



**Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków  
Lecznicych z Pracownia Modelowania Komputerowego**

*Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,  
Tel./fax. 0-81-488 70 70, 488 70 72*



**Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology  
of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab**

*Faculty of Pharmacy  
Medical University of Lublin  
4A Chodźki str., 20-093 Lublin, Poland  
Phone/fax \*048-81-488 70 70, 488 70 72*

---

Lublin, 10-04-2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Mgr inż. Justyny GRZYMSKIEJ**

**z Katedry Chemii Biologicznej i Bioobrazowania,  
Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej**

**pt. „Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych na aktywność wybranych  
enzymów proteolitycznych.”**

Spośród wielu możliwych modyfikacji potranslacyjnych fosforylacja jest procesem najpowszechniejszym, wprowadzającym dodatkowy podwójny ładunek ujemny w łańcuchu bocznym. Inne modyfikacje różnicują strukturę naturalnych aminokwasów rozszerzając znacznie ich pulę jako elementów budulcowych białek. Niektóre enzymy, szczególnie proteolityczne, są w stanie rozpoznawać takie modyfikowane aminokwasy, co decyduje nie tylko o sile ich działania ale przede wszystkim ich specyficzności.

Praca doktorska mgr Grzymskiej dotyczy analizy łączącego się z tymi właściwościami problemu. Po pierwsze doktorantka badała wpływ metylacji i fosforylacji reszt aminokwasowych w pozycji P1 na aktywność wybranych katepsyn – L, B, V, S i K. Badała także wpływ fosforylacji seryn i treonin na aktywność kaspazy 3 i 7. Badania te pozwoliły na określenie preferencji substratowych badanych katepsyn oraz otrzymanie zestawu tetrapeptydów fluorogenicznych specyficznych dla katepsyny S i markera chemicznego selektywnego w stosunku do tej katepsyny.

Badania oprócz projektowania i syntezy obejmowały także analizę kinetyczną ligandów.

W oparciu o przegląd literaturowy doktorantka zapoznała się z grupą proteaz cysteinowych – kaspazy 3- i 7-, oraz katepsyn S. Informacje te poszerzyła także o metody określania specyficzności substratowej, markery chemiczne do badania enzymów, szczególnie fluorescencyjne a także modyfikacje potranslacyjne. Wiedza ta prezentująca pozytywy ale też ograniczenie poszczególnych metod pozwoliła na właściwe zaplanowanie procesu badawczego oraz analizę wyników prowadzącą do odpowiednich wniosków.

Ponieważ zmiany potranslacyjne, np. metylacja czy fosforylacja mogą, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, wywoływać bardzo zróżnicowane efekty komórkowe, konieczne jest ich badanie. Oba procesy, na przykład, mogą chronić zwijające się białko przed przedwczesną degradacją. Natomiast fosforylacja może służyć także przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych czy aktywować miejsca aktywne enzymów. Zmiany potranslacyjne prowadzą także do otrzymywania nowych form aminokwasów poszerzając znacznie pulę aminokwasów naturalnych. Wydaje się interesujące, czy modyfikowane aminokwasy będą rozpoznawane przez proteazy i czy ich obecność ułatwi czy utrudni degradację białek.

Te cele postawiła sobie doktorantka korzystając z metod oraz bazy naturalnych i nienaturalnych aminokwasów, którymi dysponuje promotor tej rozprawy, Kierownik Katedry, profesor Marcin Drąg.

Cel, który postawiła sobie doktorantka podzielony został na dwie części. Pierwsza dotyczyła badania katepsyny S i innych katepsyn. Objęła ona określenie wpływu metylacji i fosforylacji pozycji P1 substratów białkowych na aktywność proteazy. Dla osiągnięcia tego celu doktorantka stworzyła pełną bibliotekę zawierającą naturalne i nienaturalne aminokwasy co pozwoliło na stworzenie profilu specyficzności substratowej. Druga część dotyczyła kaspaz 3- i 7-, które rozpoznają kwaśne aminokwasy w pozycji P1 substratu. W miejsce kwasów asparaginowego lub glutaminowego doktorantka umieściła fosforylowaną serynę lub treoninę i także zbadała aktywność proteaz. Stosowała metodę inicjowania i wygaszania fluorescencji przez wprowadzanie odpowiednich znaczników – ACC (kwas 7-aminokumaryno-4-octowy) jako donor i N-dinitrofenylolizyna jako akceptor (wygaszacz).

Analiza specyficzności substratowej katepsyn wykazała, że pozycja P1 jest wrażliwa na działanie katepsyn jeżeli zawiera naturalne i nienaturalne aminokwasy

zasadowe, chociaż praktycznie identyczny profil dotyczy wszystkich, badanych katepsyn. Pozycja P2 jest bardziej selektywna dla poszczególnych podtypów, często w stosunku do aminokwasów aromatycznych a pozycje P3 i P4 nieselektywne zarówno przestrzennie jak i stereochemicznie. Doktorantka zbadała także preferencje substratowe w pozycjach P1' i P2' (od C-końca). W pozycji P1' wszystkie katepsyny nie toleruje proliny i jej analogów a ich wysoka specyficzność obserwowana jest jedynie w przypadku katepsyny L. Pozycja P2' jest także mało selektywna, chociaż istnieją pewne różnice pomiędzy podtypami. Analiza wyników badań została przez doktorantkę wykorzystane do otrzymania tetrapeptydowych substratów dedykowanych specyficznie dla katepsyny S oraz fluorescencyjnego markera chemicznego.

