



UNIWERSYTET GDAŃSKI



## **Dr hab. Elżbieta Jankowska**

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: [elzbieta.jankowska@ug.edu.pl](mailto:elzbieta.jankowska@ug.edu.pl)

Gdańsk, 25.05.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk,  
zatytułowanej: **Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej  
w charakterystyce wybranych proteinaz serynowych**

Obiektem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk były enzymy proteolityczne znajdujące się w ziarnistościach cytoplazmatycznych komórek neutrofilii: ludzka elastaza neutrofilna (HNE), proteinaza 3 (PR3) oraz czwarta neutrofilowa proteinaza serynowa (NSP4). Zadania jakie wyznaczyła sobie Doktorantka polegały przede wszystkim na dokładnym scharakteryzowaniu specyficzności substratowych każdego z tych enzymów, i to zarówno w odniesieniu do nieprimowanych, jak i primowanych kieszeni substratowych, a następnie przetestowaniu najbardziej efektywnych i selektywnych substratów pod kątem ich przydatności do oznaczania stężenia i aktywności enzymatycznej PR3 i HNE w materiale biologicznym, w ramach nieinwazyjnych testów diagnostycznych.

Ludzkie neutrofilne proteiny serynowe zaangażowane są w mechanizmy zwalczające patogeny oraz w regulację odpowiedzi zapalnej. Nadmierne wydzielanie tych enzymów bądź też zaburzenie równowagi enzym-naturalny inhibitor obserwowane jest w szeregu chorób, m.in. przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, mukowiscydozie, czy ostrej niewydolności oddechowej. Bardzo ważne znaczenie z punktu widzenia diagnostyki tych chorób miałyby opracowanie czułych metod detekcji aktywnych proteinaz neutrofilnych z jednoczesnym przypisaniem wykrytej aktywności do konkretnego enzymu. Badania zaplanowane przez mgr Jadwigę Popow-Stellmaszyk są odpowiedzią na to zapotrzebowanie. Podjęty przez Doktorantkę temat został bardzo dokładnie przemyślany i potraktowany wielotorowo. Eksperymenty prowadzone były niezwykle rzetelnie, z odpowiednio dobranymi próbkami kontrolnymi. Imponujący jest zakres zarówno prac syntetycznych, jak i badań biochemicznych.

Realizując cele swojej pracy Doktorantka zaprojektowała substraty fluorescencyjne wykorzystujące zjawisko przeniesienia energii wzbudzenia elektronowego (FRET). Stosując metody chemii kombinatorycznej otrzymała cztery biblioteki związków – substraty dla proteinazy 3, ludzkiej neutrofilnej elastazy, oraz ludzkiej i mysiej czwartej neutrofilowej proteinazy. Dla każdej z bibliotek wykonywała iteracyjną dekonwolucję, przy czym wybór reszty aminokwasowej jako optymalnej w danej pozycji był zwykle

podyktowany kompromisem uwzględniającym zarówno efektywność trawienia danego substratu przez enzym, jak i jego specyficzność. Na poszczególnych etapach dekonwolucji badanych podbibliotek charakteryzowano je też z wykorzystaniem spektrometrii mas, wykorzystując do analizy widm powstały z inicjatywy Doktorantki program komputerowy KomBi Kreator. Bardzo starannie zostały zaplanowane i wykonane testy enzymatyczne, w których sprawdzano m.in. optimum pH dla reakcji trawienia substratów przez badane proteiny serynowe, poziom detekcji enzymu z wykorzystaniem otrzymanych substratów, konkurencyjność działania enzymów względem tego samego substratu. Dla wybranych substratów Doktorantka wyznaczyła dokładne parametry kinetyczne – stałą Michaelisa-Menten, stałą katalizy oraz stałą specyficzności. Wyselekcjonowane substraty zostały następnie użyte przez Doktorantkę do określenia aktywności enzymatycznej proteiny 3 oraz ludzkiej neutrofilnej elastazy w różnego typu materiale biologicznym – surowicy, osoczu, lizatach komórkowych oraz płynie z płukania pęcherzykowo-oskrzelowego. Wyniki tych badań są bardzo obiecujące i wskazują, iż wybrane przez mgr Popow-Stellmaszyk substraty mogłyby być wykorzystywane do selektywnej detekcji podwyższonego poziomu aktywności enzymów PR3 i HNE, jak również do charakteryzowania poprzez oznaczenie tej aktywności wariantów genetycznych naturalnego inhibitora proteinaz serynowych - alfa-1 antytrypsyny.

