



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego

Prof. dr hab. Justyna Brasuń

Wrocław, 15.06.2020

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Giżyńskiej

pt.: "***Wykorzystanie C-końcowej sekwencji białka Blm10 do otrzymania efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S***".

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Giżyńskiej, zatytułowana "Wykorzystanie C-końcowej sekwencji białka Blm10 do otrzymania efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S", której promotorem jest dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG, została wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jest to opracowanie liczące w sumie 153 strony.

Założeniem niniejszej dysertacji było zaprojektowanie, synteza oraz zbadanie w sumie 58 peptydów, będących analogami C-końcowej sekwencji białka Blm10 w aspekcie ich zdolności do modulowania aktywności ludzkiego proteasomu 20S. Ponadto zostały przedstawione także wyniki badań komórkowych oraz została podjęta próba wyznaczenia miejsca wiązania otrzymanych związków w strukturze proteasomu.

Rozprawa ta posiada klasyczny układ, charakterystyczny dla prac eksperymentalnych i składa się z sześciu głównych rozdziałów. W pierwszym z nich zwięźle zostały przedstawione założenia i cel pracy. Następnie, we Wstępie literaturowym, Doktorantka przedstawiła tematykę związaną funkcją proteasomu. Szczegółowo opisuje jego budowę, funkcję oraz regulację jego aktywności. W związku z tym, że celem pracy jest poszukiwanie skutecznych stymulatorów proteasomu w aspekcie możliwości wykorzystania ich do regulacji homeostazy białkowej, zostały

opisane także zagadnienia związane z zaburzeniem jego działania, jako jedna ze strategii hamowania *m.in.* rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Doktorantka opisała także możliwości stosowania peptydów w terapii.

Obszerność i aktualność prezentowanej tematyki wymagała od Doktorantki wnikliwego przeanalizowania dostępnej literatury. W swojej pracy zacytowała 196 pozycji literaturowych, co pozwoliło na dobre wprowadzenie czytelnika do tematu badań własnych. W części tej jednak, Doktorantka nie uniknęła uproszczeń językowych czy sformułowań żargonowych, których kilka z racji obowiązku Recenzenta wymienię. Na stronie 10 jest napisane „*Proteasom wydaje się być atrakcyjnym celem w projektowaniu potencjalnych środków terapeutycznych na*”. Wydaje mi się, iż poprawniej byłoby napisać „... środków terapeutycznych do stosowania w leczeniu ...”. Na tej samej stronie Doktorantka pisze: „*Obecnie najbardziej eksploatowana jest koncepcja wykorzystania inhibitorów w terapii przeciwnowotworowej.*”, a może lepiej napisać „... obecnie uwaga badaczy skupiona jest na możliwości wykorzystania ...”. Strona 10 „*Zaobserwowano przy tym, że część z nich była*”, a powinno być „... część ...”. Ponownie str. 10 i 11 „*Nasz zespół od kilku lat prowadził badania dotyczące 11 allosterycznych modulatorów aktywności proteasomu, co doprowadziło do otrzymania 14-resztowego peptydu Blm-pep, który kilkakrotnie stymulował wszystkie peptydazy proteasomu h20S.*” a zdaniem recenzenta powinno być „zespół od kilku lat prowadzi badania” lub „... kilka lat prowadził badania ...”. Strona 11, ten sam akapit „*kilkakrotnie stymulował*” – co Autorka miała na myśli? Przy edycji tekstu warto także pamiętać o tym, że na końcu wersu nie zostawiamy typograficznych „sierotek”. Str. 34 zamiast „*hyperfosforylacja*” lepiej byłoby napisać „hiperfosforylacja”. Na Rysunku 3, 13 opisy powinny być w języku polskim a nie angielskim. Strona 40 „*Wśród tych pierwszych można wyróżnić jeszcze kolejną podgrupę związków, które zachowują się jak detergenty*”- co to znaczy? Strona 44 – jest „*formowania*” a poprawniej byłoby użyć słowa tworzenie czy powstawanie.

