



POLITECHNIKA ŁÓDZKA

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Tel: 42-636-25-42, 42- 631-31-40, Fax: 42-636-55-30

prof. dr hab. inż. Zbigniew J. Kamiński,

tel: 42-631-32-24; e-mail: zbigniew.kaminski@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej Natalii Marii Ptaszyńskiej

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska zatytułowana „Międzycząsteczkowe mostki disulfidowe: zastosowanie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego katalizowanego przez proteiny i w syntezie koniugatów peptydowych” wykonana w Pracowni Chemii Bioorganicznej, Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego przez mgr Natalię Marię Ptaszyńską. Promotorem pracy jest dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG.

U źródeł tematu wiodącego recenzowanej rozprawy są wysoce interesujące obserwacje poczynione w trakcie badań prowadzonych na Wydziale Chemii UG, dokumentujące możliwość przemodelowania struktury łańcucha peptydowego w procesie analogicznym do dobrze udokumentowanego w literaturze procesu zwanego splicingiem i dotyczącego przemian kwasów nukleinowych. Wybór tematyki głównego motywu pracy badawczej pozwala z pełnym przekonaniem ocenić go wysoce pozytywnie, jako racjonalnie uzasadniony, ambitny i w pełni aktualny. Doktorantka jako drugi cel swojej pracy wymienia syntezę i badania analogów zawierających podwojoną sekwencję inhibitora SFTI-1 zawierających w pozycji P₁ zamiast reszt lizyny dwie reszty peptoidowe Nlys. Moim zdaniem ten fragment badań w zupełności mieści się głównym nurcie pracy poświęconym poznaniu mechanizmu splicingu peptydowego. Przemawia za tym zarówno zbliżona metodyka prac syntetycznych jak i kierunek poszukiwań koncentrujący się na poznaniu mechanizmu procesu i reguł rządzących splicingiem peptydowym.

Odmienny charakter mają natomiast prace określane przez Doktorantkę jako trzeci cel badań, a w moim przekonaniu jako drugi nurt pracy związany z problematyką syntezy koniugatów i chimer peptydowych o zróżnicowanym profilu aktywności farmakologicznej. W tym miejscu muszę przyznać, że znalazłem się w trudnej sytuacji bowiem jako recenzent przyznaję, że zakres wykonanych badań z pewnością przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim w wielu ośrodkach akademickich i każdy z wymienionych nurtów badań mógłby stanowić dostateczną podstawę do obrony doktoratu. Z drugiej zaś strony, jako promotor, zapewne nie umiałbym się powstrzymać przed rozszerzeniem tak interesującego zakresu badań, no cóż, do rozmiaru zbliżonego do tego jaki jest w ocenianej rozprawie.

Struktura pracy jest tylko częściowo zbliżona do standardów stosowanych w dysertacjach doktorskich i w zakresie części merytorycznych obejmuje:

Wstęp: uzasadniający wagę badań nad mostkami disulfidowymi,

Przegląd literaturowy: prezentujący podstawowe informacje dotyczące splicingu, proteaz, inhibitorów proteaz, tworzenia mostków disulfidowych, biokoniugacji i biokoniugatów wybranych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz zastosowania krystalografii w badaniach peptydów i białek,

Cel pracy: definiujący trzy obszary badawcze: poznanie mechanizmu splicingu analogów SFTI-1, badania jego analogów peptomerowych oraz uzasadnienie celowości syntezy

koniugatów peptydów farmakologicznie aktywnych połączonych wiązaniem disulfidowym lub izopeptydowym i uściślający ich struktury.

Badania własne: zamieszczające na stronach od 91 do 131 opis materiałów, metod syntezy i prezentujący wyniki rozdziałów chromatograficznych i analiz spektralnych otrzymanych produktów reakcji.

Zastanawiam się czy nie można było zatytułować tego rozdziału jako „Materiały i metodyka badań”?

Wyniki i dyskusja: prezentujące zestawienia chromatogramów oraz zestawienia widm MS substratów użytych do badań, zestawienia chromatogramów oraz widm MS wykorzystanych w dyskusji nad mechanizmem splicingu, badania struktury analogu SFTI-1 oznaczonego w dysertacji jako analog **1** przy zastosowaniu technik NMR, badania oddziaływań z enzymami peptomerycznego analogu oznaczonego jako [Nlys^{5,19}] BiSFTI-1 i wreszcie szczegółowe omówienie metod syntezy i obszerną charakterystykę koniugatów peptydowych i koniugatów chimerycznych.

