



dr hab. inż. Marcin Sieńczyk
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
ul. Smoluchowskiego 23, p.131
50-372 Wrocław
tel. +48 71 320 36 46
fax +48 71 320 24 27

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Cypriana Kamila Norwida 4/6
50-373 Wrocław
tel. +48 71 320 24 25
fax +48 71 320 21 52

Wrocław, 10 czerwca 2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pauliny Marii Strzeleckiej pt. *Synthesis of theta-defensins analogues and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activity toward selected bacterial strains and cell lines*

(Synteza analogów teta-defensyn oraz ocena właściwości antymikrobiotycznych i cytotoksycznych zsyntetyzowanych związków wobec wybranych szczepów bakteryjnych i linii komórkowych)

Pomimo wielu lat, które upłynęły od momentu wprowadzenia do terapii pierwszych związków przeciwnowotworowych, to Nasz postęp w dziedzinie walki z nowotworami wciąż jest, niestety, znikomy. Jak zwykle natura wykazuje się ogromnym sprytem, a nowotwory okazują się być prawdziwymi mistrzami uników angażując w swoje przetrwanie nie tylko wszystkie możliwe szlaki biochemiczne komórki, lecz także umiejętnie wpływając na środowisko zewnętrzne, co zapewnia im niekontrolowany rozwój.

Wciąż jednymi z podstawowych chemoterapeutyków są interkalatory DNA oraz związki silnie alkilujące, pochodne gazów bojowych (iperytu), których biologiczne właściwości zostały odkryte, jak często bywało w historii nauki, przypadkowo. Ich stosowanie niesie jednak ze sobą występowanie dość poważnych skutków ubocznych, a sama wartość terapeutyczna niejednokrotnie pozostawia wiele do życzenia. Wprowadzane, w ostatnich latach coraz intensywniej, wysoce selektywne w działaniu przeciwciała monoklonalne, pomimo swych wielu zalet, także nie są pozbawione skutków ubocznych, a niesłychanie wysoki koszt ich produkcji sprawia, że niestety nie są powszechnie dostępne.



Każda nowa, biologicznie aktywna pochodna może więc stanowić istotny punkt wyjścia do opracowania nowej, efektywnej strategii terapeutycznej. I choć wysoce wątpliwe jest odkrycie *magicznej pigulki* zdolnej do wyleczenia wszystkich typów nowotworów, to każda, nawet najmniejsza cegiełka prowadząca do zgłębienia Naszej wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój nowotworów jest cenna. Dlatego też poszukiwanie nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych wciąż należy do największych wyzwań współczesnej nauki. W ten nurt wpisuje się także praca doktorska Pani Pauliny Marii Strzeleckiej dotycząca poszukiwania nowych, biologicznie aktywnych, peptydów czy peptydomimetyków, obszar zainteresowań także od wielu lat intensywnie eksplorowany przez Promotora niniejszej rozprawy, Profesora Adama Lesnera.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 161 stron i ma układ typowy, powszechnie przyjęty dla tego rodzaju opracowań, a została przygotowana w języku angielskim. Rozprawa składa się z sześciu głównych części (Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie) poprzedzonych wykazem najczęściej stosowanych skrótów oraz krótkim streszczeniem, także w języku polskim. Do pracy został także dodany załącznik przedstawiający opis przeprowadzonych syntez docelowych pochodnych. Doktorantka umieściła w swojej rozprawie 64 rysunki oraz 28 tabel, natomiast spis cytowanej literatury obejmuje 191 pozycje w większości z ostatnich dziesięciu lat. Do pracy dołączone zostało także oświadczenie Autorki o samodzielności jej wykonania oraz informacja na temat źródła finansowania przeprowadzonych badań. Wykaz skrótów obejmuje najważniejsze skróty użyte w pracy. Jedynym na co mógłbym zwrócić uwagę to skróty *rpm*, czyli *revolutions per minute*, a nie *rotation per minute* oraz *PBS*, czyli *phosphate-buffered saline*, a nie *phosphate saline buffer*.

