

Dr hab. Jacek Jemielity, Prof. UW
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 07.12.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Rut

p.t. „Zastosowanie naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w otrzymywaniu aktywnych i specyficznych markerów dla proteaz cysteinowych i treoninowych”

Enzymy proteolityczne zwane proteazami są odpowiedzialne za specyficzną hydrolizę łańcuchów peptydowych i pełnią kluczowe funkcje w najważniejszych dla funkcjonowania organizmów procesach życiowych. Dysfunkcje tych enzymów prowadzą do bardzo poważnych nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym, a w konsekwencji są przyczynami poważnych chorób takich jak nowotwory, choroby układu krwionośnego, choroby neurodegeneracyjne, czy autoimmunologiczne. Z tych powodów proteazy są przedmiotem bardzo intensywnych badań w różnych aspektach i jednym z najintensywniej rozwijanych zagadnień zakresie chemii biologicznej. Bodajże najbardziej fascynującym zagadnieniem w tym aspekcie jest specyficzność substratowa tych białek, czyli jakie mechanizmy decydują o tym, że spośród tysięcy białek obecnych w komórkach enzymy te przecinają łańcuchy peptydowe konkretnych białek w konkretnym miejscu. Jest to również największe wyzwanie z punktu widzenia projektowania sond molekularnych a także selektywnych inhibitorów, bo tylko takie mogą być rozpatrywane w kontekście terapeutycznym. Przełomem w poszukiwaniu selektywności substratowej przyniosło zastosowanie nienaturalnych aminokwasów, w czym swój istotny udział ma Prof. Marcin Drąg wraz z współpracownikami. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Wioletty Rut wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Prof. Drąga doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, a dotyczy projektowania, syntezy i badań specyficznych substratów, markerów oraz inhibitorów dwóch ważnych

medycznie enzymów proteolitycznych: proteazy wirusowej SARS PLpro oraz kompleksu enzymatycznego – proteasomu 20S.

Praca doktorska ma klasyczny układ i liczy 172 strony, a więc jest obszernym materiałem naukowym. Na rozprawę składa się wstęp teoretyczny, badania własne oraz część eksperymentalna. Dodatkowo wyodrębniono, cele pracy, a na końcu podsumowanie oraz listę prac wchodzących do dorobku autorki oraz osiągnięć związanych z realizacją doktoratu. W pracy zamieszczono 50 rysunków oraz 12 tabel, bardzo starannie przygotowanych pod względem edytorskim, które są bardzo pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autorki rozprawy. W pracy zacytowano 200 pozycji literaturowych, które w znakomitej większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii, biochemii i medycyny oraz dziedzin pokrewnych. Cała praca jest przygotowana pod względem edytorskim bardzo profesjonalnie, łącznie z bardzo atrakcyjną wizualnie oprawą pracy.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) Umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

Cel pracy postawiony przed jej Autorką składał się z dwóch zasadniczych części: a) synteza narzędzi molekularnych do badań trzech różnych aktywności proteasomu oraz b) stworzenie narzędzi do badań reprezentującą grupę enzymów deubikwitynujących proteazy SARS PLpro. Aby te cele osiągnąć Autorka zaplanowała syntezę bibliotek substratów fluorogenicznych i wykorzystanie ich do badań specyficzności substratowych wszystkich wyżej wspomnianych aktywności proteolitycznych. Efekty tych badań miały zostać następnie wykorzystane do zaprojektowania i syntezy selektywnych substratów oraz chemicznych markerów wszystkich trzech aktywności proteasomu oraz SARS PLpro, a w przypadku tego drugiego enzymu również jego inhibitorów.

W części literaturowej Autorka opisuje w sposób dojrzały naukowo, a przy tym bardzo interesujący, różnorakie aspekty związane z proteazami, ze szczególnym uwzględnieniem proteasomu, komentując budowę, mechanizm hydrolizy wiązań peptydowych, podsumowuje wiedzę na temat specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek katalitycznych. Szczegółowo opisane są znane z literatury inhibitory oraz konsekwencje terapeutyczne hamowania aktywności proteasomu. Znaczna część przeglądu literaturowego poświęcona jest również markerom chemicznym proteaz oraz metodom pozwalającym na badanie specyficzności substratowej tych enzymów, dzięki czemu później bardzo łatwo było ocenić dokonania autorki na tle aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie. Wszystko zostało opisane w klarowny i zwarty sposób, z dużą odpowiedzialnością za słowa i chyba pierwszy raz czytając prace doktorską zdarzyło mi się żałować, że właśnie oto dotarłem do końca wstępu literaturowego.

Część poświęcona badaniom własnym to bardzo bogaty materiał badawczy, w którym Autorka podjęła się trudnego zadania jakim była realizacja bardzo ambitnych celów postawionych przed Doktorantką. Trzeba jednak przyznać, że Autorka rozprawy poradziła sobie z realizacją tych celów znakomicie.

