

dr hab., prof. UG  
Sylwia Rodziewicz-Motowidło  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.10.2016 r.

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Filipowicz**

**pt. „Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych” wykonanej w Katedrze Biochemii Molekularnej, w Pracowni Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego**

**(promotor: dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG)**

Tematyka dysertacji opiera się na zastosowaniu peptydów, ulegających tzw. splicingowi, jako wektorów do wprowadzania peptydów o zadanej aktywności biologicznej lub sond fluorescencyjnych do wnętrza komórek. Powszechnie, proces splicingu kojarzy się z tzw. składaniem genu, który polega na usunięciu intronów i połączeniu eksonów z prekursorowego mRNA. Proces ten zachodzi u organizmów eukariotycznych z udziałem cząsteczek mRNA, które w ten sposób dojrzewają, zawierając w swoim składzie jedynie fragmenty kodujące i jest katalizowany przez kompleks białek z RNA bądź autokatalitycznie z udziałem samego RNA. Podobny proces odkryto w latach 90 ubiegłego wieku w białkach. Proces splicingu białkowego polega na autokatalitycznym wycinaniu fragmentów białek z ich własnych prekursorów. Stosunkowo niedawno, bo w roku 2004 odkryto proces splicingu peptydowego w procesie tworzenia immunogennych peptydów z fragmentów białek. Proces ten zachodzi wewnątrz kanału części katalitycznej proteasomu. W roku 2010 odkryto, że analogi inhibitora trypsyny SFTI-1 o podwojonej sekwencji, również ulegają procesowi splicingu peptydowego. Peptydy te pod wpływem działania enzymu z rodziny proteinaz serynowych ulegają splicingowi peptydowemu. W wyniku tego procesu środkowy fragment peptydu zostaje wycięty, następuje resynteza jednego miejsca reaktywnego i odtwarza się monocykliczny peptyd SFTI-1 lub jego analog. Wykorzystanie wyciętego fragmentu peptydowego jako wektora lub inaczej nośnika peptydowej sekwencji aktywnej to zupełnie nowatorski pomysł na zastosowanie splicingu peptydowego do wprowadzenia do wnętrza komórki peptydu o aktywnej biologicznie sekwencji lub sondy fluorescencyjnej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje zakres projektowania peptydów ulegających splicingowi, badania ich trwałości proteolitycznej i ich aktywności inhibitorowej, badania stabilności peptydów w surowicy krwi ludzkiej oraz badania przenikania znakowanych fluorescencyjnie peptydów do wnętrza komórek. Dla zsyntetyzowanych peptydów zaprezentowane zostały również wyniki badań biologicznych, wśród których wymienić należy badania cytotoksyczności wobec komórek zdrowych i komórek nowotworowych oraz internalizacji przez komórki.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy doktorskiej jest niezwykle aktualna a przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania pozwoliły na (i) pogłębienie wiedzy w zakresie projektowania nowych peptydów

ulegających splicingowi z jednoczesnym uwolnieniem sekwencji aktywnej oraz na (ii) ukazanie możliwości zastosowania peptydów ulegających splicingowi jako nowej generacji leków przeciwnowotworowych. Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Łęgowskiej, prof. UG na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotor pracy od wielu lat prowadzi badania w zakresie projektowania oraz syntezy nowych inhibitorów proteinaz serynowych, ze szczególnym uwzględnieniem SFTI-1.

Praca ma układ typowy dla prac doktorskich z zakresu chemii. Całość rozprawy obejmuje 139 stron maszynopisu i podzielona jest na 3 główne rozdziały (tj. część literaturowa, badania własne z celem i planem pracy, wyniki i dyskusja). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów i symboli. Na końcu pracy znajduje się spis tabel i rysunków oraz spis piśmiennictwa, który obejmuje 157 pozycji (12 stron). W pracy umieszczono 12 tabel i 53 rysunki, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Warto zaznaczyć, iż praca jest napisana poprawną polszczyzną a poszczególne rozdziały są krótkie aczkolwiek „treściwie”, co sprawia, iż czyta się ją z dużym zainteresowaniem.

