

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 5.08.2022 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Skrzypczak
pt.: „Modyfikacje rdzenia benzochinonowego naturalnego makrolaktamu –
geldanamycyny oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe” wykonanej w Zakładzie Chemii Produktów
Naturalnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Przybylskiego**

Rozwój społeczno-gospodarczy prowadzi do powstania coraz to bardziej zaskakujących technologii w różnych dziedzinach życia takich jak energetyka, medycyna, cyfryzacja itd. Z drugiej jednak strony rozwój społeczno-gospodarczy przyczynia się do degradacji środowiska naturalnego, które prowadzi z kolei do zwiększonej ilości „błędów” genetycznych i do rozwoju nowotworów. Pierwszy opis guza nowotworowego w ludzkich tkankach został znaleziony w egipskim papirusie datowanym na 1500 p.n.e. Istnieją dowody na to, że również dinozaury żyjące 250 do 65 milionów lat temu chorowały na raka. Jednocześnie wiadomo, że słonie na raka praktycznie nie chorują, co jest związane z występowaniem 20 kopii genu kodującego białko p53 (człowiek posiada tylko jedną kopię). Skala zachorowań na nowotwory u ludzi, we współczesnym świecie, jest bardzo duża. Szacuje się, że tylko w 2020 roku na całym świecie było ponad 19 milionów nowych zachorowań na raka i prawie 10 milionów zgonów. W porównaniu z rokiem 2000 liczba ta wzrosła o 9 mln nowych przypadków i 4 mln zgonów. Z szacunków WHO wynika, że do 2040 roku liczba chorych na raka - zwłaszcza w biedniejszych krajach - może wzrosnąć o 81%. Ta eskalacja zachorowań odzwierciedla nie tylko pogarszający się stan środowiska naturalnego ale także wzrost i starzenie się światowej populacji. Wiadomo bowiem, że proces starzenia się organizmu zwiększa tempo mutacji i osłabia efektywność procesów naprawczych w komórkach. Oczywiście nie bez znaczenia dla zwiększającej się liczby chorych na raka są predyspozycje genetyczne człowieka (np. mutacje genów BRCA1 i BRCA2), zakażenia wirusami onkogennymi (np. wirus HPV) czy nabywanie przez nowotwory oporności na niektóre leki (np. przekierowanie na inne szlaki metaboliczne). Dane te wskazują na konieczność poszukiwania nowych terapeutyków oraz rozwoju diagnostyki i stosowania profilaktyki. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wpisuje się doskonale w potrzeby współczesnego świata w zakresie poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych. Pani Natalia Skrzypczak postanowiła w swoich poszukiwaniach wykorzystać, jako cząsteczkę wiodącą, znany związek naturalny jakim jest geldanamycyna (GDM). Aktywność przeciwnowotworowa GDM spowodowana jest hamowaniem działania białka szoku cieplnego Hsp90. Białka Hsp90 działają jako białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe przyjmowanie konformacji innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Oprócz roli opiekuńczej, białka Hsp mają także swój udział w takich procesach jak apoptoza, nowotworzenie (zwiększona ekspresja białek Hsp), czy zwiększona odpowiedź immunologiczna. Zahamowanie działania Hsp90 w komórce prowadzi do jej śmierci, co jest wskazane w przypadku komórki nowotworowej. Strategia inaktywacji białka Hsp90 w komórkach z udziałem analogów geldanamycyny stała się głównym tematem pracy doktorskiej mgr Skrzypczak.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Piotra Przybylskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach projektu NCN OPUS 13. Całość rozprawy obejmuje 473 strony maszynopisu z czego 142 strony stanowią załączniki w formie widm IR, NMR, tabel i wzorów struktur. Praca podzielona jest na 9 głównych rozdziałów (tj. cel pracy, część literaturowa – 3 główne podrozdziały, wyniki i dyskusje, część eksperymentalna, podsumowanie, literatura i załączniki w postaci widm NMR i IR). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów. Spis piśmiennictwa obejmuje 218 pozycji, uwzględniających pełne dane wraz z numerem DOI. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków, struktur i schematów reakcji chemicznych, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii. W pracy znalazłam drobne błędy edycyjne (np. wyjaśnienie sposobu obliczeń współczynników pod tabelą a nie w opisie materiałów i metod, bardzo słaba jakość rysunku 16, str. 32, angielskie opisy niektórych rysunków; plamki korelacyjne to sygnały korelacyjne lub sygnały krzyżowe; powinno być „wieży NOE” a nie „węzły NOESY”) ale w żaden sposób nie umniejszają one mojej wysokiej oceny dysertacji. Do pracy zostały dołączone osobne (zalamowane) kartki z kolorowymi strukturami zsyntetyzowanych związków i ich nazwami wraz z numeracją poszczególnych atomów. Zastosowane rozwiązanie było bardzo pomocne podczas lektury pracy doktorskiej. Takie rozwiązanie zastosowane zostało przez poprzednich wychowanków prof. Przybylskiego (byłam recenzentem pracy doktorskiej dr Anny Janas) i cieszę się że ta dobra praktyka jest kontynuowana.

