



dr hab. inż. Marcin Sieńczyk
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
ul. Smoluchowskiego 23, p.131
50-372 Wrocław
tel. +48 71 320 36 46
fax +48 71 320 24 27

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Cypriana Kamila Norwida 4/6
50-373 Wrocław
tel. +48 71 320 24 25
fax +48 71 320 21 52

Wrocław, 19 maja 2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk pt. *Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w charakterystyce wybranych proteinaz serynowych*

Poszukiwanie nowych substancji chemicznych, dzięki którym możliwe staje się śledzenie aktywności enzymów, zarówno we wnętrzu komórki, jak i w niezwykle skomplikowanych pod względem swego składu płynach ustrojowych, stanowi ogromne wyzwanie współczesnej nauki mieszczącej się na pograniczu chemii, biologii i immunologii. Choć już ponad 13 lat temu opublikowano wyniki projektu, którego celem było poznanie genomu człowieka, okazało się, iż w miejsce długo wyczekiwanych odpowiedzi zostaliśmy raczej pozostawieni z ogromną ilością nowych pytań i swoistych naukowych zagadek, na których rozwiązanie przyjdzie nam czekać jeszcze długie lata. Lecz taka jest już rola nauki – poszukiwanie odpowiedzi na ważne pytania i stawianie nowych – co powoli, krok po kroku, przybliży nas do zrozumienia otaczającego świata.

Jednym z istotnych zagadnień ery postgenomowej jest poznanie mechanizmów aktywacji czy regulacji działania enzymów proteolitycznych, określenie biologicznej roli jaką pełnią w wielu kluczowych procesach życiowych jak krzepnięcie krwi, apoptoza, angiogeneza, trawienie pokarmu, funkcjonowanie systemu dopełniacza, procesowanie antygenów, metastaza nowotworów czy nawet proces replikacji wirusów. Poznanie sposobu funkcjonowania proteaz, poznanie ich roli w często krzyżujących się skomplikowanych ścieżkach biochemicznych zależności otwiera możliwości projektowania nowych leków, które w różny sposób mogą oddziaływać z docelowymi enzymami. Jednak badanie aktywności proteaz wymaga posiadania bardzo precyzyjnych, specyficznych i czułych narzędzi analitycznych, bez których sukces prowadzonych badań jest praktycznie niemożliwy, a których opracowanie samo w sobie stanowi ogromne wyzwanie. Wyzwanie, które postanowiła podjąć w swej pracy doktorskiej Pani Jadwiga Popow-Stellmaszyk.



Jednym z podejść stosowanych w badaniu aktywności enzymów proteolitycznych jest projektowanie i otrzymywanie wysoce specyficznych substratów, których proteoliza pozwala na śledzenie aktywności enzymów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Co więcej, zoptymalizowane strukturalnie substraty pozwalają często na zaprojektowanie specyficznych inhibitorów czy sond molekularnych, co dodatkowo powiększa wachlarz narzędzi analitycznych pozwalających na kompleksowe poznanie funkcji enzymów proteolitycznych.

