

Szanowny Panie Dziekanie, Profesorze Stepnowski, Szanowni Członkowie Rady Wydziału,

Chciałabym podziękować za zaufanie jakim Państwo obdarzyli mnie prosząc o opinię w sprawie dysertacji doktorskiej zaprezentowanej przez mgr Monikę Katarzynę Łęgowską z Katedry Biochemii Wydziału Chemii, której tytuł brzmi: W poszukiwaniu substratów i inhibitorów ludzkiej katepsyny C. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne.

Z przyjemnością przeczytałam dysertację, która napisana jest bezbłędnym angielskim. Dotyczy ona projektowania substratów i inhibitorów katepsyny C. Doskonale połączenie ogromnej ilości danych eksperymentalnych i szczegółowej dyskusji wyników otrzymanych zarówno na drodze chemicznej jak i biochemicznej w klarowny sposób pokazuje osiągnięcia Kandydatki w dziedzinie biochemii enzymów proteolitycznych.

Kandydatka rozprawę rozpoczyna obszernym wstępem, w którym przedstawia i zwraca uwagę na najważniejsze doniesienia literaturowe w swojej dziedzinie, przez co płynnie wprowadza czytelnika w cel swojej dysertacji. Mgr Łęgowska zaczyna od opisu zróżnicowanej rodziny katepsyn cysteinowych, spośród konkretnego jej przedstawiciela – katepsynę C. Pani magister ogólnie opisuje biosyntezę i ścieżki transportu komórkowego katepsyn cysteinowych, a następnie dyskutuje ich struktury w świetle specyficzności substratowej. Kiedy przechodzi do opisu roli jaką katepsyny cysteinowe odgrywają w fizjologii i patologii, jasnym się staje dlaczego i w jaki sposób katepsyna C jest wyjątkowa. Podczas, gdy katepsyny cysteinowe, szczególnie zazwyczaj wydzielane pozakomórkowo zaangażowane są w trawienie różnych substratów białkowych jako endopeptydazy, to katepsyna C działa głównie jako dipeptydylopeptydaza i dlatego nazywana jest również dipeptydylopeptydazą I (DPPI). Choroba związana z agresywnym zapaleniem ozębnej i rozległymi zmianami skórnymi, syndrom Papillon'a-Lefevre'a jest wynikiem mutacji genu *Ctsc*. Choroba ta dotyka dzieci przed okresem dojrzewania. Dlatego katepsyna C jest znana ze swej znaczącej funkcji w patologiach immunologicznych. Z biochemicznego punktu widzenia, katepsyna C jest ważna, ponieważ działa jako multimer, podczas gdy kanoniczne katepsyny cysteinowe - jako monomery. Pośród szeregu katepsyn cysteinowych – B, C, L, O i X/Z, uważa się, że katepsyna C oddziałuje tylko z niewielką grupą naturalnych substratów, co czyni ją idealnym kandydatem w procesie celowego projektowania leków.