Na początku pracy doktorskiej Doktorantka umieściła podziękowania swojemu promotorowi oraz najbliższym współpracownikom i rodzinie. Każda z tych osób została obdarzona podziękowaniami na osobnej stronie, co świadczy o dużym wsparciu merytorycznym i wsparciu emocjonalnym tych osób w powstaniu pracy doktorskiej. Zawsze z dużą uwagą czytam podziękowania składane w pracach doktorskich, gdyż często pokazują w jakiej atmosferze realizowane były badania znajdujące swoje zwieńczenie w postaci pracy doktorskiej. Wnioskuje, że prace p. Natalii Skrzypczak przebiegały w atmosferze życzliwości ze strony promotora i wsparcia ze strony koleżanek, kolegów i rodziny. Choć nigdy się o tym nie mówi to uważam, że jest to bardzo ważny czynnik (życzliwość i wsparcie), bez którego często nie dochodzi do ukończenia doktoratu.

Mgr Natalia Skrzypczak na początku swojej dysertacji przedstawiła **cel główny swojej pracy, którym było otrzymanie nowych pochodnych geldanamycyny oraz ustalenie wpływu rodzaju modyfikacji na zależność struktura – aktywność biologiczna. Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie wpływu rozerwania makrocyklicznej struktury mostu na jego orientację względem rdzenia oraz na aktywność biologiczną.** Prace te były podyktowane tym, że głównym problemem w stosowaniu geldanamycyny jako leku przeciwnowotworowego jest jej toksyczność (kowalencyjne wiązanie się z GSH), niska rozpuszczalność w wodzie powodująca ograniczoną biodostępność oraz niska stabilność chemiczna ze względu na udział w reakcjach redoks. Dlatego też, zaproponowała szereg nowych pochodnych, które zsyntezowała i scharakteryzowała a następnie sprawdziła ich aktywność biologiczną i przeanalizowała zależność struktura-aktywność (SAR).

W kolejnych rozdziałach (II-IV – część literaturowa) Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej. Na początku scharakteryzowała grupę antybiotyków ansamycynowych, do której należy również geldanamycyna, a które stanowią bardzo dużą grupę antybiotyków. Doktorantka skupiła się na opisanu sposobu ich otrzymywania, na ich charakterystyce strukturalnej i systematycznym podziale. Uogólniając można z tego rozdziału dowiedzieć się, że ansamycyny to grupa związków naturalnych posiadających w swojej budowie alifatyczny linker spinający niesąsiadujące pozycje aromatycznego rdzenia tzw. most ansa. Obecność takiej struktury wpływa na dużą labilność konformacyjną tych związków. Drugą charakterystyczną cechą ansamycyn jest występowanie ugrupowania

laktamowego w strukturze alifatycznego mostu. W dalszej części literaturowej swojej pracy mgr Skrzypczak w sposób skondensowany i bardzo przystępny opisała główną bohaterkę swojej pracy a mianowicie geldanamycynę. Wyjaśniła w jaki sposób związek ten został odkryty, jakie jest jego pochodzenie oraz jak przebiega jej naturalna ścieżka biosyntezy. W tej części pracy zabrakło mi jedynie informacji o działaniu antybiotycznym tego związku oraz mechanizmie działania przeciwdrobnoustrojowego. Czy jest on taki sam jak w przypadku aktywności przeciwnowotworowej? W kolejnym podrozdziale części teoretycznej mgr Skrzypczak bardzo szczegółowo scharakteryzowała białka chaperonowe Hsp ze szczególnym uwzględnieniem białek Hsp90. Dokładnie wyjaśniła działanie molekularne białek Hsp90 a także strategie hamowania ich funkcji. W przypadku geldanamycyny do inhibicji białka Hsp90 dochodzi poprzez wiązanie się związku z N-końcem domeny NBD, w kieszeni enzymatycznej odpowiedzialnej za katalizowanie reakcji hydrolizy ATP. Ponieważ wiadomo, że Hsp90 tworzy kompleks z białkiem p53 (białko regulujące procesy naprawcze DNA w komórce) to czy geldanamycyna może także wpływać na proces tworzenia się tego kompleksu i czy oprócz hamowania hydrolizy ATP możliwy jest jeszcze inny mechanizm aktywności przeciwnowotworowej tego związku? Z rozdziału tego dowiadujemy się również, że geldanamycyna wykazuje wysoki stopień hepatotoksyczności, dzięki temu że jest inhibitorem glutationu i wiąże się z nim w sposób nieodwracalny na drodze 1,4-sprzężonej addycji grupy tiolowej glutationu do układu chinonowego rdzenia benzenoidowego. W następnym podrozdziale Doktorantka opisała istniejące modyfikacje geldanamycyny powstałe na drodze syntezy totalnej, semisyntezy czy mutasyntezy połączonej z semisyntezą. Tą część rozprawy doktorskiej (opis istniejących modyfikacji chemicznych oraz ich wpływ na aktywność biologiczną) oceniam bardzo wysoko, gdyż w sposób bardzo szczegółowy wprowadza czytelnika w problematykę dysertacji. Dodatkowo, każdy omawiany związek został przez Doktorantkę starannie narysowany (z zaznaczoną numeracją atomów), co sprawiło, że czytelnik nie miał wątpliwości w którym miejscu cząsteczki została wprowadzona omawiana modyfikacja. Po lekturze tej części rozprawy doktorskiej zastanowiło mnie jedynie czy któryś z opisywanych związków został wprowadzony do kliniki i w jakim zastosowaniu? Ostatni podrozdział części teoretycznej pracy doktorskiej obejmuje charakterystykę chinonów oraz sposobów ich chemicznej modyfikacji. Związki te zostały opisane z uwagi na fakt zastosowania ich przez Doktorantkę do modyfikacji chemicznej geldanamycyny.

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Wyniki i dyskusja”. Rozdział ten został przez Doktorantkę podzielony na dwie zasadnicze części. W pierwszej części opisała w sześciu podrozdziałach różne grupy analogów geldanamycyny (synteza, analiza strukturalna i fizykochemiczna), natomiast w drugiej części pracy skupiła się na opisaniu wyników badań biologicznych oraz analizie SAR wcześniej otrzymanych związków. W poszczególnych podrozdziałach opisała następujące grupy analogów:

- (i) pochodne geldanamycyny modyfikowane w pozycji C(17) – ta grupa związków zmodyfikowany został pierścień benzochinonowy w taki sposób, żeby wymusić dodatkowe oddziaływania w kieszeni wiążącej Hsp90 poprzez wprowadzenie wysięgnika o różnym charakterze chemicznym (kwasowym, zasadowym i obojętnym). Doktorantka zsyntezowała 28 (GDM-1 do GDM-28) aminowych analogów, reakcje monitorowała z wykorzystaniem techniki HPLC, oczyściła z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej i potwierdziła ich struktury z wykorzystaniem techniki ESI-MS, 2D NMR i FT-IR w ciele stałym. Dodatkowo dla związków GDM oraz GDM-1, 9, 12 i 24-26 zostały ustalone struktury krystaliczne i zdeponowane w bazie CCDC.

- (ii) pochodne geldanamycyny z otwartym mostem ansa – w tej grupie związków (GDM-29 do GDM-33) Doktorantka nie doprowadziła do cyklizacji mostem ansa badanych związków. W ten sposób chciała sprawdzić czy obecność mostu ansa wpływa na zachowanie aktywności biologicznej badanej grupy związków. Do analizy Doktorantka wykorzystwała takie same procedury i techniki jak w pkt. (i).
- (iii) N-alkilowane pochodne geldanamycyny podstawionej w pozycji C(17) aminochinuklidyną – ta grupa związków, podobnie jak w pkt (i), została zmodyfikowana na węglu C(17) różnymi pochodnymi aminochinuklidyny (GDM-35 do GDM-39). Modyfikacje te miały na celu zwiększenie hydrofiliwości pochodnych. Do analizy Doktorantka wykorzystwała takie same procedury i techniki jak w pkt. (i).
- (iv) nowe pochodne geldanamycyny z wykorzystaniem reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena a w tym seria pochodnych, w których geldanamycyna posiada linker alkinowy lub azydkowy – ta grupa związków, podobnie jak w pkt (i), została zmodyfikowana na węglu C(17) linkerami umożliwiającymi oddalenie podstawnika od pierścienia benzochinonowego geldanamycyny. W ten sposób Doktorantka otrzymała nowe pochodne triazolowe (GDM-40 do GDM-73). Do analizy wykorzystwała takie same procedury i techniki jak w pkt. (i).
- (v) nowe hybrydy geldanamycyny otrzymane w reakcji Hecka – w tej części pracy doktorskiej mgr Skrzypczak otrzymała dwie pochodne w których podobnie jak wcześniej podstawiała węgiel C(17) geldanamycyny linkerem sterynowym do którego przyłączyła kolchiceinę (GDM-73, 74, 76 i 77). Do analizy Doktorantka wykorzystwała takie same procedury i techniki jak w pkt. (i).
- (vi) nowe pochodne geldanamycyny zawierające ugrupowanie benzo[d]oksazolowe – w tej grupie związków Doktorantka otrzymała szereg pochodnych, podstawionych na węglu C(17) pochodnymi *para*-benzylowymi (GDM-78 do GDM-88). W wyniku prowadzonej syntezy z 4-cyjanobenzylaminą oraz 4-nitrobenzylaminą niespodziewanie powstały nowe pochodne o innej od spodziewanej strukturze. Dla niestandardowych pochodnych (GDM-96 i 97) przeprowadziła krystalizację, celem uzyskania pełnych informacji strukturalnych dla nowych związków. Okazało się, że doszło do heterocyklizacji w wyniku czego układ chinonowy uległ przekształceniu w układ heterocykliczny benzo[d]oksazolu. Doktorantka ustaliła wpływ obecności różnej natury podstawnika w położeniu *para* na przebieg reakcji heterocyklizacji. Zaproponowała również mechanizm tej reakcji. Otrzymane nowe związki, zawierające ugrupowanie benzo[d]oksazolowe, stały się inspiracją do otrzymania nowej podgrupy związków z układem benzo[d]oksazolu i z podstawnikiem *para*-benzylowym. Dla części związków z tej grupy otrzymane zostały struktury krystaliczne i zdeponowane w bazie CCDC. Do analizy Doktorantka wykorzystwała takie same procedury i techniki jak w pkt. (i).

Ta część rozprawy została wzbogacona tabelami ze szczegółowymi danymi spektroskopowymi i schematami reakcji chemicznych. W tym miejscu pragnę nadmienić, iż ilość pracy jaka została włożona w wykonanie tej części pracy jest olbrzymia i imponująca. Mgr Skrzypczak otrzymała łącznie 100! pochodnych geldanamycyny, w tym 33 nowych analogów aminowych oraz 10 opisanych w literaturze, 5 nowych analogów z rozerwanym mostem ansamycynowym, 5 soli N-alkiloamoniowych geldanamycyny podstawionych w pozycji węgla C(17) ugrupowaniem aminochinuklidynowym, 31 triazolowych pochodnych antybiotyku, 4 hybrydy z kolchicyną oraz 12 nowych pochodnych ansamycynowych zawierających nowy rdzeń benzo[d]oksazolowy.