Zagadnienie poszukiwania nowych związków biologicznie aktywnych od wielu lat należy do obszaru zainteresowań *Gdańskiej Szkoły Chemików* Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, kiedyś jeszcze pod wodzą śp. Profesora Gotfryda Kupryszewskiego, obecnie rozwijane przez Profesora Krzysztofa Rolkę oraz Promotora niniejszej rozprawy, Profesora Adama Lesnera.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 215 stron i ma układ typowy, powszechnie przyjęty dla tego rodzaju opracowań. Rozprawa składa się z ośmiu głównych części (Przegląd literaturowy, Cel pracy, Badania własne, Dyskusja na temat wyników i wnioski, Wykaz rysunków, Wykaz tablic, Dorobek naukowy i Literatura cytowana) poprzedzonych wykazem najczęściej stosowanych skrótów i krótkim wstępem. Nie mniej jednak niewielka modyfikacja układu pracy, w mojej ocenie, pozwoliłaby na zwiększenie jej czytelności – mam tu na myśli przeniesienie wniosków z wykonanych prac, które znajdują się w części zatytułowanej *Dyskusja na temat wyników i wnioski* do części *Badania własne*, przynajmniej dla kolejnych etapów dekonwolucji. Umożliwiłoby to niemalże natychmiastowe zorientowanie się, dlaczego Autorka podjęła takie, a nie inne decyzje dotyczące wyboru dalszych etapów prowadzonych prac (np. selekcji kolejnych reszt aminokwasowych w trakcie optymalizacji struktury najefektywniej hydrolizowanych substratów). W obecnym układzie pracy odpowiedzi na wiele pytań znajdują się dopiero w końcowych rozdziałach co sprawia, że w celu jej pełnego zrozumienia należy równolegle analizować dane znajdujące się w dwóch, czasami nawet w trzech odrębnych miejscach. Trochę przypomina to bibliotekę substratów obejmujących pozycje X_3 - X_3' – niby wszystko jest, ale potrzeba trochę wysiłku i cierpliwości, aby odnaleźć właściwą sekwencję...

Doktorantka umieściła w swojej rozprawie aż 145 rysunków oraz 21 tablic, natomiast spis cytowanej literatury obejmuje 184 pozycje w większości z ostatnich dziesięciu lat. Do pracy dołączone zostało także oświadczenie Autorki o samodzielności jej wykonania. Wykaz skrótów obejmuje najważniejsze skróty użyte w pracy i, co warto podkreślić, zawiera także odnośniki literaturowe do rekomendacji Komisji Nomenklatury Biochemicznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej oraz Międzynarodowej Unii Biochemicznej, a także Europejskiego Towarzystwa Peptydowego. Jedyne na co pragnęłyby zwrócić uwagę jest niepoprawna odmiana słowa *neutrofile* – dopełniacz liczby mnogiej słowa *neutrofile* brzmi *neutrofilii*, nie *neutrofilów*. W tym miejscu także chciałbym zwrócić uwagę Autorki na, według mnie, nieco błędne utworzenie przymiotnika od rzeczownika *neutrofil*. Przez analogię do słowa nukleofil, mówimy raczej



o substytucji nukleofilowej, NIE nukleofilnej – proponowałbym więc ludzką elastazę nazywać raczej neutrofilową zamiast elastazą *neutrofilną*,

Zanim jednak przejdę do analizy poszczególnych części opracowania, pozwolę sobie na kilka uwag natury ogólnej. Rozprawa doktorska Pani Jadwigi Popow-Stellmaszyk została bardzo starannie opracowana pod względem edytorskim i graficznym, co bardzo korzystnie wpłynęło na jej estetykę, ogólny odbiór i przejrzystość zawartych w niej informacji. Mam jednak kilka drobnych uwag. Jako że charakter prowadzonych przez Autorkę badań wymagał przedstawienia części z uzyskanych wyników w postaci chromatogramów HPLC, i choć rozumiem także, że *młodość ma swoje prawa*, to trudno mi zrozumieć jednak wiarę Autorki w to, że wszyscy potencjalni czytelnicy jej rozprawy mają wzrok dwudziestokilkulatków. Niestety rozmiar czcionki na większości z umieszczonych w pracy chromatogramach HPLC wymagał użycia lupy (przykładowo rysunki 50, 51, 56, 57, 63...). Analogiczna sytuacja ma miejsce dla części zamieszczonych w pracy widm spektrometrii mas, pośród których obecne są także (na szczęście nieliczne) zupełnie nieczytelne, niskiej jakości, niemożliwe do interpretacji obrazy. A szkoda, bo przedstawione analizy HPLC i MS są niezwykle interesujące i niosą w sobie ogromną wartość poznawczą. Jest to jednak drobne potknięcie edytorskie i zrzucam to raczej na karb przeniesienia pracy z wersji elektronicznej na papier i związanej z tym utraty jakości.

