



Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 15 czerwca 2018 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Wojtysiak zatytułowanej „Substraty i niskocząsteczkowe inhibitory wybranych enzymów proteolitycznych z rodziny kalikrein.

Synteza chemiczna i badania enzymatyczne”

Kalikreiny tkankowe są grupą 15 proteaz serynowych obecnych w licznych tkankach, o postulowanych funkcjach dotyczących zarówno fizjologii, jak i patologii człowieka. Przypuszczenia te oparte są na wiedzy o ekspresji kalikrein w licznych tkankach i organach oraz o ich potencjalnych białkowych substratach i inhibitorach. Tkankowa kalikreina 14 jest stosunkowo słabo zbadana, jeżeli chodzi o jej specyficzność substratową. Oprócz funkcji w złuszczeniu naskórka czy upłynnianiu nasienia sugeruje się jej istotną rolę w powstawaniu nowotworów prostaty, sutka czy jąder. Ustalenie optymalnych sekwencji aminokwasowych substratów tej proteazy, a także opracowanie inhibitorów i sond molekularnych wydaje się więc atrakcyjnym i aktualnym celem badawczym, a uzyskane wyniki mogą mieć implikacje dla opracowania kandydatów na lek przeciwnowotworowy lub posłużyć celom diagnostycznym. Doktorat mgr Anny Wojtysiak został zrealizowany pod opieką prof. dr. hab. Adama Lesnera i dr hab. Magdaleny Wysockiej, którzy posiadają znakomite doświadczenie w badaniu proteaz oraz ustalaniu ich preferencji substratowej metodami kombinatorycznymi z wykorzystaniem substratów fluorescencyjnych.

Rozprawa doktorska mgr Wojtysiak jest bardzo obszerna, gdyż liczy 240 stron, jest napisana poprawną polszczyzną i podzielona jest na sześć głównych rozdziałów: *Przegląd literaturowy* (odpowiednik *Wstępu*), *Cel pracy*, *Badania własne* (odpowiednik rozdziału *Materiały i metody*), *Wyniki i dyskusja* i *Literatura cytowana*. Podział rozprawy na rozdziały jest więc nieco odmienny od typowego. Istotnym rozdziałem są też *Wnioski*, które na dwóch stronach zestawiają najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji doktoratu. Niestety, rozprawa nie zawiera streszczenia w języku angielskim. Praca jest napisana i zilustrowana starannie. Daje się zauważyć



dbałość doktorantki o unikanie błędów stylistycznych czy językowych, jednak w czasie lektury dostrzegłem pewną niewielką liczbę błędów interpunkcyjnych.

W bardzo długim, bo liczącym 91 stron, *Przeglądzie literaturowym* autorka przedstawia właściwie wszystko, co osobie nie zaznajomionej z tematyką rozprawy umożliwi jej zrozumienie. Są więc podstawowe informacje o proteolizie i jej udziale w przekazywaniu sygnału komórkowego, enzymach proteolitycznych i ich inhibitorach, a następnie, już bezpośrednio związane z doktoratem, rozdziały o kalikreinach, metodach tworzenia bibliotek peptydowych, a na końcu o technikach oznaczania aktywności proteaz, w tym o sondach molekularnych, spektroskopii impedancyjnej i woltamperometrii, stosowanych w rozprawie. Ogólnie, cały rozdział wydaje się stanowczo zbyt długi, jednak trudno winić doktorantkę, że dołożyła wszelkiej staranności, aby przybliżyć czytelnikowi wiedzę o różnych zagadnieniach prezentowanych w rozprawie. Liczna literatura (aż 340 pozycji) cytowana jest w sposób jednolity i prawidłowy.

W rozdziale *Wyniki i Dyskusja* mgr Wojtysiak przedstawiła na 55 stronach uzyskane wyniki i obszernie je omówiła. Do najciekawszych osiągnięć doktorantki zaliczam:

1. Ustalenie sekwencji aminokwasowej w rejonie od P4 do P3' selektywnych lub najszybciej hydrolizowanych substratów kalikreiny 14. Substraty zostały ustalone dzięki analizie dwóch bibliotek peptydowych, tetra- i heptapeptydowej, stosując taką optymalizację sekwencji, aby różnicować je wobec kalikreiny 13. Do monitorowania hydrolizy substratu doktorantka zastosowała grupę ABZ (donor) i ANB-NH₂ (akceptor), odpowiednio na końcach N i C peptydu. Jest to wartościowy wynik, który dostarcza informacji o optymalnej sekwencji rozpoznawanej przez kalikreinę 14. Sekwencja selektywna była tylko w niewielkim stopniu hydrolizowana przez kalikreinę 2, nie była zaś hydrolizowana przez 11 innych testowanych kalikrein lub katepsyn.
2. Znalezienie analogów fosfonowych, będących inhibitorami kalikreiny 14. W tej części pracy mgr Wojtysiak współpracowała z dr. hab. Marcinem Sieńczykiem.
3. Opracowanie biotynylowanej sondy molekularnej, będącej selektywnym inhibitorem kalikreiny 14.
4. Opracowanie koniugatu kropki kwantowej z selektywnym substratem kalikreiny 14, który może być wykorzystany do oznaczania aktywności tego enzymu.
5. Zastosowanie metod elektrochemicznych do monitorowania aktywności kalikreiny 14. We współpracy z dr. Pawłem Niedziałkowskim doktorantka pokazała, że techniki woltamperometrii cyklicznej (CV) i spektroskopii impedancyjnej (EIS) można stosować do

oznaczania aktywności kalikreiny 14, stosując peptydy wrażliwe na działanie tego enzymu zakotwiczone na elektrodzie złotej. Co ważne, techniki elektrochemiczne umożliwiają monitorowanie aktywności kalikreiny 14 na poziomie niezwykle niskich stężeń, rzędu 10^{-14} M (CV) i 10^{-16} M (EIS).

