

dr hab. Grzegorz Dubin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Małopolskie Centrum Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków 21.09.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Donaty Figaj „Pętle LA I LD jako istotne element modułujące aktywność proteolityczną I strukturę białka HtrA *Escherichia coli*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje badania mechanizmu regulacji aktywności proteolitycznej proteazy HtrA *Escherichia coli*, modelowego enzymu rodziny proteaz HtrA. Praca została przygotowana na Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Joanny Skórko-Glonek, prof. UG. Przedstawione badania stanowią kontynuację tematyki analizowanej w grupie badawczej w której doktorantka przygotowywała rozprawę. To naturalne podejście pozwala wykorzystać synergicznie z wcześniejszymi osiągnięciami co jest widoczne szczególnie przy wykorzystaniu pewnych wcześniej opracowanych przez grupę materiałów oraz metodologii, a także w dyskusji wyników. Przedstawiona praca jest jednak w pełnym zakresie oryginalna. Budując na wcześniejszym doświadczeniu, doktorantka rozwija je twórczo uzyskując interesujące wyniki, nie wynikające w oczywisty sposób z wcześniejszej wiedzy. Tym samym przedstawiona praca znacząco rozszerza zakres dotychczasowej wiedzy.

Tematyka rozprawy, pojmowana jako analiza mechanizmu działania enzymów proteolitycznych, jest analogiczna do tematyki prac realizowanych w prowadzonym przez mnie laboratorium. Metodologia bazująca na strukturze mutagenyzy punktowej stosowana przez autorkę jest analogiczna do stosowanej w prowadzonych przez mnie pracach. Tym samym czuję się kompetentny do przygotowania rzetelnej oceny przedstawionej rozprawy.

Rozprawa została przygotowana w języku polskim, w formie zamkniętego opracowania zawierającego szczegółowe i ciekawe omówienie obecnego stanu wiedzy, klarowne przedstawienie celu prowadzonych badań, opis stosowanych materiałów i metodologii, jasne i bogato ilustrowane materiałem graficznym przedstawienie wyników oraz dyskusję obejmującą analizę uzyskanych wyników w świetle obecnego stanu wiedzy. Opracowanie stanowi spójną całość, w sposób wyczerpujący prezentującą podejmowane zagadnienia.

Autorka bada rolę dwóch pętli regulatorowych, inhibitorowej pętli LA oraz aktywacyjnej pętli LD w regulacji aktywności proteolitycznej proteazy HtrA. Zagadnienie to jest nietrywialne i obrazuje stosunkowo ubogi zakres dostępnej obecnie metodologii badawczej pozwalającej na analizę zjawisk dynamicznych zachodzących w wielodomenowych i multimerycznych białkach enzymatycznych. Pomimo tych ograniczeń, wspomaganą modelowaniem komputerowym analiza strukturalna wraz z doświadczalną weryfikacją konkluzji oraz analizą na tle dostępnej wiedzy strukturalnej i biochemicznej pozwalają autorce na wyciągnięcie bardzo interesujących wniosków na temat roli poszczególnych aminokwasów w obrębie analizowanych pętli w funkcji białka.

W rozdziale wstępnym autorka prezentuje bardzo bogaty, ciekawie i przejrzyste przygotowany oraz ilustrowany interesującym materiałem graficznym przegląd wiedzy zgromadzonej dotychczas w temacie badań. Rozdział ten czyta się bardzo dobrze i stanowi on dokładnie wystarczające, nie przeładowane nadmierną ilością informacji, ani też nie zbyt skrócone wprowadzenie czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Znajduje się tam wprawdzie kilka pobocznych wątków które po lekturze całej pracy wydają się niepotrzebne (jak np. wprowadzanie klasyfikacji IUBMB czy szczegółowe omówienie mechanizmu katalizy które to informacje nie są wykorzystywane w późniejszej dyskusji) jednak nie umniejsza to w żaden sposób wysokiej wartości tej części opracowania. Być może takie drobne uchybienia logice kompozycji są nawet uzasadnione pozwalając na lepsze zrozumienie pracy czytelnikom mniej zaznajomionym z tematem badań.

Kolejny rozdział przedstawia w punktach cele badań bardzo dobrze i zwięźle wprowadzając czytelnika do analizy wyników. Jasno postawione cele obejmują poznanie kluczowych reszt aminokwasowych w obrębie pętli LA i LD i wpływu ich zaburzeń (mutacji) na strukturę, aktywność i funkcjonalność HtrA, a tym samym na bardziej szczegółowe określenie oddziaływań w obrębie tych pętli na funkcję enzymu. Cele te są konsekwentnie realizowane w całej rozprawie przy użyciu bardzo dobrze dobranej, różnorodnej i interesującej metodologii.