Rozprawa doktorska mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk jest bardzo obszerna, obejmuje bowiem aż 214 stron. Przegląd literatury zawarty został na ok. 50 stronach. Znalazły się w nim podstawowe informacje na temat syntezy kombinatorycznej, kinetyki reakcji enzymatycznych, substratów chromo- i fluorogenicznych, a także zjawiska fluorescencji ze szczególnym uwzględnieniem rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia. Doktorantka ujęła w tym rozdziale również najważniejsze informacje na temat właściwości i budowy neutrofilnych proteinaz serynowych, w tym m.in. specyficzności ich kieszeni substratowych. Tekst jest napisany jasno i klarownie, w sposób zwięzły prezentując treści niezbędne do zrozumienia dalszej części rozprawy. Jedyną uwagę, jak nasuwa się po lekturze tej części pracy to brak informacji na temat dotychczasowych badań nad specyficznością primowanych kieszeni substratowych neutrofilnych proteinaz serynowych. Zacytowanie kilku pozycji literaturowych i skwitowanie zagadnienia sformułowaniem „Analiza specyficzności substratowej [...] pozwoliła wysnuć wnioski, że pozycje S2, S1' i S2' są kluczowymi elementami pozwalającymi na rozróżnienie specyficzności” wydaje się być nadmiernie oszczędne, zwłaszcza wobec faktu, iż optymalizacja pozycji primowanych substratów była jednym z głównych celów tej pracy doktorskiej.

Znakomitą większość treści rozprawy (128 stron) stanowi opis przeprowadzonych eksperymentów oraz dyskusja wyników i wnioski. Wydaje się, że w przypadku akurat tej rozprawy niezbyt fortunne było oddzielenie wyników badań od ich omówienia. Przy tak przyjętym schemacie część wykresów została zaprezentowana w rozdziale opisującym wyniki, część dopiero później, przy ich omawianiu. Przy lekturze części pierwszej często rodziły się pytania, dlaczego zdecydowano się na wybór takich a nie innych reszt przy iteracyjnej dekonwolucji podbibliotek. Wątpliwości te były rozwiewane dopiero podczas lektury rozdziału *Dyskusja na temat wyników i wnioski*. Ponadto, konieczność ciągłego wertowania bardzo obszernej pracy w poszukiwaniu wykresów, do których odwoływano się przy omawianiu wyników, utrudniała trochę lekturę

tekstu. Niemniej jednak sposób prezentacji wyników – czytelność wykresów, tabel, rysunków nie budzi zastrzeżeń. Interpretacja wyników i wyciąganie rozsądnych i jak najbardziej uprawnionych wniosków na ich podstawie to także mocne strony tej rozprawy.

Poniżej wymieniam kilka dostrzeżonych nieprawidłowości bądź braków:

- W wykazie stosowanych skrótów pominięto cały szereg oznaczeń, które następnie były wielokrotnie stosowane w tekście rozprawy (np. niemal wszystkie skróty związane z syntezą peptydów, takie jak DMF, DIC, HOBt, TBTU, TFA itp.). Skróty te wyjaśniane były w momencie pojawienia się w tekście, ale wcale niekoniecznie przy pierwszym ich użyciu.
- Przy opisie specyficzności substratowych proteinaz serynowych (str. 24) podano, iż chymotrypsyna „wykazuje specyficzność do hydrolizy wiązań peptydowych po karboksylowej stronie aminokwasów z dodatnio naładowanymi łańcuchami lub aminokwasów hydrofobowych.” Cytowane źródło literaturowe podaje nieco inną informację...
- Rysunek 13 miał pokazywać różnice w polarności kieszeni substratowych S4-S3' enzymów PR3 i HNE, nie zaznaczono na nim jednak ani samych kieszeni, ani wspomnianych w tekście reszt Asp66, Lys99 i Arg143. Nie podano też jakie są odpowiedniki tych różnicujących polarność reszt w HNE. Wbrew więc zaanonsowanemu „jak można zaobserwować”, na rysunku tych różnic dostrzec się nie da.
- Na stronie 28 użyto sformułowania „superpozycja widma modelowego cząsteczki NSP4 pokazała...”. Zabrakło informacji, na jaką strukturę nakładano to widmo modelowe.
- Czy w analizach chromatograficznych naprawdę używano kolumn o długości 25 mm? (str. 65)
- Na str. 169 w rozważaniach na temat substratu ludzkiej elastazy neutrofilnej podano, iż substrat z resztą Thr w pozycji X2' jest równie wydajnie hydrolizowany przez elastazę, jak i proteinazę 3. Rysunek 65, na którym przedstawione są te dane zdecydowanie nie wskazuje na równie intensywną hydrolizę, aczkolwiek rzeczywiście jest ona znacząca.
- czy  $2 \times 19 = 36$ ? (str. 72, 73, 75)

Mam też kilka pytań:

- Czy znane są dokładne dane statystyczne dotyczące częstości występowania wrodzonego niedoboru fizjologicznego inhibitora proteaz serynowych, alfa-1 antytrypsyny? Czy podana informacja, że jest to jedno z najczęstszych zaburzeń genetycznych rasy kaukaskiej dotyczy zaburzeń genetycznych w ogóle, czy też jedynie zaburzeń powiązanych z proteinazami neutrofilnymi?
- Czy w literaturze przy analizie nieco zadziwiającej budowy kieszeni S1 czwartej neutrofilnej proteazy serynowej w powiązaniu z jej preferencjami do hydrolizy wiązań po reszcie Arg, nie podnoszono możliwości wystąpienia kontaktów typu kation- $\pi$  między resztą Arg a pierścieniem aromatycznym zamykającej kieszeń reszty Phe? Bo taki kontakt byłby silniejszy i chyba lepiej orientujący resztę P1 substratu niż słabe oddziaływanie typu hydrofobowego. Czy w świetle znanej struktury krystalicznej NSP4 można by takie oddziaływanie brać pod uwagę?

