



Wrocław, 10.09.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pianki pt. „Projektowanie i synteza chemiczna analogów RTD-2 oraz analiza ich aktywności biologicznej wobec linii komórkowych raka piersi”**

Praca doktorska Pani mgr Joanny Pianki została wykonana w dwóch laboratoriach tj. w Zespole Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego oraz w Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest Pan prof. dr hab. Adam Lesner, kopromotorem Pan dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed, natomiast promotorem pomocniczym Pani dr Natalia Gruba. Tematem rozprawy było zaprojektowanie i otrzymanie uproszczonych analogów  $\theta$ -defensyny, a następnie przebadanie ich aktywności biologicznej z wykorzystaniem szeregu linii komórkowych raka piersi. Poszukiwanie skutecznych substancji w walce przeciw najbardziej zjadliwym formom raka piersi jest bardzo istotne z punktu widzenia farmaceutycznego i zdrowia ludzkiego. Praca w tym temacie stanowi kontynuację prac prowadzonych przez obu promotorów Doktorantki.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska licząca 145 stron jest napisana w języku polskim i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wstęp, będący przeglądem literaturowym, cel pracy, część: materiały i metody, podzielona na część syntetyczną i badania biologiczne, rezultaty, podzielone w podobny sposób, podsumowanie i dyskusję oraz spis literatury. Spis ten obejmuje 199 pozycji, które zostały w przeważającej części opublikowane w ostatnim 20-leciu. Do pracy dołączony jest wykaz używanych skrótów, lista 42 ilustracji i 11 tabel, które znalazły się w rozprawie.

Wstęp pracy, liczący 27 stron, został napisany dość zwięźle i posiada najważniejsze informacje poświęcone naturalnym peptydom przeciwdrobnoustrojowym (w skrócie AMP). Przedstawiony jest tu rys historyczny związany z odkryciem najistotniejszych AMP, opis struktur, klasyfikacja, aktywność biologiczna i mechanizm działania. Można tu w szczególności znaleźć informacje o defensynach jako części wrodzonego układu odpornościowego. Autorka dokonała tu podziału defensyn zgodnie z ich odkryciem, budową i aktywnością biologiczną. Szczególnie ciekawy jest opis funkcji odmiennych od działania

przeciwdrobnoustrojowego, który związany jest między innymi z ich cytotoksycznością i stymulacją wzrostu. Ostatnia część wstępu poświęcona jest najmłodszej i zarazem najbardziej odmiennej pod względem budowy i funkcji grupie defensyn, a mianowicie  $\theta$ -defensynom. Te cykliczne peptydy pochodzenia zwierzęcego powstają w wyniku procesowania produktów białkowych powstałych w wyniku ekspresji genów DEFT i następczej biosyntezy. Procesowanie to obejmuje między innymi powstawanie mostków disulfidowych oraz ligację dwóch 9-aminokwasowych demidefensyn. W rozprawie brak jest opisu w jaki sposób te reakcje zachodzą – tu prosiłbym Doktorantkę o krótki komentarz, głównie w temacie ligacji typu „głowa-ogon”. Ostatnia część poświęcona jest właściwościom cytotoxicznym  $\theta$ -defensyn w kontekście potencjalnego zastosowania ich w terapiach przeciwnowotworowych. Podrozdział ten jest *de facto* punktem wyjścia do celu pracy obejmującego syntezę siedmiu uproszczonych analogów defensyny RTD-2 zawierającej jeden mostek disulfidowy, a następnie przebadanie ich aktywności biologicznej względem panelu linii komórkowych pochodzących z różnych podtypów nowotworu piersi, których leczenie wymaga chemioterapii lub/i leczenia operacyjnego. Sam rozdział cel pracy liczący dwie strony jest nieco przegadany i zawiera niepotrzebnie informacje znajdujące się w poprzednim rozdziale. Niemniej jednak jest on klarowny, a znajdujący się tam schemat jest przejrzysty dla czytelnika. O ile zamierzenie Doktorantki dotyczące przebadania różnic pomiędzy peptydami zawierającymi reszty hydrofilowe wstawione w pozycje reszt cysteinowych, które nie tworząc mostków jest klarowne, o tyle sam wybór RTD-2 nie jest w pełni jasny. We wstępie znajduje się co prawda informacja o tym, że RTD-2 wykazuje pewną cytotoxicność, nie ma tam jednak informacji o cytotoxicnych właściwościach innych  $\theta$ -defensyn. Domyślam się, że wybór tego, a nie innego peptydu cyklicznego podyktowany był wcześniej prowadzonymi badaniami. Proszę Autorkę o przedstawienie powodów wyboru tego peptydu, a także komentarz dotyczący różnic we właściwościach cytotoxicnych  $\theta$ -defensyn o ile były one przebadane.

