

Prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
NIP: 584-020-32-39

Gdańsk, 16.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego
zatytułowanej: „Opracowanie strategii syntezy pochodnych ubikwityny
zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i
selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących”

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 14. 06. 2023 r.

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem prof. dr. hab. Marcina Drąga oraz dr inż. Wioletty Rut.

Rozprawę doktorską stanowi przygotowana w języku polskim praca pisemna obejmująca dziewięć części, w tym: Wstęp teoretyczny (41 str.), Cele pracy (2 str.), Badania własne (40 str.), Podsumowanie i wnioski końcowe (7 str.), Część eksperymentalna (12 str.). Dyskusja nie została wydzielona w formie osobnego rozdziału, lecz jest wpleciona w „Część eksperymentalną” w formie dwóch podrozdziałów. Na początku pracy został umieszczony spis treści, a na końcu rozprawy znajdują się: struktury aminokwasów użytych w bibliotece HyCoSuL oraz w zdefiniowanej bibliotece P2, lista stosowanych skrótów, dorobek naukowy i aktywność dodatkowa oraz piśmiennictwo. Streszczenia w języku polskim i angielskim są dostępne na stronie internetowej Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej.



Oceniana rozprawa dotyczy opracowania strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w obrębie końca C białka jako specyficznych i selektywnych narzędzi do badania enzymów deubikwitynujących. Ubikwityna jest niewielkim, powszechnie występującym w organizmach eukariotycznych białkiem, które tworzy wiązania kowalencyjne z innymi białkami w procesie zwanym ubikwitynacją. Modyfikacja białek przez ubikwitynę, zależnie od typu ubikwitynacji, może kierować białka do degradacji zależnej od proteasomu lub modulować ich transport i aktywność, wpływając na ekspresję genów i sygnalizację komórkową. Edycja sygnałów ubikwitynowych jest prowadzona przez grupę enzymów proteolitycznych, określanych jako deubikwitynazy (DUB), których zadaniem jest usuwanie cząsteczek ubikwityny ze zmodyfikowanych białek. Ze względu na złożoność i istotność funkcji ubikwitynacji i deubikwitynacji procesy te są przedmiotem intensywnych badań. W związku z tym podjęcie badań określonych w tytule rozprawy uważam za zasadne, a uzyskane wyniki mogą potencjalnie znaleźć praktyczne zastosowanie.

Badania Doktoranta skupiły się na aspektach dotyczących opracowania sposobu uzyskania selektywnych i specyficznych narzędzi chemicznych opartych na strukturze ubikwityny oraz walidacji tych narzędzi z wykorzystaniem dwóch enzymów deubikwitynujących, wirusowego MERS-CoV PL^{pro} oraz ludzkiego UCH-L3.

Rozdział „**Wstęp**” stanowi właściwe wprowadzenie w zagadnienia związane z tematyką rozprawy. Na początku została przedstawiona ogólna charakterystyka ubikwityny i procesu ubikwitynacji. Następnie Autor skupił się na opisie enzymów deubikwitynujących i znaczeniu tego procesu w fizjologii komórki eukariotycznej oraz podczas infekcji wirusowej. Szczególny nacisk został położony na aspekty związane z możliwością wykorzystania DUB, w tym pochodzenia wirusowego, jako celów molekularnych do opracowania cząsteczek terapeutycznych. Dalsze dwa rozdziały przedstawiają przegląd narzędzi chemicznych wykorzystywanych w badaniach proteaz z uwzględnieniem markerów chemicznych oraz metod syntezy pochodnych ubikwityny, będących głównym przedmiotem rozprawy.

Wstęp został napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały. Treści zawarte w tekście zostały bardzo dobrze uzupełnione klarownymi modelami strukturalnymi i schematami (rysunki 1-14).

Podsumowując, rozdział ten porusza zakres tematyczny dobrze odzwierciedlający przedmiot badań Doktoranta i zagadnienia poruszane w dyskusji. Należy więc uznać wybór omawianych tematów za zasadny i niezbędny do właściwego wprowadzenia czytelnika do dalszych rozdziałów rozprawy.

Cel pracy został jasno określony, zarówno w tytule rozprawy, jak i dedykowanym rozdziale dysertacji. Realizacja celu obejmowała sześć wyodrębnionych zadań, polegających na precyzyjnej charakterystyce specyficzności substratowej MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3, uzyskaniu różnego typu substratów, syntezie markerów chemicznych i określeniu ich selektywności względem rekombinowanych enzymów DUB i enzymów zawartych w lizatach komórkowych.

Warto w tym miejscu zauważyć, iż wymienione zadania nie były dotychczas realizowane względem wymienionych DUB lub były wykonane w znacznie skromniejszym zakresie. W związku z tym zaplanowane badania miały charakter nowatorski.

