



prof. dr hab. Marcin Drąg
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wroclawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Kamińskiej

z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

pt. „The effect of carbamylation on the enzymatic activity and biological function of angiotensin I converting enzyme (ACE1)”

Enzymy proteolityczne kontrolują praktycznie wszystkie ścieżki metaboliczne w organizmie ludzkim. Niemniej, na skutek działania niesprzyjających czynników, ich działanie może prowadzić do zaburzeń w ich funkcjonowaniu, a tym samym do stanów chorobowych. Tym samym stanowią one doskonały cel przy poszukiwaniu kandydatów na leki czy w diagnostyce medycznej. Dobitym przykładem użyteczności takiego podejścia jest znalezienie w ostatnim czasie cząsteczki inhibitującej działanie proteazy SARS-CoV-2, a tym samym stworzenie terapii przeciw COVID-19. By do tego jednak doszło, niezbędna jest tak zwana walidacja celu medycznego, czyli określenie funkcji danej proteazy w stanie chorobowym, a także potwierdzenie użyteczności modulowania jej aktywności lekami w celu osiągnięcia zamierzonego efektu terapeutycznego. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Marty Kamińskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, w szczególności w aspekcie badań nad zastosowaniem interdyscyplinarnych metod badawczych w dokładnej charakterystyce ważnej medycznie proteazy. Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Piotra Mateusza Mydela z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Głównym celem pracy magister Marty Kamińskiej było zbadanie wpływu reakcji karbamyłacji na aktywność enzymatyczną, a także funkcje biologiczne konwertazy angiotensyny I (ACE1). Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie coraz liczniejszych

doniesień literaturowych o kluczowej, acz dalej nie do końca zrozumiałej i wyjaśnionej roli tej proteazy w rozwoju wielu chorób uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Analiza bazy Pubmed wskazuje, iż Doktorantka jest współautorem pięciu publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W jednej pracy mgr Marta Kamińska jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania. Powyższy dorobek naukowy oceniam wysoko, niemniej tematyka prac wskazuje, iż główne tezy przedstawionej do oceny pracy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Kamińskiej została napisana w języku angielskim, ma klasyczny układ i liczy 137 stron. Wstęp do pracy poprzedza wykaz skrótów, a także abstrakty w języku angielskim oraz polskim. Wstęp teoretyczny do pracy jest bardzo obszernym materiałem, w którym Doktorantka skupiła się w pierwszej części na opisie całego systemu RAA (Renina-Angiotensyna-Aldosteron), a w szczególności na charakterystyce ACE1, peptydowych hormonów ścieżki RAA, a także innych substratach. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje rolę ACE1 w nadciśnieniu czy zaburzeniu funkcjonowania nerek, znane strategie leczenia, aspekty medyczne modyfikacji posttranslacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem roli karbamyacji, również w aspekcie wykorzystania w diagnostyce. Wstęp teoretyczny jest napisany na wysokim poziomie merytorycznym, a zacytowana literatura pochodzi w większości z oryginalnych prac, co świadczy o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w literaturze tematu. Uważam, iż jest to doskonały materiał do napisania pracy przeglądowej w tym temacie. Wstęp teoretyczny doskonale wyjaśnia także genezę postawienia hipotezy badawczej rozprawy doktorskiej oraz postawienia celów badawczych wymaganych do jej udowodnienia. Same cele zostały jasno rozpisane i sprecyzowane w kolejnym rozdziale pracy.

W rozdziale Materiały, Doktorantka przedstawia pełną listę materiałów, aparatury oraz ekspertyz zewnętrznych wykorzystanych w prowadzonych badaniach. W kolejnym rozdziale (Methods) opisuje metody wykorzystane w badaniach. Ich ilość oraz różnorodność wskazuje na wybitnie interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, a także bardzo szerokie spektrum znajomości technik badawczych przez mgr Martę Kamińską.

Najbardziej obszernym materiałem przedstawionej do oceny rozprawy jest ten opisujący badania własne (Results). Zaplanowane eksperymenty stanowią logiczną całość mającą udowodnić hipotezę badawczą, zostały zaplanowane i opisane na wysokim poziomie merytorycznym oraz z dużą szczegółowością, co pozwala na ich powtórzenie przez niezależnych eksperymentatorów. Zamieszczone wykresy, tabele i ryciny są również przygotowane doskonale pod względem edytorskim oraz merytorycznym. Należy jeszcze raz podkreślić, iż dobór metod badawczych wskazuje, że przedstawiona do oceny praca ma

charakter wybitnie interdyscyplinarny i łączy ze sobą aspekty chemii, biochemii, biologii molekularnej oraz biologii.

