



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



Warszawa, 10.08.202 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

[misicka@chem.uw.edu.pl](mailto:misicka@chem.uw.edu.pl)

**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***

Enzymy deubikwitynujące pełnią w organizmie różnorodne funkcje, a zaburzenia w ich aktywności są powiązane z rozwojem wielu chorób. Ich aktywność polega na hydrolizie wiązania izopeptydowego występującego pomiędzy grupą karboksylową ubikwityny (Ub), a grupą ε-aminową łańcucha bocznego lizyny zawartej w białku, do którego przyłączona jest Ub. Niewiele jest znanych selektywnych i specyficznych narzędzi do badania tej grupy enzymów proteolitycznych. Dlatego poszukiwanie nowych, selektywnych substratów i markerów tej grupy enzymów jest obecnie celem badawczym wielu grup naukowych, a jedną z grup z sukcesem badającą te możliwości jest zespół prof. dr hab. Marcina Drąga.

Praca doktorska mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Drąga, promotora tej pracy i promotora pomocniczego dr inż. Wioletty Rut. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska (155 stron) składa się ze wstępu teoretycznego (41 stron), celu pracy (2 strony), opisu badań własnych wraz z opisem procedur syntetycznych (41 stron), podsumowania i wniosków (6 stron) oraz części eksperymentalnej (19 stron). Rozprawa zawiera również wykaz stosowanych skrótów, struktury aminokwasów użytych w syntezie bibliotek, jak również spis literatury cytowanej (215 pozycje) i spis dorobku naukowego doktoranta, który obejmuje 8 publikacji, 1 rozdział w monografii i 5 wystąpień konferencyjnych.

Wstęp teoretyczny składa się z kilku zasadniczych części omawiających doniesienia literaturowe w zakresie zagadnień związanych z rozprawą. Wstęp jest zapoczątkowany bardzo interesującym i zwartym wprowadzeniem. W części pierwszej wstępu doktorant przedstawił ogólne zagadnienia związane z ubikwityną, ubikwitynacją i enzymami deubikwitynującymi (DUBs), następnie omówił szczegółowo stosowane narzędzia chemiczne i biologiczne w badaniu enzymów deubikwitynujących, a w ostatnim rozdziale przedstawił metody syntezy ubikwityny.

Głównym celem badań mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego było opracowanie strategii syntezy selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych o strukturze opartej na strukturze ubikwityny i walidacja opracowanej strategii przy użyciu dwóch enzymów deubikwitynujących: wirusowego MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz ludzkiego UCH-L3.

W pierwszej fazie badań doktorant przeprowadził syntezę (metodą SPPS) zdefiniowanej biblioteki tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych (o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie „X” to jeden ze 128 zdefiniowanych naturalnych bądź nienaturalnych aminokwasów), którą użył do badania specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących w pozycji P2.

Do określenia profilu specyficzności substratowej badanych enzymów w pozycjach P4-P2, posłużyła biblioteka kombinatoryczna otrzymana w technologii *Hybrid Combinatorial Substrate Library* (HyCoSuL), składająca się z następujących podbibliotek: Ac-X-Mix-Gly-Gly-ACC – podbiblioteka P4; Ac-Mix-X-Gly-Gly-ACC - podbiblioteka P3) oraz zdefiniowana biblioteka substratów w pozycji P2.

Otrzymane profile specyficzności pokazały, że MERS-98 CoV PL<sup>pro</sup> w pozycji P2 toleruje jedynie glicynę, w pozycji P3 najlepiej rozpoznaje aminokwasy z aromatycznymi łańcuchami bocznymi, a w pozycji P4 aminokwasy hydrofobowe. Natomiast enzym UCH-L3 w pozycji P2 wykazywał tolerancję wobec aminokwasów zawierających krótki alifatyczny łańcuch boczny, w pozycji P3 wykazywał specyficzność wobec aminokwasów zasadowych i w pozycji P4 rozpoznawał aminokwasy hydrofobowe, jak również tolerował wybrane zasadowe aminokwasy o różnej konfiguracji (L i D).

Na podstawie otrzymanych wyników doktorant zaprojektował i otrzymał techniką na podłożu stałym serię fluorogenicznych tetrapeptydowych substratów (znacznikiem był kwas 7-amino-4-kumarynooctowy ACC), a następnie określił aktywność rekombinowanych enzymów względem nich. Do dalszych badań wybrał cztery substraty: referencyjny substrat Ac-LRGG-ACC o sekwencji pochodzącej z C-końcowego motywu Ub oraz trzy substraty (substrat dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> o sekwencji Ac-Tle-Phg-Gly-Gly-ACC i 2 substraty dla UCH-L3 Ac-Cha-Arg-Abu-Gly-ACC oraz Ac-D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC), które były rozpoznawane lepiej niż substrat referencyjny. Badania selektywności potwierdziły selektywność otrzymanych substratów względem enzymów dla których były projektowane.

W następnym etapie swoich badań doktorant użył specyficzne i selektywne sekwencje aminokwasowe substratów do zaprojektowania i syntezy 4 pochodnych Ub zawierających modyfikacje w obrębie C-końca cząsteczki. Otrzymał je stosując strategię ligacja-desulfuryzacja wykorzystując peptydowe C-końcowe hydrazydy jako zamaskowane tioestry.

To było duże wyzwanie syntetyczne! Cząsteczka Ub została podzielona na 3 fragmenty, z których fragment C-końcowy zawierał sekwencję pochodzącą od jednego z czterech substratów tetrapeptydowych, specyficznych wobec badanych enzymów. Segmenty zsyntezowano na podłożu stałym na żywicy 2-CTC sfunkcjonalizowanej Fmoc-NH-NH<sub>2</sub>. Poszczególne fragmenty były kondensowane metodą NCL pomiędzy C-końcowym tioestrem jednego fragmentu a N-końcowym tiolem kolejnego fragmentu. Otrzymany 75-peptyd poddano rodnikowej desulfuryzacji w celu konwersji reszt Cys (wprowadzonych w miejsce

reszt Ala w wyjściowym peptydzie) do Ala. W ostatnim etapie do otrzymanych hydrazydów przyłączono znacznik fluorogeniczny (Gly-ACC), uzyskując 4 fluorogeniczne substraty. Otrzymane pochodne Ub zawierały nienaturalne aminokwasy oraz C-końcowy znacznik fluorogeniczny ACC.

Badania mające na celu określenie selektywności i specyficzności otrzymanych pochodnych względem rekombinowanych enzymów wykazały, że pochodne Ub, które na C-końcach zawierały sekwencje wywodzące się z selektywnie rozpoznawanych substratów tetrapeptydowych, również były selektywne względem badanych enzymów DUBs, a stałe specyficzności wyższe niż dla referencyjnego substratu Ub-ACC

W następnym etapie badań doktorant zsyntezował 4 markery chemiczne do selektywnej detekcji wybranych enzymów DUBs w lizatach komórkowych (marker referencyjny i 3 markery chemiczne do badanych enzymów). Zaprojektowane markery miały struktury oparte na cząsteczkach Ub ze zmodyfikowanymi C-końcowymi fragmentami sekwencji peptydowych i przyłączoną na N-końcu biotynę, oddaloną od peptydu poprzez Ahx, jako grupę reporterową i zawierającą na C-końcu ester winylowo-metylowy (poprzez przyłączenie w ostatnim etapie do C-końca H<sub>2</sub>N-Gly-VME).

Następnie doktorant scharakteryzował otrzymane markery chemiczne pod kątem inhibicji badanych enzymów. Przeprowadził również eksperymenty z użyciem lizatów komórkowych z linii HEK-293T, HeLa oraz A-431, w celu określenia selektywności zsyntezowanych markerów. Otrzymane wyniki potwierdziły, że zsyntezowane markery chemiczne zawierające nienaturalne aminokwasy selektywnie wiązały się do badanych enzymów (MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3).