Zanim jednak przejdę do analizy poszczególnych części opracowania, pozwolę sobie na kilka uwag natury ogólnej. Rozprawa doktorska Pani Pauliny Marii Strzeleckiej została bardzo starannie opracowana pod względem edytorskim i graficznym, co bardzo korzystnie wpłynęło na jej ogólny odbiór i przejrzystość zawartych w niej informacji. Niestety, język angielski budzi moje zastrzeżenia. Autorka nie ustrzegła się błędów stylistycznych, gramatycznych oraz interpunkcyjnych czy tzw. *literówek*. Niektóre zdania, ze względu na błędną konstrukcję, są trudne do zrozumienia. Przykładowo, błędnie użyto liczby mnogiej w słowie *theta-defensins analogues* – a powinno być *theta-defensin analogues*. Wydaje mi się, iż przygotowanie rozprawy w języku polskim byłoby znacznie korzystniejszym rozwiązaniem, a nie wpłynęłoby w żaden sposób na przedstawione wyniki z przeprowadzonych badań.

Pracę poprzedza krótki *Abstract* (2 strony) oraz jego tłumaczenie na język polski (2 strony). Drobną uwagę - prawidłową formą jest forma zsyntetyzowano, a nie zsyntezowano. Przegląd literatury zawarty został na zaledwie 36 stronach, na których Autorka przybliży czytelnikowi informacje dotyczące biologicznej roli tzw. obronnych peptydów gospodarza (HDP, *host defence peptides*). Autorka omawia ogromną różnorodność, zarówno strukturalną, jak i funkcjonalną



peptydów HDP pochodzących z różnych, często bardzo odległych filogenetycznie organizmów, przedstawia także podstawowe mechanizmy ich działania. Interesujące jest także zestawienie (Tabela 4) przez Autorkę peptydów czy peptydomimetyków znajdujących się obecnie w fazie badań klinicznych. Szkoda tylko, że zabrakło informacji, które firmy prowadzą owe badania. W dalszej części Autorka skupiła swoją uwagę na defensynach, szczególnie na stanowiących przedmiot dysertacji – teta-defensynach. Znajdujemy tu zarówno rys historyczny dotyczący ich odkrycia, struktury chemicznej czy przeglądu ich niezwykle interesujących właściwości biologicznych jak działanie przeciwbakteryjne czy przeciwwirusowe. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż przeciwnowotworowe właściwości teta-defensyn nie zostały dotychczas opisane w literaturze naukowej i to właśnie skłoniło Panią Paulinę Strzelecką do podjęcia się opisanych w rozprawie badań. Ten fragment przeglądu literaturowego jest bardzo interesujący, szczególnie że Autorka podejmuje się trudnego zadania jakim jest próba usystematyzowania informacji dotyczących teta-defensyn: właściwości przeciwbakteryjnych, stabilności, strategii otrzymywania czy w końcu ich utleniania do natywnej formy. Szkoda, że Autorka nie rozwinęła opisu strategii syntezy natywnej formy RTD-1 polegającej na jednoczesnej cyklizacji i utlenianiu jej prekursora.

W tym miejscu chciałbym jednak zadać Autorce kilka pytań. Czym są *nie natywne (non-native)* aminokwasy (strona 36)? Ponadto błąd występuje na Rysunku 15 przedstawiającym mechanizm tworzenia mostków disulfidowych w białkach. Kolejne podrozdziały dotyczą peptoidów i peptomerów. Jako że Autorka w części eksperymentalnej podjęła się syntezy tego typu pochodnych, zupełnie niezrozumiałe jest, dlaczego ten fragment pracy jest tak szczątkowy (około 2 strony)? Szkoda także, że opis strategii syntezy peptoidów (monomeryczny i submonomeryczny) nie został przedstawiony na schemacie. Prosiłbym także Doktorantkę o wyjaśnienie następującego zdania (strona 44): *As monomers forming a peptoid oligomer are connected through imide bonds....* Czy Autorka może wskazać wspomniane wiązania imidowe w strukturze tej klasy peptydomimetyków? Przegląd literaturowy kończy opis, niestety bardzo ogólny (nie licząc Tabeli 10 i Rysunku 19 opis nie przekracza 1 strony!), wykorzystania *host defence peptides* jako czynników przeciwnowotworowych.

