



UNIwersYTET GDAŃSKI



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 2.10.2014

L.dz. 8010-WCH/IP-1327/2014

IN MARI VIA TUA

WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Medycznej



Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 30.09.2014

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Małuch,
z tytułowanej
„Projektowanie i chemiczna synteza inhibitorów konwertaz probiałkowych”

Konwertazy probiałkowe (PC) należą do rodziny serynowych endoproteaz, u ssaków składającej się z 9 enzymów. Ich główną funkcją jest aktywacja różnorodnych prekursorów białkowych w obrębie szlaku wydzielniczego, m.in. prekursorów hormonów, enzymów, czynników wzrostu i receptorów. Coraz więcej dowodów wskazuje na zaangażowanie enzymów PC w rozwój nowotworów. Podwyższoną ekspresję konwertaz zaobserwowano w komórkach nowotworu płuc, piersi, jelita grubego, a obniżoną - w nowotworach jajnika. Ostatnie badania wiążą konwertazy probiałkowe, głównie konwertazę PACE4, z nowotworem prostaty, jednym z wiodących w niechlubnym rankingu przyczyn śmiertelności u mężczyzn. Znalezienie efektywnych i selektywnych inhibitorów PACE4 mogłoby umożliwić wytyczenie nowych dróg i poprawienie skuteczności terapii w przypadku tego nowotworu. To jak najbardziej ważne zadanie zidentyfikowania takich związków podjęte zostało przez panią Izabelę Małuch, a efekty tych poszukiwań zostały opisane w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej.

Doktorantka postawiła sobie za cel sprawdzenie wpływu modyfikacji pozycji P5-P8 w modelowym inhibitorze ML-Amba na jego właściwości inhibicyjne względem konwertazy PACE4 oraz antyproliferacyjne w stosunku do komórek nowotworowych. Podstawienie w wybranych pozycjach P5, P6, P7 i P8 kolejno wszystkich aminokwasów kodowanych zaowocowało otrzymaniem 76 peptydomimetyków. Dla wszystkich tych związków przeprowadzono badania kinetyki reakcji enzymatycznych katalizowanych przez dwie konwertazy probiałkowe: PACE4 i furynę. W następnym etapie za pomocą testu MTT oznaczona została aktywność antyproliferacyjna otrzymanych analogów względem komórek nowotworowych linii DU145 i LNCaP, wykazujących podwyższony poziom ekspresji enzymu PACE4, oraz, kontrolnie, względem linii komórek PC3, w których ilość produkowanego PACE4 jest znikoma. Oznaczenie stałych inhibicji K_i pozwoliło wytypować związki, które w sposób wysoce efektywny i selektywny względem furyny hamowały aktywność konwertazy PACE4. Niestety, żaden z wytypowanych w badaniach kinetycznych związków nie wykazał się wartymi uwagi właściwościami antyproliferacyjnymi. Testy na liniach komórek nowotworowych wskazały trzy inne analogi – z resztami Gln bądź Val w pozycji P5 oraz z resztą Phe w pozycji P8, jako najbardziej

obiecujące i mogące stać się związkami wiodącymi przy projektowaniu potencjalnych środków terapeutycznych, możliwych do wykorzystania w leczeniu nowotworu prostaty. Zidentyfikowanie tych związków, po wykonaniu ogromnej ilości syntez i testów, uważam za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki.

Rozprawa doktorska mgr Izabeli Małuch ma układ klasyczny dla prac chemicznych. Składa się ze związłego ale treściwego wprowadzenia literaturowego (38 stron), celu pracy (1 strona), opisu wykonanych badań własnych (24 strony), prezentacji i omówienia wyników (24 strony) oraz podsumowania (2 strony). Spis literatury cytowanej zawiera 203 pozycje uwzględniające najnowsze publikacje z czasopism o zasięgu międzynarodowym. Na końcu pracy dodano także spis tabel i rysunków ułatwiający odnajdywanie potrzebnych informacji, oraz podsumowanie dorobku publikacyjnego Doktorantki.

W części wstępnej swojej rozprawy Doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący konwertaz probiałkowych – ich budowy, preferencji substratowych, lokalizacji wewnątrzkomórkowej, pełnionych funkcji fizjologicznych oraz zaangażowania w rozwój stanów patologicznych. W dalszej części omówione zostały strategie terapeutyczne oparte o inhibitory konwertaz probiałkowych, ze szczególnym uwzględnieniem konwertazy PACE4. Wszystkie rozdziały wstępu są zilustrowane rysunkami i tabelami, co powoduje, że czyta się go łatwo i z dużym zainteresowaniem. Przedstawione wprowadzenie literaturowe dobrze przygotowuje do rozdziału, w którym Doktorantka omawia wyniki zrealizowanych badań.

