ miejsca aktywnego. Białko przyjmuje konformację aktywną („otwartą”), czemu towarzyszy aktywacja proteazy [Li *et al.*, 2002]. Ponadto, istniały przesłanki przemawiające za tym, że aktywacja przez peptyd allosteryczny i aktywacja poprzez wzrost temperatury mogą przebiegać podobnie [Martins *et al.*, 2003]. Model ten stał się punktem wyjścia dla badań zmierzających

do eksperymentalnego zweryfikowania mechanizmu regulacji HtrA2 poprzez poznanie molekularnych zdarzeń towarzyszących aktywacji proteazy. Wyniki tych badań wchodzą w skład niniejszego osiągnięcia.

Prace w tym kierunku zapoczątkowane zostały analizą biochemiczną HtrA2, która dowiodła, że HtrA2 wykazuje kinetykę proteolizy typową dla enzymów allosterycznych, a aktywność proteazy wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Wyniki te były zgodne z modelem regulacji allosterycznej proteazy [Li *et al.*, 2002] oraz w sposób pośredni przemawiały za postulowaną dla białek HtrA rolą fizjologiczną związaną z odpowiedzią na działanie czynników stresowych, w tym temperatury podwyższonej ponad fizjologiczną wartość [Clausen *et al.*, 2011]. Ponadto, uzyskane wyniki pokazały, że HtrA2 aktywowane przez podwyższoną temperaturę nie jest dalej stymulowane przez peptyd wiążący się do szczeliny w domenie PDZ. Wynik ten stanowił argument przemawiający za podobieństwem zmian towarzyszących aktywacji termicznej HtrA2 do tych indukowanych przez peptyd allosteryczny oraz pozostawał w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez [Martins *et al.*, 2003].

Zgodnie z założeniami modelu zmiany strukturalne towarzyszące aktywacji proteazy zachodzą na styku domeny proteazowej (PD) i domeny PDZ, i prowadzą do przemieszczenia domeny PDZ blokującej dostęp do centrum aktywnego. W konsekwencji aktywność enzymu rośnie. Czerpiąc z wcześniejszych doświadczeń wynikających z prac nad mechanizmem regulacji proteazy HtrA *E. coli* [Sobiecka-Szkatuła *et al.*, 2009] podjęłam badania zmierzające do zweryfikowania założeń modelu aktywacji HtrA2 z wykorzystaniem technik spektroskopowych w celu monitorowania zmian strukturalnych towarzyszących aktywacji termicznej proteazy. Do rejonów styku domen, w tym szczeliny wiążącej peptyd w domenie PDZ wprowadzone zostały pojedyncze reszty tryptofanu (Trp). Dzięki właściwościom spektralnym Trp stanowił swoistą molekularną sondę, która wprowadzona do danego rejonu białka umożliwiała śledzenie lokalnych zmian konformacyjnych indukowanych pod wpływem temperatury. Analiza wyników, w tym parametrów wygaszania fluorescencji reszt Trp za pomocą akryloamidu oraz maksimum fluorescencji Trp pokazały, że pod wpływem wzrostu temperatury powierzchnie styku domen stają się bardziej dostępne dla środowiska, zmiany strukturalne zależą od temperatury i są najwyraźniejsze w zakresie temperatur 30-35°C. Co więcej, uzyskane dane przemawiały za sekwencyjnym modelem zmian, w którym wzrost temperatury indukuje najpierw zmiany w obrębie domeny PDZ, a następnie w domenie proteazowej. Powyższe wyniki sugerowały, że aktywacji termicznej HtrA2 towarzyszy rozluźnienie struktury proteazy. Okazją do zweryfikowania tego przypuszczenia była współpraca z dr Agnieszką Polit z Katedry Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Aby oszacować ewentualne zmiany w wielkości cząsteczki HtrA2, które świadczyłyby o zachodzących w trakcie aktywacji termicznej zmianach strukturalnych zastosowana została metoda dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Analiza parametrów hydrodynamicznych wskazała na stopniowy wzrost wartości promienia hydrodynamicznego oligomeru HtrA2 oraz jego stabilność w zakresie temperatur 20-45°C. Wyniki te stanowiły potwierdzenie tezy, że termicznej aktywacji proteazy towarzyszy rozluźnienie struktury.

Zaproponowano hipotezę, że w utrzymaniu struktury HtrA2 istotną rolę pełnią oddziaływania hydrofobowych reszt aminokwasowych rejonów znajdujących się na styku domen – struktury β 11 i β 12 domeny proteazowej oraz β 14 i α 5 domeny PDZ [Li *et al.*, 2002]. Podjęłam próbę eksperymentalnej weryfikacji tego założenia. Uzyskane wyniki pokazały, że substytucje wybranych reszt hydrofobowych należących do rejonów β 11 i β 12 na reszty o charakterze hydrofilowym (V325D, I329N, F331Y) powodowały utratę aktywności proteazy. Ponadto, dwie substytucje (V226K, R432L) prowadzące do osłabienia interakcji pomiędzy domeną proteazową (PD) i domeną PDZ spowodowały znaczący wzrost aktywności proteazy. Wyniki te potwierdziły istotne znaczenie oddziaływań hydrofobowych z udziałem reszt aminokwasowych zlokalizowanych na styku domen w stabilizacji struktury proteazy. Ponadto, dowiodły w sposób pośredni, że osłabienie interakcji między domeną PDZ i PD może istotnie wpływać na otwarcie struktury i wzrost aktywności HtrA2 podczas aktywacji termicznej. Powyższe wyniki złożyły się na pracę [3].

Kontynuację prac nad mechanizmem aktywacji termicznej HtrA2 stanowiła próba poznania sekwencji zdarzeń molekularnych składających się na ten proces, poprzez zbadanie oddziaływań istotnych w stabilizacji struktury domeny proteazowej w obrębie monomeru oraz interakcji między sąsiadującymi podjednostkami trimeru, a także roli pętli regulatorowych. Na podstawie analizy struktury przestrzennej HtrA wytypowane zostały rejony kluczowe dla kontaktu między domenami PDZ i proteazową (helisa α 5 i nić β 14 domeny PDZ z C-końcową β -beczką PD, oraz nić β 13 i helisa α 7 domeny PDZ z N-końcową β -beczką PD). Do śledzenia zmian konformacyjnych indukowanych przez wzrost temperatury między wybranymi elementami tych rejonów została wykorzystana metoda gaszenia fluorescencji przez Trp (*Tryptophan-induced Quenching*, TriQ). Metoda TriQ wykorzystuje zdolność gaszenia fluorescencji pochodnych bimanu przez Trp, w sytuacji gdy fluorofor i reszta Trp znajdują się w bliskiej odległości 5-15 Å [Mansoor *et al.*, 2010]. Wyniki uzyskane metodą TriQ pokazały, że indukowane wzrostem temperatury zmiany strukturalne zachodzą wewnątrz monomeru (pętla L3 zwiększa odległość od domeny PDZ, nić β 14 domeny PDZ zbliża się do obu beczulek β , nić β 13 oddala się od pętli LC i LB N-końcowej beczułki, pętla flankująca β 15 domeny PDZ zwiększają odległość od domeny proteazowej) a także, co istotne, mają miejsce w rejonach kontaktu między sąsiadującymi podjednostkami (zwiększa się dystans między helisą α 5 domeny PDZ a pętlami LD* i L1* domeny proteazowej sąsiedniego monomeru) (* oznacza element strukturalny sąsiedniej podjednostki). Pojawiło się więc przypuszczenie, że osłabienie interakcji między elementami struktury domen PDZ i PD w rejonach kontaktu domen będzie sprzyjać aktywacji proteazy. Aby zweryfikować to założenie, przygotowany został zestaw mutein HtrA2, w których reszty aminokwasowe kluczowe dla utrzymania kontaktu między domeną PDZ a PD i PD* zostały zamienione na reszty aminokwasowe o odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych. Analiza aktywności proteolitycznej tychże mutein pokazała, że substytucje reszt aminokwasowych, które osłabiają oddziaływania PDZ-PD oraz PDZ z PD* zwiększają aktywność proteazy. Wynik ten sugeruje, że destabilizacja interakcji domeny PDZ z PD w obrębie monomeru, jak też destabilizacja oddziaływań między domeną PDZ a elementami domeny proteazowej sąsiedniej podjednostki, promują aktywację HtrA2, co pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi metodą TriQ. Ponadto, analiza uzyskanych wyników doprowadziła do wniosku,

że helisa $\alpha 5$ może pełnić istotną rolę w zmianach zachodzących wewnątrz monomeru oraz w obrębie PD* sąsiedniej podjednostki, przez co przypuszczalnie stanowi ważny element w sekwencji zdarzeń podczas aktywacji termicznej HtrA2. Ze względu na fakt, że ułożenie triady katalitycznej w enzymie nieaktywnym uniemożliwia katalizę [Singh et al., 2011], zmiany konformacyjne w pętli L1*, w obrębie której zlokalizowana jest reszta seryny tejże triady, mogą sprzyjać przyjęciu aktywnej konformacji przez centrum katalityczne.

Przedstawione wyniki złożyły się na pracę [4], w której zaproponowany został model aktywacji termicznej proteazy HtrA2. Zgodnie z modelem, pod wpływem temperatury zmienia się położenie domeny PDZ względem domeny proteazowej a zmiany te zachodzą w dwóch płaszczyznach, co więcej, dotyczą nie tylko pojedynczego monomeru, ale przenoszone są na sąsiadującą podjednostkę w trimerze HtrA2. Pod wpływem temperatury pętla regulatorowa L3 zwiększa swoją odległość od domeny PDZ, która przesuwana się wzdłuż powierzchni styku PD–PDZ w kierunku przeciwnym w stosunku do centrum aktywnego. Ruch ten przechodzi w obrót, wskutek czego krawędź domeny PDZ odsłania centrum katalityczne, zwiększony jest także dostęp do szczeliny wiążącej peptyd w domenie PDZ. Jednocześnie zmiany przenoszone są na sąsiednią podjednostkę, w szczególności zaś dotyczą pętli L1*, gdzie znajduje się reszta seryny centrum aktywnego PD*.