Przegląd literatury zawarty został na 45 stronach i składa się z czterech głównych rozdziałów. W pierwszym rozdziale (21 stron) Autorka omawia klasyfikację enzymów, podstawowe mechanizmy ich działania czy wpływ środowiska na kinetykę reakcji enzymatycznej. W dalszej części rozdziału przedstawione zostały podstawowe informacje dotyczące proteaz serynowych i stosunkowo dokładny opis biologicznej roli neutrofilowych proteaz serynowych (proteinyazy 3, katepsyny G, elastazy oraz czwartej neutrofilowej proteazy serynowej) stanowiących przedmiot rozprawy. Rozdział ten stanowi bardzo dobre wprowadzenie czytelnika w dalszą lekturę rozprawy, który znajduje tutaj pełne uzasadnienie dla przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Choć do tej części pracy nie mam większych uwag, z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić uwagę na kilka kwestii. Tytuł Rozdziału 1 *Przeglądu literaturowego* proponowałbym zmienić na jakiś bardziej ogólny w miejsce *Neutrofilne proteinyazy serynowe*, tym bardziej że Autorka opisuje w nim ogólne cechy i podział enzymów. Ponadto Podrozdział 1.7. także nosi nazwę *Neutrofilne proteinyazy serynowe*, czyli dochodzi do sytuacji, w której nazwy rozdziału i podrozdziału są identyczne.

Rozumiem „przywiązanie” Autorki do białek jako głównych katalizatorów reakcji chemicznych w organizmie, ale pragnąłbym przypomnieć, iż białka nie mają monopolu na katalizę. Już dawno odkryto cząsteczki RNA o funkcji katalitycznej, a wyniki sekwencjonowania ludzkiego genomu pokazały, że prawdopodobnie ich rola jest daleka od marginalnej wbrew temu, co nam się wcześniej wydawało.



Dyskusyjne jest stwierdzenie Doktorantki, iż *W przypadku proteinaz serynowych, reszty te tworzą „triadę katalityczną” i występują zawsze w zastępującej kolejności: a) reszta nukleofilowa (Ser195), b) reszta katalityczna (Asp102) i c) reszta His57*. Po pierwsze, ogólnie przyjęty zapis klasycznego układu triady katalitycznej dla proteaz klanu PA (którego przedstawicielem jest np. chymotrypsyna A należąca do rodziny S1) jest Ser/His/Asp, a nie jak Autorka podaje Ser/Asp/His. Abstrahując od użytego zapisu chciałbym dodać, iż nie zawsze reszty te występują w takiej konfiguracji – znany jest szereg proteaz serynowych o niekanonicznym układzie reszt katalitycznych jak np. Asp/His/Ser (subtylizyna) czy Ser/His/His (proteaza cytomegalowirusa). Co więcej, nie zawsze musi to być układ triady – znane są układy zawierające w miejscu aktywnym katalityczną diadę (Ser/Lys obecna w bakteryjnych peptydazach sygnałowych typu I), czy nawet pojedynczą resztę katalityczną (Ser, prekursor acylazy penicyliny G). Mając na uwadze moje głębokie przekonanie, że Doktorantka będzie rozwijać swoją karierę naukową, polecam lekturę bardzo ciekawego artykułu autorstwa Ekici i wsp. *Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration* (Protein Science, 2008, 17, 2023).

Trudno mi także w pełni zgodzić się z Autorką, że *Drugą cechą odróżniającą reakcje enzymatyczne od zwykłej katalizy chemicznej jest stereospecyficzność...* – przecież nie wszystkie substraty reakcji katalizowanych przez enzymy są chiralne (np. ureaza – mocznik), jak i znane są stereospecyficzne katalizatory stosowane w *zwykłej katalizie chemicznej*.

Kilka drobniejszych uwag – rysunek 9 – nie rozumiem koncepcji umieszczenia słowa *inhibitor* w nawiasie pod słowem *enzym* – być może Autorka planowała umieścić je pod słowem *substrat*? Niejasne jest także dla mnie użycie nazwy *Centrum aktywne* w odniesieniu do alfa-1 antytrypsyny (rysunek 16).

