

2016 06. 21

Gdańsk, 10.06.2016 r.

Prof. dr hab. Józef Kur  
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska  
ul. Narutowicza 11/12  
80-233 Gdańsk

**RECENZJA**  
**pracy doktorskiej Pana mgr Przemysława Glazy**  
**pt. „Biochemiczna charakterystyka pro-apoptotycznej proteazy HtrA3**  
**człowieka”**

Praca doktorska Pana mgr Przemysława Glazy wykonana została w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorami tej pracy są prof. dr hab. Barbara Lipińska i prof. dr hab. Bogusław Szewczyk. Tematyka ocenianej rozprawy dotyczy zagadnień związanych z białkiem HtrA3 należącym do zachowanej w ewolucji rodziny proteaz serynowych HtrA. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano cztery takie białka: HtrA1, HtrA2/Omi, HtrA3 i HtrA4. Białko HtrA3 stymuluje szlak mitochondrialny apoptozy oraz uczestniczy w implantacji zarodka i formowaniu łożyska. Jest także zaangażowane w proces onkogenezy i promuje apoptozę komórek nowotworowych stymulowaną przez chemoterapeutyki. Stąd białko HtrA3 uważane jest za potencjalny cel molekularny dla nowych związków antynowotworowych. W chwili rozpoczęcia pracy doktorskiej wiedza na temat struktury i własności biochemicznych proteazy HtrA3 była ograniczona i dotyczyła rozwiązanej struktury krystalicznej izolowanej C-terminalnej domeny PDZ, występującej tylko w izoformie długiej HtrA3, brak było informacji odnośnie aktywności opiekuńczej i bardzo niewiele danych dotyczących aktywności proteolitycznej. W tym świetle badania Doktoranta skupiły się na poznaniu struktury długiej izoformy HtrA3L pozbawionej domeny N-terminalnej (normalnie odcinanej w komórce) i na scharakteryzowaniu aktywności proteolitycznej oraz opiekuńczej białka HtrA3.

Ponieważ tematyka i charakter pracy dotyczą w większości biochemii i badań strukturalnych białek, uważam iż wybór dziedziny i dyscypliny naukowej pracy doktorskiej, odpowiednio: nauki biologiczne i biologia, jest jak najbardziej uzasadniony.

Za główny cel swojej pracy doktorskiej Pan mgr Przemysław Glaza postawił sobie wykonanie kompleksowej charakterystyki biochemicznej ludzkiego białka HtrA3. W tym celu musiał przede wszystkim opracować wydajne metody produkcji i oczyszczania HtrA3 i jego bardzo licznych koniecznych do badań mutein w oparciu o system ekspresyjny *Escherichia coli*, a następnie przeprowadzić właściwe eksperymenty, polegające na badaniach struktury krystalicznej białka HtrA3 zawierającego domenę proteazy oraz domenę PDZ (z delecją N-terminalnej części białka izoformy długiej), jak również ustalenie stopnia oligomeryzacji białka w roztworze, scharakteryzowanie aktywności proteolitycznej oraz opiekuńczej i określenie wpływu domeny PDZ na strukturę i aktywność białka HtrA3.

Opis stosowanych materiałów i metod badawczych jest precyzyjny i jednoznaczny, jednak czasami zbyt obszerny. Doświadczenia zostały ciekawie zaplanowane i prawidłowo wykonane, z zastosowaniem odpowiednich eksperymentów kontrolnych, a ich wyniki poprawnie zinterpretowane. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych ani do części metodycznej ani co do sposobu wykonania doświadczeń i interpretacji ich rezultatów.

Udało się Doktorantowi opracować skuteczne technologie wytwarzania rekombinantowych form białka HtrA3L (z N-terminalną delecją) oraz różnych jej mutein w komórkach bakteryjnych, w ilości oraz jakości pozwalającej na analizę krystalograficzną oraz badania biochemiczne. Zadanie to nie było łatwe z uwagi na liczbę mutein, które trzeba było otrzymać oraz charakter tego białka (duża liczba cystein i problemy z prawidłowym foldigiem).

