



prof. dr hab. Artur Jarmołowski  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Ekspresji Genów  
ul. Umultowska 89  
61-614 Poznań  
tel.: +48 61-829-5959  
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 30. 10. 2017

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mirosława Jarząba pt.:**  
**„Mechanizm aktywacji ludzkiej proteazy HtrA2 (Omit)”**

***I. Uwagi formalne***

Rozprawa doktorska mgr Mirosława Jarząba powstała w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem ocenianej pracy jest prof. dr hab. Barbara Lipińska. Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy ludzkiej endopeptydazy serynowej HtrA2, degradującej białka zarówno zdenaturowane, jak również poprawnie zwinięte białka regulatorowe. Enzym ten stanowi ważny element kontroli jakości białek, niezbędny dla utrzymania homeostazy mitochondriów, a w warunkach stresowych uczestniczy w indukcji programowanej śmierci komórki. Wykazano również, że aktywność tej interesującej proteazy można powiązać z procesami onkogenezy, a także chorobami Parkinsona i Alzheimerera. Co więcej, postuluje się, że badany przez Mirosława Jarząba enzym mógłby być w przyszłości celem terapii skierowanych przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym. Istotnym elementem prawidłowego funkcjonowania HtrA2 w komórce jest aktywacja tego enzymu poprzez zmiany konformacyjne, które odsłaniają centrum aktywne



zlokalizowane w domenie proteolitycznej białka (PD). W nieaktywnym enzymie domena ta jest zaangażowana w oddziaływanie z C-terminalną domeną regulatorową (PDZ) i ta właśnie interakcja działa negatywnie na aktywność enzymatyczną HtrA2. Regulację aktywności badanego enzymu komplikuje dodatkowo fakt, że tworzy ona homotrimer, co wymusza nie tylko analizę struktury przestrzennej pojedynczej cząsteczki enzymu, ale również monitorowanie wpływu konformacji jednej cząsteczki na strukturę przestrzenną dwóch pozostałych podjednostek kompleksu. Wcześniejsze dane eksperymentalne wskazują, że aktywność HtrA2 stymulowana jest przez temperaturę, a także przez specyficzne peptydy wiążące się do domeny PDZ.

Celem ocenianej rozprawy było wyjaśnienie zmian strukturalnych, które zachodzą w czasie wzrostu temperatury, a także podczas związania peptydu regulatorowego przez domenę PDZ, i powiązanie tych zmian z aktywnością proteolityczną enzymu. Do monitorowania dynamiki zmian konformacyjnych HtrA2 wybrano dwie dobrze scharakteryzowane metody biofizyczne: pomiar wygaszania fluorescencji tryptofanu oraz pomiar gaszenia fluorescencji znacznika przez tryptofan (TrIQ). Zaproponowany temat uważam za oryginalny, a uzyskane wyniki w istotny sposób pogłębiły zrozumienie mechanizmu aktywacji proteazy HtrA2 po podwyższeniu temperatury lub na drodze regulacji allosterycznej, pod wpływem przyłączenia odpowiednich peptydów regulatorowych. W pełni spełniony jest zatem wymóg oryginalności badań przeprowadzonych przez mgr Mirosława Jarzaba, a przede wszystkim naukowej istotności zaprezentowanych w rozprawie wyników.

Praca ma klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich z zakresu biologii molekularnej układ rozdziałów. Została napisana w sposób jasny i czytelny, język ocenianej rozprawy jest poprawny i zrozumiały. Można mieć jedynie pewne zastrzeżenia do objętości pracy, bez uszczerbku dla jakości i przejrzystości przekazu mogłaby być znacznie odchudzona, ale z uwagi na bardzo elegancki język jakim



została napisana, a także logiczny i przejrzysty układ treści, czytanie tej ponad dwustustronicowej pracy nie było aż tak „bolesne”.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Mirosława Jarząba w pełni spełnia warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim, zarówno pod względem formy, jak i oryginalności tematu i poziomu naukowego uzyskanych wyników.

## **II. Ocena merytoryczna**

Magister Mirosław Jarząb rozpoczął badania nad HtrA2 od ekspresji tego enzymu w komórkach *E. coli* i oczyszczenia rekombinowanego białka. Na początku otrzymał dwa warianty ludzkiego HtrA2: natywną oraz wariant pozbawiony domeny PDZ. Poprawność ekspresji obu białek została potwierdzona metodą western, przy wykorzystaniu przeciwciał specyficznie rozpoznających ludzkie białko HtrA2. Wykorzystując rekombinowany enzym mgr Mirosław Jarząb sprawdził następnie zależność jego aktywności od temperatury, wykazując, że wraz ze wzrostem temperatury w zakresie od 25°C do 45°C aktywność badanego białka również wzrastała. Analizując wykresy obrazujące ten eksperyment, nasunęła mi pytanie, dlaczego w niższych temperaturach, przy wysokich stężeniach substratu, aktywność badanego enzymu spada? Efektu tego nie zauważyłem przy analizie aktywności prowadzonej w wyższych temperaturach.