Zabrakło mi także przedstawienia w rozprawie modeli strukturalnych NSP, których struktury krystaliczne są przecież zdeponowane w bazie Protein Data Bank, a pojawia się struktura chymotrypsyny (rysunek 12). Ułatwiłoby to także Autorce przeprowadzenie analizy strukturalnych wymagań opisywanych proteaz względem substratów. Warto było także wspomnieć, iż podwójna specyficzność ludzkiej katepsyny G (strona 27) pojawiła się w toku ewolucji stosunkowo późno i jest pewnego rodzaju ewenementem, w przeciwieństwie do, przykładowo, specyficzności mysiej katepsyny G.

Kolejny rozdział przeglądu literaturowego dotyczy mechanizmu absorpcji, fluorescencji, fosfofluorescencji, zjawiska transferu rezonansowego energii fluorescencji (8 stron), co jest dobrym wstępem do kolejnych rozdziałów poświęconych substratom fluorescencyjnym czy substratom opartym o zjawisko FRET (9 stron). Natomiast w czwartym rozdziale Autorka przedstawia różne strategie chemii kombinatorycznej wykorzystywane w projektowaniu i otrzymywaniu bibliotek związków o aktywności biologicznej oraz sposoby identyfikacji optymalnych struktur (7 stron). Ta część pracy została opracowana bardzo starannie, a zawarte w niej informacje są spójne i tworzą jedną, logiczną i, co niezwykle istotne, zrozumiałą całość. Jedyne moje zastrzeżenie dotyczy braku



informacji o znanych, opisanych już w literaturze substratach neutrofilowych proteaz serynowych (NSPs). Można odnieść więc mylne wrażenie, że do czasu rozpoczęcia prac badawczych przez Doktorantkę nie istniały, bądź prawie nie istniały, żadne substraty dla tych enzymów... Brak obiektywnego przedstawienia aktualnego stanu wiedzy w tym zakresie uważam za istotne niedopatrzenie Autorki.

W tym miejscu chciałbym się zatrzymać na chwilę. Do tej pory nie spotkałem się z sytuacją, aby ktoś, kto realizuje pracę doktorską z chemii, biochemii czy nauk pokrewnych, podjął się wyzwania, jakim jest stworzenie od podstaw programu komputerowego, który, jak się okazało, był niezwykle pomocny w analizie uzyskanych przez Panią Jadwigę Popow-Stellmaszyk wyników. Opracowana (we współpracy) aplikacja *KomBi Kreator* pozwala na szybką analizę przewidywanego widma spektrometrii mas złożonych bibliotek związków i porównania go z uzyskanymi wynikami eksperymentalnymi. Opracowanie tak użytecznego narzędzia w mojej ocenie znacznie wykracza poza wymagania stawiane pracom doktorskim. Jednocześnie mam nadzieję, że oprogramowanie to „wyjdzie” poza ściany laboratorium i będzie dostępne dla szerszego grona odbiorców, czy to na zasadzie *open-share*, czy w formie licencji.

Być może ze względu na złożoność pracy i szeroki zakres poruszanych we wstępie teoretycznym zagadnień, Autorka nie ustrzegła się niejednoznacznych stwierdzeń, dość niefortunnych sformułowań czy drobnych błędów językowych. Co ciekawe, w obrębie całej, jakże obszernej pracy, występują tylko nieliczne błędy interpunkcyjne.

Cele pracy są jasno sprecyzowane i zgodne z tematem rozprawy (przedstawione na trzech stronach tekstu), a obejmują syntezę i dekonwolucję bibliotek fluorescencyjnych substratów dla proteinazy 3, ludzkiej neutrofilowej elastazy oraz czwartej neutrofilowej serynowej proteazy z organizmu człowieka i myszy, identyfikację i pełną analizę optymalnych substratów dla ww. proteaz, a także określenie przydatności otrzymanych substratów w analizie aktywności NSPs w próbkach biologicznych.

