



Warszawa, 17.08.2019 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

[misicka@chem.uw.edu.pl](mailto:misicka@chem.uw.edu.pl)

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Lubos

**pt.: „Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne peptydowych niekowalencyjnych i kowalencyjnych inhibitorów proteasomu”**

Jednym z najważniejszych systemów degradacji białek pozwalających na utrzymanie właściwej homeostazy komórkowej jest system ubikwityno-proteasomowy (UPS), który degraduje większość (aż do 90%) białek komórkowych. Zaangażowany w ten system proteasom 20S pełni zarówno rolę ochronną (rozkładając źle sfałdowane lub uszkodzone białka), jak i regulatorową (poprzez rozkład białek regulatorowych) uczestnicząc w regulacji podstawowych procesów życiowych. Ponieważ w komórkach nowotworowych obserwuje się podwyższoną aktywność proteasomu, jak również komórki te są często bardziej wrażliwe na inhibicję proteasomu niż komórki prawidłowe, to wiele ośrodków naukowych prowadzi od lat badania nad opracowaniem aktywnych i selektywnych inhibitorów proteasomu, zarówno pod kątem poznawczym, jak i z powodu potencjalnego wykorzystania tego typu związków w terapii przeciwnowotworowej.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Marty Lubos podejmuje zagadnienia w zakresie tej niezwykle ważnej obecnie tematyki. Praca ta jest w pewnym stopniu kontynuacją badań od lat prowadzonych w Katedrze Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Rolki w zakresie poszukiwań peptydowych inhibitorów proteaz serynowych lub treoninowych. Promotorem pomocniczym tej pracy był dr hab. Dawid Dębowski.

Celem pracy doktorskiej mgr Marty Lubos było zaprojektowanie, przeprowadzenie syntezy i badania kinetyczne dwóch grup inhibitorów ludzkiego, konstytutywnego proteasomu 20S. Pierwszą grupę stanowiły aldehydy zbudowane z 4 reszt aminokwasowych, wiążące się z proteasomem w sposób kowalencyjny, a drugą analogi inhibitora trypsyny wyodrębnionego z nasion słonecznika (SFTI-1), łączące się z proteasomem w sposób niekowalencyjny.

Praca doktorska mgr Marty Lubos ma układ klasyczny dla eksperymentalnych prac chemicznych, składa się z przeglądu literaturowego (53 strony), celu pracy (3 strony), opisu badań własnych (21 stron), opisu i dyskusji wyników (30 stron) oraz podsumowania (3 strony). W pracy jest również zamieszczony wykaz stosowanych skrótów, spis rysunków i spis literatury cytowanej obejmujący aż 262 pozycje (17 stron!).

W części wstępnej przeglądu literaturowego (229 odnośników literaturowych) doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący systemu ubikwityna-proteasom omawiając budowę i funkcje proteasomu, w tym budowę i funkcje jednostek 20S i 19S. Przedstawiła również budowę ubikwityny i proces ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji.

Kolejne rozdziały obejmują przegląd literatury pod kątem poszukiwań inhibitorów do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej. Doktorantka starannie omówiła budowę i aktywność inhibitorów proteasomu konstytutywnego (peptydowe aldehydy, epoksyketony, winylosulfony, peptydowe pochodne kwasu borowego,  $\beta$ -laktony, syrbaktyny) i inhibitorów immunoproteasomu. Oddzielny rozdział dotyczy niekowalencyjnych inhibitorów peptydowych (inhibitory Bowmana-Birki, SFTI-1, sunflower trypsin inhibitor 1).

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Marty Lubos było zaplanowanie, synteza i badania kinetyczne nowych peptydowych inhibitorów proteasomu. Syntezę zaplanowanych związków doktorantka przeprowadziła na nośnikach stałych, manualnie lub z użyciem półautomatycznego syntezyzatora z zastosowaniem strategii Fmoc/tBu.

W celu znalezienia nowych inhibitorów proteasomu doktorantka przeprowadziła syntezę dwóch grup inhibitorów ludzkiego, konstytutywnego proteasomu 20S:

1. pierwszą grupę stanowiły aldehydy zbudowane z 4 reszt aminokwasowych, wiążące się z proteasomem w sposób kowalencyjny. Syntezę 40 peptydowych aldehydów doktorantka przeprowadziła z zastosowaniem żywicy NovaSyn TG,

2. drugą grupę stanowiły analogi inhibitora trypsyny wyodrębnionego z nasion słonecznika (SFTI-1), łączące się z proteasomem w sposób niekowalencyjny. Syntezę 30 analogów SFTI-1 została przeprowadzona na żywicy chloro-(2'-chloro)tritylowej lub żywicy Tenta Gel.

Peptydy po zdjęciu z żywicy były analizowane, oczyszczane przy pomocy wysokoprężnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP HPLC), a następnie ich budowa była potwierdzana metodami spektrometrii mas (MALDI-TOF).

