



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,
dr hab. Beata Kolesińska, prof. PŁ,
tel: 42-631-31-49; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Gruba

Magister Natalia Gruba swoją rozprawę doktorską zatytułowaną „Badanie specyficzności ludzkiego proteasomu metodami chemii kombinatorycznej” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Pracowni Analityki Biochemicznej Katedry Biochemii Molekularnej.

Przedstawiona do recenzji praca posiada złożoną, wielopoziomową strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej prof. dr hab. Adama Lesnera, który można określić jako wykorzystanie narzędzi chemii kombinatorycznej w badaniu specyficzności substratowej enzymów, w tym w szczególności enzymów proteolitycznych, co z kolei może być wykorzystane do racjonalnego projektowania ich inhibitorów. Chemia kombinatoryczna, pomimo faktu, że jest to relatywnie młoda dziedzina chemii, znalazła ze spektakularnymi sukcesami zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym w badaniach prowadzonych nad poszukiwaniem nowych terapeutyków. O sile chemii kombinatorycznej umożliwiającej efektywne tworzenie licznych zbiorów związków, decyduje możliwość przyspieszenia badań nad nowymi farmaceutykami, a o skuteczności jej stosowania świadczy fakt zauważalnie większej ilości nowych terapeutyków dopuszczanych do obrotu. Metoda ta, z powodzeniem jest wykorzystywana w badaniach nad poszukiwaniem nowych biologicznie aktywnych związków o budowie peptydowej, glikopeptydowej, oligosacharydowej, oligonukleotydydowej, jak również peptydomimetyków czy innych związków chemicznych. Z pełnym przekonaniem można więc wyrazić opinię o aktualności i o wysokiej randze tematyki podjętej w rozprawie.

Uzyskane wyniki badań zostały opisane w pracy liczącej 181, chociaż dla ścisłości należy dodać, że cała praca liczy 207 stron, jednak końcowy fragment obejmuje spis rysunków, spis tabel, dorobek naukowy Doktorantki oraz spis literatury cytowanej. Układ pracy, dostosowany do jednoznacznie zdefiniowanego celu badawczego, jest standardowy i obejmuje dziewięć głównych rozdziałów: Przegląd literaturowy, Cel pracy, Badania własne, Wyniki i dyskusja, Wnioski, oraz wspomniany już dorobek naukowy, spisy tabel i rysunków i

literaturę cytowaną. Część referatową pracy stanowi 44 stronicowy zbiór esejów prezentujących przeglądy literaturowe stanowiące wprowadzenia do kolejnych tematów badawczych rozwijanych w rozprawie. Obejmują one zagadnienia dedykowane:

- degradacji białek: w tym szlak lizosomalny oraz system ubikwityna-proteasom,
- degradacji białek w komórkach nowotworowych,
- aktywności proteasomu w różnych chorobach, ze szczególnym naciskiem na choroby nowotworowe,
- inhibitorom proteasomu,
- metodom badania aktywności proteasomu,
- najważniejszym elementom chemii kombinatorycznej.

Dobór materiału literaturowego obejmuje w sumie 163 pozycje. Jest on głęboko przemyślany i prezentuje wszystkie najważniejsze publikacje, co pozwoliło na rzetelną i dogłębną prezentację stanu wiedzy. Na wyróżnienie zasługuje precyzja wyboru referowanych tekstów i zwięzłość wywodu, które pozwoliły na stworzenie wysoce przydatnych skoncentrowanych opracowań multi-dyscyplinarnych, kosztem pominięcia prac o mniejszym znaczeniu. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Pozwala to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy.