Kolejne 102 strony rozprawy stanowi rozdział *Badania własne*, w którym Autorka skupia swoją uwagę na opisie przeprowadzonych syntez, kolejnych etapach dekonwolucji otrzymanych bibliotek oraz przeprowadzonych badaniach kinetycznych. Ta część rozprawy, w mojej ocenie, jest najbardziej wartościowa. Nie tylko wyraźnie pokazuje świetne opanowanie przez Panią Jadwigę Popow-Stellmaszyk warsztatu chemika organika, ale także pełne zrozumienie trudnego przecież tematu balansującego na pograniczu chemii i biologii, konsekwencję i dużą wytrwałość w prowadzeniu badań, logiczne planowanie kolejnych eksperymentów, często poprzedzonych wykonaniem wstępnych doświadczeń. Rozdział ten zawiera także wyniki analiz (HPLC, HPLC z detekcją fluorescencyjną czy MS) zarówno otrzymanych bibliotek, jak i docelowych substratów. Ta część rozprawy przedstawiona jest niezwykle czytelnie i pozwala czytelnikowi bez trudu śledzić tok rozumowania i przeprowadzoną przez Autorkę analizę uzyskiwanych wyników, szczególnie, że Autorka już na pierwszych stronach *Badania własnych* obrazowo przedstawiła całą strategię



i koncepcję eksperymentalną. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły Doktorance wyselekcjonować (z otrzymanych 34 656 związków !) i w pełni scharakteryzować 22 nowe substraty typu FRET, które ulegały wydajnej hydrolizie pod wpływem docelowych proteaz. Przedstawione w dalszej części rozdziału *Badania własne* wyniki są niejako naturalną konsekwencją wcześniejszych etapów obejmujących syntezę chemiczną i badania kinetyczne i wskazują na, jakże często pomijany, praktyczny aspekt prowadzonych badań naukowych. W tym miejscu Autorka podjęła próbę oznaczenia aktywności neutrofilowych proteaz serynowych w materiale biologicznym (surowica, osocze, lizaty komórkowe, płyn oskrzelowo-pęcherzykowy, BAL) oraz, stosując otrzymane substraty, określenia właściwości inhibitorowych różnych genetycznych wariantów alfa-1 antytrypsyny wobec badanych NSPs.

Choć ten fragment rozprawy jest bardzo interesujący, szczególnie w świetle uzyskanych wyników, Doktorantka nie ustrzegła się w nim pewnych pomyłek czy niejasnych sformułowań, które wymagają komentarza czy wyjaśnienia. Pierwsza z uwag dotyczy języka użytego w opisie przeprowadzonych syntez czy badań enzymatycznych. Specyfika tego rodzaju opisów wymaga zastosowania określonego naukowego (!) języka, którego niestety nie mogę odnaleźć w rozprawie, a zawarte w niej opisy, czasem aż nazbyt dokładne, bliższe są raczej językowi literackiemu... czego konsekwencją, według mnie, było pominięcie istotnych informacji, które w owych opisach powinny były się znaleźć. Pozwolę sobie zacytować kilka fragmentów. *Przed przystąpieniem do syntezy bibliotek peptydowych dla badanych proteinaz musiałam każdorazowo wyliczyć ilość potrzebnej żywicy...* (strona 66) co chyba jest oczywiste i nie wymaga komentarza. *Ostatnim etapem było otworzenie strzykawkę z przepłukaną peptydylożywicą i pozostawienie jej do wysuszenia* (strona 72) czy *...w zakręcanym falkonie przyszykowałam roztwór enzymu (...) roztwór delikatnie wymieszałam na wortexie, przelałam do plastikowej rynny...* W podobnym duchu opisane są wszystkie wykonane eksperymenty. Pragnąłbym także zwrócić uwagę, iż DIPEA czy DMAP trudno uznać za odczynniki sprzęgające (rysunek 36 i 40). Ponadto czym jest stosowana przez Doktorantkę *technologia strzykawkę* (strona 91)? Zamieszczanie w pracy zdjęć łaźni lodowej (rysunek 41) oraz łaźni olejowej (rysunek 42) uważam za zbędne. Mam nadzieję, że w przyszłości Doktorantka nabierze większej wprawy w bardziej precyzyjnym wyrażaniu myśli używając języka naukowego.

