



UNIVERSITY OF GDAŃSK



FACULTY OF CHEMISTRY
Department of Organic Synthesis



80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18, tel. (+48 58) 523 5428, fax (+48 58) 523 5005, e-mail: adam.prahl@ug.edu.pl, www.chem.ug.edu.pl

Dr hab. Adam Prahl, prof. nadzw. UG
Kierownik Zakładu Syntezy Organicznej
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-952 Gdańsk

Gdańsk, 17.06.2013 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Rafała Łukajtisa pt. „Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania aktywności inhibitorów proteinaz serynowych”

Proteiny to grupa enzymów proteolitycznych odpowiedzialnych za hydrolizę wiązania peptydowego. Ich działanie nierozdzielnie wiąże się z funkcjonowaniem białek – to one poprzez odpowiednie przetwarzanie białek wywołują ich aktywację bądź dezaktywację przekładając to bezpośrednio na ich aktywność biologiczną. Spośród wielu istotnych funkcji, jakie proteiny pełnią w organizmie można wymienić chociażby procesy związane z aktywacją wielu bioaktywnych sekwencji, wpływ na działanie układów: immunologicznego, trawiennego, krążenia, nie wyłączając z tego układu nerwowego. Można śmiało zaryzykować stwierdzenie, że ich rola rozpoczyna się już w momencie zapłodnienia dającego początek nowemu życiu, a kończy się w procesach apoptozy, czyli naturalnych procesach zaprogramowanej śmierci komórek. Najlepiej opisaną grupą enzymów proteolitycznych są proteiny serynowe. Związane jest to zarówno z faktem, że stanowią one najliczniejszą grupę enzymów ale również z ich kluczową rolą, jaką pełnią w organizmach żywych. Dla zapewnienia pełnej kontroli procesów proteolitycznych zachodzących w naszych organizmach konieczna jest możliwość regulacji aktywności katalitycznej enzymów. W przyrodzie proces ten odbywa się przy pomocy substancji hamujących ich działanie zwanych inhibitorami. Odpowiednie manipulacje w obrębie struktury inhibitora dają możliwość potencjalnego wykorzystania go jako narzędzia diagnostycznego w badaniu procesów przebiegających z udziałem enzymów, ale także każą postrzegać tak zmodyfikowane związki jako narzędzia terapeutyczne stosowane w chorobach spowodowanych nieprawidłowym ich funkcjonowaniem.



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 18.06.2013

L.dz. 8010-WCH/IP-943/13

Przedstawiona do recenzji praca zrealizowana została w Katedrze Chemii Bioorganicznej, Wydziału Chemii UG, kierowanej przez prof. Krzysztofa Rolkę pod kierunkiem dr hab. Adama Lesnera, prof. nadzw. UG. Od wielu lat tematyka realizowana przez zespół Pana Profesora Rolki związana jest z poszukiwaniem zarówno substratów jak i inhibitorów proteinaz serynowych. Intensywne badania skutkowały dokonaniem wielu ciekawych odkryć, czego dowodem jest ogromna liczba prac naukowych opublikowanych przez grupę badawczą. Opisane w rozprawie doktorskiej badania są kontynuacją poszukiwań efektywnych i selektywnych inhibitorów proteinaz serynowych. W swojej pracy mgr Rafał Łukajtis skoncentrował się na modyfikacji struktury trzech inhibitorów pochodzenia naturalnego: SFTI-1 – wyodrębnionego z nasion słonecznika oraz OGTI i HV-BBI – wyodrębnionych z wydzielin skór płazów (żab: *Odorrana grahamsi* i *Huia versabilis*). Poprzez wprowadzenie do ich cząsteczek różnych kodowanych aminokwasów, fragmentów peptoidowych (zawierających reszty glicyny z różnie podstawionym atomem azotu) oraz pochodnymi i mimetykami proliny postanowił ocenić wpływ zaproponowanych modyfikacji na powinowactwo, selektywność, odporność proteolityczną oraz aktywność inhibitorową (wobec bydłowej α -chymotrypsyny, bydłowej β -trypsyny i innych wybranych proteinaz serynowych) tak otrzymanych analogów. Dodatkowo dzięki współpracy z dr Marcinem Sieńczykiem z Zakładu Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej, poza jednym wszystkie pozostałe analogi zostały przebadane pod kątem aktywności antydrobnoustrojowej (wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*), natomiast dzięki współpracy z dr Michałem Pikułą z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego cztery z analogów zostały przebadane pod kątem cytotoksyczności. W sumie w trakcie realizacji prac zostało zaprojektowanych, zsyntezowanych i przebadanych 45 analogów. W tym miejscu pierwsza uwaga krytyczna – ani w samej pracy ani w załącznikach nie znalazłem bezpośrednich informacji dotyczących charakterystyki otrzymanych związków.