Ostatni podrozdział (błędnie ponumerowany jako 1.4.1, a powinien być 1.5.1) dotyczy klasyfikacji nowotworów piersi w oparciu o poziom ekspresji różnych białek powierzchniowych. Na próżno szukać w tym miejscu uzasadnienia, dlaczego akurat ten typ nowotworu został ujęty w rozprawie. Nasuwa się także fundamentalne pytanie – dlaczego ten typ komórek nowotworowych został wybrany jako obiekt badawczy? Na to pytanie także nie znalazłem odpowiedzi w obrębie całej pracy, a argumentacja Autorki o zasadności wyboru nowotworu piersi - ponieważ występuje on często wśród kobiet, a jego biologia została dobrze poznana (strona 102) jest mało przekonująca.

Niestety, w moim odczuciu wstęp jest zbyt ogólny. Choć Autorka zaakcentowała problemy pojawiające się w syntezie teta-defensyn, to brak jest dokładnego przedstawienia sposobów wykorzystanych w syntezie choć kilku wybranych defensyn. Ponadto niezrozumiałe jest wielokrotne powtarzanie, niemalże w identycznym brzmieniu, tych samych informacji, że



defensyny mają 3 mostki disulfidowe i są cykliczne i są bardzo obiecującymi, potencjalnymi terapeutykami....

Cele pracy są jasno sprecyzowane i zgodne z tematem rozprawy (przedstawione na trzech stronach tekstu), a obejmują syntezę natywnych teta-defensyn i ich analogów, zarówno liniowych, jak i cyklicznych, zawierających jedno, centralne wiązanie disulfidowe oraz badania ich właściwości biologicznych (aktywność przeciwbakteryjna i cytotoksyczność wobec wybranych linii komórek normalnych oraz nowotworowych).

Kolejne 14 stron rozprawy stanowi rozdział *Materiały i metody*, w którym Autorka skupia swoją uwagę na opisie sposobu otrzymywania tytułowych teta-defensyn oraz ich strukturalnie uproszczonych analogów metodami syntezy na podłożu stałym, wykorzystanych metod cyklizacji łańcucha czy utleniania reszt cysteiny. W tym rozdziale Autorka przedstawiła także opis przeprowadzonych badań biologicznych – określenie wpływu otrzymanych związków na rozwój hodowli *E. coli* i *S. aureus*, ich właściwości hemolitycznych wobec ludzkich erytrocytów czy testy służące określeniu efektu cytotoksycznego wobec komórek PBMC oraz komórek zdrowych i nowotworowych. Choć do tej części rozprawy nie mam większych uwag, może poza faktem, iż nie są zbyt szczegółowe (np. dla jednych materiałów podany jest producent, dla innych już nie) chciałbym zwrócić uwagę na kilka drobnych rzeczy. Wydaje mi się, że błędnie opisano płytkę dla badań przeciwbakteryjnych (Rysunek 25) – skoro testowano 6 różnych stężeń każdego związku na 24-dołkowej płytce – w układzie przedstawionym na rysunku zmierzono jedynie 3 stężenia. Czy to oznacza, że pozostałe stężenia badano na drugiej płytce? Opis izolacji komórek PBMC mógł być nieco dokładniejszy – jest przecież kilka metod opartych o *ficoll*. Którą z nich wykorzystano? W opisie testu cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych pojawia się stwierdzenie *To deremine cell viability the absorbance of samples against background control as blank was measured*. Prosiłbym o wyjaśnienie, czym była kontrola w tym pomiarze. W opisie testu 3D określającego wpływ badanych związków na komórki nowotworowe zabrakło informacji, jakie stężenia związków użyto do testu, a jest to *de facto* rozdział *Materiały i metody*.

W tym miejscu pragnąłby zadać Autorce pytanie, dlaczego w testach mających na celu określenie wpływu otrzymanych związków na uwrażliwienie komórek nowotworowych na doksorubicynę nie wykorzystano linii MDA-MB-231-DR, czyli linii odpornej na działanie tego cytostatyku? Wydaje mi się, że mogłoby to prowadzić do uzyskania bardzo ciekawych wyników.

W opisie sposobu wykonania testów określających stabilność otrzymanych związków pojawia się stwierdzenie, że 1mg peptydu rozpuszczono w 500µl buforu PBS uzyskując stężenie około 1mM. Około? Czy nie można było przygotować dokładnie 1mM roztworów? Przecież różnią się one masą molową! Według mnie jest to istotne zaniedbanie eksperymentalne. Poza tym, jakiej dokładnie kolumny analitycznej użyto w tym miejscu w analizie HPLC?