Podsumowanie wyników i wnioski:

Literaturę cytowaną: 261 pozycji, **Spis rysunków:** 83 pozycje, **i spis tabel:** 18 pozycji oraz **Dorobek naukowy** obejmujący 8 publikacji zamieszczonych w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu, 3 publikacje pokonferencyjne oraz 19 posterów i wystąpień konferencyjnych.

W uzupełnieniu do przedstawionego powyżej komentarza o nieco odbiegającym od klasycznego schematu, układzie pracy należy dodać, że w wielu akapitach części poświęconej omówieniu wyników zamieszczone zostały przesadnie szczegółowe opisy procedur preparatywnych bądź analitycznych zamiast spodziewanej dyskusji wyników. Przykłady takie znajdują się na str. 138 (opis roztworu do reakcji z odczynnikiem Ellmana) czy też na str. 139 (opis składu buforu). Pomimo wspomnianych uwag należy ocenić, że przedstawiona dysertacja posiada przejrzystą strukturę, co pozwala na jej merytoryczną i formalną ocenę.

Obszar badawczy prezentowany w tej wielowątkowej rozprawie jest spójny i dostosowany do osiągnięcia obu celów pracy jednoznacznie zdefiniowanych w tytule rozprawy. Część referatowa pracy zwana „Przeglądem literatury” stanowi zbiór krótkich esejów omawiających aktualny stan wiedzy i stanowiących wprowadzenie do najważniejszych wątków badań własnych. Sposób prezentacji i wybór najbardziej reprezentatywnych prac jest w większości przypadków precyzyjny i właściwy. W zestawie informacji zamieszczonych w pracy traktującej o splicingu brakuje mi jednak chociaż kilku słów poświęconych zastosowaniu proteaz w syntezie wiązań peptydowych. A przecież finalną część procesu splicingu stanowi tworzenie nowego wiązania peptydowego katalizowane proteazą. Brakuje mi tego odniesienia zarówno w Przeglądzie literatury jak i w dyskusji badań własnych skupionej na sformułowaniu tezy o mechanizmie splicingu. Brak takiego spojrzenia badań skutkuje niedocenieniem w dyskusji faktu, że proces syntezy wiązania peptydowego katalizowanej proteazami może mieć kinetyczną lub termodynamiczną siłę napędową. I jeszcze jedno, przyjmując za uzasadnione założenie o służebnej roli tematyki esejów zestawionych w części referatowej dysertacji względem treści badań własnych, brakuje mi sformalizowanej analizy termodynamiki procesu katalizowanego enzymami. Ten formalny uszczerbek części referatowej dysertacji nie wywarł jednak niekorzystnego wpływu na wysoki poziom badań własnych, bowiem został w znacznej mierze zrekomensowany profesjonalizmem i intuicją chemiczną Doktorantki. Niemniej jednak, mając na uwadze możliwie wszechstronne wykorzystanie inspirujących wyników badań własnych, warto rozważyć wpływ entropii na proces splicingu oraz konsekwencje zmian entropii i entalpii wynikających z utworzenia cząsteczki wody w hydrofobowej wnęce enzymu.

Dalsze części przeglądu literaturowego, a zwłaszcza podrozdziały 5 poświęcony koniugatom peptydowym i podrozdział 6 przedstawiający wybrane peptydy o aktywności

przeciwdrobnoustrojowej, zmierzające do nakreślenia drogi poszukiwania nowego podejścia do problemu lekooporności, w mojej ocenie, stanowią bardzo wartościowy fragment recenzowanej dysertacji.

Część Eksperymentalna pracy zwana „Badaniami własnymi” rzetelnie i wyczerpująco opisuje zastosowane metodyki syntetyczne oraz metodyki pomiarów. W pełni zgadzam się z Doktorantką, że nie było potrzeby rozpisywania się przy raportowaniu rutynowych syntez peptydów wykonanych na fazie stałej. Wątpliwości natomiast budzi (przy szczegółowym opisie nietypowej syntezy jednostek peptomerowych; str. 108-109) niedostatecznie wyczerpujący opis procedur i charakterystyki tych produktów. Nie pozwala to na wyczerpującą weryfikację zastosowanej metodyki syntetycznej. Podobne wątpliwości nasuwa opis syntezy koniugatu katelicydyny z nystatyną połączonych niesymetrycznym mostkiem disiarczowym opisany na str. 115. Z formalnego punktu widzenia taka synteza może prowadzić do trzech różnych produktów. Nie udało mi się również odszukać informacji o kalibrowaniu roztworów SFTI-1 wykorzystywanych w wielu miejscach jako referencyjne w ilościowych oznaczeniach spektrofotometrycznych. Proszę o komentarz w tej sprawie. Na pochwałę natomiast zasługuje dokumentacja procesu tworzenia wiązań disulfidowych dokonana poprzez nałożenie chromatogramów mieszaniny reagującej w funkcji czasu (patrz rys. 50, str. 101; rys 57 str 120, rys 58 str. 121 i inne).

