



Warszawa, dnia 10 listopada 2016 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik
misicka@chem.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Marii Ptaszyńskiej

pt.: „Międzycząsteczkowe mostki disulfidowe: zastosowanie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego katalizowanego przez proteiny i w syntezie koniugatów peptydowych”

Inhibitory enzymów z racji potencjalnego zastosowania w medycynie i rolnictwie stanowią od wielu lat centrum zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Szczególnie ciekawe w tym zakresie są badania dotyczące inhibitorów roślinnych Bowmana-Birki, w tym najmniejszego z naturalnie występujących peptydowych inhibitorów proteinaz serynowych, inhibitora SFTI-1 (sunflower trypsin inhibitor), wyizolowanego z nasion słonecznika.

Do światowego kręgu badaczy prowadzących badania w tej tematyce należy zaliczyć naukowców z Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w tym promotora recenzowanej pracy prof. UG dr hab. Annę Łęgowską. Niezwykle interesujące wyniki jej badań dotyczących procesu splicingu peptydowego, któremu ulegają analogi cyklicznego inhibitora trypsyny SFTI-1 zawierające podwojone sekwencje tego inhibitora stały się punktem wyjścia do badań zaprojektowanych w ramach recenzowanej pracy doktorskiej mgr Natalii Ptaszyńskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma układ klasyczny dla prac eksperymentalnych, składa się z przeglądu literatury (73 strony), celu pracy (5 stron), opisu badań własnych (39 stron), dyskusji wyników (51 stron), podsumowania (2 strony) oraz spisu literatury cytowanej (261 pozycji). Oprócz powyższych rozdziałów praca zawiera spis skrótów, symboli i oznaczeń, spis zamieszczonych w pracy rysunków (86), tabel (19) i spis dorobku naukowego doktorantki.

Poszczególne cele badań doktorantki polegały na:

1. Poznaniu mechanizmu splicingu peptydowego, któremu ulegają analogi inhibitora trypsyny SFTI-1 w wyniku ich inkubacji z proteinazami serynowymi
2. Sprawdzeniu czy proces splicingu może zachodzić również w przypadku peptomerów
3. Syntezie koniugatów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Zaplanowane badania wymagały dokonania starannego przeglądu literatury. Doktorantka swoje studia literaturowe podzieliła na kilka podrozdziałów. W pierwszym z nich omówiła proces splicingu pod kątem tworzenia nowych białczątek. Szczególną uwagę poświęciła na przedstawienie mechanizmu splicingu białkowego w segmentach białkowych (inteinach). Niezależny podrozdział poświęciła zagadnieniom splicingu peptydowego zachodzącego w proteasomie (splicing bezpośredniej transpeptydacji, odwrócony splicing peptydowy).

W następnym rozdziale wstępu doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z proteazami, w szczególności proteazami serynowymi omawiając budowę centrum aktywnego, mechanizm działania, peptydowe inhibitory proteaz, mechanizm ich działania, inhibitory Bowmana-Birki, inhibitor SFTI-1, jego biosyntezę i splicing peptydowy zachodzący w jego analogach.

Ponieważ zaplanowane w pracy analogi inhibitorów SFTI-1 miały zawierać mostek disulfidowy, więc osobny rozdział wstępu doktorantka poświęciła metodom tworzenia mostków disulfidowych w białkach i peptydach, zarówno mostków wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych. Ostatnie rozdziały wstępu literaturowego dotyczą zagadnień biokoniugacji pod kątem zastosowań medycznych, peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i zastosowań krystalografii rentgenowskiej w badaniach peptydów i białek.

Przegląd literaturowy przedstawiony w pracy jest obszerny, dobrze napisany i przygotowuje do rozdziału, w którym doktorantka omawia wyniki badań własnych.

Pierwszym celem pracy doktorskiej mgr Ptaszyńskiej było poznanie mechanizmu splicingu peptydowego, któremu ulegają analogi inhibitora trypsyny SFTI-1. Pierwszym etapem badań w tym zakresie była synteza potrzebnych peptydów: było to 8 peptydów liniowych zawierających od 5 do 15 reszt aminokwasowych, w tym cysteinę. Peptydy te były następnie łączone (w różnych kombinacjach) mostkiem disulfidowym w celu otrzymania peptydów do badań mechanizmu splicingu, zawierających od 10 do 30 reszt aminokwasowych i mostek disulfidowy. Na tym etapie doktorantka przeprowadziła badania dotyczące optymalizacji tworzenia międzycząsteczkowego wiązania disulfidowego, które wskazały że w tym przypadku, metoda z użyciem ditiopirydyny (DTP) jest najkorzystniejsza bo prowadzi do otrzymania produktów z większą wydajnością. Zaplanowane peptydy były otrzymane na nośniku polimerycznym (Tenta-Gel, żywica chloro-2'-chloro)trytylowa) przy użyciu strategii Fmoc, i zanalizowane metodą HPLC-MS. Otrzymane analogi SFTI-1, zbudowane z N- i C-końcowych fragmentów tego inhibitora połączonych wiązaniem disulfidowym zostały poddane działaniu katalitycznej ilości bydlęcej β -trypsyny lub α -chymotrypsyny. Analiza produktów reakcji monitorowanych w czasie metodą spektrometrii mas (MS) pozwoliła wysnuć wniosek, że mechanizm splicingu peptydowego zachodzący w syntezowanych analogach SFTI-1 pod wpływem katalitycznej ilości trypsyny przebiega wg. mechanizmu bezpośredniej transpeptydacji.

