

Wisła Wielka, dn. 15.09.2023

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

W związku z otrzymaniem zaproszenia od Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej (uchwała z dnia 14.06.2023r), podjęłam się recenzji przedstawionej przez Pana magister inż. Mikołaja Żmudzińskiego rozprawy doktorskiej dotyczącej opracowania strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących, wykonanej w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, którą kieruje Pan Profesor dr hab. Marcin Drąg, Promotor rozprawy.

W przedstawionej pracy został podjęty niezwykle interesujący, nowatorski, jednocześnie trudny, ale oczekiwany temat, którego wyniki mogą w przyszłości dostarczyć wiele praktycznych zastosowań, w tym w medycynie.

Opracowanie liczy 146 stron oraz zawiera 43 rysunki i 10 tabel. Przedłożona do recenzji przez Pana mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego rozprawa doktorska ma układ składający się ze 1. Wstępu teoretycznego, 2. Celu pracy, 3. Badań własnych, 4. Podsumowania i wniosków końcowych, 5. Części eksperymentalnej, 6. Struktury aminokwasów użytych w bibliotece HyCoSul oraz o zdefiniowanej bibliotece P2. 7. Wykaz stosowanych skrótów. 8. Dorobek naukowy i aktywność dodatkowa. 9. Piśmiennictwo. Układ ten nieco odbiega od typowego, jak : Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki z omówieniem, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Piśmiennictwo, Spis rycin i tabel, Wykaz skrótów i ewentualnie Aneks. Być może zastosowany przez Doktoranta układ dysertacji obowiązuje w Politechnikach i jest odmienny od tego w Uniwersytetach, streszczenia jednak brakuje.

Autor w części teoretycznej pracy (Wstęp teoretyczny) przedstawia dokładną charakterystykę dotychczasowej wiedzy ogólnej dotyczącej enzymów deubikwitynujących, w tym ubikwityny i ubikwitynacji, enzymów deubikwitynujących (DUBs) wraz z ich celami molekularnymi, ludzkiej C-końcowej hydrolazy ubikwityny-L3 (UCH-L3) i wirusowej MERS-CoV PL^{pro} - jednego z siedmiu ludzkich koronawirusów. Natomiast w dalszej części Autor dokładnie scharakteryzował dotychczasową ogólną wiedzę naukową z zakresu dostępnej wówczas metodyki tj. narzędzi chemicznych w badaniach proteaz, zarówno specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących, jak i metody określania specyficzności substratowej proteaz, również Metody chemiczne – biblioteki substratów peptydowych, Metody wykorzystujące spektrometrię masową, Metody biologiczne, jak i Specyficzność substratową enzymów deubikwitynujących względem łańcuchów poli-Ub. W kolejnych rozdziałach Wstępu Autor

szczegółowo przedstawił dokładną charakterystykę dotychczasowej wiedzy ogólnej dotyczącej Markerów chemicznych w badaniu enzymów proteolitycznych, jak i Markerów chemicznych do badania DUBs. Następnie Doktorant scharakteryzował dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą: Selektowności narzędzi chemicznych do badania DUBs, szczególnie w zakresie Doboru C-końcowego elektrofilowego ugrupowania, Metody wykorzystujące prezentację fagową i Metody wykorzystujące projektowanie mutantów Ub *in silico*. Wstęp teoretyczny zamyka rozdział poświęcony Syntezie pochodnych ubikwityny, który obejmuje: Metody semisyntetyczne, Metody syntezy totalnej, w tym SPPS i NCL (metody natywnej chemicznej ligacji). Autor podkreśla jednocześnie m.in., że Reakcja NCL z wysoką wydajnością zachodzi w buforze wodnym, co pozwala uniknąć często niewydajnej syntezy długich peptydów na nośniku stałym (SPPS).

