

Gliwice, 13.05.2024 r.

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Drąga. Praca obejmuje badania nad określeniem specyficzności substratowej kieszeni S6-S2 oraz S1'-S2' poszczególnych podjednostek immunoproteasomu oraz kieszeni S6-S5 i S1'-S2' proteasomu 20S, z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych i otrzymanych bibliotek substratów peptydowych. Realizacja pracy w zespole uznanego autorytetu w dziedzinie bioobrazowania, enzymów proteolitycznych i chemii kombinatorycznej oraz nowatorskie podejście do tematu dają pewność, że rozprawa doktorska mgr inż. Radosława Gładysza wpisuje się doskonale w nowoczesne trendy badawcze, związane z charakterystyką kluczowych dla organizmu ludzkiego kompleksów enzymatycznych. Proteasom 20S i immunoproteasom biorą udział w kluczowych procesach biologicznych, a zaburzenie ich funkcji prowadzą do wielu stanów chorobowych (m.in. choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne czy nowotworowe). Dlatego też stanowią one obiecujące cele molekularne dla już istniejących leków, ale przede wszystkim dla poszukiwanych, selektywnych inhibitorów, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii ciężkich schorzeń.

Ocena układu rozprawy

Rozprawa doktorska posiada klasyczny układ, jest podzielona na rozdziały i podrozdziały. Napisana jest poprawnie i liczy 165 stron (w tym wstęp teoretyczny - 30 stron, cel pracy – 2 strony, badania własne - 59 stron, podsumowanie i wnioski końcowe 4 strony, część eksperymentalna- 53 strony). Praca zawiera również opis dorobku naukowego Doktoranta oraz bibliografię. Cytowanych jest 96 pozycji literaturowych. W pracy brakuje natomiast streszczenia w języku polskim i angielskim. Moim zdaniem mankamentem jest również brak spisu skrótów i nazw zwyczajowych, co znacznie utrudnia czytanie pracy. Część skrótów jest wprawdzie wyjaśniona w tekście, ale wielu brakuje.

Ocena merytoryczna

Przedstawiony temat pracy w pełni zgadza się z określonymi w rozdziale “Cel pracy” założeniami i zakresem badań oraz przedstawionymi wynikami.

W rozdziale „Wstęp teoretyczny”, Autor przedstawił stan wiedzy dotyczący ogólnej charakterystyki enzymów proteolitycznych oraz proteasomu 26S i immunoproteasomu. Następnie skupił się na omówieniu literatury z zakresu badań preferencji substratowej poszczególnych podjednostek tych kompleksów enzymatycznych, przedstawiając szczegółowo kilka narzędzi w postaci różnych bibliotek substratów peptydowych, pozwalających na dokładne i szybkie zbadanie profilu specyficzności tych wielkocząsteczkowych kompleksów enzymatycznych. Opisał również budowę i zastosowanie znanych inhibitorów proteasomu 26S i immunoproteasomu. Część dotycząca opisu bibliotek substratów i inhibitorów nie budzi zastrzeżeń, jednak moim zdaniem przydałoby się lepsze usystematyzowanie wiedzy na temat struktury proteasomu 26S i immunoproteasomu oraz umieszczenie bardziej dokładnych rysunków. Takie struktury pozwoliłyby m.in. zlokalizować białka, które Autor w tekście oznacza tylko symbolami bez ich wyjaśnienia (np. dla proteasomu 26S białka Rpn3, Rpn 5-9, Rpt1-Rpt-6 i wiele innych). Ta sama uwaga dotyczy struktury miejsc aktywnych w poszczególnych podjednostkach badanych kompleksów enzymatycznych. Autor w opisie doniesień literaturowych podaje wprawdzie kilka informacji na temat aminokwasów występujących w pewnych lokalizacjach, ale bez ich graficznego przedstawienia trudno przeanalizować możliwe oddziaływania z substratami. Przydatne byłoby również krótkie podsumowanie stanu wiedzy z zakresu specyficzności substratowej podjednostek katalitycznych badanych kompleksów, co znacznie ułatwiłoby analizę wyników w części badawczej.

Kolejnym rozdziałem jest „Cel pracy”, gdzie Autor przedstawił główne założenia pracy i bardzo ambitny zakres badań. Zakres ten obejmował zarówno zaprojektowanie i syntezę wielu hybrydowych bibliotek peptydowych substratów fluorogenicznych oraz zdefiniowanych bibliotek substratów typu IQF (wewnętrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów), jaki i określenie specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek proteasomu 20S oraz immunoproteasomu w kilku kieszeniach wiążących.