W następującym po „Wstępie” rozdziale „**Badania własne**” Doktorant przedstawił wyniki realizowanych zadań badawczych. W pierwszej kolejności Autor skupił się na uzyskaniu bibliotek

substratów do badania specyficzności DUB w pozycjach P2, P3 i P4. Zostały zaprojektowane i wykonane biblioteki substratów z nienaturalnymi aminokwasami, co pozwala na znacznie dokładniejsze określenie specyficzności substratowej proteazy i pełniejszą charakterystykę architektury centrum aktywnego niż w przypadku ograniczenia się jedynie do aminokwasów występujących naturalnie w białkach. Ta strategia umożliwiła wychwycenie różnic w preferencji wybranych DUB względem reszt aminokwasowych w miejscach P2, P3 i P4 substratu. Wyniki powyższych badań stały się podstawą do opracowania i późniejszej syntezy fluorogenicznych tetrapeptydowych substratów, wykazujących wyższą specyficzność i selektywność wobec badanych DUB niż substrat referencyjny zawierający klasyczną sekwencję aminokwasową LRGG C-końcowego motywu ubikwityny. W rezultacie Doktorant uzyskał substrat M2, hydrolizowany wyłącznie przez proteazę MERS-CoV PL^{pro}, oraz S2 selektywnie cięty przez UCH-L3. W kolejnym etapie metodą totalnej syntezy chemicznej Doktorant otrzymał fluorogeniczne pochodne ubikwityny, które zawierały uprzednio przetestowane C-końcowe tetrapeptydowe motywy nadające selektywność wobec badanych DUB. Pozwoliło to na wyznaczenie stałych specyficzności k_{kat}/K_M i stałych szybkości k_{kat} , a ich wartości potwierdziły wyższą specyficzność zmodyfikowanych substratów w porównaniu do kontrolnej fluorogenicznej pochodnej ubikwityny. Ostatnim etapem było wykonanie markerów chemicznych umożliwiających selektywną detekcję badanych DUB w lizatach komórkowych. Zadanie to zakończyło się sukcesem: otrzymane markery chemiczne (na bazie substratowych pochodnych UB ze zmodyfikowanymi rejonami C-końcowymi) były zdecydowanie bardziej selektywne względem wybranych DUB niż marker referencyjny z ubikwityną typu dzikiego.

Doktorant uzyskał wiele interesujących wyników, wśród których za najważniejsze uważam:

- (1) wykazanie różnic w specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących MERS-CoV PL^{pro} i UCH-L3 z zastosowaniem bibliotek tetrapeptydowych zawierających nienaturalne aminokwasy,
- (2) zaprojektowanie i uzyskanie cząsteczek substratów, pochodnych ubikwityny zawierających opracowane przez Doktoranta C-końcowe sekwencje tetrapeptydowe, które były selektywnie rozpoznawane przez badane DUB i bardziej wydajnie degradowane niż substrat referencyjny.
- (3) opracowanie i uzyskanie markerów chemicznych, pozwalających na bardziej selektywne wykrywanie wybranych DUB niż z użyciem markera referencyjnego.

Podsumowując tę część pracy uważam, że Pan mgr inż. Mikołaj Żmudziński uzyskał bardzo wartościowe wyniki, które pozwoliły na opracowanie nowatorskiej strategii otrzymywania wariantów ubikwityny zawierających nienaturalne reszty aminokwasowe, które mogą być wykorzystane jako bardziej selektywne i specyficzne substraty, markery chemiczne lub inhibitory tych enzymów deubikwitynujących, dla których zostały opracowane. Uważam to za bardzo duże osiągnięcie Doktoranta, gdyż takie kompleksowe podejście nie było do tej pory stosowane w przypadku enzymów DUB. O randze wyników świadczy m.in. fakt opublikowania ich w prestiżowym czasopiśmie naukowym *Chemical Science*, a także zawarcie ich w pracy przeglądowej. Opracowana metodyka została przedstawiona w rozdziale książki z serii „*Methods in Molecular Biology*”.

Jak już zostało wspomniane, w dysertacji nie został wyodrębniony osobny rozdział „Dyskusja”; w zamian Doktorant prowadził dyskusję wyników dwuetapowo w podrozdziałach następujących bezpośrednio po każdym z głównych etapów doświadczeń. Nie jest to może klasyczny sposób, ale



forma ta sprawdziła się w przypadku tej rozprawy. Zastosowane podejście pozwoliło na osobne i bardzo precyzyjne ustosunkowanie się do wyników dotyczących pochodnych ubikwityny jako substratów i markerów chemicznych. Dyskusja jest prowadzona w sposób dojrzały i wskazuje na znajomość tematyki badawczej i umiejętność umieszczenia danych eksperymentalnych w szerszym kontekście.

Bardzo dobrym uzupełnieniem tej formy dyskusji jest rozdział „**Podsumowanie i wnioski końcowe**”, spinający wszystkie uzyskane wyniki i wypływające z nich wnioski.

Lektura „Wyników własnych” nasunęła mi kilka pytań.