Część metodyczna pracy, jak wspomniałem wcześniej, podzielna jest na dwie wyraźne części obejmujące część syntetyczną oraz badania biologiczne. W obu z nich znajduje się wykaz stosowanych odczynników/materiałów, aparatury, linii komórkowych, szczegóły dotyczące syntezy chemicznej podzielone na liczne podrozdziały, a także procedury związane z hodowlą komórkową, inkubacją komórek z badanymi związkami czy opis stosowanych metod immunochemicznych. Opis syntezy czy modyfikacji peptydów jest sporządzony dokładnie i nie budzi wątpliwości co do rzemiosła i procedur. Autorce jednak umknęło kilka detali, które mogłyby znaleźć się w opisach procedur. Nie zauważyłem na przykład jakich aminokwasów z grupą blokującą Fmoc używała Doktorantka podczas syntezy. Jest to dość istotne przy tworzeniu mostku disulfidowego. W opisie nie jest podany też gradient fazy A i B używany podczas oczyszczania. Domyślam się, że mógł być on różny w zależności od oczyszczanego peptydu – wówczas detale dotyczące tego mogłyby znaleźć się pod chromatografami prezentowanymi w części wynikowej. Opis procedur w części badania biologiczne nie budzi zastrzeżeń, został on przygotowany bardzo przejrzysto.

Rozdział wyniki, tak jak przystało na pracę eksperymentalną, to najobszerniejszy z rozdziałów rozprawy. Ta część, podobnie jak materiały i metody, została podzielona na część chemiczną i biologiczną.

W pierwszej z nich Autorka umieściła krótki opis syntezy i oczyszczania poszczególnych peptydów wraz z chromatogramami HPLC oraz widmami MS produktów syntezy. Brakuje tu informacji o wydajności syntezy i oczyszczania poszczególnych peptydów. Myślę, że cenne byłoby również umieszczenie widm fluorescencyjnych zmodyfikowanych peptydów jako dowodów na to, że otrzymane związki wykazują oczekiwane właściwości optyczne. W części biologicznej Doktorantka umieściła wyniki testów cytotoksyczności poszczególnych peptydów względem wybranych linii komórkowych raka piersi. W hodowlach dwuwymiarowych żaden z analogów RTD-2 nie wykazywał zadowalającej skuteczności. Najbardziej wrażliwe okazały się tu komórki HB2, stanowiące linię kontrolną, dla których przy najmniejszym testowanym stężeniu zauważono spadek żywotności komórek o co najmniej 10%. Wiem, że Autorka nie syntezowała peptydu RTD-2, a jedynie uproszczone jego wersje, ale to właśnie użycie tego peptydu byłoby tu świetną kontrolą wobec uzyskanych analogów. W kolejnym etapie, słusznie zresztą, Doktorantka przeprowadziła testy cytotoksyczności wykonując hodowle trójwymiarowe oddające w lepszy sposób warunki fizjologiczne. W tym wypadku wybrano analogi zawierające resztę Arg, Thr i Ser w pozycjach 3, 7, 12 i 16 kierując się wynikami hodowli dwuwymiarowych. Przeprowadzone badania potwierdziły, że analog serynowy charakteryzuje się największym zahamowaniem proliferacji komórek nowotworowych. Wykonane testy stężeniowe pokazały, że działa on bardzo dobrze już przy stężeniu 1 µg/ml obniżając żywotność komórek linii MDA-MB-231 o ponad 70%. Bardzo ciekawym eksperymentem było użycie analogów RTD-2 wraz z chemioterapeutykami by sprawdzić, czy badane peptydy są w stanie uwrażliwić komórki MDA-MB-231 i spotęgować działanie chemioterapeutyków. Faktycznie, jednoczesne ich podanie spowodowało nasilenie działania cytotoksycznego doksorubicyny i cisplatyny zapewne z powodów dezintegracji błony i zwiększonej permeabilizacji. Jest to zdecydowanie najciekawszy i najbardziej wartościowy wynik uzyskany przez Doktorantkę. Wskazuje on na to, że możliwe jest obniżenie stężeń dawek chemioterapeutyków przy zachowaniu ich aktywności i jednoczesne obniżenie niepożądanych skutków ubocznych terapii.

