



Prof. dr hab. Anna Skorupska
prof. emerytowany
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

.....Lublin, 08. 09. 2017 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Donaty Figaj

**p.t.: „Pętle LA i LD jako istotne elementy modulujące aktywność proteolityczną
i strukturę białka HtrA *Echerichia coli*”**

**(“The LA and LD loops as important modulators of the proteolytic activity and
structure of the HtrA protein from *Echerichia coli*”)**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem i opieką naukową dr hab. Joanny Skórko-Glonek, prof. UG. Fundusze na badania pochodziły z grantu badawczego MNiSW przyznanego dr hab. J. Skórko-Glonek oraz z dwóch projektów badawczych przyznaných przez Wydział Biologii UG w latach 2011 i 2012.

Rozprawa doktorska dotyczy analizy funkcji, aktywności enzymatycznej i struktury białka HtrA (*High-temperature requirement A*) należącego do rodziny proteaz serynowych, silnie zachowanych w ewolucji i występujących w większości badanych organizmów pro- i eukariotycznych. Białko to spełnia istotną rolę w zachowaniu homeostazy komórki w warunkach stresu, poprzez proteolizę nieprawidłowo zwiniętych lub uszkodzonych białek zapobiegając śmierci komórek. Obok aktywności proteolitycznej większość białek HtrA wykazuje także aktywność opiekuńczą. Rodzina proteaz HtrA charakteryzuje się podobną organizacją domenową tzn. N-końcową lokalizacją domeny protezowej i C-końcową lokalizacją, co-najmniej jednej

domeny PDZ. W komórkach bakterii Gram-ujemnych i w modelowej bakterii *E. coli*, HtrA jest zlokalizowane w przestrzeni periplazmatycznej.

Białko HtrA *E. coli* jest od wielu lat obiektem badań zespołu prof. dr hab. Barbary Lipińskiej, a następnie dr hab. Joanny Skórko-Glonek wraz zespołem, a efektem tych badań jest wiele, bardzo wartościowych publikacji. Przedstawiona do oceny rozprawa mgr Donaty Figaj jest kontynuacją tych badań. Rozprawa ma układ typowy dla większości prac eksperymentalnych, liczy łącznie 150 stron, 56 rycin, 14 tabel i zawiera wszystkie wymagane części składające się na rozprawę t.j., Wstęp, wyodrębniany Cel pracy, część metodyczną, Wyniki, Dyskusję i Bibliografię. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i językowym.

Wstęp w sposób jasny wprowadza informacje niezbędne dla oceny i zrozumienia przedstawionych wyników. Poszczególne rozdziały są najpierw ogólnym opisem aktywności proteolitycznej proteaz serynowych oraz istoty regulacji allosterycznej, a następnie szczegółowym opisem struktury i aktywności proteazy HtrA *E.coli*. Ekspresja genu *htrA* następuje w warunkach stresowych z udziałem czynnika transkrypcyjnego sigma 24 i dwuskładnikowego systemu CpxAR. Dojrzała forma HtrA składa się z domeny proteazowej złożonej z dwóch β baryłek połączonych pętlami (LA, LD, L1, L2, L3) spełniającymi funkcje regulacyjne i z dwóch domen PDZ1 i PDZ2 odpowiedzialnych za wiązanie substratu i tworzenie oligomerycznych form HtrA. Domena PDZ1 jest niezbędna dla aktywności proteazowej. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisała złożoną strukturę nieaktywnych proteolitycznie form trimeru i heksamery HtrA, który w obecności substratu, czyli nieprawidłowo zwiniętych lub zdenaturowanych termicznie białek, ulega rearanzacji do aktywnych proteolitycznie oligomerów rzędu 12 - 24-mer. Po degradacji substratu oligomery wracają do struktur heksamerycznych. Aktywność proteolityczna HtrA ma charakter procesywny, co chroni komórkę przed gromadzeniem się nie całkowicie zdegradowanych peptydów. Aktywność proteolityczna HtrA jest indukowana termicznie w zakresie 28° – 55°C i/lub allosterycznie. Wzrost temperatury powoduje zmiany oddziaływań pętli LA oraz innych struktur i utworzenie aktywnych proteolitycznie oligomerów. W aktywacji allosterycznej substrat indukuje zmiany konfiguracji przestrzennej pętli regulatorowych w domenie proteazowej i domenie PDZ, co w efekcie powoduje

powstanie prawidłowej konfiguracji wszystkich elementów centrum katalitycznego (tzw. triady katalitycznej) białka HtrA.

