

dr hab. Michał Sobkowski, prof. ICHB PAN
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Poznań, 28.06.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej pt. „Synteza i aktywność fosfonowych inhibitorów kinazy polifosforanowej 2”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej dotyczy badań kwasów fosfonowych w kontekście ich zdolności do hamowania aktywności kinaz polifosforanowych, ze szczególnym uwzględnieniem kinazy polifosforanowej 2 (PPK2). Ponieważ enzym ten jest charakterystyczny prawie wyłącznie dla prokariotów, jego skuteczne i specyficzne zablokowanie może pozwolić na selektywne zwalczanie groźnych drobnoustrojów patogennych. Praca ma charakter interdyscyplinarny, łącząc zaawansowaną syntezę chemiczną z badaniami biochemicznymi nad efektywnością uzyskanych związków.

Rozprawa została napisana w języku polskim pod kierunkiem prof. dr. hab. Artura Muchy. Liczy 169 stron i składa się z obszernego przeglądu literaturowego zatytułowanego „Wstęp”, zwięzłego przedstawienia celu pracy, opisu uzyskanych wyników wraz z dyskusją, które kończy podsumowanie, części eksperymentalnej i spisu odnośników literaturowych, liczącego aż 260 pozycji. Pracę uzupełnia lista używanych skrótów, streszczenia w języku angielskim i polskim oraz zestawienie publikacji własnych autorki. Podczas lektury zwraca uwagę staranność językowa i bardzo mała liczba anglicyzmów, niezręcznych sformułowań i błędów interpunkcyjnych. Praca jest też starannie przygotowana od strony redakcyjnej i technicznej.

Część literaturowa składa się z 3 podrozdziałów. Na początku autorka wprowadza czytelnika w tematykę roli polifosforanów w organizmach eukariotycznych i prokariotycznych. Zwraca tu uwagę ich wszechobecność oraz w jak różny sposób ten typ związków jest wykorzystywany w omawianych domenach. W największym skrócie, polifosforany są regulatorami i przekaźnikami sygnałów w mitochondriach, wpływają na aktywność komórek nerwowych, biorą udział w krzepnięciu krwi, mineralizacji kości i proliferacji fibroblastów. Wykazują również działanie przeciwnowotworowe. U bakterii polifosforany pełnią istotną rolę w przekazywaniu sygnałów między komórkami (tzw. *quorum sensing*), umożliwiając im wytworzenie biofilmu. Zwiększają wirulencję i ruchliwość patogenów oraz są w różnorodny sposób zaangażowane w regulację ekspresji genów w odpowiedzi na stres. Drugim zagadnieniem tematycznym omówionym w części literaturowej są enzymy zaangażowane w syntezę i degradację polifosforanów nieorganicznych. Przedstawione są tu katalizowane reakcje, zagadnienia strukturalne i inhibitory kinaz polifosforanowych 1 i 2, a także podstawowe informacje o kinazach polifosforanowych 3 oraz egzo- i endopolifosfatazach. Wreszcie doktorantka przechodzi do opisanie wybranych związków fosforoorganicznych zdolnych do hamowania aktywności enzymów, skupiając się na inhibitorach transferaz, hydroliz i ligaz, zwłaszcza tych, które mają znaczenie kliniczne. Autorka wskazuje 5 klas takich związków: kwasy fosfonowe, bisfosfonowe i fosfinowe oraz fosfoniany diarylowe i kwasy fosfonowe jako elementy peptydów. Zwraca tu uwagę, że większość z zaprezentowanych związków aktywnych biologicznie zawiera atom azotu w pozycji α lub β i takiego właśnie typu związki stanowią będą główną część badań własnych doktorantki.

Podsumowując ten rozdział, doktorantka dokonała prawidłowego wyboru tematyki, którą należy przedstawić czytelnikowi w części wstępnej. Opisane zagadnienia są oparte o obszerny materiał źródłowy, który stanowi ponad 200 pozycji literaturowych, z czego – co należy podkreślić – ponad 1/3 stanowią publikacje z ostatniej dekady. Przedstawiony jest więc bardzo aktualny obraz stanu wiedzy w omawianych zagadnieniach.

Doktorantka nie ustrzegła się jednak w tej części od pewnych niedociągnięć i skrótów myślowych, które warto wyjaśnić podczas publicznej obrony:

1. Na s. 19, pisząc o krzepnięciu krwi, doktorantka wskazuje udział w tym procesie polifosforanu pochodzenia bakteryjnego. Proszę o kilka słów wyjaśnienia, skąd we krwi bierze się polifosforan o takim pochodzeniu.
2. Rys. 2 na s. 20 przedstawia schematycznie udział poliP w krzepnięciu krwi. Rysunek zawiera szereg nieobjaśnionych symboli i różnokolorowych elementów. Niejasne jest, w których miejscach pojawia się poliP i jaka jest jego rola (np. czerwony kontur 2.A.1 i szary 2.B). Prosiłbym o zaprezentowanie tych ilustracji z dokładniejszym objaśnieniem. Analogiczna sytuacja ma miejsce na rys. 3 na s. 23 – całkowicie pominięto opis znaczenia przedstawionych elementów.
3. Na s. 24 doktorantka pisze, że „tworzenie biofilmu wpływa pozytywnie nie tylko na kondycję bakterii, ale także na potencjał proliferacyjny bakteriofagów”. Wydaje się, że jest to sprzeczność – rozwój bakteriofagów jest przecież dla bakterii zjawiskiem negatywnym. Proszę o wyjaśnienie.
4. Na s. 40 doktorantka pisze „PPK1 występuje u wszystkich zbadanych dotąd gatunków bakterii [135]”. W przypisie tym nie znalazłem jednak takiej informacji; ponadto jest to praca sprzed 20 lat, więc określenie „dotąd” jest niezbyt szczęśliwe.
5. Rys. 4, 6 i 7 prezentujące struktury enzymów dyskutowane w pracy nie zawierają żadnych opisów elementów strukturalnych. W tekście doktorantka omawia szczegółowo różne domeny, motywy, moduły, reszty aminokwasowe i inne elementy tych enzymów, a czytelnik nie ma żadnego odniesienia, gdzie szukać tych elementów na ilustracjach. Prosiłbym o zaprezentowanie tych ilustracji wraz ze wskazaniem lokalizacji elementów strukturalnych opisanych w pracy (rys. 4 vs opis na s. 41; rys. 6 i 7 vs opisy na s. 46-47).
6. Na s. 58 doktorantka pisze „Tetraedryczna geometria atomu fosforu decyduje o tym, że związki zawierające motyw N-C-P bardzo dobrze naśladują wysokoenergetyczne analogi stanu przejściowego reakcji hydrolizy wiązania amidowego lub estrowego”. Tu aż prosi się o ilustrację porównującą te elementy, mam nadzieję na zobaczenie jej podczas obrony.

Część pracy przedstawiająca wyniki własne jest skonstruowana prawidłowo, z logicznym ciągiem przyczynowo-skutkowym prowadzącym od opartego na eksperymentach wyboru obiektów badawczych i technik analitycznych, przez badania wstępne i zaprojektowanie na ich podstawie nowych związków, po ich syntezę (o ile okazała się możliwa) i badania biochemiczne.

Do badań wstępnych doktorantka wytypowała ponad 20 związków z zasobów własnych zakładu i użyła ich jako inhibitorów 8 enzymów należących do 3 klas kinaz katalizujących fosforylację nukleotydów (PPK2), klasa 1: NDP → NTP, klasa 2: NMP → NDP i klasa 3: NMP → NTP. Stwierdziła, że dwie metody badania ich aktywności – wysoce wydajna technika pomiaru rozpraszania światła oraz analiza spektrofotometryczna kaskadowej reakcji enzymatycznej w wielu przypadkach okazały się zawodne. Natomiast analiza mieszaniny reakcyjnej za pomocą HPLC była uniwersalna i powtarzalna; z tej przyczyny metoda ta stosowana była w dalszych badaniach. Na podstawie uzyskanych wyników własnych oraz analizy struktur krystalograficznych kompleksów enzym-inhibitor doktorantka przyjęła jako obiecujący związek wyjściowy kwas α -aminometylenobisfosfonowy z podstawnikiem 3,5-dichlorofenylovym na grupie aminowej (zw. **37d**). Analizując jego ułożenie w kompleksie z enzymem zaprojektowała cząsteczki sześciu nowych kwasów fosfonowych, które powinny efektywniej wiązać się z badanymi kinazami. Podjęte próby ich syntezy zakończyły się sukcesem w połowie przypadków – doktorantce udało się otrzymać 3 kwasy α -aminometylenobisfosfonowe niosące grupę aminową, aminometylową i guanidynową w pozycji meta podstawnika fenylowego, natomiast niepowodzeniem zakończyły się wszelkie podejścia syntetyczne mające na celu otrzymanie analogów kwasu **37d**, w których grupa α -aminowa zastąpiona była grupą metylenową. Zbiór związków do badań enzymatycznych doktorantka poszerzyła do łącznie 50 kwasów fosfonowych, z których 12 otrzymała samodzielnie, a pozostałe pochodziły z zasobów zakładu. Enzymami modelowymi były dwie kinazy – ChPPK2 (jedna z badanych we wcześniejszych etapach i najlepiej poznana strukturalnie kinaza PPK2 klasy 3), a także

