



Wrocław, 27 stycznia 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anity Romanowskiej  
zatytułowanej „Projektowanie, synteza i badania biologiczne peptydomimetyków  
zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anity Romanowskiej, została wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG oraz Pani dr hab. Agnieszki Piwkowskiej, prof. IMDiK. Przedmiotem badań było otrzymanie i scharakteryzowanie pod kątem aktywności biologicznej serii peptydomimetyków posiadających zdolność penetracji błon komórkowych (CPP). Doktorantka przeprowadziła syntezy ponad 20 związków, a następnie wykonała szereg analiz weryfikujących działanie uzyskanych peptydomimetyków w modelach komórkowych. Realizacja pracy miała na celu uzyskanie peptydomimetyku efektywnie pokonującego barierę błony komórkowej, przy jednoczesnym braku toksyczności, oraz mogącego służyć jako transporter białek i kwasów nukleinowych do wnętrza komórki. Tak więc, tematyka badawcza jest bardzo aktualna, w szczególności w świetle poszukiwania efektywnych nośników leków biologicznych, a realizacja pracy pod opieką dwóch promotorów o interdyscyplinarnych zainteresowaniach badawczych zapewniła dostęp do wszelkich niezbędnych metod i prawidłowego zaplanowania prac eksperymentalnych zarówno z obszaru syntezy chemicznej, jak i biologii komórki.

Rozprawa doktorska mgr Romanowskiej jest napisana w języku polskim, liczy 204 strony, podzielona jest na pięć głównych rozdziałów, zawiera 91 rysunków, 25 tabel i 172 pozycje literaturowe. Praca składa się z *Przeglądu literaturowego*, *Celu pracy*, opisu zastosowanych metod, prezentacji uzyskanych *Wyników* oraz *Podsumowania i wniosków*. Rozprawa zawiera także rozdział prezentujący cytowaną literaturę, rozdział poświęcony dorobkowi naukowemu Doktorantki, wykaz zastosowanych skrótów, spis tabel i rysunków oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. *Spis Treści* jest dobrze zredagowany

i ułatwia lekturę rozprawy. Ogromnie żałuję jednak, że w rozprawie pominięty został rozdział *Dyskusja*. Wprawdzie Doktorantka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej pracy w *Podsumowaniu i wnioskach*, jednak krytyczna konfrontacja uzyskanych wyników z dotychczasowymi danymi literaturowymi, a także przedstawienie ich w szerszej perspektywie wraz z omówieniem ich potencjału aplikacyjnego zwiększyłyby jeszcze wartość rozprawy.

W obszernym *Przeglądzie literaturowym*, liczącym 48 stron, Doktorantka szczegółowo omówiła najważniejsze dla przedstawionych w rozprawie badań zagadnienia. Zawarła w nim informacje na temat budowy i funkcjonowania dwuwarstwy lipidowej, a także rodzajów transportu związków przez błonę komórkową. Przedstawiała poszczególne klasy peptydów zdolnych do „przechodzenia” przez błonę, a także zróżnicowane mechanizmy penetracji. Opisała także sposoby przyłączania różnego typu cargo do CPP. Druga część tego rozdziału poświęcona jest wybranym technikom eksperymentalnym, które Doktorantka wykorzystywała do przeprowadzenia charakterystyki oddziaływań poszczególnych peptydomimetyków, takim jak: mikroskopia sił atomowych (AFM), termoforeza w mikroskali (MST), powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR). Cały rozdział napisany jest kompetentnie, dobrze wprowadza w poszczególne aspekty rozprawy doktorskiej i świadczy o znajomości tematu przez Doktorantkę. Ponadto opatrzony jest bardzo starannymi i estetycznymi rysunkami samodzielnie wykonanymi przez Autorkę. Moje zastrzeżenia budzi jedynie sposób cytowania pozycji literaturowych. Odniesienia do bibliografii pojawiają się zawsze na końcu akapitów, które często są dość obszerne i zawierają informacje pochodzące z różnych źródeł. Poprawniej byłoby podawać referencje bezpośrednio po przytoczeniu konkretnych wyników eksperymentalnych.

