

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 04.11.2014 r.

## Recenzja

### rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Małuch zatytułowanej „Projektowanie i chemiczna synteza inhibitorów konwertaz probiałkowych”

Praca doktorska Pani mgr Izabeli Małuch została wykonana w Pracowni Chemii Biopolimerów Katedry Chemii Organicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Prahla, którego zainteresowania naukowe oscylują wokół chemii peptydów i białek.

Projektowanie i synteza inhibitorów enzymatycznych stanowi bardzo ważny element przy opracowywaniu nowych leków przeciwko wielu chorobom cywilizacyjnym i zaniedbanym. Precyzyjna, celowana inhibicja aktywności enzymatycznej może stanowić element terapii antynowotworowej, antybakteryjnej i antywirusowej tworząc uniwersalne podejście do najnowszych trendów poszukiwania nowych terapeutyków.

Przedstawiona do recenzji dysertacja jest zawarta na 125 stronach maszynopisu podzielonych na 9 głównych rozdziałów: „I. Przegląd literaturowy”, „II. Cel pracy”, „III. Badania własne”, „IV. Prezentacja i omówienie wyników”, oraz „V. Podsumowanie”. Pozostałe to: „VI. Literatura cytowana”, „VII. Spis rysunków”, „VIII. Spis tabel” oraz „IX. Dorobek naukowy”, w których zawiera się 30 rysunków, 19 tabel oraz 203 przypisy literaturowe.

Pierwszy rozdział stanowi bardzo dobre kompendium wiedzy dotyczące proteaz serynowych oraz konwertaz probiałkowych. Jest to fragment pracy napisany bardzo skrupulatnie i zrozumiale, udokumentowany licznymi referencjami literaturowymi oraz poparty ilustracjami i odpowiednimi tabelami. Zdaniem recenzenta część pracy poświęcona konwertazom probiałkowym stanowi gotową pracę przeglądową, która przetłumaczona na język angielski mogłaby dodatkowo wzbogacić dorobek naukowy Doktorantki.

W rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” zostały obszernie sprecyzowane tezy dysertacji zawierające genezę badań, która wywodziła się z dotychczasowej trudności w projektowaniu odpowiednich, specyficznych inhibitorów dla konwertazy probiałkowej PACE4. Trudności te związane były z licznymi analogiami do innego enzymu – furyny. Autorka dysertacji opisuje swoje badania jako identyfikujące reszty aminokwasowe preferowane w sekwencji inhibitora peptydowego multi-Leu-Amba (ML-Amba), które wpływają na wzrost jego aktywności inhibitorowej względem enzymu PACE4. Zaplanowane badania kinetyczne określające stałe hamowania aktywności enzymatycznej  $K_i$  oraz testy antyproliferacyjne na liniach komórkowych nowotworu prostaty stanowią fragment poszukiwań selektywnych i skutecznych inhibitorów dla białka PACE4 oraz pozwalają na rozwój obszaru wiedzy dotyczącego konwertaz probiałkowych. Niniejsze badania były również ukierunkowane na poszukiwaniu różnic strukturalnych substratów preferowanych przez enzymy PACE4 i furynę.



DZIEKANAT  
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 18.11.2014

L.dz. 8010-WCH/1P-1596/2014

W następnym rozdziale zatytułowanym „Badania własne” Doktorantka opisuje najpierw etapy syntezy substratu chronionej 4-amidynobenzylaminy (Amba). Synteza była przeprowadzona w pięciu etapach. W pierwszym etapie wprowadzono grupę ochronną Boc dla grupy aminowej w 4-cyjanobenzylaminie, w czterech kolejnych przekształcono grupę nitylową w amidynową. Tak otrzymany substrat w postaci dichlorowodoru został użyty do syntezy peptydów. Peptydy zostały syntezowane z zastosowaniem procedury Fmoc/tBu z wykorzystaniem dwóch rodzajów żywic: 4-Fmoc-hydrazynobenzoilowej oraz chloro(2'-chloro)tritylowej. Na tej żywicy zostało zsyntezowane 17 peptydów różniących się resztą aminokwasową w pozycji P5 zawierających na C-końcu resztę Amba. Syntezy zostały przeprowadzone za pomocą automatycznego dwunastokanałowego syntezyzatora Symphony firmy Protein Technologies, a odpowiednie protokoły syntez zostały zamieszczone w postaci opisów i tabel. Drugi rodzaj żywicy posłużył do syntez dwóch peptydów z modyfikacją w pozycji P5, które zawierały reszty Cys i Met oraz 19 peptydów z modyfikacją P6, 19 peptydów z modyfikacją P7 oraz 19 peptydów z modyfikacją P8. Razem zbiór potencjalnych inhibitorów stanowił 76 peptydów zawierających zmiany reszt aminokwasowych w sekwencji od 1 do 4 (P5-P8) z C-końcową resztą Amba, których otrzymywanie tak jak w poprzednim przypadku zostało szczegółowo opisane. Wszystkie peptydy zostały scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas.

