



Kraków, 27 kwietnia 2024

JAGIELLONIAN  
UNIVERSITY  
IN KRAKOW

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Krzysztofa Grześkowiaka pt.  
„Synthesis and evaluation in vitro of novel arginine analogues as potential  
new components of metabolic anticancer therapy”**

Rozwój nowych strategii terapii onkologicznych spowodował wzrost zarówno pełnej wyleczalności nowotworów, jak i średniego czasu życia pacjentów. Jednak nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w tym glejak wielopostaciowy (glioblastoma multiforme; GBM), wciąż stanowią wyzwanie dla współczesnej neuroonkologii. Mimo rozwoju wiedzy na temat biologii glejaków i opracowania nowych, coraz doskonalszych technik interwencji chirurgicznej, radiologicznej i chemioterapeutycznej, pacjenci z tą chorobą zwykle żyją do ok. kilkunastu miesięcy od pierwszej diagnozy, a taka sytuacja pozostaje niezmienną od wielu lat. Wynika to zarówno z agresywnego przebiegu samej choroby, jak i jej umiejscowienia. Taki stan rzeczy uzasadnia wysiłki na rzecz rozwoju nowych strategii terapeutycznych, wspomagających te już wdrożone do leczenia nowotworów OUN. Rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Krzysztofa Grześkowiaka wpisuje się w ten trend.

Jednym ze sposobów wspomagania chemioterapii nowotworów OUN jest eliminacja niektórych składników diety, które są im niezbędne do prawidłowego wzrostu a których komórki nie są w stanie samodzielnie syntetyzować (czyli wykazują względem nich auktrofie). Do tej grupy należy strategia oparta na eliminacji argininy z otoczenia komórek nowotworowych. Potencjalnie wzmaga ona skutki deficytów metabolicznych komórek nowotworowych. Z drugiej strony strategia ta ma też ograniczenia, dlatego proponuje się podejścia kombinowane, oparte na jednoczesnym ograniczeniu biodostępności argininy (w tym indukcji jej rozkładu) i podaniu jej analogów. Jednym z przykładów takich analogów jest L-kanawanina, której wbudowanie do syntetyzowanych białek zaburza ich funkcje. Obiecujące wyniki badań cytostatycznej aktywności tej substancji uzyskane wcześniej przez grupę prof. Jolanty Rędownicz, stanowiły podstawę merytoryczną ocenianej rozprawy doktorskiej. Została ona wykonana dzięki współpracy grup badawczych z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN (kierowanych odpowiednio przez prof. Mariolę Koszytkowską-Stawińską i prof. Jolantę Rędownicz) w ramach Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020. Jej celem było wytypowanie substancji wykazujących powinowactwo do arginyl-tRNA syntetazy (enzymu uczestniczącego we wbudowywaniu argininy do łańcuchów peptydowych), potencjalnie podnoszących skuteczność skojarzonych terapii leczenia GBM opartych na cytostatykach i deprywacji metabolicznej. Ze względu na wagę problemu (nie)skuteczności obecnie dostępnych strategii terapii GBM, tematykę przedstawionej rozprawy doktorskiej uważam za w pełni uzasadnioną. Ocenę tę dodatkowo wspiera interdyscyplinarny charakter rozprawy, łączący zaawansowane techniki modelowania matematycznego cząsteczek i ich interakcji, syntezy chemicznej i analiz biologicznych in vitro.