Cel pracy został precyzyjnie określony. Zadaniem Doktorantki było zaprojektowanie, synteza i zweryfikowanie właściwości biofizycznych oraz biologicznych peptydomimetyków zbudowanych z reszt kwasu 2,3-diaminopropionowego (Dap, L lub D). Uzyskane związki w pozycji 3 Dap zawierały grupy guanidynowe, aminowe lub hydroksylowe. Część z nich dodatkowo znakowana była fluorescencyjnie przy użyciu fluoresceiny lub tetrametylorodaminy. Szczegółowe cele pracy obejmowały: badanie wpływu modyfikacji łańcucha bocznego peptydomimetyków na ich zdolność penetracji błon komórkowych, określenie mechanizmu penetracji błon biologicznych przez peptydomimetyki, ocenę wpływu liczby ugrupowań guanidynowych w cząsteczce na jej zdolność penetracji błon,

badanie wpływu uzyskanych związków na żywotność różnego typu komórek oraz przebieg cyklu komórkowego, analizę oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami a DNA, ocenę możliwości wykorzystania zsyntezowanych związków w charakterze czynników transfekcyjnych oraz nośników białek zapewniających ich transport do wnętrza komórki.

W rozdziale *Metodologia przeprowadzonych badań* Doktorantka szczegółowo opisuje wykorzystane w pracy techniki syntezy chemicznej poszczególnych peptydomimetyków oraz ich analiz z wykorzystaniem spektrometrii mas oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej. Ponadto dokładnie omawia techniki, które umożliwiły analizę oddziaływań uzyskanych związków z kwasami nukleinowymi, takie jak SPR, MST czy AFM. Znacząca część tego rozdziału poświęcona jest technikom eksperymentalnym z zakresu biologii komórki z wykorzystaniem różnych modeli komórkowych. Doktorantka skrupulatnie przedstawia testy biologiczne, które posłużyły do oceny cytotoksyczności badanych związków, ich zdolności penetrowania błon komórkowych, potencjału transportowania DNA plazmidowego oraz białek przez błonę, wpływu na cykl komórkowy oraz odpowiedziapoptotyczną komórki. Opanowanie różnorodnych metod badawczych, obok uzyskania wartościowych wyników, jest jednym z zasadniczych celów stawianych pracom doktorskim. Rozdział ten świadczy o wszechstronności mgr Romanowskiej, która z sukcesem połączyła techniki z zakresu syntezy chemicznej, chemii biofizycznej oraz biologii komórki i biochemii. Moje zastrzeżenie budzi jedynie umieszczenie technik z zakresu pomiaru oddziaływań w podrozdziale 4, którego tytuł „*Badania biologiczne*” sugeruje techniki z zakresu biologii komórki.

Rozdział poświęcony wynikom jest bardzo obszerny, zawiera szereg wartościowych danych i bezsprzecznie wskazuje na ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w badania objęte rozprawą. Opatrzony jest bogatą i staranną dokumentacją graficzną. Warto podkreślić, że Doktorantka wyraźnie zaznacza, które analizy wykonywane były przez innych badaczy lub we współpracy.

Doktorantka uzyskała 23 (na podstawie Tabeli 2) peptydomimetyki, które w stężeniach 10  $\mu\text{M}$  nie powodowały istotnej cytotoksyczności wobec większości badanych linii komórkowych. Wykazała, że wprowadzenie modyfikowanych oksakwasów z ugrupowaniem guanidynowym w miejsce reszt argininy peptydomimetyku powoduje wzrost jego zdolności penetracji błon komórkowych. Natomiast wymiana grup guanidynowych na grupy  $-\text{NH}_2$  skutkuje zmniejszeniem właściwości przenikania przez błony, podczas gdy zastąpienie ich

grupą –OH prowadzi do całkowitej utraty zdolności penetrujących. Stopień penetracji membran przez peptydomimetyki rośnie wraz z ilością ugrupowań guanidynowych obecnych w ich sekwencji. Co ciekawe, konfiguracja kwasu Dap (L *versus* D) nie wpływa znacząco na zdolności peptydomimetyków do przenikania przez błony.

Mgr Romanowska wykazała, iż peptydomimetyki zawierające w swojej sekwencji ugrupowania guanidynowe (związki 8, 10 i 11) oddziałują z kwasami nukleinowymi, a siła oddziaływania rośnie wraz z ilością grup guanidynowych. Peptydomimetyki te mogą być wykorzystywane jako związki umożliwiające transfekcje komórek plazmidowym DNA. Wnikają one do komórek wykorzystując dwa mechanizmy: makropinocytozę oraz endocytozę zależną od klatryn. W lizatach komórkowych związki te są stabilne przez co najmniej kilkanaście godzin, zarówno w środowisku kwasowym jak i obojętnym. Nie wpływają także znacząco na przebieg cyklu komórkowego.

