

Prof. dr hab. Maciej Kozak  
Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM  
oraz Środowiskowe Laboratorium Badań SAXS  
ul. Umultowska 85  
61-614 Poznań  
[mkozak@amu.edu.pl](mailto:mkozak@amu.edu.pl)

Poznań, 15 maja 2017 r

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Julii Pauliny Witkowskiej

*“Badania oddziaływań proteasomu z allosterycznymi modulatorami jego aktywności oraz wyznaczenie miejsc ich wiązania z enzymem za pomocą rentgenografii strukturalnej”*

Kompleks proteasomu odgrywa kluczową rolę w procesach degradacji białek, dlatego w ostatnich kilkunastu latach stał się atrakcyjnym celem terapeutycznym w poszukiwaniach nowych leków przeciwnowotworowych oraz substancji, które mogą potencjalnie posłużyć w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Intensywne poszukiwania doprowadziły do uzyskania i zatwierdzenia kilku nowych leków bazujących na inhibitorach proteasomu. Pierwszy z nich bortezomib został już w 2003 roku dopuszczony w USA do stosowania w terapii szpiczaka mnogiego. Niestety wiele z proponowanych inhibitorów proteasomu generuje niepożądane efekty uboczne, a wśród innych rozwija się efekt oporności w trakcie terapii. Dotyczy to także wspomnianego bortezomibu, którego efektem ubocznym może być neuropatia obwodowa. Obecnie prowadzone badania mają na celu uzyskanie kolejnych substancji czynnych modyfikujących aktywność proteasomu i skupiają się na poprawie ich selektywności i specyficzności. Na tym tle bardzo atrakcyjnie przedstawia się tematyka, którą poruszyła mgr Julia Paulina Witkowska w swojej pracy zatytułowanej „Badania oddziaływań proteasomu z allosterycznymi modulatorami jego aktywności oraz wyznaczenie miejsc ich wiązania z enzymem za pomocą rentgenografii strukturalnej” dlatego w tym miejscu pragnę pogratulować Doktorantce i Promotorce wyboru ciekawej tematyki.

Dysertacja przygotowana została w Katedrze Chemii Biomedycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką promotorską uznanej specjalistki w zakresie chemii medycznej i syntezy peptydów, dr hab. Elżbiety Jankowskiej.

Przedstawioną do recenzji pracę Autorka przygotowała w postaci maszynopisu o objętości 135 stron. Praca podzielona została na sześć rozdziałów oraz zilustrowana 55 rysunkami oraz 20 tabelami. W kolejnych częściach recenzji pokrótce chciałbym omówić zawartość pracy, a następnie ustosunkować się do zaproponowanej metodyki badawczej, uzyskanych wyników badań oraz przeprowadzonej przez Doktorantkę ich dyskusji.

W pierwszym rozdziale, liczącym 40 stron, Doktorantka przedstawiła obszerny przegląd literatury dotyczący budowy i funkcji proteasomu. Omówiła także skutki dysfunkcji proteasomu, rolę jego aktywatorów i inhibitorów, projektowanych jako leki przeciwnowotworowe lub przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym. Ostatnia część rozdziału poświęcona została omówieniu modeli allosteryczności oraz zastosowaniu leków allosterycznych.

W drugim rozdziale Doktorantka przedstawiła cel swoich badań. Za cel swojej pracy mgr Witkowska obrała sobie znalezienie i przeprowadzenie charakterystyki miejsc wiązania substancji modulujących aktywność proteasomu 20S. W szczególności postawiła sobie za cel rozpoznanie uwarunkowań konformacyjnych i określenie różnic w ścieżkach transferu sygnału allosterycznego różnych modulatorów aktywności. Równoległe do badań strukturalnych zaplanowała syntezę serii peptydowych modulatorów opartych na sekwencji białka Blm10, peptydów PR11 oraz Tat2. Sekwencje planowanych peptydów zostały zaprezentowane wraz z krótkim uzasadnieniem wprowadzanych modyfikacji.

