



Dr hab. Łukasz Berlicki
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wroclaw
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Gruby, pt.: "Badanie specyficzności
ludzkiego proteasomu metodami chemii kombinatorycznej"**

Pani mgr Natalia Gruba wykonała pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Lesnera i dr Magdaleny Wysockiej (promotor pomocniczy) dotyczy poszukiwania specyficznych substratów ludzkiego proteasomu metodami chemii kombinatorycznej. Tematyka badań Doktorantki związana jest z niezwykle ciekawym i ważnym białkiem, którego aktywność jest powiązana z wieloma chorobami.

Proteasom jest ogromnym i złożonym kompleksem białkowym o właściwościach proteolitycznych, który uczestniczy w procesie degradacji białek. Jest on jednym z kluczowych elementów procesu regulacji cyklu komórkowego. Jego aktywność powiązana jest także z odpowiedzią immunologiczną i stresem oksydacyjnym. Proteasom wzbudza bardzo duże zainteresowanie społeczności naukowej (ponad trzydzieści tysięcy publikacji, Nagroda Nobla 2004). Duża część badań jest stymulowana możliwością zastosowania inhibitorów proteasomu w terapii nowotworowej (trzy związki zostały już dopuszczone do użycia). Wykazano także

powiązanie proteasomu z chorobami neurodegeneracyjnymi tj. chorobą Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona i stwardnieniem zanikowym bocznym.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Gruby jest bardzo obszerna — liczy ponad 200 stron. Jest skonstruowana w sposób klasyczny i zawiera: przegląd literaturowy, cel pracy, badania własne, wyniki i dyskusję, wnioski oraz literaturę. Warto podkreślić wysoką staranność edycji oraz klarowny i profesjonalny język pracy.

Przegląd literaturowy zawarty na 44 stronach jest napisany bardzo przejrzysto i prezentuje najważniejsze informacje o strukturze i funkcjach proteasomu. Wyczerpująco opisane są inhibitory proteasomu i jego powiązanie z różnymi chorobami. Jednakże podrozdział 5 „Metody analizy proteasomu” wydaje się być źle skonstruowany. Zawiera on bowiem podstawowe informacje dotyczące fluorescencji i testów immunoenzymatycznych, które można znaleźć w wielu podręcznikach. Nie ma niestety informacji dotyczących znanych substratów proteasomu i metod badania jego aktywności. Kolejny podrozdział „Chemia kombinatoryczna” także wydaje się być zbędny, ponieważ opisuje jedynie podstawowe techniki. Co więcej, szczegóły metody *mix and split* zastosowanej w tej pracy są dokładnie opisane w rozdziale ‘Badania własne’.

Cel pracy jest jasno przedstawiony w pięciostronicowym rozdziale. Autorka krótko opisuje swoje zamierzenia dotyczące syntezy bibliotek peptydów, w których będzie poszukiwać substratów dla poszczególnych podjednostek katalitycznych proteasomu. Wyselekcjonowane związki Doktorantka planuje zastosować do określania aktywności enzymu w próbkach biologicznych.

Kolejny rozdział zatytułowany ‘Badania własne’ jest bardzo obszerny (60 stron) i zawiera dane eksperymentalne. Szczegółowo opisano syntezę bibliotek peptydowych, ich dekonwolucję a analizę poparto kopiami widm spektrometrii mas. Bardzo skrupulatnie opisano także badania kinetyczne i pomiary na materiale biologicznym. Rozdział ten dobrze pokazuje doskonały warsztat naukowy Autorki. Niepotrzebne jedynie wydaje się opisywanie podstaw kinetyki reakcji enzymatycznych (strony 104-107), co jest przedmiotem podstawowych kursów biochemii. Poprawność zsyntezowanych bibliotek peptydów Doktorantka sprawdzała poprzez wyznaczenie zakresu mas cząsteczkowych. Czy były symulowane widma masowe tych bibliotek? Porównanie takiej symulacji z wynikiem eksperymentalnym znacząco lepiej dowodziłoby poprawności składu biblioteki.

W następnej części pracy znajduje się opis otrzymanych wyników i ich dyskusja. Autorka opisuje sposób optymalizacji sekwencji peptydowych, które specyficznie trawione są przez podjednostki chymotrypsynową, trypsynową i kaspazową proteasomu. Otrzymane heptapeptydy wykazywały znaczące parametry kinetyczne względem proteasomu i charakteryzowały się bardzo wysoką specyficznością względem wybranych podjednostek. W dyskusji tych wyników bardzo pomocne byłoby porównanie parametrów kinetycznych otrzymanych heptapeptydów z tymi dla komercyjnie dostępnych substratów proteasomu. Stwierdzenie, że 'dość istotnie się różnią' jest zbyt ogólne. Ze względu na to, że komercyjne substraty zawierają 3-4 reszty aminokwasowe, to warto byłoby zestawić je także ze zoptymalizowanymi tetrapeptydami. Dodatkowo, warto byłoby określić, czy opisano w literaturze inne substraty proteasomu o podobnej liczbie reszt aminokwasowych?

Druga część wyników dotyczy zastosowania otrzymanych substratów do oznaczania aktywności proteasomu w próbkach biologicznych — osoczu krwi i moczu pacjentów z chorobami nowotworowymi. Bardzo ciekawa jest obserwacja, że aktywność proteasomu w moczu jest mierzalna dla osób cierpiących na nowotwory pęcherza moczowego i nieobecna w próbkach osób zdrowych. Obecność proteasomu w próbkach pochodzących od osób chorych została dodatkowo potwierdzona testami ELISA.

Poza wyżej wymienionymi uwagami chciałbym poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie w czasie obrony następujących problemów:

- Czy i w jaki sposób zoptymalizowane peptydy mogą przyczynić się do odkrycia nowych inhibitorów proteasomu?
- Czy zastosowanie opracowanych substratów do wykrywania aktywności proteasomu w moczu może być użyteczne klinicznie? Jakie zalety/wady ma ta metoda w porównaniu do innych metod diagnostycznych?

Chciałbym podkreślić, że powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej pracy, a mają na celu wywołanie dyskusji naukowej.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Gruby spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, potwierdzające dużą wiedzę Autorki jak i umiejętności prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Gruby do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Ponieważ

rozprawa została przygotowana i zrealizowana w wyróżniający się sposób, a część wyników pracy została już opublikowana, wnioskuję do Rady Wydziału Chemii U. G. o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Juliusz Bilal