Oczywiście uwagi te absolutnie nie wpływają na merytoryczną jakość tej części rozprawy. Rysunki, schematy i tabele są bardzo przejrzyste, co zdecydowanie ułatwia zapoznanie się z opisywanymi zagadnieniami. Cała praca została przygotowana z dużą starannością. Stanowi ona spójną i logiczną całość pokazującą świadomość naukową Doktorantki.

Celem przedstawionych badań było zbadanie serii specjalnie zaprojektowanych i zsyntezowanych analogów C-końcowej sekwencji białka Blm10 w aspekcie ich zdolności do modulowania aktywności ludzkiego proteasomu 20S. Ponadto zostały zaprezentowane wyniki badań komórkowych oraz wyznaczania miejsca wiązania otrzymanych związków w strukturze h20S. W związku z tym Doktorantka zastosowała metody badawcze, które pozwoliły na zrealizowanie założonego celu. Większość związków została zsyntezowana i oczyszczona przez Doktorantkę, tylko kilka z nich było otrzymanych w ramach realizacji pracy dyplomowej lub magisterskiej. Dla wybranych związków zostały przeprowadzone testy aktywności, które Doktorantka przeprowadziła we współpracy z zespołem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna z Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego natomiast badania mające na celu zidentyfikowanie miejsca wiązania aktywatorów w strukturze h20S za pomocą sieciowania foto/chemicznego zostały przeprowadzone dzięki współpracy z dr Julią Witkowską. Ze względu na obszerność części metodologicznej, została ona umieszczona po rozdziałach „Badania własne” i „Podsumowanie”. Dzięki temu, wprowadzenie literaturowe, analiza wyników oraz podsumowanie stanowią jeden ciąg logiczny.

W rozdziale „Badania własne” Autorka zaprezentowała otrzymane wyniki oraz przedstawiła ich interpretację. Badania zostały przeprowadzone dla 58 analogów peptydu Blm-pep o sekwencji KYF-TGSK-LWRSYYA, które doktorantka podzieliła na cztery główne grupy.

W pierwszej z nich znalazło się 14 peptydów (1-14) różniącymi się długością łańcucha peptydowego, obecnością wolnej lub zablokowanej N-końcowej grupy aminowej a w trzech z nich, (12-14), aromatyczne N-końcowe reszty Tyr lub/i Phe zostały podstawione cykloheksyloalaniną.

Analiza wyników otrzymanych dla tej grupy wykazała, iż skrócenie długości łańcucha peptydowego powoduje spadek aktywności chymotrypsyno-, kaspado- oraz trypsynopodobnej proteasomu h20S w porównaniu do peptydu macierzystego. Podobnie działa zablokowanie N-końcowej grupy aminowej. Skrócenie długości łącznika -TGSK- (lub jego brak) (peptydy 9-11) także wpływało na osłabienie aktywności. Interesującą obserwacją dała analiza wyników otrzymanych dla peptydów posiadających w N-końcowej sekwencji podstawione reszty aromatyczne (Phe lub/i Tyr) cykloheksyloalaniną. Wykazano mianowicie, iż najmniejsze działanie dezaktywujące wykazywał peptyd posiadający niepodstawioną resztę Tyr2.

W tym miejscu rodzi się pytanie: Czy znaczenie ma pozycja reszty aromatycznej, czy obecność grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym Tyr?

Druga grupa badanych peptydów, dzięki zastosowaniu modelowania molekularnego, została tak zaprojektowana, by optymalnie oddziaływać z proteasomem swoim C- lub N-końcowym fragmentem. To 20 związków, w sekwencjach których, wybrane reszty aminokwasowe zostały wymienione na reszty: Gln lub/i Asp lub/i Arg lub/i Ser lub/i Tyr lub/i Glu lub/i Pro. Modyfikacji został poddany C-końcowy fragment (peptydy 15-23), N-końcowy fragment (peptydy 24-31) lub oba fragmenty (peptydy 32-34).