Stosując syntetyczne biblioteki peptydów, niektóre z tych bibliotek zaprojektowane i zsyntezowane przez samą Doktorantkę, inne wcześniej otrzymane w laboratorium Promotora. Doktorantka użyła tych bibliotek do profilowania wszystkich trzech aktywności proteasomu 20S co doprowadziło do następujących konkluzji: do optymalnej aktywności wszystkich trzech podjednostek katalitycznych wymagany jest substrat 4-aminoikwasowy. Najlepiej rozpoznawane przez podjednostkę β -1 proteasomu (aktywność kaspazo-podobna) i β -5 (aktywność chymotrypsyno-podobna) są heksapeptydy, natomiast podjednostka β -2 (aktywność trypsyno-podobna) preferuje pentapeptydy. Co więcej badania pozwoliły również na określenie pełnego profilu specyficzności substratowej trzech podjednostek proteasomu, a następnie otrzymanie i potwierdzenie aktywności selektywnych substratów fluorogenicznych dla każdej aktywności katalitycznej proteasomu 20S. W końcu otrzymano selektywne markery chemiczne do detekcji podjednostek β proteasomu 20S w lizatach komórkowych, w tym krwi ludzkiej. Wydaje się, że zdolność do monitorowania aktywności poszczególnych podjednostek w prosty i wiarygodny sposób otwiera nowe możliwości w badaniach nad skutecznością terapeutyków dla których celem terapeutycznym jest proteasom. Z całą pewnością praca Pani magister Rut dostarcza potężnych narzędzi do lepszego zrozumienia jak działa w naszych komórkach fasynująca maszyna molekularna odpowiedzialna za degradację białek. Mimo tak ważnych wyników osiągniętych dla proteasomu 20S, Doktorantka kontynuowała badania co w dalszym ciągu doprowadziło do przy zastosowaniu podobnego podejścia do określenia preferencji substratowej proteazy SARS PLpro. W tym przypadku Doktorantka również była w stanie otrzymać selektywne substraty fluorogeniczne, a co więcej otrzymała również selektywne inhibitory tego białka.

Przykry obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny, tych na szczęście w recenzowanej pracy jest nie wiele. Dodatkowo kilka stwierdzeń zamieszczonych w rozprawie wzbudziło pewne wątpliwości i wymaga komentarza ze strony Doktorantki podczas publicznej obrony. Przykładowo na stronie 24 doktorantka opisuje inhibitory proteasomu, wartościując inhibitory dla których wyznaczono wartości IC50 w różnych eksperymentach. Nie jest to do końca prawidłowe gdyż parametr IC50 silnie zależy od warunków eksperymentu, dla tego samego związku w różnych eksperymentach otrzymuje się z reguły inne wartości. Inhibitory na jego podstawie można porównywać jeśli wyznaczmy IC50 dla różnych inhibitorów w takim samym rodzaju eksperymentu w takich samych warunkach. Dlatego stwierdzenia, że inhibitor a jest 37-krotnie silniejszy niż b są nieuprawnione. Proszę doktorantkę o odniesienie się do tej uwagi na publicznej obronie i przedyskutowanie jakie ewentualnie parametry mogą być użyte do porównywania inhibitorów

badanych w różnych eksperymentach. Z kolei na stronie 29 doktorantka napisała, że w przypadku peptydowych pochodnych kwasu boronowego skrócenie sekwencji peptydowej z trzech do dwóch aminokwasów spowodowało wzrost selektywności, choć intuicyjnie spodziewałbym się przeciwnego efektu.

Czystość każdego z substratów (składników biblioteki P5 i P6 do badań proteasomu) została potwierdzona za pomocą analitycznego HPLC, a masa cząsteczkowa została wyznaczona przy użyciu ESI-MS. Szkoda, że w pracy nie przedstawiono przykładowych profili HPLC oraz widm HRMS. Proszę o przedstawienie przykładów tych danych podczas publicznej obrony.

Dla szeregu rysunków zamieszczonych w rozprawie brak odnośników w tekście np. rysunki 7,8, 17, 21-23, 26, 38 i jeszcze kilka innych).

Tabela 5, z badań przy użyciu spektrometrii mas, która zajmuje ponad 7 stron rozprawy, a została w tekście skomentowana jednym zdaniem, że markery są selektywne, mogłaby się znaleźć w suplementach do rozprawy bez szkody dla strony merytorycznej rozprawy.

Autorka nie ustrzegła się sporadycznych błędów gramatycznych, braku znaków interpunkcyjnych, czy tzw. literówek, co oczywiście nie obniża bardzo wysokiej wartości pracy zarówno pod względem edytorskim, a tym bardziej pod względem merytorycznym.

Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy jest cenny z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych, diagnostycznych oraz poznawczych. Rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad tak problematyczną w przypadku proteaz specyficznością substratów. Na odrębny komentarz zasługuje dorobek publikacyjny Doktorantki. Większość wyników będących rezultatem realizacji pracy doktorskiej została już opublikowana. Pani magister Wioletta Rut jest współautorką 10 prac opublikowanych w wiodących w dziedzinie czasopiśmie z listy filadelfijskiej w tym pracy przeglądowej (w Chemical Reviews) oraz jednej pracy wysłanej do druku. W czterech z tych prac Doktorantka jest pierwszą współautorką. Mimo, tego, że badaczka z oczywistych względów ma niewielki staż jej prace były już 40 razy czytowane przez innych badaczy. Doktorantka również wielokrotnie prezentowała swoje badania na konferencjach zagranicznych i krajowych w postaci komunikatów ustnych oraz prezentacji plakatowych. Te liczne osiągnięcia naukowe spotkały się z uznaniem różnych gremiów naukowych, co odzwierciedlają liczne nagrody i wyróżnienia. Na szczególne uznanie zasługuje tu prestiżowe stypendium 17 edycji programu L'Oréal Polska Dla Kobiet i Nauki.

W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Wioletty Rut do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wagę uzyskanych wyników naukowych w szczególności opracowanie struktur i otrzymanie selektywnych substratów i chemicznych markerów ludzkiego

proteasomu 20S, a przy tym imponujący dorobek naukowy jak na ten etap kariery naukowej z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani magister Wioletty Rut.

Jacek Jenciel