



WYDZIAŁ CHEMII
UNIwersytet GDAŃSKI

prof. dr hab. Adam Lesner
Kierownik Pracowni Analityki Biochemicznej

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-523 5095
fax +48-58-523 5012
e-mail: adam.lesner@ug.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Macegoniuk

Poszukiwanie substancji regulujących aktywność enzymów bez wątpienia należy do jednych z ważniejszych wyzwań światowej nauki. Enzymy należące do klasy hydrolaz stanowią jedną z większych grup wśród opisanych do tej pory biokatalizatorów. Ureazy - enzymy katalizujące rozkład mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla stanowią wręcz podręcznikowy przykład tej klasy związków. Ureaza jest jednym z najpowszechniej występujących enzymów hydrolitycznych. Jej obecność stwierdzono u większości niższych organizmów katalizujących rozpad mocznika. Mimo swej prostoty wspomniana wyżej reakcja rozkładu w sposób istotny wpływa na jakość życia ludzkiego zarówno w aspekcie globalnym poprzez obniżanie efektywności nawożenia obszarów rolniczych oraz zwiększenie ilości CO₂ i toksycznego amoniaku w atmosferze. U człowieka, wywołany przez mikroorganizmy niekontrolowany rozkład mocznika może się przyczyniać do nadmiernego wzrostu bakterii urolitycznych (m.in. *Helicobacter pylori* czy *Mirabilis pyogenes*) prowadzących do powstawania depozytów fosforanów wapnia lub magnezu w układzie moczowym, owrzodzeń śluzówki żołądka czy do uszkodzenia hepatocytów i w konsekwencji do śpiączki wątrobowej.

Wszystkie powyższe fakty potwierdzają potrzebę kontroli aktywności ureolitycznej pochodzenia bakteryjnego zarówno w środowisku naturalnym, jak i w organizmie człowieka. Repertuar kontroli aktywności tych enzymów jest bardzo szeroki, lecz niedoskonały. Większość związków stosowanych do hamowania aktywności ureolitycznej stosowanych w

terapii powoduje niepożądane poważne skutki uboczne przez co użycie ich jako terapeutyków jest dyskusyjne. Kolejną wadą szeregu inhibitorów jest ich niska stabilność w roztworach wodnych.

Wobec powyższego poszukiwanie nowych związków silnie i selektywnie hamujących aktywność ureolityczną stanowi interesujący temat o istotnym znaczeniu utylitarnym. Zagadnienie to leży w obszarze zainteresowań grupy badawczej z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, a wśród jej liderów należy wymienić prof. Pawła Kafarskiego oraz Promotora niniejszej rozprawy prof. Łukasza Berlickiego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 195 stron i ma układ typowy, powszechnie przyjęty dla tego rodzaju opracowań. Rozprawa składa się pięciu głównych części: wstępu zawierającego przegląd literatury, celu pracy, części eksperymentalnej, prezentacji i dyskusji wyników, krótkiego podsumowania oraz spisu literatury cytowanej. W swej rozprawie Doktorantka umieściła 66 rysunków oraz 28 tablic, a spis cytowanej przez mgr Macegoniuk literatury zawiera 309 odnośników w większości z ostatniego dziesięciolecia.

Wstęp pracy który stanowi przegląd literatury to zwięzłe 46 stronicowe opracowanie wprowadzające czytającego w zagadnienia enzymów ureolitycznych; ich budowy przestrzennej, regulacji ekspresji, znaczenie i występowanie tych biokatalizatorów. W kolejnym istotnym podrozdziale Autorka charakteryzuje inhibitory ureaz z uwzględnieniem ich budowy i mechanizmu oddziaływania z enzymem. Rozdział ten stanowi bardzo dobre wprowadzenie do badań własnych mgr Macegoniuk, a jedyna uwaga krytyczna dotyczy zbyt częstego używania terminu „aktywność inhibicyjna”, które pod koniec opracowania przyjmuje postać „aktywności inhibitorowej”. W przyszłości proponowałbym zamiennie użycie terminów: siły hamowania, zdolności hamowania aktywności itp. Termin „inhibicja” str 36 wiersz 6 od góry proponowałby wymienić na „hamowanie”. Ponadto w całej rozprawie Autorka konsekwentnie stosuje symbol kropki zamiast przecinka jako symbol dziesiętnych części liczby całkowitej. Zapis ten typowy dla krajów anglosaskich, uważam za nieprawidłowy.

Cele pracy sformułowane zwięzłe lecz jasno, zawierają następujące po sobie etapy realizacji badań: ekspresji ureaz bakteryjnych oraz ich oczyszczanie, analizę zdolności hamowania aktywności ureolitycznej wybranych enzymów przez szereg strukturalnie zróżnicowanych związków chemicznych. Ostatnim celem pracy były próby krystalizacji wybranych ureaz z wyselekcjonowanymi w poprzednim etapie inhibitorami.

Rozdziały zatytułowane Materiały i metody oraz kolejny Wyniki i dyskusja stanowią części rozprawy które przeczytałem z prawdziwą przyjemnością. W pierwszej rozdziale Autorka na blisko 40 stronach tekstu, opisała warsztat naukowy jakim się posługiwała podczas realizacji zadań badawczych. Jest to opracowanie interesujące, gdyż techniki tu zawarte stanowią ciekawy zbiór badacza eksperymentatora z pogranicza chemii, enzymologii i biologii. Tego typu prace interdyscyplinarne uważam za wartościowe i godne naśladowania. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wymienić kilka nieścisłości, które jak rozumiem mają swoje źródło w żargonie laboratoryjnym. Strona 71 wiersz 15 od góry zawiera sformułowanie cytuje „...bufor glicynowy (1-krotnie stężony)...”. Prosiłbym Doktorantkę o podanie definicji „1-krotnie stężonego roztworu”. Dwie strony wcześniej termin „mostki disiarczkowe” wewnątrz struktury białka... uważam za błąd merytoryczny. Wyżej wymienione usterki w żaden sposób nie wpływają na mają ocenę tej części pracy, a stanowią jedynie dowód na to, że opracowanie pisał omylny człowiek, a nie maszyna.