Moje pytanie dotyczy wyników opisanych w rozdziale „The effect of carbamylation on ACE1 enzymatic activity” (s. 71). Doktorantka bada wpływ karbamyłacji na enzymatyczną aktywność ACE1 przy użyciu substratów fluorogenicznych próbując wytłumaczyć niejednoznaczne obserwowane zmiany typem użytej techniki badawczej czy rodzajem substratu. Czy rozważane były możliwości zmian konformacyjnych białka po tych modyfikacjach mogących wpłynąć na model wiązania poszczególnych substratów? Idealną metodą do zbadania tego zjawiska byłby z pewnością dichroizm kołowy (CD) czy NMR. Kolejne pytanie dotyczy aktywności ACE1 po chemicznym modyfikowaniu w celu uzyskania karbamyłacji. Czy możliwe jest, iż w wyniku modyfikacji część ACE1 uległa denaturacji, a tym samym stężenie natywnego białka w stosunku do modyfikowanego jest różne i obserwowane zmiany aktywności w stosunku do natywnego białka są efektem kumulacji modyfikacji PTM oraz denaturacji? Z pewnością miałyby to wpływ na całkowitą obserwowaną aktywność enzymatyczną badanej proteazy. Czy i jak miareczkowana była ilość aktywnego enzymu przed i po modyfikacji. Kolejne pytanie dotyczy karbamyłacji lizatów komórkowych (s. 85). Przy tak globalnym procesie modyfikacji uzasadnionym wydawałoby się zbadanie przy wykorzystaniu metod proteomicznych całego proteomu w aspekcie potencjalnie zmodyfikowanych białek. Czy takie rozważania były prowadzone? Bardzo bym prosił Doktorantkę o ustosunkowanie się do tych pytań.

W rozdziale Dyskusja mgr Marta Kamińska w dojrzały sposób i na wysokim poziomie merytorycznym podsumowuje wszystkie wyniki swoich badań, ich wartość w aspekcie już dostępnej wcześniej wiedzy w tym zakresie, a także wskazuje na dalsze możliwe kierunki badawcze. Z pewnością można uznać, iż główne tezy hipotezy badawczej zostały zbadane i udowodnione. Uważam, iż wyniki pracy mają wysoce oryginalny, a co szczególnie ważne, także nowatorski charakter i z pewnością znajdą liczne zastosowania w przyszłych badaniach, jak również stanowią doskonały materiał do napisania publikacji.

Podsumowując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Marty Kamińskiej uważam:

1. Opracowanie wydajnej metody karbamyłacji ACE1 w aspekcie kinetyki oraz aktywności enzymatycznej na podstawie zidentyfikowanych miejsc modyfikacji, a także obserwowanych zmian konformacyjnych.
2. Wykazanie, iż karbamyłacja ACE1 zmniejsza jej powinowactwo (K_i) do znanych i stosowanych leków (enalaprilat oraz lizinopril), a zwiększa powinowactwo do zofenoprilu.

3. Karbamyłacja ma znaczący wpływ na zmniejszenie aktywności śródbłonkowego ACE1, gdzie za częściową przyczynę należy uznać karbamyłację tego enzymu, zanim zostanie on usunięty z powierzchni komórki.
4. W odniesieniu do powyższego, zaobserwowanie zaburzonej ekspresji wybranych genów odgrywających rolę w funkcjonalności śródbłonka (ENPP1, ICAM-1, receptory hormonów peptydowych układu RAA).
5. Wykazanie, iż: (a) aktywność domeny N- jest zwiększona w surowicy pacjentów z przewlekłym zapaleniem nerek w porównaniu z surowicą od zdrowych ochotników; (b) krótkoterminowo angiotensyna II jest produkowana wydajniej przez proteazy w surowicy pacjentów z przewlekłym zapaleniem nerek; (c) karbamyłowana angiotensyna I jest skuteczniej hydrolizowana przez proteazy inne niż ACE1 w odróżnieniu do natywnej angiotensyny I.
6. Zaobserwowanie, iż: (a) aktywność biologiczną hormonów peptydowych RAAS/KKS można zmienić przez karbamyłację; (b) karbamyłacja wpływa na inne efekty biologiczne wywoływane przez peptydy (takie jak stymulacja aktywności ACE1 i przyleganie monocytów).

Podsumowując wartość merytoryczną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Marty Kamińskiej, można zdecydowanie stwierdzić, iż otrzymane wyniki mają znamiona odkrycia naukowego, a przedstawiony w pracy materiał badawczy ma nowatorski charakter i potencjał na bardzo dobrą publikację naukową.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Marty Kamińskiej została przygotowana starannie i bez zarzutów. Zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Marty Kamińskiej z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod tytułem „The effect of carbamylation on the enzymatic activity and biological function of angiotensin I converting enzyme (ACE1)” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób udowodniła postawioną hipotezę badawczą i zrealizowała zaplanowane cele badawcze. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. 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 Dyscypliny Nauki biologiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg