

Recenzja
pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Radosława Gładysza
pt. „Badanie rozszerzonego profilu specyficzności ludzkich
proteasomów”

Recenzowana rozprawa doktorska jest efektem prac prowadzonych przez Pana mgr. inż. Radosława Gładysza w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Drąga.

Tematyka badań opisanych w recenzowanej rozprawie związana jest z określaniem specyficzności substratowej proteaz budujących ludzki proteasom albo immunoproteasom, z nadrzędnym celem przyświecającym tym staraniom, jakim jest umożliwienie projektowania związków specyficznie blokujących aktywność proteolityczną poszczególnych podjednostek do zastosowania w eksperymentalnych podejściach terapeutycznych. Uściślając, celem niniejszej pracy było zgłębienie wiedzy na temat wspomnianej specyficzności substratowej poprzez zbadanie preferencji wiążących substrat kieszeni S6-S2 podjednostek ludzkiego immunoproteasomu, kieszeni S6 i S5 podjednostek ludzkiego proteasomu 20S oraz kieszeni S1'-S2' podjednostek obu tych kompleksów.

Dla zrealizowania tego celu przeprowadzono opisane w rozprawie doświadczenia biochemiczne, mające na celu sprawdzenie wydajności reakcji enzymatycznej katalizowanej przez poszczególne podjednostki proteolityczne w zależności od sekwencji aminokwasowej stosowanej do tego celu sondy peptydowej. Sporządzenie obszernych bibliotek takich sond, z jednej strony zaprojektowanych jako optymalne dla poszczególnych podjednostek proteolitycznych, a z drugiej strony zróżnicowanych pod względem sekwencji w odpowiadających badanym kieszeniom pozycjach sekwencji aminokwasowej (P6-P2 i P1'-P2' dla immunoproteasomu oraz P6-P5 i P1'-P2' dla proteasomu 20S) dało Doktorantowi możliwość scharakteryzowania specyficzności substratowej badanych podjednostek proteasomu 20S i immunoproteasomu. Na uwagę zasługuje fakt, że poza większością spośród 20 naturalnych L-aminokwasów do konstrukcji bibliotek wykorzystano także D-

aminokwasy oraz aminokwasy niestandardowe, co może pozwolić na obszerniejszą optymalizację struktur chemicznych potencjalnych inhibitorów projektowanych w przyszłości.

W znacznej mierze podczas doboru aminokwasów stałych w sekwencjach sond stanowiących projektowane biblioteki korzystano z cytowanej, wcześniejszej pracy doświadczalnej, zrealizowanej w Zespole (publikacja Rut i wsp.), prawdopodobnie błędnie cytowanej w rozprawie na stronach 55 oraz 71 jako odwołanie [49] (Nazif i Bogyo, PNAS, 2001). Umieszcza to recenzowaną rozprawę w obrębie zakrojonego na szerszą skalę projektu, realizowanego przez lata w Zespole. W przypadku biblioteki β 1i doktorant przy jej projektowaniu skorzystał z opisanych w rozprawie własnych wstępnych wyników, dotyczących specyficzności substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2.

Wskazany zatem w rozprawie doktorskiej podjęty problem naukowy jest niedostateczna wiedza na temat specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P6-P5 i P1'-P2' substratu, a wymaganym ustawowo oryginalnym rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie biblioteki sond, rozbudowanej w porównaniu do wcześniejszych raportów o aminokwasy szeregu D i inne aminokwasy niestandardowe, co stanowi rozwinięcie badań prowadzonych wcześniej (Rut i wsp, Gruba i wsp.).

Recenzowana rozprawa doktorska ma formę klasycznej pracy pisemnej sporządzonej na 165 stronach. Składa się ona z 8 rozdziałów, wśród których najobszerniejsze to Wstęp teoretyczny (30 stron, 18,2 % pracy), Badania własne (59, 35,8 % pracy) i Część eksperymentalna (47 stron, 28,5 % pracy). W pracy dostrzeżono bardzo nieliczne błędy językowe i w opinii Recenzenta nie ma potrzeby skupiać się na ich dokładnym wskazywaniu, ponieważ zrozumiałe jest, że są one nieodzownym elementem tak obszernych prac pisemnych.

Opisywane w rozprawie doktorskiej zagadnienia zobrazowane są za pomocą czytelnych, kolorowych rycin i wykresów oraz schematów opisywanych struktur chemicznych. Rozdział zatytułowany Wstęp teoretyczny wprowadza merytorycznie czytelnika do problematyki badawczej, której dotyczy rozprawa i podsumowuje dotychczasową wiedzę naukową w zakresie specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek badanych kompleksów białkowych oraz dostępnych inhibitorów ich

aktywności katalitycznej. W recenzowanej rozprawie zabrakło wymaganego ustawowo streszczenia w języku angielskim, ale zapewne stosowny dokument zawierający takie streszczenie został sporządzony w formie oddzielnego pisma i dołączony do dokumentacji postępowania o nadanie stopnia doktora.

Opisane w rozprawie doktorskiej wyniki dostarczają bardzo cennych danych dotyczących różnic w specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek ludzkiego proteasomu i immunoproteasomu. Dane te z całą pewnością stanowią istotny wkład zarówno w rozwój wiedzy podstawowej dotyczącej tychże kompleksów białkowych, jak i dają możliwość wykorzystania tej wiedzy, w zestawieniu z dostępnymi w literaturze danymi, do projektowania sond specyficznym celujących w kieszenie wiążące poszczególnych podjednostek. Potwierdzeniem wartości tych informacji było zaprojektowanie substratów optymalnych dla podjednostki $\beta 1i$ i wykazujących obserwowalną specyficzność względem immunoproteasomu w porównaniu do proteasomu 20S. W kolejnym kroku, opierając się na tej obserwacji, zaprojektowano cząsteczkę inhibitora, zdolnego do hamowania aktywności immunoproteasomu w stężeniach niższych niż proteasomu 20S. Sam inhibitor, choć dość słaby (IC_{50} wynosi 12,1 μM), wskazuje możliwości, jakie otwierają się przed Zespołem w kontekście prowadzonych w nim badań. Zanim jednak rozwijający się projekt rozpędzi się na dobre, chciałbym poprosić Doktoranta o odpowiedź na kilka pytań, jakie pojawiły się na etapie zapoznawania się z recenzowaną rozprawą doktorską.

Uzyskane w trakcie realizacji studiów doktorskich Pana Radosława Gładysza wyniki wskazały na dość znikomą specyficzność substratową dla większości badanych podjednostek w pozycjach P6-P5, co zostało podkreślone także w rozdziale podsumowującym. Czy zatem uzyskana w wyniku przeprowadzonych tu analiz wiedza dotycząca ściśle tych pozycji sekwencji aminokwasowej może zostać wykorzystana do projektowania związków biologicznie czynnych?

Dla podjednostek $\beta 1i$, $\beta 2i$ oraz $\beta 5i$ wyniki wskazują na wyraźny brak tolerancji dla obecności aminokwasów szeregu D w pozycjach P2 i P3, co nie zostało jednak skomentowane przez Autora rozprawy. Czy istnieją jakieś przesłanki, być może strukturalne, dla tak wyraźnej selektywności wspomnianych podjednostek w zakresie pozycji P3-P2 w kierunku aminokwasów szeregu L? Czy można wytłumaczyć dlaczego takiej

selektywności nie obserwujemy dla pozycji P6-P5, a w pozycji P4 selektywność ta wydaje się silnie zależna od rodzaju testowanej podjednostki?