Funkcja opiekuńcza HtrA polega na zapobieganiu agregacji białek o nieprawidłowej strukturze poprzez ich wiązanie i tworzenie z nimi stabilnych kompleksów i nie jest zależna od funkcji proteolitycznej. Białko HtrA ma swoje dobrze opisane paralogi w genomie *E. coli*, które mimo znacznego podobieństwa strukturalnego różnią się od HtrA. Interesujące są homologi HtrA opisane w wielu bakteriach patogennych, jako jedne z czynników wirulencji tych bakterii. Delecja *htrA* może zmniejszyć lub nawet powodować całkowitą utratę wirulencji patogenów.

Celem naukowym podjętych przez Doktorantkę badań jest opisanie funkcji dwóch aktywnych pętli regulatorowych LA i LD domeny proteazowej białka HtrA, poprzez zbadanie wpływu substytucji istotnych aminokwasów na strukturę, poziom aktywności i funkcję tego enzymu. Ważnym celem przedstawionych badań jest również udział eksperymentalny Doktorantki w modyfikacji teoretycznego modelu struktury pętli LA opracowanego przez dr. A. Giełdonia z Wydziału Chemii UG.

W obszernej **części metodycznej** Doktorantka szczegółowo opisała użyte materiały i bardzo szeroki zestaw metod genetycznych, biochemicznych i fizykochemicznych zastosowanych w przeprowadzonych eksperymentach. Dokładny opis metod niewątpliwie będzie przydatnym skryptem dla studentów i doktorantów. W opisie metod można zauważyć kilka bardzo laboratoryjnych (slangowych) określeń, niekoniecznie wg. recenzentki prawidłowych, jak:

str. 51 – „Bakterie *E. coli*.. szokowano przez umieszczenie w termobloku...nagrzany do...”

str. 52 – „...stężenie plazmidów szacowano po rozdziale elektroforetycznym..” – powinno być: stęż. DNA plazmidów oznaczano...

str. 53 – „W celu zweryfikowania poprawności wprowadzonej mutacji plazmidy wysyłano do sekwencjonowania do firmy...”. Samo wysłanie plazmidu niekoniecznie oznacza osiągnięcie celu.

W pracy są używane nazwy start'erów do sekwencjonowania: przedni i wsteczny. Czy to są lepsze terminy niż ang. *forward* i *reverse*?

str.54 – „Rano rozcieńczano hodowlę...” – nie podano czasu trwania hodowli.

Str. 57 i in. – „...żele były poddawane barwieniu błękitem...”, (str.63) frakcje poddawano dializie...poddawano sekwencjonowaniu itd. ” - lepiej po prostu: barwiono, dializowano itd.

Str. 61. Czy powinno być: próbówki wirownicze, czy wirówkowe?

Chcę zaznaczyć, że powyższe „z obowiązku recenzenta” uwagi nie wpływają na moją bardzo pozytywną opinię o opracowaniu tej części rozprawy.

Kolejną część, **Wyniki** badań, podzielono na podrozdziały, w których przedstawiono kolejne etapy pracy doświadczalnej: (1) mutagenezę genu *htrA* polegającą na jedno aminokwasowych substytucjach (34 konstrukty) w istotnych punktach kontaktowych elementów strukturalnych enzymu; (2) izolację i oczyszczanie poszczególnych mutein HtrA; (3) analizę znaczenia poszczególnych podstawień w pętli LA i LD spełniających funkcje, odpowiednio, negatywnego i pozytywnego regulatora aktywności proteolitycznej; zbadano wpływ mutacji na strukturę, aktywność proteolityczną i stres temperaturowy HtrA; (4) zbadano efekt substytucji w pętłach LA i LD na II- i IV - rzędową strukturę HtrA i na stopień oligomeryzacji oraz (5) przeprowadzono weryfikację teoretycznego modelu struktury przestrzennej pętli LA białka HtrA. Końcowym etapem pracy było oznaczenie przeżywalności poszczególnych mutantów metodami mikrobiologicznymi. Uzyskane wyniki podsumowano i omówiono rzeczowo w rozdziale Dyskusja, odnosząc je do wcześniejszych badań zespołu nad białkiem HtrA i dostępnych danych literaturowych (bibliografia rozprawy liczy ok.105 pozycji).