W części „Badania własne” Doktorant przedstawił rezultaty swoich szeroko zakrojonych badań, będących realizacją bardzo ambitnych celów założonych w pracy. Ilość wykonanych badań jest bardzo imponująca. Nowatorskie podejście Doktoranta przejawia się zarówno w wykorzystaniu nowoczesnych narzędzi do projektowania, syntezy i badania bardzo obszernej biblioteki substratów, jak i w zastosowaniu nienaturalnych aminokwasów w otrzymywanych peptydach.

Doktorant rozpoczął od określenia specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek immunoproteasomu (podjednostki $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$), wykorzystując w sumie 9 bibliotek (3x3 podbiblioteki) tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych zsyntetyzowanych w grupie prof. Marcina Drąga. Każda z bibliotek zawierała 129 różnych tetrapeptydów ze znacznikiem kumarynowym w pozycji P1' oraz grupą acetylową na C-końcu. Na podstawie otrzymanych wyników Autor określił preferowane przez poszczególne podjednostki immunoproteasomu aminokwasy

w pozycjach P2, P3, i P4 tetrapeptydów, wymieniając te, dla których osiągnięto ~80-100% względnej aktywności enzymatycznej. Ze względu na to, że w dalszych badaniach Autor stosuje substraty ze ściśle określonymi aminokwasami w pozycjach P4-P2, przydałoby się krótkie podsumowanie tej części i informacja na temat wybranych związków.

Zasadnicza część rozprawy dotyczy projektowania i syntezy bardzo licznych bibliotek substratów do badania rozszerzonego profilu specyficzności substratowej podjednostek proteasomu 20S i immunoproteasomu. W celu zbadania specyficzności substratowej w kieszeniach S5 i S6, Doktorant zaprojektował i zsyntetyzował cztery hybrydowe kombinatoryczne biblioteki substratów (*ang. hybrid combinatorial substrate library*; HyCoSuL), przy czym każda składała się z dwóch podbibliotek. Substraty te posiadały zdefiniowane aminokwasy w pozycjach P4-P1 oraz fluorofor w postaci kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego (ACC). W badaniach oddziaływań otrzymanych peptydów z poszczególnymi podjednostkami proteasomu i immunoproteasomu, Autor wskazał te substraty (a właściwie odpowiednie aminokwasy w pozycjach P5 i P6 substratów), dla których uzyskał najwyższą względną aktywność enzymatyczną. Porównał również specyficzność odpowiadających sobie podjednostek (np. $\beta 1$ i $\beta 1i$). Zaprojektował także i otrzymał kolejne biblioteki (4x2 podbiblioteki) wewnątrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów (*ang. internally quenched fluorescent substrate*; IQF), które są odpowiednie do badania specyficzności substratowej proteaz w kieszeniach S1' i S2'. Każdy peptyd posiadał parę fluorofor-wygaszacz fluorescencji (odpowiednio ACC i dinitrofenylo-L-lizynę). Doktorant wykazał m.in, że poszczególne podjednostki proteasomu 20S znacznie różnią się specyficznością substratową w badanych kieszeniach. Przykładowo, podjednostki $\beta 1$ i $\beta 2$ charakteryzują się stosunkowo wąską specyficznością w tych miejscach, natomiast $\beta 5$ rozpoznaje znacznie szerszą gamę aminokwasów. Autor określił również wpływ długości łańcucha peptydowego substratu na aktywność poszczególnych podjednostek katalitycznych proteasomu 20S i immunoproteasomu. W tym celu otrzymał kolejne biblioteki substratów różniących się długością łańcucha peptydowego (po 7 substratów dla każdej podjednostki). Doktorant wykazał, że podjednostki $\beta 1$ i $\beta 1i$ różnią się preferencjami, jeżeli chodzi o długość łańcucha peptydowego (odpowiednio heksapeptyd vs. tripeptyd), podczas gdy zarówno $\beta 2$, jak i $\beta 2i$ preferują tripeptydy, a $\beta 5$ i $\beta 5i$ odpowiednio heksapeptydy oraz penta- i heksapeptydy. Kolejnym etapem było zbadanie aktywności podjednostki $\beta 1i$ wobec 7 dipeptydowych substratów fluorogenicznych oraz badania kinetyczne z zastosowaniem dwóch z tych związków. Pewnym niedociągnięciem jest brak komentarza na temat osiągniętych wartości k_{kat}/K_M . Część „Badania własne” kończy rozdział przedstawiający wyniki syntezy i charakterystyki specyficznego inhibitora podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu.