Kandydatka bardzo dobrze opisuje różne metody dotyczące oceny aktywności katepsyn cysteinowych przy użyciu specyficznych substratów, inhibitorów i sond bazujących na aktywności (ABPs), które są nowymi narzędziami zaprojektowanymi do badania aktywności enzymu *in vitro* (w lizatach i ekstraktach tkanek) oraz *in vivo* (w kulturach bakterii lub w myszach). Niektóre z katepsyn cysteinowych zostały sklasyfikowane jako cele molekularne leków stosowanych w terapii takich chorób jak Alzheimer (inhibitor katepsyny B), osteoporoza (inhibitor katepsyny K) czy rak (inhibitory katepsyny B i L). Jednak z powodu różnorodności funkcji fizjologicznych i patologicznych tych enzymów, a także ze względu na mnogość potencjalnych substratów, nie łatwo jest opracować wysoko specyficzny lek, który nie powodowałby dotkliwych efektów ubocznych podczas terapii. Firmy farmaceutyczne podjęły to wyzwanie, jednak wydaje się oczywistym, że katepsyny cysteinowe nie są łatwym obiektem terapeutycznym. Fakt ten ma również potwierdzenie w tym, że ekspresja katepsyn odbywa się w sposób redundantny. Oznacza to, że w warunkach całkowitej lub częściowej utraty funkcji przez jeden z enzymów, członek rodziny proteaz zazwyczaj staje się aktywowany po to, aby skompensować utratę aktywności tego pierwszego. Wspomniana redundantność nie jest jedynym problemem na poziomie oddziaływania z substratem, ale poświęca się jej dużo uwagi podczas przygotowywania testów aktywności proteolitycznej katepsyn cysteinowych. Należy pamiętać, że katepsyny cysteinowe nazywane są również enzymami lizosomalnymi, ale ich ekspresja i aktywność mają miejsce we wszystkich etapach szlaku endocytotycznego, oraz są wydzielane zarówno w warunkach fizjologicznych lub patologicznych i docierają do nietypowych miejsc działania takich jak np. jądro komórkowe.

Katepsyna C odgrywa istotną rolę w chorobach immunologicznych oraz tych o podłożu zapalnym. Powoduje to, że jest ona interesującym kandydatem, dla którego warto projektować substraty o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce wielu schorzeń zaczynając od astmy kończąc na artretyzmie, przewlekłym zapaleniu płuc czy mukowiscydozie, a kończąc na raku skóry. Te przykłady pokazują, że katepsyna C jest nie tylko odpowiedzialna za rzadki syndrom Papillon'a-Lefevre'a, ale również za choroby, które dotyczą pacjentów na całym świecie. Dlatego na przestrzeni ostatnich lat zaprojektowano i scharakteryzowano wiele specyficznych substratów i inhibitorów katepsyny C, co kandydatka opisuje bardzo szczegółowo w obszernym wstępie. Rozdział ten w doskonały sposób opisuje różne metody stosowane w projektowaniu substratów i inhibitorów, np.: bazujące na klasycznych substratach peptydowych posiadających różne grupy luminescencyjne lub chromogeniczne, substraty działające z wykorzystaniem transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET), jak

również ostatnio badane nanosondy. Dla inhibitorów o znaczeniu terapeutycznym oraz sond bazujących na aktywności (ABP) charakteryzujących się aktywnością inhibitorową, coraz bardziej popularna staje się technika fluorescencji w bliskiej podczerwieni. Do badania aktywności katepsyny w fazie stałej zaprojektowano tetrapeptydy znakowane ferrocenem w celu oznaczeń jakościowych i ilościowych katepsyn cysteinowych w roztworach lub lizatach tkanek. Ponadto ostatnio zostały zaprojektowane nieznakowane sensory aktywności proteolitycznych.

Celem eksperymentalnym pracy Kandydatki było zaprojektowanie inhibitorów i substratów katepsyny C, które byłyby stosowane *in vivo*. Do tej pory produkty metabolicznej przemiany takich inhibitorów uniemożliwiały ich zastosowanie lub wprowadzenie do praktyki klinicznej. Biorąc pod uwagę znaczenie, jakie przypisuje się katepsynie C w schorzeniach autoimmunologicznych oraz chorobach o charakterze zapalnym, nadszedł czas, aby opracować tego typu związki. Do swoich badań Kandydatka wybrała nitrylowe pochodne leków jako te, które z sukcesem zostały poddane testom klinicznym w terapii osteoporozy (inhibitor katepsyny K) i cukrzycy (inhibitor dipeptydylopeptydazy IV). Wcześniej jednak zdecydowała się, zaprojektować specyficzne substraty dla katepsyny C, aby określić poziom aktywności enzymu. W tym celu wykorzystwała dipeptydowe substraty i sprawdzała czy niebiałkowa reszta aminokwasowa Thi znajdująca się w pozycji P2 i inne grupy fluorogeniczne są tolerowane przez enzym. Dodatkowo zaprojektowała substraty FRET w celu selektywnej i wysokoczułej detekcji katepsyny C oraz porównała wyniki z otrzymanymi dla katepsyny L. Interesujące jest, że otrzymała niezwykle selektywny substrat katepsyny L, który to enzym znalazł się kręgu zainteresowań Pani mgr Łęgowskiej z uwagi na rzadkość występowania inhibitorów tej proteazy. Ponadto Kandydatka w ramach prowadzonych prac otrzymała szereg substratów FRET, które wykorzystwała do analizy reszt znajdujących się w miejscu aktywnym katepsyny C. Następnie Autorka rozprawy zaprojektowała inhibitory katepsyny C, które nie byłyby hydrolizowane przez proteazy znajdujące się w wątrobie i krwi. Tak więc celem tych eksperymentów była identyfikacja inhibitora katepsyny C odpornego na proteolizę, który podczas terapii charakteryzowałby się wyższą trwałością i przez to pozwoliłby na przewyciężenie obserwowanej niestabilności inhibitorów katepsyn cysteinowych. Przygotowując drugą serię inhibitorów celem Pani Moniki była analiza oddziaływań pomiędzy katepsyną C a substratem w pozycji P1. Cel ten realizowany był poprzez projektowanie związków, w których w omawianej pozycji zawierały zasadowy aminokwas charakteryzujący się różną długością łańcucha bocznego.

Rozdział poświęcony projektowaniu i syntezie jest edytorsko dobrze ułożony i wystarczająco szczegółowy, aby powtórzyć opisywane syntezę. Z uwagi na fakt, iż nie jestem chemikiem, mam nadzieję, że wybaczą mi Państwo brak szczegółowego komentarza dotyczącego wspomnianego „piękna” i poszczególnych jej etapów. Nawet nie będąc ekspertem, mogę stwierdzić, że kandydatka z wielką roztropnością zaprojektowała każdy z etapów syntezy chemicznej oraz analizowała produkty, które szczegółowo scharakteryzowała przed kolejnymi badaniami. Opis testów enzymatycznych określających aktywność katepsyny C i L jest zarówno wyczerpujący jak i pozwalający na ich powtórzenie przy użyciu stosownych procedur badania aktywności proteolitycznej. Co więcej przeprowadzonych zostało wiele testów z wykorzystaniem następujących materiałów: lizatów przygotowanych z neutrofilów i różnych komórek ludzkich zarówno zdrowych jak i rakowych oraz próbek biologicznych takich jak plazma, mocz czy płyny z płukania oskrzelowo-płucnego.

Substraty, które Kandydatka zaprojektowała i zsyntezowała zostały przebadane wobec katepsyny C i L oraz rodziny neutrofilnych proteinaz serynowych. Pani Monika określiła specyficzność tych enzymów stosując różne środowisko pH, tak aby uwzględnić naturalne przemiany fizjologiczne tych enzymów. Przygotowała również serię fluorogenicznych dipeptydowych substratów, spośród których Thi-Phe-AFC okazał się być najbardziej specyficzny w stosunku do katepsyny C. Analizując substraty FRET, Thi-Ala(Mca)-Ser-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ okazał się być odpowiedni do badania aktywności katepsyny C. Kandydatka z powodzeniem skupiła się również na scharakteryzowaniu głównego miejsca specyficznego katepsyny C (patrz powyżej). Być może nic w tym dziwnego, ale warto wspomnieć, że warunki pH, w których jest rozcinaane wiązanie substratu, zwiększają zdolność katepsyny C do oddziaływania z różnymi substratami. Wyniki opisane w tej części dysertacji są również interesujące zarówno z biologiczno-komórkowego jak również klinicznego punktu widzenia, ponieważ dane sugerują ograniczone możliwości proteolizy w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i warunkach endosomalnego pH podczas, gdy katepsyna C wykazywała większą aktywność związaną z hydrolizą substratu w pH zbliżonym do lizosomalnego (pH 5). Podobne obserwacje otrzymała dla pozostałych katepsyn cysteinowych. Podczas wprowadzania leku ważne jest, aby pamiętać o powyższych właściwościach katepsyny C, gdyż jest mało prawdopodobne aby leki lizosomotropowe były stosowane w praktyce klinicznej ze względu na potencjalne reakcje uboczne (a tym samym efekty uboczne) zachodzące podczas ich stosowania na komórkach i tkankach.

