



Kraków, 2 maja 2024 roku

dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ
Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Grzyskiej
z tytułem
„Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych
na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Justyny Grzyskiej została przygotowana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Marcina Dąga.

Od wielu lat wiadomo, że modyfikacje potranslacyjne są odpowiedzialne za zwiększenie funkcjonalnej różnorodności proteomu. Mogą one wpływać na strukturę, elektrofilowość i oddziaływanie białek, dzięki czemu m.in. regulują fałdowanie białek, oddziaływanie z ligandami lub innymi białkami, zmianę aktywności katalitycznej czy sygnalizacyjnej. W związku z tym, aby w pełni zrozumieć aktywność enzymów proteolitycznych, które od wielu lat badane są w grupie prof. Marcina Dąga, poszerzono dotychczasowe badania uwzględniając w poszukiwaniu substratów i inhibitorów dla wybranych proteaz modyfikacje potranslacyjne. Pani mgr inż. Justyna Grzyska podjęła się tego zadania i realizując pracę doktorską otrzymała wiele ciekawych wyników, które wskazują na istotną i skomplikowaną rolę modyfikacji potranslacyjnych w sterowaniu aktywnością wybranych do badań enzymów.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa rozpoczyna się wstępem teoretycznym, obejmującym 47 stron. Jest on bardzo dobrze przygotowany i świetnie wprowadza w tematykę badań nad enzymami proteolitycznymi. We wprowadzeniu Doktorantka zdefiniowała najważniejsze pojęcia związane z badaniami jak również wskazała wyzwania w projektowaniu nowych związków mogących pełnić rolę substratów, markerów czy inhibitorów dla enzymów proteolitycznych. W dalszej części Doktorantka skupiła się na dokładnym omówieniu proteaz cysteinowych ze szczególnym uwzględnieniem kaspaz i katepsyn cysteinowych, które stanowią przedmiot jej badań. Kolejno przedstawiła metody wykorzystywane do określenia specyficzności substratowej dzieląc je na chemiczne, biologiczne jak również opisując wykorzystanie mikromacierzy czy też proteomiki/degradomiki. Opisała również sposoby konstruowania markerów chemicznych i możliwości ich wykorzystania do badania enzymów proteolitycznych. Ostatni punkt tego rozdziału dotyczy rodzajów i roli modyfikacji potranslacyjnych w odniesieniu do proteaz i w pełni uzasadnia potrzebę badań podjętych przez Doktorantkę. Przedstawione doniesienia literaturowe pozwalają także na umiejscowienie jej badań na tle dotychczas prowadzonych prac w tym temacie. Część literaturowa oparta jest na 244 pozycjach literaturowych i może stanowić doskonałe kompendium wiedzy o obecnie panujących trendach, a licznie przytoczone dane wskazują na dogłębną analizę tej tematyki przez Autorkę.



W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka przedstawia cel oraz plan swoich badań. Przygotowany wstęp literaturowy świetnie uzasadnia potrzebę podjętych przez Doktorantkę prac badawczych. Głównym celem recenzowanej pracy było opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych do badania katepsyny S. Aby osiągnąć ten cel Doktorantka wykorzystwała dane dostępne w literaturze oraz zaplanowała dodatkowe badania mające na celu określenie wpływu modyfikacji potrancylnych takich jak metylacja, cytrulinacja czy fosforylacja naturalnych reszt aminokwasowych w pozycji P1, na aktywność katepsyn L, B, V, S oraz K. Dodatkowo Autorka podjęła się zbadania wpływu fosforylacji reszt seryny i treoniny w sekwencji peptydowej substratów na aktywność kaspazy-3 oraz kaspazy-7 w celu zrozumienia roli tej modyfikacji w regulacji aktywności tych enzymów.

Dalsza część pracy obejmuje „Badania własne” Doktorantki, które zostały podzielone na dwa duże rozdziały, pierwszy dotyczący prac związanych z katepsynami, a drugi z kaspazami.