Jak należało oczekiwać, sam cel pracy został postawiony dopiero po wprowadzeniu literaturowym dającym uzasadnienie dla wszystkich jego elementów składowych na tle współczesnego stanu badań. Podjęte zadanie badawcze obejmowały:

- syntezę tetrapeptydowych bibliotek chromogenicznych i fluorescencyjnych substratów ludzkiego proteasomu; w ramach tych badań planowana była synteza trzech podbibliotek substratów o zróżnicowanej budowie zaprojektowanych z myślą o ich przeznaczeniu do badań trzech podjednostek proteasomu charakteryzujących się zróżnicowaną aktywnością enzymatyczną (trypsynową, chymotrypsynową i kaspazową) o ogólnej budowie $ABZ-X_4-X_3-X_2-X_1-ANB-NH_2$, gdzie X_4 , X_3 , X_2 , X_1 odpowiadają pozycjom P_4 , P_3 , P_2 , P_1 substratu,
- dekonwolucję otrzymanych podbibliotek metodą iteracyjną,

- syntezę bibliotek substratów fluorescencyjnych ludzkiego proteasomu, ponownie planowano otrzymać trzy podbiblioteki substratów o zróżnicowanej budowie odpowiadającej zróżnicowanym centrom katalitycznym proteasomu, wzór ogólny projektowanych peptydów będących składnikami poszczególnych podbibliotek to: ABZ-PEPTYD- X_1' - X_2' - X_3' -Tyr(3-NO₂)-NH₂, gdzie peptyd stanowi tetrapeptyd będący najbardziej aktywnym substratem wyselekcjonowanym w pierwszym etapie badań,
- dekonwolucję otrzymanych podbibliotek metodą iteracyjną,
- syntezę bibliotek substratów ludzkiego proteasomu 20S modyfikowanych w pozycji P₁, w ramach tych badań, Doktorantka zaplanowała syntezę podbiblioteki substratów dla podjednostek chymotrypsynowej oraz trypsynowej, z pominięciem podjednostki o aktywności kaspazowej.
- wyznaczenie parametrów kinetycznych najbardziej aktywnych substratów ludzkiego proteasomu,
- i wreszcie wykazanie możliwości zastosowania najbardziej aktywnych substratów specyficznych względem podjednostek proteasomu o zróżnicowanej aktywności w badaniach z użyciem próbek biologicznych (mocz, osocze) jako potencjalnych związków diagnostycznych.

Pierwszy etap badań obejmował syntezę trzech bibliotek tetrapeptydów o ogólnej budowie ABZ- X_4 - X_3 - X_2 - X_1 -ANB-NH₂, gdzie X_4 , X_3 , X_2 , X_1 odpowiadają pozycjom P₄, P₃, P₂, P₁ substratu. Jako X_1 zastosowana została lizyna i arginina w przypadku biblioteki substratów dla podjednostki β_2 o aktywności trypsynowej, tyrozyna lub fenyloalanina dla biblioteki substratów dla podjednostki β_5 o aktywności chymotrypsynowej, oraz kwas asparaginowy lub kwas glutaminowy dla podjednostki β_1 o aktywności kaspazowej. W pozycje X_2 , X_3 , X_4 wbudowane zostały wszystkie z wyjątkiem cysteiny naturalne aminokwasy.

W oparciu o wyniki dekonwolucji oraz badania z użyciem inhibitorów specyficznych dla poszczególnych podjednostek proteasomu, Doktorantka stwierdziła, że substratami tymi są odpowiednio Val-Val-Ser-Tyr (dla podjednostki β_5 o aktywności chymotrypsynowej), Val-Val-Ser-Arg (dla podjednostki β_2 o aktywności trypsynowej) oraz Ile-Leu-Met-Asp (dla podjednostki β_1 o aktywności kaspazowej).

Kolejny etap badań obejmował syntezę bibliotek heptapeptydów ABZ-PEPTYD- X_1' - X_2' - X_3' -Tyr(3-NO₂)-NH₂, gdzie fragment oznaczony mianem PEPTYD stanowił tetrapeptyd będący najbardziej aktywnym substratem wyselekcjonowanym w pierwszym etapie badań.

Ponownie, w oparciu o wyniki dekonwolucji oraz badania z użyciem inhibitorów Doktorantka wyselekcjonowała najbardziej aktywne substraty dla poszczególnych podjednostek ludzkiego proteasomu. Struktury te to:

ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (dla podjednostki o aktywności chymotrypsynowej),

ABZ-Ile-Leu-Met-Asp-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (dla podjednostki o aktywności kaspazowej),

ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Met-Tyr(3-NO₂)-NH₂ dla podjednostki o aktywności chymotrypsynowej) w warunkach aktywacji proteasomu (SDS+)

oraz ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ala-Phe-Phe-Tyr(3-NO₂)-NH₂ dla nieaktywowanego proteasomu (SDS-).

