



**POLITECHNIKA ŁÓDZKA**  
**INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ**

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,  
prof. dr hab. Beata Kolesińska,  
tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

**Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr Anity Romanowskiej

Magister Anita Romanowska swoją pracę doktorską zatytułowaną „Projektowanie, synteza i badania biologiczne peptydomimetyków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Chemii Biomedycznej pod opieką dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. Uniwersytetu Gdańskiego oraz dr hab. Agnieszki Piwkowskiej, prof. Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie jest aktualna i można ją zdefiniować jako poszukiwanie nowych peptydów/peptydomimetyków penetrujących błony komórkowe użytecznych jako transportery cargo do komórki. Hydrofilowy charakter peptydów i białek czyni je nieprzepuszczalnymi przez błony komórkowe. Tak więc, aby dostarczać środki lecznicze oparte na peptydach lub białkach przez błonę plazmatyczną lub bariery nabłonkowe i śródbłonkowe, należy zastosować strategię zwiększania ich przenikania. Peptydy penetrujące do komórki (CPP) stanowią narzędzie transportu różnorodnych związków w tym peptydów i białek do komórek. CPP posiadają zdolność przenikania też przez różne nabłonki i barierę krew-mózg (BBB). Większość zastosowań CPP jako transporterów leków ukierunkowana jest na poszukiwanie nowych terapii przeciwnowotworowych oraz dystrofii mięśniowej.

Praca posiada klasyczną strukturę, wpisującą się w obszar badawczy realizowany w grupie dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG (dotyczy to prac syntetycznych i badania właściwości fizycznych i chemicznych) oraz badania właściwości biologicznych uzyskanych peptydomimetyków (prace realizowane pod opieką dr hab. Agnieszki Piwkowskiej, prof. IMDiK).

Zaprojektowanie, synteza i badanie aktywności biologicznej peptydomimetyków zawierających modyfikowane, za pomocą oksakwasów zawierających ugrupowania guanidynowe, aminowe, hydroksylowe, reszty kwasy L-2,3-diaminopropionowego wymagało

realizacji badań wielopoziomowych, dlatego też główny cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych obejmujących: 1) opracowanie syntezy peptydomimetków oraz ich znakowania za pomocą 5/6-karboksyfluoresceiny lub 5/6-karboksytetrametylorodaminy; 2) zbadanie wpływu struktury peptydomimetyków na ich zdolność przenikania przez błony komórkowe, w tym oceny liczby reszt guanidynowych w łańcuchu bocznym peptydomimetyku na penetrację błon komórkowych; 3) badanie mechanizmu penetracji otrzymanych peptydomimetyków przez błony komórkowe; 4) badanie wpływu otrzymanych peptydomimetyków na przebieg i regulacje cyklu komórkowego; 5) zbadanie właściwości penetrujących peptydomimetyków zawierających w łańcuchu głównym reszty wpływające na zmianę ułożenia w przestrzeni; 6) zbadanie oddziaływania peptydomimetyków z DNA; 7) zastosowanie otrzymanych peptydomimetyków jako czynników transfekcyjnych; 8) zbadanie możliwości zastosowania otrzymanych peptydomimetyków jako układów transportujących białka do wnętrza komórki.

Recenzowana praca liczy 204 strony. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje streszczenie, wykaz skrótów, przegląd literaturowy, cel pracy, metodologię przeprowadzonych badań, wyniki, podsumowanie i wnioski, dorobek naukowy, literaturę cytowaną, wykaz rysunków i tabel.

Rozdział pierwszy „Streszczenie” przedstawia w zwięzły sposób zakres zrealizowanych prac badawczych. Rozdział trzeci „Wykaz skrótów” został podzielony na spis skrótów występujących w części literaturowej oraz części doświadczalnej.

