



**prof. dr hab. Marcin Drąg**  
**Zakład Chemii Bioorganicznej**  
**Wydział Chemiczny**  
**Politechnika Wroclawska**

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Przemysława Karpowicza**

**pt. „Poszukiwanie allosterycznych modulatorów aktywności proteasomu”**

Ścieżka ubiquityna – proteasom w ostatnich latach jest przedmiotem bardzo intensywnych badań zarówno w placówkach akademickich jak i w przemyśle. Popularność ta wynika przede wszystkim z odkrycia w ostatnim czasie wielu powiązań jednostek chorobowych z nieprawidłowym funkcjonowaniem proteasomu. Intensywne badania nad inhibitorami proteasomu doprowadziły do wprowadzenia trzech leków do leczenia wybranych nowotworów (przede wszystkim szpiczaka mnogiego), niemniej wymagane są dalsze badania ukierunkowane na zwiększenie ich stabilności, wchłaniałości i efektów ubocznych, czy zwiększenia spektrum działania. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magistra Przemysława Karpowicza bardzo dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy i dotyczy poszukiwania inhibitorów allosterycznych proteasomu. Praca została wykonana pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG na Uniwersytecie Gdańskim. Promotorem pomocniczym przedstawionej do recenzji pracy jest doktor Maria Gaczynska z University of Texas Health Science Center w San Antonio, USA.

**Opublikowany dorobek badawczy**

Analiza online dorobku naukowego wykazuje, iż Pan mgr Przemysław Karpowicz jest autorem siedmiu publikacji w czasopismach recenzowanych, w tym sześciu w dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej (dwie publikacje w Plos ONE, Tetrahedron, Journal of Peptide Science, Current Pharmaceutical Design i Proteins) oraz jednej w

Wyb. Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław  
tel. +48 (71) 320 4526  
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

czasopiśmie o zasięgu lokalnym (Wiadomości Chemiczne). Opisane w nich wyniki stanowią część przedstawionej rozprawy doktorskiej. W jednej publikacji (Plos ONE, 2015) Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego wiodącej roli w planowaniu badań oraz eksperymentów, a także o dużej samodzielności naukowej. Analiza bazy Scopus wykazuje, iż wszystkie prace były cytowane razem 17 razy (z wyłączeniem autocytowań). Doktorant jest także autorem wielu doniesień konferencyjnych w postaci komunikatów ustnych oraz prezentacji posterowych na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. Aktywnie brał udział w realizacji kilku grantów, a w jednym z nich (Projekty badań dla Młodych Naukowców 2014) był kierownikiem. Jest także laureatem kilku nagród i wyróżnień. Powyższy dorobek naukowy oceniam dobrze, zwłaszcza w aspekcie publikacji w czasopismach wiodących dla dziedziny. Nadmienić należy także, iż magister Przemysław Karpowicz czynnie udzielał się w życiu Uniwersytetu Gdańskiego jako członek Rady Doktorantów. Zaznaczyć należy, iż pozostałe, nieopublikowane wyniki zamieszczone w recenzowanej pracy doktorskiej są na tyle wartościowe naukowo, iż w przyszłości mają szansę być także materiałem na kolejne publikacje.

### **Poprawność doboru i analizy eksperymentów**

Pierwsza część opisu eksperymentów wchodzących w skład pracy doktorskiej jest poświęcona opisowi syntezy 37 sekwencji peptydowych. Doktorant bardzo dobrze i umiejętnie zaplanował wszystkie eksperymenty, a niepowodzenia w czasie syntezy danego związku zostały odpowiednio skorygowane w procedurach syntezy, tak by udało się otrzymać pożądany produkt. Dominującą metodą syntezy było zastosowanie klasycznego układu solid phase, czyli syntezy na nośniku stałym z użyciem syntezyatorów tradycyjnych lub mikrofalowych. Niemalym wyzwaniem była synteza peptydów zawierających w swojej strukturze nienaturalne aminokwasy, których wprowadzenie do peptydu miało wpłynąć na uzyskanie efektu beta zgięcia. Doktorant w czasie syntezy kilku analogów napotkał na spore problemy syntetyczne, wynikające przede wszystkim z dużej zawady sterycznej. Przejście na manulaną syntezę ze zwiększeniem czasu i ilości cykli sprzęgania, a następnie odblokowania w tym przypadku jest wysoce uzasadnione. Wszystkie otrzymane pochodne zostały dokładnie opisane pod względem stopnia czystości oraz wydajności w dołączonych tabelach. Również wyniki analizy masowej potwierdzające masy danego peptydu zostały precyzyjnie opisane i zamieszczone w tabelach. Opisy syntetyczne są bardzo dokładne i z pewnością pozwolą