Swoje badania Doktorantka rozpoczęła od analizy kinetycznej biblioteki tetrapeptydowych analogów sekwencji kontrolnej Ac-ARLR-ACC, w której modyfikowane były reszty aminokwasowe w pozycji P1. Nowe podejście w tych badaniach polegało na dodatkowym wprowadzeniu reszt aminokwasowych z modyfikacjami potrancylnymi takimi jak metylacja, cytrulinacja, fosforylacja czy utlenienie metioniny. Kolejny etap badań obejmował systematyczne badania mające na celu określenie profilu specyficzności substratowej w pozycjach P4-P2' ludzkich katepsyn L, B, S, V oraz K. W pierwszej kolejności Pani Grzymska skupiła się na określeniu preferencji wiążących w miejscu aktywnym katepsyny w pozycjach P2, P3 i P4 wykorzystując metodę HyCoSuL opracowaną i rozwijaną w zespole Promotora pracy, prof. dr hab. Marcina Drąga. Dalszy etap prac był związany z wykorzystaniem tej samej metody do określenia specyficzności substratowej katepsyn w pozycji P1. Badanie specyficzności substratowej kieszeni S1' oraz S2' jest bardziej wymagające i aby określić preferencje w pozycji P1' i P2' Doktorantka posłużyła się substratami typu IQF (ang. *internally quenched fluorescent substrate*). Otrzymane profile specyficzności posłużyły Doktorantce do opracowania selektywnych tetrapeptydowych substratów dla katepsyny S z wykorzystaniem reszt z modyfikacjami potrancylnymi. Ciężka praca Doktorantki została uwieńczona sukcesem, otrzymała ona selektywny substrat wobec katepsyny S, który zawierał m.in. modyfikację potrancylną w pozycji P1 (metylacja kwasu glutaminowego) i w pozycji P3 (cytrulinacja argininy) oraz wykazywał wysoki stosunek selektywności wobec katepsyny S. Doktorantka pokazała, że otrzymany na podstawie tego substratu marker chemiczny charakteryzuje się wysoką skutecznością inhibicji katepsyny S znacznie przewyższającą hamowanie pozostałych katepsyn.

Kolejny rozdział pracy związany jest z badaniami dotyczącymi kaspaz. Doktorantka skupiła się na sprawdzeniu wpływu fosforylacji znanych substratów dla kaspaz na ich aktywność. Zaprojektowała substraty typu IQF wykorzystując peptydy wywodzące się z białek YAP1, VIME i PARP, a następnie badała wpływ fosforylacji L-treoniny lub L-seryny na efektywność hydrolizy substratów. Doktorantka również podjęła badania mające na celu sprawdzenie miejsca hydrolizy wybranych substratów wykorzystując technikę LC-MS. Uzyskane wyniki są



bardzo ciekawe, wnoszą wiele nowych istotnych informacji na temat regulacji aktywności enzymatycznej poprzez modyfikacje potranslacyjne, a także zwracają uwagę na istotność długości sekwencji peptydowej w badaniach nad aktywnością enzymów proteolitycznych. Otrzymane dane zostały opublikowane w pracy pt. *Evaluation of the effects of phosphorylation of synthetic peptide substrates on their cleavage by caspase-3 and -7*, którego Doktorantka jest współautorką.

Rozdział 'Badania własne' napisany jest w bardzo przejrzysty sposób, zawiera liczne schematy i tabele, a przygotowane graficzne profile specyficzności są bardzo czytelne. Należy podkreślić, że Doktorantka otrzymała ogromną ilość danych a wszystkie otrzymane wyniki badań są bardzo skrupulatnie omówione, przedyskutowane na tle istniejących doniesień literaturowych oraz poddane krytycznej analizie. Doktorantka wykazała się umiejętnościami godnymi dojrzałego naukowca.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki uzyskanych w trakcie realizacji zarysowanych powyżej zadań badawczych składających się na recenzowaną Dysertację należą:

- zaprojektowanie tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych selektywnych względem katepsyny S;
- wykazanie, że substrat zawierający 2 aminokwasy z modyfikacjami potranslacyjnymi tj. cytrulinę oraz metylowany kwas glutaminowy posiada największą selektywność wobec katepsyny S i skonstruowanie na jego podstawie inhibitora o dużej selektywności;
- przeprowadzenie rzetelnej analizy wpływu fosforylowanych reszt aminokwasowych w pozycji P1 substratów na regulację aktywności kaspaz 3 i 7 pokazującej złożoność tego efektu;
- wykazanie, że obie kaspazy hydrolizują substrat po karboksylowej stronie fosfo-L-seryny.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka umieściła podsumowanie, które w sposób zwięzły, ale jednocześnie dokładny przedstawia najważniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań oraz komentuje otrzymane dane pod kątem szerszej perspektywy możliwości ich wykorzystania przez innych naukowców. Doktorantka jeszcze raz podkreśliła istotność modyfikacji potranslacyjnych w badaniach nad mechanizmami regulacji aktywności proteaz.

Kolejny rozdział pracy „Część eksperymentalna” jest świetnie przygotowany. Doktorantka na wstępie tego rozdziału wskazuje osoby, z którymi współpracowała i w jakim zakresie, co jest zrozumiałe przy tak ogromnym projekcie realizowanym w ramach tej pracy doktorskiej. Kolejno przedstawia stosowane odczynniki i ich skróty, a następnie opisuje wykorzystywaną aparaturę badawczą. Doktorantka wskazała również pochodzenie badanych enzymów: kaspaz-3, -6, -7 oraz -8 otrzymanych przez dr. Scotta Snipasa (SanfordBurnham Prebys Medical Discovery Institute w La Jolla, CA, Stany Zjednoczone) oraz katepsyn B, L, V, S oraz K otrzymanych w grupie prof. Borisa Turka (Instytut Jožefa Stefana, Lublana, Słowenia). Dalej w sposób bardzo szczegółowy opisana jest synteza znacznika fluorescencyjnego wraz z przedstawieniem schematów reakcji. Każdy z otrzymanych kolejno związków został



dokładnie scharakteryzowany za pomocą spektroskopii NMR oraz HRMS. Wszystkie związki zostały otrzymane z bardzo dużymi wydajnościami, co niewątpliwie jest dużym sukcesem Doktorantki. Kolejno Doktorantka opisała syntezę biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC dla katepsyn opierając się na wcześniejszej pracy dr. inż. Wioletty Rut, otrzymując **143 substraty**, dla których wykonała analizę LC-MS. Dalej opisana jest synteza kombinatorycznej biblioteki typu IQF dla katepsyn składającej się z dwóch podbibliotek o sekwencji ACC-Ala-Arg-Leu-Arg-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp) oraz ACC-Ala-Arg-Leu-Arg-P2'-Mix-Gly-Lys(Dnp), wykorzystującej w pozycji P1' oraz P2' jeden z **96 naturalnych lub nienaturalnych reszt aminokwasowych** a jako mix mieszaninę aminokwasów naturalnych (z pominięciem cysteiny i metioniny oraz z norleucyną). W ten sposób powstała ogromna biblioteka substratów typu IQF do opracowania profilu specyficzności substratowej ludzkich katepsyn B, L, V, S oraz K w kieszeni wiążącej S1' oraz S2'. Kolejno została opisana metodyka badania specyficzności substratowej dla katepsyn dla różnych bibliotek. Dalej w pracy Doktorantka przedstawia syntezę zdefiniowanych fluorogennych tetrapeptydowych substratów dla katepsyn oraz kaspaz otrzymując odpowiednio **104 i 5 związków**, potwierdzając ich czystość i tożsamość za pomocą LC-MS. Opisana została również synteza **14-stu substratów typu IQF** dla kaspaz. Dalej została opisana metodyka badania aktywności kinetycznej dla tak otrzymanych związków wobec kaspaz i katepsyn. W kolejnych rozdziałach opisana jest synteza inhibitora dedykowanego katepsynie S i badanie jego aktywności inhibicyjnej. Przedstawione opisy są bardzo rzetelne, wskazują na bardzo dobrą znajomość warsztatu badawczego Doktorantki i wskazują na ogrom pracy jaki wykonała Doktorantka zarówno podczas syntez jak i analizy aktywności kinetycznej otrzymanych związków.

