

Prof. dr hab. Adam Prahł
Pracownia Chemii Biopolimerów
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 30.07.2015 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Ewy Pięty pt. „Spektroskopowa analiza struktur molekularnych i procesu adsorpcji fosfinowych pochodnych pirydyny, potencjalnych inhibitorów aminopeptydazy N”

Enzymy proteolityczne (proteazy) to podklasa enzymów z klasy hydrolaz, które są odpowiedzialne za proteolizę, czyli hydrolizę wiązań peptydowych. Procesy te zachodzą w komórkach żywych organizmów i związane są z trawieniem białek przyjmowanych z pokarmem bądź też degradowaniem ich szkodliwych form, które pojawiają się w komórce. Już w połowie ubiegłego stulecia wraz z postępem nauk biologicznych i biochemicznych zaczęto zdawać sobie sprawę, że enzymy proteolityczne pełnią w organizmie wiele innych, znacznie bardziej złożonych funkcji poza trawiennymi. Rozwój metod poznawczych do badania ich struktury i funkcji w komórkach pozwolił na powiązanie ich aktywności także z obróbką posttranslacyjną mającą na celu wytworzenie biologicznie czynnych form wielu białek wydzielniczych, których działanie odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu żywych organizmów. Znanych jest siedem klas proteaz. Wyodrębniono je na podstawie wykazywanego podobieństwa w sekwencjach enzymów, strukturach przestrzennych oraz specyficznościach substratowych. Zalicza się do nich proteazy: serynowe (stanowią najliczniejszą grupę związków, liczącą ponad 26000 przedstawicieli), cysteinowe, treoninowe, asparaginianowe, glutaminianowe, metaloproteazy i proteazy o nieznanym mechanizmie katalitycznym. Ze względu na kluczową rolę, jaką proteazy pełnią w organizmach niezwykle istotna jest regulacja ich aktywności. Wyróżnia się dwa podstawowe, naturalne mechanizmy kontroli funkcjonowania enzymów – aktywację zymogenów (proenzymów) oraz hamowanie ich aktywności poprzez zastosowanie selektywnie działających cząsteczek inhibitorów. Zwykle mechanizmy te są połączone kaskadowo, a kaskady proteolityczne są procesami odpowiedzialnymi za podstawowe funkcje życiowe takie jak: wzrost i różnicowanie komórek, procesy trawienne i immunologiczne, aż po programowaną śmierć. Wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu tych zależności wynikające zarówno z działania czynników zewnętrznych, jak i wewnętrznych mają zwykle poważne skutki patologiczne. W tym świetle badania dotyczące struktury i aktywności proteaz nabierają szczególnego znaczenia zarówno w zrozumieniu etiologii wielu chorób, jak i w określeniu optymalnych celów molekularnych dla nowych leków. Służyć temu może projektowanie oraz synteza aktywnych i selektywnych inhibitorów regulujących funkcjonowanie pojedynczej proteazy, ale również elementów stanowiących całość złożonych szlaków proteolitycznych. Stwarza to perspektywę zastosowania takich związków w terapii wielu chorób, takich jak: nowotworowe, układu odpornościowego, neurodegeneracyjne, ale również narzędzia w leczeniu wielu infekcji bakteryjnych,

grzybiczych i wirusowych. Globalnie temu właśnie zagadnieniu poświęcona jest przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Ewy Pięty, chociaż w samym zamyśle zaplanowane i zrealizowane badania sprowadzają się do przeprowadzenia analizy struktury oscylacyjnej i zbadania sposobów adsorpcji fosfinowych pochodnych pirydyny na różnych powierzchniach metalicznych. Przedmiotem zaplanowanych i przeprowadzonych w ramach rozprawy badań są potencjalne inhibitory jednej z metaloproteaz – aminopeptydazy N (EC 3.4.11.2) odpowiedzialnej za hydrolizę N-terminalnych, obojętnych reszt aminokwasowych. Inhibicja aminopeptydazy N zatrzymuje między innymi angiogenezę i apoptozę niektórych komórek nowotworowych. Aktywność metalozależnych proteaz związana jest z wykorzystaniem aktywowanej cząsteczki wody jako nukleofila w jednoetapowej reakcji hydrolizy – rolę aktywatora pełnią grupy funkcyjne obecne w łańcuchach bocznych reszt aminokwasowych kwasów: glutaminowego lub asparaginowego bądź też kation metalu – najczęściej Zn(II). W oparciu o założenie, że najsilniejsze oddziaływania z substratem powinny występować w stanach przejściowych całego procesu (zmniejszając w ten sposób energię jego aktywacji), zaczęto konstruować inhibitory o strukturach je przypominających. W ten sposób powstała cała gama aktywnych związków opartych o analogi zawierające w swojej strukturze atom fosforu w postaci grupy fosfoamidowej, fosfonowej lub fosfinowej, imitującej hydrolizowane wiązanie peptydowe. Później okazało się, że szczególnie aktywne są te inhibitory, dla których zaproponowane podobieństwo jest dodatkowo związane ze skompleksowaniem przez resztę fosforową kluczowego dla katalizy kationu metalu obecnego w centrum aktywnym. Wymogi te wydają się spełniać obiekty badań Pani mgr Ewy Pięty – dwie grupy nowych pochodnych: trzy α -hydroksy-fosfinotlenki difenylowe oraz trzy kwasy α -amino-fenylfosfinowe otrzymane poprzez różne ich przyłączenie do pierścienia pirydyny – odpowiednio poprzez grupę hydroksymetylową i grupę N-butyloamino-metylową lub N-benzyloamino-metylową. O ile wybór trzech, tak a nie inaczej zbudowanych α -hydroksy-fosfinotlenków wydaje się być logiczny, o tyle zastanawiają różnice w strukturze podstawników w przypadku kwasów α -amino-fenylfosfinowych. Prosiłbym o komentarz. W tym miejscu również pierwsza uwaga dotycząca pracy – nazwy związków podane w punkcie 1.1.2 nie są zgodne z ich strukturą przedstawioną na rysunkach w Tabeli 1. Błędy te są powielane w dalszej części pracy.