na eksperymentalne powtórzenie wyników przez innych uczonych. Niemniej, w odniesieniu do tej części mam następujące komentarze. W Tabeli 1 Doktorant przedstawia odczynniki użyte do poszczególnych etapów syntezy. Na samym dole tabeli przedstawione są warunki do acetylowania, w których użyto kwasu octowego, DIEA oraz HOBt. Wydaje się, iż brakuje tutaj jeszcze jakiegoś odczynnika sprzęgającego, gdyż samo HOBt jest niewystarczające. Proszę tutaj o komentarz. Z kolei w wielu miejscach opisu eksperymentalnego (między innymi strony 69, 73, 78, 80, 84, 86 czy 92) w przypadku procedury odszczepiania od nośnika stałego Doktorant przywołuje protokół opisany w podrozdziale 0, którego mimo dokładnej analizy nie mogłem znaleźć w pracy. Czy chodzi tutaj o rozdział 3.1.2.? Z kolei na stronie 82 Doktorant przywołuje podrozdział 3.3.1. jako ten opisujący protokół odszczepienia. Analiza tego podrozdziału takiej procedury nie ujawnia, a kolejny raz przywoływany jest podrozdział 0. Z ciekawości naukowej zapytam także o kryterium wyboru alaniny jako aminokwasu zastępującego endogenne aminokwasy w peptydzie struktury wiodącej Tat1. Również prosiłbym o wyjaśnienie kryterium wyboru aminokwasu z grupą nitrową jako potencjalnego elementu stabilizującego strukturę peptydu w konformacji zgięcia (kwas 2-fluoro-5-nitrobenzoesowy). Czy są jakieś doniesienia literaturowe o takim właśnie wpływie tego aminokwasu na sekwencję peptydu?

Podsumowując, część syntetyczną, której jest poświęcona znakomita część całej pracy eksperymentalnej oceniam wysoko.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorant przedstawia wyniki dotyczące badania wpływu otrzymanych peptydów na modulację aktywności proteasomu. W badaniach użyte są substraty fluorogeniczne, których struktury opisano w Tabeli 7. W odniesieniu do opisanych eksperymentów mam następujące uwagi oraz pytania. Uwaga dotyczy substratów fluorogenicznych jako tych specyficznych dla każdej z podjednostek proteasomu. Przedstawione sekwencje można uznać za wysoko specyficzne dla danej jednostki, jednakże nie można wykluczyć iż są one także w pewnym stopniu hydrolizowane przez inne podjednostki, a tym samym mają wpływ na otrzymane wartości inhibicji. Z kolei, w przypadku stosowania proteasomu jako enzymu pytanie moje dotyczy kontroli jego aktywności. W części eksperymentalnej znajduje się opis enzymu, natomiast nie ma opisanych eksperymentów kontrolnych potwierdzających, iż użyty enzym był katalitycznie aktywny. Wskazane byłoby potwierdzenie i określenie procentu aktywności enzymu w całkowitej ilości testowanego białka. Czy takie badania były prowadzone? Bezценne byłyby wyniki miareczkowania centrum aktywnego specyficznym inhibitorem. Kolejne pytanie dotyczy stężenia użytego substratu. Czy przy

wyznaczaniu wartości IC50 były obliczone wartości Km dla każdego z używanych substratów, a co za tym idzie stężenia substratów użytych w badaniach zoptymalizowane w odniesieniu do tych wartości? Ostatnie pytanie dotyczy badania trawienia wybranych peptydów Tat przez proteasom 20S. Sam eksperyment z użyciem proteasomu oceniam bardzo wysoko i jako mający duży wpływ na ogólną wiedzę o stabilności używanych do badań analogów. Niemniej, analiza sekwencji otrzymanych peptydów wskazuje na dużą ilość aminokwasów z grupą o charakterze zasadowym w łańcuchu bocznym, a tym samym podatnych na hydrolizę przez inne proteazy, w tym na przykład przez trypsynę. Czy Doktorant prowadził testy stabilności w obecności trypsyny lub czy takie testy są przewidziane w przyszłości? Ich wyniki z pewnością miałyby fundamentalny wpływ na optymalizację struktury przyszłych inhibitorów czy modulatorów.

Kolejnym etapem badań było badanie degradacji  $\alpha$ -synukleiny przez proteasom 20S traktowany analogami Tat1. W rozdziale tym Doktorant przeprowadził serię eksperymentów mających na celu badanie hydrolizy natywnego białka z elementem nieuporządkowanym. Eksperymenty zostały bardzo dobrze zaplanowane, a wnioski są na wysokim poziomie merytorycznym. W odniesieniu do tego rozdziału mam dwa pytania. Proszę o wyjaśnienie terminu „mieszanina obciążająca” ze strony 111. Drugie pytanie dotyczy różnic w proteasomie z Enzo Life Sciences oraz Boston Biochem. Czym różniły się te dwa, w sumie identyczne enzymy, iż konieczne było wyznaczenie nowych warunków prowadzenia eksperymentów? Jaki miało to wpływ na końcową analizę wyników?