Część zaprojektowanych cząsteczek substratów katepsyny C było analizowane przy pomocy modelowania molekularnego.

Interesującym wątkiem rozprawy jest opis selekcji specyficznego substratu wobec katepsyny L ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln- Tyr(NO₂)-NH₂. Związek ten niesie ze sobą duży potencjał i może zostać wykorzystany w przyszłości. Kandydatka przetestowała go pod względem skuteczności w detekcji cysteinowej katepsyny L w lizacie komórkowym. Byłoby interesujące, aby sprawdzić czy związek ten potwierdzi pokładane w nim nadzieje również w połączeniu z katepsyną L2/V (nie wydzielaną u myszy) i katepsyną K, która również odgrywa znaczącą rolę fizjologiczną i patologiczną. Rola katepsyny K w chorobach płuc jest znana, jednakże niewiele wiadomo w tej kwestii o katepsynie L2/V. Dlatego Kandydatka w przyszłości powinna prowadzić bardziej szczegółowe badania w tej tematyce. Przygotowana seria związków o potencjale inhibitorowym specyficznym dla katepsyny C, będzie mogła być użyta jako modulator aktywności oddziaływań z Thi-Lys-CN – najbardziej obiecującym spośród tych substancji. Dodatkowo Kandydatka wykorzystwała serię związków, które pozwoliły jej na ustalenie wpływu chiralności na ich siłę hamowania i czas półtrwania. Potwierdziła Ona, że związki zawierające D-aminokwasy nie zwiększają aktywności inhibitorowej, ale powodują, że związek jest bardziej trwały w płynach zewnątrzkomórkowych. Z tego punktu widzenia badania z wykorzystaniem próbek biologicznych okazały się bardzo przydatne umożliwiając tym samym rozróżnienie pomiędzy aktywnością katepsyny C w stanie normalnym i patologicznym oraz pozwoliło przewidzieć czy rozpatrywany związek będzie odporny *in vivo*.

Podsumowując, rozprawa mgr Moniki Katarzyny Łęgowskiej jest napisana bardzo dobrze, a procedury eksperymentalne przedstawione są wystarczająco szczegółowo. Zaprezentowane wyniki ilustrowane są niezwykle przejrzystych rysunkami. Kandydatka w sposób ogólny opisuje bieżący stan wiedzy dotyczący katepsyn, a w szczególności katepsyny C i L oraz cząsteczek, które z nimi oddziałują (substraty, inhibitory, leki). Wskazuje również, dlaczego Jej praca jest ważna nie tylko w celu zdobycia wiedzy naukowej, ale również podczas projektowania potencjalnych, wykorzystanych w przyszłości terapeutyków. Pani Monika przedstawia i krytycznie dyskutuje swoje wyniki, jednocześnie wskazując, które eksperymenty wymagają modyfikacji w przyszłości. W rozprawie znajduje się również wykaz literatury.

Praca mgr Moniki Katarzyny Łęgowskiej wnosi znaczący wkład w tematykę proteolizy i identyfikacji leków zorientowanych na katepsynę C i L. Z powodzeniem opracowała szereg

związków, które mogą być w przyszłości wykorzystane do testów aktywności lub jako specyficzne inhibitory. Biorąc powyższe pod uwagę sugeruję akceptację dysertacji napisanej przez mgr Monikę Katarzynę Łęgowską jako część spełnienia wymagań w ubieganiu się o stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie Biochemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Drobna uwaga dotyczy błędu typograficznego, w całej pracy autorka używa słowa „wildly”, które powinno być zastąpione „widely”.