W dalszej części rozprawy Doktorantka opisuje badania kinetyczne dotyczące pomiarów hamowania aktywności względem wybranych konwertaz probiałkowych PACE4 i furyny za pomocą puli zsyntezowanych peptydów. Badania te zostały przeprowadzone w grupie prof. Roberta Day'a z Zakładu Urologii, Katedry Chirurgii, Wydziału Medycyny Uniwersytetu w Sherbrooke w Kanadzie. Badania analogów modyfikowanych w pozycji P5 oraz P6 Autorka dysertacji przeprowadziła samodzielnie, jak wnioskuję podczas pobytu stażowego.

Następnie, w tej samej grupie badawczej wykonane zostały badania aktywności antyproliferacyjnej zsyntezowanych inhibitorów wobec komórek nowotworowych linii DU145, LNCaP i PC3. W tym celu została wykorzystana metoda MTT, w której ilość zredukowanego formazanu jest proporcjonalna do ilości komórek.

W dalszej kolejności mgr Izabela Małuch przystąpiła do prezentacji i omówienia wyników. W pierwszym z podrozdziałów opisuje aktywność inhibitorową peptydów z modyfikacją w pozycjach od P5 do P8 względem konwertaz probiałkowych PACE4 i furyny. Analizując wyniki dla pierwszej modyfikacji (P5) najlepszymi podstawieniami, o najniższych wartościach  $K_i$  okazały się być takie reszty aminokwasowe jak: His, Lys i Arg, które niestety wykazywały niską specyficzność substratową względem obu badanych enzymów. Spośród niezasadowych aminokwasów dość dobre wyniki zostały uzyskane dla reszt Ser i Tyr, natomiast dla reszt kwasowych Asp i Glu aktywność inhibitorowa była bardzo niska. Modyfikacje pozycji P6 przyniosły podobne rezultaty. Ponownie najniższe wartości  $K_i$  zostały zidentyfikowane dla reszt zasadowych – His, Arg, Lys oraz neutralnych nierozbudowanych – Gly i Ala, tym razem z zauważalną preferencją względem PACE4. Dla pozycji P7 najlepsze wyniki zostały uzyskane dla Lys i Arg, podczas gdy reszta His wykazała właściwości dobre, lecz odbiegające od wartości dla obu zasadowych reszt aminokwasowych. Obiecujące rezultaty badań zostały otrzymane dla reszt Thr oraz Pro. Tak jak w poprzednich przypadkach najgorsze wyniki zostały uzyskane dla reszt kwasowych Asp i Glu oraz dla hydrofobowych reszt

aminokwasowych Met, Phe i Trp. Dla modyfikacji w pozycji P8 najlepsze wyniki uzyskano jedynie dla Lys i Arg.

Następnie została porównana przez Autorkę pracy selektywność najbardziej aktywnych inhibitorów dla enzymu PACE4 w stosunku do furyny. W tym celu wzięte pod uwagę zostały tylko modyfikacje, których współczynnik specyficzności PACE4/furyna posiadał wartości powyżej 2.7 (rysunek 26). Konkludując tą część badań najlepszą selektywność osiągnięto względem modyfikacji resztą His zarówno dla pozycji P5, jak i P6, pozostałe reszty aminokwasowe, pośród których znalazły się dla pozycji P5: Phe, Gly, Lys, Arg, Ser, Tyr, oraz dla pozycji P6: Ale, Phe, Gly, Ile, Met, Asn, Thr, Trp, Tyr wykazywały selektywność hamowania aktywności pomiędzy wartościami 2.6 a 6.5. Modyfikacje w pozycji P7 i P8 nie wykazały pożądanego poziomu selektywności działania względem PACE4 oraz furyny.