W kolejnym rozdziale Doktorant przeprowadził serię eksperymentów badających poziom cytotoksyczności otrzymanych analogów Tat względem komórek HeLa. Analiza danych wykazała, iż otrzymane analogi znacząco różnią się w kwestii cytotoksyczności od modelowej struktury Tat1, która nie wykazywała cytotoksyczności. Kilka otrzymanych analogów okazało się być wysoce cytotoksycznymi w stosunku do linii komórkowej HeLa. Przeprowadzone badania są bardzo dobrze opisane, a analiza porównawcza wykazuje istotne różnice pomiędzy poszczególnymi analogami. Moje zainteresowanie wzbudziła próba określenia mechanizmu śmierci opisanego w dolnym paragrafie na stronie 122. Doktorant sugeruje, iż widoczne pozostałości błony komórkowej sugerują śmierć przez apoptozę. Czy zostały wykonane jeszcze jakieś inne testy potwierdzające apoptozę? Obecność błony komórkowej może być również wynikiem rozerwania napęczniałych komórek na drodze nekrozy. Wydaje się, iż w tym przypadku konieczne są jeszcze dodatkowe badania.

Następny rozdział części eksperymentalnej został poświęcony badaniom strukturalnym oraz modelowaniu molekularnemu wybranych związków. Doktorant przeprowadził serię analiz analogów Tat przy zastosowaniu dichroizmu kołowego. Otrzymane wyniki, wykazały iż część analogów posiada praktycznie niezmienną konformację jak Tat1, natomiast wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów, a w szczególności D-Tic-Oic w pozycjach 4-5 oraz 8-9 spowodowało drastyczną zmianę konformacji. Wyniki te potwierdzają zasadność wprowadzenia nienaturalnych aminokwasów do struktury badanych peptydów. W dalszej części tego rozdziału Doktorant przeprowadził analizę korelacji widm NMR z modelowaniem molekularnym. W tej części pracy podoba mi się wspomaganie analizy NMR o modelowanie dynamiki molekularnej związków. Ta analiza znacząco ułatwia całkowitą analizę konformacyjną badanych peptydów.

Ostatni rozdział części eksperymentalnej został poświęcony badaniu oddziaływań wybranych analogów Tat1 z ludzkim proteasomem przy pomocy mikroskalowej mikroforezy. Tutaj moje pytanie dotyczy znakowania fluorescencyjnego proteasomu 20S. Czy takie postępowanie nie prowadzi do zmiany konformacyjnych powierzchni proteasomu, a tym samym nie ma wpływu na siłę wiązania badanych peptydów? Proszę o wyjaśnienie tego zagadnienia.

Podsumowując wybór metod eksperymentalnych zauważyć należy, iż Doktorant w czasie wszystkich lat studiów opanował bardzo szeroki wachlarz metod eksperymentalnych z zakresu syntezy peptydów, analizy spektroskopowej, biochemii, a w szczególności kinetyki enzymatycznej, podstaw biologii molekularnej, a także biologii w aspekcie cytotoksyczności otrzymanych związków. Bardzo pozytywnie oceniam także umiejętność współpracy z innymi naukowcami w projekcie, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami oraz spostrzeżeniami. Potrafi trafnie wybrać odpowiednie metody do planowanych zadań badawczych. Przeprowadzone analizy wyników eksperymentalnych są także są na wysokim poziomie. Zastosowanie tak wielu technik w różnych dziedzinach wybitnie świadczy o interdyscyplinarnym charakterze pracy.

Powyższe wyniki eksperymentalne zostały w bardzo dojrzały i na bardzo wysokim poziomie merytorycznym przedyskutowane w rozdziale 9 - Wyniki i dyskusja wniosków. Nie do końca mogę zgodzić się tutaj ze zdaniem na stronie 142 wskazującym, iż drożdżowy proteasom 20S jest bliskim modelem ludzkiego proteasomu. Jak sam Doktorant opisuje we wstępie, różnice między tymi dwoma enzymami jednak istnieją i skłaniałbym się do stwierdzenia, iż drożdżowy proteasom nie jest idealnym modelem do

tego typu rozważań.

