



**Politechnika Łódzka**

Instytut Chemii Organicznej

90-924 Łódź  
ul. Żeromskiego 116  
Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma  
e-mail: [aleksandra.olma@p.lodz.pl](mailto:aleksandra.olma@p.lodz.pl)

Łódź, 10. 10. 2016

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej**

**DESIGNING AND CHEMICAL SYNTHESSES OF SELECTIVE MATRIPTASE-2  
INHIBITORS BASED ON TRYPSIN INHIBITOR SFTI-1 ISOLATED FROM  
SUNFLOWER SEEDS**

wykonanej w Katedrze Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego  
pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Rolki

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska opisuje badania przeprowadzone przez mgr Agatę Gitlin-Domagalską pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Rolki. Rozprawa poświęcona jest projektowaniu, syntezie selektywnych inhibitorów matryptazy-2 oraz badaniu ich aktywności i mechanizmu działania. Badania te są kontynuacją tematyki realizowanej od szeregu lat przez profesora Rolkę, który jest niekwestionowanym ekspertem w tej dziedzinie. Kopro motorem pracy jest profesor Michael Gütschow z Instytutu Farmaceutycznego Uniwersytetu w Bonn.

Proteazy serynowe należą do największej i najlepiej poznanej grupy enzymów proteolitycznych. Ich aktywność musi być ściśle regulowana, tak aby zapobiec niewłaściwej i często destrukcyjnej proteolizie. Nadmierna i niekontrolowana przez endogenne inhibitory aktywność proteaz serynowych prowadzi do wielu stanów chorobowych.

Matryptaza-1 i matryptaza-2 są transmembranowymi proteazami serynowymi typu II, których nadekspresja związana jest między innymi z rozwojem nowotworów piersi lub prostaty. Dokładna rola matryptazy-2 w rozwoju nowotworów nie jest poznana. Inną ważną funkcją enzymu jest udział w homeostazie żelaza. Inhibitory matryptazy-2 mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób związanych z nadmiernym poziomem żelaza w organizmie.

Mgr Agata Gitlin-Domagalska w swojej dysertacji podjęła bardzo aktualne badania nad selektywnymi inhibitorami matryptazy-2 wykorzystując modyfikacje inhibitora trypsyny wyodrębnionego z nasion słonecznika (SFTI-1). Praca obejmuje nie tylko projektowanie i syntezę nowych analogów, ale również obszerne badania enzymatyczne. Poszukiwanie niskocząsteczkowych inhibitorów pozwalających na kontrolę aktywności enzymów stanowi ważne wyzwanie współczesnej chemii medycznej.

Praca napisana w języku angielskim liczy 179 stron i została podzielona na kilka części: Literaturową (*Literature review*) – 76 stron, poprzedzoną wykazem stosowanych skrótów, Cel badań (*Objective of the study*) – 3 strony, Projektowanie i synteza chemiczna (*Design and chemical syntheses*) – 26 stron, Badania enzymatyczne (*Enzymatic studies*) – 26 stron, Wnioski (*Conclusion*) – 2 strony oraz Spis literatury (*References*) liczący 351 odnośników. Na końcu rozprawy zamieszczony został spis rysunków i tabel oraz 6-cio stronicowe podsumowanie w języku polskim, wymagane w ustawie. Do pracy dołączony jest suplement w formie elektronicznej zawierający chromatogramy HPLC oraz widma spektrometrii mas wszystkich otrzymanych związków.

Obszerny przegląd literatury obejmuje klasyfikacje enzymów, charakterystykę peptydaz, proteaz serynowych oraz proteaz serynowych typu II, zakotwiczonych w błonie komórkowej, ze szczególnym uwzględnieniem matryptazy-1 i 2. Mgr Gitlin-Domagalska opisała strukturę i funkcję lepiej poznanej matryptazy-1 oraz przedstawiła stan wiedzy na temat matryptazy-2, jej rolę w homeostazie żelaza. Kolejny rozdział Autorka poświęciła klasyfikacji inhibitorów proteaz serynowych oraz omówiła sposoby oddziaływania inhibitorów z docelowymi enzymami. W dalszej części omówiła naturalne inhibitory, wśród nich dobrze poznaną rodzinę inhibitorów Bowmana-Birki (BBI), wśród nich SFTI-1. Obszerna część literaturowa stanowi bardzo dobre wprowadzenie do badań własnych.