*Ec*PPK1, enzym katalizujący wydłużanie łańcucha polifosforanu kosztem ATP, a więc o działaniu odwrotnym do PPK2. Zbadanie dwóch typów kinaz polifosforanowych o przeciwnym działaniu miało na cel ustalenie specyficzności badanych inhibitorów.

Pomimo analizy biochemicznej tak dużej liczby związków, w tym o zaprojektowanej budowie, w żadnym przypadku nie udało się uzyskać stopnia inhibicji, który można by określić mianem przełomowego. Nie jest to jednak w żadnej mierze zarzut odnośnie wartości pracy – taki wynik to raczej standard w tego typu badaniach. Tym niemniej nie sposób nie zauważyć, że niektóre ze zbadanych kwasów fosfonowych wykazują niezłą aktywność inhibicyjną z IC_{50} poniżej 100 μ M. Co więcej, do grupy tej należą dwa z trzech zaprojektowanych kwasów α -aminometylenobisfosfonowych, a spośród nich szczególnie interesujący wydaje się być związek **37m** (zawierający podstawnik *m*-anilinowy), który jako jedyny ze zbadanego zestawu jest dobrym inhibitorem zarówno PPK2, jak i PPK1.

Podobnie jak w przeglądzie literaturowym, także w niniejszej części napotkałem na kilka rzeczy wymagających wyjaśnienia:

1. W podrozdziale opisującym badania spektrofotometryczne reakcji enzymatycznych (s. 74-75) doktorantka pisze: „...niezbędne było przygotowanie stosunkowo dużej liczby próbek – z inhibitorami oraz wszystkimi trzema enzymami (PPK2, PK oraz G6PD lub PPK2, HK i LDH), jak również kontroli: bez inhibitorów, a także bez enzymów (kolejno – bez PPK2, bez PPK2 oraz PK (HK) oraz bez wszystkich trzech białek)”. W dysertacji brakuje jednak przedstawienia tego bogatego materiału doświadczalnego – ani w części „Wyniki i dyskusja”, ani w części eksperymentalnej.
2. Wykres 2 (s. 76) przedstawia wyniki testów spektrofotometrycznych 22 związków. Opis wykresów jest jednak niezwykle ubogi. Dlaczego podzielony jest na panele A i B? Czym różnią się one między sobą? Dlaczego w panelach tych są różne wyniki dla kontroli? Co zawierały poszczególne mieszaniny reakcyjne opisane jako „brak enzymów”, *Pa*PPK2, PK i LD? Opis w części eksperymentalnej (s. 128) tego nie wyjaśnia.
3. Co oznaczają kreski w Tabeli 6? Interpretacje mogą być różne. Podobnie w Tabeli 10.
4. Na Wykresie 3 podane są wyniki inhibicji *Ch*PPK2 przez 4 związki. Jakie były kryteria ich doboru?
5. W Tabeli 8 podano % inhibicji *Ch*PPK2 przez ww. 4 związki, ale nie podano ich stężeń. Podobnie w Tabeli 9.
6. Na s. 79 autorka wskazuje, że w reakcjach katalizowanych przez *Ch*PPK2 obecny był m.in. AMP. Jest to intrygujące, gdyż zgodnie ze Sch. 10 monofosforan nie powinien tu powstawać. Czy doktorantka może przedstawić hipotezy odnośnie jego zaobserwowania?
7. Na tej samej s. 79 doktorantka pisze „Najsilniejszą zależność pomiędzy strukturą a aktywnością kwasów fosfonowych zaobserwowałam w przypadku kinazy *Ch*PPK2 [...]”. Czy rzeczywiście występuje tu zależność pomiędzy strukturą a aktywnością, czy też jest to tylko niezbyt szczęśliwe sformułowanie?
8. Dlaczego na Wykresie 4 nie ma wyników dla *Rp*PPK2, które były badane w tej sekcji tak samo, jak ujęte na wykresie *Pa*PPK2 i *Ch*PPK2?
9. W całej pracy doktorantka nie przedstawiła ani jednego chromatogramu HPLC. Proszę o pokazanie kilku reprezentatywnych wyników analiz HPLC podczas obrony. Czy piki od inhibitorów nie zakłócają analizy?
10. Na podstawie zaawansowanej analizy strukturalnej doktorantka wytypowała strukturę 6 potencjalnie wysokoaktywnych inhibitorów PPK2. Jednak w trakcie prac syntetycznych poszerzyła tę grupę o szereg kolejnych związków. Czy było racjonalne uzasadnienie strukturalne przeprowadzenia tych syntez?
11. W tabelach 10 i 14 przedstawione są m.in. wartości IC_{50} dla rozmaitych inhibitorów. 4 eksperymenty w obu tabelach pokrywając się, tj. dotyczą takich samych układów *Ch*PPK2–inhibitor. Zaskakująca jest jednak rozbieżność podanych wyników. Dla związków **30**, **37d** i **37h** w Tab. 10 znajduje się kreska, w Tab. 14 są konkretne wartości, odpowiednio 354, 216 i 318 μ M. Z kolei dla związku **37e** IC_{50} w Tab. 10 wynosi 980 μ M, a w Tab. 14 – 60 μ M. Z czego wynikają te różnice?