W pierwszej części pracy, Doktorantka wprowadziła czytelnika w świat enzymów oraz ich inhibitorów. W tej części pracy znajduje się opis podziału enzymów ich działania ze szczególnym uwzględnieniem proteinaz serynowych. W części literaturowej Pani Filipowicz opisała również białkowe inhibitory proteinaz serynowych ze szczególnym uwzględnieniem inhibitorów trypsyny wyizolowanych z nasion słonecznika SFTI-1, co w świetle projektowanych i syntetyzowanych peptydów wydaje się logiczne. W kolejnym podrozdziale części literaturowej Doktorantka opisała procesy splicingu zachodzącego w biomolekułach oraz opisała peptydy jako substancje przeciwnowotworowe oraz peptydy zawierające w swojej sekwencji motyw RGD jako inhibitory integryn. Na zakończenie w krótkim rozdziale Doktorantka opisała zasady działania techniki FRET w aspekcie zastosowania tej techniki do badań docelowego ułożenia badanych związków. W tej części pracy pewien niedosyt budzi opis aktywności przeciwnowotworowej peptydów zawierających sekwencję RGD. Dopiero po zasięgnięciu informacji z oryginalnej literatury (Nature, 1999) dowiedziałam się, że peptydy te odpowiadają za aktywację wewnątrzkomórkową prokaspazy-3, białka o aktywności proapoptycznej. Na zakończenie tej części recenzji dodam, iż Doktorantka podjęła w części literaturowej wiele różnych tematów, ale jest to w pełni uzasadnione z uwagi na obiekty badawcze, czyli „multi-funkcyjne peptydy”. Doktorantka poradziła sobie z tym problemem świetnie i sprawnie przeprowadziła czytelnika przez kolejne tematy i rozdziały, co z pewnością wymagało od niej zdobycia „multi-tematycznej” wiedzy.

W kolejnej części pracy mgr Filipowicz przedstawiła cele jakie postawiła w swoim doktoracie, do których należało:

- (1) Ustalenie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać peptyd, aby uległ splicingowi peptydowemu;
- (2) Wykazanie, że zaprojektowane i syntetyzowane związki mogą mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w aspekcie aktywności przeciwnowotworowej;
- (3) Uzyskanie wygodnego narzędzia w postaci techniki FRET do śledzenia splicingu peptydowego w układach biologicznych.

Po wstępie teoretycznym i przedstawieniu celu i planu pracy Doktorantka w sposób zwięzły (13 stron) opisała stosowaną przez siebie metodologię syntezy peptydów, opisała sposób tworzenia mostków disulfidowych w syntetyzowanych przez siebie peptydach, sposób oczyszczania otrzymanych analogów SFTI-1 oraz sposób przeprowadzenia analizy HPLC i MS otrzymanych peptydów. Ta część rozdziału jest najbardziej obszerna i pokazuje dobre przygotowanie warsztatu pracy Doktorantki. W rozdziale tym mgr Filipowicz opisała również procedury

przeprowadzonych badań biologicznych, zastosowane dla zsyntetyzowanych związków oraz w jaki sposób badała przechodzenie analogów SFTI-1, zawierających znaczniki fluorescencyjne przez błony komórkowe. Zastosowane przez Doktorantkę metody są standardowe i powszechnie używane w zakresie syntezy, oczyszczania oraz badań fizykochemicznych i biologicznych peptydów.

