

### Ocena pracy doktorskiej mgr Marii Anny Smużyńskiej

#### p.t. „Badania wpływu modyfikacji cząsteczki Cystapep 1 na jej aktywność biologiczną”

Badanie zależności *struktura – aktywność* Cystapepu 1 (Z-Arg-Leu-NH-CH(iPr)-CH<sub>2</sub>-NH-Cin; gdzie Cin – *trans*-cynamoil) to w ostatniej dekadzie główny temat badawczy prof. dr. hab. Franciszka Kasprzykowskiego, promotora recenzowanej rozprawy. Ten niewielki peptydomimetyk, zaprojektowany przez F. Kasprzykowskiego na bazie centrum aktywnego ludzkiej cystatyny C, wykazuje niezmiernie interesujący profil aktywności biologicznej. Hamuje wzrost szeregu ważnych klinicznie (lekoopornych) szczepów bakterii gram-dodatnich w tym, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, a mechanizm jego działania zdaje się być odmienny od dotychczas stosowanych antybiotyków. Właściwość ta była podstawą objęcia Cystapepu 1 ochroną patentową. Pogłębione badania biologiczne prowadzone przez współpracujące z prof. Kasprzykowskim grupy biologów wykazały, że Cystapep 1 oraz jego analogi odznaczają się aktywnością antywirusową, a także hamują proces osteoklastogenezy. Badania te kontynuowała w ramach swojej doktorskiej Pani mgr Maria Smużyńska. Z uwagi na duży potencjał aplikacyjny tej grupy peptydomimetyków temat badaczy, mimo wieloletnich badań, jest w dalszym ciągu atrakcyjny, a uzyskane wyniki interesujące, poszerzające wiedzę o tej grupie związków chemicznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to prawie 200 stronic tekstu; należy więc do obszernych. Mimo, iż Autorka nie dokonała klasycznego wydzielenia trzech zasadniczych części (przeгляд literaturowy, cel pracy, badania własne), czytelnik nie ma wątpliwości, jak zakwalifikować poszczególne rozdziały. Cztery pierwsze, nie licząc spisu stosowanych skrótów, stanowią przeгляд literaturowy oraz wprowadzenie do metod stosowanych w badaniach Kandydatki (77 stron). Kolejny rozdział to cel pracy (3 strony), a następne trzy



(łącznie 103 strony) prezentują badania własne Doktorantki; ostatni to spis literatury cytowanej (158 pozycji) przygotowany w porządku alfabetycznym.

Problematyka pierwszej części rozprawy nawiązuje bezpośrednio do badań własnych Doktorantki. Znajduje się tutaj charakterystyka bakterii gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) oraz paciorkowca *Streptococcus pyogenes*. Szczególnie dużo miejsca Autorka poświęca zagadnieniom związanym z ich chorobotwórczością, w tym opisie toksyn bakteryjnych oraz wywoływanych przez nie jednostek chorobowych, a także szczepów lekoopornych. Kolejny rozdział ma charakter poglądowy i zawiera opis metod oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. W następnym omówione zostały mechanizmy oporności na leki w/w bakterii. Rozdział ten kończy się prezentacją leków stosowanych przeciwko opisywanym gatunkom bakterii. Ostatni rozdział tej części przynosi zwięzłą charakterystykę proteasomu; oprócz opisu jego budowy i specyficzności substratowej, zasadniczą część rozdziału stanowi prezentacja przykładów związków chemicznych modulujących aktywność proteolityczną tego kompleksu enzymatycznego. Treści zawarte w tej części bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w problematykę badań Doktorantki. Po jego lekturze czytelnik nie ma wątpliwości, co do celowości planowanych badań. Strona językowa nie tylko tej części rozprawy nie budzi zastrzeżeń, a korekta pracy jest staranna. Znalazłem stosunkowo niewiele potknięć językowych i niezręcznych sformułowań np. struktura konformacyjna (str. 52), zamiast „aktywność przeciwgrzybiczna” powinno być „aktywność przeciwgrzybowa” (str. 53), „mechanizm” zamiast „mechanizmie” (str. 60), razi bardzo często stosowane słowo „inhibuje”, „grupa węgiel” (str. 71). Odnoszę wrażenie, że niektóre zagadnienia zawarte w tej części rozprawy, Autorka mogła pominąć. Zostały one opisane w ogólnie dostępnych wydawnictwach książkowych. W opracowaniach takich jak rozprawa doktorska należałoby się skupić na relacjonowaniu wyników badań opisanych w pracach oryginalnych. Ta część zawiera, moim zdaniem, zbyt dużo rysunków (80). Zwykle rysunki bardzo ułatwiają lekturę tekstu, jednak, gdy jest ich nadmierna liczba, dekoncentrują czytelnika. Z części można zrezygnować, pozostałe mogłyby być większe, tym samym bardziej czytelne. Z uwag o charakterze redakcyjnym zwrócić należy na brak w wykazie skrótów wielu stosowanych w tekście. Tytuł rozprawy sugeruje, że przedmiotem badań będzie cząsteczka związku chemicznego.