Kolejne dwa rozdziały obejmują opis Materiałów i Metodologii. Opis ten jest merytorycznie poprawny i posiada klasyczny dla tego typu opracowań układ i zawartość. W moim osobistym odczuciu tak szczegółowy opis powszechnie stosowanych w każdym laboratorium metod nie jest potrzebny na poziomie tak zaawansowanym jak praca doktorska. Przygotowanie takiego opisu wymaga bardzo dużo pracy, a nie wnosi on szczególnej wartości poznawczej. Powinien być on raczej bardziej zbliżony do opisów przyjętych w publikacjach naukowych, zwięzły, punktujący jedynie ważniejsze i mniej znane ogólnie elementy. Zdaje sobie jednak sprawę iż tego typu podejście jest powszechnie przyjętym schematem, z którym autorka poradziła sobie bezbłędnie.

Rozdział opisujący uzyskane wyniki został według mnie przygotowany wręcz wzorowo. Autorka prezentuje ogrom włożonej w badania pracy i dużą ilość uzyskanych danych doświadczalnych w sposób zwięzły i przejrzysty. Stanowi to zadanie wcale nietławe zważywszy, że analizowanych jest kilkadziesiąt mutein o zróżnicowanym wpływie na aktywność i stopień oligomeryzacji białka. Ponieważ jednak wywód jest poprowadzony klarownie, a dane doświadczalne zilustrowane bogatą i przejrzystą ikonografią i tabelarycznymi podsumowaniami, jedynie jeden paragraf wymagał powtórnej lektury, a i to zapewne bardziej przez moje przeoczenie niż niejasną prezentację wyników przez autorkę. W mojej ocenie jest to osiągnięcie wyjątkowe, zważywszy na stopień skomplikowania prezentowanego materiału.

Główna część prezentowanego materiału obejmuje bardzo klarowne i szeroko przeprowadzone badania biochemiczne obejmujące określanie aktywności, integralności i stopnia oligomeryzacji poszczególnych mutein, zarówno w ujęciu jakościowym, jak i – tam gdzie to możliwe – ilościowym. Badania te zostały przeprowadzone zgodnie ze sztuką, a wyniki zaprezentowane wręcz wzorowo i ciężko doszukać się w tej części znaczących niedociągnięć. Co ważne, autorka nie poprzestaje na analizie biochemicznej określając także wpływ bardziej znaczących mutacji na funkcję białka *in vivo*. Podejścia takiego nie spotyka się niestety zbyt często, dlatego jest ono tym bardziej godne podkreślenia. Najważniejsze jednak, iż

zastosowane połączenie rzetelnej, klasycznej analizy biochemicznej z badaniami funkcjonalnymi *in vivo* pozwoliło na wypracowanie najistotniejszej w mojej opinii konkluzji tej pracy, tzn. iż ani nadmierna ani zbyt mała aktywność HtrA nie jest korzystna w warunkach stresowych, co doskonale obrazuje konieczność wielostopniowej kontroli aktywności tego enzymu – zagadnienie opracowywane przez autorkę w rozprawie.

Równolegle z wysoką oceną prezentowanych wyników mam jednak pewną wątpliwość. Główne konkluzje znaczącej części badań eksperymentalnych przedstawionych w rozprawie bazują na porównaniu aktywności właściwej mutein HtrA. Aktywność ta jest wyrażona w przeliczeniu na ilość enzymu wykorzystywanego w testach. Wobec spójności wyników uzyskanych także innymi metodami trudno tutaj kwestionować zasadność konkluzji, niemniej ilość białka nie jest koniecznie tożsama z ilością aktywnego enzymu pomimo zastosowania identycznych metod produkcji i oczyszczania. Czy autorka próbowała określić zawartość aktywnego enzymu w preparatach? Jeśli tak to w jaki sposób, a jeśli nie, to w jaki sposób można by próbować wykonać takie oznaczenia? Ponadto czy zamiast β -kazeiny nie byłoby prościej stosować jako substratu FITC-kazeiny (kazeiny znakowanej fluorescencyjnie), jako substratu bardziej czułego i ułatwiającego pomiary?

Z innych pytań: czy określono miejsce hydrolizy w obrębie muteiny R44A?

Dalsze części rozprawy obejmują klarownie poprowadzoną dyskusję wyników która podsumowuje osiągnięcia prezentowane w rozprawie oraz przedstawia je w szerszym zakresie dotychczasowej wiedzy. Następnie przedstawione jest zwarte podsumowanie oraz spis cytowanej literatury. W podsumowaniu autorka informuje czytelnika iż wyniki przedstawione w rozprawie zostały zawarte w dwóch publikacjach naukowych które ukazały się drukiem w uznanych w tematyce badań czasopismach (Journal of Biological Chemistry oraz FEBS Journal) oraz podaje informacje na temat finansowania badań. Brakuje mi tutaj (a właściwie na początku rozprawy, w rozdziale wprowadzającym) listy wszystkich opublikowanych prac autorki. Analiza literatury wskazuje iż doktorantka może pochwalić się znacznie szerszym dorobkiem naukowym i to powinno zostać podkreślone we wstępie do rozprawy. Nie stanowi to wprawdzie merytorycznej części pracy, jednak prawdziwymi osiągnięciami należy się chwalić.