W drugiej części rozdziału „Wyniki i dyskusja” Doktorantka na początku przeanalizowała dane strukturalne dla struktur krystalicznych związków GDM-1, GDM-9, GDM-12, GDM-24 do GDM-26, GDM-89 do GDM-99, w tym dwie z

niestandardowym ułożeniem mostu ansa. Porównała te struktury ze strukturą związku literaturowego 17-DMAP - inhibitora Hsp90. Analiza ta umożliwiła uzyskanie bardzo ciekawych i nowych informacji strukturalnych na temat mechanizmu wzajemnej konwersji formy wolnej w roztworze (*trans*-laktam) i formy związanej z Hsp90 (*cis*-laktam). W tej części pracy mgr Skrzypczak przedstawiła wyniki dotyczące badania reakcji wiązania glutationu (GSH) przez geldanamycynę oraz jej analogi. Wyniki tych badań pokazują dobrą korelację pomiędzy zwiększoną toksycznością związków a większym stopniem wiązania GSH. W kolejnej części podrozdziału Doktorantka przedstawiła zestawienie tabelaryczne wyników badań biologicznych dla pochodnych aminowych oraz z otwartym mostem ansa tj. aktywność przeciwnowotworową wyrażoną parametrem IC_{50} i selektywnością wobec wybranych ludzkich nowotworowych linii komórkowych. Tutaj pojawia się moje pytanie dotyczące wyboru takich a nie innych linii nowotworowych. Czy wiadomo jaki jest poziom ekspresji Hsp90 w tych liniach komórkowych? Różny poziom ekspresji tego białka mógłby potencjalnie wpłynąć na zróżnicowaną aktywność badanych związków. Wyniki badań biologicznych pokazały, iż sztywne ramię przyłączone do węgla C(17) zwiększa potencjał przeciwnowotworowy pochodnych, natomiast zerwanie struktury mostu ansa prowadzi do obniżenia tego potencjału. Doktorantka na podstawie danych biologicznych ułożyła badane związki w szereg związków o najwyższej aktywności przeciwnowotworowej a także zauważyła, że związki o wyższym potencjale przeciwnowotworowym posiadają wyższe wartości $clogP$, określające stopień lipofiliwości. Te o najwyższym potencjale biologicznym zadokowała do kieszeni wiążącej NBD białka Hsp90 i wskazała elementy strukturalne, zarówno po stronie inhibitora jak i po stronie Hsp90, odpowiedzialne za lepsze dopasowanie analogów niż cząsteczka natywna. Uzyskane struktury porównała z dostępnymi w bazie PDB strukturami innych kompleksów inhibitor-Hsp90. W kolejnym etapie mgr Skrzypczak przedstawiła wyniki siły wiązania wybranych analogów do Hsp90. Nie znalazłam w pracy informacji na jakiej podstawie wybrane zostały związki do badań ITC? Wyznaczone wartości stałych dysocjacji K_D pokazały, że analogi GDM-21, 22, 26 i 27 silniej wiążą się do Hsp90 niż geldanamycyna. Jednak ze względu na brak danych dotyczących błędu pomiaru nie można w mojej opinii stwierdzić tego definitywnie. Pewne jest natomiast, że analogi GDM-29 oraz 32, posiadające otwarty most ansa, wiążą się o dwa rzędy wielkości słabiej niż natywna cząsteczka. Oznacza to najprawdopodobniej, że analogi te nie blokują aktywności Hsp90 a ich aktywność biologiczna jest związana z innym celem molekularnym. Czy istnieje szansa, że badane analogi geldanamycyny wiążą się do domeny NBD innych białek chaperonowych? Następnie Doktorantka przedstawiła wyniki badań biologicznych dla kolejnej grupy pochodnych, charakteryzujących się obecnością podstawionej w pozycji C(17) aminochinolidyną. Pochodne te charakteryzowały się lepszą rozpuszczalnością (w porównaniu z GDM) oraz zmniejszoną toksycznością i względnie dobrą aktywnością biologiczną. Pochodne te Doktorantka zadokowała do Hsp90 i pokazała, że posiadają one dodatkowe oddziaływania hydrofobowe stabilizujące ich strukturę w kieszeni wiążącej Hsp90. Kolejne badania wykonane przez p. Natalię Skrzypczak dotyczyły skuteczności addytywnego działania dwóch analogów (dlaczego tylko tych?) geldanamycyny w obecności doksorubicyny (DOX) lub polietylenodiaminy (PEI). Wyniki tych badań pokazały, że dodatek tych związków powoduje zwiększenie lub zachowanie aktywności przeciwnowotworowej przy zwiększonej toksyczności wobec zdrowych linii komórkowych. W dalszej części mgr Skrzypczak przedstawiła wyniki badań biologicznych dla analogów połączonych z kolchicyną. Pokazała, że związki te posiadają wysoką aktywność przeciwnowotworową przy czym pochodne otrzymane w wyniku reakcji Hecka posiadały wyższą aktywność przeciwnowotworową w porównaniu z analogicznymi pochodnymi otrzymanymi na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Na zakończenie Doktorantka omówiła wyniki badań biologicznych dla analogów triazolowych w których geldanamycyna posiada linker alkinowy lub azydkowy. Wyniki dla tej grupy związków pokazały, że najbardziej aktywne są pochodne zawierające podstawiony układ benzyłowy oraz związek z przyłączoną D-galaktozą. Związek ten posiada najlepsze parametry biologiczne korelujące z obniżoną toksycznością. Nie znalazłam w pracy wyników badań biologicznych dla

