

Prof. dr hab. Adam Prahl  
Pracownia Chemii Peptydów  
Katedra Chemii Organicznej  
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 30.08.2016r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

*mgr. Przemysława Karpowicza pt. „Poszukiwanie allosterycznych modulatorów aktywności proteasomu”*

Degradacja białek jest elementem niezbędnym do utrzymania białkowej homeostazy wewnątrzkomórkowej i prawidłowego funkcjonowania komórek. Każdego dnia w zdrowym organizmie 3–5% białek - prawidłowych, ale już nieużytecznych lub nieprawidłowych powstałych wskutek mutacji genetycznych, błędów w transkrypcji i translacji, jest usuwane z komórki za pomocą skomplikowanych mechanizmów. Przez wiele lat uważano, że degradacja polipeptydów w większości komórek zachodzi głównie w lizosomach wskutek działania zawartych w nich proteaz. Późniejsze badania dowiodły, że komórki, które nie posiadają lizosomów również potrafią szybko i efektywnie pozbyć się niepotrzebnych białek. Doprowadziło to do odkrycia systemu ubikwityna-proteasom, który jest jednym z głównych szlaków selektywnej degradacji białek komórkowych, regulując tym samym większość procesów kluczowych dla zachowania stałych warunków układu (homeostazy komórki). Degradacji proteasomalnej ulegają białka odpowiedzialne za szereg procesów - transdukcję sygnału, regulację metabolizmu i cyklu komórkowego aż po apoptozę. Regulacja funkcjonowania tak złożonego układu może odbywać się poprzez kontrolę ubikwitynacji (specyficzne znakowanie produktów degradacji), bądź też poprzez wykorzystanie odpowiednich modulatorów, których wpływ przekłada się na aktywność proteolityczną proteasomu. Bardzo interesujące wydaje się być wykorzystanie inhibitorów systemu ubikwityna-proteasom powodujące zahamowanie proliferacji komórek i indukcję apoptozy, szczególnie w komórkach nowotworowych. Otwiera to nowe możliwości na drodze walki z chorobami nowotworowymi dając naukowcom potężne narzędzie wymierzone w te niepożądane, groźne komórki.

Przedstawiona do recenzji praca wpisuje się w ten nurt badań i poświęcona jest znalezieniu modyfikacji struktury peptydu Tat1 pozwalających mu hamować aktywność ludzkiego proteasomu 20S w oparciu o modulację allosteryczną. Peptyd Tat1 jest aktywnym fragmentem białka wirusowego HIV-1 Tat – jednego z nielicznych, białkowych inhibitorów proteasomu hamujących jego aktywność proteolityczną na sposób allosteryczny.

Praca doktorska zrealizowana została w Pracowni Chemii Biomedycznej Katedry Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. nadzw. UG. Opracowanie obejmuje 165 stron podzielonych na 11 rozdziałów poprzedzonych spisem treści i wykazem stosowanych skrótów. Rozdziały odnoszące się do syntez i dokonanych oznaczeń zatytułowane są zgodnie z kolejnymi zadaniami badawczymi, stojącymi przed Doktorantem. Bardziej klasyczny układ i nazwy rozdziałów (może z pominięciem rozdziału tytułowanego zwykle „Badania własne”, które tutaj zostały wrzucone do „Części eksperymentalnej”) znalazły się w spisie treści jako

dotodkowy element organizacji struktury pracy. Całość rozprawy opatrzona jest 59 rysunkami i 11 tabelami. Szata graficzna opracowania jest na wysokim poziomie, zamieszczone rysunki, schematy i tabele są przygotowane bardzo starannie. Jedyną wpadką, jaką zauważyłem to rysunek nr 44 na str. 118 przedstawiający trzy widma masowe – dwa pierwsze z nich są zupełnie nieczytelne (chodzi o przypisanie wartości odpowiednim pikom). Mała niekonsekwencja dotyczy też rozgraniczenia pomiędzy tabelami i rysunkami. Na stronach od 124 do 126 znalazły się zdjęcia przedstawiające obrazy mikroskopowe odnoszące się do badań cytotoksycznych wybranych analogów względem komórek nowotworowych HeLa zebrane i zatytułowane jako Tabela 11. Natomiast zdjęcia żeli np. ze strony 115 są rysunkiem (nr 41).