Doktorantka w oparciu o struktury wyselekcjonowanych substratów ludzkiego proteasomu zaprojektowała i otrzymała dwie biblioteki, w których w pozycji P1 wbudowywała nienaturalne aminokwasy. Dla biblioteki analogów substratu podjednostki o aktywności chymotrypsynowej, jedynie peptydy zawierające białkowe aminokwasy ulegają efektywnej hydrolizie. Podstawienie reszty argininy w substracie podjednostki o aktywności trypsynowej skutkuje obniżeniem zdolności ich hydrolizy przez ludzki proteasom. Na uznanie zasługuje wyselekcjonowanie analogu ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w którym zastąpienie tyrozyny resztą 4-guanidyl-L-feniloalaniny powoduje, że związek ten jest selektywnym substratem podjednostki ludzkiego proteasomu o aktywności trypsynowej.

Ostatni fragment pracy poświęcony został sprawdzeniu możliwości zastosowania trzech wyselekcjonowanych substratów do badania ich podatności na hydrolizę przez proteasom zawarty w materiale biologicznym: mocz oraz osocze krwi pacjentów z chorobą nowotworową płuc i/lub pęcherza moczowego. Doktorantka wykazała, że mocz jest bardziej przydatnym materiałem biologicznym niż osocze. Porównanie reakcji enzymatycznych wybranych substratów pod działaniem proteasomu zawartego w płynach fizjologicznych osób cierpiących na nowotwór pęcherza moczowego z próbkami pochodzącymi od osób zdrowych wykazało, że w moczu osób chorych aktywność proteasomu jest znacznie podwyższona. Obserwacje te zostały również potwierdzone testami immunoenzymatycznymi.

Lekturę tekstu rozprawy uznaję za wielce stymulującą do głębszych przemyśleń. Wśród pytań, które mi się nasunęły chciałabym postawić cztery następujące:

1. Jaki był sens włączania do grupy analogów optymalnych substratów podjednostek o aktywności trypsynowej oraz chymotrypsynowej modyfikowanych w pozycji P1 nienaturalnymi aminokwasami reszty argininy/lizyny oraz odpowiednio Tyr/Phe/Trp?

2. Czym może być spowodowana różna specyficzność substratowa dla substratów podjednostki trypsynowej ludzkiego proteasomu 20S zależna od obecności jego aktywatora (SDS+) lub też jego braku (SDS-)? Co może być przyczyną braku takiej zależności dla substratów specyficznych względem podjednostki o aktywności chymotrypsynowej oraz kaspazowej?

3. Co może być przyczyną obserwowanych różnic w wyznaczonych oraz obliczonych ciężarach cząsteczkowych peptydów modyfikowanych nienaturalnymi aminokwasami peptydów, będących analogami wyselekcjonowanego substratu podjednostki o aktywności chymotrypsynowej (Tabela 6, strona 82), oraz dlaczego w przypadku analogów substratu podjednostki o aktywności trypsynowej zróżnicowane to widoczne jest jedynie dla jednego peptydu (peptyd 27)?

4. Jaka była czystość finalnych pojedynczych peptydów uzyskiwanych w trakcie dekonwolucji oraz modyfikowanych w pozycji P1 nienaturalnymi aminokwasami substratów dla poszczególnych jednostek ludzkiego proteasomu 20S?