Część „Wyniki i dyskusja” rozpoczyna się od zestawienia kopii chromatogramów i widm MS potwierdzających poprawność syntez analogów SFTI-1. Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu wyników inkubacji wymienionych analogów z katalityczną i następnie równomolową ilością trypsyny i/lub chymotrypsyny. Jak formułuje to Doktorantka, jego celem jest weryfikacja tezy, że do zajścia splicingu potrzebna jest energia hydrolizy wiązania peptydowego. Badania polegały na śledzeniu zmian składu mieszaniny analogów fragmentów N- i C-końcowego SFTI-1 połączonych wiązaniem disulfidowym w obecności katalitycznej i równomolowej ilości trypsyny i/lub chymotrypsyny. Badania wykazały, że w obecności katalitycznej ilości enzymu, splicing prowadzący do otrzymania monocyklicznego SFTI-1 obserwowany był tylko w przypadkach analogów **5** i **6** i w obu przypadkach był poprzedzony hydrolizą wiązania Lys~Ser. Oznaczenie aktywności inhibitorowej dokonano z wykorzystaniem mieszaniny produktów, stwierdzając we wszystkich przypadkach narastanie jej w czasie. Dla wyjaśnienia podjęto umotywowaną rozważaniami mechanistycznymi decyzję o wykonaniu badań krystalograficznych kompleksów analogów **1**, **2**, **5** KK[BiSFTI-1] i analogu **8** z trypsyną. Studia krystalograficzne wykonane w pracowni dr Grzegorza Dubina wykazały, że we wszystkich przypadkach fragment peptydowy zaangażowany w tworzenie krystalicznego kompleksu z enzymem jest identyczny i posiada budowę SFTI-1. Eksperymenty dowiodły, że w obecności trypsyny nastąpiła cyklizacja i utworzone zostało wiązanie Lys-Ser, nawet w przypadku analogu **1**, w którym nie mogła być ona poprzedzona hydrolizą innego wiązania peptydowego. Na wysoką ocenę zasługuje dogłębna analiza tej obserwacji i dobrze uzasadniony scenariusz dalszych badań obejmujący ponowne przebadanie zmian składu równomolowych mieszanin trypsyny z bisulfidowymi analogami jej inhibitorów oraz analizę mechanizmu reakcji z użyciem wody znaczonej izotopem tlenu O^{18} . Precyzja w interpretacji kolejnych wyników i żelazna konsekwencja w projektowaniu harmonogramu celu i zakresu kolejnej fazy badań zasługują na szczególne uznanie. Przedstawiona na str. 157 dyskusja mechanizmu jest poprawna a siłą argumentacji przemawiającej za mechanizmem bezpośredniej transpeptydacji wspiera (wspomniany przeze mnie powyżej w recenzji) wzrost entropii układu w wyniku wydzielenia cząsteczki wody w trakcie utworzenia acyloenzymu. Jedyne niedosyt związany z interpretacją wyników zebranych w tym fragmencie dysertacji wynika z niedopowiedzenia co do sekwencji przemian analogów **7** i **8** przedstawionych na chromatogramach na rys 70, str. 153. Jeżeli monocykliczny SFTI-1 był stabilny przy 24 godzinnym traktowaniu trypsyną to jego obecność w przypadku analogów **7** i **8** wskazuje albo

na konkurencyjne ścieżki hydrolizy albo na jeszcze nie osiągnięty stan równowagi. Bardzo proszę o komentarz w tej sprawie. Czy są jakieś dane pozwalające na rozstrzygnięcie tej kwestii?

Bardzo interesujące było podejście do wyjaśnienia mechanizmu splicingu z użyciem substratów peptomerowych. W tym celu zsyntezowany został analog SFTI-1 zawierający podwojoną sekwencję tego inhibitora, w którym reszta Lys w pozycjach P1 obu miejsc reaktywnych została podstawiona resztą peptoidową – Nlys natomiast reszta argininy posiadała konfigurację D. Eksperymenty wykazały, że peptomery z resztą Nlys ulegają hydrolizie i co więcej, wiązanie peptydowe z ich udziałem może być utworzone.

