



Warszawa, 1.12.2013 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
mail: misicka@chem.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Anny Smużyńskiej

pt.: „Badania wpływu modyfikacji cząsteczki *Cystapep 1* na jej aktywność biologiczną”

Cystatyna C (hCC) to stosunkowo małe białko (120 aminokwasów) należące do rodziny cystatyn regulujących aktywność proteinaz cysteinowych. Z powodu swoich właściwości jest szczegółowo badane w wielu ośrodkach naukowych. Wśród nich znajduje się także Katedra Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie na podstawie N-końcowego fragmentu cystatyny C, który jest zaangażowany w oddziaływanie z proteinazą, opracowano bardzo wydajny inhibitor proteinaz cysteinowych - *Cystapep 1* (Z-Arg-Leu-NH-CH(iPr)-CH₂-NH-Cin, gdzie Cin-*trans*-cynamoil). Jest to bardzo szczególny peptydomimetyk wykazujący nie tylko właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do wielu szczepów bakterii i właściwości przeciwwirusowe, ale również posiadający zdolność hamowania procesu degradacji macierzy kostnej oraz zdolność do modulowania aktywności proteasomu. Dlatego też struktura tego peptydomimetyku została opatentowana i obecnie trwają prace nad jego częściową komercjalizacją. Osobą, która zaprojektowała i otrzymała *Cystapep 1* jest promotor pracy doktorskiej mgr Marii Smużyńskiej prof. dr hab. Franciszek Kasprzykowski. Oczywiście dalsze badania nad opracowaniem nowych i aktywnych analogów tego peptydomimetyku, poznaniem elementów strukturalnych ważnych do wykazywania poszczególnych działań biologicznych i poznanie mechanizmów jego działania są cały czas prowadzone zarówno na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, jak również w jednostkach współpracujących w Szwecji i USA. Doktorantka miała więc dużo szczęścia, że jej praca doktorska dotyczyła tak ważnej i aktualnej tematyki badawczej, zarówno z poznawczego jak i utylitarne punktu widzenia.

Praca doktorska mgr Marii Smużyńskiej ma układ klasyczny dla prac chemicznych, składa się z obszernego wprowadzenia literaturowego (78 strony), celu pracy (3 strony), opisu przeprowadzonych eksperymentów (22 strony), omówienia wyników (42 strony), podsumowania (2 strony) oraz wykazu stosowanych skrótów i spisu literatury cytowanej (158 pozycje).

W części wstępnej swojej rozprawy doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący bakterii lekoopornych: gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i paciorkowca ropnego *Streptococcus pyogenes*; ich morfologię, bytowanie i chorobotwórczość. Kolejne rozdziały dotyczą omówienia metod oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemoterapeutyki oraz mechanizmów oporności na antybiotyki bakterii gronkowca i paciorkowca. Osobny rozdział dotyczy omówienia potencjalnych antybiotyków i chemoterapeutyków aktywnych przeciwko bakteriom lekoopornym, dość szumnie nazwany „przyszłość potencjalnych antybiotyków itd.” Wśród omówionych związków jest też *Cystapep 1*, myślę jednak, że zdecydowanie zbyt skromnie przez doktorantkę omówiony, np. nie są zacytowane patenty dotyczące tego związku, a których współautorem jest promotor jej pracy doktorskiej. Część literaturową kończy rozdział dotyczący inhibitorów i aktywatorów proteasomu jako potencjalnych leków.

Przedstawione wprowadzenie literaturowe jest bardzo obszerne (choć nie wiem czy nie za obszerne), ale dobrze napisane i bogato ilustrowane, świadczy też o ogromnej wiedzy doktorantki z zakresu mikrobiologii i dobrze przygotowuje do rozdziału, w którym doktorantka omawia wyniki badań mikrobiologicznych związków otrzymanych w ramach badań własnych.

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Marii Smużyńskiej było określenie wpływu modyfikacji poszczególnych fragmentów cząsteczki *Cystapep 1* na jej aktywność biologiczną. W pierwszej części swoich badań doktorantka przeprowadziła syntezy 15 peptydomimetyków zawierających modyfikacje w poszczególnych fragmentach wyjściowego związku. Zaplanowane w pierwszej fazie peptydomimetyki zawierały w miejscu reszty kwasu *trans*-cynamonowego resztę kwasu α -fenylocynamonowego, naftylooctowego oraz resztę dansylową lub ugrupowanie Fmoc, czyli ugrupowania sterycznie rozbudowane. Inne modyfikacje polegały na zamianie reszty leucyny na aminokwas zasadowy (Arg, His) i otrzymaniu związków z dwoma aminokwasami zasadowymi, co miało polepszyć rozpuszczalność otrzymywanych analogów w wodzie.

Związkiem wyjściowym do syntez zaplanowanych analogów był Boc-N-chroniony aminokwas redukowany do aminoalkoholu, przekształcany następnie w pochodną

mesylanową, umożliwiającą otrzymanie pochodnej azydkowej, z której po wodorolizie doktorantka otrzymywała odpowiednie mono N-podstawione diaminy. Ten fragment cząsteczki był następnie przedłużany o kolejne aminokwasy lub grupy. Cała synteza analogów była prowadzona w roztworze, a więc była to synteza wieloetapowa, pracochłonna, a związki chyba niełatwe do oczyszczania.