Praca doktorska zrealizowana została w Zakładzie Fizyki Chemicznej w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką dr hab. Edyty Proniewicz, prof. nadzw. AGH. Opracowanie obejmuje 237 stron podzielonych na 6 rozdziałów poprzedzonych spisem treści i wykazem najważniejszych skrótów i symboli. Pierwszą część pracy stanowi rozdział „Wstęp teoretyczny” poświęcony przybliżeniu tematyki i przedmiotu badań. W rozdziale tym Doktorantka, po krótkim wprowadzeniu dotyczącym aminopeptydazy N i jej fosfinowych inhibitorów, przedstawia charakterystykę związków wybranych do badań (pochodne zostały zaprojektowane i zsyntezowane we współpracy z grupą prof. Bogdana Boduszka z Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej). Następne podrozdziały poświęcone są metodom wykorzystywanym do badań: IR, RS, SERS i DFT. Kolejny rozdział „Cel rozprawy

doktorskiej” jest syntetycznym opisem zadań, jakie Doktorantka stawia przed sobą. Po nim następuje rozdział trzeci „Część eksperymentalna” poświęcony krótkim opisom dotyczącym syntezy analizowanych związków, wykonaniu obliczeń z wykorzystaniem metod DFT i pomiarów z wykorzystaniem FT-RS, FT-IR, SERS, UV-Vis i AFM. Najobszerniejszy i najistotniejszy dla całej pracy jest kolejny rozdział „Wyniki i ich dyskusja”. Obrazuje on doskonale to, co i jak zostało zaplanowane i wykonane w ramach realizacji badań. Pierwszy krok obejmował wykonanie obliczeń kwantowo-mechanicznych z wykorzystaniem metod DFT oraz analizę oscylacyjną dwóch grup związków wytypowanych do badań w oparciu o widma FT-IR i FT-RS. Następnym krokiem było określenie charakterystyki procesów adsorpcji badanych związków na odpowiednio przygotowanych warstwach metalicznych. Badania te można podzielić na dwie części. Pierwsza została zrealizowana z wykorzystaniem jako substratu metalicznego elektrochemicznie schropowaconych w cyklach oksydacyjno-redukcyjnych powierzchni elektrod wykonanych ze srebra, złota i miedzi. Ich powierzchnię przygotowaną do pomiarów zobrazowano pod kątem stopnia schropowacenia przy wykorzystaniu mikroskopii sił atomowych. Badania z wykorzystaniem elektrody Ag pozwoliły na udowodnienie znaczącego wpływu sposobu przyłączenia pierścienia pirydyny do cząsteczki na proces adsorpcji na powierzchni warstwy metalicznej (szczególnie w przypadku cząsteczek kwasów α -amino-fenylfosfinowych). Dowiodły również, że w niektórych przypadkach mechanizm przeniesienia ładunku odgrywa bardzo istotny wpływ na wzmocnienie sygnału SERS. Zastosowanie trzech różnych elektrod pozwoliło dodatkowo określić wpływ zarówno rodzaju użytego materiału, jak i wartości przyłożonego napięcia na geometrię adsorpcyjną badanych związków. Druga część badań poświęcona była procesom adsorpcji wybranych związków na nanocząstkach koloidalnego złota i srebra jako substratu metalicznego. Oprócz zbadania wpływu rodzaju materiału na różnice w mechanizmie procesów Doktorantka określiła również wpływ warunków pH roztworu na zmiany w geometrii adsorpcyjnej na powierzchni koloidalnych nanocząstek złota. Wszystkie uzyskane wyniki zostały podsumowane w piątym rozdziale pracy zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski”. Analiza widm oscylacyjnych otrzymanych przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni i spektroskopii Ramana okazała się być w dużej mierze zgodna z przewidywaniami teoretycznymi uzyskanymi w wyniku zastosowania metod DFT. W przypadku obu grup związków najstabilniejszymi formami okazały się być dimery stabilizowane przez wiązania wodorowe pomiędzy odpowiednimi grupami atomów w monomerach (w podsumowaniu na str. 194 błędnie podane jest, że wiązanie wodorowe w przypadku fosfinotlenków występuje „pomiędzy atomem H grupy α -hydroksylowej, a atomem O trzeciorzędowej fosfiny”; powinno być „tlenu fosfinotlenku” lub „tlenu grupy fosforylowej”). Przy użyciu techniki powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana Doktorantka potwierdziła, że sposób przyłączenia pierścienia pirydyny do szkieletu związku odgrywa kluczową rolę w procesach adsorpcji badanych cząsteczek, niezależnie od rodzaju zastosowanych substratów metalicznych (w tym przypadku różne typy elektrochemicznie schropowaconych elektrod lub roztworów koloidalnych). Realizacja wyznaczonych celów pozwoliła zarówno na określenie parametrów pomiarowych, które mają wpływ na zachodzące na granicy faz