Ostatni fragment rozprawy koncentrował się na wykorzystaniu doświadczenia zdobytego w syntezie mostków disulfidowych do otrzymywania koniugatów peptydów z nystatyną i koniugatów peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej połączonych wiązaniem izopeptydowym lub disulfidowym. Ta część rozprawy to podziwu godny pokaz kunsztu preparatorskiego Doktorantki, która z sukcesem poradziła sobie z wyizolowaniem w stanie czystym i udokumentowaniem struktury wielu złożonych substratów peptydowych jak i z ich późniejszą koniugacją.

Dysertacja opatrzona jest obszernym zbiorem odnośników literaturowych, jednolicie i poprawnie sformatowanych, opatrzonych we wszystkich przypadkach tytułami cytowanych prac i w poprawny sposób dobranych dla zwięzłego zaprezentowania aktualnego stanu badań opisanego w literaturze jak i do uzupełnienia opisu stosowanych metodyk badawczych o wyjaśnienia szczegółowe.

Formalna ocena pracy jest również bardzo pozytywna. Tekst rozprawy jest starannie zredagowany. Używane sformułowania, nawet w bardzo specjalistycznych fragmentach pracy, są precyzyjne i jednoznaczne. Liczne rysunki i schematy są estetyczne i czytelne. Pewnym mankamentem manuskryptu jest nieco zbyt mały rozmiar prezentowanych chromatogramów i spektrogramów. Rozumiem jednak intencje Autorki zmierzającą do zwięzłego zestawienia możliwie wszystkich danych w i tak obszernym tekście, co jednak musiało prowadzić do pogorszenia komfortu lektury pracy. Niedociągnięcia edytorskie, „literówki” i zapewne efekty nadgorliwości komputerowego edytora tekstu są na tyle nieliczne w rozprawie, że nie ma sensu ich tu wymieniać. Z obowiązków recenzenta zmuszony jestem jednak do przedstawienia moich dwóch wątpliwości:

1) tłumaczenie terminu angielskiego „burst substrate” jak „substrat wybuchowy” jest nie tyle niezręczne ile wprowadzające w błąd (zwłaszcza w przypadku nitrozwiązku). Przyznaję, że mimo wysiłków nie umiem zaproponować lepszego terminu niż „impulsywny substrat”.

2) kłopoty jakie sprawia w języku polskim odmiana nazwisk kobiet próbowano obejść w rozprawie poprzez deklinację nazwiska urodzonej w Grajewie Yehudith Gershtanski (później Birk) jako Birki co w końcowym efekcie doprowadziło do utworzenia nazwy inhibitorów Bowmana-Birki. Lepsze to niż Bosmana-Birka, ale w moim przekonaniu to niepoprawne, bowiem taką formę można utworzyć tylko od nazwiska Birka (kogo czego? Birki) a nie od nazwiska Birk, które jest nieodmienne. A więc inhibitory Bowmana-Birk a nie Bowmana-Birki.

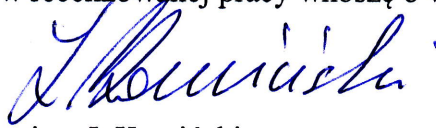
Można podsumować, że redakcja tekstu rozprawy znajduje się znacznie powyżej poziomu wymagań standardowych a przytoczone powyżej uwagi mają charakter dyskusyjny, nie podważają jej warstwy merytorycznej i w żadnej mierze nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę pracy.

Wysoko oceniam trafność wyboru tematu badań. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych pytań dotyczących interakcji peptydów z enzymami i dostarcza obszernego zbioru danych pozwalających na pogłębione zrozumienie splicingu peptydowego. O wysokiej wartości wyników świadczy

również znaczny dorobek naukowy. Na szczególne uznanie zasługuje zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych oraz trudny, interdyscyplinarny charakter wykonanych prac niezbędnych dla zrealizowania tak wielu zadań badawczych. Ich realizacja wymagała efektywnej współpracy z wyspecjalizowanymi ośrodkami naukowymi w Polsce. Obszar, zakres i podział ról we współpracy został jednoznacznie określony w dysertacji. We wszystkich przypadkach wnioskowanie jest dobrze poparte materiałem eksperymentalnym i odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Analiza wyników eksperymentów jest krytyczna co wzbudza zaufanie do wyciąganych wniosków.

Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Z pełnym przekonaniem uznaję, że dysertacja przedstawiona do oceny spełnia wymagania określone w ustawie o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Natalii Ptaszyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz biorąc pod uwagę wartość wyników badań zawartych w recenzowanej pracy wnoszę o wyróżnienie dysertacji.



Zbigniew J. Kamiński

Łódź 22.12.2016