

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk  
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
tel.: +48-71-3757212  
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 2019-08-08

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Lubos  
zatytułowanej „Projektowanie, chemiczna synteza oraz  
badania kinetyczne peptydowych niekwalencyjnych i  
kwalencyjnych inhibitorów proteasomu”**

Inhibitory proteasomów są potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi. Jeden z nich - bortezomib, będący silnym i odwracalnym inhibitorem proteasomu 26S, jest lekiem stosowanym od szesnastu lat w leczeniu szpiczaka mnogiego. Niestety, zaobserwowano wiele niepożądanych działań ubocznych wywoływanych przez bortezomib, w tym: niedrożność jelit, małopłytkowość i neuropatię obwodową. Dlatego w wielu ośrodkach akademickich i farmaceutycznych prowadzi się intensywne badania mające na celu znalezienie nowych inhibitorów proteasomu o zwiększonej selektywności działania i poprawionych walorach farmakologicznych oraz zmniejszonej toksyczności. Szczególnie pomocne w badaniach zależności aktywności biologicznej od struktury inhibitorów proteasomu mogą być oligopeptydowe aldehydy. Są one łatwymi do zsyntezowania na nośniku stałym inhibitorami proteasomu 26S, co pozwala na uzyskanie dużej liczby analogów warunkującej dokładne określenie wpływu poszczególnych grup chemicznych na aktywność inhibitorową.

Pani mgr Marta Lubos włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem prof. Krzysztofa Rolki wykonała pracę doktorską dotyczącą projektowania, syntezy i badań kinetycznych peptydowych inhibitorów proteasomu. Niewątpliwie tematyka badawcza przedstawiona w pracy doktorskiej mgr Marty Lubos jest aktualna i ciekawa zarówno z naukowego jak i użytecznego punktu widzenia. Praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego a promotorem pomocniczym był dr hab. Dawid Dębowski.

Rozprawa doktorska mgr Marty Lubos, zawiera 150 stron i składa się z trzech zasadniczych części - *Przeglądu literaturowego* (54 strony), *Badań własnych*, w których Autorka przedstawiła cel pracy (26 stron) oraz *Wyników i dyskusji* (33 strony). W pracy zachowana jest zatem właściwa proporcja między częścią literaturową i częścią badawczą. Doktorantka przedstawiła również krótkie *Podsumowanie wyników i wnioski*, *Spis rysunków i tabel*, *Wykaz skrótów, symboli i oznaczeń* oraz *Literaturę cytowaną* (262 pozycje) a następnie zamieściła wykaz swoich publikacji (*Dorobek naukowy*). Do pracy zostały załączone streszczenia pracy w językach polskim i angielskim. Układ pracy doktorskiej mgr Marty Lubos i struktury podziału treści jest więc prawidłowe.

W *Przeglądzie literaturowym* Doktorantka zamieściła podstawowe informacje o proteosomie, jego budowie oraz różnorodnych inhibitorach. Następnie omówiła inhibitory immunoproteosomu. Rozdział ten zawiera wiele starannie dobranych informacji naukowych i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki na temat inhibitorów proteasomu oraz o umiejętności prawidłowego korzystania ze źródeł literaturowych. Tekst tego rozdziału został napisany językiem prostym, przez co będzie zrozumiały dla szerokiego grona czytelników. Rozdział ten zawiera wszystkie informacje niezbędne do wyjaśnienia celu pracy. Bardzo wysoko oceniam tą część rozprawy doktorskiej mgr Marty Lubos.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza chemiczna oraz badania aktywności dwóch grup peptydowych potencjalnych inhibitorów ludzkiego, konstytutywnego proteasomu 20S.: 40 tetrapeptydowych aldehydów i 31 analogów inhibitora trypsyny wyodrębnionego z nasion słonecznika (SFTI-1). Sekwencje tetrapeptydowych aldehydów zostały zaprojektowane w oparciu o struktury pierwszorzędowe dobrych substratów proteasomu 20S, odkrytych wcześniej przez Zespół badawczy prof. Krzysztofa Rolki. Natomiast analogi inhibitora trypsyny zostały zaprojektowane na podstawie struktury [Arg<sup>5</sup>, Lys<sup>7,8</sup>]SFTI-1, którego aktywność inhibitorową wobec proteasomu 20S została odkryta również w Zespole prof. Krzysztofa Rolki. Sekwencje peptydów zostały więc racjonalnie zaprojektowane a badania wykonane w ramach recenzowanej pracy doktorskiej stanowią konsekwentną kontynuację prac badawczych Zespołu.

Zadanie badawcze przedstawione w celu pracy wymagało przeprowadzenia wieloetapowych syntez chemicznych i szeregu dobrze przemyślanych wielokierunkowych badań, a także opanowania wielu nowoczesnych metod badawczych, takich jak: syntezy peptydów, spektrometrii mas, chromatografii i badania kinetyczne enzymów. W mojej opinii problem badawczy, którego rozwiązania podjęła się Autorka, został poprawnie sformułowany a metody badawcze były trafnie dobrane.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że badania zostały prawidłowo przeprowadzone, i fachowo opisane. Doktorantka przeprowadziła syntezy 71 peptydów, w tym 40 tetrapeptydów zawierających grupy aldehydowe na końcu C. Ponadto przeprowadziła syntezy analogów [Arg<sup>5</sup>,Lys<sup>7,8</sup>]SFTI-1, obejmujących zarówno peptydy liniowe, jak i monocykliczne (zawierające mostek disulfidowy lub wiązanie amidowe pomiędzy grupami terminalnymi) oraz bicykliczne. Były to trudne i czasochłonne syntezy, gdyż peptydy zawierały różne niebiałkowe reszty aminokwasowe, a niektóre wymagały przeprowadzenia cyklizacji.

