

Warszawa, 26.05.2023 r.

Recenzja
rozprawy na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i
przyrodniczych w dyscyplinie: nauki chemiczne
Pani mgr inż. Justyny Prajsnar

pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy
aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki
3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Macieja Guzika i prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk we współpracy z Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, a także z Laboratorium Mikrobiologii Farmaceutycznej w Centrum Badań Przedklinicznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Zakładem Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę monografii naukowej podzielonej na następujące części: wstęp teoretyczny, cel naukowy badań, badania własne i literaturę. Ponadto, praca została opatrzona streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim, spisem stosowanych skrótów, spisem tabel, spisem ilustracji, suplementem zawierającym wykresy widm i kartą wzorów oraz spisem treści.

We Wstępie teoretycznym Kandydatka przedstawia historię odkrycia antybiotyków β -laktamowych i badań nad ich wykorzystaniem, charakteryzuje poszczególne grupy tych antybiotyków uwzględniając zarówno ich budowę chemiczną jak i działanie na poszczególne grupy drobnoustrojów, szczegółowo opisuje mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych, mechanizmy oporności wytwarzane przez bakterie oraz modyfikacje chemiczne i stosowane inhibitory w celu przełamania oporności bakterii. Dalej Kandydatka wyjaśnia czym są polihydroksyalkaniany (PHA), opisuje ich budowę i właściwości, szczegółowo opisuje szlaki biosyntezy różnych rodzajów PHA i przedstawia je na schematach. Przedstawiony w rozprawie doktorskiej wstęp teoretyczny prezentuje szeroką wiedzę teoretyczną Kandydatki m.in. w zakresie chemii, w tym w szczególności, budowy i syntezy związków biologicznie czynnych, oraz



mikrobiologii, w tym mikrobiologii ogólnej, środowiskowej, przemysłowej i medycznej. Do tej części pracy mam jedną drobną uwagę: Kandydatka stosując nazwy gatunkowe bakterii nazwę rodzajową czasem podaje w całości a czasem w postaci skrótu tj. pierwszej litery nazwy rodzajowej. Sugerowałabym, aby w przyszłych pracach trzymać się schematu: po raz pierwszy użyta w tekście nazwa gatunkowa bakterii zawiera pełną nazwę rodzajową, a po raz kolejny przywoływana nazwa gatunkowa zawiera tylko skrót nazwy rodzajowej, tak jak jest to ogólnie przyjęte w literaturze naukowej.

Kandydatka wspomina m.in. właściwości biobójcze PHA względem bakterii *Listeria sp.* Jaka jest możliwość, zdaniem Kandydatki, zastosowania PHA w przemyśle spożywczym do zabezpieczania żywności przed skażeniem bakteriami?

Celem przeprowadzonych przez Kandydatkę badań było opracowanie nowych ścieżek otrzymywania penicylin poprzez wprowadzenie do cząsteczki kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego. Modyfikatorami wykorzystywanymi w syntezie nowych pochodnych 6-APA, były monomery polihydroksyalkanianów (PHA). Cel ten został bardzo dobrze uzasadniony m.in. potencjałem farmakologicznym PHA.

W badaniach własnych Kandydatka w pierwszej kolejności przeprowadziła eksperymenty w celu uzyskania modyfikatorów dla kwasu 6-Aminopenicylanowego jakimi były wybrane PHA, tj. poli-3-hydroksynonanoan (P(3HN)) należący do grupy polimerów alifatycznych oraz poli-3-hydroksy-5-fenylwalerianian (P(3H5PV)) z grupy aromatycznej. Do produkcji ww. związków wykorzystano dwa szczepy bakteryjne *Pseudomonas putida*: KT2440 oraz CA3, oraz dwie strategie hodowlane: hodowlę w 5-litrowym reaktorze i zastosowanie czynnika limitującego w postaci niedoboru fosforanów w podłożu hodowlanym, a także hodowlę w kolbach Erlenmeyera z wytrząsaniem i czynnikiem limitującym w postaci niedoboru azotanów w pożywce. Z ww. dwóch polimerów w wyniku depolimeryzacji uzyskała 3 monomery PHA: ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego, ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydrokseyheptanowego i ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego. Jako alternatywną drogę uzyskania estrów metylowych 3-hydroksykwasów Kandydatka wykorzystano również syntezę chemiczną uzyskując tożsame do powyższych monomery o równym udziale enancjomerów *R* i *S* w mieszaninie racemicznej. Następnie wszystkie otrzymane i oczyszczone estry metylowane 3-hydroksykwasów poddała reakcjom hydrolizy zasadowej, w wyniku których otrzymała następujące kwasy tłuszczowe: (*R*)-3-hydroksynonanowy, (*R*)-3-hydrokseyheptanowy, (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy, a także ich odpowiedniki będące mieszaninami racemicznymi. Strukturę związków uzyskanych na drodze fermentacji bakteryjnej oraz na drodze syntezy chemicznej Kandydatka potwierdziła stosując metody UHPLC-MS/MS, ¹H-NMR, IR oraz analizę CD.

