

dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 6 maja 2024 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

### **Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Radosława Gładysza**

#### **zatytułowanej „Badanie rozszerzonego profilu specyficzności ludzkich proteasomów”**

Prawie wszystkie reakcje chemiczne, związane z funkcjonowaniem organizmów żywych, zachodzą z udziałem enzymów. Jedną z klas enzymów są proteazy, które katalizują hydrolizę wiązań peptydowych. Ze względu na swoją funkcję uczestniczą one w wielu istotnych procesach biologicznych, między innymi: apoptozie, kaskadzie krzepnięcia krwi, odpowiedzi immunologicznej czy wewnątrzkomórkowej degradacji białek. Ludzki proteasom konstytutywny i immunoproteasom odgrywają kluczową rolę w procesie degradacji białek oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej, a zaburzenia w funkcjonowaniu tych enzymów mogą prowadzić do rozwoju takich chorób jak: nowotworowe, neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne. Jedną z obiecujących strategii terapeutycznych w wypadku tych chorób jest hamowanie aktywności proteasomów dlatego prowadzone są badania mające doprowadzić do otrzymania ich selektywnych inhibitorów. Do tego nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr. inż. Radosława Gładysza, wykonaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Marcina Drąga. Tematykę pracy uważam za aktualną i ważną. Określenie rozszerzonych profili specyficzności substratowej podjednostek ludzkich proteasomów może przyczynić się do opracowania nowych narzędzi diagnostycznych w leczeniu zależnych od nich zaburzeń, a także otrzymania leków o zwiększonej specyficzności względem wybranych podjednostek katalitycznych.

Recenzowana rozprawa napisana została na 165 stronach, a jej układ jest typowy dla prac doktorskich z dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych. W rozprawie wyróżniono kilka części. Na początku znajduje się przegląd literaturowy, po nim Doktorant przedstawił cel pracy, kolejny to rozdział zatytułowany „Badania własne”, w którym opisał przeprowadzone syntezy

oraz przedstawił wyniki badań określających specyficzną substratową kieszeni podjednostek obu proteasomów. Kolejne rozdziały to „Podsumowanie i wnioski końcowe” oraz „Część eksperymentalna”. Na końcu pracy umieszczone zostały wzory chemiczne 125 aminokwasów, których pochodnych użyto do syntezy bibliotek substratów, spis dorobku naukowego Doktoranta oraz wykaz literatury cytowanej – 96 pozycji.

Przeгляд Literaturowy dobrze wprowadza w tematykę badań własnych Doktoranta. Znajduje się w nim szczegółowa charakterystyka proteasomu 26S i immunoproteasomu, a także omówione zostały substraty i inhibitory obu proteasomów. Przy okazji omawiania badań, których celem było określenie specyficzności substratowej proteasomu, Doktorant zaprezentował wyniki badań bibliotek substratów otrzymanych jedną z metod stosowanych w chemii kombinatorycznej – metodą z wykorzystaniem pozycyjnego skanowania, oraz bibliotek wewnątrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów. Poziom merytoryczny tej części rozprawy jest właściwy dla prac doktorskich i dobrze przygotowuje do lektury rozdziału, w którym omówione zostały badania własne. Umieszczone w pracy czytelne rysunki, ułatwiają lekturę tekstu.

Celem pracy doktorskiej mgr. inż. Gładysza było określenie specyficzności substratowej kieszeni S6-S2 oraz S1'-S2' immunoproteasomu oraz S6-S5 i S1'-S2' jednostki katalitycznej 20S proteasomu.

W pierwszym etapie badań Doktorant określił specyficzną substratową kieszeni S4-S2 trzech katalitycznych podjednostek ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  i  $\beta 5i$ ) ludzkiego immunoproteasomu. W tym celu wykorzystał otrzymane wcześniej przez grupę prof. Marcina Drąga hybrydowe biblioteki substratów fluorogenicznych.

Kolejnym etapem pracy było zaprojektowanie i synteza czterech bibliotek hybrydowych, mających umożliwić identyfikację reszt aminokwasowych w pozycjach P5 i P6 substratów, wiążących się specyficznie z katalitycznymi podjednostkami immunoproteasomu i proteasomu 20S ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 5$ ).

Podczas projektowania bibliotek, Doktorant skorzystał z profili specyficzności substratowej proteasomu 20S, otrzymanych przez dr inż. Wioletę Rut. Synteza bibliotek substratów przeprowadzona została na fazie stałej. Każdy otrzymany peptydowy substrat, zawierał na C-końcu (w pozycji P1') fluorofor, (kwas 7-aminokumaryno-4-octowy), a na N-końcową grupę aminową wprowadzono grupę acetylową. Po odszczepieniu składników biblioteki od polimeru, otrzymane substraty poddano badaniom mającym na celu ustalenie,



które z aminokwasów w pozycjach P5 i P6 substratów są najlepiej rozpoznawane przez podjednostki katalityczne proteasomu 20S i immunoproteasomu.

W celu ustalenia specyficzności substratowej kieszeni S1' i S2' obu proteasomów zaprojektowane i otrzymane zostały cztery biblioteki wewnątrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów, w których w pozycjach P1' i P2' umieszczono aminokwasy różniące się długością i budową łańcucha bocznego. Łącznie doktorant otrzymał 768 substratów, które w sekwencji zawierały parę donor-akceptor, czyli odpowiednio kwas 7-aminokumaryno-4-octowy i N<sup>ε</sup>-(2,4-dinitrofenylo)-L-lizynę. Wszystkie otrzymane substraty tej serii zostały oczyszczone metodą HPLC, scharakteryzowane przy zastosowaniu LC-MS, a następnie poddane badaniom enzymatycznym, które pozwoliły na określenie specyficzności substratowej kieszeni S1' i S2' podjednostek  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i,  $\beta$ 5i immunoproteasomu i  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5 proteasomu 20S. W tym miejscu muszę podkreślić, że Doktorant udowodnił, że bardzo dobrze opanował techniki eksperymentalne związane z chemiczną syntezą peptydów. Fakt, że z powodzeniem otrzymał, oczyścił i scharakteryzował tak dużą liczbę peptydów-świadczy o tym, że bardzo dobrze potrafi zaplanować i zorganizować pracę w laboratorium. Doktorant wykazał się niesamowitą wręcz pracowitością i cierpliwością, bo oczyszczenie i scharakteryzowanie w tym wypadku 768 peptydów (każdy zbudowany z 11 reszt aminokwasowych), a łącznie ponad 800 peptydów to jest wyzwanie, a przecież to był tylko jeden z etapów pracy doktorskiej. Z powinności recenzenta, muszę zauważyć, że szkoda, że Doktorant nie umieścił w pracy (bądź w załączniku) żadnego chromatogramu HPLC, czy też widma MS otrzymanych substratów, ani nie przedstawił warunków ich oczyszczania, w tym stosowanych podczas oczyszczania gradientów. Uważam, że umieszczenie kilku przykładowych chromatogramów surowych i oczyszczonych substratów każdej serii wzbogaciło by pracę i pokazało, z czym Doktorant musiał się zmierzyć.

Po ustaleniu specyficzności substratowych badanych kieszeni obu proteasomów Doktorant zaprojektował (korzystając z wyników przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań) i przeprowadził syntezę 5 serii (po 7 peptydów w serii) substratów peptydowych zawierających od trzech do trzynastu reszt aminokwasowych. Określenie ich aktywności wobec badanych proteasomów pozwoliło Kandydatowi na określenie wpływu długości łańcucha peptydowego na aktywność w stosunku do podjednostek katalitycznych obu proteasomów.

W ostatnim etapie pracy, wykorzystując wyniki swoich dotychczasowych badań, Doktorant zaprojektował siedem potencjalnie selektywnych fluorogenicznych substratów oraz

specyficzny inhibitor dla podjednostki  $\beta$ 1i immunoproteasomu. I tu proszę o wyjaśnienie, dlaczego projektując substraty selektywne wobec wymienionej podjednostki wybrano di-, a nie tripeptydy, wobec których podjednostka  $\beta$ 1i wykazała największą aktywność.

Lektura rozdziałów trzeciego i czwartego, w których Doktorant omówił wszystkie przeprowadzone syntezy, wykonane badania specyficzności substratowej w stosunku do obu proteasomów, podsumował uzyskane wyniki oraz wyciągnął wynikające z nich wnioski, a także rozdziału piątego (opis przeprowadzonych eksperymentów) upewniają, że Doktorant zrealizował założone cele pracy doktorskiej.

Rozprawa została napisana w sposób logiczny, na ogół poprawnym językiem, jednak znajduje się w niej trochę błędów literowych i niefortunnych zwrotów. W trakcie czytania pracy nasunęło mi się kilka uwag. Jedną z uwag jest ta, że w pracy brakuje zestawienia użytych w pracy skrótów, co ułatwiłoby jej czytanie, a także streszczenia pracy. Jeśli chodzi o błędy i nieścisłości, to niektóre z nich, z obowiązku recenzenta, przedstawiłam poniżej:

1. str. 29, na rys.12 jest błąd we wzorach grup Boc, brakuje atomu tlenu
2. na str. 57 znajduje się zdanie „W pozycji P5 przyłączono równomolową mieszaninę 19 aminokwasów z wykorzystaniem HOBt i N,N'-diizopropylkarbodiimidu (DICI)” itd., które nie opisuje tego co faktycznie wykonano. Lepiej by było, gdyby napisano: „Pozycję P5 poddano acylowaniu równomolową mieszaniną 19 pochodnych aminokwasowych” itd.
3. na str. 96 jest błąd w nazwie łącznika, Peg-4 to nie jest *glikol polietylenowy* lecz poli(glikol etylenu) lub politlenek etylenu.
4. str. 97, na rys. 59 jest błąd we wzorze (dimetylosulfonylo)fosfonianu dietylu, oraz błędnie napisano wzór końcowego produktu. Uważam też, że podpis pod rysunkiem nie jest właściwy, bo rysunek przedstawia schemat syntezy winylosulfonowej pochodnej leucyny, a nie winylosulfonowej grupy wiążącej. Na tej stronie jest też błąd w nazwie zastosowanej w syntezie żywicy. Jak widać na rys. 60 (str. 98) zastosowano żywicę chloro-(2'-chloro)tritylową a nie 2-chlorotrytylową.
5. Muszę też zwrócić uwagę na to, że reakcja usuwania grupy ochronnej Fmoc, to nie jest reakcja hydrolizy (str. 108, 115). To samo dotyczy odszczepiania peptydu od żywicy, to też nie jest reakcja hydrolizy (str. 110).
6. str. 121 w tabeli 14 w tytule drugiej kolumny powinno być napisane: aminokwas w pozycji P2', a nie P1', to samo dotyczy tabeli 16 na str. 128.



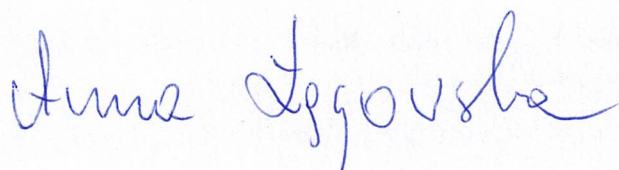
7. str. 124 w podpisie tabeli 15 i w sekwencji aminokwasowej podbiblioteki dedykowanej podjednostce  $\beta$ 1i (pozycja P1'), w pozycji P2' umieszczono Ala, a w tabeli 3 str. 71 w pozycji P2' jest Ser, którą więc resztę umieszczono w tej pozycji podbiblioteki?

8. str. 150, w tabeli 21 umieszczono błędne wartości obliczonych jonów molekularnych odpowiadających fragmentom inhibitora podjednostki  $\beta$ 1i ludzkiego immunoproteasomu. Niestety, wyniki uzyskane podczas analiz MS potwierdziły je. Proszę o wyjaśnienie tego faktu i pokazanie wyników analizy MS obu składowych i inhibitora.

Dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości nie mają istotnego wpływu na moją ogólną wysoką ocenę wartości naukowej pracy. Prawdopodobnie wynikają one z bardzo dużego pośpiechu w redakcji rozprawy.

Podsumowując, wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w rozprawie. Zostały one dobrze zaplanowane i wykonane. Zakres wykonanych badań jest szeroki: od wielu pracochłonnych syntez bibliotek jak i serii substratów, przez ich oczyszczenie i wykonanie fizykochemicznej analizy, do badań określających aktywności substratowe w stosunku do obu proteasomów. Na uznanie zasługuje bardzo duża objętość pracy wykonanej przez Kandydata, a także poziom przygotowania merytorycznego, który umożliwił jej zaplanowanie, wykonanie oraz interpretację uzyskanych wyników. Wszystkie umiejętności jakimi wykazał się Doktorant pozwalają stwierdzić, że jest On dobrze przygotowany do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Radosława Gładysza zatytułowana „Badanie rozszerzonego profilu specyficzności ludzkich proteasomów” stanowi cenny wkład w naukę i spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 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.), dlatego zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. inż. Radosława Gładysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Anna Jęgorvska', is written at the bottom of the page.