Przedstawione z wielkim skrótem, precyzyjne i niezwykle pracochłonne eksperymenty, jakie przeprowadziła Doktorantka pozwoliły Jej na przedstawienie najważniejszych osiągnięć, które są uzupełnieniem brakujących informacji dotyczących aktywacji HtrA oraz opisanie nowych danych dotyczących funkcji i struktury tego białka. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki można zaliczyć:

1. Zidentyfikowanie aminokwasów istotnych dla funkcjonowania pętli LA i LD białka Htr.
2. Ustalenie, że pętla LA jest odpowiedzialna za stabilizację nieaktywnej proteolitycznie struktury heksametru poprzez formowanie dwóch ugrupowań reszt aminokwasowych tzw. klastra hydrofilowego i hydrofobowego.

3. Wykazanie, że dla zachowania nieaktywnej proteolitycznie konformacji HtrA niezbędne jest zachowanie odpowiedniej sztywności pętli LA.
4. Wyniki analizy pętli LA pozwoliły na weryfikację teoretycznego modelu struktury LA opracowanego przez dr. A. Giełdonia.
5. Przedstawienie modelu przekazywania sygnału allosterycznego w HtrA, w którym pętla LD tworzy rusztowanie dla tzw. klastra aktywacyjnego, stabilizującego aktywną proteolitycznie strukturę HtrA.
6. Wykazanie, że dla zachowania aktywnej proteolitycznie konformacji HtrA niezbędne jest zachowanie odpowiedniej sztywności i struktury pętli LD.

Wysoki poziom badań naukowych składających się na rozprawę doktorską opublikowano w dwóch współautorskich pracach w wysoko notowanych czasopismach: *Journal Biological Chemistry*, $IF_{2014}=4,573$ i *FEBS Journal* $IF_{2016}=3,902$. W obydwu pracach mgr D. Figaj jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej dominujący udział w wykonaniu eksperymentów i opracowaniu wyników. Wprawdzie Doktorantka nie przedstawiła całego swojego dorobku naukowego, ale z informacji internetowych wynika, że jest współautorką kilku publikacji, w tym dwóch prac przeglądowych opracowanych przez zespół dr hab. J. Skórko-Glonek i prof. B. Lipińskiej.

W celu dyskusji z Doktorantką chcę przedstawić pytania dotyczące ocenianej rozprawy:

1. Szczep z delecją *htrA* rośnie dobrze w temp. fizjologicznej 37°C na podłożu stałym. Mutant G174S HtrA wykazujący autodegradację bardzo słabo rósł w tych warunkach (Ryc. 40) . Czy to oznacza, że białko HtrA nie jest niezbędne dla przeżycia bakterii, a ten mutant jest toksyczny? Jak te szczepy rosną w temp. niższych np. 25-30°C?
2. Czy podobne badania wzrostu mutantu w pętli LA R44A również o własnościach autodestrukcyjnych był badany na tzw. witalność?
3. Nawiązując do podkreślanego w pracy znaczenia HtrA w walce z patogenami, czy może Pani przedstawić możliwe podejścia eksperymentalne z użyciem białka HtrA w eliminacji patogenów?
4. Czy złożoność oligomerycznej struktury HtrA nie utrudnia możliwości terapeutycznego zastosowania tego białka?

W podsumowaniu, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa Pani **mgr Donaty Figaj** prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, wykazuje szeroką ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań. Oceniana rozprawa doktorska w pełni spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 14. 03. 2003 r. o stopniach i tytule naukowym, a dotychczasowy dorobek naukowy opublikowany i przedstawiony w rozprawie uzasadnia nadanie Jej stopnia naukowego **doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia**. W związku z tym, zwracam się do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr D. Figaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową i znaczenie poznawcze pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Anna Skowron