W drugim z podrozdziałów została opisana aktywność antyproliferycyjna zsyntezowanych inhibitorów konwertaz probiałkowych w stosunku do komórek nowotworowych z modelowych linii DU145, LNCaP oraz PC3 stosowanych w badaniach nad ludzkim nowotworem prostaty (wyizolowane z przerzutów do mózgu, węzłów chłonnych oraz kości). Największy poziom ekspresji enzymu PACE4 występuje w linii komórkowej LNCaP, linia DU145 wykazuje sześciokrotnie niższy poziom enzymu, podczas gdy linia komórkowa PC3 jedynie jego znikomą ilość. Wstępnie antyproliferycyjne badania przesiewowe zostały wykonane dla 76 peptydów z wykorzystaniem najszybciej rozwijającej się linii komórkowej DU145. Niestety peptydy zasadowe wykazujące największą aktywność inhibitorową wykazały niższą aktywność antyproliferycyjną niż peptyd modelowy ML-Amba. Analogi peptydowe modyfikowane w pozycjach P5-P8 wykazujące największą zdolność hamowania aktywności metabolicznej komórek zostały przedstawione w tabeli 17. Następnie, na podstawie otrzymanych wyników, peptydy wykazujące właściwości antyproliferycyjne w stopniu zbliżonym lub wyższym do peptydu modelowego ML-Amba zostały wybrane do dalszych badań z trzema liniami komórkowymi używając rozszerzonego zakresu stężeń związków. W dalszej części pracy wyznaczono dla nich wartości  $IC_{50}$  – parametru opisującego stężenie inhibitora, przy którym następuje zahamowanie proliferacji komórek w 50 % w stosunku do układu kontrolnego. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń Doktorantce udało się wyselekcjonować molekuly o najwyższej aktywności antyproliferycyjnej, którymi okazały się być peptydy posiadające modyfikację Gln (P5), Val (P5) i Phe (P8).

Zaprojektowane i przebadane za pomocą powyżej przedstawionego algorytmu badawczego związku mogą być wykorzystane jako potencjalne środki terapeutyczne lub materiał wyjściowy do opracowania dalszych inhibitorów konwertaz probiałkowych w leczeniu raka prostaty. Niestety peptydy, które wykazywały najlepsze aktywności inhibitorowe nie wykazywały właściwości antyproliferycyjnych, prawdopodobnie ze względu na niską przenikalność przez błony biologiczne. W związku z tym, jak słusznie zauważyła Autorka dysertacji, potrzebne są dalsze badania ukierunkowane na testy *in vitro* oraz *in vivo*. Zdaniem recenzenta niewątpliwie ciekawym i celowym byłoby zsyntezowanie dwóch peptydów: pierwszego, który posiadałby wysoką aktywność inhibitorową, złożonego z najbardziej obiecujących modyfikacji oraz drugiego, który posiadałby najlepsze właściwości antyproliferycyjne, również złożonego z najlepszych modyfikacji. W tym miejscu chciałbym poprosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do tego tej sugestii w czasie publicznej obrony dysertacji.

Podsumowując, Doktorantka opanowała bardzo dobrze warsztat badawczy, a otrzymane wyniki stanowią ciąg logiczno-przyczynowy zmierzający do opracowania efektywnych inhibitorów dla enzymu PAEC4. Praca napisana jest w sposób zrozumiały, przejrzysty oraz staranny. Posiada niewielką ilość kolokwializmów i „niedopatrzeń” które nie wpływają na jej wartość merytoryczną i których celowo nie wymieniałem. Niniejszą dysertację oceniam bardzo wysoko, a jej wyniki mogą stanowić z powodzeniem podstawę do dalszych badań nad inhibitorami konwertaz probiałkowych.

Do osiągnięć mgr Izabeli Małuch należy zaliczyć również jej bardzo dużą aktywność konferencyjną – 18 prezentacji konferencyjnych, w tym cztery publikacje pokonferencyjne wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej oraz ponadprzeciętny jak na Doktoranta udział w projektach badawczych (cztery projekty indywidualne Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz jeden projekt Preludium-NCN). Wartym wspomnienia jest również fakt, że Doktorantka jest współautorką dwóch publikacji poza zakresem rozprawy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Małuch spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'K. K...' with a stylized flourish at the end.