



POLITECHNIKA ŁÓDZKA

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

prof. dr hab. Beata Kolesińska,

tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Honoraty Sikory

Magister Honorata Sikora swoją pracę doktorską zatytułowaną „Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 jako czynnika predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Chemii Biomedycznej pod opieką dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. Uniwersytetu Gdańskiego oraz dr Natalii Gruby, jako promotora pomocniczego.

Enzymy z rodziny ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) to białka transbłonowe lub wydzielnicze, które pełnią różnorodne funkcje w komórce. Odgrywają one złożoną i często kluczową rolę w rozwoju wielu chorób poprzez swoje działanie proteolityczne i adhezyjne. Ich zdolność do odcinania zewnątrzkomórkowych domen różnych białek (shedding) wpływa na sygnalizację komórkową, adhezję, migrację i inne procesy, które są często zaburzone w stanach patologicznych. ADAM10 jest uważany za enzym ochronny, ponieważ bierze udział w nieamyloidogennej ścieżce przetwarzania prekursora białka amyloidowego (APP), zapobiegając powstawaniu beta-amyloidów. Obniżona aktywność ADAM10 może zwiększać ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. Wiele enzymów ADAM, w tym ADAM17, ADAM9 i ADAM15, bierze udział w odcinaniu czynników wzrostu, receptorów i cząsteczek adhezyjnych, co może promować wzrost nowotworów, angiogenezę, inwazję i przerzuty. Nadmierna ekspresja i aktywność tych enzymów często korelują ze zwiększoną złośliwością nowotworów. Uważa się, że ADAM10 i ADAM17 mogą odgrywać rolę w miażdżycy indukowanej przewlekłą chorobą nerek poprzez wpływ na procesy zapalne i dysfunkcję naczyń. ADAM17 (TACE) jest kluczowym enzymem odpowiedzialnym za uwalnianie TNF-alfa, prozapalnej cytokiny, która odgrywa kluczową rolę w wielu chorobach zapalnych, w tym reumatoidalnym zapaleniu stawów i nieswoistych zapaleniach jelit. ADAM8 jest zaangażowany w procesy zapalne i może przyczyniać się do patogenezy chorób zapalnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i zapalenie tchawicy. ADAM10 i ADAM17 regulują migrację komórek endometriozy poprzez skoordynowane odcinanie ligandów i receptorów, wpływając na szlaki sygnałowe kinaz. Ich aktywność jest zaburzona

w przebiegu tej choroby. Zaburzenia w funkcji enzymów ADAM, zarówno ich nadmierna, jak i niedostateczna aktywność, mogą przyczyniać się do rozwoju i progresji różnych chorób. Zrozumienie roli poszczególnych enzymów ADAM w specyficznych kontekstach chorobowych otwiera możliwości terapeutyczne poprzez modulowanie ich aktywności. Nieprawidłowe działanie enzymów ADAM powiązane z różnymi stanami patologicznymi, w tym z rakiem, chorobami sercowo-naczyniowymi, astmą i chorobą Alzheimera, co podkreśla ich znaczenie w prawidłowej fizjologii i chorobach.

Inhibitory ADAM są badane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe i przeciwzapalne, natomiast strategie mające na celu zwiększenie aktywności niektórych ADAM, na przykład ADAM10 w chorobie Alzheimera, są również intensywnie badane.

Podjęte badania nad poznaniem aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 jako czynnika predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej bez wątplenia wpisuje się w aktualnie prowadzone badania nad zrozumieniem złożonych funkcji tych enzymów, identyfikacji ich roli w rozwoju chorób oraz opracowaniu strategii terapeutycznych modulujących ich aktywność. Badania koncentrują się na patogenezie wielu chorób, mechanizmach działania i szlakach sygnałowych, inhibitorach i aktywatorach ADAM jako potencjalnych lekach, wykorzystaniu ADAM jako biomarkerów.

Recenzowana praca liczy 191 stron. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje streszczenie, wykaz skrótów, wprowadzenie teoretyczne, metody, cel pracy, badania własne, wyniki i dyskusję podsumowanie i wnioski, dorobek naukowy, wykaz rycin tabel oraz bibliografię.