1. Niektóre enzymy DUB są regulowane allosterycznie. Między innymi są takie wskazania dla UCH-L3. Czy zostało sprawdzone, że reakcje hydrolizy katalizowane przez MERS-CoV PL^{pro} i UCH-L3 wykazują kinetykę Michaelisa-Menten?
2. Otrzymane w ramach ocenianej pracy markery chemiczne w warunkach doświadczalnych charakteryzowały się dużą selektywnością względem tych DUB, dla których zostały zaprojektowane i nie wiązały się wydajnie do innych DUB zawartych w lizatach komórkowych. Ale czy marker biot-6-ahx-Ub.M2-VME wiąże się specyficznie do proteazy MERS-CoV PL^{pro} w obecności proteaz PL^{pro} innych koronawirusów?
3. W podsumowaniu Doktorant wspomniał, iż „w połączeniu z innymi metodami projektowania selektywnych wariantów Ub” można uzyskać bardziej specyficzne i selektywne narzędzia. Czy są planowane takie badania? Jakie podejście eksperymentalne zaproponowałby Doktorant?

Rozdział „**Część eksperymentalna**” przedstawia użyte pracy metody badawcze. W większości przypadków są one opisane w sposób wyczerpujący i pozwalający na powtórzenie badań. Zwłaszcza opisy syntezy chemicznej są przedstawione bardzo szczegółowo. Natomiast nieco zbyt skrótowo zostały potraktowane opisy wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy. W podrozdziale 5.5 (Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla tetrapeptydowych substratów): przy jakich wartościach stężeń substratu były wyznaczone parametry k_{kat}/K_M ? Na podstawie jednego stężenia czy kilku?

W wynikach zostały podane wartości parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy pochodnych ubikwityny, w tym wartości K_M i k_{kat} . Natomiast w sekcji „Część eksperymentalna” nie został zawarty opis wyznaczenia tych wartości. W punkcie 5.9 jest informacja tylko o wyznaczeniu parametru k_{kat}/K_M . Czy była sporządzona krzywa Michaelisa-Menten? Jak była wyznaczana prędkość reakcji? Czy było wyliczane stężenie powstałego produktu?

W punkcie 5.10 (Detekcja DUBs w lizatach komórkowych) - czy zawartość białka w próbach reprezentujących lizaty komórek pochodzących z różnych linii była taka sama? Ponadto w próbach pochodzących z tej samej linii komórkowej kontrola ilości nałożonego białka do studzienki (β -aktyna) nie w każdym przypadku wskazuje na równą zawartość białek (Rys. 38). Jakie przeciwciała były użyte do detekcji β -aktyny? Zabrakło informacji na temat źródła przeciwciał użytych w badaniach.

Liczące 215 pozycji „**Piśmiennictwo**” zawiera zestaw publikacji związanych z tematyką dysertacji i użytą metodyką. Są to prace datowane przede wszystkim po 2010 roku, aczkolwiek nie zostały pominięte prace pionierskie o znaczeniu historycznym.

Uwagi ogólne

Praca została napisana bardzo dobrze, w sposób klarowny i logiczny, bez zbędnych dygresji, ale równocześnie z wystarczającą ilością szczegółów. Założenia badań zostały bardzo dobrze wyjaśnione, dzięki czemu czytelnik nie związany bezpośrednio z syntezą chemiczną ma przyjemność zapoznania się zarówno z problematyką badawczą, jak i zgłębić część doświadczalną. Tekst dobrze uzupełniają ryciny (43) oraz tabele (10). Z obowiązku recenzenta muszę jednak wspomnieć o występujących w pracy błędach językowych (żargon laboratoryjny, niepotrzebne zapożyczenia z języka angielskiego).

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko i wspomniane powyżej uchybienia nie umniejszają wartości pracy. Oceniana dysertacja ma charakter interdyscyplinarny i doskonale łączy zagadnienia z zakresu chemii i biologii. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny z zastosowaniem właściwie dobranej metodologii badawczej. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo spójny i logiczny ciąg doświadczeń, od określenia specyficzności substratowej wybranych DUB, selekcję sekwencji tetrapeptydowych umożliwiających rozróżnienie badanych DUB, po wykorzystanie tej selektywności do konstrukcji substratów i markerów chemicznych w oparciu o cząsteczkę zmodyfikowanej ubikwityny. Przedstawione wyniki są opisane poprawnie i w wielu przypadkach stanowią podstawę do uściślenia hipotez i planowania dalszych badań. Przeprowadzona dyskusja świadczy o głębokiej wiedzy Doktoranta i jego umiejętności skonfrontowania rezultatów własnych badań z danymi literaturowymi. Wyciągnięte z wyników badań wnioski są wyważone i pozbawione nadinterpretacji. Nie mam w związku z tym wątpliwości, iż Pan mgr inż. Mikołaj Żmudziński dobrze opanował warsztat naukowy w zakresie chemii lecz także biochemii i biologii molekularnej. Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i są bardzo cennym uzupełnieniem wiedzy w zakresie chemii białek.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa całkowicie spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pana mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy dysertacji oraz związany z rozprawą bardzo dobry dorobek naukowy Doktoranta, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Łucja Skórka-Blonik