Pierwszą część pracy stanowi rozdział „Wstęp literaturowy” (43 strony) poświęcony przybliżeniu tematyki i przedmiotu badań. Doktorant skoncentrował się w nim na budowie i aktywności proteasomu, sposobach jego aktywacji oraz funkcji jaką pełni w układach biologicznych. Rozdział kończy się krótkim opisem schorzeń spowodowanych zaburzeniami w funkcjonowaniu proteasomu oraz perspektywami wykorzystania go jako celu farmakologicznego. Ta część pracy napisana jest bardzo przystępnie, w formie i objętości adekwatnej do tego typu opracowań. Po wstępie literaturowym następuje krótki rozdział „Cel pracy”, w którym wymienione zostały wszystkie zaplanowane do syntezy analogi i krótko scharakteryzowane badania zaplanowane do realizacji z ich wykorzystaniem. Zapoznając się z tą częścią pracy nie do końca można zrozumieć co i dlaczego Doktorant zamierza wykonać w trakcie realizacji badań – chodzi o dobór analogów. Oczywiście te wyjaśnienia zawarte są w dalszej części opracowania, pytanie czy nie powinny znaleźć się w tym właśnie miejscu (chodzi o dwa słowa komentarza odnośnie takiego a nie innego skanu alaninowego i doboru modyfikacji wymuszającej odpowiednią konformację łańcucha peptydowego).

Kolejną część pracy stanowią rozdziały (3-8) związane z opisem wykonanych syntez i oznaczeń mających na celu:

- otrzymanie 37 analogów peptydu Tat1;
- zbadanie wpływu otrzymanych analogów na modulację aktywności proteasomu z wykorzystaniem odpowiednich substratów fluorogenicznych;
- zbadanie stabilności badanych analogów w obecności proteasomu;
- zbadanie wpływu peptydu Tat1 na modulację proteasomu pochodzącego z drożdży;
- zbadanie wpływu peptydu Tat1 i jego wybranych analogów na degradację modelowego substratu białkowego ( $\alpha$ -synukleiny) przez proteasom;
- określenie cytotoksyczności analogów peptydu Tat1 względem komórek nowotworowych HeLa;
- analizę struktury wybranych analogów z wykorzystaniem dichroizmu kołowego, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego i technik obliczeniowych;
- zbadanie oddziaływań wybranych analogów peptydu Tat1 z ludzkim proteasomem z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej.

Otrzymane wyniki zostały omówione w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wnioski i dyskusja wyników”. Rozdział ten stanowi spójne, syntetyczne zebranie i omówienie najważniejszych rezultatów realizacji poszczególnych zadań. Całość pracy kończą rozdziały „Podsumowanie” oraz „Literatura cytowana” (obejmuje ona 197 pozycji z lat 1970-2015).

Zakres prac zaplanowanych przez Doktoranta jest bardzo szeroki i obejmuje wiele metod eksperymentalnych. Ważny jest fakt, iż Pan Przemek operuje nimi w sposób bardzo swobodny i potrafi rozwiązywać napotkane problemy. Tak stało się chociażby w przypadku wstępnych niepowodzeń z niektórymi z syntez, czy też znakowaniem proteasomu w przypadku badań z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej. Podkreślić należy, że wszystkie zaplanowane eksperymenty udało się zrealizować i doprowadziły one do uzyskania szeregu ważnych informacji. Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta zaliczyć można:

- wyznaczenie dwóch regionów farmakoforowych w sekwencji peptydu Tat1 – przeprowadzony skan alaninowy z wykorzystaniem pojedynczych, podwójnych i potrójnych modyfikacji pozwolił na zdefiniowanie takich regionów we fragmentach 4-6 i 8-10 peptydu;
- określenie wpływu modyfikacji stabilizujących peptyd Tat1 w konformacji typu  $\beta$  na ich aktywność inhibitorową – wprowadzenie nienaturalnych reszt aminokwasowych stabilizujących konformację typu  $\beta$  w regiony farmakoforowe doprowadziło do uzyskania analogów o wysokiej aktywności;
- otrzymanie trzech analogów peptydu Tat1 charakteryzujących się bardzo wysoką zdolnością do hamowania aktywności proteasomu – analogi peptydu oznaczonego jako Tat5-Cuk charakteryzują się najwyższą aktywnością spośród małowiązanych allosterycznych inhibitorów proteasomu opisanych do tej pory w literaturze;
- potwierdzenie wpływu przestrzennego rozłożenia ładunku w połączeniu z przyjęciem odpowiedniej konformacji przez analogi na pożądaną aktywność;
- otrzymanie szeregu związków o właściwościach cytotoksycznych względem komórek raka szyjki macicy (HeLa) – wprowadzenie modyfikacji stabilizujących konformację  $\beta$  do cząsteczek analogów spowodowało uzyskanie przez nie takiej właśnie aktywności (w przeciwieństwie do Tat1); znów analogi peptydu oznaczonego Tat5-Cuk okazały się być najaktywniejsze.

W tekście powyżej zostały już wytknięte pewne niedociągnięcia. Z racji obowiązku jaki spoczywa na recenzencie chciałbym ten wątek jeszcze przez chwilę rozwinąć. Jeżeli chodzi o stronę edytorską opracowania to jest ona na bardzo przyzwoitym poziomie, jednak znalazły się w nim niewielkie potknięcia. W tym miejscu chciałbym przytoczyć tylko kilka przykładów błędów, niefortunnych sformułowań językowych i innych niedociągnięć:

- w spisie treści rozjechało się formatowanie rozdziału 5;
- niefortunne sformułowania: „białka źle sfałdowane”, „wnioski oparto wówczas przede wszystkim o analizę rentgenografii strukturalnej...”, „fluorogenne substraty”, „nie-białkowe”, „długość gradientu”, „natężenie przepływu eluentów”, „efektywność przyłączenia ... do żywicy”, „wykonałem resyntezę”, „Surowy produkt XXIX oczyszczałem stosując szereg warunków.”, „podstawienie pozycji”;
- chciałbym poprosić o komentarz do zdania: „Do określenia masy molowej otrzymanych związków (weryfikacji prawidłowości składu aminokwasowego) wykorzystałem następujące spektrometry mas:...”;
- z nadmiernym upodobaniem Doktorant posługuje się słowem „istotność” – istnieje wiele synonimów tego słowa, które w niektórych wypadkach dużo lepiej pasowały do kontekstu zdań;
- w wymienionych dwóch (spośród trzech) warunkach odszczepiania peptydów od nośnika (podrozdział 3.1.2) TIPSII pojawia się raz w stosunku objętościowym raz w wagowym; do warunków

odszczepiania Autor odwołuje się w poszczególnych opisach syntez przywołując „roboczy” numer podrozdziału – O; łatwiej i wtedy pewnie bezbłędnie było po prostu za każdym razem podać skład mieszaniny;

- nie wiem dlaczego ostatni rozdział „Literatura cytowana” – został sformatowany w zupełnie inny sposób - rozmiar czcionki i brak odstępów między pozycjami nie ułatwiły poruszania się po nim.

Oprócz wymienionych (zresztą dyskusyjnych w niektórych przypadkach) niedociągnięć w dysertacji trzeba zauważyć i docenić ogrom pracy i wysiłku włożony przez Doktoranta w jej powstanie. Prace łączące tak szeroką gamę metod eksperymentalnych nie należą do prostych i wymagają szerokiej i różnorodnej wiedzy. Takimi umiejętnościami wykazał się w trakcie realizacji kolejnych zadań Pan mgr Przemysław Karpowicz. Uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej wyniki wnoszą wiele nowych i niewątpliwie cennych informacji dotyczących allosterycznej regulacji proteasomu. Mogą one w przyszłości znaleźć zastosowanie w wyjaśnieniu i dokładnym poznaniu mechanizmu całego procesu, co przełoży się niewątpliwie na wykorzystanie efektów przeprowadzonych badań na zastosowanie farmaceutyczne.

Dorobek naukowy mgr. Przemysława Karpowicza (zgodnie z dostarczonymi mi materiałami) to sześć publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR, jedna publikacja spoza tej listy, trzy publikacje w materiałach pokonferencyjnych i trzydzieści siedem komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych (6 z nich to samodzielne wystąpienia ustne). Mniej więcej połowę z nich stanowią konferencje zagraniczne. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż publikowane i prezentowane wyniki w większości odnoszą się bezpośrednio do efektów eksperymentów wchodzących w skład recenzowanej pracy. Pan Przemek odbył dwuletni staż naukowy w laboratorium kopromotora - Pani profesor Marii Gaczynskiej (Institute of Biotechnology, University of Texas Health Science Centre). Przez miesiąc przebywał również w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w grupie naukowej profesora Wojciecha Bala wykonując eksperymenty ukierunkowane na badanie oddziaływań wybranych analogów Tat1 z ludzkim proteasomem z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej. Na koncie Doktoranta znajduje się również szereg wyróżnień. Ja zwróciłbym szczególną uwagę na stypendium w ramach VI edycji programu InnoDoktorant (2014).

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr. Przemysława Karpowicza spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 17 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami w art. 251 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 15 stycznia 2004 oraz w zaleceniach Centralnej Komisji ds. Tytułu Naukowego i Stopni Naukowych z dnia 20 maja 2002 i z dnia 14 października 2005 i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania Mu stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr. Przemysława Karpowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Adam Frahl*