



UNIWERSYTET GDAŃSKI



**Dr hab. Elżbieta Jankowska**

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

Gdańsk, 7.10.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej:

**In search of substrates and inhibitors of human cathepsin C. Design, chemical synthesis and biological studies,**

przygotowanej przez mgr Monikę Katarzynę Łęgowską

Termin „katepsyna” pochodzi z języka greckiego i oznacza trawienie. Można go spotkać zarówno wśród nazw proteaz aspartylowych, jak też serynowych i cysteinowych. Tych ostatnich w proteomie człowieka rozpoznanych zostało dotąd 11. Jedną z nich – katepsyna C, stała się obiektem badań pani mgr Moniki Łęgowskiej.

Katepsyna C jest to dipeptydylowa egzoptydaza odpowiedzialna m.in. za aktywację białek poprzez odcinanie domen propeptydowych. Jedną z docelowych grup dla tego typu aktywującej proteolizy realizowanej przez katepsynę C są neutrofilne proteazy serynowe. Nadmierna aktywność tych enzymów prowadzi do rozwoju różnego rodzaju chorób o podłożu zapalnym i immunologicznym, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego, astmy, mukowiscydozy, czy przewlekłego obturacyjnego zapalenia płuc. W poszukiwaniu sposobów na zahamowanie rozwoju tych chorób jako jedną z możliwości rozważa się wykorzystanie inhibitorów katepsyny C. Znaleźnię skutecznych, a przy tym odpornych na degradację enzymatyczną inhibitorów tego enzymu było jednym z celów pracy badawczej wykonanej przez mgr Łęgowską. Drugą część pracy stanowiło poszukiwanie selektywnych substratów, które mogłyby otworzyć drogę do dokładnego rozpoznania lokalizacji i funkcji patofizjologicznych katepsyny C. Efekty tych poszukiwań opisane zostały w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej.

Realizując prace poświęcone substratom Doktorantka zaprojektowała dwie grupy związków: substraty fluorogeniczne oraz substraty wykorzystujące przeniesienie energii wzbudzenia elektronowego (FRET). W pierwszej grupie otrzymała 14 związków, modyfikując sekwencję jednego z rozpoznanych już substratów katepsyny C: H-Gly-Phe-AMC, poprzez wprowadzenie w miejsce glicyny niebiałkowej reszty aminokwasowej -  $\beta$ -(2-tienylo)-L-alaniny, bądź wymianę fluoroforu na różnego rodzaju pochodne aminokumarynowe lub aminochinolinonowe. Choć najlepsze z tej grupy substratów wykazywały się

znaczącym powinowactwem do katepsyny C, ich selektywność nie była, niestety, wystarczająca, by mogły być wykorzystywane do oznaczeń prowadzonych w złożonych próbkach biologicznych.

W grupie substratów zawierających pary donor-akceptor fluorescencji otrzymane zostały dwie serie związków. Związki należące do pierwszej z nich (w sumie 59) zawierały jako donor fluorescencji resztę kwasu 2-aminobenzoowego, a jako akceptor – resztę 3-nitrotyrozyny. Związki te okazały się niepodatne na hydrolizę katalizowaną przez katepsynę C, posłużyły jednak Doktorantce do zbadania preferencji substratowych w nieprimowanych (P1) i primowanych (P1' i P2') miejscach substratowych katepsyny L. Zidentyfikowany jako substrat o najkorzystniejszych parametrach kinetycznych związek z resztami argininy, alaniny i glutaminy odpowiednio w pozycjach P1, P1' i P2' (ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>) okazał się także bardzo selektywny, nie poddawał się bowiem hydrolizie pod wpływem katepsyn B, C, F, K, S i V. Doktorantka wykazała ponadto, iż otrzymany przez Nią substrat cechuje się czułością wystarczającą do detekcji podwyższonej aktywności katepsyny L w komórkach rakowych. Znaczenie powyższych rezultatów dodatkowo podkreśla fakt ich opublikowania w cenionym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (Anal. Biochem.).

Druga seria substratów typu FRET (41) posiadała również resztę 3-nitrotyrozyny jako akceptor fluorescencji, rolę donora spełniała w nich natomiast reszta 7-metoksykumarynylo-L-alaniny. Badania związków z tej serii były pierwszą, szeroką zakrojoną próbą określenia specyficzności primowanych miejsc substratowych katepsyny C. Jeden z najefektywniejszych substratów z tej grupy okazał się być także selektywny, nie poddając się hydrolizie katalizowanej przez katepsyny K, L, S, V i X, a także neutrofilne proteazy serynowe (katepsynę G, HNE oraz PR3). W stosunku do katepsyny B wykazywał natomiast około 20-krotnie niższe wartości stałej specyficzności (przy pH 6) niż dla katepsyny C. Co warto podkreślić, Doktorantka nie poprzestała na wyznaczeniu parametrów kinetycznych dla najlepszych ze swoich substratów, ale korzystając ze spektrometrii mas określiła także profil ich degradacji, dzięki czemu zauważyła, iż produkty hydrolizy są inne w przypadku katepsyny B i C.

W części poświęconej inhibitorom katepsyny C Doktorantka zaprojektowała i otrzymała dwie serie dwuaminokwasowych nityli. W jednej serii zbadła znaczenie długości zasadowego łańcucha w sekwencji inhibitora dla jego zdolności do blokowania aktywności katepsyny C. W drugiej określiła wpływ konfiguracji absolutnej każdej z reszt aminokwasowych na zdolności inhibicyjne oraz odporność na degradację proteolityczną. Choć te syntezy nie przyniosły szczególnie efektywnych inhibitorów, zastosowanie aminokwasów z szeregu D zmniejszyło znacząco podatność na proteolizę, dzięki czemu inhibitor Thi-D-Phe-CN mógł znaleźć zastosowanie do otrzymania układów odniesienia przy oznaczaniu aktywności katepsyny C w próbkach biologicznych.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Łęgowskiej zawarta została na 176 stronach i ma układ klasyczny dla prac chemicznych. Składa się ze wstępu, ale treściwego wprowadzenia literaturowego, obejmującego 39 stron, celu pracy (3 strony), opisu i omówienia wyników wykonanych badań własnych, zawartego na 93 stronach, oraz podsumowania (1 strona). Ponieważ rozprawa przygotowana została w języku angielskim na

jej końcu dodano jeszcze krótkie streszczenie w języku polskim. Spis literatury cytowanej zawiera 182 pozycje uwzględniające najnowsze publikacje z czasopism o zasięgu międzynarodowym. Zamieszczony dodatkowo spis tabel i rysunków ułatwia poruszanie się po treści pracy i odnajdywanie potrzebnych informacji.

W części stanowiącej przegląd literatury Doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący katepsyn cysteinowych – ich biosyntezy, struktury, preferencji substratowych, lokalizacji wewnątrzkomórkowej, pełnionych funkcji fizjologicznych oraz zaangażowania w rozwój stanów patologicznych. Szczególnie dużo uwagi poświęciła katepsynie C, a zwłaszcza inhibitorom jej aktywności. Opisy są zwięzłe, ale jasne i treściwe, zilustrowane poglądowymi rysunkami i tabelami, co powoduje, że czyta się je łatwo i z dużym zainteresowaniem. Przedstawione wprowadzenie literaturowe dobrze przygotowuje do rozdziału, w którym Doktorantka omawia wyniki zrealizowanych badań.

W części prezentującej wyniki badań własnych wydzielono dwa rozdziały, zawierające odpowiednio opisy wykonanych syntez oraz badań biologicznych. Są to rozdziały bardzo obszerne, gdyż i ilość wykonanych prac eksperymentalnych jest doprawdy imponująca. Doktorantka otrzymała w sumie 122 peptydy i peptydomimetyki, zawierające od trzech do sześciu reszt aminokwasowych. Większość syntez prowadzonych była na nośniku stałym, jednak część wykonywano w roztworze, co wiązało się z koniecznością oczyszczania produktów pośrednich, powiększając znacząco konieczne nakłady pracy. Doktorantka własnoręcznie wykonała także badania biologiczne, oznaczając aktywność otrzymanych substratów względem rekombinowanych enzymów – przede wszystkim katepsyny C i/lub katepsyny L, dla części związków również względem innych katepsyn i neutrofilnych proteaz serynowych. Przeprowadziła także testy aktywności na lizatach komórkowych oraz próbkach biologicznych pochodzących od pacjentów lub zdrowych ochotników. Dla najbardziej interesujących substratów wyznaczyła parametry kinetyczne – stałą Michaelisa, stałą katalizy i stałą specyficzności, jak również miejsce cięcia oraz granice wykrywalności i oznaczalności enzymu przy pomocy otrzymanego substratu. Dla zsyntezowanych inhibitorów określiła nie tylko zdolność do hamowania realizowanej przez katepsynę C proteolizy, ale także stabilność w płynach ustrojowych. Część z tych badań wykonała w ramach stażowego pobytu w laboratorium ko-promotora, dr hab. Brice Korkmaz, na Uniwersytecie w Tours, we Francji. Ogromna ilość zebranych wyników została w rozprawie przedstawiona w bardzo przemyślany sposób i klarownie zinterpretowana, dowodząc dojrzałości naukowej Doktorantki.

Mimo, iż treść rozprawy zasadniczo wyrażona została jasno i precyzyjnie, w pewnych miejscach pojawiły się sformułowania czy braki, co do których recenzent ma pewne uwagi. Jedna z uwag dotyczy celów pracy. Zaprezentowane zostały one dość szczegółowo, z szerokim uzasadnieniem. Pozwala to z jednej strony lepiej zrozumieć powody podjęcia takich a nie innych badań, z drugiej jednak nieco utrudnia szybką orientację w zaplanowanych do realizacji syntezach i badaniach. Być może korzystniej byłoby jednak uprościć nieco opis, choćby podając w punktach czy tabelach zaplanowane do syntezy związki. Poniżej wymieniam jeszcze kilka uwag bądź zapytań w odniesieniu do tych nielicznych dostrzeżonych nieprawidłowości:

- czy nie należałoby konsekwentnie podawać wszystkich sekwencji peptydów i peptydomimetyków wraz ze wskazaniem C-końcowej grupy funkcyjnej? W niektórych miejscach tego zabrakło.