Celem, jaki postawiła sobie Doktorantka, były próby znalezienia selektywnych peptydowych inhibitorów matryptazy-2. Warto podkreślić, że w literaturze nie zostały opisane selektywne inhibitory matryptazy-2, nie oddziałujące jednocześnie z matryptazą-1. Jako strukturę wiodącą Doktorantka wybrała natywny inhibitor trypsyny wyodrębniony z nasion słonecznika (SFTI-1), a przy projektowaniu serii peptydów wykorzystwała doniesienia literaturowe opisujące inhibitory matryptazy-1 oraz substraty matryptazy-2. Dużym utrudnieniem w planowaniu analogów był brak struktury trójwymiarowej enzymu. W swoich badaniach mgr Gitlin-Domagalska zdecydowała się wykorzystać model otrzymany w oparciu o znane struktury krystaliczne innych enzymów transmembranowych (m.in. matryptazy-1). Zaplanowała i

otrzymała serię 40 mono- i bicyklicznych analogów modyfikowanych w pozycjach 1, 4, 5, 10 i 12, ponadto zsyntetyzowała dwa fluorescencyjnie znakowane analogi oraz natywny i monocykliczny analog SFTI-1. Ponieważ w miejscu wiążącym S3/S4 matryptazy-2 obecne reszty Glu662, Asp663 i Ser664 tworzą ujemnie naładowaną kieszeń, w miejsce P3 lub P4 Doktorantka postanowiła wbudować resztę L- lub D-argininy. Na podstawie opisanych w literaturze doniesień o wpływie na aktywność matryptazy małego, niepolarnego aminokwasu w pozycji P1' zaprojektowała analogi **14-17**, zawierające resztę Ile. Dodatkowa cyklizacja poprzez utworzenia wiązania amidowego pozwoliło na porównanie aktywności inhibitorów bicyklicznych z monocyklicznymi. Wbudowanie w pozycję 1 reszty lizyny dało możliwość cyklizacji zarówno „głowa-ogon” jak i „łańcuch boczny-ogon”, co pozwoliło otrzymać bicykliczne analogi o różnej wielkości pierścienia (**19, 20, 22, 23, 24, 25, 32, 33 i 35-38**). Mgr Gitlin-Domagalska otrzymała również dwa peptomery (**39 i 40**), zawierające resztę analogu argininy - *N*-guanidynopropylglicynę, w pozycji P1 lub P1 i P4. Wszystkie analogi Doktorantka poddała badaniu na aktywność w stosunku do matryptazy-1 i matryptazy-2 w trzech różnych stężeniach (0,98, 9,8 i 98  $\mu$ M) z użyciem odpowiednio Boc-Gln-Ala-Arg-AMC oraz ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ala-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> jako substratów. Analogi zawierające resztę lizyny w pozycji P1 były słabszymi inhibitorami matryptazy-2 niż analogi zawierające resztę argininy w pozycji P1 i P4. Dla wybranych analogów (**6, 7, 11, 12, 21-24, 28-30 and 34-37**) oraz natywnego i monocyklicznego SFTI-1 została wyznaczona stała inhibicji K<sub>i</sub> wobec matryptazy-1, matryptazy-2 oraz innych proteaz serynowych o zbliżonej do obu matryptaz specyficzności substratowej (plazminy, trombiny oraz trypsyny). Analogi **3, 6, 7, 11, 12 i 29** o różnej aktywności inhibitorowej wykazały również wysoką stabilność proteolityczną w obecności matryptazy-2. Przeprowadzone pomiary kinetyczne dla analogu **6** ([Arg<sup>5</sup>]SFTI-1) pozwoliły zaproponować mechanizm inhibicji określany jako hamowanie kompetycyjne. Dla zbadania oddziaływania inhibitora o najwyższej aktywności (**6**) z enzymem w komórce Doktorantka zsyntetyzowała znakowane fluorescencyjnie analogi **6A i 6B**, zawierające resztę karboksyfluoresceiny, (mieszanina dwóch izomerów) połączonej z resztą glicyny za pomocą odpowiedniego łącznika (polietylenoglikol lub kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy). Wstępne badania nad możliwością wykorzystania obu peptydów jako próbników do oznaczania aktywności matryptazy-2 wymagają dalszych eksperymentów.

Dużym osiągnięciem mgr Gitlin-Domagalskiej było uzyskanie dwóch wysoce selektywnych inhibitorów matryptazy-2 (monocykliczny analog **7** i bicykliczny analog **12**), które

hamowały działanie matryptazy-1 odpowiednio 176 i 228 razy słabiej. Oba analogi okazały się słabymi inhibitorami plazminy i silnymi inhibitorami trypsyny. Nie wpływa to jednak na możliwości ich wykorzystania jako terapeutyków z uwagi na różne miejsca wydzielania matryptazy i trypsyny.