Badania własności inhibitorowych otrzymanych analogów w stosunku do proteasomu 20S doktorantka przeprowadziła z wykorzystaniem substratów fluorogenicznych, odpowiednich dla danej aktywności peptydazowej. Badania nad toksycznością inhibitorów proteasomu wobec komórek prawidłowych i nowotworowych zostały wykonane w laboratoriach współpracujących: przez zespół dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a badania nad toksycznością inhibitorów proteasomu wobec ludzkiej linii komórek glejaka zostały wykonane przez zespół dr. Timo Burstera z Wydziału Biologii Uniwersytetu Nazarbajewa w Astanie (Kazachstan).

Wyniki porównania aktywności inhibitorowej serii inhibitorów aldehydowych wskazały, że:

1. Największą aktywność wobec podjednostki  $\beta$ 1c (aktywność w zakresie 140-190 nM) wykazały peptydowe aldehydy o strukturze pierwszorzędowej IPMD-al, posiadające na swym N-końcu grupy

acylowe z długim łańcuchem hydrofilowym (analog 5) lub hydrofobowym (analog 6) zakończonym grupą aminową.

2. Spośród inhibitorów zaprojektowanych, aby blokować podjednostkę  $\beta 2c$  najsilniejszym okazał się analog 16, (peptydowy aldehyd O1Pent-VVMR-al), o aktywności ok. 20 nM.

3. Właściwości inhibitorowe peptydowych aldehydów, zawierających na C-końcu resztę Phe, badane wobec podjednostek  $\beta 5c$  i  $\beta 5i$  wskazały, że większość analogów była nieselektywna. Jedynie związki 21 i 22 charakteryzowały się nieznaczną selektywnością (inhibitory te hamowały 2,7-razy mocniej podjednostkę  $\beta 5i$  niż  $\beta 5c$ ). Na aktywność inhibitorową wpływały również reszty aminokwasowe leżące w kolejnych pozycjach: P2, P3 i P4. Trudno jednak na podstawie otrzymanych wyników wyciągnąć ogólne wnioski. Najbardziej aktywne inhibitory o aktywności 20-30 nM (25, 27 i 28) miały w pozycji P2 resztę Phe i dołączony na N-końcu łańcuch poli(tlenku etylenu) O2OOcta.

4. Niezmiernie interesujące informacje o wymaganiach strukturalnych inhibitorów podjednostek  $\beta 5c$  i  $\beta 5i$  wnoszą analogi 33 i 34, które są peptomerami, a więc nie posiadają atomu wodoru przy atomie azotu w wiązaniu amidowym. Ponieważ te analogi nie wykazują aktywności inhibitorowej wobec proteasomu, to można z tego faktu wnioskować, że w oddziaływaniach inhibitora z proteasomem niezmiernie istotną rolę odgrywają wiązania wodorowe tworzone przez atom wodoru znajdujący się przy amidowym atomie azotu. Warto byłoby zaproponować nową serię analogów, która potwierdziłaby ten wniosek.

5. Badania z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych: osteoblastów płodowych, kostniakomięsaka, nowotworu trzustki i ostrej białaczki szpikowej Jurkat, wykazały jednak niższą aktywność najlepszych inhibitorów z otrzymanych przez doktorantkę serii [O2OOcta-VLSF-al (21) i O2OOcta-hF-LFF-al (28)] w porównaniu do referencyjnego peptydowego aldehydu MG-132.

Druga seria analogów dotyczyła analogów inhibitora trypsyny [Arg5,Lys7,8]SFTI-1), która została zaprojektowana w celu zbadania wpływu na aktywność inhibitorową a) rodzaju cyklizacji, b) usunięcia/substytucji aminokwasów znajdujących się w pozycji 1 i 2 (Gly1, Arg2), c) wpływu modyfikacji N-końcowej grupy aminowej, d) wpływu podwojenia struktury pierwszorzędowej.

Wyniki aktywności inhibitorowej tej serii wskazały, że:

a. peptyd 41 ([Arg5,Lys7,8]SFTI-1, posiadający mostek disulfidowy) i 42 (bicykliczny analog 41 z dodatkową cyklizacją łańcucha głównego) były mocniejszymi inhibitorami niż ich analogi 43 (posiadający cyklizację głównego łańcucha peptydowego) i 44 (liniowy).

b. Inhibitor 64 posiadający na swym N-końcu hydrofilową pochodną poli(tlenku etylenu), okazał się najsilniejszym inhibitorem podjednostki  $\beta 2c$  spośród wszystkich badanych analogów [Arg5,Lys7,8]SFTI-1.

c. Inhibitory o podwójnej sekwencji (z wyjątkiem peptydu 71) były najsilniejszymi inhibitorami podjednostek  $\beta 1c$  i  $\beta 5c$ .