- co to są nieinwazyjne aminokwasy („non-invasive amino acids“)?

- czy rzeczywiście zaplanowano do syntezy związku zawierające pary FRET i jednocześnie dwie pozycje –  $P_1'$  i  $P_2'$  poddawano modyfikacjom (str. 51)? Zapis to właśnie sugeruje, co oznaczałoby 19 x 19 modyfikacji, a więc w sumie 361 analogów dla jednej sekwencji bazowej...

- przy przedstawianych widmach MALDI dobrze byłoby podawać matrycę, której użyto, zwłaszcza, gdy niewielka masa cząsteczkowa związków powoduje, iż sygnały pochodzące od związku znajdują się w rejonie matrycowym

- dlaczego przy modyfikacji pozycji  $P_2'$  w substracie typu FRET jako związek wyjściowy wybrano związek z resztą alaniny w pozycji  $P_1'$  (ABZ-Bip-Arg-Ala- $X_2'$ -Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>), a nie z resztą seryny, który zdaje się wykazywać większą aktywność?

Niezwykle starannie wykonana korekta językowa powoduje, iż w całej, tak obszernej pracy, niewiele jest błędów czy usterek edycyjnych. Z obowiązku recenzenckiego muszę jednak zwrócić uwagę na kilka z nich:

- przy wymienianiu par donor-akceptor (str. 22) nie zachowano spójności w podawanych nazwach – w przypadku grupy dinitrofenylowej (Dnp) nie podano pełnej nazwy ugrupowania wbudowywanego do sekwencji peptydu;

- używano zamiennie skrótu TCCP i TCPP na określenie tego samego związku (str. 9, 23, 149);

- rysunki 22 i 23 mają identyczne podpisy, mimo iż prezentują struktury odmiennych inhibitorów;

- błędnie zacytowano jedną z pozycji literaturowych ([151] zamiast [149], str. 56)

- w pozycji [173] spisu literatury nie wymieniono autorów

- pochodna ACC kumaryny przedstawiana jest zarówno jako kwas (str. 8, 19, 54) jak i amid (rys. 14, 28, str. 172, pozycja [150] w spisie literatury)

- czy sygnał m/z 321.3 dla związku ABZ-Bip-Asp-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (str. 74) to naprawdę  $[M-H]^{2+}$ ?

- czy sygnał m/z 836.7 dla związku ABZ-Bip-Arg-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (str. 76) to nie jest raczej  $[M]^+$ ?

- str. 81: sygnały 656.3 (Ala(Mca)-Tyr-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>) oraz 727.8 (Ala(Mca)-Nle(6-OBzl)-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>) to odpowiednio  $[M+Na]^+$  i  $[M+K]^+$ , a nie, jak napisano,  $[M+H]^+$

- str. 134: peptyd ABZ-Bip-Arg-Ala-Ser-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> jest rzeczywiście bardzo dobrym substratem katepsyny L, jednak wyznaczona dla niego wartość stałej Michaelisa jest nie o rząd wielkości, jak napisano, ale około 5 razy niższa w porównaniu z analogicznym parametrem dla peptydów z resztami Ala lub Gln w pozycji  $P_2'$

- str. 134: w tekście i tabeli (tabela 16) podano różne wartości stałej katalizy dla jednego z substratów (odpowiednio 20,83 i 27,0 s<sup>-1</sup>)

Te drobne mankamenty w żaden sposób nie umniejszają jednak wartości rozprawy, w której mgr Monika Łęgowska zaprezentowała bardzo interesujące i wartościowe wyniki. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy, zdaniem recenzenta:

- zidentyfikowanie związku o znaczącej odporności na degradację enzymatyczną oraz selektywności względem katepsyny C (Thi-Ala(Mca)-Ser-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>), co zostało potwierdzone w testach wykrywających aktywność tego enzymu w lizatach komórek neutrofilnych i komórek białaczki, a także w próbkach pobranych od pacjentów z przewlekłymi chorobami płuc o podłożu zapalnym;

- zidentyfikowanie selektywnego i czułego substratu katepsyny L (ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>), który posłużyć może do oznaczania aktywności tego powiązanego z rozwojem nowotworów enzymu w lizatach komórkowych.

Co niezwykle istotne, na prowadzone badania Doktorantka pozyskała środki finansowe w postaci grantu *Preludium*, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, oraz grantu na badania własne młodych pracowników nauki Uniwersytetu Gdańskiego. Na podkreślenie zasługuje też, iż mgr Łęgowska jest już współautorką 4 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym współczynniku wpływu ponad 10. Dwie dodatkowe prace opublikowała w materiałach pokonferencyjnych Europejskiego Sympozjum Peptydowego. Docenić należy również fakt, iż doświadczenie naukowe Doktorantka zdobywała nie tylko pracując w macierzystym laboratorium na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, ale także podczas dwu kilkumiesięcznych staży w bardzo dobrych laboratoriach europejskich.

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 Moniki Katarzyny Łęgowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łęgowska