Wszystkie peptydy otrzymane na żywicy Barlosa z wykorzystaniem strategii Fmoc. Synteza monocyklicznych peptydów obejmowała usunięcie liniowych prekursorów z żywicy z jednoczesnym odblokowaniem grup funkcyjnych a następnie cyklizację poprzez utworzenie mostka disulfidowego. Dla 14 bicyklicznych analogów, liniowe prekursory były usuwane z żywicy, bez deprotekcji łańcuchów bocznych. Pierwsza cyklizacja obejmowała utworzenie wiązania amidowego z udziałem PyBOP jako odczynnika sprzęgającego a następnie, po usunięciu wszystkich grup ochronnych utworzono mostek disulfidowy. Wszystkie peptydy zostały oczyszczone z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, a ich masa została potwierdzona spektrometrią mas.

Z opisu rozprawy wynika, że Doktorantka dobrze panuje nad metodologią syntezy peptydów na fazie stałej, cyklizacją liniowych prekursorów, technikami chromatograficznymi, charakterystyka otrzymanych związków nie budzi zastrzeżeń. Również dużą biegłością wykazała się w badaniach enzymatycznych.

Praca napisana jest poprawnym angielskim, dobre wrażenie sprawia estetyczny wygląd pracy i przejrzyste rysunki. Niestety polskie streszczenie zawiera kilka niefortunnych sformułowań.

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka wybranych uwag:

- zamieszczanie na dziewięciu stronach chromatogramów HPLC i widm MS nie było konieczne i niepotrzebnie zwiększa objętość pracy. Wszystkie dane są w tabeli 6 oraz w załączonym suplemencie.
- w podrozdziale „Peptide synthesis” Autorka nie podaje obsadzenia żywicy i skali w jakiej przeprowadzała syntezy
- w Tabeli 6 podaje wydajność, choć podanie czystości otrzymanych analogów byłoby bardziej zasadne. Nie bardzo rozumiem jak została policzona wydajność końcowych produktów i liczę na wyjaśnienie w trakcie obrony pracy.
- czy substrat Boc-Gln-Ala-Arg-MAC (str. 123) jest amidem 7-amino-4-metylokumaryny, który w skrótach jest opisany jako AMC?
- „własności” i „właściwości” są w języku potocznym synonimami, ale w tekście chemicznym powinno używać się terminu „właściwości”
- „proteoliza enzymatyczne” (str. 179) – proteoliza jest hydroliza enzymatyczna, powinno

- „proteoliza enzymatyczne” (str. 179) – proteoliza jest hydrolizą enzymatyczną, powinno być hydroliza enzymatyczna lub proteoliza

- „Uzyskane wyniki potwierdziły, że uzyskane wyniki najlepiej pasują...”- należałoby przeredagować

Należy jednak podkreślić, że powyższe, drobne mankamenty nie mają istotnego wpływu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy.

Dorobek mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej obejmuje 4 publikacje w czasopismach z bazy JCR o sumarycznym IF=12,922 (w jednej jest pierwszym autorem), trzy prace w książkowych materiałach konferencyjnych oraz 26 doniesień zaprezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

O ważności i aktualności badań prowadzonych przez Doktorantkę świadczy również fakt, że znalazły one finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Preludium 7 (kierownik grantu) oraz z funduszu Młodych Naukowców (kierownik grantu).

Podsumowując, pracę doktorską mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej oceniam bardzo wysoko. Temat podjęty przez Doktorantkę jest z punktu widzenia naukowego wysoce aktualny. Uzyskała ona szereg ważnych i ciekawych rezultatów, wykazała umiejętność posługiwania się wieloma nowoczesnymi metodami badawczymi i zdolnością krytycznej interpretacji uzyskanych wyników. W mojej opinii, recenzowana rozprawa stanowi samodzielne rozwiązanie przez Doktorantkę problemu naukowego, związanego z poszukiwaniem selektywnych inhibitorów matrypotazy-2.

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja pt. „Designing and chemical syntheses of selective matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds” spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytule Naukowym i Stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Aleksandra Olma*

Instytut Chemii Organicznej  
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27  
tel. 42 631 31 40, fax 42 636 55 30,  
[www.chemia.p.lodz.pl](http://www.chemia.p.lodz.pl), [www.p.lodz.pl](http://www.p.lodz.pl)



HR EXCELLENCE IN RESEARCH