

Wrocław, 2016-10-01

Dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Filipowicz

pt. „Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych”

Pani mgr Magdalena Filipowicz wykonała pracę doktorską zatytułowaną: „**Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych**” pod kierunkiem naukowym dr hab. Anny Łęgowskiej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Praca doktorska będąca przedmiotem tej recenzji jest oparta na obserwacji poczynionej przez badaczy z Uniwersytetu Gdańskiego wskazującej, że niektóre ze zmodyfikowanych analogów inhibitorowych peptydów wydzielanych z nasion słonecznika wykazują nieoczekiwaną i intrygującą zdolność do ulegania splicingowi w obecności enzymów proteolitycznych takich jak trypsyna i chymotrypsyna. Wynikiem tego procesu było wycięcie z sekwencji cyklicznego peptydu kilku aminokwasów i odtworzenie w zmniejszonym pierścieniu wiązania peptydowego. Ponieważ inhibitory SFTI mają zdolność pokonywania błony komórkowej, wydają się bardzo atrakcyjne jako cząsteczki wektorowe mogące wprowadzać wybrane sekwencje do wnętrza komórki i wywoływać założone efekty biologiczne. O atrakcyjności proponowanego podejścia decyduje też możliwość wykorzystania zmodyfikowanych genetycznie roślin do produkowania aktywnych farmakologicznie cząsteczek metodami biotechnologicznymi, co pozwoliłoby uniknąć kłopotliwej i kosztownej chemicznej syntezy bioaktywnych cząsteczek. Podejście takie jest ogólne i pozwala na wykorzystywanie jako aktywnych farmakologicznie substancji produktów modyfikacji różnorodnych cyklopeptydów pochodzenia roślinnego. Można więc stwierdzić, że realizowany w pracy doktorskiej temat badawczy jest bardzo aktualny, ma potencjalne zastosowania aplikacyjne i znakomicie wpisuje się w tematykę badań prowadzonych w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Ocena pracy

Praca liczy 139 stron i napisana jest w zwięzły i jasny sposób. Przegląd literaturowy liczy 59 stron i wprowadza czytelnika w problematykę enzymów proteolitycznych i ich inhibitorów ze szczególnym uwzględnieniem inhibitora SFTI-1, będącego dla badanych układów cząsteczką prototypową. Pokażna część wprowadzenia literaturowego stanowi podrozdział „splicing jako metoda formowania biomolekuł” w którym Doktorantka omówiła tytułowe zjawisko w bardzo szeroki sposób i wykazała jego ogólne znaczenie w biologii molekularnej. Rozdział ten omawia splicing RNA, splicing białkowy przebiegający z udziałem intein, jak również przykłady splicingu peptydów. Jak wymagała tego tematyka pracy, ten ostatni temat został przedstawiony najszerzej. W szczegółowy sposób przeanalizowane zostały dostępne dane na temat przebiegu i mechanizmów wycinania fragmentów peptydowych przez proteasom i inne enzymy proteolityczne. W części literaturowej rozprawy znalazły się też informacje dotyczące przenikania SFTI-1 przez błony komórkowe, zastosowań tej cząsteczki jako wektora aktywnych biologicznie peptydów a także przegląd wybranych peptydów o działaniu przeciwnowotworowym. Przeglądowa część rozprawy napisana jest jasno i zrozumiale z uwzględnieniem najnowszej literatury naukowej. Zasadniczo wszystkie informacje zawarte tej części są celowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia rozprawy. Co najwyżej, możnaby rozważyć pominięcie części dotyczącej splicingu RNA, chociaż, zapewne intencją Autorki, było podkreślenie powszechności i znaczenia tego zjawiska.

Cele pracy są jasno i jednoznacznie określone. Dotyczą one ustalenia strukturalnych wymogów, jakie spełniać muszą analogi SFTI-1, umożliwiających zachodzenia zjawiska splicingu peptydowego, oraz zbadania możliwości wykorzystania splicingu do wprowadzenia do wnętrza komórki peptydów przeciwnowotworowych jak również sond fluorescencyjnych. Uzupelnienie celu pracy stanowi szczegółowy plan badań. Zaplanowano przeprowadzenie syntez serii analogów SFTI-1 wraz z pełną analityczną charakterystyką. Trwałość enzymatyczna otrzymanych analogów była badana z wykorzystaniem HPLC i MS. Informacje dotyczące wnikania peptydów do komórki i ich hydrolizy planowano uzyskać za pomocą badań fluorescencyjnych i HPLC z detekcją fluorescencyjną. Przewidziano również badania biologiczne otrzymanych związków.

Część eksperymentalna napisana jest szczegółowo i zawiera wszystkie dane niezbędne do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Dane analityczne dotyczące otrzymanych substancji w przekonujący sposób potwierdzają czystość i jednorodność uzyskanych peptydów. Charakterystyka analityczna otrzymanych substancji została przedstawiona w tabeli 10. Zawiera ona pełen komplet danych. Dodatkowo, widma MS oraz chromatogramy zamieszczone w rozprawie jednoznacznie dowodzą jednorodności otrzymanych peptydów i potwierdzają ich tożsamość. Wszystkie zaprojektowane peptydy zostały zatem z powodzeniem zsyntezowane. Zawierały one wbudowane sekwencje RGD i GRGDNP, którym przypisuje się działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe.