Opis specyficzności substratowej podjednostek $\beta 1$ i $\beta 1i$ w pozycjach P1' i P2' sprawia wrażenie pewnej niekonsekwencji. W przypadku podjednostki $\beta 1$ zarówno dla pozycji P1' (str. 72 rozprawy, dot. Rys. 42) jak i dla pozycji P2' (strona 76 rozprawy, dot. Rys. 45) Autor wskazuje na „wąską specyficzność substratową”. W przypadku podjednostki $\beta 1i$ dla obu tych pozycji Autor stwierdza, że podjednostka ta „nie wykazuje specyficzności substratowej” (str. 80 rozprawy, dot. Rys. 48 oraz str. 84, dot. Rys. 51). Spoglądając na odpowiednie wyniki można jednak odnieść wrażenie, że podjednostka $\beta 1i$ również wykazuje specyficzność substratową, gdyż względem około połowy sond nie wykazuje żadnej aktywności enzymatycznej. Na jakiej podstawie Autor dokonał stwierdzenia czy dana podjednostka wykazuje czy nie wykazuje specyficzność substratową? Czy wykonywany był jakiś test matematyczny pomagający w ocenie różnorodności w zbiorze otrzymanych wyników w obrębie biblioteki?

Na uwagę zwraca także konstrukcja sond dla podjednostki $\beta 1i$. Wyniki uzyskane dla bibliotek w pozycji P1' (Rys. 48) oraz P2' (Rys. 51) zdają się podważać optymalność umiejscowienia Ser w pozycji P2' dla pierwszej, oraz Lys w pozycji P1' dla drugiej biblioteki. Z wyników dla drugiej biblioteki odczytać można, że obecność Ser w pozycji P2' sprawia, że sonda jest prawie nierozpoznawalna jako substrat dla podjednostki $\beta 1i$. Z wyników dla pierwszej natomiast dowiadujemy się, że obecność Lys w pozycji P1' sprawia, że aktywność enzymu względem takiej sondy wynosi 0%. Czy zatem wskazany w pracy sposób zaprojektowania sond nie był błędny? Czy uzyskane w tym zestawie wyników dane nie stoją ze sobą w pewnym sensie w sprzeczności? Czy nie należało by powtórzyć doświadczenia z sondami zaprojektowanymi na nowo?

W Części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej Autor wskazuje, że zarówno dla testowania specyficzności substratowej w pozycjach P2-P4 i P5-P6 (str. 114), jak i w pozycjach P1'-P2' (str. 147) „każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie”. We wcześniejszych częściach pracy spotykamy natomiast zapis „pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie”. Czy istniały więc pomiary, które przeprowadzono jedynie dwukrotnie? Jeśli tak, to z jakiej przyczyny? Czym są słupki błędów zamieszczone na poszczególnych wykresach?

Rozdział Podsumowanie i wnioski końcowe, zajmujący jedynie 4 strony rozprawy doktorskiej (zaledwie 2,5 % pracy) pozostawia w czytelniku pewien niedosyt. W znacznej mierze stanowi on jedynie ponownie zebrane i w pewnym stopniu uszeregowane dane dotyczące specyficzności substratowej badanych podjednostek. Pomimo częstego odnoszenia się w tekście do wcześniejszej publikacji Rut i wsp., JMC, 2018 (odnośnik nr 52) i, jak wskazuje Autor rozprawy, częściowego pokrywania się przeprowadzonych w rozprawie i w publikacji Rut i wsp., Biol. Chem., 2016 (odnośnik nr 53) analiz (specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycjach P5 i P6 w zakresie 18 naturalnych aminokwasów) brak jest w tym rozdziale komentarzy dotyczących zbieżności lub rozbieżności obu tych zestawów danych. Czy uzyskane przez Doktoranta dane potwierdziły wcześniejsze ustalenia w tej materii?

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa zawiera elementy oryginalnego rozwiązania problemu naukowego i prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie naukowej Nauki Chemiczne. Większość uwag zawartych w niniejszej recenzji należy traktować jako zaproszenie do dyskusji w trakcie obrony doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim 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.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne i Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pana mgr. inż. Radosława Gładysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.