Zaproponowany model aktywacji termicznej HtrA2 nie dawał odpowiedzi na pytanie, czy sekwencja zdarzeń towarzyszących aktywacji przez peptyd jest podobna do zmian zachodzących podczas aktywacji termicznej. Odpowiedź na to pytanie stanowiła wyzwanie, ponieważ struktura krystaliczna HtrA w formie aktywnej nie została poznana – opublikowana była jedynie struktura HtrA2 S306A, w której seryna centrum aktywnego była wymieniona na alaninę. Ponadto, w strukturze nie były ujawnione elementy łącznika pomiędzy PD a PDZ oraz istotnej dla aktywacji pętli L3 należącej do PD. We współpracy z dr Arturem Giędoniem (obecnie: dr hab.) z Zespołu Prof. dr hab. Jerzego Ciarkowskiego z Katedry Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz z dr Grzegorzem Dubinem (obecnie: Prof. dr hab.) z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego została wymodelowana uzupełniona struktura aktywnego HtrA2 a także struktury, skonstruowanych i scharakteryzowanych przeze mnie pod względem biochemicznym wariantów HtrA2 V226K i HtrA2 V325D. Pozycje 226 i 325 leżą w rejonach oddziaływań hydrofobowych reszt aminokwasowych położonych na styku PD i domeny PDZ. Oddziaływania te są istotne dla utrzymania struktury proteazy. Substytucja V325D powodowała utratę aktywności proteolitycznej HtrA2, substytucja V226K skutkowałą jej podwyższeniem. Reszta V226, będąc częścią pętli łączącej nici $\beta 5$ i $\beta 6$ domeny proteazowej, w konformacji nieaktywnej lokuje się naprzeciwko szczeliny wiążącej peptyd domeny PDZ i ogranicza do niej dostęp liganda. Tak więc substytucja zmieniająca interakcje w tym rejonie mogłaby sprzyjać otwarciu struktury podczas aktywacji. Wariant ten wraz z wariantem HtrA2 V325D zostały włączone do badań *in silico* zmierzających do poznania sekwencji zdarzeń towarzyszących aktywacji HtrA2 przez peptyd, ale także podejmujących próbę odpowiedzi na pytanie o podstawy molekularne podwyższonej aktywności proteazy spowodowanej substytucją V226K. W tym celu wykonana została symulacja dynamiki molekularnej tych struktur z peptydowym ligandem GWTMFWV wiążącym się do domeny PDZ, oraz bez liganda. Krystaliczna struktura izolowanej

domeny PDZ z tym peptydem była wcześniej opisana [Zhang et al., 2007]. Wyniki badań *in silico* wskazały, że wiązanie peptydu powoduje rotację domeny PDZ w stosunku do PD o kąt ok. 30-50° w sposób przypominający otwarcie wieczka, w trimerze HtrA2 ruchy te przypominają otwierający się pęk kwiatu i postępują sekwencyjnie w ciągu 50 ns symulacji. Otwarcie to powoduje odkrycie centrum katalitycznego enzymu. Domeny PDZ otwierały się dynamicznie w proteazie typu dzikiego (niezmutowanej), natomiast ruch ten nie był obserwowany w strukturze nieaktywnego białka HtrA2 V325D. Pod nieobecność peptydu ruch domeny PDZ w stosunku do PD wydawał się być bardziej subtelny, a powierzchnie styku domen ulegały ekspozycji jedynie w niewielkim stopniu. Na podstawie analizy wyników badań *in silico* i wyników badań *in vitro* można przypuszczać, że choć mechanizm aktywacji termicznej proteazy oraz przez peptyd mają wspólny ogólny schemat, to mogą istnieć różnice pomiędzy nimi. W trakcie opisanych badań rozwiązana została krystaliczna struktura białka HtrA2 V226K o podwyższonej aktywności, która okazała się być praktycznie identyczna ze strukturą HtrA2 S306A. Molekularne podstawy wzrostu aktywności tego wariantu HtrA2 nie zostały na tym etapie wyjaśnione. Wyniki te zostały zebrane i opublikowane w pracy [5].

Wyniki uzyskane w pracach [3], [4], [5] dostarczyły argumentów za allosterycznym mechanizmem regulacji HtrA2 w oparciu o domenę PDZ. Podczas aktywacji dochodzi do zmian konformacyjnych na styku domeny PDZ i PD, które prowadzą do zniesienia hamującego działania domeny PDZ, odsłonięcia centrum katalitycznego oraz zwiększenia dostępu do szczeliny wiążącej w domenie PDZ. Zmiany te w połączeniu z ruchami pętli regulatorowych prowadzą do uzyskania właściwej geometrii centrum katalitycznego i przeniesienia sygnału allosterycznego na sąsiednie podjednostki w trimerycznej strukturze proteazy. Mechanizmy aktywacji termicznej i przez związanie peptydu do szczeliny w domenie PDZ mogą mieć podobne schematy.

Zwieńczeniem badań nad molekularnym modelem aktywacji HtrA2 stała się praca [6], która podsumowuje dotychczasowe badania nad strukturą i mechanizmami regulacji aktywności proteaz HtrA człowieka, wliczając prace [3], [4], [5], których jestem współautorem.

Obok tematyki związanej z molekularnym mechanizmem działania HtrA2 moje zainteresowanie wzbudził wątek powiązań proteaz HtrA z onkogenezą. Wnioski płynące z danych literaturowych sugerowały, że białka te mogą zajmować zasadnicze miejsce w mechanizmach patogenezы nowotworów oraz stanowić potencjalne molekularne markery w diagnostyce i leczeniu tych chorób [1]. Badania w tym kierunku umożliwiła współpraca z dr n. med. Tomaszem Stefaniakiem (obecnie: dr hab. n. med.) i dr Jarosławem Kobielą (obecnie: dr hab. n. med.) z Zespołu Prof. dr hab. Zbigniewa Śledzińskiego z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Endokrynologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Moja uwaga skupiła się na patogenezie nowotworów tarczycy oraz patogenezie raka jelita grubego. Nowotwory tarczycy to najczęściej spotykane nowotwory układu wewnątrzwydzielniczego, do których należą guzy łagodne oraz nowotwory złośliwe, w tym raki pęcherzykowy i brodawkowy stanowiące ok. 90% nowotworów złośliwych tarczycy [Fagin & Wells, 2016]. Z kolei rak jelita grubego należy do grona najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych na świecie, w szczególności w krajach wysokorozwiniętych, i zajmuje czwarte miejsce wśród przyczyn

śmierci z powodu choroby nowotworowej [Arnold *et al.*, 2017; Kuipers *et al.*, 2015]. Celem badań była odpowiedź na pytanie o związek białek HtrA1-3, w tym izoform HtrA3, z patogenezą wybranych nowotworów. Białko HtrA3 zostało zidentyfikowane jako proteaza związana z rozwojem ciąży [Nie *et al.*, 2003]. Przypisuje się jej rolę supresorową w rozwoju niektórych typów nowotworów [Skórko-Glonek *et al.*, 2013]. HtrA3 może występować w komórce w formie dwóch izoform, będących efektem alternatywnego składania RNA: długiej (HtrA3L) oraz krótkiej (HtrA3S). HtrA3S pozbawiona jest domeny PDZ, a jej miejsce zajmuje unikalna C-końcowa sekwencja [Nie *et al.*, 2003]. Nasunęło się pytanie o znaczenie występowania w komórce dwóch izoform; rola izoform HtrA3 w fizjologii komórki i znaczenie w rozwoju stanów patologicznych nie była znana. Brak domeny PDZ czyni HtrA3S unikatowym wśród białek z rodziny HtrA. Tym bardziej pytanie o związek izoform HtrA3 z onkogenezą stało się niezwykle intrygujące.

Do badań nad związkiem HtrA1-3 z patogenezą nowotworów tarczycy zostało włączonych 40 chorych leczonych z powodu guzów łagodnych i złośliwych tarczycy. W tkance nowotworowej oraz kontrolnej (makroskopowo niezmięnionej tkance tarczycy) została zbadana ekspresja genów *HTRA1-3* poprzez oznaczenie poziomu białek HtrA techniką immunoblottingu. Okazało się, że poziom białek HtrA2 i HtrA3S był podwyższony w tkance raka tarczycy w porównaniu z tkanką kontrolną oraz tkanką guza łagodnego, natomiast poziom HtrA3L był wyższy w tkance raka tarczycy w porównaniu z guzem łagodnym, co sugeruje związek zmian w ekspresji *HTRA2* i *HTRA3*, w tym ekspresji wariantów *HTRA3* z onkogenezą tarczycy. Co ciekawe, poziom HtrA3L był podwyższony w tkance kontrolnej pochodzącej od chorych z rakiem tarczycy w odniesieniu do tkanki nowotworowej i kontrolnej tarczycy pochodzących od chorych z guzem łagodnym, co sugeruje, że wyższy poziom HtrA3L w prawidłowej tkance tarczycy może mieć związek z rozwojem nowotworu złośliwego tego gruczołu. Ponadto, rak brodawkowy i pęcherzykowy różniły się ekspresją *HTRA1* i *HTRA3S*; poziom HtrA1 był obniżony w raku brodawkowym, natomiast poziom HtrA3S był podwyższony w raku pęcherzykowym, co sugeruje, że ekspresja *HTRA1/3S* może być powiązana z typem histologicznym. Uzyskane wyniki pokazały po raz pierwszy, że w przebiegu karcynogenezy ekspresja wariantów *HTRA3* może być zróżnicowana oraz zależna od typu histologicznego nowotworu. Można zatem przypuszczać odmienną funkcję tych izoform w patogenezie guzów tarczycy. Zebrane wyniki złożyły się na pracę [2].