W kolejnym rozdziale pracy, zatytułowanym „Wyniki i dyskusja”, Doktorantka na początku opisała przebieg syntezy oraz podała charakterystykę dwudziestu czterech otrzymanych peptydów. Dla każdego z nich umieściła dla każdego zsyntetyzowanego peptydu widma MS i chromatogramy HPLC, co w sposób jednoznaczny wskazuje na uzyskanie przez Doktorantkę związków o pożądanej strukturze i o pożądanej czystości. W dalszej części pracy mgr Filipowicz opisała w jaki sposób zaprojektowała nowe analogi SFTI-1, zawierające w swojej sekwencji motyw RGD. Analogi te zostały zaprojektowane tak aby zawierały sekwencję RGD oraz aby wykazywały aktywność inhibitorową w stosunku do trypsyny, chymotrypsyny lub obu enzymów jednocześnie. W przypadku trzech peptydów dodała ugrupowanie PEG celem poprawy rozpuszczalności. Tak zaprojektowane i zsyntetyzowane peptydy następnie przebadła pod względem trwałości proteolitycznej względem bydlęcej  $\beta$ -trypsyny. Doktorantka udowodniła, iż z wyjątkiem analogów (4), (8) i (11) wszystkie pozostałe peptydy ulegają procesowi splicingu oraz, że zaprojektowane peptydy wykazują aktywność inhibitorową względem odpowiednich enzymów. Dla czterech, rozpuszczalnych w wodzie peptydów zawierających sekwencję RGD i ulegających splicingowi przeprowadziła badania stabilności w surowicy ludzkiej krwi oraz przeanalizowała wyniki badań aktywności cytotoksycznej i adhezji komórkowej względem ludzkich fibroblastów. Najbardziej stabilne okazały się związki (7) oraz (8), największą cytotoksyczność wykazał związek (8), natomiast zwiększoną adhezję wykazywał peptyd (5) i (7). W kolejnym etapie Doktorantka ustaliła, na podstawie wcześniej uzyskanych wyników, minimalne wymagania jakie powinien spełniać peptyd, aby uległ splicingowi z uwolnieniem sekwencji aktywnej. Po określeniu wymogów, przystąpiła do projektowania na bazie peptydu (7) i syntezy peptydów ulegających splicingowi z uwolnieniem sekwencji aktywnej wobec komórek nowotworowych, czyli GRGDNP. Dla tak otrzymanych związków przeprowadziła badania trwałości proteolitycznej, uzyskując informacje, który z peptydów ulega splicingowi peptydowemu. Otrzymała bardzo ciekawe wyniki, które w sposób wskazują, iż jedynie peptyd (13) ulega splicingowi z jednoczesnym uwolnieniem peptydu aktywnego. W tej części pracy Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę wpływu rodzaju i położenia reszty aminokwasowej w sekwencji peptydu na szybkość hydrolizy wiązań peptydowych w badanych analogach SFTI-1 przez enzymy z grupy proteinaz serynowych. W dalszym etapie mgr Filipowicz sprawdziła stabilność analogów SFTI-1, zawierających sekwencję GRGDNP, w surowicy krwi oraz przeanalizowała wyniki badań cytotoksyczności tych analogów wobec komórek nowotworowych. Okazało się, iż peptyd (13) jest niestabilny w osoczu krwi oraz, że zaprojektowane związki (13 i 14') są toksyczne dla badanych komórek nowotworowych (tj. Jurkat T oraz U87-MG). Ciekawe, że peptyd (14') pomimo, iż nie ulega splicingowi jest tak samo toksyczny jak peptyd (13), ulegający splicingowi. W ostatniej części rozdziału „Wyniki i dyskusja”, Doktorantka przeprowadziła badania analogów SFTI-1 zawierających znaczniki fluorescencyjne, w aspekcie ich zastosowania w śledzeniu wnikania peptydów do wnętrza komórki oraz ich zastosowania w monitorowaniu proteolizy wewnątrz komórki. W tym celu Doktorantka zsyntetyzowała kolejne analogi zawierające parę donor i/lub akceptor w efekcie FRET, dla których sprawdziła czy ulegają one splicingowi peptydowemu oraz czy wnikają do wnętrza komórki. Potwierdziła, iż badane analogi SFTI-1 ze znacznikiem fluorescencyjnym wnikają do wnętrza komórek oraz że analogi SFTI-1 zawierające parę FRET mogą stanowić doskonałe narzędzie do śledzenia proteolizy wewnątrzkomórkowej.

Na podstawie opisanych wyników można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła doskonały warsztat badawczy w zakresie projektowania i syntezy peptydów oraz w zakresie zastosowania technik fizykochemicznych służących charakterystyce uzyskanych związków. Doktorantka w swojej pracy dobrze dobrała

techniki służące zweryfikowaniu postawionym hipotezom badawczym a także sprawnie przeprowadziła analizę uzyskanych wyników, w tym również wyniki badań biologicznych, które często są trudne w interpretacji.