Rozprawa doktorska mgr Rafała Łukajtisa podzielona jest na dziewięć rozdziałów poprzedzonych spisem treści i wykazem stosowanych skrótów. Tekst pracy przedstawiony jest na 137 stronach maszynopisu, opatrzonych trzydziestoma czterema rysunkami, dwudziestoma czterema tabelami (tutaj kolejna uwaga, czy też pytanie – dlaczego są one nazywane w tekście (choć nie zawsze) tablicami?). Pracę kończy rozdział zatytułowany „Wykaz literatury”, który liczy 150 pozycji. Jest on obszerny, ponieważ wszystkie zacytowane pozycje literaturowe zostały przytoczone z tytułami. Muszę przyznać, że znacznie ułatwiło mi to poruszanie się po pracy i dotarcie do kilku z nich. O ile rozdziały: (VI) „Dorobek naukowy”, (VII) „Spis rysunków”, (VIII) „Spis tablic” i wymieniony wcześniej (IX) nie wymagają komentarza chciałbym przez chwilę zatrzymać się przy czterech pozostałych. Właściwy tekst dysertacji rozpoczyna się rozdziałem

zatytułowanym „Część literaturowa” (I) obejmującym 43 strony. Jest to swego rodzaju wprowadzenie w tematykę badawczą pracy. Doktorant charakteryzuje w kolejnych podrozdziałach i podpodrozdziałach inhibitory proteinaz, mechanizmy inhibicji, peptydy o właściwościach inhibitorowych i antydrobnoustrojowych wyizolowane z płazów i wreszcie definiuje peptoidy i peptomery w kontekście planowanych syntez.

Kolejny rozdział zatytułowany „Cel pracy” (II) jest w praktyce informacją o sposobie realizacji zadań badawczych. Na sześciu stronach Doktorant dokładnie informuje jakie zabiegi w obrębie jakich peptydów zostaną przeprowadzone i jakich spodziewa się rezultatów. Opis przeprowadzonych eksperymentów i omówienie wyników zawarte są w dwóch kolejnych rozdziałach zatytułowanych odpowiednio „Badania własne” (III) i „Wyniki i dyskusja” (IV). W pierwszym z nich znajdujemy bezpośrednie odniesienie do zastosowanych technik i sposobu przeprowadzenia eksperymentów. Podzielony on został na trzy podrozdziały poświęcone odpowiednio: syntezie i oczyszczaniu związków, badaniom kinetycznym – w części tej znalazły się dokładne opisy wyznaczania równowagowych stałych asocjacji i wreszcie opisom badań biologicznych. „Wyniki i dyskusja” odnoszą się bezpośrednio do efektów uzyskanych poprzez modyfikacje wprowadzone w obrębie trzech naturalnie występujących inhibitorów. Podsumowaniem całości badań, a właściwie efektów uzyskanych w trakcie ich realizacji jest rozdział (V) „Podsumowanie i wnioski”. W rozdziale tym Pan Rafał w punktach przedstawił najważniejsze osiągnięcia swojej pracy. Niewątpliwie jednym z nich są wyniki prac uzyskane dla analogów SFTI-1. Zaprojektowanie serii analogów modyfikowanych w pozycji P_1 resztami β -aminokwasów doprowadziło do uzyskania silnych i stabilnych proteolitycznie inhibitorów bydlęcej β -trypsyny i α -chymotrypsyny. Na uwagę zasługują również wyniki badań poświęcone wpływowi charakteru reszt aminokwasowych w pozycjach P_1 i P_1' i cyklizacji tego fragmentu cząsteczki na stabilność proteolityczną analogów. Z kolei pochodne Pro wprowadzane w kluczową dla aktywności pozycję P_1' inhibitora poprawiły co prawda jego stabilność proteolityczną, spowodowały jednak zmniejszenie aktywności inhibitorowej. Zabiegi przeprowadzone w obrębie inhibitorów wyodrębnionych z wydzielin skóry zab nie doprowadziły do uzyskania związków o interesujących właściwościach.