Badania enzymatyczne wykazały, że niemal wszystkie otrzymane związki w obecności enzymów (trypsyna oraz chymotrypsyna) ulegały splicingowi peptydowemu uwalniając wewnętrzny, potencjalnie cytotoksyczny fragment. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem analogów SFTI-1 znakowanych fluorescencyjnie wykazały, że wnikały one do wnętrza komórki zaś eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem techniki FRET jednoznacznie udowodniły, że ulegają one wewnątrzkomórkowej hydrolizie. W celu znalezienia odpowiedzi na pytanie co jest produktem tej reakcji wykonane zostały badania lizatu komórkowego. Zastosowano tu metody chromatograficzne z detekcją fluorescencyjną i masową. Wysoka czułość i specyficzność zastosowanych technik badawczych pozwoliła na potwierdzenie, że w wyniku wewnątrzkomórkowej hydrolizy powstaje peptyd o sekwencji: Ser-Ile-Lys(rodamina)-Thr-Lys, będący produktem splicingu peptydowego modelowej cząsteczek. Eksperyment ten jednoznacznie dowodzi, że zmodyfikowane peptydy opracowane w oparciu o sekwencję SFTI-1 mogą zostać wykorzystane jako wektory wprowadzające do komórek farmakologicznie aktywne sekwencje peptydowe a następnie uwalniać je w miejscu przeznaczenia. Badania zostały też uzupełnione przez określenie wpływu wybranych koniugatów na żywotność wybranych linii komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek glejaka ludzkiego U87-MG wykazały bardzo znaczący wpływ wbudowania sekwencji GRGDNP do cząsteczki SFTI-1. Jeden z uzyskanych koniugatów okazał się aktywny przy stężeniu ok. 100 krotnie niższym niż wyjściowy cytotoksyczny peptyd GRGDNP.

Można zatem jednoznacznie stwierdzić, że przeprowadzone badania zakończyły się sukcesem i doprowadziły do wyników, które są ciekawe poznawczo i mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w projektowaniu substancji aktywnych biologicznie.

Jednak, jak to zwykle bywa, podczas lektury pracy nasuwa się kilka pytań i komentarzy. Pierwsze z nich dotyczy enzymu, który odpowiada za wewnątrzkomórkową hydrolizę podanych peptydów. Modelowe badania były przeprowadzone z użyciem trypsyny i chymotrypsyny. Eksperymenty wykorzystujące komórki, sugerują, że specyficzność wewnątrzkomórkowej hydrolizy jest taka sama jak w badaniach modelowych. Jaki enzym jest zatem aktywny w komórkach?

Pewnego komentarza wymaga też sekwencja peptydu zastosowanego w badaniach fluorescencyjnych. O ile dobór fluoroforów w cząsteczce nie budzi wątpliwości, nie jest dla mnie jasne, dlaczego fragment przewidziany do enzymatycznego uwolnienia z koniugatu ma sekwencję Ser-Ile-Lys-Thr-Lys, a nie jest zmodyfikowana wersja którejś z badanych sekwencji o właściwościach cytotoksycznych.

Przedstawiony w części literaturowej rozprawy mechanizm splicingu peptydowego wydaje się sugerować możliwość wykorzystania tego zjawiska w syntezie naturalnego bicyklicznego inhibitora. Czy takie prace były prowadzone na Uniwersytecie Gdańskim lub w innym ośrodku. Jaka jest opinia Doktorantki na temat ewentualnego zastosowania enzymów proteolitycznych do otrzymywania SFTI-1 i analogów?

Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są dobrze wyważone a całość napisana jest przejrzysto i przeważnie dobrym, poprawnym językiem. Potknięcia stylistyczne i terminologiczne są bardzo nieliczne, np.

Str 48 zapobiega przed szybkim rozkładem

Str 77..... w opisie tabeli jon pseudomolekularny – termin ten nie jest już zalecany, mówi się raczej o protonowanej cząsteczce

W tej samej tabeli zestawiono obliczone masy $[M]$ ze zmierzonymi wartościami $[M+H]^+$. Wygodniej byłoby porównać $[M+H]^+$ teoretyczne i $[M+H]^+$ eksperymentalne – choć można założyć, że czytelnik bez trudu sam wykona dodawania.

Bibliografia (157 pozycji) jest przygotowana w sposób jednolity i staranny. Uwzględnia najnowsze publikacje aż do roku 2016. Jedyny mankament jaki w niej znalazłem to brak dat dostępu w źródłach internetowych (pozycja 10, 53 i 79).

Wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej opublikowano w formie dwóch publikacji z Listy Filadelfijskiej. Należy odnotować, że Doktorantka jest pierwszym autorem w jednej z tych publikacji. Sumaryczny współczynnik wpływu publikacji związanych z ocenianą pracą dokorską wynosi 4,50. Dodatkowo Magdalena Filiopowicz jest autorką dwóch publikacji w materiałach pokonferencyjnych współautorką 10 komunikatów i posterów konferencyjnych.

Podsumowując, stwierdzam, że badania przeprowadzone przez Doktorantkę odpowiadają na pytania postawione w celu pracy zaś eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Literatura obejmuje najnowsze prace i cytowana jest w sposób jednolity i konsekwentny. Wykonana przez Panią Mgr Magdalenę Filipowicz i przedłożona mi do recenzji praca pt. „**Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych**” spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 18 marca 2011 jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Piotr Stefanowicz