Wyniki uzyskane w trakcie prowadzonych badań zostały przedstawione na 29 stronach rozprawy. Jako że wyniki dotyczą części chemicznej i biologicznej, ich analizę pozwoliłem sobie także rozdzielić na dwie części. Część *chemiczna* rozdziału zawiera wyniki analiz HPLC oraz MALDI-TOF dla większości z otrzymanych związków. Autorka uzasadnia także, dlaczego na skutek trudności w izolacji docelowego związku z mieszaniny poreakcyjnej porzuciła pomysł syntezy zaplanowanych peptomerów. Szkoda tylko, że nie podjęła dalszych prób rozwiązania tego problemu. Tym bardziej szkoda, że nie podjęła się syntezy pozostałych liniowych form peptomerów, które także mogły przecież wykazać ciekawe właściwości biologiczne. A może synteza pozostałych z zaplanowanych peptomerów nie nastęczałaby trudności? Poza tym Doktorantka nie wspomina, czy próbowała zastosować inne techniki separacji cyklicznego peptomeru? Ponadto dlaczego przedstawione w rozprawie chromatogramy HPLC oraz widma analizy masowej są *obcięte*?!

Sam rozdział opracowany został ciekawie pod względem edytorskim (przykładowo strony o niestandardowym rozmiarze czy jednolita kolorystyka zastosowana w przedstawieniu struktur otrzymanych związków). Nie mniej jednak Autorka nie ustrzegła się kilku niedociągnięć. Dlaczego nie przedstawiono wyników analiz (HPLC i MALDI-TOF) uzyskanych dla wszystkich związków? Mam tu na myśli komplet wyników uzyskanych dla peptydów RTD-1, RTD-2 i RTD-3. Nie pojawiają się one w żadnym miejscu rozprawy. Zawarte zostały jedynie wyniki uzyskane dla cyklicznej formy RTD-3 (widmo MS, Rysunek 28, powtórzone także na Rysunku 29!) oraz liniowej formy RTD-2 (widmo MS, Rysunek 29). Ponadto, to w jaki sposób potwierdziła, że mostki disulfidowe w docelowych peptydach mają pożądaną konfigurację (z piętnastu przecież możliwych). Autorka nie wspomina o wykonaniu jakichkolwiek badań strukturalnych w tym kierunku!

W części *biologicznej* Autorka przedstawiła wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań nad zdolnością otrzymanych analogów do hamowania wzrostu hodowli bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Przeprowadzone testy wykazały brak efektu bakteriobójczego czy bakteriostatycznego analizowanych związków. Szkoda tylko, że Autorka nie przedstawiła jakichkolwiek wyników z wykonanych badań, nawet, jeśli były one negatywne. Poza tym nie do końca rozumiem powód wyeliminowania pochodnych leucynowych otrzymanych teta-defensyn z badań mikrobiologicznych. Nawet jeśli wykazywały one ograniczoną rozpuszczalność w wodzie, można było spróbować wykonać testy w układzie woda-rozpuszczalnik organiczny (np. DMSO). Tym bardziej, że wiele spośród stosowanych współcześnie antybiotyków również wykazuje znikomą rozpuszczalność w układach wodnych, a mimo wszystko są z powodzeniem stosowane w terapii jako zawiesiny. Nie jest także w pełni zrozumiałe, dlaczego w testach określających hemolityczną aktywność otrzymanych związków przebadano wyłącznie jedną pochodną zawierającą reszty seryny w swej strukturze (pochodna 2Ser)? Także dla tej części badań nie przedstawiono żadnych wyników! W dalszej części Doktorantka przedstawiła wyniki badań cytotoksyczności zsyntetyzowanych związków wobec ludzkich komórek PBMC oraz wybranych