Analiza zawartego w części *Badania własne* materiału skłoniła mnie także do zadania Autorce kilku dodatkowych pytań licząc na uzyskanie odpowiedzi. W rozprawie brakuje jednoznacznego opisu postępowania, że po pierwszym etapie dekonwolucji i selekcji optymalnej reszty aminokwasowej w określonej pozycji Autorka wykorzystwała odłożoną wcześniej naważkę do dalszych, bardziej ukierunkowanych już syntez, i jak je wykonano. Pojawia się jedynie zdanie (strona 54, *Przegląd literaturowy*) *Dlatego w następnych etapach powraca się do odłożonej wcześniej porcji peptydylożywicy i do każdej z tych porcji osobno dołącza się zidentyfikowaną resztę aminokwasową*. Czytelnik nie zaznajomiony z wykorzystaną strategią chemii kombinatorycznej i ideą dekonwolucji zadałby pytanie, jaki jest sens pozostawiania wspomnianych



naważek, tym bardziej, że nie pojawiają się one w żadnym opisie z przeprowadzonych przez Doktorantkę syntez? Pozostając przy zagadnieniu dekonwolucji, dlaczego na różnych jej etapach dla konkretnego enzymu stosowane były różne jego stężenia? Autorka także stwierdza, że próbą kontrolną stanowił roztwór substratu w buforze (np. strona 76) – który substrat skoro pomiar wykonywany był dla całej biblioteki? Dlaczego dla dekonwolucji pozycji X₄ biblioteki substratowej dla mysiej NSP4 nie zastosowano pomiaru przyrostu absorbancji (nie absorbancji jak błędnie opisano na rysunku 53) tak jak dla pozycji X₃? Tym bardziej, że cztery reszty aminokwasowe w pozycji X₄ skutkowały zbliżonymi wartościami przyrostu fluorescencji? Dlaczego resztę His w pozycji X₁ wykluczono w dalszych pracach nad otrzymaniem optymalnego substratu HNE? Rysunki 67 i 68 (oraz ich opisy) zawierają tzw. *czeski błąd* w sekwencji aminokwasowej bibliotek (jest Val-Pro, powinno być Pro-Val). Na stronie 98 Autorka stwierdza, że substrat **4** nie był hydrolizowany przez ludzką neutrofilową elastazę, podczas gdy wyniki zawarte na rysunku 110 zdają się przeczyć temu stwierdzeniu. Rysunek 101 przedstawia raczej zależność intensywności fluorescencji od stężenia ABZ (nie odwrotnie).

Nie jestem także przekonany do słuszności posługiwania się w badaniach enzymatycznych stężeniami substratów wyrażonymi w mg/ml (tym bardziej, że w celu wyznaczenia parametrów kinetycznych i tak muszą one zostać wyrażone w jednostce stężenia molowego). Ponadto pozwoliłoby to na dokładne porównanie uzyskanych wyników pomiarowych i ich jednoznaczną interpretację.

Widzę też pewną rozbieżność między wyznaczonymi parametrami kinetycznymi (rysunki 102-105) a ich wartościami zamieszczonymi w tabeli 15. Ponadto dla większości substratów wartości k_{cat}/K_M wydają się być o rząd niższe niż wynikałoby z przedstawionych w tabeli 15 danych. Czy oznacza to, że Doktorantka uzyskała znacznie lepsze substraty, niż podaje? Podobna rozbieżność dotyczy wyników przedstawionych na rysunku 117, choć w tym przypadku sytuacja jest nieco bardziej skomplikowana. Przedstawione dane sugerują, że wyselekcjonowany dla mysiej proteazy NSP4 substrat okazał się znacznie wydajniej hydrolizowany przez hNSP4, niż wyselekcjonowany dla hNSP4 substrat. Wyniki te jednak nie znajdują potwierdzenia w wyznaczonych dla tego substratu parametrach kinetycznych zamieszczonych na rysunku 144 (na którym także są błędy obliczeniowe). Trudno także o przeprowadzenie „własnych” obliczeń, bo Autorka nie podaje, jakie było stężenie substratów użytych w krzyżowej proteolizie substratów dla obu analogów NSP4. Prosiłbym o komentarz Doktorantki w tej kwestii.