ostatniej grupy związków zawierających ugrupowanie benzo[d]oksazolowe, co zapewne spowodowane było długim oczekiwaniem na wyniki badań biologicznych. Brak tych wyników nie umniejsza mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy doktorskiej. W moim odczuciu rozdział VII pracy doktorskiej jest przeładowany treścią i można by go podzielić na kilka mniejszych części co zyskałoby na przejrzystości pracy doktorskiej.

Przedostatni rozdział dysertacji został zatytułowany „Część eksperymentalna” i zawiera opis metod oraz procedur syntetycznych stosowanych przez Doktorantkę. W mojej opinii Pani mgr Natalia Skrzypczak zastosowała właściwe metody i procedury wymagane od chemika syntetyka i analityka. Doktorantka w swoich badaniach posługiwała się zarówno prostymi jak i zaawansowanymi metodami analitycznymi takimi jak TLC, HPLC, 2D NMR, FT-IR oraz ESI-MS. Dokonała obliczeń teoretycznych dla wybranych struktur z wykorzystaniem metod półempirycznych DFT i uwzględnieniem danych NMR oraz dokowania molekularnego analogów geldanamycyny do centrum katalitycznego białka Hsp90. W swoich badaniach dokładnie przeanalizowała wyniki badań biologicznych (testy aktywności, wyznaczanie współczynników IC_{50} , SI) a także strukturalnych (X-ray) i kalorymetrycznych (ITC). Wszystkie procedury syntezy, wydajności oraz pełna charakterystyka fizykochemiczna i spektroskopowa poszczególnych związków zostały szczegółowo i bardzo precyzyjnie opisane oraz nie budzą moich wątpliwości. Zastanowiła mnie jedynie dlaczego zastosowane zostały różne aparaty NMR i o różnej częstotliwości podstawowej tj. 400, 500 i 600 MHz. Mój niedosyt budzi również brak informacji na temat sposobu obliczania stałej K_D (przykładowa krzywa miareczkowania ITC), oraz danych termodynamicznych (ΔG , ΔS), które niewątpliwie były wynikiem eksperymentów ITC. Dane entropowe mogłyby rzucić dodatkowe światło na proces wiązania się poszczególnych analogów do kieszeni aktywnej Hsp90. W tej części pracy doktorskiej Doktorantka wskazała te części pracy eksperymentalnej, których nie wykonywała samodzielnie, ale za to przeprowadziła pełną analizę uzyskanych wyników. Warto nadmienić, że w ramach realizacji swojej pracy współpracowała nie tylko z osobami z poznańskiego ośrodka akademickiego (badania biologiczne oraz rentgenostrukturalne) ale także z ośrodkiem zagranicznym (pomiar ITC). Obecnie, duże firmy farmaceutyczne (np. Pfizer), do poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych, wykorzystują bioinformatyczną analizę metadanych biologicznych (poszukiwanie nowych celów molekularnych), stosują także biblioteki związków naturalnych w testach komórkowych oraz technologię CRISPR do określania lub wyłączenia genów potencjalnych celów molekularnych. Podstawę stanowią również testy przesiewowe dotyczące wiązania się związków z biblioteki z potencjalnym celem molekularnym. Podobne procedury w swojej pracy doktorskiej zastosowała mgr Natalia Skrzypczak (z pominięciem analizy metadanych oraz technologii CRISPR), co świadczy o światowym poziomie prowadzonych badań.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski swojej pracy doktorskiej. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam **zaprojektowanie, syntezę, pełną charakterystykę strukturalną samych związków oraz w kompleksie z Hsp90 oraz analizę zależności struktura-aktywność nowych analogów geldanamycyny o właściwościach przeciwnowotworowych**. Na szczególną uwagę zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę bardzo precyzyjnej analizy widm 2D NMR i FT-IR, potwierdzającej budowę chemiczną uzyskanych związków, oraz profesjonalnej analizy SAR. W tym miejscu powstaje naturalne pytanie dotyczące przyszłych, ewentualnych badań nad najbardziej aktywnymi związkami? Czy planowane są kolejne badania dla tych związków, np. badania in vivo? Czy najbardziej aktywne związki zostały objęte ochroną własności intelektualnej? Czy tak duża pula uzyskanych danych fizyko-chemicznych i biologicznych planowana jest do wykorzystania w analizie 3D QSAR, celem ukierunkowania kolejnych badań na rodzaj i miejsce modyfikacji geldanamycyny?