Pomimo iż przygotowanie rozprawy, zarówno merytoryczne jak i edytorskie uważam za staranne i satysfakcjonujące, autorka nie ustrzegła się kilku niedociągnięć które z obowiązku recenzenta wymieniam poniżej. Podkreślam jednak iż wady te nie wpływają znacząco na moją wysoką ocenę przygotowania rozprawy.

1. Selekcja mutein analizowanych w rozprawie bazowała na modelu *in silico* stworzonym przez dra A. Giełdonia z Wydziału Chemii UG. Model ten był następnie modyfikowany na podstawie uzyskanych wstępnie wyników prac *in vitro*, a ulepszony model stanowił podstawę do interpretacji danych eksperymentalnych. Stanowi to bardzo dobry przykład współpracy między bioinformatyką a pracami eksperymentalnymi. Wkład poszczególnych stron jest w pracy wyraźnie określony co odczytuje pozytywnie. Rozgraniczenie jest jednak poprowadzone zbyt intensywnie. Wyraźna informacja na ten temat powinna się znaleźć w pracy w jednym, góra dwóch miejscach, na pewno nie w kilku i nie w streszczeniu. Współpraca to nic złego, wręcz przeciwnie. Poza tym model, choć nie jest bezpośrednim dziełem autorki, powinien zostać zawarty i szczegółowo omówiony w pracy w części wyniki lub przynajmniej we wstępie. Praca naukowa w chwili obecnej jest już bardzo rzadko osiągnięciem indywidualnym. Specyfika rozprawy doktorskiej wymaga wyraźnego rozgraniczenia badań własnych i wyników

uzyskanych przez inne osoby, jednak nie kosztem merytorycznym prowadzonego wywodu. Moim zdaniem brak szczegółowego opisu przewidywań modelu utrudnia zrozumienie wyboru reszt poddawanych mutagenezie na początkowym etapie omówienia wyników, choć lektura tekstu do końca, razem z dyskusją rozwiewa te wątpliwości.

2. W pracy pojawia się kilkakrotnie stwierdzenie o „ostatecznej weryfikacji poprawności modelu”. Tego typu model można jedynie nieustannie ulepszać i nie odpowie on raczej na wszystkie pytania – myślę że w takim przypadku należałoby używać łagodniejszych stwierdzeń.

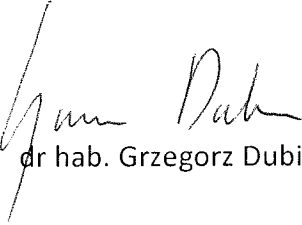
3. Autorka stosuje określenie „dziura oksyanionu” które jest literalnym tłumaczeniem ang. „oxyanion hole”. Choć zdaje sobie sprawę iż określenie takie pojawia się w literaturze polskojęzycznej sugerowałbym raczej używanie określenia „miejsce wiązania oksyanionu”.

4. Chociaż praca jest bardzo dobrze opracowana edytorsko i graficznie, autorka nie ustrzegła się przed drobnymi potknięciami. Formatowanie niektórych podpisów ilustracji jest „rozstrzelone”, opisy kilku ilustracji znajdują się nie na tej stronie co sam obraz, można doszukać się pewnych kolokwializmów, makaronizmów, niefortunnych tłumaczeń z angielskiego i zwykłych błędów pisarskich.

Podsumowując, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Donatę Figaj jest bardzo dobrze przygotowana, ciekawa i spójna merytorycznie. Czyta się ją bardzo dobrze. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny, z zastosowaniem właściwej, różnorodnej i dobrze dobranej metodologii badawczej. Uzyskane wyniki zostały poprawnie zinterpretowane technicznie oraz właściwie skontrastowane ze stanem wiedzy. Wnioski wyciągnięte przez autorkę są wyważone, brak w nich nadmiernej przesady i nadinterpretacji. Drobne potknięcia edytorskie nie wpływają znacząco na bardzo wysoką ocenę przedstawionej do recenzji pracy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Donaty Figaj spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny dorobek naukowy kandydatki w pełni uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUM o dopuszczenie pani magister Donaty Figaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, iż prace wykonane przez doktorantkę i przedstawione w rozprawie, będąc na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, zasługują na specjalne wyróżnienie. Dlatego wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUM o nadanie wyróżnienia.



dr hab. Grzegorz Dubin