W kolejnej części badań własnych Kandydatka skupiła się na opracowaniu nowych ścieżek otrzymywania zmodyfikowanych penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej. Jako cząsteczki przyłączane do 6-APA wykorzystwała pochodne PHA oraz ich odpowiedniki w formie mieszaniny racemicznej uzyskane w pierwszej części prac eksperymentalnych. W celu zwiększenia rozpuszczalności kwasu 6-APA w rozpuszczalnikach organicznych przeprowadziła reakcję estryfikacji. Do otrzymania nowych pochodnych 6-APA, w postaci estrów benzytowych na drodze syntezy chemicznej, Kandydatka wykorzystwała cztery różne tzw. odczynniki kondensujące, szeroko stosowane w chemii białek do wytwarzania wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami, obejmujące *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), heksafluorofosforan *O*-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetra-metylouroniowy (HATU), bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P) oraz jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (odczynnik Mucayama). Oceniała ich przydatność pod względem największej wydajności otrzymywania pochodnych 6-APA. Postęp reakcji monitorowała przy użyciu UHPLC-MS/MS. W wyniku przeprowadzonych badań Kandydatka stwierdziła, że wszystkie reakcje testowe z wybranymi odczynnikiem kondensującymi doprowadziły do powstania właściwego produktu, tj. nowych pochodnych 6-APA z dołączonymi 3-hydroksykwasami, jednak tylko w przypadku odczynnika T3P reakcja biegła do całkowitego wyczerpania jednego z substratów. Na tej podstawie Kandydatka wybrała reagent T3P jako najlepszy aktywator wszystkich testowanych kwasów karboksylowych.

Do otrzymania nowych pochodnych 6-APA, w postaci estrów benzytowych na drodze biosyntezy, Kandydatka wykorzystwała dwie lipazy, tj. CalB pochodzącą z *Candida antarctica* i TL-IM pochodzącą z *Thermomyces lanuginosus*. Obydwie lipazy charakteryzują się szerokim spektrum substratowym oraz dużym przedziałem tolerancji temperaturowej. Optymalizacja ścieżki biosyntezy pochodnych 6-APA obejmowała: wybór najlepszego rozpuszczalnika organicznego stanowiącego środowisko reakcji dla wybranych enzymów, optymalizację temperatury, wybór typu modyfikatora (kwasu lub estru) cząsteczki 6-APA oraz preferowanej przez enzym formy chiralnej cząsteczki dołączonej do pierścienia β -laktamowego. Również w tym przypadku przebieg reakcji był monitorowany przy użyciu UHPLC-MS/MS. W wyniku przeprowadzonych badań Kandydatka stwierdziła, że lipazą, która najwydajniej przeprowadzała aminolizę względem wybranych estrów metylowych 3-hydroksykwasów była lipaza TL-IM pochodząca z *T. lanuginosus*. Natomiast najlepszymi warunkami ustalonymi dla biosyntezy produktów z udziałem tego enzymu było zastosowanie jako środowiska reakcji bezwodnego toluenu oraz prowadzenie aminolizy w temperaturze 15°C.

W celu zwiększenia rozpuszczalności w wodzie uzyskanych związków otrzymane estry benzytowe pochodnych 6-APA poddano reakcji hydrolizy wiązania estrowego, w wyniku której otrzymano zmodyfikowane penicyliny w postaci soli sodowych.

Strukturę związków stanowiących półprodukty i produkty końcowe reakcji syntez Kandydatka potwierdziła stosując metody $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR oraz analizę CD. Weryfikacji mas produktów oraz ich stężenia w mieszaninie poreakcyjnej dokonała stosując analizę UHPLC-MS/MS.

