



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ

ul. Joliot-Curie 14a, pok. 3.12
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 27 65

www.chembiolab.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Artur Krężel
Zakład Chemii Biologicznej
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 08.07.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Hałdys pt. „Tiosemikarbazony jako inhibitory tyrozynazy”

Praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Hałdys została wykonana pod kierunkiem dr hab. prof. P.Wr. Rafała Latajki w Katedrze Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Tematem rozprawy jest analiza wpływu sporej grupy tiosemikarbazonów o różnej budowie chemicznej na aktywność enzymatyczną tyrozynazy. Praca nad inhibitorami tyrozynazy stanowi kontynuację wieloletnich już badań profesora Latajki. Opracowanie skutecznych inhibitorów tego enzymu jest istotne z punktu widzenia przemysłu kosmetycznego i spożywczego, gdyż zapobiega hiperpigmentacji skóry i włosów oraz niepożądanemu barwieniu się produktów spożywczych w wyniku działania grzybów i roślin.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska licząca 131 stron napisana w języku angielskim i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wstęp będący przeglądem literaturowym, cel pracy, część: materiały i metody, rezultaty i dyskusję, konkluzje oraz spis literatury. Spis ten obejmuje 199 pozycji, które zostały w przeważającej części opublikowane w ostatnim 20-leciu. Do pracy dołączony jest spis używanych skrótów, lista 34 ilustracji i 9 tabel, które znalazły się w rozprawie, a także lista osiągnięć naukowych obejmująca opublikowane artykuły, prezentacje konferencyjne, staże oraz informację o finansowaniu badań oraz odbytego stażu.

Wstęp pracy liczący 35 stron został napisany dość zwięźle i posiada najważniejsze informacje poświęcone tyrozinazom jej substratom oraz inhibitorom. Można tu w szczególności znaleźć informacje o rozpowszechnieniu tyrozinaz, jej aktywności katalitycznej oraz strukturze, a także przegląd substratów. Szczególnie ciekawy jest rozdział poświęcony przejściom pomiędzy stanami redoks poszczególnych form katalitycznych tyrozinazy. Spora część wstępu poświęcona jest melaninie, grupie naturalnych pigmentów biorących udział w ochronie materiału genetycznego znajdującej się w komórkach skóry, w której syntezie bierze udział tyrozinaza. Najwięcej wysiłku Autorka poświęciła jednak inhibitorom tyrozinaz znajdującym szerokie zastosowanie w przemyśle. Doktorantka skrupulatnie przedstawia i krótko charakteryzuje inhibitory pochodzące ze źródeł naturalnych jak i te otrzymane syntetycznie. W szczególności omówione są tu tiosemikarbazony, będące tematem rozprawy. Doktorantka jasno opisuje tu relację pomiędzy strukturą a aktywnością przebadanych dotąd inhibitorów i jasno wskazuje na grupę arylowych tiosemikarbazonów jako grupy o największym potencjalnie hamującym aktywność tyrozinazy. Wskazówka ta jest *de facto* punktem wyjścia do celu pracy obejmującego izolację i oczyszczanie tyrozinazy z pieczarki dwuzarodnikowej, przeskanowanie właściwości inhibitorowych grupy 53 tiosemikarbazonów, a następnie dokładną charakterystykę enzymatyczną względem wybranych związków. Cel pracy obejmuje również charakterystykę kompleksu enzym-inhibitor z zastosowaniem metod obliczeniowych oraz porównanie właściwości hamujących aktywność tiosemikarbazonów w wybranej linii komórkowej B16F10.

Część metodyczna pracy obejmuje materiały i metody używane podczas realizacji pracy eksperymentalnej oraz obliczeniowej. W części tej znajdują się również wzory strukturalne wszystkich 53 pochodnych tiosemikarbazonu testowane w trakcie realizacji projektu. Sam rozdział jest przygotowany poprawnie i zawiera liczne szczegóły przydatne w powtórzeniach eksperymentów. Jednakże, zawiera on liczne błędy edytorskie we wzorach czy skrótach. Doktorantka naprzemiennie stosuje brytyjskie i amerykańskie formy zapisów jednostek itp. Poza tym jest kilka rzeczy, które wymagają komentarza jak np. stosowanie buforu Tris-HCl o pH 6,8, brak informacji o rozpuszczalności badanych związków w buforze czy dostosowanie czułości używanych aparatów względem stosowanych stężeń inhibitorów. Zdecydowanie przy czytaniu wieloetapowego opisu

izolacji tyrozynazy przydałby się choćby uproszczony schemat postępowania. Dlaczego przy wyznaczaniu stałych hamowania (rozdział 4.2.4.2) nie było stosowane podejście numeryczne a jedynie graficzne?

Rozdział rezultaty i dyskusja, tak jak przystało na pracę eksperymentalną, to najobszerniejszy z rozdziałów rozprawy. Ta część pracy przedstawia krok po kroku wyniki dotyczące izolacji tyrozynazy, jej charakterystyki aktywności oraz porównanie do danych literaturowych. Następnie Autorka prezentuje zależność stężeniową poszczególnych tiosemikarbazonów na aktywność tyrozynazy. Dopiero w tym miejscu czytelnik dowiaduje się jakie były stosowane stężenia poszczególnych związków. Niejasne jest również dlaczego poszczególne składowe Rysunku 20 zawierają różne zakresy stężeń tiosemikarbazonów. Czy wynika to z rozpuszczalności inhibitorów czy stałej hamowania? Jednym z ciekawszych rozdziałów rozprawy jest następująca dyskusja na temat relacji pomiędzy strukturą badanych związków a ich aktywnością inhibitorową. W rozdziale tym Autorka skrupulatnie analizuje wpływ poszczególnych podstawników oraz ich pozycji na właściwości hamujące tyrozynazę. Podsumowaniem tej ciekawa dyskusji jest schemat przedstawiony na Rysunku 22, w którym bardzo przejrzycie zostały zaprezentowane poszczególne wpływy podstawników w pozycjach R¹, R² i R³.

