



Prof. Łukasz Berlicki
Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marii Rózanowskiej, pt.: "Nowe cykliczne analogi wybranych peptydów opioidowych – wpływ ugupowania biarylowego na właściwości konformacyjne, stabilność proteolityczną i aktywność biologiczną"

Pani mgr Maria Rózanowska zrealizowała pracę doktorską pod opieką dr hab. Marka Lisowskiego w Zespole Inżynierii Peptydów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Marii Rózanowskiej była synteza makrocyklicznych peptydów z zastosowaniem reakcji Suzuki-Miyaura oraz analiza struktury i funkcji otrzymanych połączeń.

Tematyka doktoratu dotycząca nowoczesnej chemii peptydów doskonale wpisuje się w nurt badawczy z powodzeniem realizowany od wielu lat w Zakładzie Inżynierii Peptydów. Makrocyklizacja peptydów z udziałem grup bocznych jest szeroko badana a wyniki badań w tym zakresie pozwoliły na odkrycie wielu wartościowych związków. Niewątpliwie temat podjęty przez Doktorantkę jest ważny a rozwiązany problem otrzymania makrocykli peptydowych z zastosowaniem reakcji Suzuki-Miyaura nietrywialny.

Rozprawa doktorska Pani Marii Rózanowskiej liczy 165 stron i dodatkowo zawiera suplement zapisany na płycie DVD, w którym znajdziemy dodatkowe tabele, rysunki, widma MS, CD i chromatogramy. Praca jest napisana w układzie klasycznym i zawiera: wstęp (25 stron), cel pracy (2 strony), materiały i metody (37 stron), wyniki i dyskusje (63 strony),

podsumowanie (3 strony) oraz 303 odnośniki do literatury. Praca pod względem językowym jest napisana poprawnie i w sposób łatwy do zrozumienia a jednocześnie wykonane eksperymenty są przedstawione z odpowiednią dbałością o szczegóły. W pracy jest niewielka liczba usterek edytorskich (np. strona 96, linia 5) jednakże nie utrudniają one znacząco czytania pracy i przez to nie są warte dyskusji w niniejszej recenzji. Warto natomiast wspomnieć o szeregu kolorowych rysunków, które bardzo dobrze ilustrują dyskutowane zagadnienia i są przygotowana z odpowiednią starannością. Nietypową praktyką jest umieszczanie podpisów nad rysunkami.

Wstęp do pracy doktorskiej Pani mgr Marii Różanowskiej jest relatywnie krótki i zawiera najważniejsze informacje z zakresu badań peptydów opioidowych oraz strategii cyklizacji peptydów, a w szczególności zastosowanie mostków biarylowych. Omówiona została także reakcja Suzuki-Miyaura – opisano mechanizm, oraz możliwości zastosowania w syntezie makrocykli peptydowych. Niestety we wstępie brakuje przedstawienia szerszego kontekstu makrocyklizacji peptydów z użyciem grup bocznych reszt aminokwasowych, pomimo tego, że w literaturze opisano zastosowanie wielu ciekawych i nieoczywistych reakcji chemicznych.

Następnie przedstawiony jest cel pracy oraz krótkie uzasadnienie wykonanych badań. Pomimo odniesienia się w tym fragmencie tekstu do literatury nie zostały bezpośrednio wskazane żadne wcześniejsze artykuły.

Rozdział Materiały i Metody został przygotowany z dużą starannością i zbiera wszystkie szczegóły eksperymentalne wykonanych prac. Opisano zostały metody analityczne, syntetyczne a także przedstawiono szczegółową analizę wszystkich otrzymanych pochodnych. Co więcej otrzymujemy także szereg odniesień do suplementu, gdzie umieszczono chromatogramy i widma MS. Jednakże brakuje informacji o znalezionych kontaktach między protonami peptydu, które umożliwiły otrzymanie modeli struktur.

Najważniejsza część rozprawy – Wyniki i Dyskusja jest napisana w sposób dobrze przemyślany i klarowny. Zaskakującą niespójność napotykamy w rozdziale „synteza pochodnych aminokwasowych”, gdzie na początku przedstawiono wyniki dotyczące syntezy końcowych peptydów z zastosowaniem pochodnych benzylowych tyrozyny. Jest to oczywiste uzasadnienie dla wyboru syntezy pochodnych *tert*-butylowych, jednakże nie zostały przedyskutowane reakcje prowadzące do przedstawionych peptydów zablokowanych grupą benzylową.