12. Uzasadniając niewątpliwe polepszenie inhibicji ChPPK2 przez wprowadzenie podstawnika aminowego i guanidynowego w pierścieniu fenolowym doktorantka pisze: „Najprawdopodobniej ligandy te dobrze naśladują heteroaromatyczny fragment nukleotydu biorącego udział w katalizowanej przez kinazę reakcji przeniesienia grupy fosforanowej, tworząc dodatkowe oddziaływania w kieszeni enzymu”. Tymczasem w strukturze krystalicznej przedstawionej na Rys. 24 pierścień aromatyczny inhibitora znajduje się w znacznej odległości od reszty adeniny z ADP i nie wydaje się, aby wpływał na nukleotydowy komponent reakcji. Z wcześniejszych opisów mechanizmu inhibicji wynika zresztą, że badane kwasy fosfonowe blokują wiązanie polifosforanu, a nie nukleotydu. Czy więc przedstawiona interpretacja jest poprawna?

Drobniejsze błędy to podanie na Sch. 7 enzymu FPPS zamiast GPPS jako katalizującego pierwszy etap reakcji, zły numer związku na s. 99 (**68** zamiast **66**), nazwanie wypełnienia kolumny chromatograficznej „krzemionka” zamiast „żel krzemionkowy” itp. drobne pomyłki, które jednak są sporadyczne i nie wymagają komentarza.

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wysokiej wartości naukowej rozprawy, a raczej świadczą, jak rozmaite, nowatorskie i frapujące zagadnienia poruszone są w dysertacji. Szereg zadanych powyżej pytań wynika z faktu, że praca mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej jest bardzo ciekawa i wielowątkowa, a takie właśnie prace skłaniają do dyskusji. Doktorantka przeprowadziła bardzo obszerną i rzetelną analizę współczesnego stanu wiedzy, co pozwoliło jej zidentyfikować ciekawe naukowo i perspektywiczne zagadnienie. Dogłębne badania wstępne potwierdziły słuszność obranego kierunku badań i wskazały najlepszą metodę analityczną. Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane, dzięki czemu możliwe było wytypowanie obiecujących struktur, które zostały przebadane łącznie z szeregiem innych potencjalnych inhibitorów badanych kinaz. Dysertację kończy podsumowanie, w którym mgr Małgorzata Burda-Grabowska przedstawia poprawne i dobrze przemyślane wnioski z pracy.

Na wysokie uznanie zasługuje interdyscyplinarność doktorantki, która bardzo dobrze opanowała techniki zaawansowanej syntezy organicznej i fosforoorganicznej, jak też biegle porusza się w obszarze biologii molekularnej i analityki chemicznej i biochemicznej. Mgr Małgorzata Burda-Grabowska wykazała się pracowitością, starannością i sumiennością w prowadzonych pracach, a przede wszystkim pokazała, że potrafi prawidłowo zaprojektować, prowadzić i rozwiązać niełatwy problem badawczy. O wysokiej jakości dokonań mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej świadczy opublikowanie wyników z niniejszej dysertacji w dwóch czasopismach naukowych z listy JCR, w tym w prestiżowym ACS Catalysis. Doktorantka jest też współautorką kolejnych 2 publikacji z listy JCR i artykułu w serii „Na pograniczu chemii i biologii”.

Nie ulega wątpliwości, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), wobec czego wnioskuję o dopuszczenie mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.