Otrzymane związki doktorantka przebadła pod kątem mikrobiologicznym na szczepach gronkowca i paciorkowca, określając dla poszczególnych związków minimalne stężenie hamujące (MIC) i bakteriobójcze (MBC) metodą seryjnych rozcieńczeń. Okazało się, że związki zawierające resztę kwasu α -fenylocynamonowego lub naftylooctowego wykazywały podwyższoną aktywność przeciwbakteryjną.

Doktorantka przebadła również wpływ otrzymanych analogów *Cystapep 1* na aktywność enzymatyczną ludzkiego proteasomu 20S, sprawdzając też czy nie są one substratami dla proteasomu. Badanie te wykonała w laboratorium dr Marii Gaczyńskiej w University of Texas w USA. Wykonała również eksperymenty trawienia drożdżowej enolazy przez ludzki proteasom w obecności różnych inhibitorów, w celu zbadania produktów proteolizy i określenie wpływu tych inhibitorów na wzorzec trawienia proteasomu 20S.

W wyniku przeprowadzonych przez doktorantkę badań okazało się, że związki posiadające w swojej sekwencji więcej niż jedną resztę zasadową wykazały silne działania modulujące proteasom, zaś związki z rozbudowanymi sterycznie resztami kwasów w miejsce kwasu *trans*-cynamonowego wykazały silne działanie przeciwbakteryjne. Stąd pojawił się pomysł syntezy nowych analogów, które posiadałyby obie te modyfikacje i przebadanie ich pod względem aktywności przeciwbakteryjnej oraz wpływu na aktywność proteasomu.

Okazało się, że wśród otrzymanych przez doktorantkę peptydomimetyków (w sumie otrzymała i przebadła 32 analogi) były związki hamujące kaspazopodobną aktywność proteasomu, co w połączeniu z wykazywaniem przez te związki aktywności przeciwbakteryjnej może stanowić bardzo interesujący punkt wyjścia do dalszych badań nad opracowaniem leku do walki z bakteriami opornymi na metycylinę (MRSA) obecnymi w szpitalnych oddziałach nowotworowych.

Pracę doktorską mgr Marii Smużyńskiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana bardzo dobrą polszczyzną, przejrzyste, jest również bogato ilustrowana rysunkami, wykresami i tabelami.

Jednak z obowiązku recenzenta chciałabym wymienić kilka zauważonych błędów i zadać pytania:

1. Określanie modyfikacji cząsteczki *Cystapept 1* jako zmiany w pozycji 2,3,5 jest mylące, bo to sugeruje zmiany aminokwasów znajdujących się w poszczególnych pozycjach, tak jak się to oznacza w analogach peptydowych. Może raczej należało miejsce zmian określić jako „fragment”, pozostawiając ogólny Rysunek A na str. 79.

2. Str. 143 „otrzymałam część diaminy w postaci kryształków chlorowodorku, a część w postaci oleistej diaminy. Spowodowane to było zbyt małą ilością dodanego przeze mnie chloroformu”? Czyżby chloroform wpływał na protonowanie grupy aminowej?

3. Str. 83 dziwny sposób zapisu gradientu używanego przy oczyszczaniu: 100%A→100%B, albo 95%A→100%

4. Str. 58 tabela 1 przedstawiająca działanie przeciwbakteryjne pochodnych fragmentu cystatyny C nie ma niestety stosownego odnośnika literaturowego

5. Str. 86 związek 8.2.1.2 jest niepełny opis syntezy, Str. 79 (cel) „peptydomimetyki z dwiema zasadowymi resztami w pozycji 2”? (Powinno być w 2 i 3)

6. Str. 87 doktorantka zmieniła płeć, bo jest „odparowałam”

Oczywiście wymienione powyżej drobne usterki nie mają wpływu na wartość naukową rozprawy i nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej opinii o tej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że zakres pracy doktorskiej mgr Marii Smużyńskiej był niezwykle szeroki. Obejmował on zarówno otrzymanie 32 niełatwych do syntezy związków, jak również przeprowadzenie badań aktywności biologicznej otrzymanych związków; w tym badań aktywności przeciwbakteryjnej i badań wpływu na aktywność proteasomu. Wszystkie te bardzo różnorodne badania wymagały od doktorantki wszechstronnego przygotowania, zarówno teoretycznego, jak i eksperymentalnego. Część badań mikrobiologicznych doktorantka wykonała w Katedrze Chemii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Lund pod opieką Andersa Grubba, część w Zakładzie diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii pod opieką dr Mariusza Grinholca, a badania dotyczące oddziaływania z proteasomem prowadziła w laboratorium dr Marii Gaczyńskiej, w University of Texas w USA. Praca w tak wielu zespołach badawczych świadczy o wielkim zaangażowaniu doktorantki w prowadzone badania, o szybkim uczeniu się nowych technik i łatwości adaptacji do nowych grup badawczych. Oczywiście staże te były możliwe dzięki promotorowi tej pracy prof. Kasprzykowskiemu, który tak wszechstronne badania zaplanował.

Również bardzo wysoko oceniam sposób prezentacji wyników i sposób prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie te umiejętności klasyfikują doktorantkę jako wszechstronnego badacza, dobrze przygotowanego do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Chciałabym również podkreślić, że doktorantka wielokrotnie prezentowała swoje wyniki na zjazdach krajowych i zagranicznych, jest również współautorką 2 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej i współtwórcą szwedzkiego zgłoszenia patentowego. To naprawdę duży dorobek zasługujący na wyróżnienie.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Marii Smużyńskiej „*Badania wpływu modyfikacji cząsteczki Cystapep 1 na jej aktywność biologiczną*” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marii Smużyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Kisiele