Ważnym elementem pracy było rozwiązanie struktury domeny proteolitycznej (PD) i PDZ białka DN-HtrA3L S305A. Wyniki tych badań strukturalnych zostały uzyskane przez współpracujący zespół w Structural Biology Center Argonne National Laboratory (USA) (dr J. Osipiuk). W tym miejscu chciałbym prosić Doktoranta o zdefiniowanie jego bezpośredniej roli w tych badaniach. Następnym ważnym wynikiem było stwierdzenie, że badane białko tworzy trimer, który różni się istotnie od proteaz HtrA1 i HtrA2 pod względem pozycji domeny PDZ wobec PD. Wyróżniono unikalne dla białka HtrA3L oddziaływania (pomiędzy pętlą LB domeny proteolitycznej

i domeną PDZ), nie występujące w dotychczas poznanych strukturach proteaz HtrA. W oparciu o otrzymane muteiny  $\Delta$ N-HtrA3L i wykonanie eksperymentów sączenia molekularnego z ich udziałem udało się wykazać, że oddziaływania LB-PDZ stabilizują trimeryczną formę białka. Wykazano także, że białka pozbawione domeny PDZ są monomeryczne. Wniosek z tych eksperymentów był jednoznaczny, iż domena PDZ jest niezbędna do trimeryzacji, co różni to białko od HtrA1 i HtrA2. Co ciekawe, usunięcie motywu trimeryzacji w PD powodowało utratę aktywności proteolitycznej. Stąd ważny wniosek wyciągnięty przez Doktoranta, iż zachowanie struktury trimerycznej jest istotne dla aktywności HtrA3, a usunięcie domeny PDZ nie wpływa na aktywność proteolityczną, co świadczy o tym, że domena ta nie jest istotna dla proteolizy, podobnie jak opisano to dla HtrA1, lecz odmiennie niż w HtrA2, gdzie PDZ hamuje aktywność. W badaniach aktywności HtrA3 Doktorant wykazał silną stymulację aktywności proteolitycznej przez temperaturę, podobnie jak dla HtrA2. Białko  $\Delta$ N-HtrA3 hydrolizowało  $\beta$ -kazeinę porównywalnie do HtrA2 i znacząco szybciej od HtrA1. Ważnym odkryciem opisanym w pracy doktorskiej jest także stwierdzenie, że białka  $\Delta$ N-HtrA3 (obu izoform) efektywnie trawią antyapoptotyczne białko XIAP, stąd Doktorant wnioskuje istnienie możliwości stymulacji apoptozy przez HtrA3 poprzez proteolizę XIAP. W innych badaniach z wykorzystaniem spektrometrii mas określono preferowane miejsca cięcia przez obie izoformy HtrA3, które przecinają wiązania peptydowe za alifatycznymi i hydrofilowymi, pozbawionymi ładunku resztami aminokwasów. Więc specyficzność substratowa HtrA3 okazała się podobna do wykazanej dla HtrA1 i HtrA2. Doktorant wykazał także, że białko  $\Delta$ N-HtrA3 posiada aktywność opiekuńczą holdazy a nie refoldazy, oraz, że obecność domeny PDZ pozytywnie wpływa na aktywność holdazy..

Uważam, że otrzymane wyniki i wyciągnięte z nich wnioski wskazują na rozwiązanie przez Doktoranta problemu naukowego, a uzyskane rezultaty są nowatorskie i stanowią ważny wkład w rozwój biologii. Tutaj również warto podkreślić, że zaprezentowane w pracy doktorskiej wyniki zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych, najważniejsze w Plos ONE, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem.

Rozprawa doktorska Pana mgr Przemysława Glazy przedstawiona została w formie manuskryptu, podzielonego na rozdziały, według ogólnych zasad spotykanych w pracach naukowych z zakresu nauk biologicznych: *Streszczenie, Wstęp, Cel*

pracy, *Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Literatura*. Ocenę części metodycznej oraz wyników i dyskusji przedstawiłem powyżej. Wysoko oceniam też część teoretyczną, w której Pan mgr Przemysław Glaza zwięźle przedstawił współczesną wiedzę na temat proteaz serynowych HtrA człowieka. Ta część pracy stanowi też dobre wprowadzenie czytającego do lektury kolejnych rozdziałów.

