

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, 2013-06-11

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Rafała Łukajtisa
zatytułowanej: „Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania
aktywności inhibitorów proteinaz serynowych”**

Poszukiwanie analogów biologicznie aktywnych peptydów o podwyższonych walorach użytkowych znajduje się w centrum zainteresowania większości zespołów badawczych zajmujących się chemią peptydów. Zadanie to polega na odpowiednim zaprojektowaniu i syntezie nowych analogów peptydu, w których zmieniono budowę chemiczną określonych reszt aminokwasowych, skrócono łańcuchy peptydowe, albo połączono wybrane grupy chemiczne w cząsteczce peptydu w celu usztywnienia jego konformacji. Następnie zsyntezowane związki chemiczne poddaje się odpowiednim testom biologicznym w celu ustalenia zależności ich działania biologicznego od budowy chemicznej. Zazwyczaj modyfikacje struktur chemicznych peptydów polegające na podstawieniu określonej białkowej reszty aminokwasowej na inną prowadzą do obniżenia a nawet zaniku działania biologicznego, co dowodzi że Przyroda na drodze ewolucji zoptymalizowała sekwencje aktywnych peptydów. Niemniej jednak badania aktywności takich analogów mają duże znaczenie poznawcze, gdyż umożliwiają zrozumienie roli poszczególnych reszt aminokwasowych peptydu w jego działaniu biologicznym. Jednakże rywalizacja z Przyrodą w poszukiwaniu peptydowych farmaceutyków skuteczniejszych od pierwowzoru nie musi być *a priori* skazana na niepowodzenie. Współczesna chemia organiczna umożliwia syntezę aminokwasów niewystępujących w naturze, a ich wprowadzenie do cząsteczki peptydów może stworzyć nową jakość. Dlatego znane są liczne przykłady racjonalnego zaprojektowania

nowych związków chemicznych (tzw. peptydomimetyków), naśladujących peptydy w działaniu, lecz zawierające fragmenty niepeptydowe. Związki te są potencjalnymi lekami, gdyż mogą wykazywać wyższą aktywność biologiczną, stabilność proteolityczną i biodostępność od peptydowego pierwowzoru. Wieloetapowa synteza peptydomimetyków jest jednak zadaniem trudnym, możliwym do przeprowadzenia tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach syntetycznych przez fachowców posiadających duże doświadczenie i wiedzę w chemii organicznej.

Pan mgr Rafał Łukajtis wykonał pod kierunkiem dr hab. Adama Lesnera, prof. UG pracę doktorską poświęconą badaniom analogów peptydowych inhibitorów proteinaz serynowych, zawierających niebiałkowe reszty aminokwasowe. W moim przekonaniu, tematyka badawcza mgra Rafała Łukajtisa jest aktualna i wpisuje się w nurt nowoczesnych badań z zakresu syntezy i analizy peptydomimetyków. Nie bez znaczenia jest też fakt, że Doktorant pracował w świetnie wyposażonym laboratorium w Katedrze Chemii Bioorganicznej, wśród światowej sławy specjalistów zajmujących się chemią organiczną, chemią peptydów i peptydomimetyków oraz enzymologią. Mgr Rafał Łukajtis miał więc odpowiednie warunki do wykonania ambitnej pracy doktorskiej w świetnym zespole badawczym.

Rozprawa doktorska mgra Rafała Łukajtisa liczy 137 stron i składa się z tradycyjnych części: *Przeglądu literaturowego*, *Celu pracy*, *Badań własnych*, *Podsumowania i wniosków*. Zamieszczono też spis publikacji i komunikatów Doktoranta (*Dorobek naukowy*) oraz *Spis rysunków i tablic*. Rozprawę kończy *Literatura cytowana* zawierająca 248 odnośników literaturowych. W mojej opinii układ recenzowanej pracy doktorskiej spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, chociaż wskazane byłoby umieszczenie krótkiego streszczenia pracy.

W 47-stronnicowym *Przeglądzie literaturowym* Autor przedstawił podstawowe informacje o peptydowych inhibitorach proteinaz, ze szczególnym uwzględnieniem inhibitora trypsyny SFTI-1 z nasion słonecznika, oraz opisał znane peptydy antymikrobiotyczne płazów (w tym OGTI i HV-BBI). Następnie omówił metody syntezy i budowę chemiczną α - i β -peptoidów.

W przeglądzie literaturowym zawarto wszystkie informacje niezbędne do uzasadnienia *Celu pracy*, którym były badania nad nowymi analogami następujących peptydów naturalnych:

- SFTI-1 (inhibitor trypsyny wyizolowany z nasion słonecznika)
- OGTI i HV-BBI (peptydy antydrobnoustrojowe wyizolowane z wydzielin skór płazów)

Doktorant racjonalnie zaplanował struktury cyklicznych peptydów i peptydomimetyków, które zawierały niebiałkowe aminokwasy takie jak: N-podstawione pochodne β -alaniny, β - i γ -aminokwasy oraz różne analogi proliny. Otrzymanie tych związków, a zwłaszcza cyklicznych peptoidów było zadaniem trudnym, gdyż wymagało stosowania niestandardowych metod syntetycznych. Dlatego zadanie badawcze przedstawione w celu pracy wymagało doskonałego opanowania warsztatu pracy oraz szybkiego zdobycia wiedzy i doświadczenia z syntezy organicznej peptydomimetyków i ich oczyszczania. Celem tych syntez była ocena wpływu zastosowanych modyfikacji chemicznych na aktywności inhibitorowe względem wybranych proteaz. Ponadto zaplanowano badania ich stabilności proteolitycznej oraz działania cytotoksycznego i antydrobnoustrojowego na wybranych układach.