linii komórek ludzkiego nowotworu piersi. Choć ten fragment pracy został opracowany starannie, mam do Autorki kilka uwag. Po pierwsze, dlaczego nie podjęła próby określenia mechanizmu cytotoksycznego efektu pochodnych serylowych? Obecnie tego typu badania są wykonywane praktycznie rutynowo i nie stanowią same w sobie wyzwania naukowego, natomiast dostarczają wielu istotnych informacji. Dlaczego także Autorka nie wyznaczyła wartości stałych IC_{50} dla zbadanych związków? Pozwoliłoby to obiektywnie zweryfikować uzyskane wyniki w odniesieniu do związków opisanych już w literaturze naukowej. Ponadto jaki był powód wybrania w testach 3D stężenia $5\mu M$ dla badanych pochodnych? Nie jest także jasne, dlaczego podczas określania stężenia kontrolnego cisplatyny i doksorubicyny dla testów 3D badania wykonano w hodowli 2D? Czy nie bardziej miarodajne byłoby wykonanie tych oznaczeń także w hodowli 3D? Prosiłbym także o wyjaśnienie wyników przedstawionych na Rysunkach 50 i 51. Z danych zawartych na Rysunku 50 wynika, iż równoległe potraktowanie komórek badanymi związkami oraz cisplatiną lub doksorubicyną wskazuje na efekt synergistyczny, co jest bardzo ważną obserwacją (jedyna uwaga – dlaczego na żadnym ze zdjęć mikroskopowych nie przedstawiono skali lub powiększenia?). Natomiast analiza danych zawartych na Rysunku 51 wskazuje, że podawanie otrzymanych analogów teta-defensyn ma działanie odwrotne i wyraźnie zmniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na działanie cisplatyny czy doksorubicyny! Dlaczego? Liczę, iż Doktorantka ustosunkuje się do powyższych uwag.

Pracę kończą dwa rozdziały poświęcone dyskusji uzyskanych wyników (8 stron) oraz krótkim, dwustronicowym podsumowaniem. Poza wspomnianymi wcześniej uwagami dotyczącymi języka, nie mam do tej części żadnych uwag. Autorka prawidłowo analizuje uzyskane wyniki i odnosi je do danych literaturowych, co wskazuje na dobrą orientację w tematyce przedmiotu. Pozwolę sobie jednak na drobne wskazówki. Warto rozważyć zbadanie wpływu glutationu na strukturę otrzymanych związków, szczególnie z uwagi na fakt występowania silnie redukujących warunków w nowotworach. Czy w środowisku redukującym (np. fizjologicznym stężeniu glutationu) struktura związków, a konkretnie istotnego z punktu widzenia ich aktywności biologicznej mostku disulfidowego, będzie zachowana?

W jednym miejscu Autorka opisuje bardzo ciekawe narzędzie *in silico* pomagające w analizie sekwencji peptydów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej (Chen *i wsp.*, Oncotarget, 2016). Czy Doktorantka spróbowała użyć tego programu w celu analizy zszyntetyzowanych związków? Byłaby to interesująca weryfikacja potencjalnych możliwości analizy *in silico* z uzyskanymi badaniami biologicznymi.

Do pracy dołączony został także załącznik (37 stron), w którym Autorka dokładnie opisała, w moim odczuciu nazbyt dokładnie, przeprowadzone syntezy. Nie widzę sensu zamieszczania w formie tabelki każdego z użytych aminokwasów czy reagentów. Z powodzeniem wystarczyłby sam opis poszczególnych typów przeprowadzonych reakcji. Tym bardziej, że w każdej tabeli znajduje się błąd (powtórzone reszty aminokwasów), prawdopodobnie wynikający z formatowania



tekstu. Ponadto dla niektórych pochodnych zabrakło informacji o wydajności reakcji. Błąd występuje także na Rysunku 64 przedstawiającym struktury chemiczne NPhe i Mlle!

Chciałbym podkreślić, iż powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny, a występujące w pracy błędy czy niedociągnięcia w żaden sposób nie wpływają na moją ocenę jej wartości naukowej. Pani Paulina Strzelecka jest współautorką jednej publikacji z tzw. *listy filadelfijskiej* (Biopolymers, 2013) oraz współautorką dziesięciu doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym, jak i zagranicznym. Wyniki jej badań zostały także zawarte w materiałach pokonferencyjnych. Na uwagę zasługuje także fakt uzyskania przez Autorkę prestiżowego Diamentowego Grantu, który sfinansował przeprowadzone badania naukowe.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Marii Strzeleckiej spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Jednocześnie wnioskuję o jej przyjęcie i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.