Najcenniejszą częścią pracy jest optymalizacja syntez odpowiednich pochodnych aminokwasowych oraz ich zastosowanie do syntezy peptydów. Rozbudowane tabele opisujące

przetestowane warunki reakcji świadczą o nie trywialności tego zadania z jednej strony a istotności wyników z drugiej. Należy jednakże wskazać drobną nieścisłość w opisywanych wynikach – produkt C w tabelach 3, 4 i 5 jest po prostu nieprzereagowanym substratem. Zastosowanie otrzymanych pochodnych boronowych jak i boronowanie prekursorów na podłożu stałym ostatecznie umożliwiły otrzymanie znaczącej liczby cyklicznych peptydów.

W drugiej części pracy otrzymane makrocykle są szczegółowo przeanalizowane z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mass, magnetycznego rezonansu jądrowego oraz dichroizmu kołowego, co pozwala na otrzymanie całościowego obrazu preferencji konformacyjnych. Analiza NMR wykazała stabilność konformacyjną większości peptydów. Co ciekawe, zaobserwowano znaczące różnice w preferencjach konformacyjnych w grupie analogów enkefalin, które były zależne od sposobu makrocyklizacji a nie od sekwencji (np.: peptyd P5 *versus* P6). Niestety nie zostały przedyskutowane bezpośrednio obserwowane na widmach kontakty między protonami, które bezpośrednio definiują zakres możliwych konformacji. Bardzo ciekawa jest także analiza CD otrzymanych peptydów, jednakże brak widm w tekście rozprawy znacząco utrudnia śledzenie przedstawionych analiz.

W kolejnym rozdziale opisano stabilność proteolityczną w eksperymentach z udziałem chymotrypsyny. Jednoznacznie można wskazać, że wszystkie otrzymane makrocykle są bardziej odporne na hydrolizę, niż ich liniowe odpowiedniki. W tym przypadku warto byłoby zmierzyć/oszacować wartości czasu połowicznego trawienia dla obu grup związków, co w sposób ilościowy pokazałoby przewagę analogów cyklicznych.

Ostatnie dwa podrozdziały sekcji Wyniki i Dyskusja dotyczą aktywności biologicznej zsyntezowanych peptydów makrocyklicznych. Niestety wszystkie związki cykliczne są znacząco mniej aktywne niż ich analogi liniowe. Wyniki modelowania molekularnego potwierdzają znaczące różnice wiązania związków liniowych i cyklicznych.

Poza kwestiami już wskazanymi w niniejszej recenzji chciałbym, aby w czasie obrony Doktorantka przedyskutowała następujące kwestie:

1. W jaki sposób opracowane strategie syntetyczne rozbudowują potencjał otrzymywania nowych makrocykli peptydowych?
2. Co może być przyczyną różnic w stabilności konformacyjnej peptydów P6 i P7 względem peptydu P5, które różnią się sposobem połączenia grup aryłowych? Proszę także o przedyskutowanie analogicznych obserwacji dla innych grup peptydów.

3. Czy na podstawie uzyskanej wiedzy można zaproponować nowe makrocykle o potencjalnie wyższej aktywności biologicznej (w porównaniu do tych opisanych w dyskutowanej rozprawie doktorskiej)?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Marii Różanowskiej oceniam bardzo dobrze. Wpisując się w nowoczesne trendy badań nad peptydami makrocyklicznymi, Doktorantka uzyskała szereg wartościowych wyników. Co ważne, pomimo znaczących trudności Doktorantka otrzymała z sukcesem kilkanaście pochodnych makrocyklicznych. Dodatkowo, wszystkie zsyntezowane pochodne zostały kompleksowo przeanalizowane z zastosowaniem szeregu metod eksperymentalnych. Niewątpliwie, opisane wyniki są znaczącym wkładem w współczesną chemię peptydów. Z tego powodu, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Marii Różanowskiej spełnia ustawowe (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r.) i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Marii Różanowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Julian Bemich