Rozpoczynając badania nad udziałem proteaz HtrA w patogenezie raka jelita grubego nawiązałam współpracę z Zespołem Prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Kmiecica z Katedry Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr n. med. Rafałem Pęksą z Zespołu Prof. dr hab. n. med. Wojciecha Biernata z Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Owocem tej współpracy stała się praca [7]. Do badania włączonych zostało 65 przypadków – chorych leczonych z powodu raka jelita grubego, od których pobrano tkankę nowotworową oraz kontrolną (makroskopowo niezmięzoną śluzówkę jelita grubego). W materiale tkankowym oznaczona została ekspresja genów *HTRA1-3*; poziom mRNA został oznaczony metodą PCR w czasie rzeczywistym, natomiast poziom białka, techniką immunoblottingu. Uzyskane wyniki pokazały, że poziom mRNA *HTRA1* był podwyższony w tkance nowotworowej, w szczególności w guzach pierwotnych pochodzących od

chorych na raka jelita grubego w stadium zaawansowanym (III i IV stopień zaawansowania określony wg skali TMN [Amin *et al.*, 2017]), natomiast poziom mRNA *HTRA2* był obniżony w tkance nowotworowej. Ponadto, w tkance nowotworowej jelita grubego poziom białek HtrA1 i HtrA2 był obniżony, w szczególności w guzach pochodzących od chorych w stadium zaawansowanym choroby. Wyniki te sugerują, że wśród genów *HTRA*, ekspresja *HTRA1* i *HTRA2* zmienia się w przebiegu onkogenezy jelita grubego, co więcej, zmiany te mogą być związane z potencjałem nowotworu do tworzenia przerzutów. W poszukiwaniu przyczyny obserwowanych zmian w ekspresji *HTRA1/2* sprawdzono, czy istnieje powiązanie między poziomem transkryptu genów *HTRA* a niestabilnością mikrosatelitarną (MSI, *microsatellite instability*). Występowanie MSI jest związane z dysfunkcją systemu naprawy błędnie sparowanych zasad DNA (*DNA mismatch repair*) i leży u podstaw jednej z trzech ścieżek molekularnych odpowiedzialnych za rozwój raka jelita grubego (obok ścieżki związanej z niestabilnością chromosomalną (*chromosomal instability*) oraz ścieżki związanej z fenotypem metylatorowym (CIMP, *CpG Island methylator phenotype*) [Mundade *et al.*, 2014]. W prezentowanej pracy występowanie MSI zostało zbadane przez oznaczenie w tkance nowotworowej polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych należących do panelu markerów rekomendowanych do definiowania statusu stabilności mikrosatelitarnej raka jelita grubego [Boland *et al.*, 1998]. Na tej podstawie możliwe było wyróżnienie nowotworów charakteryzujących się stabilnością mikrosatelitarną (MSS, *microsatellite stability*), oraz występowaniem niestabilności mikrosatelitarnej stopnia wysokiego (MSI-H) i niskiego (MSI-L), i następnie poszukiwanie korelacji między tak zdefiniowanym statusem nowotworu a ekspresją genów *HTRA*. Uzyskane wyniki pokazały, że poziom mRNA *HTRA1* oraz poziom mRNA *HTRA2* były obniżone w grupie nowotworów z MSI-H w porównaniu z nowotworami z MSS. Co więcej, w przypadku *HTRA1*, poziom transkryptu był podwyższony w guzach z MSS w porównaniu z poziomem transkryptu w tkance kontrolnej. Wyniki te pokazały, że poziom mRNA genów *HTRA1* i *HTRA2* spada wraz ze wzrostem MSI, co sugeruje, że obserwowane zmiany w ekspresji tych genów mogą być związane, przynajmniej częściowo, ze zjawiskiem niestabilności mikrosatelitarnej. Niezwykle ciekawa obserwacja wynikała z analizy krzywych przeżycia chorych; krótszy był czas przeżycia chorych, u których poziom jednego z białek HtrA (HtrA1 lub HtrA2) w tkance nowotworowej był obniżony, co więcej, gdy poziom obydwu białek HtrA był obniżony efekt ten kumulował się. Ponadto, co ciekawe, nie uległa zmianie ekspresja *HTRA3L* i *HTRA3S*. Biorąc pod uwagę wyniki, które złożyły się na pracę [2] można przypuszczać, że związek izoform HtrA3 z transformacją nowotworową może być odmienny w zależności od typu nowotworu. Wyniki pracy [7] stanowią interesujący punkt wyjściowy do szczegółowych badań nad charakterystyką proteaz HtrA w raku jelita grubego oraz nad przydatnością oznaczania białek HtrA jako markerów w diagnostyce i leczeniu tego typu raka.

Podsumowując, najważniejsze odkrycia cyklu prac składających się na moje osiągnięcie naukowe to:

- Wykazanie, że podczas wzrostu temperatury dochodzi do zmian konformacyjnych na styku domeny PDZ i domeny proteazowej (PD) prowadzących do rozluźnienia struktury proteazy HtrA2. Zmiany te mają charakter sekwencyjny, najpierw zachodzą w domenie PDZ, następnie w PD.

- Wykazanie, że oddziaływania hydrofobowe z udziałem reszt aminokwasowych położonych na styku powierzchni domen są istotnym elementem stabilizującym strukturę HtrA2, oraz że podczas aktywacji termicznej dochodzi do zmiany charakteru oddziaływań reszt aminokwasowych z rejonów bliskiego kontaktu domen, co sprzyja otwarciu struktury i zwiększeniu dostępu do szczeliny wiążącej peptyd w domenie PDZ i centrum katalitycznego proteazy.

- Wykazanie, że podczas aktywacji termicznej domena PDZ zmienia swoje położenie względem PD wewnątrz monomeru, czemu towarzyszą zmiany konformacyjne pętli regulatorowej L3, oraz względem domeny proteazowej sąsiedniej podjednostki, co indukuje zmiany strukturalne pętli L1*, gdzie zlokalizowana jest seryna centrum katalitycznego. Stwierdzenie, że helisa $\alpha 5$ stanowi ważny element pośredniczący w zmianach wewnątrz monomeru oraz między podjednostkami w trimerze.

- Stwierdzenie, że mechanizm aktywacji termicznej proteazy HtrA2 może mieć podobny schemat jak aktywacja poprzez peptyd allosteryczny.

- Zaproponowanie schematu regulacji HtrA2, w którym w trakcie aktywacji zmienia się położenie domeny PDZ względem PD. Domena PDZ przesuwa się wzdłuż powierzchni styku PD–PDZ w kierunku przeciwnym w stosunku do centrum aktywnego. Ruch ten przechodzi w obrót, wskutek czego krawędź domeny PDZ odsłania centrum katalityczne oraz zwiększa się dostęp do szczeliny wiążącej peptyd w domenie PDZ. Jednocześnie zmiany przenoszone są na sąsiednią podjednostkę w trimerze, w szczególności dotyczą pętli L1*, czego skutkiem jest przyjęcie aktywnej konformacji przez centrum katalityczne.

- Wykazanie, że ekspresja genów *HTRA1-3*, w tym wariantów *HTRA3 – HTRA3L* i *HTRA3S*, zmienia się w rozwoju raka tarczycy, co pośrednio sugeruje związek białek HtrA z patogenezą nowotworu tarczycy oraz odmienną funkcję izoform HtrA3 w rozwoju tego typu nowotworu.

- Wykazanie, że ekspresja genów *HTRA1/2* zmienia się w przebiegu karcynogenezy jelita grubego i może być, przynajmniej częściowo, związana ze zjawiskiem niestabilności mikrosatelitarnej (MSI). Poziom białek HtrA1 i HtrA2 jest obniżony w raku jelita grubego i koreluje z krótszym czasem przeżycia chorych, co więcej, gdy poziom obydwu białek HtrA jest obniżony, efekt ten kumuluje się.

- Stwierdzenie, że ekspresja wariantów *HTRA3L* i *HTRA3S* może być odmienna w przebiegu karcynogenezy i zróżnicowana w zależności od typu nowotworu.

Wymienione rezultaty badań umożliwiły wnikiwiejsze wniknięcie w molekularne szczegóły aktywacji proteazy HtrA2 a tym samym przyczyniły się do uzupełnienia wiedzy o sposobach regulacji białek z rodziny HtrA. Wiedza ta może stanowić punkt wyjścia w kierunku badań nad opracowaniem cząsteczek modulujących aktywność proteazy HtrA2 w oparciu o działanie allosteryczne. Zważywszy na proapoptotyczne właściwości HtrA2 cząsteczki takie mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii chorób, w tym chorób nowotworowych. Ponadto, rezultaty badań uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat związku białek HtrA z patogenezą nowotworów i mogą stanowić punkt wyjścia do badań nad

rolą tych proteaz w mechanizmach karcynogenezy oraz ich wykorzystaniem jako markerów nowotworowych.

Literatura uzupełniająca (poza publikacjami tworzącymi osiągnięcie naukowe):

Amin M.B., Edge S., Greene F., Byrd D.R., Brookland R.K., Washington M.K., *et al.* (2017). AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed. American Joint Committee on Cancer: Chicago, IL, USA.

Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66: 683–691.

Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W., *et al.* (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248–5257.

Chien J., Campioni M., Shridhar V., Baldi A. (2009). HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 451–468.

Clausen T., Kaiser M., Huber R., Ehrmann M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 152–162.

Fagin J.A., Wells S.A. (2016). Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Eng J Med* 375(11): 1054–1067.

Hansen G., Hilgenfeld R. (2013). Architecture and regulation of HtrA family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol Life Sci* 70: 761–775.

Krojer T., Sawa J., Huber R., Clausen T. (2010). HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues. *Nat Struct Mol Biol* 17: 844–852.

Kuipers E.J., Grady W.M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J.J., Boelens P.G., *et al.* (2015). Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primer* 1: 15065.

Li W., Srinivasula S.M., Chai J., Li P., Wu J.-W., Zhang Z., *et al.* (2002). Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* 9: 436–441.