Pod względem redakcyjnym cała praca prezentuje się bardzo pozytywnie. Jest napisana poprawnym i ogólnie zrozumiałym językiem naukowym. Niemniej jednak zdarzają się w niej drobne błędy, nieścisłości merytoryczne i nomenklaturowe. Nie wpływają one na ogólny poziom naukowy pracy ani na jej ogólne zrozumienie. Poniżej przedstawiam najważniejsze z zauważonych w pracy mankamentów:

- str. 8 i 100 – określenie „HtrA zawiera dwie  $\beta$ -baryłki”, powinno być „HtrA zawiera dwie  $\beta$ -beczki”;

- str 27 i inne – powinno być redukcja mostków disiarczkowych, a nie dwusiarczkowych wg obowiązującej nomenklatury chemicznej;

- niektóre tabele są niepotrzebne, szczególnie w rozdziałach *Materiały* oraz *Metody*;

- opis niektórych oczywistych metod jest zbędny, wystarczyło podać odnośnik do literatury, np. Transformacja komórek bakteryjnych metodą z użyciem chlorku wapnia;

- niepotrzebne opisy niektórych oczywistych działań, np. rozdziałik na str 80 „Przygotowanie worków dializacyjnych”;

- str 85 – legenda do rysunku 23, do western blottingu użyto komercyjnie dostępnych przeciwciał anti HtrA3, jeżeli takie były to dlaczego otrzymywano własne, których otrzymanie nic nie wносиło do pracy;

- str 87 – pisownia enzymów restrykcyjnych, powinno być *HindIII*, a nie *HindIII*;

- str 98, pierwszy akapit, po co opisywano technikę LIC do klonowania stosowaną przez dr Osipiuka jak i tak tego nie wykorzystano;

- str 98 i dalej, tutaj mam pytanie, czy analizy struktur krystalicznych badanych białek były przeprowadzone z czynnym udziałem Doktoranta?

- str 103- w tytule rozdziału 4.1 zgubiono HtrA2;

- str 105 – przy podawaniu danych kinetycznych aktywności proteolitycznych badanych białek wartości były dla HtrA2 i HtrA3 porównywalne, trudno na tej podstawie wyciągać jakiegokolwiek wnioski;

- str 106 – sformułowania aktywność proteolityczna nieco wyższa, czy wyższa nie ma sensu, bo co praktycznie to oznacza?;

-str 109 – skomplikowane i mało klarowne nazewnictwo białek przedstawione w schemacie na rysunku 51;

- str 111 – jaka była zasadność substytucji w HtrA2 reszty fenyloalaniny na resztę kwasu asparaginowego a nie na resztę alaniny jak to zwyczajowo się robi;

- str 112 – wobec bardzo niskiego stężenia proteazy  $\Delta N$ -HtrA3L F142D uniemożliwiającego zbadanie wpływu substytucji na oligomeryzację czy podjęto próby uzyskania tego białka w innym, np. drożdżowym systemie ekspresyjnym (dotyczy to także innych mutein z którymi były problemy w uzyskaniu preparatów o stężeniu odpowiednim dla prowadzonych eksperymentów);

- str 140 – rozdział 7 Wyników, pt. Konstrukcja plazmidów kodujących warianty białka  $\Delta N$ -HtrA3L, powinien raczej być umieszczony w rozdziale Metody; także pokazywane w tym rozdziale oczyszczanie pochodnych plazmidu, czy wyników reakcji PCR jest całkowicie zbędne;

- str 150 – niezrozumiałe jest dla recenzenta zdanie cytuję „Ze względu na dużą ilość zanieczyszczeń preparatów oczyszczonych na złożu niklowym zastosowano drugi etap oczyszczania z użyciem złoża kobaltowego”, to przecież ten sam typ chromatografii metalopowinowactwa, wydaje się, że pierwszy etap czyli zastosowanie złoża „niklowego” był źle wykonany, proszę o wyjaśnienie tego fenomenu.

Podsumowując, nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa zawiera istotne elementy nowości naukowej. Należy w całej pełni docenić ogrom badań i wysiłku, który musiał Doktorant włożyć w jej wykonanie. Pan Przemysław Glaza wykazał się przy tym wiedzą teoretyczną w zakresie tematyki prowadzonych badań, a także umiejętnością interpretacji wyników doświadczeń. Uzyskane przez Doktoranta rezultaty pozwalają na lepsze zrozumienie funkcjonowania białka HtrA3 w warunkach *in vitro* i powinny ułatwić wyjaśnienie roli HtrA3 w stanach fizjologicznych oraz patologicznych oraz stanowią cenny wkład w badania białek, które mogą stać się w przyszłości interesującymi celami

molekularnymi dla nowej generacji związków potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z tym, przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Glazy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Glaza', is written on the right side of the page.