



Prof. dr hab. Ewa Bartnik  
 UNI WERSYTET WARSZAWSKI  
 INSTYTUT GENETYKI i BIOTECHNOLOGII  
 ul. Pawińskiego 5A  
 02-106 Warszawa  
 tel. (22) 5922247  
 fax. (22)658-47-54  
 email: ebartnik@igib.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Glazy pt. „Biochemiczna charakterystyka proteazy HtrA3 człowieka”

promotorzy – prof. dr hab. Barbara Lipińska

prof. dr hab. Bogusław Szewczyk

Celem przedstawionej pracy było scharakteryzowanie aktywności i budowy ważnego ale mało znanego białka – proteazy HtrA3. Jak wiele białek eukariotycznych jest ono zaangażowane w wiele ważnych funkcji w komórce, ale może najważniejszą i mogącą mieć znaczenie praktyczne jest rola tego białka w indukowaniu apoptozy powodowanej przez chemioterapeutyki w komórkach nowotworowych. Punktem wyjścia pracy było uzyskanie istotnych informacji o tym białku, oczywiście po uzyskaniu różnych jego form w postaci oczyszczonej, umożliwiającej badania biofizyczne i biochemiczne.

Zacznę od drobnych uwag – nie ma dużo literówek, nie da się ich do końca uniknąć w pracach tego typu, bo spell-check nie wszystko wychwyci, a autor widzi co chciał napisać, a nie co napisał, podam parę przykładów – strona 25 wiązę (powinno być wiąże); „uszkodzeń płodu ...czy nawet poronienia” (str. 41) jest wartościujące i takich stwierdzeń należy unikać; czas przebywania w nałogu (str. 43) chyba nie jest ogólnie przyjętym sformułowaniem; brak słowa „raka” w „rozwojem płuc u palaczy” (str. 43). Najwięcej literówek znalazłam w materiałach i metodach na str. 60 -77, i nie będę ich wyliczać, jako biochemik chciałam tylko zwrócić uwagę, że nie jest prawidłowe przeliczanie czegokolwiek z uwzględnieniem ilości „mM uwalnianego CoA w czasie minuty przez 1  $\mu$ M syntazy cytrynianowej” bo oba skróty wyrażają stężenia, nie ilości.

Praca ma układ klasyczny (wstęp, cel, materiały, metody, wyniki i dyskusja) i jest długa (172 strony), czego na ogół nie lubię, ale tu muszę przyznać, że ogromną część pracy

stanowią uzyskane wyniki, prawie połowę z ponad 170 stron tekstu, i tych wyników jest rzeczywiście dużo.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do grupy proteaz HtrA, i jasno pokazuje, że dużo więcej wiadomo o HtrA1 i 2 niż o HtrA3 – czyli stanowi uzasadnienie podjętego tematu. Materiał i metody są obszerne, ponieważ obejmują stosowane konstrukty, metody czyszczenia i badania aktywności zarówno proteolitycznej jak i innych (proteazy, holdazy i refoldazy) jak i metody modyfikowania badanego genu w celu uzyskania odpowiednich wariantów białka. Wyniki opisują po kolei (może nie całkiem, bo pewne konstrukty są opisane na końcu wyników) co było zrobione i jakie wyniki uzyskano, a sama dyskusja jest krótka, bo wyniki i wnioski autora pracy są jasne i bardzo konkretne. Na końcu pracy podane jest około 180 pozycji literaturowych, wiele z nich bardzo nowych, kilkanaście pochodzi z wcześniejszych prac prowadzonych w grupie pani profesor Barbary Lipińskiej.

Do pracy miałam wyjątkowo mało uwag, jest – jak już wspomniałam długa, ale jest tak dobrze napisana, że nie stanowi to problemu przy czytaniu. Opis badań jest wyjątkowo precyzyjny i jasny, wiadomo co i po co było robione na każdym etapie pracy i wyniki są bardzo dobrze udokumentowane – zazwyczaj nie podaję takich danych jak liczba tabeli czy ilustracji, ale w pracy są np. 93 ilustracje i ich obecność jest bardzo dobrze uzasadniona.

Podsumowanie wyników przez autora obejmuje aż 16 punktów, część z nich dotyczy metod i problemów z czyszczeniem czy spraw w miarę metodycznych, choć niekoniecznie prostych (takich jak uzyskanie przeciwciał czy oczyszczenie białka). Struktura oczyszczonego białka została rozwiązana w USA. Ważnymi osiągnięciami pana mgr Glazy było moim zdaniem ustalenie funkcji poszczególnych domen/części białka – takich jak funkcje stabilizujące trimery białka czy wpływające na aktywność proteolityczną. Ważne też było ustalenie, że białko w roztworze jest trimerym, i z jakimi substratami tworzy stabilne kompleksy. Bardzo ciekawym wynikiem – i związanym z potencjalnym zastosowaniem badanego białka w terapiach przeciwnowotworowych jest stwierdzenie aktywności proteolitycznej HtrA3 względem antyapoptotycznego białka XIAP, co mogłoby tłumaczyć rolę badanej proteazy w procesach apoptozy komórek rakowych.

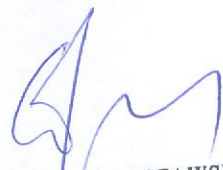
Scharakteryzowano także bardzo szeroko inne substraty i miejsca cięcia proteolitycznego dla HtrA3. Kolejnym interesującym wynikiem jest stwierdzenie, że białko ma aktywność opiekuńczą holdazy – czyli przeciwdziała denaturacji termicznej modelowego białka ale nie jest zdolne do przywrócenia jego prawidłowej konformacji po denaturacji.

Nie wyliczam wszystkich wyników uzyskanych przez pana magistra Glazę, ale myślę, że cel pracy - scharakteryzowanie słabo poznanego a istotnego białka został osiągnięty.

Wyniki pracy zostały częściowo opublikowane w PLOS One, doktorant jest też współautorem 3 innych prac, dwie dotyczą HtrA2 a jedna jest pracą przeglądową o rodzinie proteaz HtrA jako celach dla terapii. W spisie literatury w pracy doktorskiej (ale nie wychodzi to w PubMed) jest jeszcze jedna praca doktoranta jako pierwszego autora o HtrA3 w Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol.

Rozprawa ta spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W jej wyniku wiedza o budowie i działaniu ważnego białka została znacząco poszerzona. Wnoszę więc do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pana mgr Głazy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponieważ wyniki pracy zostały też już opublikowane w PLOS One (doktorant jest pierwszym autorem) i sama praca jest na bardzo wysokim poziomie wnoszę też o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Warszawa, dn. 17.06.2016



UNIwersytet WARSZAWSKI  
WYDZIAŁ BIOLOGII  
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII  
prof. dr hab. Ewa Bartnik