Rozdział trzeci zawiera bardzo szczegółowe omówienie metodyki badań zrealizowanych w pracy, począwszy od technik związanych z syntezą peptydów na technikach krystalografii białek skończywszy. Opis strony metodycznej jest wyczerpujący, jednak w mojej ocenie zabrakło tu szerszego opisu pomiarów struktury drugorzędowej peptydów metodą spektroskopii dichroizmu kołowego.

W rozdziale czwartym Doktorantka przedstawiła i omówiła uzyskane wyniki. Rozdział ten podzielony został na trzy logiczne części, w których omówiła kolejno wyniki badań struktury i aktywności analogów Tat2, aktywności i podatności na trawienie analogów PR i Blm-pep oraz strukturę krystaliczną kompleksu drożdżowego proteasomu 20S z modulatorem Blm-pep. Na końcu każdego z tych podrozdziałów Autorka krytycznie dyskutowała uzyskane wyniki.

W kolejnym, piątym rozdziale dysertacji, Doktorantka przedstawiła zwięzłe podsumowanie przeprowadzonych badań. Rozprawę zamyka rozdział zawierający zacytowaną w pracy literaturę, która obejmuje 184 pozycje.

### **Ocena strony merytorycznej pracy**

Metodyka badań została szczegółowo opisana w sposób pozwalający na powtórzenie omawianych eksperymentów. Wyniki badań zostały przejrzysto zaprezentowane i szczegółowo omówione, nie zostały pominięte także trudności które

Doktorantka napotkała podczas realizacji swoich badań (np. rozpuszczanie kryształów proteasomu podczas nasączenia roztworem modulatora). Autorka z odpowiednim dystansem przedyskutowała także uzyskane wyniki. Dlatego można jednoznacznie stwierdzić, że założony cel badań, który obejmował znalezienie i charakterystykę miejsc wiązania modulatorów aktywności proteasomu 20S oraz rozpoznanie ich uwarunkowań konformacyjnych oraz różnic w ścieżkach transferu sygnału allosterycznego, został osiągnięty. Badania te zostały także opublikowane w uznanych czasopismach międzynarodowych.

W oparciu o zaprezentowane w dysertacji dokonania, do najważniejszych osiągnięć mgr Witkowskiej zaliczam:

- zaprojektowanie, przeprowadzenie syntezy i charakterystyki spektroskopowej oraz określenie aktywności serii peptydowych modulatorów aktywności proteasomu bazujących na peptydzie Tat2,
- otrzymanie i scharakteryzowanie aktywatorów PR1 i Blm o silnych właściwościach stymulujących,
- określenie pierwszej struktury przestrzennej kompleksu drożdżowego proteasomu, która pozwala na lokalizację miejsca wiązania aktywatora (Blm-pep).

Podczas lektury rozprawy nasunęło mi się kilka drobnych uwag krytycznych, które chciałbym w tym miejscu wyartykułować:

- Nie zostało jasno przedstawione powiązanie przedstawionych wyników badań peptydów z pojedynczą alaninową substytucją (oznaczanych A1-A11) z zaprezentowanymi w celu pracy peptydami. Można co prawda się w dalszej części domyślić, jednak Autorka powinna to powiązanie wcześniej wyjaśnić.
- Na rysunku 41 Autorka przedstawiała dane FTIR. Położenia maksimów pasma amidowego I określiła za pomocą analizy z wykorzystaniem drugiej pochodnej. Niestety poza samymi danymi na rysunku nie zostały zaprezentowane wyszukane maksima. W mojej ocenie tego typu analiza nie jest do końca precyzyjna. W dalszym etapie należałoby w oparciu o położenia maksimów przeprowadzić numeryczne dopasowanie profili pików do profilu badanego pasma. Miarą dokładności tego typu analizy są także różnice pomiędzy profilem eksperymentalnym a profilami pików z dopasowania numerycznego, które powinny zostać zaprezentowane.
- W pracy brakuje szczegółowych informacji dotyczących procedury wykonywania pomiarów i analizy wyników dichroizmu kołowego. Według typowych procedur pomiarowych najczęściej stężenie białka w pomiarach FTIR jest kilkakrotnie wyższe niż w pomiarach CD. Z uwagi na potencjalne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w roztworze o wyższym stężeniu nie zawsze będziemy mogli oczekiwać identycznych wyników z obu tych metod. Co więcej, zdarza się, że w różnych stężeniach białka