Rozdział pierwszy „Streszczenie” przedstawia w zwięzły sposób wprowadzenie do pracy oraz zakres zrealizowanych prac badawczych. Rozdział „Wykaz stosowanych skrótów” jest bardzo zwięzły i liczy tylko 9 wyjaśnionych skrótów. Nasuwa się pytanie, czy rzeczywiście było konieczne jego wydzielanie.

Rozdział „Wprowadzenie teoretyczne” obejmuje podrozdziały dotyczące: rodziny białek dezintegryny i metaloproteazy, w tym budowy, funkcji i wpływu na tych białek na rozwój chorób, budowy enzymu ADAM 17, substratów ADAM 17, chorób wywołanych zmianami aktywności ADAM 17, inhibitorów ADAM 17 oraz nefropatii cukrzycowej. Rozdział ten liczy 49 stron i zawiera 178 odnośników literaturowych. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji, co pozwala na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy.

Rozdział „Metody” opisany jest na 16 stronach. W rozdziale tym opisane zostały podstawowe zagadnienia dotyczące chemii kombinatorycznej (metoda split and mix), syntezy peptydów, w tym stosowanych nośników polimerowych, odczynników kondensujących, metod analizy aktywności proteolitycznej enzymów z wykorzystaniem substratów chromogenicznych, fluorogenicznych, w tym metody FRET, oraz opisu substratów enzymów (notacja Schechter i Bergera). W moim przekonaniu tytuł Metody wskazuje, że będzie to część eksperymentalna, natomiast rozdział ten jest połączeniem metod eksperymentalnych oraz standardowych metod chemii kombinatorycznej. Wydaje mi się, że lepszym rozwiązaniem byłby krótki rozdział dotyczący chemii kombinatorycznej dołączony do głównego rozdziału I „Wprowadzenie teoretyczne”. W tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o omówienie metod stosowanych w chemii kombinatorycznej, które pozwalają na badanie aktywności enzymatycznej białek ze składowymi bibliotek w oparciu o podejście jedno ziarno – test analityczny (ocena aktywności enzymatycznej). Proszę również o omówienie standardowych metod dekonwolucji stosowanych w chemii kombinatorycznej.

Kolejny rozdział pracy to cel pracy. Głównym celem pracy było otrzymanie metodami chemii kombinatorycznej selektywnego substratu fluorogenicznego dla enzymu ADAM 17. Osiągnięcie celu głównego wymagało osiągnięcia wielu celów szczegółowych obejmujących: dekonwolucję biblioteki tetrapeptydowych substratów chromogenicznych wobec o wzorze ogólnym $ABZ-X_4-X_3-X_2-X_1-ANB-NH_2$, dekonwolucję biblioteki heptapeptydowych substratów fluorescencyjnych dla enzymu ADAM 17, o wzorze ogólnym $ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X_1'-X_2'-X_3'-Tyr(3-NO_2)-NH_2$, określenie wpływu modyfikacji C-końcowego ugrupowania na szybkość hydrolizy, wyznaczenie parametrów kinetycznych: stałej Michaelisa, szybkości maksymalnej, stałej katalitycznej oraz stałej specyficzności dla najlepszych substratów, zbadanie zmian aktywności enzymu ADAM 17 w lizacie komórkowym, medium zewnątrzkomórkowym oraz badania nad wyznaczeniem zależności między aktywnością enzymu w moczu a cukrzycą i jej powikłaniami. W opisie celu pracy pomiędzy celem ogólnym, a celami szczegółowymi, w moim przekonaniu jest zbyt duży skrót myślowy. Głównym celem jest bowiem znalezienie selektywnego substratu fluorogenicznego dla enzymu ADAM 17, zaś cele szczegółowe zaczynają się od dekonwolucji, a nie syntezy bibliotek. Proszę o precyzyjne przedstawienie celu głównego i celów szczegółowych w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej. Kolejna uwaga dotyczy struktur ogólnych obydwu bibliotek, skąd Doktorantka je знаła i dlaczego podjęła badania nad nimi. Tu również proszę o informację nad wyborem tych dwóch pochodnych peptydowych.