„Przegląd literaturowy” obejmuje podrozdziały dotyczące: budowy i funkcji błony komórkowej, w tym różnic w błonie komórkowej komórek zdrowych i nowotworowych, peptydów zdolnych do przenikania przez błony komórkowe (CPP), związków transportowanych przez błony komórkowe, mechanizmu przenikania CPP przez błony komórkowe, zróżnicowanych strukturalnie związków zawierających liczne ugrupowania guanidynowe, związków zdolnych do oddziaływania z DNA i wpływających na kondensację DNA. Ostatni podrozdział tej części dotyczy wybranych metod analitycznych wykorzystanych w pracy, w mojej opinii rozdział ten nie wnosi wiele do rozprawy, gdyż metody zostały opisane w sposób bardzo ogólny, podrozdział ten byłby przydatny, gdyby wskazane zostały przykłady ich wykorzystania w badaniu peptydów penetrujących błony komórkowe. Proszę o przedstawienie na obronie pracy doktorskiej przykładów zastosowania opisanych metod badawczych w aspekcie badania CPP. Proszę również o przedstawienie wad i zalet technik MST oraz SPR.



Rozdział ten liczy 47 stron i zawiera 152 odnośniki literaturowe. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy.

Lektura tego rozdziału nasunęła mi pytania, na które chciałabym uzyskać odpowiedź w trakcie obrony:

- 1) Proszę o syntetyczne przedstawienie miejsc działania leków przeciwnowotworowych. Na stronie 18, Doktorantka pisze bowiem, że „najczęstszym celem terapeutycznym podczas projektowania przeciwnowotworowej jest DNA lub błona cytoplazmatyczna” czy Doktorantka ma na myśli samą błonę komórkową, czy raczej białka lub inne związki „zanurzone” w błonie komórkowej?
- 2) Na czym polega wspomniana przez Doktorantkę na stronie 24 „dezoragnizacja” błony komórkowej pod działaniem kationowych CPP oraz amfipatycznych CPP?
- 3) Na czym polega ochrona przed działaniem proteaz i nukleaz w przypadku niekowalencyjnych kompleksów CPP a transportowanym związkiem (strona 31)?

Kolejny rozdział główny, „Cel pracy” przedstawia cel pracy wraz ze wskazaniem celów szczegółowych. W opisie Doktorantka zamieściła struktury związków, co z uwagi na ich dużą różnorodność znacząco ułatwia lekturę. Jedyna moja uwaga dotyczy samego sposobu opisu, cel główny został przedstawiony w formie przypuszczającej, zaś cele szczegółowe w formie dokonanej.

Rozdział „Metodologia przeprowadzonych badań” opisany jest na 41 stronach. Procedury i protokoły badań biologicznych przedstawione zostały w sposób umożliwiający ich odtworzenie. Początkowe podrozdziały dotyczące syntezy peptydomimetyków przedstawione zostały poprawnie, choć w mojej opinii brakuje pełnego opisu eksperymentalnego dla jednego wybranego peptydu. Wtedy to dane przedstawione w tabeli 7, 10, 11 byłyby bardziej czytelne. Proszę więc o omówienie w trakcie obrony metody syntezy wybranego peptydomimetyku. Zabrakło mi również informacji, dlaczego stosowane są różne odczynniki kondensujące w trakcie syntezy.

Ostatni główny rozdział „Wyniki” liczy 68 stron. Zawiera 51 rysunków oraz 7 tabel. W moim przekonaniu w rozdziale tym brakuje dyskusji. Doktorantka finalnie otrzymała 42 związki, z czego 36 peptydomimetyków. Ocenę ich cytotoksyczności wykonano względem linii komórkowych piersi HB2 i MDA-MB-231. Stwierdzono, że w stężeniu 10  $\mu$ M związki