Dodatkowo w ramach współpracy z dr. Grzegorzem Dubinem z Zakładu Mikrobiologii, Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego udało się przeprowadzić badania rentgenostrukturalne kryształów kompleksów otrzymanych peptydów z enzymami, które jednoznacznie wskazały na zachodzenie splicingu, a uzyskana struktura krystaliczna monocyklicznego analogu SFTI-1 została zdeponowana w bazie PDB. Doktorantka przeprowadziła również badania strukturalne analogu 1 inhibitora SFTI-1 metodami magnetycznego rezonansu jądrowego. Badania te wskazały na brak struktury drugorzędowej tego analogu, co z kolei sugeruje, że peptyd ten przyjmuje konformację specyficzną dla inhibitora SFTI-1 w wyniku oddziaływania z enzymem.

Wyniki tych tak nowatorskich i wszechstronnych badań zostały już opublikowane w dwóch pracach: w *FEBS J* w 2013 r. i *Chembiochem* w 2015 r., zostały również wykorzystane w następnych badaniach dotyczących zastosowania w wycinaniu bioaktywnego peptydu z cyklicznego prekursora, które zostały opublikowane niedawno w *Biopolymers*, w 2016 r.

Następnym celem doktorantki było zbadanie czy proces splicingu może zachodzić w analogach zawierających nie tylko reszty aminokwasowe, ale również monomery peptoidowe (N-podstawione reszty glicyny, otrzymane metodą submonomeryczną). Analog SFTI-1 o podwojonej sekwencji i zawierający w miejscu reszt Lys w pozycjach P₁ w obu miejscach reaktywnych resztę peptoidową NLys został poddany inkubacji z odpowiednim enzymem i wyniki badań z użyciem spektrometrii mas wskazały, że proces splicingu również i w tym przypadku zachodzi. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Biopolymers*, w 2015 r.

Trzecim celem badań doktorantki było przeprowadzenie syntez koniugatów peptydowych. Syntezy biokoniugatów wybranych fragmentów katelicydyn z nystatyną okazały się niezwykle mało wydajne i nie pozwoliły na otrzymanie wystarczającej ilości materiału potrzebnego na badania mikrobiologiczne. Drugi typ zaprojektowanych koniugatów peptydowych był połączeniem fragmentu ludzkiej laktoferyny i peptydu neutrofilnego, gdzie oba fragmenty składowe wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Połączenie to zakłada, że uzyskane związki będą posiadały lepszy profil farmakologiczny (większą aktywność i/lub inną selektywność). Badania tego typu są niezwykle istotne z uwagi na poszerzający się problem lekooporności i obecnie wiele ośrodków prowadzi badania poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych. Otrzymane koniugaty peptydowe zostały wysłane już na badania biologiczne do współpracującego zespołu z Chińskiego Uniwersytetu w Hongkongu.

W sześciu z siedmiu otrzymanych koniugatach fragmenty składowe zostały połączone wiązaniem izopeptydowym poprzez grupę aminową w łańcuchu bocznym Lys (co wykracza poza sformułowany tytuł pracy doktorskiej dotyczący międzycząsteczkowych mostków disulfidowych), a w jednym wiązaniem disulfidowym. Niestety w podanym przez doktorantkę opisie poszczególnych sekwencji analogów

zabrakło mi wyjaśnienia przyczyn zastosowanych modyfikacji w poszczególnych fragmentach. Np. dlaczego zostawiona została grupa Acn na Cys? Czy ze względu na planowane w przyszłości nowe analogi?

Syntezy tak długich peptydów (ok. 30-35 reszt aminokwasowych) okazały się prawdziwym wyzwaniem syntetycznym, z którym doktorantka sobie bardzo dobrze poradziła. Pokazane chromatogramy surowych produktów są skomplikowane i należy docenić umiejętności doktorantki w wyizolowaniu właściwego produktu. Sama doktorantka nie doceniła swoich w tym punkcie osiągnięć podsumowując ten fragment badań stwierdzeniem: „Synteza chimer peptydowych, w których peptydy je budujące zostały połączone wiązaniem izopeptydowym, przebiegła bez większych problemów z zadawalającą wydajnością”. Jednak dobrze byłoby przy podawaniu wydajności otrzymanych związków (jak np. w tabeli na str. 178) opisać co oznacza wydajność syntezy podana w ostatniej kolumnie.

Podsumowując uważam, że przedstawiona praca doktorska mgr Natalii Ptaszyńskiej jest bardzo dobrze zaplanowana i starannie wykonana. Zrealizowany przez doktorantkę program badawczy odpowiada wszelkim światowym standardom w zakresie stosowanych technik eksperymentalnych. Mgr Natalia Ptaszyńska w ramach swojej pracy doktorskiej przeprowadziła z sukcesem syntezy zaplanowanych peptydów: były to peptydy i peptomery o różnej długości od kilku do ponad 30 reszt aminokwasowych, w tym peptydy i peptomery zawierające mostek disulfidowy. Otrzymane związki pozwoliły doktorantce na zbadanie mechanizmu splicingu peptydowego, co wymagało od niej umiejętności prowadzenia badań enzymatycznych i wyciągania wniosków z otrzymanych wyników. Opanowanie wszystkich tych umiejętności świadczy o dużych zdolnościach i wiedzy mgr Natalii Ptaszyńskiej i klasyfikuje doktorantkę jako osobę dobrze przygotowaną do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Pracę doktorską mgr Natalii Ptaszyńskiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Ale z obowiązku recenzenta poniżej przedstawię kilka uwag:

1. Jednym z głównych moich zastrzeżeń jest zastosowany przez doktorantkę opis przeprowadzonych badań i opis wyników. Wydaje mi się, że stosowany w większości prac doktorskich podział na opis badań i dyskusji wyników, przy wydzielonej części doświadczalnej opisującej zastosowane procedury, umieszczonej po rozdziale omawiającym ogólnie przeprowadzone badania i ich wyniki byłby zdecydowanie lepszy. W załączonej pracy dokumentacja HPLC-MS jest wpleciona w dyskusję wyników. Np. na str 134-136 duże chromatogramy i widma masowe, umieszczone w tym miejscu zdecydowanie utrudniają śledzenie dyskusji otrzymanych wyników. Taka dokumentacja powinna być zamieszczona na końcu pracy w suplemencie, który powinien obejmować dokumentację analityczną wszystkich otrzymanych związków. Umieszczenie chromatogramów i tabeli z masami molowymi obok siebie spowodowało, że dostrzegłam niezgodności, np. na str 133 masy molowe

związków zamieszczone w tabeli nie zgadzają się z wartościami *m/z* zamieszczonymi na następnej stronie (peptydy 3-7). Masy molowe są zapewne o 1u mniejsze.

2. Mam również zastrzeżenia do wyglądu tabel, wiele z nich jest dla czytelnika nieczytelna, niewyraźna czcionka wskazuje na kopiowanie z innych dokumentów i na pośpiech przy końcowej korekcie graficznej pracy. To samo dotyczy wyglądu wzorów – zastosowana czcionka jest albo niepotrzebnie wytłuszczona (np. str. 36), co sugeruje nie wiem czym uzasadnioną ważność, albo na skutek przekopiowywania z innych dokumentów jest niewyraźna (np. str. 17)
3. Mam również zastrzeżenia do przygotowanego przez doktorantkę spisu skrótów, w którym znalazł się np. MeOH (skrót znany nawet uczniom), ale nie znalazło się wiele skrótów używanych w tej pracy (str. 130, np. bufor HRPES, myślę również, że pewnie nazwa tego buforu powinna być HEPES)

Powyżej wymienione drobne błędy redakcyjne nie wpływają oczywiście na wartość naukową rozprawy i na moją bardzo pozytywną opinię o tej pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Natalii Marii Ptaszyńskiej pt.: „*Międzycząsteczkowe mostki disulfidowe: zastosowanie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego katalizowanego przez proteiny i w syntezie koniugatów peptydowych*” spełnia znakomicie wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym (Dz.U.Nr 65, poz.595) i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Natalii Marii Ptaszyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo dużą wartość merytoryczną badań wykonanych przez doktorantkę, nowatorski charakter pracy, a także fakt, że wyniki pracy doktorskiej mgr Natalii Ptaszyńskiej zostały opublikowane w 8 pracach, zamieszczonych w doskonałych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a w 3 pracach doktorantka jest pierwszą autorką, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej. Opublikowanie tak dużej ilości prac z zakresu badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej świadczy o dużym zaangażowaniu mgr Natalii Ptaszyńskiej w prowadzone badania i jej wszechstronnym przygotowaniu do prowadzenia tak różnorodnych i nowatorskich badań w dziedzinie inhibitorów enzymów.



Poniżej lista prac, w których mgr Ptaszyńska jest pierwszym autorem i współczynniki oddziaływania:

Karna N., Dębowski D., Gitlin A., Łęgowska A., Rolka K., *FEBS J.*, 280, 6213-6222 (2013), **IF=3,5**

Karna N., Dębowski D., Łęgowska A., Bachor R., Szewczuk Z., Rolka K., *Biopolymers*, 104, 206-212 (2015), **IF=2,2**

Karna N., Łęgowska A., Malicki S., Dębowski D., Golik P., Gitlin A., Grudnik P., Władysław B., Brzozowski K., Dubin G., Rolka K., *Chembiochem*, 16, 2036-2045 (2015), **IF=3.0**