Przedostatnia część badań to określenie zależności od czasu lokalizacji komórkowej otrzymanych analogów RTD-2 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Nie jest dla mnie jasne dlaczego peptydy, których celem jest dezintegracja błony komórkowej mają się specyficznie lokalizować w komórce. Uzyskane wyniki mikroskopowe dla linii MDA-MB-231 oraz T47D wskazują, że fluorescencyjne pochodne peptydu w zależności od budowy lokalizują się albo w błonie lub w tzw. przedziale okołojądrowym. Bardzo proszę o komentarz w tej sprawie.

Kontynuacją badań nad lokalizacją komórkową analogów RTD-2 była próba określenia z jakimi makromolekułami (głównie białkami lub ich grupą) owe peptydy mogą oddziaływać w komórce z zastosowaniem analizy proteomicznej. W tym celu Doktorantka otrzymała pochodną analogu serynowego zawierającą resztę biotyny, która charakteryzowała się tymi samymi właściwościami cytotoksycznymi co peptyd niezmodyfikowany. Lizaty komórek MDA-MB-231 oraz T47D inkubowane z peptydem biotynylowanym oraz kontrolne poddano procedurze immunoprecypitacyjnej na złożu awidynowym. Otrzymane w wyniku tego pelety analizowano z użyciem spektrometrii mas celem identyfikacji

znajdujących się w nich makromolekuł, a także ich ilościowej analizie bez zastosowania znaczników zgodnie z metodą LFQ. Zidentyfikowane białka, ale także inne molekuly zostały umieszczone w ogromnych Tabelach 9 i 10 z podaniem lokalizacji komórkowej oraz tzw. „specyficzności”, która jest przyrównaniem próbki badanej do kontrolnej. Na podstawie otrzymanych specyficzności białka znajdujące się w konkretnych lokalizacjach komórkowych zostały pogrupowane dla obu linii i przeanalizowane pod względem zmniejszonej lub zwiększonej ekspresji (Rysunek 40 i 41). Porównanie profili proteomicznych dla obu linii pozwoliło Autorce zidentyfikować dziewięć wspólnych białek wykazujących specyficzność względem serynowego analogu RTD-2. Konkluzją tej analizy jest stwierdzenie, że peptyd „posiada prawdopodobnie podwójny efekt prowadzący do zwiększenia poziomów ligandów lub zahamowania uwalniania białek wewnątrz i zewnątrzkomórkowych”. Konkluzja ta jest niejasna co do jej brzmienia, a także ze względu na samą analizę porównawczą. Proszę o dokładny opis przebiegu analizy LFQ oraz tego, jak Autorka doszła do wniosku o zwiększonej czy zmniejszonej ekspresji genów. Do badania tego typu zjawisk stosuje się chociażby ilościową analizę mRNA.