### **Oryginalność oraz najważniejsze wyniki pracy**

Przedstawiona praca doktorska ma niewątpliwie w wielu aspektach oryginalny oraz nowatorski charakter. Kluczową wartość merytoryczną przedstawiają następujące wyniki:

1. Synteza 37 analogów Tat1, w tym opracowanie procedury syntezy łączonej na nośniku stałym z wykorzystaniem syntezy manualnej.
2. Bardzo dokładna analiza czystości, wydajności oraz analiza masowa wszystkich otrzymanych peptydów.
3. Wyznaczenie dwóch kluczowych regionów farmakoforowych w pozycjach 4-6 oraz 8-10 analogów peptydu Tat1 na drodze pojedynczej lub blokowej wymiany aminokwasów endogennych na Ala.
4. Udowodnienie, iż ugrupowanie Tic-D-Oic w pozycji 8-9 ma kluczowy wpływ na zmianę konformacyjną peptydu Tat1.
5. Wykazanie, iż wszystkie alaninowe analogi Tat1 posiadają strukturę nieuporządkowaną lub PPII.
6. Przeprowadzenie analizy kinetycznej analogów peptydów Tat1 i wykazanie, iż poszczególne modyfikacje mają wpływ na wartości wiązania inhibitora do enzymu.
7. Wykazanie na drodze analizy struktura – aktywność analogów Tat1 względem proteasomu 20S, że na efekt obserwowanej inhibicji allosterycznej nakładają się efekty obecności aminokwasów o charakterze zasadowym jak i odpowiedni rozkład ładunku w przestrzeni.
8. Zastosowanie mikroskalowej termoforezy do wyliczenia stałych dysocjacji kompleksów wybranych peptydów z proteasomem.
9. Udowodnienie, iż analogi Tat w kompleksie z proteasomem wpływają różnie, w zależności od struktury, na degradację  $\alpha$ -synukleiny. Na podkreślenie zasługuje

tutaj identyfikacja związku XXXVII, który zdecydowanie hamuje degradację tego białka.

10. W badaniach cytotoksyczności, wykazanie że Tat1 nie jest cytotoksyczny nawet w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , natomiast wprowadzenie modyfikacji stabilizującej konformację beta w pozycjach farmakoforowych analogów Tat1 powoduje znaczący wzrost cytotoksyczności, zwłaszcza w analogach Tat5-Cuk.

### **Uwagi redakcyjne**

Przedstawiona praca doktorska liczy 165 stron i mieści się w normie objętościowej przyjętej dla tego typu prac. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są poprawne, a praca jest dodatkowo zobrazowana przez 59 rysunków oraz 11 tabel. Wstęp teoretyczny do pracy liczy 44 stron i jest doskonałym kompendium wiedzy o proteasomie. Jest on z pewnością doskonałą bazą do napisania pracy przeglądowej. Hipoteza badawcza oraz cel pracy zostały dokładnie opisane na czterech stronach. Praca liczy 197 odnośników literaturowych, które zostały starannie dobrane. Na uwagę zasługuje cytowanie tekstów źródłowych i nieuleganie pokusie cytowania wielu prac przeglądowych. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu doktoranta w literaturze tematu. Praca jest zakończona czterostronicowym podsumowaniem wyników. W tym rozdziale krytyczna analiza swoich badań jest dowodem na dużą dojrzałość naukową Doktoranta, a poprawna analiza otrzymanych wyników w odniesieniu do założonych celów pracy jest dowodem na duże doświadczenie naukowe zdobyte w czasie wykonywania zadań badawczych.

Praca jest napisana poprawną polszczyzną w jasny i klarowny sposób. Bardzo podoba mi się szata graficzna, widać iż Doktorant sporo czasu poświęcił na jej redakcję. Liczba błędów interpunkcyjnych, gramatycznych, terminologicznych i innych jest mała. Kilka na które zwróciłem uwagę to:

- zapis  $\text{H}^1\text{NMR}$  jest niepoprawny - przyjęty, prawidłowy zapis to  $^1\text{H NMR}$
- używanie terminu substraty fluorogenne mimo głębokiego zakorzenienia w języku polskim jest dyskusyjne – bardziej poprawna wersja to tłumaczenie z angielskiego – substraty fluorogeniczne (ang. Fluorogenic substrates)

- fluoryzująca aminokumaryna (s.95) – bardziej poprawny wydaje się zwrot fluorescencja aminokumaryny
- wspomniane już pomyłki w opisie rozdziałów
- brak jednostek przy wartości IC50 na dole strony 102
- na stronie 133 słowo „zrównowagowana” powinno być raczej zastąpione słowem zrównoważona
- na stronie 154 pojawia się wyrażenie „wysoki efekt komórkowy” – Co ono dokładnie oznacza?

## **Podsumowanie**

Przedstawiona rozprawa doktorska Pana magistra Przemysława Karpowicza ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań w większości mają cechy nowości naukowej. Doktorant w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań, a otrzymane przez niego wyniki zostały już częściowo opublikowane w dobrych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, co dodatkowo potwierdza wysoką jakość przedstawionej pracy. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na wysoką ocenę pracy, a jedynie mają zainspirować Doktoranta do dalszych badań oraz do kontynuacji tej bardzo ciekawej tematyki. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Draj