W części dotyczącej wykonanych prac doświadczalnych wydzielono dwa rozdziały: „Badania własne” oraz „Prezentacja i omówienie wyników”. Pierwszy z rozdziałów zawiera m.in. opisy syntez i charakterystykę otrzymanych związków. Ta część rozprawy wzbudza duże uznanie dla benedyktyńskiej wręcz pracy wykonanej przez Doktorantkę. Otrzymanie 76 stosunkowo rozbudowanych peptydomimetyków, niektórych z nich w wyniku dwu lub trzykrotnej syntezy, a następnie oczyszczenie wszystkich związków do poziomu co najmniej 98% homogeniczności, wymagało z pewnością wielu godzin intensywnej pracy laboratoryjnej. Zestaw prac wykonanych samodzielnie przez mgr Izabelę Małuch uzupełniają testy kinetyczne dla analogów modyfikowanych w pozycjach P5 i P6. Testy kinetyczne dla pozostałych analogów oraz wszystkie badania komórkowe przeprowadzone zostały w zespole prof. Roberta Daya z Sherbrooke University, od lat zaangażowanego w tematykę konwertaz probiałkowych i gwarantującego w związku z tym wysoką jakość wykonanych badań.

W rozdziale „Prezentacja i omówienie wyników” Doktorantka w dojrzały sposób przeanalizowała rezultaty wykonanych eksperymentów. Rozważania wsparte zostały wykresami i tabelami, co znakomicie ułatwiło śledzenie toku analiz. Mnogość wyników wymagała niezwyklej precyzji opisu, z czego Doktorantka wywiązała się bardzo dobrze. Jedyne dwa punkty budzą moje niewielkie zastrzeżenia:

- 1) Przy prezentowaniu wyników badań kinetycznych dla analogów z modyfikowaną pozycją P5 związku F (P5) i T (P5) (str. 76) wyliczono razem z kilkoma innymi jako cechujące się najniższymi wartościami K_i . Jednakże znaczny błąd, jaki podano dla oznaczenia stałej inhibicji tych dwu związków nie pozwala tak jednoznacznie zaklasyfikować tych analogów. Należałoby je raczej opisać osobno i odpowiednio skomentować uzyskane wyniki.

2) Wydaje mi się, że Tabela 19 w obecnej postaci jest mało czytelna. Chyba lepiej byłoby umieścić w niej wartości IC_{50} , K_i oraz stosunku K_i fumaryna/ K_i PACE4, a nie tylko strzałki i znak wartości zbliżonej. Zwłaszcza te pierwsze wprowadzają w błąd, ponieważ nie pokazują kierunku zmian aktywności antyproliferacyjnej i inhibitorowej, umieszczonych w tytułach kolumn, a odnoszą się bezpośrednio do wartości danego parametru – pokazują czy jest ona większa czy mniejsza niż dla związku modelowego ML-Amba. Ponieważ dla parametrów IC_{50} i K_i zależność ta jest odwrotnie proporcjonalna, tzn. im większa jest wartość parametru tym mniejsza jest aktywność antyproliferacyjna/inhibicyjna, strzałka skierowana w dół oznacza *de facto* wzrost aktywności, a skierowana w górę – jej zmniejszenie, co może wprawiać w konsternację.

Z obowiązku recenzenckiego muszę wypomnieć jeszcze kilka usterek czy niezręcznych sformułowań, które pojawiły się w rozprawie:

Błędy i usterki:

- str. 8: „CHRD – domena bogata w reszty cysteiny” (powinno być: cysteiny/histydyny)
- str. 44: „kilka typów inhibitorów konwertaz probiałkowych, które można podzielić na sześć podstawowych kategorii: peptydy, peptydomimetyki, małe niepeptydowe cząsteczki, przeciwciała i siRNA” - w sumie wymieniono ich tylko pięć
- str. 55 i 63: podano, iż syntezę prowadzono na skalę wyrażoną w μM ($\mu mol/dm^3$), a chodziło chyba o $\mu mole$
- str. 81: sformułowanie „P (P7)... okazał się być najbardziej aktywnym inhibitorem...” mimowolnie wprowadza w błąd, należałoby dodać uściślające „najbardziej aktywnym spośród prolinowych analogów”
- str. 89: „średnią ... skorelowaną o wartość błędu” (skorygowaną?)

Niezręczne sformułowania:

- str. 16: „Pierwowzorem klanu SB proteaz serynowych jest subtylizyna...” („Głównym enzymem klanu SB...”?)
- str. 23: „schemat budowy struktur pierwszorzędowych” („Schemat budowy ludzkich konwertaz” lub „Elementy struktury pierwszorzędowej ludzkich konwertaz”)
- str. 33: „Konwertaza probiałkowa PC5/6 jest kodowana w dwóch izoformach splicingu...” („...w dwóch izoformach różniących się budową egzonów...” lub „...w dwóch izoformach, które w wyniku wycinania intronów (splicingu) dają enzymy...”)
- str. 77: „negatywnym zabiegiem” (raczej: zabiegiem o negatywnych skutkach)

Te drobne mankamenty w żaden sposób nie umniejszają jednak wartości rozprawy, w której mgr Izabela Małuch zaprezentowała interesujące i wartościowe wyniki. Na podkreślenie zasługuje też dość bogaty dorobek publikacyjny Doktorantki, zwłaszcza w odniesieniu do komunikatów konferencyjnych (17), ale także publikacji pokonferencyjnych (4). Doktorantka jest również współautorką dwóch prac oryginalnych nie wiążących się z tematyką rozprawy oraz skryptu dla studentów Chemii i Ochrony Środowiska.

Samodzielność naukową mgr Małuch potwierdza Jej umiejętność zdobywania finansowania prac badawczych – podczas studiów doktoranckich była kierownikiem aż czterech grantów służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników Studiów Doktoranckich Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, oraz jednego grantu *Preludium* finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Izabeli Małuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Opiełowska