Rozdział IV Badania własne jest częścią eksperymentalną. Rozdział ten liczy 36 stron. Napisany został poprawnie. Przedstawione procedury pozwalają na odtworzenie, co gwarantuje powtarzalność procedur oraz uzyskanych wyników. W trakcie obrony rozprawy doktorskiej prosiłabym Doktorantkę o dokładne przedstawienia na przykładzie jednej biblioteki i wybranej składowej biblioteki o omówienie kolejnych etapów syntezy, dekonwolucji i przeprowadzonych badań. Pozwoli to na zobrazowanie procesu poszukiwania związku aktywnego z bibliotek związków chemicznych.

Ostatni główny rozdział „Wyniki i dyskusja” opisany jest na 34 stronach. Zawiera 20 rysunków oraz 4 tabele. Wykorzystując metody chemii kombinatorycznej Doktorantka zsyntezowała bibliotekę tetrapeptydów, którą poddała dekonwolucji. W wyniku przeprowadzonych badań wyselekcjonowała pochodną ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂, która była dobrym substratem dla enzymu ADAM 17. Kolejny etap badań obejmował projektowanie biblioteki heptapeptydów. Finalnie Doktorantka wyselekcjonowała substrat dla enzymu ADAM 17, o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**).

W wyniku optymalizacji struktury znalezionego substratu w C-końcowym fragmencie Doktorantka znalazła jeszcze dwie pochodne, wydajnie hydrolizowane przez enzym ADAM 17: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**) oraz ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH₂ (**9**). Wykazała też, że ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ jest selektywnie hydrolizowany przez enzym ADAM 17.

W ramach pracy badawczej Doktorantka zbadła aktywność enzymu ADAM 17 w próbkach lizatów oraz medium zewnątrzkomórkowego podocytów. Podocyty to wyspecjalizowane komórki nabłonkowe, które stanowią trzewną warstwę torebki Bowmana w kłębuszku nerkowym nerki. Odgrywają kluczową rolę w procesie filtracji krwi i tworzeniu moczu pierwotnego. W warunkach wysokiego stężenia glukozy (warunki uszkadzające podocyty) Doktorantka stwierdziła obniżenie wewnątrzkomórkowej aktywności ADAM 17. Zwiększoną aktywność tego enzymu obserwowana była na zewnątrz komórki. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że obecność białka Klotho istotnie zwiększa aktywność wewnątrzkomórkową enzymu w warunkach podwyższonego stężeniu glukozy. Doktorantka wykazała też że w próbkach moczu szczurów z cukrzycą obserwuje się statystycznie wyższą aktywność ADAM 17 w porównaniu do osobników zdrowych. Również badania moczu pacjentów chorych na cukrzycę wskazują na wyższą aktywność ADAM 17 w porównaniu do moczu osób zdrowych. Uzyskane przez Doktorantkę pochodne peptydowe mogą być rozważane jako użyteczne w diagnostyce cukrzycy i związanych z nią chorób nerek.

Ostatni rozdział główny „Podsumowanie i wnioski” napisany jest spójnie.

Praca przygotowana została starannie od strony edytorskiej. Jedyne niedociągnięcie to Tabela 1, gdzie legenda jest w języku angielskim.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Pozytywnie oceniam też zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach. Dodatkowym atutem recenzowanej pracy jest bezpośredni udział Doktorantki w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr Honoraty Sikory składa się 4 publikacje, z czego 3 w czasopismach z listy JCR. Dwie publikacje bezpośrednio związane są z rozprawą doktorską. W publikacji w *Analytical Biochemistry* Doktorantka jest pierwszym współautorem, i to właśnie ta praca stanowi podstawową część recenzowanej rozprawy. Pani mgr Honorata Sikora jest również współautorem sześciu komunikatów prezentowanych na konferencjach naukowych. Doktorantka była również kierownikiem trzech projektów badawczych służących rozwojowi młodych naukowców oraz doktorantów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Była również wykonawcą (doktorant stypendysta) w projekcie OPUS 15 „Rola białek klotho i NPP1 w regulacji funkcji komórki podocytarnej”, nr UMO-2018/29/B/NZ4/02074 (NCN).

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Honoraty Sikory. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Honoraty Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 17 04 2025