W trzeciej części prac eksperymentalnych Kandydatka dokonała oceny aktywności biologicznych otrzymanych penicylin. Wykorzystując dwadzieścia różnych szczepów bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wykonała oznaczenia wrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową, oznaczyła wartości MIC oraz MBC. W badaniach korzystała z wytycznych EUCAST, które są rekomendacjami stosowanymi w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń, a uzyskane zgodnie z nimi wyniki stanowią wskazania w doborze terapii farmakologicznej. Tym samym uzyskane przez Kandydatkę wyniki badań mają bezpośrednie odniesienie do antybiotyków stosowanych obecnie w terapii zakażeń. Ponadto, Kandydatka zbadała genotoksyczność i cytotoksyczność otrzymanych związków stosując odpowiednio test „rec” *Bacillus subtilis* oraz test FDA/PI z wykorzystaniem linii komórkowej mysich embrionalnych fibroblastów MEF T3T. W swoich badaniach wykazała stosunkowo wysoką aktywność przeciwbakteryjną sześciu nowych, opracowanych przez siebie związków β -laktamowych wobec bakterii Gram-dodatnich oraz niektórych szczepów bakterii Gram-ujemnych. Co prawda wartości MIC i MBC wyznaczone dla nowych związków były zazwyczaj wyższe niż dla penicyliny G i amplicyliny, stosowanych obecnie w terapii zakażeń, ale ich genotoksyczność i cytotoksyczność były zdecydowanie niższe niż ww. antybiotyków stosowanych w medycynie, co może pozwolić na ich stosowanie w wyższych stężeniach terapeutycznych.

Metodyka wszystkich badań została przedstawiona w sposób rzetelny, umożliwiający odtworzenie wszystkich eksperymentów.

W wynikach dla każdej z ww. trzech części badań eksperymentalnych Kandydatka nie tylko przedstawia rezultaty własnych eksperymentów, ale także odnosi je do wyników uzyskanych przez innych badaczy, dokładnie wyjaśnia obserwowane zjawiska oraz mechanizmy prowadzące do uzyskanych rezultatów badań. Wyjaśnia dlaczego zastosowała wybrane metody oraz tryb postępowania. Uzyskane wyniki analizuje także w sposób mający znaczenie dla przyszłych zastosowań w przemyśle uwzględniając m.in. koszty przeprowadzonych biosyntezy, wydajność reakcji, straty przy oczyszczaniu poszczególnych związków, właściwości toksyczne uzyskanych związków, itp. Cytowana literatura obejmuje zarówno najnowsze publikacje, z ostatnich kilku lat, jak też publikacje starsze, w których przedstawione informacje są wciąż aktualne. Taki sposób opisanie wyników potwierdza doskonałą znajomość metod stosowanych w badaniach i ich mechanizmów działania, znajomość aktualnej literatury naukowej w podjętej dziedzinie badań oraz dojrzałość naukową Kandydatki.

Moje pytania do Kandydatki do części eksperymentalnej pracy:

Przeprowadzając biosyntezę PHA Kandydatka przygotowywała hodowle starterowe szczepów *P. putida* w określonej objętości, które inkubowała 12-16 h z ciągłym mieszaniem. Z czego wynikał przyjęty czas inkubacji tych hodowli (Gęstość? Faza wzrostu? Inne?)?

W metodzie dyfuzyjno-krażkowej, przy jakiej wielkości strefy zahamowania wzrostu wokół krążka Kandydatka przyjmowała, że dana pochodna 6-APA hamuje wzrost bakterii?

Należy podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny i obejmuje wiedzę m.in. z obszarów chemii, farmacji, mikrobiologii przemysłowej, mikrobiologii medycznej, genetyki bakterii oraz metody badań stosowane w tych obszarach. Sama rozprawa została przygotowana starannie, a uzyskane wyniki zostały nie tylko opisane, ale także przedstawione w formie graficznej w postaci wykresów i tabel. Ponadto do pracy załączono wykresy widm badanych różnymi metodami związków, zdjęcia wyników testów i wzory uzyskanych nowych pochodnych 6-APA.

Podsumowanie:

1. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki chemiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w ww. dyscyplinie odzwierciedlają zarówno obszerny wstęp teoretyczny, jak też doskonałe zrozumienie metodyki stosowanej w badaniach własnych oraz znajomość literatury naukowej w dyscyplinie, którą odzwierciedla odniesienie wyników badań własnych do badań prowadzonych przez innych naukowców. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej odzwierciedla m.in. bardzo szeroki warsztat badawczy Kandydatki, który obejmuje nie tylko metody chemiczne i fizyko-chemiczne, ale także mikrobiologiczne oraz testy z użyciem linii komórkowych. Co więcej, Kandydatka bardzo dobrze uzasadnia wybór poszczególnych metod badawczych. Należy również zauważyć, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były realizowane we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, co wskazuje na umiejętność współpracy interdyscyplinarnej Kandydatki, niezwykle potrzebnej we współczesnej nauce.

2. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które ma potencjalne zastosowanie w sferze gospodarczej i społecznej. W odpowiedzi na narastający w skali globalnej problem antybiotykooporności drobnoustrojów, a tym samym terapii zakażeń, Kandydatka podjęła się badań mających na celu opracowanie nowych ścieżek otrzymywania i modyfikacji penicylin z wykorzystaniem związków

pochodzenia bakteryjnego. W ich wyniku opracowała sześć nowych związków będących pochodnymi 6-APA z wprowadzonymi modyfikacjami w ich łańcuchu bocznym, które wykazują skuteczność przeciwbakteryjną, a ich cytotoksyczność i genotoksyczność są mniejsze niż stosowanych obecnie antybiotyków z grupy β -laktamów. Opracowane przez Kandydatkę ścieżki otrzymywania nowych penicylin mają charakter uniwersalny, ze względu na spektrum substratowe, co daje możliwość potencjalnego ich wykorzystania także dla innych chiralnych związków pochodzących z rodziny polihydroksyalkaninów, które mogą być wykorzystane w projektowaniu, a następnie otrzymywaniu nowych antybiotyków β -laktamowych.

3. Rozprawę doktorską stanowi praca pisemna w postaci monografii naukowej.

4. Do rozprawy doktorskiej dołączone zostało streszczenie w języku angielskim i w języku polskim.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie, a drobne uwagi jakie zawarłam w opinii nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Zawarte w recenzji pytania są podyktowane moją chęcią podjęcia dyskusji naukowej z Kandydatką.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Prajsnar pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Mając na uwadze wysoki poziom pracy oraz jej interdyscyplinarność i oryginalność wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Prajsnar. Uzasadnienie wniosku załączam do niniejszej recenzji.



Prof. dr hab. Aleksandra Anna Zasada

Załącznik do Recenzji

**Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Justyny Prajsnar pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz
enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego
poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia
bakteryjnego”**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Prajsnar pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego” ma charakter interdyscyplinarny i obejmuje szeroką wiedzę z wielu obszarów nauki, w tym m.in. chemii, w szczególności, budowy i syntezy związków biologicznie czynnych, farmacji, biologii, mikrobiologii ogólnej, środowiskowej, przemysłowej i medycznej oraz genetyki bakterii. Stosowany w pracy wachlarz metod badawczych jest bardzo szeroki i obejmuje metody i techniki badawcze wykraczające daleko poza dyscyplinę nauk chemicznych. Wybór wszystkich zastosowanych metod badawczych został dobrze przemyślany i w pełni uzasadniony. Rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom zarówno w zakresie zaplanowania i przeprowadzenia całego cyklu badań oraz interpretacji ich wyników, jak również w zakresie uzyskanych rezultatów stanowiących oryginalne rozwiązanie.

Tematyka przedstawionych w rozprawie badań jest odpowiedzią na aktualny globalny problem narastającej w szybkim tempie antybiotykoodporności drobnoustrojów, a tym samym problem ze skuteczną terapią zakażeń. Wpisuje się ona w światowy trend badań nad poszukiwaniem nowych związków biologicznie czynnych. W rozprawie doktorskiej przedstawione zostało oryginalne rozwiązanie obejmujące:

- 1) Zaprojektowane, uzyskane na drodze biosyntezy oraz syntezy chemicznej i scharakteryzowane pod względem chemicznym, aktywności przeciwbakteryjnej i toksyczności (cytotoksyczność i genotoksyczność) nowe związki o potencjale aplikacyjnym w obszarze substancji biologicznie czynnych stosowanych w terapii zakażeń;



NARODOWY
INSTYTUT
ZDROWIA
PUBLICZNEGO
PAŃSTWOWY INSTYTUT
BADAWCZY

2) Opracowane ścieżki otrzymywania nowych penicylin, które mają charakter uniwersalny, ze względu na spektrum substratowe. Przy zastosowaniu procedur opracowanych w ramach rozprawy doktorskiej możliwe jest projektowanie i otrzymywanie nowych antybiotyków β -laktamowych z wykorzystaniem także innych chiralnych związków pochodzących z rodziny polihydroksyalkaninów.

Ponadto, załączony do rozprawy doktorskiej życiorys Kandydatki pokazuje bogaty jak na ten etap kariery naukowej dorobek naukowy obejmujący m.in. osiem publikacji naukowych, w tym większość w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, zgłoszenie patentowe, liczne staże naukowe i szkolenia w ośrodkach krajowych i zagranicznych oraz aktywny udział w wielu konferencjach naukowych.

Mając na uwadze powyższe wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Prajsnar.

Prof. dr hab. Aleksandra Anna Zasada