

Dziękanaat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 16.10.2017.
L.dz. nr 22/2017



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i
Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. (22) 659-2240
fax. (22) 658-4176
email: stepien@ibb.waw.pl

9 października 2017

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Mirosława Jarząba pt. "Molekularny mechanizm aktywacji ludzkiej proteazy HtrA2 (Omi)"

Pomimo ustalenia w roku 2000 sekwencji nukleotydowej wszystkich ludzkich genów, funkcje fizjologiczne większości z nich pozostają nieznanne. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że produkty pojedynczego genu mogą znajdować się w wielu różnych przedziałach komórkowych i pełnić rozmaite funkcje w zależności od ich interakcji z różnymi ligandami. Tak więc badania nad mechanizmami funkcjonowania białek stanowią nadal niezwykle ważny obszar biologii molekularnej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pana magistra Mirosława Jarząba wpisuje się w powyżej wzmiankowaną tematykę i dotyczy sposobów aktywowania ludzkiego białka HtrA2, należącego do proteaz serynowych.

Białko bakteryjne HtrA EC będące modelowym reprezentantem proteaz serynowych zostało zidentyfikowane wiele lat temu u *Escherichia coli* przez zidentyfikowane wiele lat temu u *Escherichia coli* przez prof. Barbarę Lipińską (we współpracy z prof. Costą Geotgopoulosem) będącej promotorem rozprawy magistra Jarząba. Podstawową funkcją białek z rodziny HtrA

jest kontrola jakości białek a także regulacja szlaków sygnałowych poprzez cięcie specyficznych białek prawidłowo sfałdowanych. W genomie ludzkim zakodowane są cztery białka z tej rodziny : HtrA1, HtrA2, HtrA3 i HtrA4. A1 i A3 pełnią istotne funkcje związane z rozwojem i przebiegiem ciąży, rola A4 jest słabo poznana, zaś HtrA2 jest białkiem głównie zlokalizowanym w mitochondriach i pełni rolę ochronną przed stresem mitochondrialnym: hamuje tworzenie reaktywnych form tlenu i stabilizuje potencjał błonowy, może też regulować programowaną śmierć komórek. Myszy z uszkodzonym genem HtrA2 wykazują silne zaburzenia neurodegeneracyjne, nieprawidłowości rozwojowe i śmierć neuronów prądkowia. Ustalono także powiązania zmian ekspresji HtrA2 z onkogenezą, i chorobami Parkinsona i Alzheimerera

Z powyższych względów wybór białka HtrA2 jako obiektu badań pana magistra M. Jarząba był w pełni uzasadniony. Autor postanowił ustalić jakie zmiany zachodzą w cząsteczce białka HtrA2 w trakcie aktywacji przez temperaturę oraz aktywacji zależnej od wiązania peptydów do domeny PDZ. Postawione pytania były tym bardziej istotne ze względu na kontrowersje literaturowe dotyczące zmian aktywności proteazy HtrA2 pod wpływem temperatury.

W celu zbadania powyższych właściwości białka HtrA2 autor uzyskał preparaty poprzez ekspresję heterologiczną w bakteriach i oczyszczał białko do homogenności stosując chromatografię powinowactwa na złożach Ni-NTA. Chociaż około 50% ekspresowanego białka akumulowała się jako nierozpuszczalne ciała inkluzyjne, pozostała część nadawała się do badań, a uzyskiwane wydajności sięgały imponującej wartości 5-10 mg z 1 g pasty bakteryjnej. Tę samą metodę autor zastosował do oczyszczania zmutowanych form białka HtrA2, które konstruował za pomocą mutagenyzy in vitro, dodając dodatkowe reszty tryptofanowe, lub powodując delecję domeny PDZ. Zastosowanie współczesnych metod inżynierii genetycznej do wytworzenia szeregu zmodyfikowanych form białka HtrA2 było ważnym krokiem umożliwiającym zaplanowane analizy.

Dalsze badania prowadzono stosując wyrafinowane metody biofizyczne, przede wszystkim pomiary wygaszania fluorescencji monobromobimanu przez tryptofan - znana jako TrIQ (Tryptophan Induced Quenching). Metoda ta umożliwia monitorowanie niewielkich zmian wewnątrz cząsteczki białka, zachodzących pod wpływem badanych czynników: temperatury oraz peptydów aktywujących.

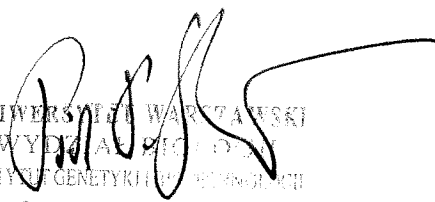
Uzyskane wyniki uważam za cenne i bardzo interesujące. Autor ustalił zależność aktywności HtrA2 od temperatury i udowodnił, że obie formy białka - zawierająca i nie zawierająca domeny PDZ zachowują cechy enzymów allosterycznych. Za najcenniejszy wynik uważam wynikający z analizy metoda TrIQ model kaskadowej aktywacji białka HtrA2, który zakłada, że wzrost temperatury powoduje zmianę położenia domeny PDZ względem domeny PD, co prowadzi do zwiększonej ekspozycji brzozy domeny PDZ wiążącej substrat, co z kolei prowadzi do transmisji zmian do sąsiednich domen białkowych. Podobny mechanizm autor wykrył dla aktywacji białka HtrA2 poprzez peptyd aktywacyjny.

Przedstawiona do oceny praca prezentuje wyjątkowo obszerny materiał eksperymentalny i została wykonana przy użyciu wyrafinowanych technik biologii molekularnej i biofizyki. Wszystkie eksperymenty są bardzo dokładnie opisane, nie mam żadnych zastrzeżeń do wyciągniętych wniosków. Uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową i stały się podstawą dwóch publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

Przedłożona rozprawa napisana jest w sposób klasyczny, to znaczy ma formę maszynopisu. Z obowiązku recenzenta muszę wymienić dostrzeżone wady prezentowanej pracy. Na stronie 3 w opisie białka HtrA2 podana jest informacja o lokalizacji w retikulum endoplazmatycznym, co jest wprawdzie zgodne z prawdą, ale dopiero kolejna strona wyjawia, że główna pula HtrA2 zlokalizowana jest w mitochondriach. Na str. 152 stwierdzenie o analizie struktury krystalicznej jest sprzeczne z informacją na str. 150, że struktury krystaliczne nie są znane. Powyższe wady, jak i niektóre powtórzenia zdarzające się w tekście dotyczą wyłącznie usterek redakcyjnych i nie obniżają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej rozprawy.

Z powyższych powodów uważam, że przedstawiona do mojej oceny rozprawa doktorska pana magistra Mirosława Jarząba spełnia wszystkie wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003; dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Ponadto, wnioskuję o nagrodzenie autora rozprawy stosowną nagrodą.


UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT GENETYKI I EVOLUCJI
prof. dr hab. Piotr Świątek