



Politechnika Wroclawska

prof. dr hab. Marcin Drag

Wroclaw, 13 czerwca 2020

Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

Politechnika Wroclawska

Wyb. Wyspiańskiego 27

50-370 Wroclaw

tel. 071 320 4526

e-mail: marcin.drag@pwr.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Giżyńskiej
z Katedry Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego**

**pt. „Wykorzystanie C-końcowej sekwencji białka BIm10 do otrzymania
efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S”**

Modulacja aktywności enzymów proteolitycznych jest od lat przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych, a także firm farmaceutycznych ze względu na potencjalne duże znaczenie proteaz jako celi medycznych. Najczęściej poszukuje się związków selektywnie hamujących działanie danej proteazy celem uzyskania pożądanego efektu terapeutycznego. Niemniej, w ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się także poszukiwaniom aktywatorów proteaz, a klasycznym tego przykładem jest bardzo duży kompleks katalityczny – proteasom. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Małgorzaty Giżyńskiej dotyczy właśnie tego zagadnienia, a została wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG., która posiada bardzo duże doświadczenie w prowadzeniu tego typu badań.

Opublikowany dorobek naukowy Doktorantki stanowią trzy prace w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*PLoS ONE* (2015), *Scientific Reports* (2017) oraz *Journal of Medicinal Chemistry* (2019)). Na szczególną uwagę zasługuje praca w *J. Med. Chem* (IF-6.25), w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 153 strony i ma klasyczny układ. W pierwszej części Doktorantka przedstawia założenia i cele pracy. Są one jasno zdefiniowane i poparte poprawnie postawioną hipotezą badawczą. Kolejna część pracy to wstęp teoretyczny, którego forma i treść zasługuje na wyróżnienie. Mgr Giżyńska przedstawia w niej budowę i funkcje proteasomu, związki powodujące jego modulację w aspekcie aktywności, a także choroby będące skutkiem jego dysregulacji, zwłaszcza choroby neurodegeneracyjne wobec których dedykowane są badania Doktorantki. Bardzo ciekawa jest dyskusja w zakresie wad i zalet związków o charakterze peptydowym wobec innych używanych związków małowcząsteczkowych jako modulatorów aktywacji proteasomu. Cały wstęp jest napisany na bardzo wysokim poziomie merytorycznym i bardzo dobrze się go czyta, a załączone rysunki dodatkowo doskonale obrazują treść pracy. Widać, iż Doktorantka doskonale porusza się w tej tematyce i posiada bardzo rozległą i dobrze ugruntowaną wiedzę. Z pewnością wstęp teoretyczny sam w sobie jest bardzo dobrym materiałem do napisania pracy przeglądowej, jako iż stanowi także kompletne kompendium wiedzy mającej być wyjściem do udowodnienia postawionej w pracy hipotezy badawczej. Cytowana literatura została dobrze dobrana, a dużą jej część stanowią oryginalne prace źródłowe. Całkowita liczba cytowań literaturowych w pracy jest imponująca i wynosi 196.

W kolejnym rozdziale dotyczącym badań własnych, Doktorantka w sposób rzeczowy przedstawia swoje osiągnięcia w zakresie badań na modulatorami aktywności proteasomu. Analiza tej części pracy wskazuje, iż ma ona charakter interdyscyplinarny z zakresu chemii peptydów i chemii medycznej, biochemii, modelowania molekularnego, a także badań komórkowych. Doktorantka opanowała duży wachlarz metod eksperymentalnych i technik. Wszystkie eksperymenty w pracy zostały przedstawione rzeczowo i dokładnie. Co warto podkreślić, to logika planowania kolejnych eksperymentów. W przypadku niepowodzenia, Doktorantka proponuje i wdraża kolejne rozwiązania eksperymentalne, które prowadzą do udoskonalania otrzymywanych struktur. Przeprowadzone analizy wyników eksperymentalnych także są na bardzo wysokim poziomie merytorycznym. Nadrzędnym celem pracy była modyfikacja znanego już wcześniej stymulatora aktywności ludzkiego proteasomu 20S – peptydu Blm-pep. Doktorantka otrzymała kilkadziesiąt modyfikacji tego peptydu, co w efekcie końcowym pozwoliło na uzyskanie sekwencji, która stymulowała aktywność proteasomu w modelach komórkowych AD, PD, HD oraz ALS. Moja uwaga i pytanie dotyczy zdania ze strony 52 – „...Poczynione przez nas w trakcie prowadzenia badań obserwacje wskazują, iż aktywność proteolityczna