Liu C., Xing F., He Y., Zong C., Luo C., Li C. *et al.* (2018). Elevated HTRA1 and HTRA4 in severe preeclampsia and their roles in trophoblast functions. *Mol Med Rep* 18(3): 2937–2944.

Mansoor S.E., Dewitt M.A., Farrens D.I. (2010). Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: the tryptophan-induced quenching (TriQ) method. *Biochem (Mosc)* 49: 9722–9731.

Martins L.M., Turk B.E., Cowling V., Borg A., Jarrell E.T., Cantley, L.C., *et al.* (2003). Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* 278: 49417–49427.

Mundade R., Imperiale T.F., Prabhu L., Loehrer P.J., Lu T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* 1: 400–406.

Nie G-Y., Hampton A., Li Y., Findlay JK., Salamonsen LA. (2003). Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J* 371: 39–48.

Singh N., Kupili R.R., Bose K. (2011). The structural basis of mode of activation and functional diversity: a case study with HtrA family of serine proteases. *Arch Biochem Biophys* 616(2): 85–96.

Skórko-Glonek J., **Żurawa-Janicka D.**, Koper T., Jarzab M., Figaj D., Glaza P., *et al.* (2013). HtrA protease family as therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 19: 977–1009

Sobiecka-Szkatuła A., Polit A., Scirè A., Gieldoń A., Tanfani F., Szkarłat Z., Ciarkowski J., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2009). Temperature-induced conformational changes within the regulatory loops L1-L2-LA of the HtrA heat-shock protease from *Escherichia coli*. *BBA-Proteins Proteomics* 1794: 1573-1582.

Zhang Y., Appleton B.A., Wu P., Wiesmann C., Sidhu S.S. (2007). Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain. *Protein Sci* 16: 1738–1750.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Po ukończeniu studiów, będąc członkiem Zespołu kierowanego przez Prof. dr hab. Barbarę Lipińską, zostałam zaangażowana w badania zmierzające do scharakteryzowania molekularnego mechanizmu działania proteazy HtrA *E. coli*. W oparciu o metody krystalografii rentgenowskiej podjęliśmy próbę poznania struktury przestrzennej HtrA *E. coli*. Prace doświadczalne nad uzyskaniem monokryształów białka HtrA *E. coli* prowadziłam w pracowniach Centrum Badań Biokrystalicznych (CBB) Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w okresie od stycznia do czerwca 2001 roku **[Załącznik 7]**. W tym czasie uczestniczyłam także w seminariach naukowych CBB. Mimo uzyskania obiecujących wyników wstępnych prace nasze zostały zawieszono – w 2002 roku struktura HtrA *E. coli* została rozwiązana przez inny zespół.

Badania zmierzające do poznania molekularnego mechanizmu regulacji proteazy HtrA2 wymagały szczegółowej analizy struktury tego białka. W tym czasie nawiązałam bliższą współpracę z dr Arturem Gieldoniem (obecnie: dr hab.) z Zespołu Prof. dr hab. Jerzego Ciarkowskiego z Katedry Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, który posiada doświadczenie w analizie i modelowaniu struktur przestrzennych molekuł oraz był zaangażowany we wcześniejsze badania nad charakterystyką strukturalną proteazy HtrA *E. coli* prowadzone przez dr Joannę Skórko-Glonek (obecnie: Prof. dr hab.) **[Sobiecka-Szkatuła et al., 2009]**. Współpracę tą zapoczątkowała dyskusja nad uzyskanymi przez mnie wynikami testów *in vitro* aktywności proteolitycznej mutein HtrA2 w kontekście zmian strukturalnych zachodzących na styku domeny PDZ i PD, indukowanych wprowadzonymi substytucjami reszt aminokwasowych. Współpraca ta trwająca nieprzerwanie kilka lat dała możliwość konfrontacji i dyskusji wyników uzyskanych w warunkach *in vitro*, badań spektroskopowych i analiz biochemicznych, w których brałam udział, z wynikami analizy struktury przestrzennej proteazy i modelowania molekularnego. Przyczyniła się do powstania modelu mechanizmu aktywacji HtrA2. Wyniki te zostały opublikowane w pracach **[3], [4], [5]**.

W trakcie badań nad modelem termicznej aktywacji nawiązałam współpracę z dr Agnieszką Polit z Katedry Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, która posiada doświadczenie w badaniach oddziaływań makrocząsteczek z wykorzystaniem metod spektroskopii fluorescencyjnej oraz znakowaniu cząsteczek znacznikami fluorescencyjnymi. Kontakt z dr A. Polit nawiązałam podczas 46. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie w 2011 roku. Dzięki temu planowałam doświadczenia z wykorzystaniem metody TriQ. Ponadto, wynikiem podjętej współpracy jest analiza parametrów hydrodynamicznych oligomeru HtrA2 wykonanych metodą DLS, której wyniki potwierdziły tezę, że termicznej aktywacji proteazy towarzyszy rozluźnienie struktury. Powyższe wyniki zostały opublikowane w pracy [3].

W roku 2012 nawiązałam współpracę z dr Grzegorzem Dubinem (obecnie: Prof. dr hab.) z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Impulsem do kontaktu z dr Dubinem stała się próba wyjaśnienia zwiększonej aktywności proteolitycznej jednej z mutein HtrA2 (HtrA2 V226K). Dzięki podjętej współpracy z dr G. Dubinem (Obecnie: Prof. dr hab.) rozwiązana została struktura przestrzenna tej muteiny, a uzyskane wyniki zostały opublikowane [5].

Badania nad związkiem białek HtrA człowieka z patogenezą wybranych nowotworów prowadzone były we współpracy z dr n. med. Tomaszem Stefaniakiem (dr hab. n. med.) i dr n. med. Jarosławem Kobiela (dr hab. n. med.) z Zespołu Prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Śledzińskiego z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Endokrynologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Dzięki temu możliwe było zaplanowanie i przeprowadzenie badań biochemicznych na materiale tkankowym pochodzącym od chorych leczonych z powodu nowotworów tarczycy. Wyniki tych badań zostały opublikowane w [2]. W 2015 roku, rozpoczynając badania nad białkami HtrA w patogenezie raka jelita grubego, nawiązałam także współpracę z Zespołem kierowanym przez Prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Kmiecica z Katedry Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, który posiada wieloletnie doświadczenie w badaniach nad patogenezą chorób jelita grubego. W okresie od września 2015 r. do maja 2017 r. prowadziłam prace doświadczalne w pracowniach Katedry Histologii GUMed [Załącznik 7], które obejmowały oznaczenie ekspresji genów *HTRA* w materiale tkankowym pochodzącym od chorych na raka jelita grubego z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym oraz oznaczenie lokalizacji białek HtrA preparatach tkankowych w oparciu o barwienie immunohistochemiczne. Ponadto, brałam też udział w badaniach nad związkiem między ekspresją *TNFSF15* a rozwojem raka jelita grubego. Kontynuując badania nad związkiem białek HtrA z rozwojem raka jelita grubego nawiązałam kontakt z dr n. med. Rafałem Pęksą z Zespołu Prof. dr hab. n. med. Wojciecha Biernata z Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach współpracy preparaty tkankowe zostały poddane ocenie histologicznej i immunohistochemicznej, a na tej postawie została określona lokalizacja białek HtrA w niezmiętej śluzówce jelita i tkance raka jelita grubego. Owocem zrealizowanych we współpracy badań jest publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego [7] oraz praca [Slebioda *et al.*, 2019 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 18], wchodząca do pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Literatura uzupełniająca (poza publikacjami tworzącymi osiągnięcie naukowe):

Ślebioda T., Stanisławowski M., Cyman M., Wierzbicki P., **Żurawa-Janicka D.**, Kobiela J., Makarewicz W., Guzek M., Kmiec Z. (2019). Distinct expression patterns of two tumor necrosis factor superfamily member 15 gene isoforms in human colon cancer. *Dig Dis Sci* 64(7): 1857-1867.

Sobiecka-Szkatuła A., Polit A., Scirè A., Gieldoń A., Tanfani F., Szkarłat Z., Ciarkowski J., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2009). Temperature-induced conformational changes within the regulatory loops L1-L2-LA of the HtrA heat-shock protease from *Escherichia coli*. *BBA-Proteins Proteomics* 1794: 1573-1582.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

a) Osiągnięcia dydaktyczne

Przygotowanie i prowadzenie zajęć

1. *Biochemia – ćwiczenia laboratoryjne* dla studentów II roku Biologii, Oceanografii i Biotechnologii; od 1999r do 2013r – prowadzenie zajęć, funkcja koordynatora ćwiczeń w latach 2010–2013, udział w opracowaniu programu zajęć
2. *Biochemia – ćwiczenia laboratoryjne* dla studentów II roku Bioinformatyki studiów I stopnia – funkcja koordynatora ćwiczeń w roku akademickim 2012/2013
3. *Wstęp do biochemii – ćwiczenia audytoryjne* dla studentów II roku Genetyki i biologii eksperymentalnej studiów I stopnia – udział w opracowaniu programu zajęć, prowadzenie zajęć
4. *Biopolimery – ćwiczenia laboratoryjne* dla studentów II roku Bioinformatyki studiów I stopnia – funkcja koordynatora ćwiczeń w roku akademickim 2012/2013
5. *Pracowania specjalnościowa – ćwiczenia laboratoryjne* dla studentów Biologii studiów II stopnia, specjalizacji Biologia molekularna, od 2000 roku – prowadzenie zajęć
6. *Fizyka z elementami biofizyki – ćwiczenia laboratoryjne* dla studentów II roku Biologii oraz Biologii Medycznej studiów I stopnia, od 2011r do 2018r – prowadzenie ćwiczeń
7. *Proseminarium* dla studentów III roku Biologii studiów I stopnia, specjalizacji Biologia molekularna, w latach 2011 – 2013 – przygotowanie i prowadzenie zajęć
8. *Metody znakowania cząsteczek biologicznych* – wykład dla studentów Biologii I roku studiów II stopnia, specjalizacji Biologia molekularna, od 2012 roku – przygotowanie i prowadzenie wykładu
9. *Metabolizm – aspekty medyczne* – wykład dla studentów II roku Biologii medycznej studiów I stopnia, od 2015 roku – przygotowanie i prowadzenie wykładu
10. *Metabolizm – aspekty medyczne – ćwiczenia audytoryjne* dla studentów II roku Biologii medycznej studiów I stopnia – od 2016 roku – prowadzenie ćwiczeń