W dalszej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka skupiła się na analizie zdolności wybranych peptydomimetyków do transportu białek do wnętrza komórki. W tym celu wykorzystwała streptawidynę (cargo) oraz biotynylowane peptydomimetyki (22 i 23) i wykazała, że utworzony kompleks wnika do wnętrza komórek wybranych linii komórkowych. Co więcej, analogiczny kompleks, w którym streptawidyna zastąpiona została  $\beta$ -galaktozydazą znakowaną streptawidyną, również efektywnie penetruje błony komórkowe, a dostarczony do wnętrza komórki enzym zachowuje swoją aktywność.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę oceniam bardzo wysoko i wierzę, że zapoczątkują one kolejne prace w zespole, mające na celu wykazanie potencjału aplikacyjnego wybranych związków, które mogą posłużyć jako efektywne nośniki leków.

Jak już wspomniałam brakuje mi w pracy rozdziału *Dyskusja*, zawierającego głębszą analizę uzyskanych danych w świetle wcześniej opublikowanych badań, a także omówienie szerszej perspektywy i propozycje dalszych prac. Końcowe wnioski sformułowane są jasno, precyzyjnie i znajdują potwierdzenie w zaprezentowanych wynikach doświadczeń.

Nasuwa mi się kilka zagadnień, o omówienie których prosiłabym Doktorantkę w trakcie publicznej rozprawy:

1. Peptydomimetyki penetrujące błonę komórkową są mało specyficzne względem konkretnych komórek/tkanek. Czy mimo to mogą one znaleźć realne zastosowanie jako nośniki leków?

2. Na str. 17-18 Doktorantka pisze, że „najczęstszym celem terapeutycznym podczas projektowania terapii przeciwnowotworowych jest DNA lub błona cytoplazmatyczna chorych komórek”. Jest to dość nieprecyzyjne sformułowanie, proszę o wyjaśnienie.

3. Na str. 19 znajduje się informacja, że prowadzone są liczne badania przedkliniczne dotyczące zastosowania CPP w leczeniu infekcji, stanów zapalnych oraz chorób nowotworowych. Proszę o podanie konkretnych przykładów.

4. W Tabeli 1, w tej samej pozycji znajduje się klasyfikacja CPP według właściwości fizykochemicznych oraz klasyfikacja według struktury. Czy dobrze rozumiem, że są to dwa oddzielne podziały i powinny zostać wyszczególnione osobno?

5. Proszę o krótkie przedyskutowanie przeciwbakteryjnego mechanizmu działania CPP. Czy peptydy takie mogą znaleźć praktyczne zastosowanie do zwalczania drobnoustrojów?

6. W jaki sposób nanorurki, opisywane przez Doktorantkę na str. 49, mogą działać jako efektywny czynnik transfekcyjny?

7. Akapit pod Rys. 20 na str. 51 jest niejasny. Proszę o skrótowe przedstawienie opisanych badań.

8. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie przyczyn zastosowania aż trzech różnych metod analizy żywotności komórek. Która z nich jest najbardziej wiarygodna?

9. Sformułowanie „wewnątrzkomórkowy transport białek” (str. 106) nie jest właściwe dla procesu translokacji zewnątrzkomórkowych białek do wnętrza komórki. Proszę o zaproponowanie innego tytułu podrozdziału 4.10.

10. Na jakiej podstawie wybrano zakres stężeń peptydomimetyków do badań cytotoksyczności?

11. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego na Rys. 41 pojawiają się trzy słupki dla kontroli, a także dlaczego w eksperymentach cytotoksyczności przedstawionych na Rys. 41 i Rys. 42 zastosowano różny zakres stężeń. Czy tylko jeden związek (8) ze wszystkich badanych w testach przedstawionych na Rys. 42 okazał się działać w sposób statystycznie różny od kontroli? W jaki sposób normalizowano wyniki przedstawione na Rys. 42? Czy w eksperymencie stosowano dwie niezależne kontrole dla 2-h i 24-h inkubacji (na wykresie przedstawiono tylko jedną kontrolę)?

12. Na jakiej podstawie wysunięto wniosek, iż związki 4a, 10a i 10b penetrują otoczkę jądrową i lokalizują się wewnątrz jądra (str. 126)? Dlaczego w eksperymentach mikroskopii

fluorescencyjnej nie wybarwiano jąder (np. DAPI)? Na jakiej podstawie wskazano lokalizację peptydomimetyków w komórkach (dane w Tabeli 20 i Tabeli 25)?