Zsyntetyzowane peptydy poddano odpowiednim testom enzymatycznym i komórkowym. Uzyskane wyniki kinetycznych badań przeprowadzone na zsyntetyzowanych peptydach umożliwiły wskazanie najaktywniejszych inhibitorów podjednostek proteosomu  $\beta 1c$ ,  $\beta 2c$ ,  $\beta 5c$  i  $\beta 5i$  oraz inhibitorów najbardziej selektywnych. Ponadto Autorka zbadała wpływ SDS na właściwości inhibitorowe badanych peptydów. We współpracy z innymi badaczami, zbadano cytotoksyczność inhibitorów wobec prawidłowych i nowotworowych linii komórkowych oraz oddziaływanie znakowanych inhibitorów CF-41 i CF-67 z komórkami ludzkiego czerniaka.

Na podstawie różnic w aktywności biologicznej zsyntetyzowanych związków Doktorantka wyciągnęła wiele ciekawych i wartościowych wniosków dotyczących zależności działania inhibitorowego od struktury peptydów. Doktorantka wykazała się krytycznym sposobem interpretowania wyników i ostrożnym wyciąganiem wniosków, co świadczy o Jej dojrzałości badawczej.

W mojej opinii, uzyskane wyniki wykonanych badań są bardzo wartościowe i ciekawe, a cel pracy został osiągnięty. Na pochwałę zasługuje liczba, różnorodność

i wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań. Niemały jest też dorobek naukowy mgr Marty Lubos, obejmujący pięć prac badawczych, w tym jedną opublikowaną w materiałach konferencyjnych, i sześć komunikatów konferencyjnych.

Rozprawa została napisana poprawnym językiem i cechuje ją estetyczny wygląd. Znalazłem w niej tylko kilka drobnych błędów literowych i nietrafnych sformułowań. W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i wątpliwości i z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

- Na stronie 64 Doktorantka napisała, że swoje badania realizowała we współpracy z dr. hab. Dawidem Dębowskim, promotorem pomocniczym rozprawy. Proszę o przedstawienie zakresu tej współpracy oraz wyjaśnienie, jaki był udział dr. hab. Dawida Dębowskiego w przeprowadzonych badaniach. Zakładam, że syntezy wszystkich związków, ich oczyszczanie, identyfikacja oraz testy enzymatyczne zostały przeprowadzone osobiście przez mgr Martę Lubos, chociaż w opisie wszystkich eksperymentów Autorka używa formy bezosobowej.
- Autorka nie podała wydajności przeprowadzonych syntez. Nie wiadomo zatem, czy wybór sposobu syntezy był optymalny. Wskazane byłyby też podanie informacji o ewentualnych produktach ubocznych, które występowały w surowych produktach.
- Jediną eksperymentalną metodą potwierdzenia struktury otrzymanych substancji była spektrometria mas. Jednak poważne wątpliwości może budzić duża różnica między wartością  $m/z$  zmierzoną i obliczoną dla związku 69 (str. 108), gdyż wynik ten mógłby sugerować niekompletne utlenienie grup sulfhydrylowych. Dlatego konieczna jest dokładna analiza rozkładu pików izotopowych uzyskanych na wysokorozdzielczym spektrometrze mas.
- Nie jest jasne co Autorka rozumie przez "Średnią wartość  $m/z$  zidentyfikowanego jonu pseudomolekularnego  $[M+H]^+$ " oraz "Obliczoną średnią masę cząsteczkową" (Tabela 9 i 15). Z widm przedstawionych na rysunkach 53 i 63 wynika, że przedstawione w tabelach "średnie wartości  $m/z$ " zostały odczytane dla pików monoizotopowych.
- W tekście brakuje informacji o czystości peptydów poddanych testom enzymatycznym i o ich trwałości w warunkach testów biologicznych.

- Na jakiej podstawie Autorka wyciągnęła wniosek, że zsyntezowane przez Nią peptydy aldehydowe są inhibitorami kowalencyjnymi?
- Wprawdzie niewielkie słupki błędów na rys. 54-62, 67 i 70 świadczą o dużej powtarzalności wyników badań nad aktywnością inhibitorową, lecz brakuje informacji o liczbie powtórzeń (informacje takie podano tylko dla badań cytotoksyczności peptydów).

Powyższe uwagi nie podważają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją wysoką ocenę tej pracy. Większość z moich uwag należy traktować jako zagajenie do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej mgr Marty Lubos.

Biorąc pod uwagę istotne wyniki uzyskane przez Doktorantkę i bardzo dobre opanowanie syntezy pochodnych peptydów oraz interpretacji wyników badań biologicznych recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Marty Lubos zatytułowana *„Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne peptydowych niekowalencyjnych i kowalencyjnych inhibitorów proteasomu”* stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Lubos do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*2. hucan*