11. *Biochemiczne podstawy funkcjonowania organizmów – wykład* dla studentów III roku Biologii studiów I stopnia – od 2014 roku – przygotowanie i prowadzenie wykładu

12. *Seminarium dyplomowe – seminarium* dla studentów III roku Biologii i Biologii medycznej studiów I stopnia, od 2018 roku

13. *Podstawy immunologii komórkowej i molekularnej – wykład* dla studentów II roku Biologii, Biologii medycznej, Genetyki i biologii eksperymentalnej studiów I stopnia, od 2019 roku – prowadzenie wykładu

Opieka naukowa nad studentami

1. Opieka merytoryczna nad studentami wykonującymi prace magisterskie (2002 – 2008), Uniwersytet Gdański, 5 osoby

2. Promotor 13 prac magisterskich (2010–2021), Uniwersytet Gdański:

Gałczyńska N. *Ekspresja genów HtrA1, HtrA2 oraz HtrA3 w nowotworach tarczycy*. (2010). Kierunek: Biologia, specjalność: biochemia.

Chrzanowska E. *Ekspresja genu TGF- β 1 w nowotworach tarczycy*. (2010). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia eksperymentalna.

Glaza P. *Klonowanie i ekspresja ludzkiego genu HtrA3*. (2011). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia molekularna.

Lubomska A. *Mechanizm działania proteazy HtrA2 człowieka*. (2011). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia molekularna.

Wenta T. *Molekularne podstawy aktywacji proteazy HtrA2/Omi*. (2013). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia medyczna.

Augustynowicz M. *Białka HtrA w kancerogenezie trzustki*. (2014). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia medyczna.

Beutler A. *Mechanizm działania białek HtrA2 i HtrA3*. (2015). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia medyczna.

Klepacka E. *Identyfikacja fizjologicznych substratów izoform białka HtrA3 metodą immunoprecypitacji*. (2016). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia medyczna.

Gos I. *Analiza poziomu przeciwciał anty-Hsp40 w surowicy dzieci z mastocytozą*. (2017). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia medyczna.

Oleksiak A. *Analiza poziomu izoformy długiej (L) i krótkiej (S) HTRA3 u chorych na raka jelita grubego*. (2018). Kierunek: Biologia, specjalność: biologia molekularna.

Ciołek M. *Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko wybranym białkom HtrA u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów*. (2019). Kierunek: Biologia medyczna, specjalność: diagnostyka molekularno-biochemiczna.

Popielarczyk A. *Ocena udziału bakteryjnych białek HtrA w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów.* (2020). Kierunek: Biologia medyczna, specjalność: diagnostyka molekularno-biochemiczna.

Zielonka D. *Analiza odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko proteazie serynowej HtrA Helicobacter pylori u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów.* (2021). Kierunek: Biologia medyczna, specjalność: diagnostyka molekularno-biochemiczna.

3. Promotor 13 prac licencjackich (2011–2020), Uniwersytet Gdański, kierunki studiów: Biologia, Biologia medyczna

4. Opieka merytoryczna nad studentami wykonującymi praktyki zawodowe w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego (2008-2009), studenci Uniwersytetu Gdańskiego (2 osoby) i Uniwersytetu Lubelskiego (1 osoba)

5. Opieka merytoryczna nad Studentem z *Houston-Downtown University* (Houston, USA) w ramach warsztatów organizowanych przez Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, lipiec 2008.

6. Opieka merytoryczna nad absolwentką *Universitat de Valencia* (Walencja, Hiszpania) wykonującą praktyki zawodowe w ramach programu ERASMUS – październik-grudzień 2017

b) Działalność w zakresie popularyzacji nauki

1. Przygotowanie i realizacja zajęć edukacyjnych promujących wiedzę biologiczną pt. „Poznaj prawdziwe kolory liści” w ramach projektu pt. „Poznaj pracę biologa”. Zajęcia prowadzone były w formie warsztatów laboratoryjnych oraz wykładu w latach 2011-2013. Skierowane były do uczniów klas licealnych.

2. Bałtycki Festiwal Nauki, „Noc Biologów”, Dni Otwarte na Wydziale Biologii UG – prezentacja tematyki badań prowadzonych w Katedrze Biochemii UG (obecnie Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej) dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych

c) Nagrody uzyskane za działalność dydaktyczną

Medal Komisji Edukacji Narodowej za szczególne zasługi dla oświaty i wychowania, Warszawa, 2014

d) Działalność organizacyjna

W 2019 roku zostałam powołana na członka Komisji ds. Zamkniętego użycia organizmów genetycznie modyfikowanych działającej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

7. Inne informacje dotyczące kariery naukowej

a) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W 1998 roku ukończyłam studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Pracę magisterską pt. „Badanie oddziaływań proteazy HtrA z fosfolipidami błonowymi *Escherichia coli*, *in vitro* oraz *in vivo*” wykonywałam w Katedrze Biochemii pod kierunkiem Prof. dr hab. Barbary Lipińskiej.

Pierwszy projekt naukowy, w którego realizacji uczestniczyłam dotyczył badań nad udziałem proteazy HtrA *Escherichia coli* w odpowiedzi na stres komórkowy. HtrA *E. coli* jest białkiem peryferyjnym błony, zlokalizowanym po stronie peryplazmatycznej błony komórkowej wewnętrznej. Aktywność HtrA jest niezbędna dla przeżycia komórki bakteryjnej w temperaturze powyżej 42°C [Lipińska *et al.*, 1989]. Dowiedziono, że HtrA degraduje białka o niewłaściwej strukturze oraz zdenaturowane, w tym w zdenaturowane termicznie [Strauch & Beckwith, 1988; Laskowska *et al.*, 1996]. Wyniki te wskazały, że podstawową rolą fizjologiczną HtrA jest degradacja białek o nieprawidłowej strukturze pojawiających w otocze komórkowej w warunkach stresu termicznego. Wydawało się więc logicznym, że HtrA może być także zaangażowana w eliminację białek uszkodzonych w warunkach stresu oksydacyjnego. Postanowiliśmy zweryfikować to przypuszczenie. Okazało się, że wśród testowanych związków utleniających jony żelazawe powodowały zahamowanie wzrostu w hodowli płynnej bakterii pozbawionych HtrA, co więcej, poziom grup karbonylowych – markera stopnia utlenienia białek był podwyższony, zwłaszcza we frakcji białek błonowych. Wiadomo było, że ekspresja genu *htrA* jest indukowana w następstwie podwyższenia temperatury ponad fizjologiczną wartość oraz w odpowiedzi na nieprawidłowe białka w przestrzeni peryplazmatycznej [Strauch & Beckwith, 1988; Lipińska *et al.*, 1989]. Uzyskane wyniki pokazały, że w warunkach stresu oksydacyjnego poziom białka HtrA także uległ podwyższeniu. Powyższe wyniki zostały opublikowane [Skórko-Glonek *et al.*, 1999 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 1]; po raz pierwszy został udokumentowany związek między HtrA *E. coli* a odpowiedzią na stres oksydacyjny, co więcej, uzyskane wyniki pozwalały przypuszczać, że proteaza HtrA pełni ważną rolę w degradacji białek otoczki komórkowej uszkodzonych w wyniku działania utleniaczy.

Zrodziło się zatem pytanie o mechanizm regulacji aktywności HtrA *E. coli*. W 2002 roku została rozwiązana struktura krystaliczna HtrA oraz opublikowany model przestrzenny heksamery HtrA – jednostki funkcjonalnej proteazy, w którym dwa trimery są połączone pętlami LA znajdującymi się w rejonie N-końca polipeptydów HtrA. Pętle LA stabilizują strukturę heksameryczną z wewnętrzną komorą, w której znajdują się centra katalityczne podjednostek oligomeru [Krojer *et al.*, 2002]. W trakcie wieloletnich badań nad charakterystyką biochemiczną i funkcjonalną HtrA *E. coli* prowadzonych przez Zespół Prof. dr hab. Barbary Lipińskiej zaobserwowano, że w pewnych warunkach proteaza ulega autoproteolizie skutkującej usunięciem N-końcowego fragmentu polipeptydu HtrA [Skórko-Glonek *et al.*, 1995]. Wyniki podjętych badań pokazały, że HtrA ulega autokatalitycznej modyfikacji podczas degradacji substratów w warunkach redukujących zarówno w warunkach *in vitro* jak *in vivo*. Reszty