Wykonując podobne eksperymenty z użyciem enzymu HtrA2 pozbawionego domeny PDZ (wariant HtrA2 $\Delta$ PDZ) mgr Mirosław Jarząb wykazał, że brak domeny PDZ powoduje wzrost aktywności badanej proteazy. Co więcej, wykonane przez Doktoranta doświadczenia pozwoliły wyznaczyć parametry kinetyczne proteolizy prowadzonej przez rekombinowany enzym HtrA2 i HtrA2 $\Delta$ PDZ. Na podstawie sigmoidalnego wykresu kinetyki oraz wartości współczynnika Hilla mgr Mirosław Jarząb wywnioskował, że HtrA2 $\Delta$ PDZ jest enzymem allosterycznym, podobnie jak enzym pełnej długości. W następnym etapie badań Doktorant przebadał wpływ



wybranych peptydów, o których było wiadomo, że aktywują HtrA2 lub wiążą się z domeną PDZ tego enzymu, na aktywność proteolityczną. Wykazano ich aktywujący wpływ na HtrA2 wobec substratu peptydowego, ale nie w przypadku zastosowania  $\beta$ -kazeiny. Skąd bierze się taka różnica? Magister Mirosław Jarzab skonstruował następnie panel wariantów HtrA2, który składał się z białek zawierających pojedyncze reszty tryptofanowe, wprowadzone głównie w miejscu styku domeny PD i domeny PDZ. Doktorant sprawdził poprawność struktury uzyskanych zmutowanych białek, wybierając do dalszych analiz tylko te, u których wprowadzone zmiany aminokwasowe nie zaburzyły ich budowy. Wszystkie wyselekcjonowane warianty tryptofanowe zostały poddane badaniom widm fluorescencyjnych, przy czym pomiary prowadzono w różnych temperaturach. Na podstawie analizy otrzymanych widm mgr Mirosław Jarzab stwierdził, że w otoczeniu reszt W361, W364 i L367, występujących w domenie PDZ, przy wzroście temperatury mają miejsce istotne zmiany konformacyjne. Badania wygaszania fluorescencji tryptofanu przez akrylamid pokazały, że zmiany konformacyjne wywołane podwyższoną temperaturą zachodzą właściwie w otoczeniu wszystkich analizowanych pozycji aminokwasowych. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że zmiany struktury HtrA2 wywołane wzrostem temperatury dotyczą głównie miejsca kontaktu domen PD i PDZ badanego enzymu. W szczególności zaobserwowano wzrost ekspozycji do środowiska reszty W303 w pętli aktywacyjnej L1 i reszty W226 w pętli aktywacyjnej LC, a także reszt W361 i W364, znajdujących się w domenie PDZ w rejonie tak zwanej bruzdy wiążącej peptyd. Do badań zmian konformacyjnych HtrA2 zastosowano także metodę wygaszania przez tryptofan fluorescencji znacznika, którym w wykonanych przez Doktoranta eksperymentach był monobromobiman (mBBr). Magister Mirosław Jarzab zaprojektował i skonstruował jeszcze jeden zestaw mutantów HtrA2, tym razem zawierających pojedyncze reszty tryptofanowe i cysteinowe. Podobnie jak poprzednio, Doktorant sprawdził poprawność zwinięcia analizowanych mutein metodą dichroizmu kołowego; do badań wyznaczył tylko te warianty, których



struktura nie różniła się znacząco od niezmienionego, natywnego enzymu. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na precyzyjny monitoring zmian konformacyjnych domen PD i PDZ w obrębie monomeru, jak również pomiędzy podjednostkami trimeru HtrA2. Metoda TrIQ pozwoliła na dokładne scharakteryzowanie zmian konformacyjnych wywołanych przez wzrost temperatury i zaproponowanie na ich podstawie modelu termicznej aktywacji enzymu. W modelu tym podwyższenie temperatury powoduje zmianę położenia domeny PDZ w stosunku do domeny proteolitycznej, co skutkuje odsłonięciem centrum katalitycznego enzymu, a także udostępnieniem bruzdy wiążącej substrat. Te zmiany powodują przeniesienie zmian konformacyjnych do następnej podjednostki trimeru. Doktorant pokusił się również o zbadanie zmian konformacyjnych HtrA2 pod wpływem przyłączenia jednego z peptydów regulatorowych i wykazał, że są one podobne do tych obserwowanych przy wzroście temperatury. Muszę przyznać, że ta część rozprawy pozostawiła pewien niedosyt. Mam nadzieję, że eksperymenty, w których zastosowane będą różne peptydy regulatorowe są laboratorium kontynuowane i doprowadzą do przedstawienia bezpośredniej korelacji zmian strukturalnych wymuszonych związaniem odpowiedniego peptydu z aktywnością HtrA2.

Wszystkie opisane w rozprawie wyniki naukowe zostały bardzo wnikliwie skonfrontowane z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych badaczy, w interesującym i obszernym rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Przedstawiona tam żywa polemika oparta jest na najnowszej literaturze naukowej i dobitnie wskazuje, że mgr Mirosław Jarzab znakomicie zna literaturę naukową poświęconą endopeptydazom serynowym z rodziny HtrA. Na szczególną pochwałę zasługuje świetne porównanie zaproponowanego modelu aktywacji ludzkiej proteazy HtrA2 z innymi członkami tej interesującej rodziny enzymatycznej.



W ocenianej pracy przedstawiono szereg interesujących, nowych i ważnych dla nauki obserwacji. Rozprawa mgr Mirosława Jarząba jest dojrzałą i istotną pracą naukową, a Jej Autor w pełni zasługuje na stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

### **III. Uwagi końcowe**

Rozprawę doktorską mgr Mirosława Jarząba oceniam bardzo wysoko. Autor przedstawił w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe. Oceniana praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Mirosława Jarząba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski