



Dr hab. Elżbieta Jankowska

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

Gdańsk, 20.09.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Lewandowskiej-Goch,
z tytułu
„Projektowanie i chemiczna synteza inhibitorów furyny”

Konwertazy probiałkowe należą do rodziny serynowych endoproteaz. Ich główną funkcją jest aktywacja różnorodnych prekursorów białkowych w obrębie szlaku wydzielniczego - hormonów, enzymów, cząsteczek sygnałowych czy czynników wzrostu, przez co regulują przebieg wielu procesów komórkowych. Jedną z szerzej rozpowszechnionych w tkankach konwertaz probiałkowych jest furyna, która pełni istotną funkcję m.in. w przebiegu embriogenezy. Obok funkcji fizjologicznych furyna może także być zaangażowana w procesy patologiczne – jej wzmożona ekspresja lub nadmierna aktywność może promować rozwój nowotworów i chorób metabolicznych. Furyna może także przyczyniać się, poprzez aktywację powierzchniowych glikoprotein wirusów i białkowych toksyn wydzielanych przez bakterie, do rozprzestrzeniania groźnych infekcji. Nie dziwi więc fakt, iż poszukiwanie inhibitorów furyny znajduje się w centrum zainteresowania naukowców. Wiele efektywnych inhibitorów, zarówno peptydowych, jak i niskocząsteczkowych zostało już odkrytych i opisanych. Wciąż jednak temat ten potrzebuje eksploracji, ponieważ ze względu na koekspresję, a także duże podobieństwo strukturalne konwertaz probiałkowych bardzo istotnym zagadnieniem jest uzyskanie odpowiedniej selektywności inhibitorów. Jedną ze ścieżek, która może doprowadzić do otrzymania inhibitorów o podwyższonej selektywności działania jest lepsze scharakteryzowanie preferencji poszczególnych kieszeni substratowych konwertaz, zwłaszcza tych oddalonych od ściślej zachowywanych ewolucyjnie kieszeni S1-S3.

Pani Monika Lewandowska-Goch podjęła się takiego właśnie zadania, w ramach realizacji swojej pracy doktorskiej próbując dokładniej określić wymogi furyny względem miejsc P5-P8 w strukturze modulatora. Doktorantka postawiła sobie za cel sprawdzenie wpływu modyfikacji tych pozycji w rozpoznanym wcześniej inhibitorze modelowym, zaprojektowanym w oparciu o strukturę jednego z białek wirusa ptasiej grypy (H5N1), którego rolą jest wiązanie się z receptorami komórek gospodarza i umożliwianie wniknięcia wirusa do ich wnętrza. Podstawienie w wybranych

pozycjach P5, P6, P7 i P8 kolejno osiemnastu aminokwasów kodowanych (oprócz cysteiny i reszt występujących w modelowym inhibitorze w pozycjach P5-P8, odpowiednio Arg, Arg, Ala i Arg), zaowocowało otrzymaniem 72 peptydów. W dodatkowych 7 związkach Doktorantka wprowadziła po dwie modyfikacje jednocześnie – w pozycjach P5 i P8 - wybranymi aminokwasami kodowanymi. Dla wszystkich tych związków w laboratorium prof. Roberta Day'a w Kanadzie przeprowadzone zostały badania kinetyki reakcji enzymatycznej katalizowanej przez furynę. Wyznaczenie stałych inhibicji K_i pozwoliło uzyskać informacje na temat znaczenia charakteru chemicznego łańcucha bocznego w pozycjach P5-P8 na efektywność działania inhibitora oraz wykazać, iż obserwowane efekty nie są addytywne. W kilkunastu kolejnych związkach Doktorantka wprowadziła w pozycje P5 i P8 aminokwasy niekodowane - zarówno o rozbudowanych hydrofobowych łańcuchach bocznych, jak i aminokwasy z szeregu D. Modyfikacje te pozwoliły na zidentyfikowanie najlepszego inhibitora ze wszystkich zaprojektowanych przez Doktorantkę, posiadającego w pozycjach P5 i P8 odpowiednio reszty L-izoleucyny i kwasu L-2-aminomasłowego, ale efektywność tego inhibitora nie była znacząco wyższa niż związku z pojedynczą modyfikacją w postaci reszty izoleucyny w pozycji P5.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, aczkolwiek niespektakularne, dostarczyły jednak nowych, niezwykle potrzebnych informacji na temat wpływu modyfikowania pozycji P5-P8 na efektywność inhibitorów furyny. Rezultaty te z pewnością mogą być w przyszłości wykorzystane przy projektowaniu nowych pochodnych. W pracy zabrakło jednak badań kinetycznych z użyciem innych niż furyna konwertaz probiałkowych. Takie badania wydają się być niezbędne w świetle przedstawionej w rozprawie hipotezy o kluczowej roli pozycji P5-P8 dla zapewnienia specyficzności nowoprojektowanych inhibitorów względem poszczególnych konwertaz. Byłabym wdzięczna za wyjaśnienie dlaczego takie badania nie zostały przeprowadzone i czy ewentualnie są planowane w przyszłości. Pewnym uzupełnieniem wykonanych przez Doktorantkę prac mogłyby być też badania strukturalne, przynajmniej dla wybranych inhibitorów. Pozwoliłyby na stwierdzenie, czy obserwowany wpływ podstawników na potencjał inhibicyjny związków nie jest związany z wprowadzanymi przez nie zmianami konformacyjnymi.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Lewandowskiej-Goch ma układ klasyczny dla prac chemicznych. Składa się z dobrze powiązanego z tematyką rozprawy wprowadzenia literaturowego (44 strony), celu pracy (3 strony), opisu wykonanych badań własnych (45 stron) oraz podsumowania (2 strony). Spis literatury cytowanej zawiera 218 pozycji uwzględniających najnowsze publikacje z czasopism o zasięgu międzynarodowym. Na końcu pracy dodano także spis tabel, schematów i rysunków ułatwiający odnajdywanie potrzebnych informacji.