Przedstawiona do oceny rozprawa wydana została w formie książeczki o objętości typowej dla tego typu opracowań: liczy ona 146 stron, zawiera 53 ryciny (w tym 22 ilustrujące dane doświadczalne), kilka tabel i trzy pokaźnych rozmiarów załączniki zawierające wzory strukturalne wytypowanych cząsteczek, ponad 30 obrazów widm NMR oraz wyniki analiz wzoru ich dokowania w kieszeni wiązania. Praca ma dość nietypowy układ, gdyż poza szczegółowym opisem metod, skądinąd zamieszczonym na końcu rozprawy (po Dyskusji i Wnioskach, a przed Załącznikami), zawiera również opis narzędzi badawczych. Tak struktura uzasadniona jest jednak interdyscyplinarnym

Faculty of Biochemistry,  
Biophysics and  
Biotechnology

Department of Cell  
Biology

Prof. Jarosław Czyż

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 6146

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl



profilem tematycznym pracy. Rozprawę rozpoczynają streszczenia i lista skrótów, a kończy bibliografia licząca 92 pozycje literaturowe (zarówno oryginalne prace doświadczalne, jak i artykuły przeglądowe) oraz załączniki. Pozycje literaturowe stanowią dobrą merytoryczną podstawę zarówno wprowadzenia w problematykę pracy, zawartego we Wstępie rozprawy, opisie Narzędzi, jak i Dyskusji uzyskanych wyników. Jednak streszczenia w języku polskim i angielskim obejmują tylko tło merytoryczne rozprawy; nie odnoszą się one do uzyskanych wyników oraz podstawowych wniosków z nich płynących, co należy uznać za niedopatrzenie Autora.

Na tyle, na ile jestem w stanie to ocenić, praca napisana jest precyzyjną angielszczyzną; czyta się ją płynnie, a liczba zidentyfikowanych przeze mnie błędów literowych i językowych (np. str. VII; l. 8 i 24; ostatnie zdanie: str. 78) pozostaje w granicach normy dla tego typu opracowań. Dało się też zauważyć pewne niedociągnięcia zw. z odnośnikami do poszczególnych podrozdziałów (np. odniesienie do nieistniejącego rozdziału 3.3.3 i 3.3.4). Z drugiej strony, uwagę zwraca wysoka jakość edytorska rozprawy, a w szczególności staranność przygotowania ilustracji symulacji wzorów dokowania w kieszeni wiązania i reakcji chemicznych, oraz dbałość Autora o szczegóły opisu i ilustracji wyników. Diagramy i ilustracje wplecione w tekst są bardzo eleganckie w formie i wspomagają lekturę pracy. Generalnie aspekt edytorski rozprawy należy ocenić pozytywnie.

W 13-stronicowym Wstępie Autor zwięźle skompilował tło merytoryczne rozprawy, a w szczególności biologiczne znaczenie argininy, jako aminokwasu budującego białka i decydującego o ich ładunku powierzchniowym. Omówił m. in. przełożenie arginylacji białek na ich właściwości, degradację w proteasomach, powinowactwo do innych struktur sub-komórkowych (na przykładzie F-aktyny i oddziaływań ligand-receptor). Chciałbym się w tym miejscu dopytać, jak arginylacja aktyny na wydajność tworzenia wiązek mikrofilamentów, ponieważ na stronie 3 Autor sugeruje hamujący wpływ arginylacji na ten proces, a na stronie 10 zjawisko odwrotne.

Następnie Autor skoncentrował się na metabolizmie argininy, szlakach syntezy tego aminokwasu i jego znaczeniu dla innych szlaków metabolicznych, w tym generujących tlenek azotu (NO), kreatynę i prolinę. Wreszcie przeszedł do omówienia podstaw epidemiologii i biologii nowotworów, w szczególności glejaka, i znaczenia argininy dla rozwoju i terapii tego nowotworu. Wspomniał on m.in. o defektach syntezy argininy w komórkach glejaka i nawiązał do konsekwencji tych deficytów dla terapii nowotworów układu nerwowego, po czym płynnie przeszedł do omówienia strategii terapeutycznych nakierowanych na metabolizm argininy. Przed wszystkim skompilował on podstawowe informacje na temat potencjału terapeutycznego analogów argininy (kanawaniny i indospicyny). Ostatni rozdział to krótkie omówienie mechanizmów rządzących śmiercią komórek (w tym nowotworowych), jako ostatecznego celu terapii nowotworowych. Wstęp miejscami jest dość lapidarny, a Autor operuje zbyt daleko idącymi uproszczeniami (np. „cancer is the result of deregulated cell proliferation”; str. 7), co jednak może być usprawiedliwione przede wszystkim „chemicznym” profilem tematycznym rozprawy. Z drugiej strony ma on logiczną strukturę i stanowi zamkniętą całość uzasadniającą podjęcie przedstawionych w rozprawie badań; dlatego pozytywnie oceniam konstrukcję i treść tej części rozprawy.