cysteiny obecne w polipeptydzie HtrA tworzą mostek disiarczkowy, którego redukcja lub usunięcie przez substytucję reszt cysteiny stymuluje autoproteolizę nawet przy braku czynnika redukującego. Polipeptydy HtrA z usuniętym N-końcowym rejonem, choć nadal aktywne proteolitycznie, nie były zdolne do tworzenia struktury heksamerycznej. Na podstawie uzyskanych wyników został sformułowany wniosek, że N-terminalny rejon HtrA jest elementem kluczowym w utrzymaniu czwartorzędowej struktury tej proteazy. Niewykluczone, że redukcja mostka, znajdującego się w pętli LA może być sygnałem dla aktywacji proteazy, czemu towarzyszy autoproteoliza, której konsekwencją są zmiany konformacyjne w oligomerze. Zmodyfikowane proteolitycznie białko HtrA wykazywało też słabsze wiązanie z fosfolipidami błonowymi i wyższą aktywność, co może mieć znaczenie dla efektywności tej proteazy w warunkach fizjologicznych. Powyższe wyniki zostały opublikowane w pracy [Skórko-Glonek *et al.*, 2003 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 2] i stały się punktem wyjścia do badań nad znaczeniem redukcji HtrA w regulacji aktywności proteazy oraz roli tego procesu w fizjologii komórki. Proteaza pozbawiona mostka disiarczkowego wykazywała zwiększone powinowactwo i podwyższoną aktywność wobec modelowego substratu, ekspozycja pętli LA była zwiększona a białko wykazywało większą zdolność przechodzenia w struktury oligomeryczne wyższego rzędu. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że wiązanie disiarczkowe ma znaczenie dla utrzymania struktury oligomerycznej a jego redukcja sprzyja zwiększeniu mobilności pętli LA, rearanzacji oligomeru i promuje aktywność [Koper *et al.*, 2015 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 13]. Uczestniczyłam także w projekcie mającym na celu poznanie mechanizmu aktywacji termicznej HtrA. Za pomocą metod spektroskopowych i z wykorzystaniem zrekombinowanych białek z pojedynczymi substytucjami tryptofanu (Trp) możliwe było śledzenie zmian strukturalnych w wybranych rejonach białka, w tym w rejonie pętli regulatorowych kluczowych dla aktywacji HtrA pod wpływem temperatury. Analiza parametrów wygaszania fluorescencji Trp za pomocą akryloamidu w zależności od temperatury w połączeniu z wynikami średniego czasu życia i maksimum fluorescencji Trp wskazały, że wraz ze wzrostem temperatury struktura HtrA ulega stopniowemu rozluźnieniu; w największym stopniu zmiany te dotyczą pętli regulatorowej LA, w mniejszym stopniu pętli L2 [Sobiecka-Szkatuła *et al.*, 2009 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 11].

Uczestniczyłam także we wstępnych pracach nad wpływem białek IbpAB, należących do małych HSPs, na aktywność enzymów tworzących ciała inkluzyjne, których pojawienie się w komórce jest efektem gromadzenia białek o nieprawidłowej strukturze przestrzennej. IbpAB wiążąc się do polipeptydów w ciałach inkluzyjnych pełnią wobec nich funkcję opiekuńczą; chronią polipeptydy przed nieodwracalną agregacją i umożliwiają enzymom zachowanie ich aktywności enzymatycznej [Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2004 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 3]. Zagadnienia związane z budową i funkcją bakteryjnych białek opiekuńczych i proteaz w mechanizmach agregacji i dezagregacji białek zostały zawarte w pracy [Skórko-Glonek *et al.*, 2011 – Załącznik 4, pkt II.2, praca nr 2], w której miałam okazję przygotować rozdział na temat proteaz cytoplazmatycznych *E. coli*.

Kiedy brałam udział w projektach dotyczących udziału HSPs w odpowiedzi stresowej moje zainteresowanie wzbudził wątek dotyczący znaczenia stresu oksydacyjnego w rozwoju stanów patologicznych. Uczestniczyłam w opracowaniu metody oznaczania poziomu utlenionych białek frakcji

surowicy krwi. Metoda ta stanowi połączenie elektroforezy dwukierunkowej oraz immunodetekcji pochodnych grup karbonylowych utlenionych białek – markera stopnia oksydacyjnego uszkodzenia białek. Stosując tą metodę wykazałam, że gammaglobuliny należą do najsilniej utlenionych białek surowicy krwi u dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (*Juvenile idiopathic arthritis*, JIA). Kolejne miejsce w tej grupie zajmuje albumina, a profil utlenienia białek surowicy zależy od typu JIA. Opracowana metoda może znaleźć zastosowanie w monitorowaniu poziomu grup karbonylowych jako markera aktywności procesu zapalnego w rozwoju JIA, a także w diagnostyce innych chorób [Żurawa-Janicka et al., 2006 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 4]. Ponadto, dzięki współpracy z Zespołem Prof. dr hab. n. med. Michała Woźniaka z Katedry Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego brałam udział w badaniach mających na celu poznanie dynamiki indukowanego estradiolem stresu oksydacyjnego z wykorzystaniem zwierzęcego modelu hormonozależnego raka piersi, w którym nefrokarcynogeneza u chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*) indukowana jest przez długotrwałą estrogenizację [Li et al., 1995]. Wyniki tych badań pokazały, że w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego krótkotrwałą ekspozycją na estradiol najbardziej narażone na uszkodzenie oksydacyjne są białka oraz DNA, co może stanowić początkowy, aczkolwiek znaczący krok w kierunku transformacji nowotworowej [Kobiela et al., 2007 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 5], [Kobiela et al., 2008 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 9].

Ze względu na fakt, że białka HtrA są indukowane w warunkach stresowych wątek związany ze skutkami działania stresu oksydacyjnego indukowanego estrogenem znalazł kontynuację w postaci projektu dotyczącego zaangażowania eukariotycznych homologów HtrA w rozwój stanów patologicznych. Wykazałam, że w nerce chomika syryjskiego pod wpływem krótkotrwałej estrogenizacji ekspresja genu *HTRA1* wzrasta, co pośrednio sugeruje związek białka HtrA1 z odpowiedzią na stres oksydacyjny indukowany estradiolem. Długotrwała ekspozycja na estradiol spowodowała istotny spadek ekspresji genu *HTRA1* oraz istotny wzrost ekspresji genu *HTRA2*, co z kolei sugeruje związek białek HtrA1 i HtrA2 z rozwojem estrogenozależnego nowotworu nerki u *M. auratus*. Dzięki zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), gen *HTRA1* *M. auratus* został zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 2 w regionie qb3-4. W wyniku przewlekłej estrogenizacji rejon ten z dużą częstotliwością ulega delecji [Papa et al., 2003], co mogłoby, przynajmniej częściowo, tłumaczyć spadek poziomu ekspresji genu *HTRA1* zaobserwowany w nerce poddanej przewlekłej ekspozycji na estradiol. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami innych autorów sugerujących, iż HtrA1 może pełnić rolę białka supresorowego w rozwoju nowotworu oraz wskazują po raz pierwszy na istnienie związku między białkiem HtrA1 a odpowiedzią na stres oksydacyjny wywołany estrogenem. Po raz pierwszy wykazano istnienie korelacji pomiędzy ekspresją *HTRA2* a rozwojem nowotworu. Sklonowana została sekwencja kodującego DNA genu *HTRA1* oraz fragment cDNA *HTRA2* *M. auratus*. Sekwencje te zostały zdeponowane w bazie GenBank (numery dostępu: EF185310, EF185311). Wyniki powyższe zostały opublikowane [Żurawa-Janicka et al., 2008 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 6], oraz złożyły się na moją pracę doktorską pt. „Udział białek HtrA1 i HtrA2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz w nefrokarcynogenezie estrogenozależnej u chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*)”, którą

obroniłam w listopadzie 2008 roku na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Wiadomości dotyczące charakterystyki białek HtrA zostały opublikowane w pracy [Żurawa-Janicka *et al.*, 2007 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 8] oraz w postaci rozdziału w książce [Żurawa-Janicka *et al.*, 2008 – Załącznik 4, pkt II.2, praca nr 1].

Ponadto, w ramach współpracy nawiązanej przez Prof. dr hab. Barbarę Lipińską z Zespołem Prof. dr hab. Janusza Emmericha z Katedry i Kliniki Ginekologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego brałam udział w badaniach nad związkiem białek HtrA1-3 z rozwojem nowotworu jajnika i raka endometrium. Dzięki współpracy możliwe było przeprowadzenie badań na materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów. Efektem tych badań było wykazanie, że ekspresja genów *HTRA1* i *HTRA3* (mierzona zarówno na poziomie transkryptu jak i białka) jest obniżona w tkance nowotworowej pochodzącej z różnych typów nowotworów jajnika [Narkiewicz *et al.*, 2008 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 7] a także w tkance raka endometrium [Narkiewicz *et al.*, 2009 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 10]. Ponadto, w przypadku raka endometrium wykazano istnienie negatywnej korelacji między poziomem białek HtrA a poziomem TGF- β 1. Wyniki te były zgodne z wynikami innych autorów wskazującymi na supresorową funkcję proteaz HtrA1 i HtrA3 w mechanizmach transformacji nowotworowej [Baldi *et al.*, 2002; Chien *et al.*, 2004, 2006; Bowden *et al.*, 2006], oraz pokazały powiązanie białek HtrA z regulacją sygnalizacji TGF- β w tkance endometrium.

Zagadnieniom związanym z fizjologiczną funkcją białek HtrA oraz ich rolą w mechanizmach patogenezы, w tym w rozwoju nowotworów, została poświęcona praca przeglądowa [Skórko-Glonek *et al.*, 2013 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 12], natomiast w pracach [Żurawa-Janicka *et al.*, 2011 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 22], [Jarzab *et al.*, 2012 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 23], [Glaza *et al.*, 2012 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 24] przedstawiona została charakterystyka genów *HTRA1*, *HTRA2* i *HTRA3*.

Brałam także udział w projektach mających na celu analizę związku białek HtrA1-4 z patogenezą chorób, w których przebiegu rolę kluczową pełnią komórki tuczne (*mast cells*, MCs), tj. mastocytozy i chorób alergicznych; MCs podczas degranulacji uwalniają mediatory zapalne, w tym proteazy, które mają wpływ na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i adaptacyjnej oraz regulują stan zapalny [Da Silva *et al.*, 2014], produkują także HtrA1 [Gilicze *et al.*, 2007]. Pierwszy projekt dotyczył badań nad udziałem białek HtrA w rozwoju mastocytozy u dzieci – choroby, której przyczyna tkwi w patologicznej akumulacji MCs w skórze i/lub innych narządach. Przeprowadzone badania pokazały, że poziom przeciwciał IgG skierowanych przeciwko białkom HtrA1 i HtrA3 był podwyższony w surowicy dzieci ze skórą odmianą mastocytozy, co sugeruje związek odpowiedzi immunologicznej przeciwko własnym białkom HtrA z rozwojem mastocytozy; autoprzeciwciała IgG mogą tworzyć kompleksy immunologiczne z antygenem i sprzyjać eskalacji odpowiedzi zapalnej z udziałem MCs [Renke *et al.*, 2018 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 16]. Kolejne badania dotyczyły związku białek HtrA z rozwojem chorób alergicznych u dzieci. Poziom białek HtrA1-3 w surowicy dzieci chorych z alergią był podwyższony, natomiast poziom autoprzeciwciał skierowanych przeciwko białkom HtrA1-3 był obniżony. Wiadomo, że w przebiegu alergii zależnej od IgE dochodzi do aktywacji MCs, a przewlekły proces zapalny może sprzyjać onkogenezie. Biorąc pod uwagę funkcję supresorową HtrA1

i HtrA3 w onkogenezie można pokusić się o przypuszczenie, że białka te mogą działać przeciwnowotworowo u chorych z alergią [Renke *et al.*, 2020 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 21].