Cel rozprawy został precyzyjnie sformułowany w kolejnym rozdziale. Zadaniem mgr M. Smużyńskiej była synteza i badania biologiczne dwóch serii analogów Cystapepu 1. Pierwsza zawierała modyfikacje w pozycjach 2, 3 i 5. Przesłanką do modyfikacji wprowadzanych w drugiej serii były wyniki badań biologicznych peptydomimetyków



pierwszej serii. Badania biologiczne obejmowały oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej syntetyzowanych związków wobec szczepów *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus pyogenes* oraz ich wpływu na aktywność proteolityczną ludzkiego proteasomu 20S. W tym miejscu na podkreślenie zasługuje wyjątkowo duża objętość pracy wykonanej przez Doktorantkę. W ramach rozprawy zsyntetyzowała 32 nowe związki chemiczne, a następnie określiła ich aktywność biologiczną. Drugi etap badań wykonała poza macierzystą jednostką; badania mikrobiologiczne pod kierunkiem prof. Andersa Grubba w Katedrze Chemii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Lund oraz dr. Mariusza Grinholca w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, a oznaczenie aktywności wobec proteasomu pod nadzorem dr Marii Garczyńskiej w UTHSC (San Antonio, Texas, USA). Reasumując, zadania postawione przed Kandydatką były ambitne i wymagały od Kandydatki opanowania zarówno metod nowoczesnej syntezy organicznej, jak i biologicznych.

Opis procedur syntetycznych oraz charakterystyka fizykochemiczna syntetyzowanych związków zawarta jest w kolejnym rozdziale. Do wyboru metod, jak również sposobu prowadzenia eksperymentów nie mam zastrzeżeń. Wieloletnie badania w laboratorium Promotora rozprawy nad syntezą Cystapepu 1 i jego analogami doprowadziły do optymalizacji procedur syntetycznych. Tym samym zadanie Kandydatki było łatwiejsze, co nie znaczy, że pozbawione trudności. Projektowane peptydomimetyki otrzymywała w roztworze w wyniku wieloetapowej procedury. Ta strategia syntezy obejmuje syntezę, oczyszczanie i charakterystykę fizykochemiczną (HPLC, TLC, MS, spektroskopia IR) produktów pośrednich. Jest więc czasochłonna i wymaga od eksperymentatora wysokich kwalifikacji w zakresie nowoczesnej preparatyki organicznej. Opisy zawarte w rozprawie przekonują, że mgr. Smużyńska w pełni wywiązała się z postawionego przed Nią zadania. Wszystkie eksperymenty opisane zostały bardzo skrupulatnie, dodatkowo zilustrowane zostały odpowiednimi schematami. Zainteresowany czytelnik nie powinien mieć problemów z ich powtórzeniem. Lektura tej części rozprawy dowodzi, jak ogromną pracę eksperymentalną wykonała Kandydatka. Do tej części rozprawy mam jedynie kilka uwag o charakterze redakcyjnym. Na str. 90 znajduje się zdanie „brak intensywnych sygnałów produktu świadczył o niezakończonych reakcji sprzęgania”. Prawdopodobnie chodziło o intensywność sygnałów pochodzących od produktu w relacji do intensywności sygnałów pochodzących od substratów. Na str. 99 (4 linia od dołu we wzorze chemicznym zamiast „Cin” powinno być „NAA”). Kilkakrotnie opis syntezy kończy się zdaniem „Pozostałość zadałam 50% kwasem octowym, powstały osad odsączyłam, zaś z przesączu ponownie odparowałam