Następnie Autor wziął pod lupę narzędzia badawcze wykorzystane w pracy, które podzielił na 3 podstawowe grupy: narzędzia informatyczne służące projektowaniu nowych związków chemicznych pod kontem wydajności ich interakcji z centrum aktywnym arginyl-tRNA syntetazy; (ii) narzędzia pozwalające na zoptymalizowaną pod względem wydajności i kosztów syntezę związków wytypowanych względem powyższych kryteriów oraz (iii) techniki analizy aktywności biologicznej tych związków *in vitro* (immunoblotting, mikroskopia świetlna). Generalnie wysoko oceniam pomysł zamieszczenia takiej syntezy, ponieważ pozwala ona czytelnikowi zorientować się w strategii działania i priorytetach przyświecających Autorowi w trakcie przygotowywania rozprawy o tak interdyscyplinarnym charakterze.



Bardziej uszczegółowiony opis wykorzystywanych technik doświadczalnych i metodyki przeprowadzonych eksperymentów (Materiały i Metody) Autor z kolei umieścił na końcu rozprawy. Jak już wspomniano, metodyczny zakres badań wyjątkowo szeroki i obejmuje techniki *in silico* (w tym dokowanie molekularne), techniki syntezy organicznej („click chemistry”, synteza Pinnera, wykorzystanie grup „protekcyjnych”) oraz szereg technik umożliwiających określenie aktywności biologicznej wytypowanych związków (hodowle komórkowe, testy metaboliczne, mikroskopia świetlna i immunoblot). Ich spektrum umożliwia weryfikację postawionych w pracy pytań. Zwięzły i konkretny styl ich opisu, dobór faktów i rozłożenie akcentów stwarza możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń. Pokazuje też, że Autor swobodnie porusza się w tematyce związanej z rozprawą, w szczególności z jej częścią dotyczącą warstwy *in silico* i syntezy chemicznej. Jednak zwróciło moją uwagę zastosowanie testu MTS, który mierzy równowagę metaboliczną komórek, a ta z kolei może się zmieniać pod wpływem badanych substancji, niekoniecznie w związku z proliferacją komórek. Z drugiej strony obrazowanie komórek pozwoliło na identyfikację komórek apoptotycznych. Tak więc mimo tego zastrzeżenia, warstwę metodyczną rozprawy należy ocenić wysoko.

Wysoko też oceniam formę i treść rozdziałów, w których Autor opisuje uzyskane w ramach rozprawy wyniki. Opis ten jest przystępny, a krótkie wprowadzenia i podsumowania ułatwiają uchwycenie ciągów przyczynowo - skutkowych, którymi kierował się Autor wykonując kolejne doświadczenia. W pierwszej części opisane zostały wyniki projektowania molekularnego analogów argininy. W oparciu o analizy wzoru ich dopasowania do „kieszeni wiążącej” ArgRS oraz symulacji siły wiązania poszczególnych cząsteczek do tego miejsca (i ich podobieństw tych wartości określonych dla argininy) do dalszych badań wytypowano cztery zaprojektowane analogi argininy (1a-c i 2a). Zsyntetyzowano je wykorzystując do tego celu technikę cykloadycji azotyno-alkinowej katalizowanej miedzią (CuAAC, synteza pierścienia triazolowego), wspartą syntezą Pinnera (synteza amidyny) i zastosowaniem grup protekcyjnych. Również ta część rozprawy zasługuje na uznanie, gdyż Autorowi udało się zoptymalizować pod względem wydajności i kosztochłonności metodę syntezy nowych obiecujących związków chemicznych. Z kolei odnosząc się do meritum biologicznej części rozprawy, należy zwrócić uwagę na dobrze przemyślany model doświadczalny, na który składają się 2 linie komórek glioblastoma. Analizy wpływu poszczególnych substancji na dobrostan komórek GBM nie wzbudzają wątpliwości. Autor w przekonujący sposób pokazał różnice aktywności biologicznej poszczególnych związków. Hamujący wpływ S-(3-amino-3-iminopropyl)-L-cysteiny (S2a) na aktywność metaboliczną komórek glejaka skorelowany był z aktywacją szlaków pro-apoptotycznych (zależnych od kaspazy-3) i zmianami morfologii komórek charakterystycznymi dla postępującej apoptozy.