Jednak analogi z tej serii wykazywały słabsze własności inhibitorowe wobec proteasomu niż peptydowe aldehydy otrzymane w pierwszej serii.

Pracę doktorską mgr Marty Lubos przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana nienaganną polszczyzną, zwięźle i przejrzyście. Z przedstawionego przeglądu literaturowego i starannego omawiania wyników aktywności biologicznych otrzymanych przez doktorantkę związków wyraźnie widać jej wielkie zainteresowanie związkami o potencjalnym wykorzystaniu w medycynie. Na podkreślenie zasługuje duża liczba zsyntezowanych analogów (w sumie 70!), a nie były to tylko proste peptydy, bo były to też peptomery, peptydy cykliczne (zawierające mostek disulfidowy, bądź cykliczny łańcuch główny), jak również peptydy bicykliczne. Doktorantka musiała prowadzić syntezy na różnorodnych żywicach, stosować różne pochodne aminokwasowe umożliwiające np. wytwarzanie mostków disulfidowych w ortogonalnych warunkach. Można się również domyślać (choć doktorantka o tym w pracy nie wspomina), że oczyszczanie niektórych związków też nie było proste. Wszystkie te umiejętności nabyte przez doktorantkę podczas wykonywania pracy świadczą o tym, że jest ona obecnie doskonale wyszkoloną chemiką w zakresie syntezy i badań kinetycznych peptydów. Ważnym elementem jest też fakt, że wyniki pracy zostały już opublikowane w 4 publikacjach w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, a zapewne niedługo ukażą się następne.

Z ciekawości i obowiązku recenzenta chciałabym zadać kilka pytań, które nasunęły mi się podczas czytania tej rozprawy doktorskiej:

1. Szkoda, że doktorantka na etapie przedstawiania celu pracy nie podała przesłanek, którymi się sugerowała projektując poszczególne grupy analogów z serii pierwszej (aldehydy). Niektóre z brakujących na tym etapie czytania pracy informacji można znaleźć w dalszych częściach pracy podczas omówienia otrzymanych wyników, ale lepiej byłoby podać uzasadnienie wprowadzanych zmian już w celu pracy. Poza tym tytuł pracy brzmi „Projektowanie, synteza itd.” Mam więc nadzieję, że podczas obrony doktorantka omówi ten problem bardziej dogłębnie.

2. Do otrzymywania peptydowych inhibitorów z grupą aldehydową na C-końcu doktorantka stosowała żywicę NovaSyn TG (Novabiochem), zabrakło mi w pracy bardziej szczegółowego omówienia samej żywicy, stosowanego linkera, procesu zdejmowania peptydu z żywicy. W pracy jest tylko podana mieszanina użyta do zdjęcia: kwas octowy/woda/chlorek metylenu/metanol (10:5:63:21), bez podania odnośnika do literatury.

3. Doktorantka do wprowadzenia grupy acetylowej na N-końiec peptydydożywicy używa 10-krotny nadmiar molowy acetyloimidazolu, prowadząc reakcję przez 75 min. Czy nie wystarczyłoby zastosować bezwodnik octowy przez 5 minut?

4. Ciekawa jestem, czy otrzymane aldehydy peptydów były przechowywane bez dostępu do powietrza (aby zapobiec utlenieniu do kwasu), jeśli nie, to czy były obserwowane produkty utlenienia po jakimś czasie?

5. Peptydowy aldehyd używany jako związek referencyjny MG132 został szczegółowo omówiony w części literaturowej pod kątem jego aktywności biologicznej, jednak szkoda, że doktorantka nie omówiła w tym miejscu też jego analogów i prób modelowania w centrum aktywnym proteasomu (tak jak jest to przykładowo przedstawione w pracy *Molecules* 2011, 16,

7551-7564, na podstawie struktury krystalicznej proteasomu 20S z peptydowym aldehydem MG131).

Wymienione powyżej zagadnienia mają na celu podjęcie na obronie wspólnej z doktorantką dyskusji na interesujące mnie zagadnienia i nie mają wpływu na moją pozytywną opinię o tej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr Marty Lubos obejmowała bardzo szeroki zakres prac zarówno syntetycznych, jak i badań aktywności inhibitorowych otrzymanych związków. Wszystkie etapy badań wymagały od doktorantki wszechstronnego przygotowania, zarówno teoretycznego, jak i eksperymentalnego. Ze wszystkich etapów pracy doktorantka wywiązała się bardzo dobrze. Nabyte w trakcie wykonywania pracy umiejętności klasyfikują doktorantkę już jako wszechstronnego badacza w zakresie szeroko pojętej chemii medycznej, przygotowanego do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Marty Lubos zatytułowana „Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne peptydowych niekowalencyjnych i kowalencyjnych inhibitorów proteasomu” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Lubos do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*A. Piśtcho*