rozpuszczalnik”. Jaki był cel odparowania rozpuszczalnika? W opisie 8.2.2.1 (str. 92) znajduje się informacja, że pozostałość (oleistą?) po oddestylowaniu rozpuszczalników „przemyto” eterem naftowym. Na czym polegało to przemywanie? Równie precyzyjne są opisy badań mikrobiologicznych (wyznaczenie wartości MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze i MIG – minimalne stężenie hamujące) oraz oznaczania wpływu syntetyzowanych peptydomimetyków na aktywność proteasomu. Także i w tym wypadku moje uwagi odnoszą się do strony redakcyjnej. Niefortunne jest zdanie „Aktywność peptydomimetyku określiłam za pomocą stężenia 7-amino-4-metylokumaryny.....”. W wielu miejscach między liczbą a jednostką stężenia brak jest odstępu. Numeracja rysunków i tabeli w kolejnych rozdziałach powinna być jednolita.

O dużej dojrzałości naukowej Kandydatki przekonuje treść rozdziału zatytułowanego „Omówienie wyników”. Znajduje się tu bardzo kompetentnie napisane uzasadnienie wyboru metod syntetycznych, a także doboru reagentów w zależności od sekwencji syntetyzowanego peptydu. Pewien niepokój budzi zdanie o otrzymaniu związku w postaci krystalicznej i oleistej, czego powodem miała być zbyt mała objętość dodanego rozpuszczalnika (str. 143). Na tej samej stronie znajduje się informacja, że w reakcji stosowano mieszaninę mono- i di-Boc pochodną His. Nie potwierdzają tego opisy na str. 103 i 104. Wszystkie syntetyzowane analogi Cystapepu 1 zostały przez Doktorantkę poddane badaniom mikrobiologicznym ma wybranych szczepach *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus pyogenes*. Stosując metodę seryjnych rozcieńczeń oznaczyła wartości MBC i MIC. Część z syntetyzowanych peptydomimetyków wykazała w stosowanych testach wysoką aktywność antybakteryjną. W wypadku kilku z nich (A-164, A-179 i A-192) była ona porównywalna z aktywnością związku referencyjnego – Cystapepu 1. Peptydomimetyki te zawierały w pozycji 5 resztę kwasu  $\alpha$ -fenylocynamonowego. W związku referencyjnym w pozycji tej występuje reszta kwasu *trans*-cynamonowego. To moim zdaniem najciekawszy wynik badań, wskazujący na celowość prowadzenia dalszych prób optymalizacji tej pozycji. W świetle dotychczasowych badań, struktura pierwszorzędowa Cystapepu 1 zadaje się być zbliżona do optymalnej. Sądząc po numeracji związków, liczba otrzymanych analogów tego peptydomimetyku zbliża się do dwustu. Możliwości dalszej jego modyfikacji zdają się być ograniczone, a wyniki uzyskane przez mgr Smużyńską mogą wyznaczać dalsze kierunki poszukiwań związków o działaniu, przeciwdrobnoustrojowym. Wyniki badań wpływu syntetyzowanych analogów Cystapepu 1 na aktywność ludzkiego proteasomu 20S są znacznie trudniejsze do interpretacji. Kilka analogów (szczególnie A-185, A-172) hamują chymotrypsynopodobną aktywność badanego enzymu aktywowanego siarczanem dodecyłu. Z kolei, jeden z analogów(A-155) w stężeniu