roztwór/substrat metaliczny procesy adsorpcyjne, jak i poznanie ich wpływu.

Całość rozprawy opatrzona jest 136 pozycjami literaturowymi obejmującymi lata 1934-2014 (cytowane pozycje wyszczególnione są bez podania tytułów, co nieco utrudnia weryfikację poprawności zastosowania odnośników, z drugiej jednak strony ogranicza nieco objętość i tak już obszernego opracowania), 63 rysunkami i 15 tabelami (13 ponumerowanych jest w tekście, dwie zamieszczone w ostatnim rozdziale zatytułowanym „Suplement”). W opracowaniu znalazły się dodatkowo: streszczenie rozprawy, wykaz tabel, wykaz rysunków, bibliografia i spis dorobku naukowego Doktorantki. Ich układ w pracy i zamieszczenie w spisie treści nie pozwala jednoznacznie określić, czy miała to być część suplementu, czy dodatkowe elementy. W tekście powyżej zostały już wymienione pewne uwagi krytyczne i wytknięte niedociągnięcia. Z racji obowiązku jaki spoczywa na recenzencie, chciałbym ten wątek jeszcze przez chwilę rozwinąć. Całość rozprawy jest napisana poprawnym językiem i poddana dość starannej korekcie. Oczywiście w całym tekście mógłbym znaleźć wiele zdań, które napisałbym zupełnie inaczej stylistycznie, jednak styl Doktorantki jest stosowany konsekwentnie w całej pracy i z racji braku kwalifikacji językowych na odpowiednim poziomie, nie chcę poddawać ich dyskusji. Znalazłem co prawda kilka drobnych potknięć językowych, jednak nie umniejszają one w żaden sposób wartości całej pracy. To co mogłoby wpłynąć na wyższą ocenę całości, to badania aktywności inhibitorowej badanych związków, jednak Autorka dwa razy przynajmniej podkreśla w tekście, że nie było to na razie przedmiotem badań. Jeżeli miałbym mimo tego wskazać jakiś słaby element rozprawy, wskazałbym ten właśnie brak badań aktywności inhibitorowej analogów. Oczywiście muszę tutaj dodać, że bez względu na tą „niedoskonałość” (celowo i mam nadzieję, że również wymownie słowo niedoskonałość napisane w cudzysłowie) bardzo wysoko oceniam i poziom przeprowadzonych badań, i samą pracę.

Oprócz wymienionych wyżej braków i słabych stron dysertacji trzeba zauważyć i docenić ogrom pracy i wysiłku włożony przez Doktorantkę w jej powstanie. Prace łączące badania teoretyczne i eksperyment nie należą do prostych i wymagają szerokiej i różnorodnej wiedzy. Takimi umiejętnościami wykazała się w trakcie realizacji kolejnych zadań mgr Ewa Pięta. Uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej wyniki wnoszą wiele nowych informacji dotyczących zarówno struktury przestrzennej wybranych do badań analogów, jak i mechanizmów zachodzących na granicy faz substrat metaliczny/roztwór, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu warunków pomiarowych na zachodzące procesy adsorpcji.

Dorobek naukowy mgr Ewy Pięty to dziewięć publikacji w recenzowanych czasopismach naukowym z listy JCR, współautorstwo w książce i w dwóch monografiach naukowych oraz dziewięć komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych (2 z nich to wystąpienia ustne). Zdecydowaną większość stanowią konferencje międzynarodowe. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, iż publikowane i prezentowane wyniki w dużej części odnoszą się bezpośrednio do efektów eksperymentów i obliczeń wchodzących w skład recenzowanej pracy. Doktorantka uczestniczyła również w realizacji trzech (dwóch uczelnianych i jednego finansowanego przez

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego) projektów naukowych.

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr Ewy Pięty spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 17 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania Jej stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Ewy Pięty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wysoka jakość badań obejmujących rozprawę i pokaźny dorobek naukowy Doktorantki skłania mnie również do wystąpienia z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Adam Piórek