zawartość poszczególnych elementów struktury drugorzędowej jest zmienna (np. J.C. Ioannou i inni, *Food Hydrocolloids* (2015), **46**, 216-225)

- Na stronie 82 Autorka opisując procedurę krystalizacji proteasomu drożdżowego, wspomniała, że zdecydowała się tylko na rozwijanie warunków znanych już z literatury. W mojej ocenie, warto byłoby na tym etapie niezależnie wykorzystać także przesiewowy test warunków krystalizacji (screening). Tym bardziej, że Doktorantka samodzielnie prowadziła ekspresję i oczyszczanie tego białka, a niejednokrotnie zdarzało się, że to samo białko pochodzące z różnych źródeł potrafi krystalizować w innych warunkach.

- Rysunek 40 ilustrujący nasączenie kryształów proteasomu jest nieczytelny. Nie widać na nim wspomnianego przez Autorkę efektu rozpuszczania się kryształów po dodaniu roztworu modulatora. Z punktu widzenia czytelnika, korzystniej by było zamieścić powiększenie omawianego efektu lub zakreślić obszar na zdjęciu, w którym ten efekt jest najlepiej widoczny.

- Opisy rysunków są niekiedy niejednoznaczne. Autorka w celu pracy zaprezentowała własną notację skrótów nazw badanych peptydów. Niestety nie stosuje jej konsekwentnie na rysunkach (np. rysunki nr 41, 42, 43) ilustrujących uzyskane wyniki. Wprowadza to pewne zamieszanie, gdyż czytelnik może mieć wrażenie, że prezentowane są inne wersje peptydów.

Powyższe uwagi, nie wpływają na wysoką ocenę pracy. Doceniam pracę jaką Doktorantka włożyła w syntezę i oczyszczanie zaprojektowanych do swoich badań peptydów oraz próby uzyskania wysokorozdzielczej struktury kompleksu proteasomu. Wyniki jej badań niewątpliwie mogą być wykorzystane przez innych badaczy w projektowaniu substancji modyfikujących aktywność proteasomu, które potencjalnie mogą dalej znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych lub przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym.

### **Ocena strony edytorskiej pracy**

Manuskrypt przygotowany został przez mgr Witkowską bardzo starannie. Zawarte w pracy rysunki oraz diagramy są czytelne i doskonale ilustrują omawiane zagadnienia. Na szczególne podkreślenie zasługują przygotowane przez Autorkę rysunki struktury proteasomu czy miejsca wiązania modulatora. Układ pracy jest przejrzysty, nie mam zastrzeżeń do formy edytorskiej, raczej sporadycznie pojawiają się też błędy edytorskie (literówki).

### **Podsumowanie**

Mgr Witkowska w pełni zrealizowała założone cele pracy. Wysoko oceniam uzyskane przez nią wyniki badań, gdyż stanowią ważny wkład do poszukiwań nowych terapeutyków, które mogą zostać wykorzystane w terapiach przeciwnowotworowych.

Warto też podkreślić, że wyniki badań mgr Witkowskiej opublikowane zostały w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (jak *Curr. Pharm. Des.*, *J. Pept. Sci.*).

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Julię Witkowską spełnia wszystkie zalecenia formalne stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz wymagania zwyczajowe. Wobec powyższego, wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Julii Pauliny Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