6. Pokazanie, że otrzymane substraty kalikreiny 14 mogą być wykorzystane do oznaczania aktywności enzymu w próbkach śliny i różnicują ślinę pochodzącą od osób zdrowych i cierpiących na nowotwór ślinianek. Można je także wykorzystać do oznaczania aktywności kalikreiny 14 w komórkach fibroblastów i keratynocytów. To ważne wyniki, gdyż pokazują praktyczne możliwości zastosowania otrzymanych substratów.

Podsumowując, skomentowane powyżej najważniejsze osiągnięcia doktoratu uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe, gdyż dotyczą stosunkowo słabo poznanego enzymu, który może mieć istotne znaczenie w procesach nowotworowych. Pewnym mankamentem, natomiast, jest stosunkowo słaba dyskusja uzyskanych wyników, w sensie odniesienia do literatury. Być może jednak, dane literaturowe, do których w dyskusji mogłaby się odnieść doktorantka są nieliczne.

Moje uwagi do doktoratu są nieliczne i mają charakter komentarza:

1. Str. 26. Podział inhibitorów proteinaz na rodziny zaproponowany przez Laskowskiego i Kato (1980) nie opierał się na tym, jaki enzym jest hamowany, ale raczej na podobieństwie strukturalnym, w tym sekwencji aminokwasowych i topologii mostków disiarczkowych. W tej ważnej pracy przeglądowej (cytowanej 2000 razy!) znajdują się także obszernie fragmenty dyskutujące czy poszczególne rodziny inhibitorów obejmuje podobny mechanizm działania. To, co nastąpiło później (podział Barretta i współpracowników) jest tylko rozszerzeniem oryginalnego pomysłu Laskowskiego i Kato, wynikającym z ogromnego przyrostu danych strukturalnych i biochemicznych, a nie nowym podziałem.
2. Str. 31. „...zaprezentowane w 1991 roku przez J. Oleksyszyna i jego współpracowników [103].”
J. Oleksyszyn pracował w tym czasie w laboratorium prof. J. C. Powersa.
3. Str. 33. „...inhibitory ...są obiecującą podstawą do opracowania nowych środków hamujących nadmierne wydzielanie proteaz serynowych w przebiegu licznych chorób”. Zapewne chodzi doktorantce o hamowanie proteaz serynowych, a nie hamowanie ich wydzielania.
4. Str. 34. „...krystalograficzne struktury rentgenowskie pokazały...”. Struktury krystaliczne, a nie krystalograficzne.
5. str. 44. „...pozycja S_1 ...”. Prawidłowo: kieszeń S_1 .
6. Str. 46. W Tabeli 5 nie podano odpowiednich odnośników literaturowych.

7. Str. 48. Inhibitor typu Kazala, a nie typu Kazal.
8. Str. 48. Tabela 8. Brak nazw podanych stałych oraz w jakich jednostkach zostały podane. Do czego odnosi się przypis pod tabelą?
9. Str. 51. Tabela 8 i Rys. 17 prezentują podobne dane, ale nie są one zgodne. W Tabeli 8 nie podano odpowiednich odnośników literaturowych.
10. Str. 63. Tabela 10. K_{cat}/K_M powinno być napisane: k_{cat}/K_M .
11. Str. 64 i 65. Brak odnośników literaturowych w Tabelach 11 i 12.
12. Str. 130. „Szybkość katalizy enzymu V zmienia się wprost proporcjonalnie do stężenia substratu $[S]$.” Niefortunne zdanie, które jest niezgodne z następnym zdaniem („dzieje się tak przede wszystkim w sytuacji, kiedy $[S]$ jest małe.” Rys. 61 przedstawia nieprawidłowy przebieg zależności V od $[S]$. Przykładowo, przy $[S] = 4 K_M$, $V = 0,8 V_{max}$, a nie $1,0 V_{max}$, jak na Rys.61.
13. Str. 166 oraz na wielu innych stronach. Nieprawidłowe jednostki szybkości reakcji enzymatycznej: V_{pocz} podano w mol/s.
14. Str 166. Jak było wyznaczane stężenie kalikreiny 14? Aby prawidłowo wyznaczyć k_{cat} należy wyznaczyć $[E_0]$, czyli stężenie aktywnego enzymu, gdyż preparat może zawierać znaczną frakcję enzymu nieaktywnego.
15. Str. 174. Na Rys.98 brak jednostek na osi x i przy wartościach IC_{50} .

Chciałbym zauważyć, że podczas realizacji doktoratu mgr Wojtysiak umiejętnie posługiwała się licznymi technikami chemicznymi, analitycznymi, enzymatycznymi, a hydrolizę peptydów weryfikowała poprzez spektrometrię mas. Lista zastosowanych metod jest więc długa i zróżnicowana, co bardzo dobrze świadczy o opanowaniu warsztatu laboratoryjnego, tak ważnego na tym etapie rozwoju.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Anny Wojtysiak zatytułowanej: „Substraty i niskocząsteczkowe inhibitory wybranych enzymów proteolitycznych z rodziny kalikrein. Synteza chemiczna i badania enzymatyczne” jest bardzo pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego mgr Wojtysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