Własna ciekawość zmusza mnie do zapytania, dlaczego substraty zawierające więcej niż jedną resztę argininy w sekwencji (przykładowo substraty otrzymane dla hNSP4 czy mNSP4) mają niską przydatność w badaniu tych enzymów?

Forma przedstawionych chromatogramów HPLC z detekcją fluorescencyjną jest w moim odczuciu bardzo myląca – pierwsze wrażenie może prowadzić do błędnych wniosków, że albo coś w syntezie biblioteki, bądź w samym pomiarze nie wyszło, gdyż wzbudzenie obserwowane jest



zarówno w przypadku braku, jak i w obecności proteazy... szkoda, że Autorka nie ujednoliciła skali osi obrazującej intensywność fluorescencji. Podobna uwaga dotyczy także wyników przedstawionych na rysunkach 114 i 115, szczególnie, że zawarte na nich wyniki mają charakter porównawczy.

Przedstawione przez Autorkę wyniki analizy HPLC otrzymanych substratów po inkubacji z właściwymi im proteazami są bardzo interesujące. Nie mniej jednak mam kilka uwag. Jak stwierdza (strona 133) przeprowadziła analizę *dla wszystkich zebranych próbek* (5, 15, 60 min, 24h i 48h), natomiast zaprezentowała wyniki jedynie dla wybranych punktów czasowych. Dlaczego? Ponadto brak jest w przeprowadzonych eksperymentach analizy prób kontrolnych samych substratów w analogicznych odstępach czasowych. Także na rysunku 112 przedstawiła wyniki dla 2h czasu inkubacji, o czym nie wspomniała w opisie eksperymentu.

Choć przeprowadzona przez Doktorantkę analiza aktywności neutrofilowych proteaz serynowych w materiale biologicznym znajduje pełne uzasadnienie, to przedstawione wyniki należy uznać jedynie za pilotażowe. Nie mniej jednak mogą one stanowić solidny punkt wyjścia dla dalszych, głębszych badań. Jak stwierdza sama Autorka, przebadala kilkaset próbek biologicznych (350 próbek osocza, 250 próbek BAL), natomiast przedstawia wyniki jedynie dla kilkudziesięciu. Skąd taka rozbieżność? Przecież dla tak dużej liczby przebadanych próbek można było przeprowadzić obiektywną analizę statystyczną i faktycznie ocenić wartość diagnostyczną opracowanych substratów.

Trudno także wyciągać jakiegokolwiek wnioski z otrzymanych wyników, skoro w żadnym z przeprowadzonych eksperymentów Autorka nie uwzględniła kontroli pochodzących od osób zdrowych. Nie rozumiem także, jaki jest sens stosowania jako kontroli roztworu substratu w buforze, skoro Autorka sama udowodniła, iż nie ulegają one spontanicznej hydrolizie w tych warunkach? Skąd bierze się pewność Autorki, że w badanych próbkach nie znajdują się aktywne proteazy, inne od badanych, które zdolne są do hydrolizy opracowanych substratów, skoro nie przeprowadziła żadnych testów specyficzności w tym kierunku?

Być może wynika to z nieuwagi i braku dokładnego opisu, ale jak, bazując na krzywych zależności intensywności fluorescencji, Autorka wyznaczyła stężenia badanych enzymów w materiale biologicznym? Tym bardziej, że pomiar zależności intensywności fluorescencji od stężenia ABZ jest pomiarem statycznym, natomiast pomiar aktywności enzymu wysoce dynamicznym? Czy w takim razie próbka biologiczna była inkubowana z substratem, a po pewnym czasie reakcja enzymatyczna została przerwana? Jeśli tak, to po jakim czasie? Czy w takim przypadku przygotowanie krzywej zależności intensywności fluorescencji od stężenia proteazy przy stałym stężeniu substratu nie było bardziej wskazane?