Wykonane przez doktoranta eksperymenty pokazały, że C-końcowy rejon cząsteczki Ub jest kluczowy dla jej wiązania się do miejsca aktywnego badanych enzymów deubikwitynujących i że możliwe jest modulowanie selektywności oraz specyficzności narzędzi chemicznych dla DUBs poprzez wprowadzanie wyselekcjonowanych (w tym nienaturalnych) reszt aminokwasowych w obrębie tego rejonu.

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawię kilka uwag, które nasunęły mi się podczas czytania tej rozprawy doktorskiej i które mogą stanowić podstawę do dyskusji z doktorantem.

1. W części eksperymentalnej znajdują się bardzo dokładne opisy wykonanych syntez. Szkoda, że doktorant nie podał wydajności otrzymywanych produktów. Szczególnie interesująca byłaby informacja na temat wydajności syntezy fragmentów Ub i jej analogów.
2. Szkoda również, że doktorant nie podał w pracy gradientu eluetów, które stosował do oczyszczenia fragmentów Ub i nie zamieścił przykładowych chromatogramów HPLC.
3. W opisie uzyskanych fragmentów Ub doktorant używa nieco dziwnego określenia typu „Otrzymany produkt zliofilizowano i przechowywano w postaci proszku w 4°C” (czy proszek to właściwe określenie?)

Podsumowując, pracę doktorską mgr. Żmudzińskiego przeczytałam z bardzo dużym zainteresowaniem. Praca jest świetnie napisana, logicznie i zawiera wszystkie niezbędne opisy wykonanych doświadczeń. Praca jest również bogato ilustrowana, bardzo informacyjnymi, kolorowymi rysunkami. Oczywiście przeprowadzenie zaplanowanych badań, czyli wykonanie: syntezy zaplanowanej biblioteki, syntezy niezbędnych związków do otrzymania fluorogenicznych substratów i markerów i w szczególności przeprowadzenie syntezy pochodnych Ub wymagało dużych umiejętności zarówno w syntezie organicznej, jak również syntezy peptydów na stałym podłożu i syntezy białek metodą NCL, włączając w to ich oczyszczanie (HPLC) i potwierdzenie budowy (MS) i następcze badania kinetyczne. Można tylko gratulować doktorantowi, że wykonał z sukcesem wszystkie zaplanowane badania!

Obecnie mgr Żmudziński jest niewątpliwie świetnie wyszkolonym i wszechstronnym chemikiem w zakresie strategii projektowania i syntezy selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych do badań różnorodnych enzymów, przygotowanym do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Dorobek naukowy: mgr. inż. Mikołaj Żmudziński jest współautorem 8 publikacji (w 1 jest pierwszym autorem) w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej: (ACS Central Science, Current Opinion in Chemical Biology, Scientific Reports, Computational Biology, Pharmaceuticals, Nature Chemical Biology, Science Advances, Chemical Science) i rozdziału w monografii (*Deubiquitinases: methods and protocols*). Wydaje się, że 3 publikacje zawierają wyniki rozprawy doktorskiej, więc można się domyślać, że przygotowywane są kolejne publikacje z zakresu rozprawy doktorskiej.

Swoje wyniki doktorant prezentował ustnie na 5 konferencjach, na jednej z nich uzyskał 1 miejsce za najlepsze wystąpienie. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że doktorant otrzymywał różnego rodzaju stypendia: stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej, stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych, stypendium z Funduszu stypendialnego Politechniki Wrocławskiej i jest wykonawcą projektu TEAM, kierowanego przez jego promotora prof. Dąga.

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego zatytułowana „Opracowanie strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących” spełnia wszelkie warunki określone w art. 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 zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Mikołaja Żmudzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie ze względu na rozległość przeprowadzonych badań, osiągnięte wyniki naukowe, opublikowanie już części wyników w doskonałych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

*A. Piśtelo*