Pewien niedosyt w części „Badania własne” budzi sposób omówienia otrzymanych wyników. W krótkich komentarzach do poszczególnych części Doktorant przedstawił wprawdzie te substraty,

dla których otrzymał najwyższe względne aktywności enzymatyczne, ale zabrakło mi bardziej wnikliwej dyskusji dotyczącej np. relacji – budowa chemiczna a oddziaływanie z poszczególnymi miejscami aktywnymi podjednostek proteasomu i immunoproteasomu, szczególnie dla aminokwasów nienaturalnych. Brakuje również dyskusji otrzymanych wyników z danymi literaturowymi. Odniesienie do literatury znalazłam dopiero w rozdziale „Podsumowanie i wnioski końcowe”. Ta właśnie część zawiera elementy dyskusji wyników oraz końcowe podsumowanie.

W rozdziale „Część eksperymentalna” Autor przedstawił informacje na temat metodyki badawczej stosowanej na poszczególnych etapach pracy. Część ta jest bardzo obszerna, bo tego wymagała realizacja tak szeroko zakrojonych badań. Należy podkreślić, że Doktorant zastosował nowoczesne metody syntezy bibliotek substratów peptydowych na podłożu stałym oraz nowoczesne metody analizy tych związków i badań specyficzności substratowej. Pan mgr Gładysz podał na początku bardzo ogólną informację na temat firm, w których zostały zakupione odczynniki, proteasom 20S i immunoproteasom. Brak jest natomiast bliższych informacji na temat czystości poszczególnych odczynników oraz bliższej charakterystyki głównych bohaterów tej pracy - proteasomu 20S i immunoproteasomu. W dalszej części Autor opisał poszczególne etapy syntezy znacznika fluorescencyjnego oraz licznych bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych oraz bibliotek typu IQF, a także inhibitora podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu. W 8 tabelach umieścił spis aminokwasów nienaturalnych i naturalnych, które znajdowały się w odpowiednich pozycjach (P6, P5, P1', P2', itd.) badanych peptydów, podając wyniki analizy LC-MS dla otrzymanych związków. Opisał również badania specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu z zastosowaniem metody spektrofluorymetrycznej.

Za najważniejsze osiągnięcie doktoranta uważam zaprojektowanie i otrzymanie bardzo wielu bibliotek peptydowych substratów fluorogenicznych oraz bibliotek wewnątrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów (IQF) oraz określenie rozszerzonego profilu specyficzności substratowej podjednostek katalitycznych $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ proteasomu 20S oraz podjednostek $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ immunoproteasomu w kilku kieszeniach wiążących (S6-S2 dla immunoproteasomu, S6-S5 dla proteasomu 20S oraz S1'-S2' dla obydwu kompleksów enzymatycznych).

Strona merytoryczna pracy nie budzi zastrzeżeń, jednak z obowiązku recenzenta przedstawiam wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy rozprawy, z prośbą o komentarz:

1. Na rys. 1 pt. „Schemat wiązania i hydrolizy substratu w centrum aktywnym proteazy” brakuje oznaczenia, gdzie dokładnie mieszczą się kieszenie wiążące S1, S2, itd. Autor umieścił tylko ogólną strukturę peptydu wskazując pozycje P3-P1 i P1'-P3'.

2. W poszczególnych etapach badań stosowane są różne stężenia proteasomu i immunoproteasomu oraz odpowiednich substratów. Na jakiej podstawie te stężenia były dobierane? (przykładowo badania w pozycjach P5 i P6: proteasom 20S 0,5 nM; immunoproteasom 1,5 nM; substrat 5 μ M; badania w pozycjach P1', P2' - proteasom 20S 0,5 nM; immunoproteasom 1 nM; substrat 1 μ M; badania wpływu długości łańcucha peptydowego: proteasom 20S 1,5 nM; immunoproteasom 3 nM; substrat 5 μ M).
3. Str. 17. Doktorant mówi o kompleksach proteasomu z podjednostkami regulatorowymi REG α / β i REG γ , brak jednak bliższego wyjaśnienia co to za podjednostki. Proszę o wyjaśnienie.
4. Str. 43. Autor stwierdza, że „podjednostka β 1i immunoproteasomu w pozycji P2 najlepiej rozpoznaje aromatyczne, hydrofobowe reszty aminokwasowe takie jak: L-Tyr (100%), czy L-Trp (81.4%). Tymczasem dla bardziej hydrofobowej L-Phe względna aktywność wynosi tylko ok. 55%. Proszę o komentarz czy tylko hydrofobowość i aromatyczny charakter łańcucha bocznego są tutaj istotne.
5. Str. 80. Doktorant stwierdza, że „podjednostka β 1i immunoproteasomu w pozycji P1' nie wykazuje specyficzności substratowej”, po czym pisze, że najlepiej rozpoznawanym aminokwasem jest L-Asp (100% względnej aktywności enzymu). To samo dotyczy stwierdzenia na str. 84. Proszę o komentarz.
6. Proszę o komentarz na temat wyboru dipeptydów do badań kinetycznych podjednostki β 1i immunoproteasomu, skoro we wcześniejszym rozdziale wykazano, że ta podjednostka wykazuje największą aktywność wobec tripeptydów.
7. Str. 95. Nie bardzo przekonuje mnie tłumaczenie sposobu wyprowadzenia wzoru na $k_{kat.}/K_M$. Proszę o komentarz.
8. Str. 109 – Autor używa pojęcia „mieszanina izokinetyczna aminokwasów”, jednak nigdzie nie znalazłam stosownego wyjaśnienia.
9. Literatura cytowana jest z użyciem różnych stylów. Znalazłam sporo błędów i braków w cytowanej literaturze (numery stron, tomów, itp.), a czasem numery odnośników w tekście nie zgadzały się z tymi w spisie literatury.