proteasomu może się zmienić wraz z partią krwi, z której był izolowany...”. Czy Doktorantka rozważała miareczkowanie centrum aktywnego przy użyciu inhibitorów kowalencyjnych by dokładnie określić ilość aktywnego enzymu w całkowitej ilości izolowanego białka. W przypadku dużych różnic w aktywności proteasomu, jego część mogła być w postaci nieaktywnej lub zdenaturowanej czy niepoprawnie sfoldowanej. Mogło to wpłynąć na otrzymywane wyniki, gdyż pomimo że teoretycznie mamy do czynienia z nieaktywną częścią proteasomu, to jednak w badaniach w których analizuje się oddziaływania cząsteczka – białko może dojść także do interakcji części nieaktywnej takiego białka z badanym związkiem, co finalnie wpływa na otrzymywane wartości danych eksperymentalnych. Tutaj prosiłbym Doktorantkę o szerszy komentarz. Kolejne moje pytanie dotyczy kryterium wyboru nienaturalnych aminokwasów wprowadzanych do sekwencji peptydowych. Jakie były kryteria ich wyboru? Wydawało by się zasadnym otrzymanie małej biblioteki peptydów z różnymi nienaturalnymi aminokwasami, co pozwoliłoby zapewne na bardziej dokładne zmapowanie interesujących fragmentów sekwencji.

W rozdziale V (Metodyka badań) poświęconym procedurom eksperymentalnym, Doktorantka w sposób szczegółowy przedstawia opisy wszystkich wykonanych eksperymentów. Zdecydowanie są one wystarczające do powtórzenia przez niezależnych badaczy w oparciu o zamieszczone informacje. Ten rozdział także został starannie przygotowany, choć tutaj można znaleźć pewne nieścisłości. Na przykład na stronie 99 w podrozdziale 3.5. poświęconym przyłączaniu znacznika Fitc, w opisie eksperymentalnym można znaleźć procedurę nie dotyczącą Fitc a Mca. Jest to zapewne tak zwana „kalka” z kolejnego rozdziału, właśnie poświęconemu przyłączaniu Mca. Z kolei, w przypadku eksperymentów z ludzką krwią brak jest informacji skąd ta krew pochodziła i czy otrzymano odpowiednie zgody na pracę z takim materiałem biologicznym. W aspekcie obecnie obowiązujących procedur taka informacja wydaje się niezbędna do zamieszczenia w opisie eksperymentalnym.

Kolejne dwa rozdziały w pracy to podsumowanie wyników otrzymanych przez Doktorantkę w wyniku prowadzonych badań, napisane w języku polskim i angielskim. Tutaj Doktorantka w sposób dojrzały opisuje krok po kroku eksperymenty, które doprowadziły do udowodnienia hipotezy badawczej. Analiza tego rozdziału pozwala stwierdzić, iż w wyniku realizacji zadań badawczych mgr Giżyńska otrzymała wiele wyników mających zdecydowanie charakter nowości naukowej o wysokiej dla dyscypliny i na bardzo dobrym poziomie merytorycznym. Podkreślić należy, iż otrzymane wyniki otwierają nowe kierunki badawcze i są doskonałym wstępem do prowadzenia jeszcze bardziej zaawansowanych badań mających na celu znalezienie optymalnych modulatorów proteasomu, co może przełożyć się na znalezienie kandydatów do badań klinicznych.

Przedstawiona do oceny przez mgr Giżyńską praca doktorska jest napisany w sposób jasny i przejrzysty. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych (praca zawiera sporo literówek), niemniej nie mają one negatywnego wpływu na wysoką wartość merytoryczną wyników.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Małgorzaty Giżyńskiej z Katedry Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod tytułem „Wykorzystanie C-końcowej sekwencji białka Blm10 do otrzymania efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S” ma zdecydowanie oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają cechy nowości naukowej. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, bardzo dobry dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Wnoszę więc o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego mgr Małgorzaty Giżyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku
prof. dr hab. Marcin Drąg