Generalnie bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną eksperymentalnej części pracy. Uwagę zwraca rzadko spotykana w publikacjach interdyscyplinarność metodyki i podejścia interpretacyjnego. Opis wyników pracy jest przejrzysty, właściwie uporządkowany i dobrze wprowadza on czytelnika w rozważania na temat znaczenia poczynionych obserwacji (zarówno w aspekcie podstawowym, jak i aplikacyjnym), które znalazły się w liczących łącznie 5 stron Dyskusji, Podsumowaniu i Wnioskach. Wywód, w którym Autor interpretuje swoje wyniki, dotyczy zarówno aspektów związanych z projektowaniem związków, ich syntezą, jak i aktywnością biologiczną. W warstwie biologicznej Autor zwraca uwagę na możliwe mechanizmy leżące u podstaw cytotatycznej aktywności S-(3-amino-3-iminopropyl)-L-cysteiny (2a) w badanym modelu, w tym możliwość inkorporacji 2a do łańcuchów polipeptydowych, lub udziału tego związku w modyfikacjach potranslacyjnych białek. W świetle uzyskanych przez Autora wyników oba scenariusze wydają się prawdopodobne. Same wyniki tworzą perspektywy wykorzystania przynajmniej tego związku w terapii glejaków, lecz nasuwają też wiele pytań, z których część została wyartykułowana



przez Autora pod koniec tego rozdziału. Po lekturze całej pracy, a w szczególności Dyskusji nasunęło mi się też kilka innych pytań:

- czy za obserwowane efekty biologiczne S-(3-amino-3-iminopropyl)-L-cysteiny (2a) nie może odpowiadać blokada aktywności ArgRS związana z trwałym wiązaniem tego związku w „kieszoni” ArgRS?
- czy zasadnym byłoby założenie, że u źródeł różnej aktywności badanych związków leżą różnice w ich biodostępności, t.j. różnej wydajności penetracji błon komórkowych?
- czy obecność komórek, które przetrwały działanie 2a sugeruje, że możliwa jest mikroewolucja komórek opornych na ten związek?

Powyższe pytania i uwagi nie podważają merytorycznej wagi i siły oddziaływania uzyskanych wyników. Opisane dane pokazują potencjał podejścia metodycznego zaproponowanego przez Autora do projektowania i syntezy analogów argininy potencjalnie przydatnych w terapii glejaków. Pokazują one również potencjał S-(3-amino-3-iminopropyl)-L-cysteiny jako związku potencjalnie wspomagającego terapię tych nowotworów. O ile finalna ocena jego przydatności wymaga dalszych prac- i kosztochłonnnych badań, o tyle już teraz może on stanowić narzędzie w badaniach pozwalających na zrozumienie procesów rządzących reaktywnością komórek GBM na deficyt argininy i na obecność analogów argininy w białkach. Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona do oceny praca prezentuje oryginalne rozwiązanie postawionego problemu, ilustrując jednocześnie wiedzę i kompetencje Autora w zakresie analiz *in silico*, syntezy chemicznej i badań aktywności biologicznej związków chemicznych. Spełnia ona zatem warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej wniosek o dopuszczenie mgr Piotra Krzysztofa Grześkowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jarosław Czyż