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie. Reasumując, uważam, że cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr Natalii Skrzypczak zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 18 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym. W tym odniesieniu wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie mgr Natalii Anny Skrzypczak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w uzyskanie **nowych inhibitorów białka Hsp90** o aktywności przeciwnowotworowej oraz ich pełnej charakterystyki strukturalnej i biologicznej, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Z poważaniem,



Sylwia Rodziewicz-Malenin

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 5.08.2022 r.

UZASADNIENIE

**na temat wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Skrzypczak
pt.: „Modyfikacje rdzenia benzochinonowego naturalnego makrolaktamu –
geldanamycyny oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe” wykonanej w Zakładzie Chemii Produktów
Naturalnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Przybylskiego**

Mając na względzie uzyskanie przez mgr Natalię Skrzypczak **nowych i bardziej skutecznych, niż te istniejące dotychczas, inhibitorów białka Hsp90** o aktywności przeciwnowotworowej oraz ich pełnej charakterystyki strukturalnej i biologicznej, zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Chemicznych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Celem głównym recenzowanej pracy, było otrzymanie nowych pochodnych geldanamycyny oraz ustalenie wpływu rodzaju modyfikacji na zależność struktura – aktywność biologiczna. Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie wpływu rozerwania makrocyclicznej struktury mostu na jego orientację względem rdzenia oraz na aktywność biologiczną. Prace te były podyktowane tym, że głównym problemem w stosowaniu geldanamycyny jako leku przeciwnowotworowego jest jej toksyczność (kwalencyjne wiązanie się z GSH), niska rozpuszczalność w wodzie powodująca ograniczoną biodostępność oraz niska stabilność chemiczna ze względu na udział w reakcjach redoks. Dlatego też, na początku swojej pracy Doktorantka zaproponowała szereg nowych pochodnych a każdą z zaproponowanych modyfikacji uzasadniła. Już sam fakt analizy dotychczas istniejących struktur analogów geldanamycyny i propozycja nowych analogów zasługuje na wielkie uznanie i dojrzałość naukową Doktorantki. Zaproponowane pochodne zsyntezowała i scharakteryzowała. Na pochwałę zasługuje bardzo rzetelna analiza strukturalna oraz stereoizomeryczna analiza danych. Na zakończenie mgr Skrzypczak przeanalizowała aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych i ustaliła zależność struktura-aktywność (SAR). Analiza, której dokonała jest bardzo obszerna i pokazuje które modyfikacje prowadzą do uzyskania związków o wyższej aktywności biologicznej. Biorąc powyższe pod uwagę, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Natalii Skrzypczak.

Z poważaniem,