W dalszej części pracy zostały umieszczone struktury aminokwasów, które były wykorzystane w bibliotekach HyCoSuL oraz w substratach zdefiniowanych, wykaz skrótów, dorobek naukowy oraz bibliografia obejmująca 266 pozycji.

Podsumowując, otrzymane dane, ich analiza i interpretacja są na najwyższym poziomie i jestem pewna, że wielu badaczy z nich skorzysta w przyszłości. W pracy tej został zaprezentowany bardzo obszerny materiał badawczy, ukazujący doskonale przygotowanie Doktorantki do prowadzenia syntez oraz badań aktywności enzymatycznej na dużą skalę. Tak zaawansowane badania wymagały dobrego przygotowania zarówno podczas przygotowania próbek, wykonywania eksperymentów jak i analizy otrzymanych danych. We wszystkich tych aspektach Doktorantka wykazała się dużym profesjonalizmem i dojrzałością naukową. Uważam to za ogromny sukces Doktorantki. Wyniki będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały już częściowo opublikowane w „*Biochemical Journal*” ale duża ich część wciąż czeka na opublikowanie i jestem przekonana, że na podstawie tej pracy powstanie kilka świetnych publikacji. W mojej ocenie otrzymane dane stanowią ceną bazę informacji i mogą stać się podstawą do badań w układach *in vitro* a nawet *in vivo*. Nie mam krytycznych uwag również w stosunku do przygotowanej rozprawy. Z obowiązków recenzenta wymienię kilka punktów do przedyskutowania podczas obrony pracy doktorskiej.



1. Czy w prowadzonych badaniach można byłoby wykorzystać metody modelowania molekularnego w celu zmniejszenia nakładu pracy eksperymentalnej?
2. Doktorantka otrzymała selektywny marker chemiczny wobec katepsyny S, proszę o zaproponowanie dalszego wykorzystania tego markera do badań.
3. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację prac badawczych ujętych w pracy doktorskiej, czy też propozycję innych tematów badawczych, które warte byłyby zainteresowania.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Grzyskiej chciałabym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Część badań, które przeprowadziła Doktorantka niewątpliwie można uznać za pionierskie i mające duży potencjał aplikacyjny w tworzeniu narzędzi do badań procesów komórkowych, określaniu mechanizmów regulacyjnych jak i w projektowaniu leków. Na duże uznanie zasługuje fakt, iż praca w *Biochemical J.* mimo, iż opublikowana została stosunkowo niedawno zyskała już kilka cytowań naukowców z bardzo dobrych ośrodków naukowych. Należy zaznaczyć, iż Doktorantka jest współautorką również przeglądu literaturowego opublikowane w *Chemistry-An Asian Journal*, który jest bezpośrednio związany z tematyką rozprawy doktorskiej i jak do tej pory był zacytowany 14 razy, co świadczy o jego dużym znaczeniu. Pani Grzyska jest dodatkowo współautorką trzech innych prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach takich jak *Chemical Science*, *Journal of Medicinal Chemistry*, czy *Thrombosis Research*. Wyniki swoich badań prezentowała również na 4 konferencjach w formie wystąpień ustnych.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Grzyskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce w Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm. Wnoszę więc do Rady Dyscyplin Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Justyny Grzyskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części recenzji, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Małgorzata Ponińska