Rozprawę wieńczy rozdział Podsumowanie i dyskusja, która jest mocno zdominowana informacjami na temat zidentyfikowanych białek i ich lokalizacji w komórkach. Autorka zgrabnie konkluduje na temat przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników w postaci dziewięciu punktów. O ile zgadzam się z większością konkluzji, o tyle najmniej z tym, że analog RTD-2 lokalizuje się głównie w przestrzeni okołojądrowej lub jądrowej (punkt 7). Zarówno pomiary mikroskopowe jak i analiza MS nie są wystarczające przekonywujące, by tak stwierdzić. W pomiarach mikroskopowych zabrakło badań kolokalizacji peptydu/powstających kompleksów z wyznakowanymi markerami danych kompartmentów komórkowych. Brakuje też zdjęć z bright-field, aby zobrazować morfologię komórki. Analiza immunoprecypitacyjna w połączeniu z MS ukazuje ogromną ilość zidentyfikowanych białek, co wskazuje na małą specyficzność całego zabiegu. Zdecydowanie zgadzam się z Doktorantką (punkt 9), że potrzebna jest dalsza poszerzona analiza molekularna na temat partnerów oddziaływania. Zdecydowanie badania biofizyczne nad zidentyfikowanymi partnerami mogłyby rzucić więcej światła na temat specyficzności interakcji.

Poza uwagami umieszczonymi wyżej, nie mam zasadniczych zastrzeżeń do recenzowanej rozprawy. Praca napisana jest poprawnym językiem, opatrzona jest w starannie wykonane ilustracje – choć w niektórych wypadkach zwiększenie rozdzielczości (głównie struktur) pomogłoby w lepszym odbiorze pracy. Zdecydowanie podpisy pod ilustracjami i tabelami mogłyby posiadać więcej informacji. Połączenie tego z krótkimi opisami wyników wymaga od czytelnika albo dużego doświadczenia w prowadzonych przez Autorkę badaniach lub domysłów na temat przeprowadzonych eksperymentów. Realizacja pracy wymagała od Doktorantki sporej wiedzy i doświadczenia na temat syntezy i oczyszczania peptydów a także prowadzenia linii komórkowych i realizacji, często niełatwych eksperymentów związanych z liniami. Zdecydowanie połączenie kilku dziedzin nauki w postaci projektu pracy doktorskich jest bardzo rozwijające i prowadzi do ciekawych wyników.

Z obowiązku recenzenta umieszczam poniżej listę pewnych niedociągnięć i błędów, których nie uniknęła Autorka. Są to jednak błędy mało istotne, ale prowadzą do pewnych nieporozumień w odbiorze rozprawy:

- 1) strona 13 'Niestety wiele leków...' w tym zdaniu pojawił się chyba błąd i zamiast słowa proliferacja (mnożenie się) chyba chodziło o degradację/obumieranie.
- 2) Ogólna uwaga do większości wykresów: brakuje policzenia istotności statystycznej pomiędzy linią kontrolną HB2 a liniami badanymi.
- 3) Ogólna uwaga do zdjęć mikroskopowych — brakuje skali.
- 4) Strona 77, Rysunek 30: w eksperymencie mającym na celu określenie możliwie niskiej dawki badanego peptydu nie uwzględniono linii kontrolnej HB2.
- 5) Strona 78, Rysunek 31 aby poprzeć tezę Doktorantki, że "jednoczesne podawanie analogów defensyn z chemioterapeutykami spowodowało nasilenie działania cytotoksycznego względem komórek linii MDA-MB-231" należałoby zbadać istotność statystyczną pomiędzy próbami poddanymi działaniu jedynie peptydu Ser\_RTD-2 oraz jedynie chemioterapeutyków a próbami poddanymi jednoczesnemu działaniu obu tych związków.
- 6) Strona 78, Rysunek 31B: Wykres A i B jest identyczny, brakuje wykresu dla eksperymentu z doksorubicyną!
- 7) Tabela 9 i 10. Brak jest podanej logiki uporządkowania składowych tabeli. Tak spore tabele umieszcza się zazwyczaj w suplementach.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Pianki spełnia wymogi ustawowe, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Joanny Pianki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