W części drugiej doktorantka badała kaspazy 3, 7 ale także 6 i 8, ich selektywność oraz możliwość blokowania przez fosforylowane aminokwasy w pozycjach P1, P2 oraz P1', P2'. Substraty wybrane do badań oparte były na naturalnych peptydach YAP1 i VIME. Doktorantka sprawdziła trzy miejsca cięcia zależne od treoniny lub seryny po obu stronach miejsca lizy (P2 oraz P1' i P2'). Porównała szybkość rozpadu dla pochodnych naturalnych i fosforylowanych. Poszczególne miejsca lizy były selektywnie rozpoznawane przez odpowiednie kaspazy a ich działanie potwierdzone przez analizę LC-MS fragmentów. Analiza MS potwierdziła, że kaspaza 3 hydrolizuje peptyd VIME z fosforylowaną seryną w pozycji P2'. Jest to pierwsze literaturowe potwierdzenie rozpoznawania fosforylowanej seryny w bezpośredniej bliskości miejsca lizy dla kaspazy 3. Analogiczne badania przeprowadzone dla fragmentu białka PARP, które hydrolizowane jest przez kaspazy 3 i 7 wykazały natomiast, że zastąpienie naturalnego kwasu asparaginowego lub glutaminowego w pozycji P1 przez serynę, treoninę, fosforylowane aminokwasy lub ich inne analogi nie przeszkadza lizie chociaż jest znacznie ona wolniejsza. Skład mieszaniny po hydrolizie także potwierdzono metodą LC-MS.

Wyniki osiągnięte przez doktorantkę są ważne. Dostarczają szczegółowych informacji o selektywności działania enzymów proteolitycznych oraz metodach, które można stosować dla badania takich zależności. Pozwala także na otrzymanie markerów chemicznych, selektywnych oraz pozwalających na badanie/obrazowanie aktywności enzymów przyżyciowe.

Praca jest zwięzła i klarowna, bardzo dobrze zredagowana i zaprezentowana. Należy podkreślić znakomitą znajomość procedur technicznych, syntetycznych i

analitycznych stosowanych w pracy z białkami, co potwierdza szeroką wiedzę doktorantki oraz jej umiejętności praktyczne.

Poziom pracy formalnie i merytorycznie jest bardzo wysoki, jednakże chciałbym poprosić doktorantkę o wyjaśnienie kilku problemów, które zauważyłem czytając pracę:

- pominę nieliczne literówki;
- doktorantka bardzo często cytuje określenia angielskojęzyczne, które mają w sposób żargonowy zastępować określenia polskie np. refluks (w temperaturze wrzenia). Refluks ma zresztą specjalne znaczenie medyczne;
- określenie to pojawia się w schematach syntetycznych – rysunek 20 i 70-74. Schematy 20 i 70 są identyczne a 71-74 przedstawiają poszczególne etapy syntetyczne, ale opisy nie oddają faktycznych warunków reakcji – substraty/ropuszczalnik/temperatura wrzenia/czas;
- dlaczego miejsce lizy oligopeptydów jest wyraźnie oznaczone jedynie w przypadku badania aktywności kaspaz. Taki zapis użyty w całej pracy pomógłby w znaczący sposób w czytaniu i analizowaniu rozprawy. Znacznie ułatwiłby także analizę umiejscowienia pozycji P1, P2, P1' i P2'. Dotyczy to także sekwencji przedstawionych na stronie 114;
- kolory użyte w rysunku 22 nie zawsze są adekwatne. Ten sam kolor oznacza 67% i 107%. Poza tym, czy warto podawać niskie wartości (do 10%) ponieważ mieszczą się w granicach błędu;
- w badaniach specyficzności substratowej katepsyn przynajmniej w kilku przypadkach ważniejsze wydają się oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  elektronowe pierścieni aromatycznych, szczególnie wtedy, gdy widoczna jest b. duża różnica w stosunku do stereoizomeru L a miejsce wiążące (np. S1 i S2) jest niewielkie;
- wieloznaczne jest użyte określenie P1-P4, raz jako aminokwas a raz jako łańcuch boczny;
- na stronie 123 użyte zostało określenie pomiar hydrolizy, prawdopodobnie chodziło o pomiar szybkości lub stopnia hydrolizy;

Uwagi te przytaczam jedynie z obowiązku recenzenta, aby w przyszłości można je było uwzględnić.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny GRZYMSKIEJ jest bardzo pozytywna ponieważ postawione cele

badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorantka wykazała się znakomitym opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań. Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Justyny GRZYMSKIEJ 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.). Składam zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Justyny GRZYMSKIEJ do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 2024-04-10

## Uzasadnienie

Z uwagi na wielokierunkowe badania z wykorzystaniem różnorodnych technik i metod, osiągnięte rezultaty i szerokie upowszechnienie – prezentacje konferencyjne oraz publikacje, a także grant zewnętrzny (FNP), w ramach którego zrealizowano projekt wnoszący o wyróżnienie doktoratu mgr inż. Justyny GRZYMSKIEJ.