Wybrane błędy, w tym edytorskie i skróty myślowe (nie wymagają komentarza Doktoranta):

1. Wzory podstawowych związków chemicznych takich jak: H₂SO₄, Na₂SO₄, P₂O₅, a także kilku innych (szczególnie w części doświadczalnej), pisane w sposób nie za bardzo odpowiadający pracy doktorskiej zrealizowanej na Wydziale Chemicznym: „H₂SO₄, Na₂SO₄, P₂O₅”, itp.
2. Brak objaśnień symboli stosowanych na niektórych rysunkach (przykładowo na rys.2 przydałoby się wyjaśnienie oznaczeń E1-E3).

3. Str. 12: zdanie „Ubikwitynacja polega na stworzeniu wiązania izopeptydowego pomiędzy C-końcówką glicyną ubikwityny, a grupą ε-aminową wybranego białka” jest skrótem myślowym - poprawnie powinno być: ... a grupą ε-aminową lizyny obecnej w białku.
4. Str. 14 jest adenozyntrifosforaz powinno być adenozyntrifosfataz
5. Str. 15. Autor wspomina Bortezomib, jednak brak jest struktury czy nazwy chemicznej tego inhibitora. Opis i wzór pojawiają się dopiero na str. 32.
6. Str. 37 i 38. Autor odnosi się do struktur odpowiednio: inhibitora YU102 i Carfilzomibu, ale ich nie podaje.
7. Str. 40. „Cel pracy” - zdania 3 i 5: „określenie specyficzności substratowej każdej aktywności katalitycznej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 i S6/ S1' oraz S2' ” jest skrótem myślowym.
8. Brak wyjaśnienia używanych skrótów związków, np. HATU i TMSCL.
9. Str. 71. Skróty myślowe: Autor podaje, że „pozycje X zawierają 18 naturalnych i 78 nienaturalnych aminokwasów...” jednak nigdzie nie wyjaśnia co oznacza pozycja X.
10. Str. 147. Jest: stężenie proteasomu 20S 1,5 μM; powinno być 1,5 nM.
11. Str. 151-157 - Różne wielkości wzorów i różne wielkości czcionek w przedstawionych wzorach.
12. Tabele 13-20 – jest (M+H)²⁺ moim zdaniem powinno być: (M+2H)²⁺.

Wnioski końcowe

Podsumowując, w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Radosława Gładysza omówione zostały bardzo aktualne zagadnienia, zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i praktycznego. Zakres podjętych badań jest bardzo szeroki, a rozprawa zawiera wiele cennych wyników, które z pewnością przysłużą się w przyszłości do opracowania selektywnych narzędzi do badania mechanizmów ważnych procesów zachodzących w komórce, a także do opracowania selektywnych inhibitorów badanych kompleksów enzymatycznych. Doktorant wykazał się niezwykłą pracowitością oraz umiejętnościami w zakresie logicznego projektowania bibliotek peptydów, planowania doświadczeń, ich realizacji i opracowania wyników. Zastosowane w pracy liczne, nowoczesne techniki laboratoryjne i analityczne, świadczą o dużym zaangażowaniu i dobrym przygotowaniu mgr inż. Radosława Gładysza do pracy badawczej. Dorobek naukowy związany z tematyką pracy obejmuje 1 publikację z listy JCR (IF 3,7; Doktorant jest pierwszym Autorem), jedną pracę, która zgodnie z informacją jest obecnie w recenzji w czasopiśmie *ACS Chemical Neuroscience* oraz 1 wystąpienie na konferencji międzynarodowej. Pan Radosław Gładysz był również wykonawcą w projekcie badawczym Opus finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki.



Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Badanie rozszerzonego profilu specyficzności ludzkich proteasomów” spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne określone w art.187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami), w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej, z prośbą o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Radosława Gładysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dante Gilber