Obok prac dotyczących udziału białek HtrA w patogenezie chorób uczestniczyłam w projektach, których celem była charakterystyka biochemiczna i funkcjonalna proteaz HtrA3 i HtrA4. Dzięki współpracy nawiązanej przez Prof. dr hab. Barbarę Lipińską z dr Jerzym Osipiukiem (Structural Biology Center Argonne National Laboratory, USA) na podstawie analizy krystalograficznej rozwiązana została struktura przestrzenna HtrA3L; proteaza tworzy trimer, w którym domeny PDZ przyjmują pozycję pośrednią pomiędzy położeniem zajmowanym w strukturze HtrA2 przypominającej piramidę a położeniem w strukturze HtrA1 przypominającej dysk. Wyniki analiz biochemicznych dowiodły, że domena PDZ nie jest konieczna dla aktywności proteolitycznej HtrA3, czym proteaza ta przypomina HtrA1. Domena PDZ nie pełni też istotnej roli negatywnego regulatora aktywności, jak to jest w przypadku HtrA2. Domena PDZ ma natomiast zasadnicze znaczenie dla utrzymania struktury trimery; HtrA3S oraz HtrA3L pozbawiona domeny PDZ mają strukturę monomeryczną, choć ich aktywność jest zachowana. Izoformy HtrA3 miały podobną, zależną od temperatury aktywność proteolityczną wobec testowanych substratów oraz podobną specyficzność substratową. Uzyskane wyniki pokazały, że HtrA3 stanowi unikalne połączenie cech proteaz HtrA człowieka [Glaza *et al.*, 2015 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 14].

Kontynuację badań nad właściwościami struktury HtrA3 stanowiła próba wyjaśnienia znaczenia interakcji pętli LB z domeną PDZ. Cecha ta jest unikalna dla HtrA3L, niespotykana dotąd wśród innych białek z rodziny HtrA, których strukturę krystaliczną rozwiązano. Okazało się, że wprowadzenie do domeny PDZ substytucji zakłócających oddziaływania wodorowe w tym rejonie skutkuje częściowym rozpadem trimery do monomeru. Z kolei, usunięcie unikalnych reszt aminokwasowych pętli LB powodowało drastyczne zmiany struktury w kierunku form heksamerycznych, co więcej, skutkowało znacznym obniżeniem aktywności proteolitycznej. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że pętla LB uczestniczy w stabilizacji struktury natywnej oligomeru HtrA3L przez co promuje aktywność proteazy [Wenta *et al.*, 2017 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 15]. Wyniki badań nad charakterystyką strukturalną i biochemiczną HtrA3 otworzyły drogę w kierunku poznania fizjologicznej roli proteazy. Wyniki uzyskane *in vitro* pokazały, że izoformy HtrA3L/S tworzą kompleksy z licznymi białkami, m.in. białkami cytoszkieletu, białkami regulującymi apoptozę, białkami opiekuńczymi i związanymi z mechanizmami naprawy DNA. Stosując techniki immunoprecypitacji i western blottingu potwierdzone zostało tworzenie *in vivo* kompleksów HtrA3 z aktywną, β -tubuliną, wimentyną a także TCP1 α – białkiem opiekuńczym związanym z organizacją cytoszkieletu, oraz antyapoptotycznym XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Wyniki fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wskazujące na ko-lokalizację wspomnianych białek z endogennym HtrA3 dostarczyły ostatecznych dowodów na poparcie tezy o tworzeniu kompleksów *in vivo*. Ponadto, pojawiło się intrygujące pytanie o charakter oddziaływań HtrA3 z analizowanymi białkami. Okazało się, że białka cytoszkieletu oraz XIAP stanowią substraty HtrA3 *in vitro*. Co więcej, proteaza reguluje proces polimeryzacji włókien β -tubuliny *in vitro*; z jednej strony promuje tworzenie mikrotubul, z drugiej, trawi β -tubulinę. Tak więc, HtrA3 może pełnić ważną funkcję w reorganizacji

cytoszkieletu poprzez trawienie białek cytoszkieletu i udział w polimeryzacji mikrotubul. Kolejne wyniki dotyczące hodowli komórkowych pokazały, że HtrA3 promuje apoptozę poprzez trawienie XIAP. Wyniki powyższe złożyły się na dwie prace oryginalne, [Wenta *et al.*, 2018 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 17] oraz [Wenta *et al.*, 2019 – załącznik 4, pkt II.4, praca nr 20].

Uczestniczyłam także w badaniach nad charakterystyką biochemiczną i funkcjonalną HtrA4, których wyniki opublikowane zostały w pracy [Wenta *et al.*, 2019 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 19]. Okazało się, że HtrA4 tworzy kompleksy z białkami o funkcji proapoptotycznej oraz białkami cytoszkieletu, co więcej, większość z tych białek stanowi substraty HtrA4 *in vitro*. Pozwala to wyciągnąć wniosek, że proteaza ta reguluje wiele istotnych w procesów fizjologicznych, w tym mechanizmy związane ze śmiercią komórki.

Obok głównego nurtu badań nad udziałem białek HtrA w patogenezie raka jelita grubego uczestniczyłam w badaniach dotyczących związku między ekspresją genu *TNFSF15* (*tumor necrosis factor superfamily 15*) a rozwojem tego typu nowotworu. Ich wyniki zostały opublikowane w pracy [Ślebioda *et al.*, 2019 – Załącznik 4, pkt II.4, praca nr 18].

Obecnie rozpoczęłam badania nad charakterystyką odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko białkom HtrA w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Na prowadzenie badań uzyskałam finansowanie z NCN. RZS jest chorobą nieuleczalną, o podłożu autoimmunizacyjnym. Centralne miejsce patogenezy RZS zajmuje objęta stanem zapalnym błona maziowa stawów, której komórki produkują cytokiny i proteazy degradujące składniki macierzy pozakomórkowej (ECM) tkanki chrzęstnej i kostnej, co w efekcie prowadzi do utraty funkcji stawów [Scott *et al.*, 2010]. Przypuszcza się, że proteazy HtrA człowieka mogą być zaangażowane w patogenezę chorób artretycznych poprzez udział w reorganizacji ECM i sygnalizacji TGF- β [Żurawa-Janicka *et al.*, 2017]. Wykazano, że białka HtrA patogennych bakterii pełnią funkcję czynników wirulencji, są silnie immunogenne, a immunizacja nimi może chronić przed zakażeniem, stąd coraz częściej białka HtrA rozważane są jako składniki poliwalentnych szczepionek [Skórko-Glonek *et al.*, 2017]. Jak dotąd aspekt związku białek HtrA z patogenezą RZS w kontekście autoimmunizacji nie został opisany, nie określono bezpieczeństwa stosowania szczepionek z wykorzystaniem bakteryjnych HtrA w roli antygenów. W ramach dotychczas przeprowadzonych badań wykazałam, że poziom przeciwciał skierowanych przeciwko HtrA1, HtrA3 oraz HtrA *E. coli* był podwyższony w surowicy chorych z RZS oraz oznaczyłam korelacje między poziomem przeciwciał a danymi kliniczno-diagnostycznymi. Wykazałam istnienie podobieństwa immunologicznego między białkiem HtrA *E. coli* a homologicznymi białkami człowieka. Wyniki te wskazują na istnienie związku między białkami HtrA a patogenezą i etiologią RZS. Wyniki te składają się na finalizowany obecnie manuskrypt pracy oryginalnej oraz stanowią punkt wyjścia do dalszych badań w kierunku scharakteryzowania odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i adaptacyjnej skierowanej przeciwko białkom HtrA człowieka i bakterii patogennych (m.in. *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia* spp.) w mechanizmach patogenezy RZS. Oczekuję, że wyniki tych badań przyniosą odpowiedzi na nurtujące pytania: jaką rolę pełni odpowiedź immunologiczna przeciwko autologicznym białkom w rozwoju RZS, czy odpowiedź

przeciwko bakteryjnym białkom HtrA może być skierowana przeciwko własnym białkom HtrA, i w końcu, na ile stosowanie HtrA bakterii patogennych jako składnika poliwalentnych szczepionek jest bezpieczne.

Bibliografia

Prace wchodzące do pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Glaza P., Osipiuk J., Wenta T., **Żurawa-Janicka D.**, Jarzab M., Lesner A., Banecki B., Skórko-Glonek J., Joachimiak A., Lipińska B. (2015). Structural and Functional Analysis of Human HtrA3 Protease and Its Subdomains. *PLoS One* 10(6): e0131142.

Kobiela J., Stefaniak T., Krajewski J., Kalińska-Blach B., **Żurawa-Janicka D.**, Łachiński A., Gackowski D., Oliński R., Nowak J., Knap N., Lipińska B., Śledziński Z., Woźniak M. (2007). Dynamics of oxidative damage at early stages of estrogen-dependent carcinogenesis. *Acta Biochim Pol* 54: 289-295.

