

Prof. dr hab. Jerzy Silberring
Katedra Biochemii i Neurobiologii
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej
pt. *"Designing and chemical syntheses of selective matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds"*

Dysertacja, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pana Prof. dr hab. Krzysztofa Rolki oraz Kopromotora, Pana Prof. Michaela Gütschowa i Promotora pomocniczego, Pana Dr Dawida Dębowskiego, dotyczy syntezy analogów SFTI o różnicującej selektywności dla matryptaz 1 i 2 oraz kilku proteaz serynowych (trombina, trypsyna i plazmina)

Inhibitory enzymów stanowią niezwykle ważną grupę związków, regulujących aktywność enzymów i szlaków metabolicznych w organizmach żywych. Ponadto, syntetyczne inhibitory pełnią funkcję leków, m.in. w leczeniu nadciśnienia tętniczego, hamowaniu procesów nowotworzenia, czy działaniu antybakteryjnym. Stąd zapewne biorą się zainteresowania Doktorantki taką tematyką, wynikającą też z tradycji znakomitej szkoły rozwijanej przez Prof. G. Kupryszewskiego i Jego ucznia Prof. K. Rolkę.

Rozprawa jest podsumowaniem prac, realizowanych w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki, kierowanego przez Doktorantkę. Tekst, napisany dobrym językiem angielskim, liczy ok. 170 stron i opatrzony został stosowną liczbą poglądowych rycin i tabel.

Wstęp teoretyczny oceniam jako bardzo dobry, uwzględniający w swojej treści także podstawy enzymologii. Uważam jednak, że tekst jest zbyt obszerny. Zgodnie z proporcjami w bazie MEROPS zawierającą 4000 enzymów i 700 inhibitorów, Doktorantka napisała 70 stron nt. enzymów i tylko 15 nt. inhibitorów. Jest to o tyle istotne, że celem pracy były właśnie inhibitory a nie same enzymy. Tę uwagę należy traktować jedynie w kategoriach złośliwości recenzenta, jako że materiał świetnie nadaje się na artykuł przeglądowy, co sugeruję zarówno Doktorantce jak i Promotorom. Warto podkreślić, że Doktorantka klarownie wyjaśnia pojęcia: proteinaza, peptydaza, proteaza, itd., często wprowadzające zamieszanie w nazewnictwie.

Doktorantka wykonała ogromną pracę, syntetyzując ok. 40 inhibitorów. Chętnie przedyskutuję, czy nie byłoby lepiej przygotować niewielką bibliotekę, co mogłoby, przynajmniej hipotetycznie, przyspieszyć badania. Na str. 127 Doktorantka słusznie zauważa, że związki 6 i 11 są dobrymi inhibitorami, jednak nie różnicują pomiędzy matryptazą 1 i 2.

Z ogólnego profilu inhibicji jedynie trombina "wyłamuje się" i ulega aktywacji. Nasuwa się tu hipoteza, czy czystość trombiny była sprawdzana? Może ta nieoczekiwana aktywacja wynika z obecności zanieczyszczeń komercyjnego preparatu, przy całej poprawności wykonywanych testów? Doktorantka nadmienia też (str. 122), że wystąpiły problemy z wyznaczeniem stężenia plazminy przy użyciu chromogenego substratu NPGb. Czy są alternatywne metody oznaczania stężenia plazminy i czy Doktorantka brała je ewentualnie pod uwagę?

Drobne literówki, z niejakim trudem wyszukane w tekście, pozwalam sobie wymienić poniżej:

Str. 8: "transferrin" a nie "transferrine"

Str. 99: "reversed phase" zamiast "reverse phase"

Na str. 130, w Tab. 10 trochę nieszczęśliwie oznaczono słabszą aktywację za pomocą strzałek biegnących w przeciwnych kierunkach. Zwyczajowo taki symbol oznacza zmienność działania.

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają bardzo wysokiej, merytorycznej wartości dysertacji.

Do najważniejszych osiągnięć Mgr Gitlin-Domagalskiej niewątpliwie należą:

- opracowanie i synteza szeregu analogów SFTI jako potencjalnych i selektywnych inhibitorów matryptaz 1 i 2;
- wyznaczenie istotnych parametrów kinetycznych;
- określenie stabilności tych sekwencji inhibitorowych i wykazanie, że zamiana Arg na D-Arg w pozycji P4 jest kluczowa dla uzyskania odporności na proteolizę;
- zastosowanie wybranych inhibitorów, znakowanych fluorescencyjnie, do badań *in vivo*;
- uważam, że uzyskane wyniki stanowią nowość naukową i wnoszą znaczącą wiedzę do przyszłych prac nad inhibitorami matryptaz, co może mieć potencjalne znaczenie farmakologiczne.

Należy podkreślić, że Doktorantka wykonała ogromną pracę, która wprawdzie nie przyniosła spektakularnych efektów, niemniej jednak stanowi bardzo dobry punkt wyjścia i solidne podstawy do dalszych badań. Opracowanie selektywnego inhibitora, działającego na jeden enzym nie jest sprawą prostą, o czym przekonała się m.in. firma Merck, projektując pierwszą generację inhibitorów cyklooksygenazy 2 (coxins).

Stosując się do zasady, że z faktami się nie dyskutuje, dorobek naukowy Doktorantki zwalnia mnie z obowiązku ponownego recenzowania już opublikowanych prac.

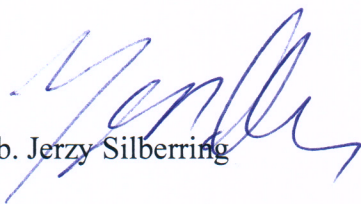
Dorobek naukowy Pani Mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej jest znaczący i obejmuje m.in.: 4 opublikowane prace w renomowanych czasopismach naukowych, 3 artykuły w materiałach konferencyjnych (międzynarodowych) oraz współudział w

bardzo dużej liczbie konferencji zarówno w formie ustnej jak i w formie posterów. Dodatkowo należy wymienić m.in. kierowanie grantem krajowym (PRELUDIUM), grantem Uniwersytetu Gdańskiego w ramach rozwoju młodych naukowców i udział w grantie NCN. Do tego należy dodać stypendia i nagrody oraz bardzo interesującą działalność organizacyjną, w tym popularyzatorską. Jest to dorobek bardzo dobry, uzyskany w okresie 4 lat i świadczy o bardzo dobrych kwalifikacjach Doktorantki oraz Jej pracowitości.

Ponownie chciałbym podkreślić ogrom pracy, włożonej w realizację tego projektu i znaczenie wyników, które są podstawą do dalszych badań a bez których nie mogło się obejść.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim i stanowi nowość naukową. Spełnione są również formalne wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011r. nr 84, poz. 455). Zatem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Mgr Agaty Gitlin-Domagalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Silberring



Kraków, 11.10.2016r.