W kolejnych rozdziałach, zgodnie z celami pracy, Autorka umieszcza wyniki badań kinetycznych przeprowadzonych dla wybranych inhibitorów obejmujące stałe hamowania oraz typ inhibicji. Jako punkt wyjścia wybrano związki, dla których wartości IC₅₀ były niższe niż 50 μM. Podobnie jak poprzednio, Autorka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników opierając się na budowie chemicznej inhibitorów dzieląc ją na tiosemikarbazony halogenowe, pochodne acetofenonu oraz resztę związków (związki 11, 47 i 51). Bardzo ciekawym uzupełnieniem uzyskanych rezultatów i przeprowadzonych analiz relacji typu struktura-aktywność są wyniki dokowania molekularnego związków 1-53 do miejsca aktywnego tyrozynazy z pieczarki dwuzarodnikowej (PDB: 2y9x). Na podstawie przeprowadzonych obliczeń Autorka wskazuje na szereg oddziaływań, które stabilizują kompleks enzym-inhibitor. Bardzo proszę by Doktorantka podczas swojej prezentacji mogła odnieść się do tych wyników porównując je z danymi kinetycznym uzyskanymi na drugim etapie badań, a dokładniej do wskazanego typu inhibicji. Czy oddziaływanie miedź-inhibitor można zaszeregować

do konkretnego typu inhibicji? Jeśli tak, to czy można coś powiedzieć o preferencji inhibitora względem stopnia utlenienia metalu?

Ostatnia część badań przeprowadzona we współpracy z dr hab. Joanną Rossowską z IITD PAN to wpływ badanych tiosemikarbazonów na proces hamowania produkcji melaniny w mysich komórkach B16-F10. Linia ta charakteryzuje się normalną biosyntezą melaniny, która wydzielana jest do medium zabarwiając je i stanowi tym samym dobry obiekt badań procesów hamowania produkcji tego pigmentu. Testy komórkowe zostały przeprowadzone dla wszystkich związków. Tu pytanie dlaczego nie dla wyselekcjonowanej grupy? Same badania obejmowały wyznaczenie dwóch najważniejszych wartości IC_{50} proliferacji komórkowej i IC_{50} produkcji melaniny. Stosunek obu wartości przedstawiony na Rysunku 33 w trafny sposób przedstawia wpływ badanych tiosemikarbazonów na efektywność produkcji melaniny uwzględniając czynnik cytotoksyczności. Spośród całej grupy inhibitorów to związki 2, 4-7, 10 oraz 33 charakteryzowały się najwyższym poziomem inhibicji. Poza ostatnim, są to benzaldehydowe pochodne w pozycji R^2 . Jednakże najwyższą wartością inhibicji charakteryzował się związek 33 będący tiosemikarbazonem z podstawnikiem 4-fluoroacetophenonowym w pozycji R^1 i grupą metylową w R^2 . Związek ten w konkluzji pracy został wskazany jako inhibitor o największym potencjale hamującym aktywność tyrozynazy i najmniejszej toksyczności.

Rozprawę wieńczą syntetyczne konkluzje, w których Doktorantka podsumowuje zwięźle najważniejsze osiągnięcia oraz konkluzje wynikające z przeprowadzonych badań. Rozdział ten napisany jest jasno i świadczy o dojrzałości badawczej Autorki.

Poza uwagami umieszczonymi wyżej, nie mam zasadniczych zastrzeżeń do recenzowanej rozprawy. Pracę czyta się z przyjemnością mimo, że opisuje ona niełatwe w realizacji i prezentacji badania biochemiczne. Zdecydowanym atutem rozprawy jest jej długość, która wpisuje się w dobre standardy prac doktorskich i stanowi ulgę dla recenzentów. Cała rozprawa napisana jest poprawnym językiem angielskim choć Autorka nie uniknęła pewnych błędów gramatycznych i zwyczajowych. Zaprezentowane ryciny i tabele wykonane są ze starannością choć ich opisy mogły by być obszerniejsze. Miejscami brak jest w nich odpowiednich odnośników literaturowych cytowanych w głównym tekście. Część ilustracji jak Rysunki 17-19, 23-27 posiada mało precyzyjne osie x i y.

Z obowiązku recenzenta chciałbym aby Doktorantka ustosunkowała się jeszcze do następujących zagadnień:

- 1) Na Rysunku 20, Autorka przedstawia spadek aktywności tyrozynazy w zależności od stężeń inhibitora. Dlaczego współczynniki nachylenia różnią się i czy można je pogrupować względem budowy chemicznej inhibitora?
- 2) Czy istnieje wyjaśnienie różnic powinowactwa enzym-substrat oraz stereospecyficzności substratowej pomiędzy tyrozynazami z różnych organizmów?
- 3) Badania Doktorantki wskazują, że podstawniki w pozycjach R¹, R² i R³ tiosemikarbazonów mają różny wpływ na typ inhibicji oraz samą stałą inhibicji. Czy na podstawie przeprowadzonych badań, Autorka widzi możliwość zaprojektowania kolejnej grupy inhibitorów o jeszcze lepszych właściwościach hamujących aktywność tyrozynaz?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Katarzyny Hałdys spełnia wymogi ustawowe, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Hałdys do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