Kobiela J., Stefaniak T., Krajewski J., Kalińska-Blach B., **Żurawa-Janicka D.**, Łachiński A., Gackowski D., Oliński R., Nowak J., Knap N., Lipińska B., Śledziński Z., Woźniak M. (2008). Dynamics of oxidative damage at early stages of estrogen-dependent carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 617: 609-615.

Koper T., Polt A., Sobiecka-Szkatuła A., Węgrzyn K., Sciré A. A., Figaj D., Kadziński L., Zarzecka U., **Żurawa-Janicka D.**, Banecki B., Lesner A., Tanfani F., Lipińska B., Skórko-Glonek J. (2015). Analysis of the link between the redox state and enzymatic activity of the HtrA(DegP) protein from *Escherichia coli*. *PLoS One* 10(2): e011741.

Kuczyńska-Wiśnik D., **Żurawa-Janicka D.**, Narkiewicz J., Kwiatkowska J., Lipińska B., Laskowska E. (2004). *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA/B, enhance activity of the enzymes sequestered in inclusion bodies. *Acta Biochim Pol* 51: 925-931.

Narkiewicz J., Klasa-Mazurkiewicz D., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Emerich J., Lipińska B. (2008). Changes in expression of human *HtrA1*, *HtrA2* and *HtrA3* genes in ovarian cancer. *Clin Biochem* 41: 561-569.

Narkiewicz J., Łapińska-Szumczyk S., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Emerich J., Lipińska B. (2009). Expression of human *HtrA1*, *HtrA2*, *HtrA3* and *TGF-β1* genes in primary endometrial cancer. *Oncol Rep* 21: 1529-1537.

Renke J., Kędzierska-Mieszkowska S., Lange M., Nedoszytko B., Liberek A., Plata-Nazar K., Renke M., Wenta T., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2018). Immune response against HtrA proteases in children with cutaneous mastocytosis. *Acta Biochim Pol* 65(3): 471-478.

Renke J., Wasilewska E., Kędzierska-Mieszkowska S., Zorena K., Barańska S., Wenta T., Liberek A., Siluk D., **Żurawa-Janicka D.**, Szczepankiewicz A., Renke M., Lipińska B. (2020). Tumor Suppressors HTRA Proteases and Interleukin-12 in Pediatric Asthma and Allergic Rhinitis Patients. *Medicina (Kaunas)* 56: 298.

Skórko-Glonek J., **Żurawa-Janicka D.**, Koper T., Jarzab M., Figaj D., Glaza P., Lipińska B. (2013). HtrA protease family as therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 19: 997-1009.

Skórko-Glonek J., Kuczyńska-Wiśnik D., **Żurawa-Janicka D.**, Matuszewska E., Figaj D., Lipińska B. (2011). Molecular chaperones and proteases as suppressors of protein aggregation in Gram-negative bacterium

Escherichia coli. In: Stein D. A. (Ed). *Protein aggregation*. Nova Biomedical Books, Nova Science Publishers Inc., New York. pp: 41-77.

Skórko-Glonek J., Żurawa D., Kuczwaro E., Woźniak M., Wypych Z., Lipińska B. (1999). *Escherichia coli* HtrA heat shock protease participates in the defence against oxidative stress. *Mol Gen Genet* 262: 342-350.

Skórko-Glonek J., Żurawa-Janicka D., Tanfani F., Scirè A., Wawrzynów A., Narkiewicz J., Bertoli E., Lipińska B. (2003). The N-terminal region of HtrA heat shock protease from *Escherichia coli* is essential for stabilization of HtrA primary structure and maintaining of its oligomeric structure. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics* 1649: 171-182.

Ślebioda T., Stanisławowski M., Cyman M., Wierzbicki P., **Żurawa-Janicka D.**, Kobiela J., Makarewicz W., Guzek M., Kmiec Z. (2019). Distinct expression patterns of two tumor necrosis factor superfamily member 15 gene isoforms in human colon cancer. *Dig Dis Sci* 64(7): 1857-1867.

Sobiecka-Szkatuła A., Polit A., Scirè A., Gieldoń A., Tanfani F., Szkatat Z., Ciarkowski J., **Żurawa-Janicka D.**, Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2009). Temperature-induced conformational changes within the regulatory loops L1-L2-LA of the HtrA heat-shock protease from *Escherichia coli*. *BBA-Proteins Proteomics* 1794: 1573-1582.

Wenta T., Glaza P., Jarzab M., Zarzecka U., **Żurawa-Janicka D.**, Lesner A., Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2017). The role of the LB structural loop and its interactions with the PDZ domain of the human HtrA3 protease. *BBA-Proteins Proteomics* 1865(9): 1141-1151.

Wenta T., Jarzab M., Rychłowski M., Borysiak M., Latała A., **Żurawa-Janicka D.**, Filipek A., Lipińska B. (2019). Cellular substrates and pro-apoptotic function of the human HtrA4 protease. *J Proteomics* 209: 103505.

Wenta T., Rychłowski M., Jurewicz E., Jarzab M., **Żurawa-Janicka D.**, Filipek A., Lipińska B. (2019). The HtrA3 protease promotes drug-induced death of lung cancer cells by cleavage of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *FEBS J* 286(22): 4579-4596.

Wenta T., Żurawa-Janicka D., Rychłowski M., Jarzab M., Glaza P., Lipińska A., Bieńkowska-Szewczyk K., Herman-Antosiewicz A., Skórko-Glonek J., Lipińska B. (2018). HtrA3 is a cellular partner of cytoskeleton proteins and TCP1 α chaperonin. *J Proteomics* 177: 88-111.

Żurawa-Janicka D., Kobiela J., Stefaniak T., Woźniak A., Woźniak M., Limon J., Lipińska B. (2008). Changes in expression of serine proteases *HtrA1* and *HtrA2* during estrogen-induced oxidative stress and nephrocarcinogenesis in male Syrian hamster. *Acta Biochim Pol* 55: 9-20.

Żurawa-Janicka D., Narkiewicz J., Lipińska B. (2007). Charakterystyka białek z rodziny HtrA. *Post Biochem* 53(1): 27-36.

Żurawa-Janicka D., Renke J., Popadiuk S., Skórko-Glonek J., Szumera M., Plata-Nazar K., Ulko P., Woźniak M., Lipińska B. (2006). Preferential immunoglobulin oxidation in children with juvenile idiopathic arthritis. *Scan J Rheumatol* 35: 193-200.

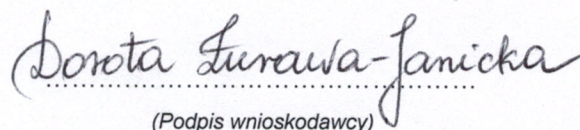
Literatura uzupełniająca

- Baldi, A.**, De Luca A., Morini M., Battista T., Felsani A., Baldi F., *et al.* (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21: 6684–6688.
- Bowden M.A.**, Di Nezza-Cossens L.A., Jobling T., Salamonsen L.A., Nie G. (2006). Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 103: 253–260.
- Chien J.**, Aletti G., Baldi A., Catalano V., Muretto P., Keeney G.L., *et al.* (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 116: 1994–2004.
- Chien J.**, Staub J., Hu S.I., Erickson-Johnson M.R., Couch F.J., Smith D.I., *et al.* (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23: 1636–1644.
- Da Silva E.**, Jamur M., Oliver C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62: 698–738.
- Gilicze A.**, Kohalmi B., Pocza P., Keszei M., Jaeger J., Gorbe E., *et al.* (2007). HtrA1 is a novel mast cell serine protease of mice and men. *Mol Immunol* 44: 2961–2968.
- Krojer T.**, Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M., Clausen T. (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-9.
- Laskowska E.**, Kuczyńska-Wiśnik D., Skórko-Glonek J., Taylor A. (1996). Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol* 22: 555-71.
- Li J.J.**, Oberley T.D., Parsons J.A. (1995). Carcinogenic activities of various steroidal and nonsteroidal estrogens in the hamster kidney: relation to hormonal activity and cell proliferation. *Cancer Res* 55: 4347-4351.
- Lipińska B.**, Fayet O., Baird L., Georgopoulos C. (1989). Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171: 1574-84.
- Papa D.**, Li S.A., Li J.J. (2003). Comparative Genomic Hybridization of Estrogen-Induced Ectopic Uterine-Like Stem Cell Neoplasms in the Hamster Kidney: Nonrandom Chromosomal Alterations. *Mol Carcinog* 38: 97-105.
- Scott D.L.**, Wolfe F., Huizinga W.J. (2010). Rheumatoid Arthritis. *Lancet* 376(9746):P1094-1108.
- Skórko-Glonek J.**, Figaj D., Zarzecka U., Przepióra T., Renke J., Lipińska B. (2017). The Extracellular Bacterial HtrA Proteins as Potential Therapeutic Targets and Vaccine Candidates. *Curr Med Chem* 24: 2174-2204.
- Skórko-Glonek J.**, Wawrzynów A., Krzewski K., Kurpierz K., Lipińska B. (1995). Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene* 163: 47–52.
- Strauch K.L.**, Beckwith J. (1988). An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1576-80.

Żurawa-Janicka D., Wenta T., Jarzab M., Skórko-Glonek J., Glaza P., Giełdoń A., Ciarkowski J., Lipińska B. (2017). Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases. *Arch Biochem Biophys* 621: 6-23.

b) Nagrody uzyskane za działalność naukową

1. Zespołowa Nagroda I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za cykl pięciu publikacji dotyczących mechanizmów, funkcji i regulacji białek szoku termicznego, Gdańsk 2004.
2. Zespołowa Nagroda I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za cykl publikacji dotyczących białek HtrA, Gdańsk 2009.
3. Zespołowa Nagroda III stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za udział w powstaniu cyklu publikacji dotyczących roli białek stresowych (proteaz i białek opiekuńczych) w fizjologii organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, Gdańsk, 2019.
4. Zespołowa Nagroda I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za udział w powstaniu cyklu publikacji dotyczących mechanizmów warunkujących utrzymanie homeostazy białek (proteostazy) w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, Gdańsk, 2020.


(Podpis wnioskodawcy)