13. Na str. 133 Doktorantka pisze, iż związek 10 jest w niewielkim stopniu cytotoksyczny (Rys. 49). Analiza statystyczna żywotności komórek HB2 na to nie wskazuje. Podobnie stwierdzenie, że pozostałe związki nie wykazują cytotoksyczności przy wyższych stężeniach w komórkach MDA-MB-231 nie koreluje z przedstawioną statystyką. Proszę o komentarz. Jaki może być powód zwiększonej żywotności komórek traktowanych niskim stężeniem peptydomimetyku 11?

14. Eksperymenty przedstawione na Rys. 53 i Rys. 54 wskazują, że intensywność fluorescencji związku 4b w lizatach komórkowych nie zmienia się w obecności inhibitora endocytozy kaweolo-zależnej. Czy w eksperymencie tym zastosowano kontrolę pozytywną, wskazującą, że inhibitor ten w stosowanym zakresie stężeń rzeczywiście działa?

15. Proszę o komentarz na temat błędów stałych  $K_D$  przedstawionych w Tabeli 23 oraz na Rys. 56. Co one reprezentują? Jak należy je interpretować (ich wartości są bardzo duże)?

16. W jaki sposób wyznaczono stałe  $K_D$  z eksperymentów SPR? Jaki model zastosowano?

17. Jaki czas inkubacji komórek z peptydomimetykami zastosowano w eksperymencie, którego wyniki przedstawiono na Rys. 68? W jaki sposób można wyjaśnić fakt, że intensywność fluorescencji była największa po 24 h? Proces endocytozy jest procesem o szybkiej kinetyce, czy była to kwestia akumulacji związku w komórce?

18. Czy w eksperymentach z użyciem kompleksów  $\beta$ z -galaktozydazą (str. 166) po dodatkowym czasie inkubacji (2 h lub 24 h) stosowano jeszcze jedno przemywanie komórek?

19. W jaki sposób można wyjaśnić odmienne efekty obserwowane dla kompleksów Strp- $\beta$ -gal z poszczególnych peptydomimetykami w stechiometrii 1:2 i 1:4 (Rys. 73 i Rys. 74)?

20. Proszę o ponowne przeanalizowanie danych przedstawionych na Rys. 91 - opis na str. 183-184 nie odpowiada przedstawionym wynikom. Związek 11 powoduje spadek aktywności kaspazy 3 w komórkach HDFa, a nie jej wzrost. Natomiast w komórkach HS-695T obserwujemy efekt odwrotny (wzrost aktywności, a nie jak pisze Doktorantka spadek).

Praca jest napisana i zilustrowana bardzo starannie. Autorka nie ustrzegła się jednak błędów interpunkcyjnych, typograficznych i stylistycznych. Piąty i dziewiąty cel szczegółowy pracy nie są poprawnie sformułowane. Na niektórych wykresach brakuje podpisów osi (np. Rys. 40). W przypadku rysunków, zajmujących więcej niż jedną stronę, ich śledzenie ułatwiłoby wprowadzenie podpunktów (A, B, ...). W pracy kilka razy pojawiają niefortunne sformułowania (np. przedostatnie zdanie rozdziału 3, ostatnie zdanie podrozdziału 2.3, tytuł podrozdziału 4.11.2 *Metodologii*, tytuł rozdziału 2 *Wyników*, „trójramienna swastyka”, „badania naukowe donoszą”, „wyzwaniem zatem jest jego ucieczka z endosomu”, „powierzchnia ulokowana na szklanej płytce”, „nowa pożywka”). W tekście umieszczone są także odnośniki do rysunków, na których nie przedstawiono opisywanych wyników (np. str. 128-129, Rys. 46, brak danych dla związku 10a oraz 12a). W podpisach do rysunków brakuje informacji o liczbie powtórzeń. Pragnę jednak podkreślić, że są to nieznaczne uchybienia o charakterze edytorskim, niemające wpływu na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Anity Romanowskiej zatytułowanej „Projektowanie, synteza i badania biologiczne peptydomimetyków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego” jest wysoce pozytywna. Praca ma charakter interdyscyplinarny, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki uważam za niezwykle oryginalne i wartościowe. Mgr Romanowska w ramach pracy doktorskiej wykonała bardzo dużo doświadczeń, opanowując przy tym szerokie spektrum technik eksperymentalnych z różnych dziedzin chemii, biochemii i biologii. Oceniana praca dokumentuje opanowany przez Panią magister warsztat, który z pewnością umożliwi jej w przyszłości prowadzenie samodzielnie badań naukowych.

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668), stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Anity Romanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ze względu na fakt, iż przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy i dostarczają nowej wiedzy na temat peptydów penetrujących błony komórkowe, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

*Matgorzata Zakrzewska*