Należy podkreślić że Doktorantka w ramach prowadzonych badań określiła siłę hamowania wybranych ureaz dla według obliczeń recenzenta 107 związków, o skrajnie różnej budowie chemicznej i jak udowodniła Autorka niniejszej rozprawy różnym mechanizmie oddziaływania z enzymem. Nie jest rolą recenzenta streszczenie prowadzonych badań, lecz ich ocena, a ta nie może być inna niż wysoka. Ekspresja trzech enzymów ureolitycznych z różnych szczepów bakteryjnych, a następnie ich oczyszczania nie należą do zadań trywialnych. Zaproponowany schemat oczyszczania ogólnie należy uznać za prawidłowy ale czy zastosowanie dwukrotnej sekwencji chromatografii jonowymiennej (kationitu) i kolejno wykluczenia masowego nie jest etapem zbędnym? Interpretacja rysunku 39 jest niejednoznaczna i o ile zanieczyszczenia obecne we frakcjach S300 dla każdego z oczyszczanych preparatów nie wykazywały aktywności enzymatycznej ten etap można by uznać za końcowy. Kolejne pytanie dotyczy prążków widocznych w obrazie elektroforetycznym obecnych w preparatach B) PMU oraz C) HPU migrujących na poziomie poniżej 30 kDa. Czy interpretacja wskazująca, że jest to sygnał podjednostki beta należy uznać za słuszną? A jeśli tak to dlaczego brak tego sygnału w systemie A? Nie jest to uwaga krytyczna lecz raczej przyczynek do dyskusji naukowej.

Nie mam zastrzeżeń do metod oceny siły hamowania określonych ureaz przez zbiór ponad 100 różnorodnych chemicznie związków. Tak szerokie i kompleksowe badania doprowadziły do wyselekcjonowania kilku związków o stałej hamowania niższej niż wykazywały dotąd opisane cząsteczki. Doskonałym przykładem jest pochodna kwasu

bis(aminometylo)fosfinowego modyfikowana podstawnikiem alifatycznym o sześciu grupach metylenowych. Wartości stałych hamowania wyznaczone dla tego związku wobec każdej z badanych ureaz są ponad stukrotnie niższe niż te otrzymane dla związku wyjściowego. Bez wątplenia wynik ten należy uznać za sukces badawczy autorki rozprawy. Tym bardziej, że poszerzone badania fizykochemiczne oraz biologiczne przeprowadzone na hodowli bakteryjnej potwierdzają istotny potencjał terapeutyczny tej pochodnej.

Kolejną ciekawą grupą potencjalnych inhibitorów będącą przedmiotem badań Doktorantki w wysokim stopniu obniżającą aktywność ureolityczną stanowią związki będące pochodnymi ebselenu. Wśród przetestowanych pochodnych struktury wyjściowej mgr inż. Katarzyna Macegoniuk była w stanie wskazać kilka o podobnej wartości stałej hamowania i silnym efekcie bójącym w stosunku do komórek bakteryjnych ze stałą ekspresją ureazy HPU.

Lista klas związków poddanych badaniom przez mgr inż. Macegoniuk nie ogranicza się do wyżej wymienionych lecz obejmuje także proste związki organiczne będące akceptorami Micheala, octany Morita-Baylis-Hillmana czy metale ciężkie. Dla każdej z tych grup Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę oddziaływań enzym – inhibitor, zaproponowała i mechanizm oddziaływań.

Prowadzone przez siebie badania Autorka rozprawy postanowiła zwieńczyć uzyskaniem struktury krystalicznej kompleksu enzymu wraz z inhibitorem. Niestety mimo początkowych sukcesów jakimi było uzyskanie kryształów ureazy HPU oraz SPU i próby otrzymania tychże dla kompleksu enzym inhibitor, prace te nie przyniosły pożądanych rezultatów. W opinii recenzenta w tym obszarze badań dużą rolę odgrywa przypadek, a prawdopodobieństwo sukcesu rośnie wraz z tysiącrotnym powtórzeniem procesu krystalizacji w subtelnie odmiennych warunkach. W dedykowanych tym zagadnieniom ośrodkom na powstanie właściwych „dobrze rozpraszające” kryształów badacze potrafią czekać ponad rok.

Powtórzę raz jeszcze że uwagi krytyczne przedstawione powyżej w żaden sposób nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy mgr inż. Katarzyny Macegoniuk, lecz chciałbym żeby stymulowały Doktorantkę do dalszych wysiłków w prowadzonych badaniach.

Podsumowując, moje pierwsze wrażenie po lekturze rozprawy to niezwykle szeroki zakres prowadzonych przez Doktorantkę prac o charakterze interdyscyplinarnym. Badania zostały zaplanowane i przeprowadzone prawidłowo. Bez zastrzeżeń Autorka rozprawy analizuje i interpretuje dane eksperymentalne. Udowadnia tym samym, że posiada kwalifikacje

pozwalające na samodzielne prowadzenie pracy naukowej. Potwierdza to dodatkowo dorobek naukowy Doktorantki, który według bazy Web of Science obejmuje cztery pozycje z listy JCR.

Stwierdzam z całym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Macegoniuk spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk 11 września 2015

Adam Lesniak