Analizując opisane w dysertacji eksperymenty pod kątem oceny warsztatu naukowego Doktoranta należy wystawić mu wysoką notę. Pan mgr Łukajtis wykazał się jako bardzo sprawny chemik syntetyk otrzymując kilkadziesiąt, czasami skomplikowanych jeżeli chodzi o ich syntezę, związków. Z nielicznymi wyjątkami (sam wymienia je w tekście jako problematyczne syntezy) analogi zostały otrzymane z dobrymi wydajnościami (zakładam, że tak było, chociaż jak wspominałem wcześniej w pracy brak danych na ten temat) i wykorzystane do dalszych testów i

oznaczeń. Doktorant, oprócz sprawnej pracy w „mokrym” laboratorium chemicznym, dał się również poznać jako naukowiec cechujący się znajomością wielu technik analitycznych, które pozwoliły mu zweryfikować uzyskane wyniki. Na szczególną uwagę zasługuje tu znajomość spektrometrii mas, technik chromatograficznych i kinetyki enzymatycznej. Na pewno praca w doświadczonym zespole naukowym pomogła mu zdobyć wiedzę i umiejętności w tak szerokim zakresie. Nie można też nie docenić chęci poszerzenia informacji o właściwościach uzyskanych analogów o ich aktywność antydrobnoustrojową i cytotoksyczność – stąd inicjatywa współpracy z ośrodkami w Trójmieście i we Wrocławiu.

Z racji obowiązku jaki spada na recenzenta muszę wytknąć również pewne słabe strony rozprawy doktorskiej mgr Rafała Łukajtisa. O ile co do poziomu i jakości przeprowadzonych badań oraz co do wyników uzyskanych w trakcie ich realizacji nie można mieć większych zastrzeżeń, o tyle sama praca, a w szczególności jej strona edytorska pozostawia wiele do życzenia. W pracy znalazłem wiele literówek, błędów stylistycznych i interpunkcyjnych, które kontrastują z poziomem naukowym pracy. Mam wrażenie, że w trakcie przygotowywania rozprawy zabrakło czasu na staranną jej korektę. Nie zmienia to oczywiście w żaden sposób rangi i znaczenia przeprowadzonych eksperymentów, pozostawia jednak pewien niedosyt co do oceny całości. Nie będę w tym miejscu wskazywał wszystkich brakujących przecinków (choć ze względu na fakt, że dla Pana Rafała nie zawsze było oczywistym stawianie go nawet przez słowem „który” można tych braków znaleźć sporo) z obowiązku recenzenta przytoczę jednak kilka niefortunnych sformułowań:

str. 27 „W pętli cyklicznej...”

str. 33 „Jiang i współpracownicy zaproponowali zastąpienie w cząsteczce inhibitora mostka disulfidowego na mostek etylenowy oraz olefinowy.”

str. 34 „Rozmiar, czy inaczej mówiąc ilość aminokwasów niezbędnych utworzenie cząsteczki, przekłada się bezpośrednio na koszt syntezy takiego związku.”

str. 34 „Synteza chemiczna dwóch analogów SFTI-1...doprowadziła do otrzymania związków o bardzo dużej stabilności proteolitycznej, lecz mniejszej 100 krotny spadek stałej inhibicji.”

str. 35 „Badania grupy brytyjskiej doprowadziły do selekcji, która wydajnie hamowała enzymy o tej specyficzności ze stałą...”

str. 36 „Ze względu na możliwość otrzymywania na drodze syntezy chemicznej, jak i ekspresji w systemach biologicznych od połowy XXI wieku SFTI-1 leży w centrum zainteresowań wielu grup badawczych.”

str. 105 „Wyznaczając równowagowe stałe asocjacji tak otrzymanych związków (tablica 22) okazało się, że jedynie analog 44 okazał się zupełnie nieaktywny w stosunku do wszystkich trzech proteinaz.”

Dorobek naukowy mgr Rafała Łukajtisa składa się z pięciu publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych z tzw. *listy filadelfijskiej*, dwóch prac zamieszczonych w materiałach pokonferencyjnych i sześciu komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych. Wszystkie sympozja to konferencje o zasięgu międzynarodowym. Jest to dorobek znaczący i bardzo dobrze świadczący o aktywności naukowej doktoranta. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, iż publikowane i prezentowane wyniki odnoszą się bezpośrednio do efektów eksperymentów wchodzących w skład recenzowanej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr Rafała Łukajtisa spełnia wszelkie wymagania zwyczajowe i ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania mu stopnia naukowego doktora. Zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Rafała Łukajtisa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
ZAKŁADU SYNTEZY ORGANICZNEJ
Adam Prahł
Dr hab. Adam Prahł, prof. nadzw. UG