10  $\mu\text{M}$  stymuluje aktywność trypsynopodobną latentnego proteasomu. Część z badanych peptydomimetyków, w tym i Cystapep 1, wykazuje natomiast wyraźnie wyższą (już na poziomie 1  $\mu\text{M}$ ) zdolność do hamowania aktywności kaspazopodobnej. Analog A173 zdaje się być selektywnym inhibitorem tej aktywności. Wyznaczona wartość  $\text{IC}_{50}$  jest niska (na poziomie 0,05  $\mu\text{M}$ ), jednak nietypowy kształt krzywej zależności aktywności w funkcji stężenia tego peptydomimetyku (str. 164) sugeruje, aby do tego wyniku podejść z dużą dozą ostrożności. Żaden z badanych peptydomimetyków, w warunkach eksperymentu, nie ulegał proteolizie pod wpływem proteasomu. O dużej docieklivosti Doktorantki świadczą eksperymenty mające na celu określenie czy syntetyzowane peptydomimetyki oddziałują z substratami. W tym jednak wypadku, eksperymenty te uważam za niecelowe. Nie znajduję przesłanek, dla których Cystapep 1 miałby tworzyć kompleks z proteasomem (str. 169). Kandydatka podjęła także próbę określenia wpływu inhibitorów proteasomu 20S na jego aktywność proteolityczną w stosunku do drożdżowej enolazy-1. Niestety eksperymenty te, prawdopodobnie z powodu zbyt skomplikowanego, w stosunku do zastosowanych metod, modelu eksperymentalnego, nie zakończyły się sukcesem. Warunkiem powodzenia, moim zdaniem, byłoby wykorzystanie zaawansowanych metod bioinformatycznych stosowanych w analizie proteomicznej lub zastosowanie zamiast białka, modelowego (syntetycznego) peptydu zawierającego dobrze zdefiniowane miejsca proteolizy. Do tej części rozprawy mam też jedną uwagę o charakterze redakcyjnym. W języku polskim dziesiąte części oddziela się przecinkiem, a nie kropką.

Reasumując, uważam, że Kandydatka przygotowała bardzo wartościową rozprawę doktorską. Wnosząc istotny wkład w badanie zależności *struktura – aktywność* niezmiernie interesującego peptydomimetyku, jakim jest Cystapep 1. Na podkreślenie zasługuje bardzo duża objętość wykonanej przez Nią pracy eksperymentalnej. Wszystkie eksperymenty zarówno chemiczne, mikrobiologiczne i enzymatyczne wykonała samodzielnie, co dodatkowo podnosi ocenę dysertacji. Udowodniła, że jest bardzo dobrym eksperymentatorem. Moje uwagi odnoszą się głównie do strony redakcyjnej rozprawy. Dostrzeżone niedociągnięcia nie utrudniają lektury tekstu, a ich waga i liczba pozwala stwierdzić, że Kandydatka potrafi redagować teksty naukowe. Szkoda, że uzyskane wyniki nie zostały dotychczas opublikowane w postaci prac oryginalnych w czasopismach specjalistycznych. Do takich z pewnością nie należą komunikaty prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. W dołączonym wykazie dorobku naukowego Kandydatki na 6 pozycji, 3 to właśnie takie komunikaty.



Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie kryteria ustawowe – Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 roku wraz z późniejszymi zmianami oraz Rozporządzenie Ministra Edukacji Narodowej i Sportu w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 15 stycznia 2004 r., Dz. U. Nr 15, poz. 128 z dnia 3 lutego 2004 roku, z późniejszymi zmianami zawartymi w rozporządzeniu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 15 grudnia 2005 roku, Dz. U. Nr 252, poz. 2125 z dnia 22 grudnia 2005 roku) i zwyczajowe, przeto wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marii Anny Smużyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Gdańsk, dnia 16 października 2013 roku