Przedstawiona we Wstępie teoretycznym dotychczasowa wiedza związana bezpośrednio z tematem rozprawy doktorskiej mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego jest szeroka, szczegółowa, ugruntowana i zwięzła. Jednocześnie wiedza naukowa zawarta we Wstępie teoretycznym świadczy o dużej wiedzy Doktoranta nie tylko w jednej dyscyplinie - chemicznej, lecz wielu dyscyplinach, w tym biologicznej, biochemicznej, biotechnologicznej, genetycznej, biomedycznej i innych, to zasługuje na szczególne podkreślenie i wyróżnienie.

Doktorant prawidłowo sprecyzował zasadniczy cel badawczy, którym było opracowanie strategii syntezy selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych opartych na strukturze ubikwityny, do walidacji tej strategii użył dwóch enzymów deubikwitynujących: wirusowego MERS-CoV PL^{pro} oraz ludzkiego UCH-L3.

Doktorant realizował ten cel poprzez zadania szczegółowe, takie jak:

- 1) syntezę zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych do badania specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących w pozycji P2 o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie „X” to jeden ze 128 zdefiniowanych naturalnych, bądź nienaturalnych aminokwasów.
- 2) Określenie profilu specyficzności substratowej enzymów MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 w pozycji P4-P2, z wykorzystaniem biblioteki HyCoSuL.(Ac-X-Mix-Gly-Gly-ACC-podbiblioteka P4; Ac-Mix-X-Gly-Gly-ACC-podbiblioteka P3) oraz zdefiniowanej biblioteki substratów Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC (pozycja P2), gdzie „Mix” to równomolowa mieszanina 19 aminokwasów, a „X” to zdefiniowany naturalny lub nienaturalny aminokwas.
- 3) Zaprojektowanie i syntezę tetrapeptydowych substratów selektywnych wobec MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 i wyznaczenie dla nich stałej specyficzności k_{cat}/K_M .
- 4) Syntezę substratów – pochodnych ubikwityny zawierających C-końcowy znacznik fluorogeniczny ACC, wykorzystując strategię ligacja-desulfuryzacja oraz określenie ich selektywności i specyficzności względem rekombinowanych enzymów.
- 5) syntezę markerów chemicznych - pochodnych Ub, zawierających biotynę jako N-kończącą grupę reporterową oraz C-kończącą grupę VME jako reaktywną grupę wiążącą, wykorzystując strategię ligacja desulfuryzacja.
- 6) Określenie selektywności zsyntetyzowanych ABPs względem rekombinowanych DUBs oraz enzymów zawartych w lizatach komórkowych.

Przedstawiony przez mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego cel pracy wraz z zadaniami szczegółowymi są w pełni zasadne na gruncie współczesnej wiedzy naukowej i są adekwatne do tytułu pracy.

Kolejną częścią dysertacji są Badania własne Doktoranta, która zawiera, zarówno Wyniki i omówienie badań własnych, jak i Dyskusję wyników w dalszym fragmencie tej części.

Część tą rozpoczyna Określenie specyficzności substratowej MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 i Zaprojektowanie biblioteki substratów do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycji P2. Doktorant zwraca uwagę czytelnika tekstu, że wykorzystanie bibliotek z nienaturalnymi

aminokwasami umożliwia dokładne zbadanie architektury miejsca aktywnego i uzyskane informacje pozwalają na zaprojektowanie specyficznych i selektywnych sekwencji peptydowych względem badanego enzymu, a dotychczas preferencje substratowe DUBs w pozycji P2, określano za pomocą metody PS-SCL z użyciem jedynie bibliotek z naturalnymi aminokwasami.

Powołując się na wcześniejsze dane literaturowe Doktorant podkreśla, że tetrapeptydowy substrat enzymu MERS-CoV PL^{pro} hydrolizowany był ponad 1000 razy mniej wydajnie.

Autor dowodzi, że ze względu na niską wydajność katalityczną hydrolizy tetrapeptydowych substratów oraz preferencję substratową DUBs względem C-końcowej sekwencji LRGG ubikwityny, dlatego w tych badaniach zaprojektował bibliotekę P2 o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie X to 19 naturalnych i 109 nienaturalnych aminokwasów.

Znakiem tej sekwencji jest ACC- (kwas 7-aminokumaryno-4-octowy), który jest uwalniany wskutek hydrolizy wiązania amidowego pomiędzy ACC a aminokwasem w pozycji P1.

Doktorant dowodzi, że przewagą ACC- nad innymi znacznikami jest obecność grupy karboksylowej, umożliwiającej kowalencyjne przyłączenie ACC do podłoża stałego, a także prawie 3-krotnie wyższa wydajność kwantowa fluorescencji i relatywnie tania i prosta jest jego synteza w dużej skali, co też uzasadnia wykorzystanie go do syntezy bibliotek fluorogenicznych substratów na podłożu stałym.

W dalszej części dysertacji pt. Badania własne Doktorant przedstawia procedurę Syntezy zdefiniowanej biblioteki Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, jak i procedury określania Specyficzności substratowej MERS-CoV PL^{pro} i UCH-L3 w pozycji P2.

Warto podkreślić, że specyficzność substratowa enzymu MERS-CoV PL^{pro} do tego substratu w pozycji P2 jest bardzo wąska, bo toleruje w tej pozycji jedynie glicynę, która znajduje się w tym substracie (rys. 17).

Natomiast UCH-L3 wykazuje szerszą specyficzność substratową w pozycji P2, enzym ten toleruje poza glicyną, również inne aminokwasy, jak np. Ala, Val w 47% i 46,5%, odpowiednio i inne (rys.18), ale w niższym stopniu %.

Następnie Autor omawia procedury określenia specyficzności substratowej obu badanych proteaz w pozycjach P3 i P4 za pomocą biblioteki HyCoSul.(rys.19), którą wcześniej opisał. Specyficzności te są zupełnie odmienne od ich specyficzności w pozycji P2 do tetrapeptydowych substratów. Określone profile specyficzności, zarówno w pozycjach P3 i P4 MERS-CoV PL^{pro} (rys.20-21), jak i UCH-L3 (rys.22-23) Autor przedstawił graficznie i omówił szczegółowo.

W kolejnym etapie badań w oparciu o otrzymane profile specyficzności substratowej obu proteaz, Doktorant zaprojektował i przedstawił procedury syntezy tetrapeptydowych substratów dla MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3, które skrupulatnie scharakteryzował i opisał.

Następnie w polu zainteresowania Doktoranta była Selektywność oraz specyficzność zsyntetyzowanych tetrapeptydowych substratów i w celu porównania wydajności katalitycznej enzymów względem zsyntetyzowanych substratów zostały wyznaczone stałe specyficzności k_{kat}/K_M .

Struktury zaprojektowanych tetrapeptydowych substratów oraz wyznaczone dla nich stałe specyficzności, zarówno dla MERS-CoV PL^{pro}, jak i dla UCH-L3 Autor przedstawia w Tabeli 1. Najlepszym spośród substratów dla MERS-CoV PL^{pro} okazał się być substrat M2 zawierający w pozycji P4 Tle, którego stała specyficzności była 1,7 razy wyższa niż dla substratu referencyjnego, natomiast dla UCH-L3 oba substraty S1 i S2 były wydajniej hydrolizowane od referencyjnego.

Dlatego do dalszych badań Doktorant wybrał właśnie te 3 związki, które były lepiej reprezentowane przez badane DUBs niż substrat referencyjny.

Następnie zbadana selektywność tetrapeptydowych substratów względem badanych proteaz pokazały, że tetrapeptydowe substraty są selektywne względem badanych enzymów, dla których zostały zaprojektowane (rys.25). Substrat referencyjny był hydrolizowany przez obie proteazy, natomiast M2 hydrolizowany był jedynie przez MERS-CoV PL^{pro}, a substraty S1 i S2 hydrolizowane są wyłącznie przez UCH-L3.

W następnej części rozprawy doktorskiej pt. Podsumowanie – selektywne tetrapeptydowe substraty dla MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 Doktorant podsumowuje osiągnięcie zasadniczego celu projektu, którym było opracowanie strategii syntezy wariantów ubikwityny selektywnie rozpoznawanych przez UCH-L3 oraz MERS-CoV PL^{pro} dzięki zmodyfikowanej C-końcowej sekwencji peptydowej zawierającej nienaturalne reszty aminokwasowe.

Doktorant podkreśla, że w pierwszym etapie badań zostało to osiągnięte z użyciem biblioteki HyCoSul do zbadania specyficzności substratowej w pozycji P3 oraz P4, a także zdefiniowanej biblioteki substratów do zbadania specyficzności substratowej w pozycji P2.

Natomiast drugi etap badań obejmował zaprojektowanie i syntezę tetrapeptydowych fluorogenicznych substratów, określenie ich stałych specyficzności oraz selektywności rozpoznawania przez UCH-L3 i MERS-CoV PL^{pro}.

Dalsza część podsumowania dotyczy specyficzności substratowej MERS-CoV PL^{pro} w pozycjach P4-P2, specyficzności substratowej UCH-L3 w pozycjach P4-P2 oraz selektywnych, tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych dla MERS-CoV PL^{pro} i UCH-L3, którą Doktorant zwięźle omawia.

Kolejny etap badań Doktoranta miał na celu opracowanie metody syntezy fluorogenicznych pochodnych ubikwityny ze zmodyfikowanym C-końcowym fragmentem sekwencji peptydowej, warunkującym selektywność względem wybranych DUBs.

Metody syntetyczne niskocząsteczkowych (małych) białek, jak np. ubikwityna, mogą polegać albo na syntezie całego łańcucha peptydowego danego białka na podłożu stałym i późniejszej jego funkcjonalizacji, bądź na syntezie krótkich fragmentów peptydowych i ich kondensacji z użyciem reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL).

Doktorant oparł się na tej drugiej strategii, zastosował metodę, która zakłada wykorzystanie hydrazydów acylu syntetyzowanych na nośniku stałym, a następnie przekształceniu ich *in situ* w tioestry, które poddawane są reakcji NCL.

Mechanizm reakcji tej (NCL) wymaga obecności w strukturze pierwszorzędowej białka reszty Cys, która nie występuje w Ub. Obecne są natomiast dwie reszty Ala (w poz.28 i 46), których obecność umożliwia zastosowanie strategii ligacja-desulfuryzacja, polegającej na syntezie trzech fragmentów hydrazydowych, których sekwencyjna kondensacja za pomocą reakcji NCL skutkuje powstawaniem mutantu Ub^{A28C,A46C} bez C-końcowej reszty glicyny, a następnie konwersji reszt Cys do reszt Ala w reakcji desulfuryzacji.

Doktorant przedstawił w Tabeli 2 dysertacji segmenty użyte do syntezy pochodnych ubikwityny, natomiast na rys.26 przedstawił autorski graficzny schemat totalnej syntezy fluorogenicznych pochodnych Ub.

Ponadto, Doktorant w dalszych trzech podrozdziałach pt., odpowiednio: ..1.Synteza hydrazynowych segmentów (rys.27); ..2.Kondensacja peptydowych hydrazydów z wykorzystaniem reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL) (rys.28,tab.3); ..3.Desulfuryzacja C-końca pochodnych Ub (rys.29,30A,B), opisał szczegółowo i przedstawił graficznie kolejne etapy procesów syntetycznych prowadzących ostatecznie do otrzymania pochodnych ubikwityny do badania MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3. W wyniku totalnej syntezy Doktorant otrzymał cztery warianty Ub z C-końcową grupą fluorogeniczną ACC, których schematy zostały przedstawione graficznie na Rysunku 30C.

W kolejnym podrozdziale pt. Badanie selektywności fluorogenicznych substratów Doktorant przedstawił przebieg i wyniki eksperymentu (rys.31), mającego na celu zbadanie wpływu substytucji aminokwasów w C-końcowej sekwencji LRGG na selektywność zsyntetyzowanych substratów.

Doktorant przeprowadzonym eksperymentem potwierdził selektywność zsyntetyzowanych substratów względem badanych enzymów. MERS-CoV PL^{pro} który oprócz Ub-ACC hydrolizuje jedynie substrat Ub.M2-ACC zawierający C-końcową sekwencję zaprojektowaną na podstawie profilu specyficzności substratowej tej proteazy.

UCH-L3 natomiast hydrolizuje wszystkie substraty z wyjątkiem Ub.M2-ACC. Ponadto, substrat referencyjny hydrolizowany był wolniej, niż obie fluorogeniczne pochodne nienaturalnej ubikwityny.

Kolejnym etapem badań Doktoranta było wyznaczenie parametrów kinetycznych dla zsyntetyzowanych substratów, wyniki przedstawił w Tabeli 4. Parametry kinetyczne wyznaczone dla MERS-CoV PL^{pro} pokazały, że enzym ma dwukrotnie wyższe powinowactwo wobec Ub-ACC niż do wariantu Ub.M2-ACC, jak to wynika z określonych wartości ich stałych K_M (Michaelisa), natomiast stała specyficzności dla nienaturalnego wariantu Ub.M2-ACC jest 1,6 razy wyższa, co wynika z prawie 4-krotnie wyższej stałej szybkości k_{kat} , dla tego wariantu niż dla substratu referencyjnego. UCH-L3 również cechuje najwyższe powinowactwo wobec Ub-ACC spośród wszystkich substratów. Substraty Ub.S1-ACC i Ub.S2-ACC cechuje wyższa specyficzność ze względu na wyższe wartości stałych szybkości k_{kat} niż dla substratu referencyjnego. Natomiast substrat Ub.M2-ACC jest słabo rozpoznawany przez UCH-L3, co wynika z wysokiej stałej K_M oraz stosunkowo niskiej stałej szybkości k_{kat} .

Wszystkie dotychczas osiągnięte wyniki badań zostały w pełni omówione i zinterpretowane wzorowo przez Doktoranta.

W dalszej części dysertacji znajduje się podrozdział pt. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne i specyficzne substraty dla DUBs.

Dyskusja prowadzona jest przez Doktoranta w rzeczowy, interesujący sposób, odnosząc wyniki własne do wyników uzyskiwanych przez innych obcojęzycznych badaczy. Jednocześnie Doktorant zwięźle wyszczególnił najważniejsze osiągnięcia tego etapu badań, wyjaśniając jednocześnie, które wyniki pozostają w zgodności z wcześniejszymi doniesieniami w tym zakresie, a które odbiegają od nich, wyjaśniając przypuszczalne przyczyny tych rozbieżności.

Kolejnym etapem badań Doktoranta była synteza markerów chemicznych do selektywnej wizualizacji badanych enzymów deubikwitynujących, poprzedzona zaprojektowaniem markerów chemicznych do selektywnej detekcji MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3.

Następnie Doktorant zbadał inhibicję rekombinowanych enzymów przez zsyntetyzowane markery chemiczne oraz określił ich selektywność, na koniec dokonał detekcji, zarówno MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 w lizatach komórkowych.

W dalszej części dysertacji jest podrozdział pt. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne markery chemiczne do detekcji enzymów deubikwitynujących. Celem tej ostatniej części badań, składających się na ocenianą rozprawę doktorską, było zaprojektowanie i synteza selektywnych markerów chemicznych opartych na cząsteczce ubikwityny, które w wyniku mutacji w obrębie C-końcowej sekwencji Ub, selektywnie znakują MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3.

Do zaprojektowania selektywnych markerów chemicznych Doktorant zastosował tą samą strategię, która umożliwiła mu otrzymanie selektywnych i specyficznych substratów

dzięki wprowadzeniu nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końca pochodnych Ub. Strategia ta jest w pełni nowatorska.

Dotychczas, jak podkreśla Doktorant, tylko jeden zespół badawczy zaprezentował strategię syntezy selektywnego markera chemicznego do znakowania UCH-L3, ale ich metoda polegała na analizie komputerowej struktur trzeciorzędowych UCH-L3 i jego krewniaka UCH-L1. Następnie zaprojektowali *in silico* wariant Ub, który faworyzowałby wiązanie się jedynie do UCH-L3.

Doktorant bardzo rzeczowo i zwięźle poprowadził dyskusję, wielokrotnie odnosząc się do wcześniejszych doniesień innych badaczy w tym zakresie, często również je komentując. Ze względu na wysoką rangę i znaczenie sentencji zwięźlającą Dyskusję zacytuje ją za Doktorantem dla podkreślenia znaczenia tego osiągnięcia „w niniejszej rozprawie wykazano, że wiedza na temat specyficzności substratowej tylko dwóch spośród enzymów deubikwitynujących umożliwia zaprojektowanie wysoce selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych. Selektywność i specyficzność wariantów Ub ze zmodyfikowanymi C-końcowymi fragmentami sekwencji peptydowych łańcucha ubikwityny potwierdzono w eksperymentach z użyciem rekombinowanych enzymów jak i lizatów komórkowych”. Odkrycia te zapewne będą miały korzystny wpływ na dalszy postęp badań w tym kierunku.

W dalszej części dysertacji znajduje się rozdział Podsumowanie i wnioski końcowe. Podsumowanie Doktorant opracował wzorowo.

Wnioski końcowe w pełni odpowiadają na postawiony cel badawczy z zadaniami szczegółowymi. Większość wniosków końcowych ma charakter nowości naukowej, w tym wniosek stwierdzający, że C-końcowy rejon Ub jest kluczowy dla jej wiązania się do miejsca aktywnego badanych enzymów deubikwitynujących oraz fakt, że możliwe jest modulowanie selektywności oraz specyficzności narzędzi chemicznych dla enzymów deubikwitynujących poprzez wprowadzanie wyselekcjonowanych reszt aminokwasowych, w tym nienaturalnych, w obrębie tego regionu.

Bez wątpienia nowością naukową jest również fakt, że w niniejszej dysertacji opisano nową strategię otrzymywania selektywnych wariantów Ub, które dzięki zastosowaniu totalnej syntezy chemicznej, mogą zostać przekształcone w substraty, markery chemiczne oraz inhibitory selektywnie rozpoznawane przez wybrane enzymy deubikwitynujące. Do zalet tej metody projektowania narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących należą:

- 1) zastosowanie różnorodnych nieproteinogenicznych aminokwasów prowadzi do wzrostu selektywności oraz specyficzności otrzymanych wariantów Ub względem pochodnych Ub typu dzikiego;
- 2) wykorzystanie totalnej chemicznej syntezy pochodnych Ub umożliwia dowolną funkcjonalizację C-końcowej grupy karboksylowej oraz N-końcowej grupy aminowej;
- 3) przedstawiona strategia nie jest ograniczona jedynie do enzymów deubikwitynujących. Użyta w rozprawie biblioteka HyCoSul. może zostać wykorzystana do zbadania preferencji substratowych również innych enzymów wykazujących specyficzność wobec motywu XXGG;
- 4) w połączeniu z innymi metodami projektowania selektywnych wariantów Ub *in silico* lub z wykorzystaniem prezentacji fagowej metoda ta potencjalnie może doprowadzić do uzyskania jeszcze bardziej specyficznych oraz selektywnych narzędzi do badania enzymów z grupy deubikwitynaz.

W dalszej części dysertacji w rozdziale Część eksperymentalna Doktorant przedstawił szczegółowo informacje dotyczące źródła zakupu odczynników i ośrodków, które wyekspresjonowały i oczyszczały zrekombinowane enzymy UCH-L3 oraz MERS-CoV PL^{pro},

jak również wysokorozdzielczych widm masowych zsyntetyzowanych związków chemicznych, widm magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H i analiz LC-Ms otrzymanych związków.

W rozdziale tym Doktorant przedstawił również szczegóły procedur chemicznych dotyczących: 1) syntezy Fmoc-ACC-OH; 2) Syntezy zdefiniowanej biblioteki tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych P2; 3) Określenia profilu specyficzności substratowej MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 w pozycjach P4-P2; 4) Syntezy tetrapeptydowych substratów dla DUBs; 5) Wyznaczenia parametrów kinetycznych dla tetrapeptydowych substratów; 6) Zbadania selektywności tetrapeptydowych substratów względem DUBs; 7) Syntezy pochodnych ubikwityny, w tym hydrazydowych segmentów peptydowych, reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL), reakcji rodnikowej desulfuryzacji, syntezy reaktywnej grupy wiążącej $\text{H}_2\text{N-Gly-VME}$, syntezy fluorogenicznej grupy $\text{H}_2\text{N-Gly-ACC}$, Derywatyzacji C-końca pochodnych Ub; 8) Badania selektywności substratów pochodnych Ub; 9) Wyznaczenia parametrów kinetycznych dla substratów pochodnych Ub; 10) Deteckji DUBs w lizatach komórkowych; 11) Pomiarów inhibicji DUB przez markery chemiczne; 12) Wyznaczenia k_{obs}/I dla markerów chemicznych.

Zastosowane w badaniach metody i narzędzia badawcze są w pełni odpowiednie do postawionych zadań, w pełni poprawne pod względem metodologicznym i wyczerpująco scharakteryzowane pod względem postawionego celu i realizacji przebiegu badań.

Oryginalna i na bardzo wysokim poziomie naukowym dysertacja dowodzi, że Doktorant miał do dyspozycji bardzo nowoczesny warsztat laboratoryjny, umożliwiający zrealizowanie tego typu badań naukowych. Ponadto sądzę też, że zasadnicze znaczenie miała duża wiedza, umiejętności i docieklivość badawcza mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego w osiągnięciu sukcesu badawczego jakim jest przedstawiona do oceny nowatorska i bardzo wartościowa rozprawa doktorska.

Mgr. inż. Mikołaj Żmudziński wykazał się dużą umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych i umiejętnością właściwego udokumentowania swoich osiągnięć badawczych. Warto też dodać, że opracowanie jest niezwykle obszerne, ale jednocześnie napisane zwięźle i nie zawiera niepotrzebnej ornamentyki i rozwlekłych opisów.

W dalszej części dysertacji znajduje się rozdział Struktury aminokwasów użytych w bibliotece HyCoSuL oraz w zdefiniowanej bibliotece P2 z wzorami chemicznymi tych związków, następnie znajduje się Wykaz stosowanych skrótów, po czym przedstawiony jest Dorobek naukowy i aktywność dodatkowa Doktoranta oraz Piśmiennictwo, które kończy pracę.

W rozdziale Piśmiennictwo przegląd literatury naukowej ukierunkowanej na temat rozprawy doktorskiej jest znaczny, liczy 215 pozycji obcojęzycznych i jest bardzo aktualne. Autor podaje w większości literaturę najnowszą, z ostatnich 10 lat, która stanowi 54,89% wszystkich publikacji, w tym z ostatnich 5 lat stanowią 24,19%, a do 10 lat 30,70%, natomiast literatura starsza od 10 do 20 lat wcześniejszych stanowi 32,09% wszystkich publikacji, a jeszcze starsza niż 20 lat stanowi 13,02% wszystkich publikacji przedstawionych w Piśmiennictwie przez Doktoranta. Piśmiennictwo jest w pełni obcojęzyczne.

Wykorzystanie piśmiennictwa podczas opracowywania całej rozprawy doktorskiej oceniam jako wzorowe, dzięki temu, że było przydatne Autorowi niemal w każdym rozdziale, podrozdziale podczas ich opracowywania, co było sukcesywnie dokumentowane odpowiednimi odnośnikami,

Opracowanie redakcyjne dysertacji jest wzorowe, nie dostrzegłam błędów stylistycznych, interpunkcyjnych, jak również powszechnych w rozprawach tzw. literówek. Jedynym niewielkim niedociągnięciem, na które zwróciłam uwagę już na początku pracy nad

oceną dysertacji, dotyczyło układu rozprawy doktorskiej, co wcześniej opisałam. Niemniej jednak, w trakcie postępu realizacji oceny pracy, stopniowo uświadamiałam sobie, że zastosowany przez Autora układ pracy jest zasadny, ze względu na uzyskaną przejrzystość i dalej potrzebę utrzymania przejrzystości postępu przekazu danych z kolejnych etapów pracy badawczej, składających się na całość obszernej i wielowątkowej pracy doktorskiej mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego.

Mam też uwagi do wniosków, co nie ma wpływu na ostateczną ocenę pracy, ale chcę zwrócić na to uwagę. Uważam, że przynajmniej najważniejsze wnioski, nieco uogólnione, powinny być punktowo wyszczególnione pod koniec w treści tego rozdziału, brakuje mi tego w ocenianej pracy doktorskiej.

Podobnie uważam, że Streszczenie powinno być zamieszczone w każdej dysertacji, wówczas zapewne, biblioteka uczelniana byłaby zadowolona.

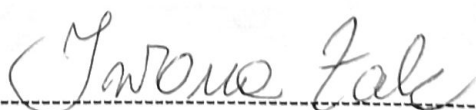
Podsumowując, oceniana praca doktorska stanowi bardzo staranne i w pełni wyczerpujące opracowanie zagadnienia badawczego. Znacząco przyczynia się do zaktualizowania i poszerzenia wiedzy dotyczącej biochemii metodologicznej - narzędzi badawczych nad proteazami. Proteazy hydrolizują białka do peptydów i aminokwasów i mają zasadnicze znaczenie w bardzo wielu procesach, zachodzących w organizmach żywych, w tym w organizmie człowieka, jak krzepnięcie, odporność, stany zapalne, apoptoza, embriogeneza, rozwój i wielu innych. W warunkach fizjologicznych mają istotny udział w utrzymaniu zdrowia, ale w warunkach odbiegających od równowagi proteazy mogą przyczyniać się też do rozwoju różnorodnych chorób, w tym np. nowotworowych.

Sądzę, że powyższe dane podkreślają wyraźnie wagę i znaczenie osiągnięć ocenianej rozprawy.

Na podstawie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pt. Opracowanie strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących stwierdzam, że spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) Niniejszym mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pana

mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu, że rozprawa doktorska mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego stanowi oryginalne rozwiązanie naukowego problemu badawczego i jest nowatorskim osiągnięciem naukowym, dostarczającym selektywnych narzędzi badawczych nad proteazami i że może przyczynić się do przyspieszenia dalszego rozwoju badań podstawowych w tym zakresie wraz z aspektami praktycznymi, szczególnie biomedycznymi i że jednocześnie znacząco przyczynia się do zaktualizowania i poszerzenia wiedzy dotyczącej metodologicznej biochemii zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Pana mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego.



prof. zw. dr hab. n. med. Iwona Małgorzata Żak