W części *Badania własne* Doktorant przedstawił ogólne metody syntezy i oczyszczania zaplanowanych peptydów. Następnie opisał stosowane metody wyznaczania równowagowych stałych asocjacji w układzie enzym - inhibitor oraz metodę badania podatności otrzymanych peptydów na hydrolizę enzymatyczną. W rozdziale tym zamieszczono też opis badań cytotoksyczności i działania antydrobnoustrojowego.

Z rozdziału *Wyniki i Dyskusja* wynika, że opisane w pracy eksperymenty zostały na ogół prawidłowo wykonane a cel rozprawy został osiągnięty. Doktorant przeprowadził syntezy 45 peptydów i peptydomimetyków będących analogami SFTI-1, OGTI lub HV-BBI. Wyniki badań enzymatycznych nad otrzymanymi związkami chemicznymi pozwoliły na wyciągnięcie szeregu interesujących wniosków, z których odnotuje najistotniejsze:

Zsyntezowane analogi SFTI-1 zawierające w pozycji P_1 reszty β -aminokwasowe lub β -peptoidowe okazały się aktywnymi inhibitorami β -trypsyny i α -chymotrypsyny,

a jednocześnie wykazywały zwiększoną odpornością na działanie proteaz. Natomiast zastąpienie tych reszt γ -aminokwasami prowadziło do zaniku aktywności inhibitorowej. Zgodnie z przewidywaniem, cyklizacja analogów SFTI-1 przez utworzenie mostka disulfidowego spowodowała wzrost stabilności proteolitycznej. Doktorant zaobserwował też spadek aktywności analogów SFTI-1 zawierających analogi strukturalne proliny w pozycji P_1' . Peptydy OGTI i HV-BBI wykazywały działanie antymikrobiotyczne wobec szczepów gronkowca złocistego. Peptyd HV-BBI silnie hamował bydlęcą β -trypsynę, natomiast OGTI okazał się jej substratem, wykazującym inhibicję czasową.

Przeprowadzona przez mgra Rafała Łukajtisa interpretacja wyników badań własnych jest na ogół prawidłowa. Z uznaniem odnoszę się do obszernej dyskusji uzyskanych rezultatów, popartej licznymi przykładami podobnych badań opisanych w literaturze naukowej. Przedstawiony w rozprawie krytyczny stosunek Doktoranta do otrzymanych wyników świadczyć może o Jego dojrzałości naukowej.

Przechodząc do oceny formalnej rozprawy, pragnę podkreślić jej estetyczny wygląd. Niestety, w manuskrypcie znalazłem dużą ilość błędów literowych, które niekiedy utrudniały jego czytanie. Należy jednak podkreślić, że błędy te nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy. W trakcie czytania rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag i wątpliwości, które z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej:

1. W tekście rozprawy nie znalazłem konkretnych informacji o wydajności otrzymanych peptydów, a zwłaszcza o ich czystości. Przedstawiony na rys. 29 chromatogram uzyskany dla OGTI (linia ciągła) może sugerować obecność wielu zanieczyszczeń towarzyszących produktowi właściwemu. W mojej opinii Doktorant powinien podać czystości związków chemicznych użytych do badań enzymatycznych i biologicznych oraz dokonać analizy chemicznej ewentualnych zanieczyszczeń. Nie można wykluczyć, że niektóre z zanieczyszczeń mogą być inhibitorami β -trypsyny, i tym samym zniekształcić wyniki badań.

2. Niewątpliwie, opracowanie wydajnej metody syntezy nowych peptamerów jest zadaniem trudnym i czasochłonnym, gdyż wymaga przeprowadzenia wielu racjonalnie zaplanowanych eksperymentów. Dlatego proszę Doktoranta o przedstawienie wyników swoich badań nad optymalizacją opracowanej metody syntezy.
3. Na stronie 64 Autor przedstawił w sposób nieprecyzyjny warunki eksperymentu HPLC: „Najczęściej stosowałem liniowy układ gradientowy 10-90% B w czasie 30 lub 40 minut, przy szybkości przepływu fazy ruchomej wynoszącym 1 do 2 mL/min oraz detekcji przy długości fali 226 nm.” W mojej opinii podawanie czasów retencji w tablicach 12, 14, 16, 18 i 20 traci sens, gdyż nieznane są rzeczywiste warunki wykonania pomiaru.
4. Poważne wątpliwości budzi przedstawiona w *Tablicy 12* duża różnica (4 Da) pomiędzy masą jonową zmierzoną dla $[\gamma\text{Phe}^5]\text{SFTI-1}$ a jej wartością obliczoną.
5. Nie jest dla mnie jasne, dlaczego Doktorant nie przeprowadził badań konformacyjnych otrzymanych substancji. Należy przypuszczać, że wyniki takich badań ułatwiłyby interpretację wpływu stosowanych modyfikacji strukturalnych na działanie biologiczne otrzymanych peptydów.

Pragnę jednak podkreślić, że powyższe pytania i uwagi nie mają charakteru zarzutów do recenzowanej rozprawy, lecz powinny być traktowane jako zagajenie do dyskusji, której oczekuję podczas obrony pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę istotne wyniki uzyskane przez Doktoranta, dobre opanowanie technik laboratoryjnych, oraz zdobycie umiejętności krytycznej interpretacji uzyskanych wyników badań, recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Na wyróżnienie zasługuje też duża ilość dobrych publikacji i komunikatów konferencyjnych, w których Rafał Łukajtis jest współautorem.

W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgra Rafała Łukajtisa zatytułowana: „Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania aktywności inhibitorów proteinaz serynowych” 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 Pana mgra Rafała Łukajtisa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. Suwank