Brakuje także dokładniejszego opisu eksperymentu, którego wynik przedstawia rysunek 129. Brakuje na nim także wzorca masy cząsteczkowej czy oznaczenia, czym są obecne na membranie prążki?

Czym podyktowany był wybór 3- i 10-minutowej inkubacji różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny z HNE i PR3? Dlaczego przedstawiono wyniki jedynie dla 3-minutowej inkubacji? Dlaczego nie wyznaczono dokładniejszych parametrów kinetycznych dla użytych inhibitorów (K_i , k_2/K_i)? Czy reakcja enzymatyczna została jakoś przerwana przed analizą HPLC? Po jakim czasie wykonana została analiza HPLC? Mogło by to po części tłumaczyć paradoksalny wynik na rysunku 132D, gdzie dłuższy czas inkubacji z serpiną skutkowało wyższą aktywnością enzymu.

Dlaczego także, dysponując selektywnymi substratami hNSP4 nie przeanalizowano pod tym kątem dostępnych próbek biologicznych?

Chciałbym jednoznacznie podkreślić, iż powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny, a występujące w pracy błędy czy niedociągnięcia w żaden sposób nie wpływają na moją wysoką ocenę jej wartości naukowej i merytorycznej. Nakład pracy włożonej w realizację postawionych celi jest godzien pochwały, a uzyskane wyniki przybliżają nas do pełniejszego zrozumienia biologicznej roli neutrofilowych proteaz serynowych. Część z uzyskanych wyników została już opublikowana w czasopiśmie *Analytical Biochemistry* (IF 2,219), w której to pracy Pani Jadwiga jest pierwszym Autorem. Liczę także na to, iż pozostałe wyniki zostaną niebawem opublikowane, szczególnie wyniki dotyczące poszukiwania optymalnych substratów ludzkiej neutrofilowej proteazy 4 (hNSP4), jak i jej ewolucyjnych analogów.

Kierując swoje krytyczne uwagi dotyczące niniejszej rozprawy chciałbym zmobilizować Doktorantkę do dalszej, intensywnej pracy naukowej i dalszego rozwoju. Po lekturze przedstawionej rozprawy wyrażam głębokie przekonanie, iż Pani Jadwiga Popow-Stellmaszyk należy do grona obiecujących, energicznych i niesłuchanie pracowitych młodych adeptów nauki. Pani Jadwiga, pomimo stosunkowo krótkiego stażu naukowego, może poszczycić się trzema publikacjami z tzw. listy filadelfijskiej (*Protein and Peptide Letters*, *Biochimie* czy wspomniana już praca w *Analytical Biochemistry*). Jest także współautorką kilkunastu doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym, jak i zagranicznym, a część z prezentowanych wyników została opublikowana w postaci suplementów do czasopism naukowych. Na uwagę zasługuje także zdolność pozyskiwania przez Doktorantkę funduszy na prowadzenie badań naukowych (udział w realizacji pięciu projektów).

Chciałbym dodać, iż po zapoznaniu się z regulaminem wyróżniania doktoratów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, według wytycznych którego rozprawa Pani Jadwigi Popow-Stellmaszyk nie spełnia wymogów formalnych ubiegania się o wyróżnienie (Punkt 1b Regulaminu), ze względu na interdyscyplinarny charakter rozprawy, jej ogromną wartość poznawczą i ogrom pracy włożony w jej realizację, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.



Chciałbym także zwrócić uwagę na fakt, iż często, szczególnie w projektach leżących na styku wielu dziedzin nauki, w tym przypadku chemii, biologii i enzymologii, projektach o rozbudowanej strukturze, w których realizację zaangażowanych jest wiele osób, często z różnych ośrodków, publikowanie uzyskanych wyników może wykraczać poza ramy czasowe przewidziane na realizację pracy doktorskiej. Poza tym pierwszeństwo autorstwa w takich przypadkach często uzależnione jest od głównego charakteru danej publikacji, nie pomniejszając w żaden sposób roli pozostałych współautorów.

Podsumowując stwierdzam z całym przekonaniem, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Jednocześnie wnioskuję o jej przyjęcie i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.