Większość analogów wykazywała się lepszymi właściwościami stymulującymi względem aktywności ChT-L. Interesującym jest to, iż różnice w selektywności otrzymanych związków względem różnych aktywności proteasomu działanie związków polegające nie tylko na otwieraniu bramy prowadzącej do komory katalitycznej proteasomu, ale także to, że ich związanie do enzymu może również bezpośrednio wpływać na miejsca aktywne. Interesującym jest to, że peptyd 21, który nie stymulował żadnej z peptydaz proteasomu, charakteryzował się największą stabilnością proteolityczną.

Wybranych 10 peptydów omawianej grupy zostało przebadanych w kierunku ich zdolności do stymulowania degradacji natywnych białek: α -synukleiny, białko Tau oraz enolazę 2. Związki te stymulowały degradację białek dopiero w obecności czynnika rozluźniającego konformację rdzenia katalitycznego 20S. Dla dwóch najbardziej efektywnych związków (peptydy 18 i 20) wykonane zostały także testy z wykorzystaniem modeli komórkowych. Wykazano w nich, że peptyd 20 stymuluje aktywność proteasomu w modelach komórkowych choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz ALS, natomiast analog 18 tylko w modelu choroby ALS.

Trzecia grupa (peptydy 35-46) to związki, do których sekwencji zostały wprowadzone nienaturalne reszty takie jak: nienaturalne aminokwasy lub mimetyk wiązania peptydowego. Celem tych modyfikacji było określenie ich wpływu na zwiększenie odporności proteolitycznej peptydu bez obniżenia jego aktywności. Przeprowadzone badania wykazały, że modyfikacja ta niekorzystnie wpłynęła na aktywność modulatorów, z tym że lepiej tolerowane były modyfikacje wiązania peptydowego. Udało się jednak uzyskać dwa związki o zwiększonej odporności

na degradację przez h20S (peptydy 39 i 46), które nie utraciły zdolności do aktywacji enzymu.

Czwartą grupą peptydów, były analogi Blm-pep, 18, 23 i 32 (wybrane na podstawie wcześniej uzyskanych rezultatów) – do których sekwencji zostały wprowadzone grupy sieciujące: Dopa lub Bpa. Modyfikacja ta miała na celu umożliwienie określenia miejsca wiązania modulatorów w strukturze h20S. Do chwili obecnej, Doktorantce udało się zidentyfikować miejsce wiązania jednego modulatora w kieszeni $\alpha 5-\alpha 6$, a drugiego w kieszeniach $\alpha 4-\alpha 5$ oraz $\alpha 5-\alpha 6$, jednak te badania są kontynuowane.

Mgr Małgorzata Giżyńska jest współautorką trzech prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (łącznie IF = 13,746). Ponadto swoje badania prezentowała w formie 30 komunikatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Chciałabym także zwrócić uwagę na znaczący udział Doktorantki w realizacji projektów naukowych. Była kierownikiem projektu badawczego NCN w ramach konkursu PRELUDIUM 12 pt. „*Allosteryczne inhibitory proteasomu - optymalizacja struktury analogów PR39 w celu uzyskania większej stabilności i efektywności*”, wykonawcą w dwóch projektach NCN w ramach konkursów OPUS oraz kierownikiem w pięciu projektach Badań dla Młodych Naukowców. Świadczy to o jej dużym zaangażowaniu w prowadzenie badań naukowych.

Przechodząc do końcowej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona wartościowy wkład do badań mających na celu poszukiwanie nowych peptydowych modulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S wykazujących jednocześnie zwiększoną odporność proteolityczną. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i znacznie poszerzają naszą wiedzę na ten temat, a pojawienie się w tekście drobnych niedociągnięć językowych i typograficznych nie ma żadnego wpływu na stronę merytoryczną pracy. Oceniając wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej w konkluzji wyraźnie stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych. Wnoszę więc o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