- Dlaczego przy odszczepianiu od nośnika peptydów zawierających resztę Met nie stosowano dodatkowo odczynników ograniczających utlenianie tej wrażliwej reszty? Na widmie MS przedstawionym na rys. 82 ujawniają się sygnały, które mogłyby pochodzić od utlenionej Met. Czy nie obserwowano podobnych na widmach innych peptydów zawierających w sekwencji resztę Met? Czy nie utrudniało to przypisywania sygnałów przy analizowaniu widm całych podbibliotek?
- Zdanie „W trypsynie reszta Ser190 powoduje, że kieszeń S1 może tworzyć silne wiązanie elektrostatyczne z dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi Lys i Arg” (str. 29) sugeruje, być może w sposób niezamierzony, iż to reszta seryny oddziałuje elektrostatycznie z aminokwasami zasadowymi. Czy to o taki kontakt chodziło?
- Dlaczego na rysunku 47A, na którym przedstawiono podobno chromatogram pojedynczego substratu (ABZ-Met-Pro-Val-ANB-NH<sub>2</sub>), jest tak dużo pików i w jaki sposób działanie enzymu HNE zmienia ten obraz w pojedynczy pik?
- Z czego wynika tak duża różnica czasu retencji substratu 11 analizowanego chromatograficznie w tym samym gradiencie 10-90% B w 40 min (rys. 125 i 127)?

Korekta językowa wykonana została dość starannie, w tekście rozprawy nie ma więc zbyt wielu błędów czy usterek edycyjnych. W kilku miejscach pojawiły się drobne niedociągnięcia takie jak utrudniający zrozumienie tekstu sztyk wyrazów, bądź też tzw. literówki. Zauważyłam też kilka niewłaściwych/niefortunnych/nieprecyzyjnych sformułowań:

- najwyższa wolna energia (str. 13)
- doskonała organizacja geometrii centrum aktywnego (str. 16)
- specyficzność stereospecyficzna (str. 17)
- sekwencja-fluor czy też donor-sekwencja-akceptor
- specyficzność S-substratowa proteinaz w kierunku N-końca łańcucha
- masy peptydów potwierdzałam widmami mas
- analiza jonu masowego biblioteki peptydowej
- długość fali w punkcie (podpis do rys. 123)
- rozwiązanie pozycji (str. 165, 175)

Te drobne mankamenty w żaden sposób nie umniejszają jednak wartości rozprawy, w której mgr Jadwiga Popow-Stellmaszyk zaprezentowała bardzo interesujące i wartościowe wyniki. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy, moim zdaniem:

- ustalenie optymalnych reszt aminokwasowych dla pozycji P1', P2' i P3' substratów proteinazy 3 oraz P2, P1, P1', P2' i P3' dla substratów ludzkiej elastazy neutrofilnej, co umożliwiło otrzymanie związków nie tylko cechujących się dużą czułością detekcji, ale także selektywnych względem enzymów, dla których były dedykowane.

- dokładne scharakteryzowanie wymogów kieszeni substratowych S4, S3, S2, S1', S2' i S3' ludzkiej i mysiej czwartej serynowej proteiny neutrofilowej. W odniesieniu do kieszeni S4 wyniki otrzymane przez mgr Popow-Stellmaszyk pozwoliły zweryfikować istniejące w literaturze doniesienie na temat preferencji tej kieszeni do reszt Ile/Leu, i wybrać jako najlepszą nietestowaną wcześniej resztę Met.
- wykazanie możliwości wykorzystania wyselekcjonowanych substratów do selektywnego wykrywania aktywności poszczególnych neutrofilnych proteinaz serynowych w materiale biologicznym.

Nie mniej ważna od umiejętności planowania i prowadzenia badań jest też umiejętność zdobywania środków finansowych na ich realizację. Pani Jadwiga Popow-Stellmaszyk udowodniła, że także z tym zadaniem radzi sobie bardzo dobrze. Kierowała bowiem nie tylko czterema grantami przydzielanymi na poziomie Wydziału (na Badania Naukowe Służące Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich), ale jest też beneficjentką grantu Narodowego Centrum Nauki (Preludium). Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż mgr Popow-Stellmaszyk jest już współautorką 3 publikacji oryginalnych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w jednej z nich jest pierwszym autorem. Pięć kolejnych prac opublikowała w materiałach pokonferencyjnych europejskich zjazdów naukowych. Wyniki swoich prac szeroko prezentowała także w formie plakatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w sumie będąc współautorką aż 16 tego typu doniesień.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ejmbowska