W części literaturowej swojej rozprawy Doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący konwertaz probiałkowych, ich substratów i inhibitorów, a także funkcji fizjologicznych pełnionych przez te enzymy i ich zaangażowania w rozwój stanów patologicznych. Opis ten zawiera wszystkie niezbędne informacje na temat obiektu badań. W tej części pada też jednak nie

rozwinęte szerzej sformułowanie: „Jednym z rozwiązań dla tych przeciwności (czyli powstawania immunogenicznych efektów ubocznych w wyniku podawania jako leków inhibitorów białkowych) jest stosowanie terapii genowych’ (str. 43). Jest to interesująca kwestia i w związku z tym byłabym wdzięczna za krótkie dopowiedzenie, w jaki sposób można ‘oszukiwać’ układ immunologiczny, by nie reagował na produkty terapii genowej, którymi zwykle także są białka.

Przedstawione wprowadzenie literaturowe dobrze przygotowuje do rozdziału, w którym Doktorantka omawia wyniki badań własnych. Do zalet tego rozdziału należy niewątpliwie klarowność, z jaką opisano przeprowadzone prace eksperymentalne. Dzięki przedstawieniu uogólnionych procedur i późniejszym do nich odwołaniom, tekst jest zwarty, przejrzysty, łatwy do zrozumienia. Wyniki zilustrowane są przemyślanymi, poglądowymi wykresami. Dzięki wnioskowi dodawanym jako podsumowanie kolejnych etapów badań uwidacznia się logika i konsekwencja zaplanowanych badań. Chciałabym jednak w nawiązaniu do treści tego rozdziału poprosić o wyjaśnienie, z jakiego powodu w roztworach do chromatografii HPLC w pierwszym etapie oczyszczania otrzymanych peptydów stosowano jako dodatek kwas heksafluoromasłowy (HFBA) i czy zamiana TFA na HFBA przyniosła oczekiwany skutek?

Analiza rozprawy pod kątem ewentualnym błędów i usterek wskazuje, iż poddano ją dość solidnej korekcie edycyjnej. Podkreślić należałoby tu bardzo niewielką ilość tzw. literówek, czy też błędów stylistyczno-gramatycznych. Te ostatnie są najprawdopodobniej skutkiem zmiany koncepcji wyrażenia treści zdania (np. „wydaje się być metodą umożliwiającą na otrzymanie...” (str. 43); „Wyznaczenie stężenia inhibitora [...] było wyznaczone [...]” (str. 76)), czy „zmniejszenie o 50% szybkości hydrolizy substratu o 50%” (str. 86 i 93).

Do innych, mniej lub bardziej istotnych, nieprawidłowości należą m.in.:

- użycie nazwy ‘keksaza’ zamiast ‘keksyna’ (str. 18)
- dość poważne błędy na schemacie nr 7, obrazującym syntezę peptydu (str. 60), gdzie:
 1. wiązanie łączące dwie reszty aminokwasowe w peptydzie przedstawiono jako
-CO-Q-NH-,
 2. w etapie opisanym jako ‘dodanie zaktywowanego Fmoc-AA’, przedstawiono aminokwas acylujący z wolną grupą karboksylową,
 3. zdefiniowano w podpisie pod schematem ugrupowanie ‘R’ jako osłonę łańcucha bocznego, co jest nieprawidłowe w stosunku do zaprezentowanej struktury
- nieprawidłowe użycie jednostki ‘ μM ’ w opisie metodologii syntezy zaplanowanych analogów, chyba iż rzeczywiście skalę syntezy ustalano w jednostkach stężenia (str. 61)
- sformułowanie „model [...] stworzony przez Michaelisa i Mentena [...]” (str. 73), co sugerowałoby, iż został on opracowany przez dwóch panów, a nie jest to prawdą
- zapis wymiarów kolumny chromatograficznej z użyciem myślnika (np. str. 96), co sugerowałoby, iż jeden z parametrów zmieniał się w zakresie od 250 do 4,6 mm
- nazwa ‘ β -merkaptometanol’ (str. 76)

Ponadto:

- w zdaniu „Domena katalityczna (...) jest identyczna (..) na poziomie 57-70%” (str. 16) słowo ‘identyczność’ należałoby raczej zmienić na zgodność sekwencyjną.
- na str. 15 pojawiło się zdanie „Badania doprowadziły do powstania hipotezy, iż dłuższy peptyd jest prekursorem form krótszych”. Nie wątpię w prawdziwość tej hipotezy, gdyż oczywistym jest, iż w procesach degradacyjnych z dłuższych peptydów powstają krótsze. Sformułowanie to należałoby więc uznać za trywialne i jako takie usunąć z opisu przekształceń prohormonu PMC, bądź też uzupełnić o dodatkowe informacje, które pokazałyby dlaczego ta hipoteza nie jest trywialna.
- parę sformułowań jest niepotrzebnie rozbudowanych, np. „budowa strukturalna” (str. 22), czy „‘Z’ oznacza [...] łańcuch boczny odpowiadający łańcuchowi bocznemu zmienionej reszty aminokwasowej”.

Tego typu mankamenty są jednak dość nieliczne, a cała rozprawa została napisana jasno, klarownie i poddana gruntownej korekcie edycyjnej. Umiejętność wyciągania wniosków oraz pewien poziom krytycyzmu względem uzyskanych wyników świadczą o osiągnięciu przez Doktorantkę odpowiedniej do etapu kariery dojrzałości naukowej.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska 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 Lewandowskiej-Goch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ejmbowska