te nie są cytotoksyczne. Stosując te same linie komórkowe Doktorantka sprawdziła, czy zsyntezowane peptydomimetyki posiadają zdolność przenikania przez błonę komórkową. Wykazano, że peptydomimetyki zawierające reszty oksakwasów z grupami guanidynowymi wydajnie przenikają przez błony komórkowe. Analogi zawierające grupy aminowe w miejsce guanidynowych charakteryzują się niższą zdolnością przenikania do komórek, natomiast w przypadku analogów zawierających oksakwasy z grupami hydroksylowymi nie obserwowano ich przenikania do komórek. Doktorantka wykazała również, że zdolność przenikania peptydomimetyków przez błony komórkowe zależy od ilości grup guanidynowych w związku. Obecność 4 lub 5 ugrupowań guanidynowych jest warunkiem koniecznym do uzyskania zdolności penetracji. Najwyższą efektywność obserwowano dla pochodnych zawierających 6-8 grup guanidynowych. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że konfiguracja kwasu 2,3-diaminopropionowego nie wpływa na efektywność przenikania przez błony komórkowe.

Peptydomimetyki **8**, **10** i **11** okazały się stabilne w lizatach komórek HB2 przez 24 godziny zarówno w środowisku kwaśnym jak i obojętnym. Natomiast w lizacie komórkowym MDA-MB-231 w środowisku obojętnym, wszystkie peptydomimetyki ulegają powolnemu rozkładowi (czas analizy 14 godz.), natomiast w środowisku kwaśnym są stabilne przez co najmniej 24 godziny. Doktorantka stwierdziła, że te same peptydomimetyki nie wpływają na przebieg cyklu komórkowego (badania na liniach HB2 i MDA-MB-231).

Peptydomimetyki **8**, **10** i **11**, zawierające reszty guanidynowe silnie oddziałują z DNA (ssDNA i dsDNA), przy czym siła oddziaływania zależy od ilości reszt guanidynowych w cząsteczce. Zastosowanie analogów peptydomimetyków **8**, **10** i **11** zawierających w miejsce grup guanidynowych reszty aminowe lub hydroksylowe znacząco osłabia zdolność oddziaływania z DNA. Doktorantka wykazała, że peptydomimetyki **8**, **10** i **11** mogą być stosowane jako środki transfekcyjne, zaś najefektywniejszy jest związek **10**.

Wykorzystanie kompleksów biotynylowanych peptydomimetyków i znakowanej fluorescencyjnie streptawidyny pozwoliło Doktorantce na stwierdzenie, że kompleksy te są efektywnie przenoszone do komórek HB2, MDA-MB-231, SKBr3 i T47D. Podobne wnioski, Doktorantka wysunęła stosując kompleks streptawidyna- $\beta$ -galaktozydaza z biotynylowanymi peptydomimetykami. Potwierdzeniem efektywność transportu przez błonę komórkową był wzrost  $\beta$ -galaktozydaza w komórkach. Zastosowanie znakowanych fluorescencyjnie peptydomimetyków **10** i **11** pozwoliło Doktorantce na stwierdzenie, że związki te są transportowane przez błony komórkowe linii komórkowych piersi, pęcherza, skory, podocytów szczurzych oraz makrofagów białaczki mysiej.



Ostatni rozdział główny „Podsumowanie i wnioski” napisany jest spójnie.

Praca przygotowana została starannie od strony edytorskiej. Jedynym mankamentem jest czytelność kilku rysunków (np. rys. 41).

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach. Dodatkowym atutem recenzowanej pracy jest bezpośredni udział Doktorantki w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr Anity Romanowskiej składa się 3 publikacje, z czego 2 w czasopismach z listy JCR. Jedna z publikacji bezpośrednio związana jest z rozprawą doktorską. W publikacji w International Journal of Molecular Science Doktorantka jest pierwszym współautorem, i to właśnie ta praca stanowi podstawową część recenzowanej rozprawy. Pani mgr Anita Romanowska jest również współautorem oryginalnej pracy naukowej opublikowanej w materiałach konferencyjnych. Jest też współautorem siedmiu komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych. Doktorantka brała udział w czterech projektach naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz doktorantów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Anity Romanowskiej. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Anity Romanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 25 01 2022