Błędy i uchybienia są nieliczne i nie utrudniają lektury pracy, ale z obowiązku zmuszona jestem do wymienienia niektórych z nich:

str. 31, Doktorantka pisze, inhibitory będące pochodnymi kwasu boronowego zawierają na *N*-końcu ugrupowanie $B(OH)_2$, przedstawiony na rysunku 16, bortezomib zawiera resztę $B(OH)_2$ na *C*-końcu, podobnie przedstawiony na rysunku 18 związek CEP-18770 zawiera tę grupę na *C*-końcu,

str. 37, przedstawione na rysunku 25 związki są raczej α,β -nienasyconymi amidami niż winyloketonami,

str. 45, czy w Tabeli 2 poprawnie przypisana jest funkcja donorowa/akceptorowa związków, dla kwasu 2-aminobenzoesowego (ABZ) Doktorantka pisze, że pełni on funkcję akceptora, zaś na stronie 56, ta sama cząsteczka pełni funkcję donora fluorescencji, podobnie, dla ANB na stronie 45 przypisana jest aktywność donora fluorescencji, zaś na stronie 56 akceptora fluorescencji,

str. 81, we wzorze Fmoc-4-karboksy-L-Phe-(*O*tBu)-OH grupa karboksylowa jest w pozycji trzeciej zamiast czwartej.

Doktorantka nie ustrzegła się od dość licznych sformułowań żargonowych jak i mało precyzyjnych określeń. Przykładowo: mieszanina ściągająca (str. 68); kinetyka reakcji enzymatycznej enzym – substrat (str. 104), cóż to za reakcja?: reszty najwydajniej ulegające hydrolizie, reszty posiadające naładowany łańcuch boczny praktycznie nie ulegały hydrolizie (str. 122), reszty aminokwasowi nie ulegają hydrolizie, wysoką aktywność wykazywały

również reszty Leu, Met, His (str. 122), to nie reszty wykazują aktywność; najwyższą wydajnością hydrolizy charakteryzowała się reszta Ser i Ala (str. 123); hydrolizowany jest przez tę specyficzność ludzkiego proteasomu 20S (str. 131), itd.

Przytoczone powyżej zestawienie uchybień świadczy, że redakcja tekstu rozprawy znajduje się na poziomie powyżej progu wymagań standardowych a uwagi o charakterze dyskusyjnym nie podważają jej warstwy merytorycznej i w żadnej mierze nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych pytań. Dokumentuje struktury najbardziej optymalnych substratów ludzkiego proteasomu o zróżnicowanej budowie dla trzech podjednostek o zróżnicowanej aktywności enzymatycznej. Wyselekcjonowane substraty obejmują reszty aminokwasów po obydwu stronach hydrolizowanego wiązania peptydowego. Opracowanie prezentuje całkowicie nowe podejście do badania korelacji pomiędzy stężeniem proteasomu w płynach fizjologicznych a stanem zdrowia, co przekłada się na możliwość wykorzystania wyselekcjonowanych substratów w diagnostyce medycznej. We wszystkich przypadkach wnioskowanie jest dobrze uzasadnione materiałem eksperymentalnym. Analiza wyników eksperymentów jest krytyczna co wzbudza zaufanie do wyciąganych wniosków.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór bardzo ambitnego tematu badań w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami badań o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, trudny, interdyscyplinarny charakter wykonanych prac niezbędnych dla zrealizowania wszystkich zadań badawczych. Na szczególne uznanie zasługuje nie tak często spotykana biegłość zarówno w wykorzystywaniu szerokiego arsenału metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Wysoko oceniam postęp jaki recenzowana rozprawa wnosi w rozwój chemii peptydów, biochemii jak i chemii kombinatorycznej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań opublikowane zostały w latach 2012-2015 w czasopismach indeksowanych w JCR. Na opublikowany dorobek mgr Natalii Gruba, które tematycznie związane są z rozprawą doktorską łącznie składają się 6 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR oraz dodatkowo jeden artykuł będący w trakcie recenzji, dwa artykuły opublikowane w recenzowanych materiałach po konferencyjnych oraz jedno zgłoszenie patentowe. Wyniki

prac badawczych Doktorantka prezentowała na licznych konferencjach krajowych oraz zagranicznych (12 posterów, 5 komunikatów ustnych) oraz 4 komunikaty ustne, w których Doktorantka była współautorem.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Natalii Gruba do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie dysertacji.

Beata Kolesińska