W ostatnim rozdziale, zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka zwięźle skonkludowała wyniki swoich badań. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam otrzymanie nowych analogów cząsteczki SFTI-1, ulegających splicingowi peptydowemu. Dzięki badaniom mgr Magdaleny Filipowicz cząsteczka SFTI-1 zyskała nowe oblicze i ujawniła się w świetle nowych zastosowań jako nośnik dla peptydów o pożądanej aktywności biologicznej. Jest to w mojej opinii bardzo duże osiągnięcie, doskonale wpisujące się w nurt współczesnych badań w zakresie badań nad kierunkowym (celowanym) dostarczaniem leków do określonych typów komórek.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniłam najważniejsze pytania oraz drobne uwagi dotyczące dysertacji:

- (1) Str. 21 – Dlaczego zastąpienie atomu siarki przez selen tak znacznie obniża aktywność inhibitorową SFTI-1?
- (2) Str. 51 – Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem, że białka posiadające motyw RGD to przeciwciała.
- (3) Str. 76 – Czym można wytłumaczyć bardzo niską wydajność syntezy peptydu (21), bo na poziomie jedynie 7%?
- (4) Str. 89 – Proszę uzasadnić wybór związku nr (8) do badań właściwości cytotoksycznych i adhezyjnych. W pracy jedynym uzasadnieniem wyboru tego związku jest informacja, że wybór został dokonany ze względu na obecność ugrupowania PEG.
- (5) Str. 90 – Czy na pewno można stwierdzić jednoznacznie że peptyd (8) wykazuje największą cytotoksyczność względem komórek fibroblastów w stężeniu 100  $\mu$ M? W mojej ocenie, biorąc pod uwagę inny zakres skali dla peptydu (8), cytotoksyczność peptydu (8) jest porównywalna z peptydem (5) i RGD.
- (6) Dlaczego dla analogów SFTI-1 zawierających sekwencję GRGDNP nie przeprowadzono badań cytotoksyczności względem zdrowych komórek np. fibroblastów czy keratynocytów, jak miało to miejsce dla wcześniej badanych analogów SFT-1? W ten sposób można sprawdzić czy peptydy te są toksyczne dla komórek nienowotworowych.
- (7) Kilka drobnych uwag edycyjnych: Czy celowe było zastosowanie w pracy różnej czcionki w tekście jednolitym oraz w tabelach?; Str. 21 – Skrót  $^1\text{H}$  NMR powinno pisać się z odstępem; Kolejność cytowanej literatury na stronie 37 powinna być kontynuowana pozycjami 86, 87 a nie 90, 91; Str. 57 – W oznaczeniach peptydów w Tabeli 4 brakuje D-Argininy (dla peptydów (5) do (12)), choć już w Tabeli 5 oznaczenia peptydów zawierających D-aminokwas są poprawnie zapisane; Str. 94 – czeski błąd zamiast m/z 2367,1 powinno być m/z 2361,7.
- (8) Czy uzyskane wyniki badań podległy ochronie patentowej? Uważam, że z uwagi na duży potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników należałoby je objąć ochroną.

Przytoczone uwagi nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo wysokiej i pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr Magdaleny Filipowicz zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny, uzyskany dla kilkudziesięciu związków. Kandydatka wykazała się ponadto znajomością w zakresie różnych technik fizykochemicznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań

opublikowane zostały w dwóch czasopismach indeksowanych w JCR (jedna w roku 2012 oraz jedna w roku 2016, w jednej Doktorantka jest pierwszym autorem).

Na zakończenie warto dodać, iż rozprawę doktorską mgr Filipowicz otwiera cytata z *Next* (2007) (czyżby chodziło o film pt. *Next?*): „Z przyszłością jest tak, że się zmienia, gdy na nią patrzysz, właśnie dlatego że patrzysz i ją zmieniasz”. Cytat ten w mojej opinii został przez Doktorantkę niezwykle celnie dopasowany do jej pracy doktorskiej. Albowiem, mgr Magdalena Filipowicz w zależności od uzyskanych wyników na wcześniejszym etapie mogła planować i realizować kolejne etapy. Mogła więc zmieniać przyszłość (czyli planować kolejne etapy pracy), właśnie dlatego, że na nią patrzyła (czyli analizowała bieżące etapy i planowała kolejne). Uważam, że to co najcenniejsze w nauce to możliwość swobodnego rozwijania ciekawych wątków naukowych w zależności od uzyskanych wyników, bo tylko takie prace w mojej ocenie prowadzą do wielkich odkryć.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W tym odniesieniu wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Filipowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na względzie istotny wkład Doktorantki w pogłębienie wiedzy na temat splicingu peptydowego i zastosowania peptydów jako „auto-nośników” dla sekwencji aktywnych biologicznie, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Z poważaniem,



Sylwia Rodziewicz-Motowidło