



Dr hab. inż. Joanna Cabaj, prof. uczelni

Wrocław, 27.01.2023

Instytut Materiałów Zaawansowanych

Politechnika Wroclawska

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Magdaleny Tobolskiej

### **Projektowanie receptorów molekularnych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe**

*Promotorzy: prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski  
prof. dr hab. Sławomir Sęk*

Potencjalne możliwości zastosowania peptydów w procesach rozpoznawania molekularnego przyczyniły się do rosnącego zainteresowania nimi w obszarze analityki czy bioanalityki. Biorąc pod uwagę fakt, że związki te selektywnie oddziałują zarówno z makrostrukturami takimi jak białka czy kwasy nukleinowe, jak i z małymi cząsteczkami np. aminokwasami, jonami oraz to, że istnieje możliwość otrzymania peptydów o różnorodnej strukturze i właściwościach, syntetyczne peptydy mogą mieć istotne znaczenie w rozwijającej się diagnostyce. Szczególnie ważne wydają się specyficzne koordynacyjne właściwości peptydów w kontekście wykorzystania ich w warstwach receptorowych urządzeń sensorowych.

Jednym z wielu czynników, które decydują o funkcji i aktywności biologicznej peptydów i białek, jest ich oddziaływanie z jonami metali. Peptydy posiadają zdolności ich kompleksowania. Z tego względu peptydy mogą być są wykorzystywane między innymi w warstwach receptorowych biosensorów do oznaczania jonów metali. Przykładowo peptydy bogate w reszty histydyny będą zdolne do wiązania dwudodatnich kationów metali, ponadto położenie reszt histydyny istotnie wpływa na właściwości strukturalne oraz termodynamiczne powstającego kompleksu. Badania prowadzone w tym kierunku wpisują się trendy badawcze oraz zapotrzebowanie rynkowe.

Kompleksy peptydów bogatych w reszty histydynowe (szczególnie His2) badane są również pod kątem zdolności tworzenia asocjacji ternarnych. Dzięki właściwościom tego typu ww. układy proteinowe mogą zostać wykorzystane w projektowaniu receptorów molekularnych do oznaczania anionów.

Kompleksy metalopeptydów wyposażone we fragment histydynowy - His2 (o zdolnościach koordynacyjnych) wydają się być idealnym przykładem receptora anionów fosforanowych (V). Istnieje ponadto możliwość modyfikacji i wzbogacania samej części peptydowej, a obecność w strukturze cząsteczki kationu metalu przejściowego (miedź, nikiel) umożliwi obserwację oddziaływań typu receptor-analit technikami elektrochemicznymi. Tego typu problematyka była ideą rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr inż. Aleksandrę Tobolską.

Wyniki badań dotyczących możliwości opracowania nowych receptorów molekularnych w oparciu o metalopeptydy, selektywnych wobec wybranych anionów zostały ujęte w tematyczny cykl pięciu publikacji naukowych, które są podstawą pracy doktorskiej mgr inż. A. Tobolskiej.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Do szczegółowych zadań badawczych postawionych przez Doktorantkę należało:

- wybór sekwencji peptydowej spośród  $\beta$ -amyloidów wyposażonych w motyw His2;
- scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych kompleksów binarnych modelowego peptydu z kationami Cu(II) i Ni(II);
- badanie oddziaływań metalokompleksów z anionami fosforanowymi oraz wybranymi nukleotydami;
- zaprojektowanie szeregu peptydów w oparciu o modelową sekwencję  $\beta$ -amyloidu biorąc pod uwagę optymalizację struktury oraz możliwie największe powinowactwo do anionów fosforanowych.

Realizując założenia pracy doktorskiej Doktorantka wykorzystwała poniższe techniki pomiarowe:

- spektrofotometrię UV-vis
- spektroskopię dichroizmu kołowego (CD)
- miareczkowanie potencjometryczne
- woltamperometrię cykliczną (CD)
- woltamperometrię pulsowo-różnicową (DPV).

Recenzowana rozprawa doktorska niewątpliwie poszerza i uzupełnia w interesujący sposób program badań w obszarze bioelektrochemii i sensorowych receptorów molekularnych, realizowany z powodzeniem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej.

Przedstawiony do recenzji materiał rozprawy doktorskiej to, jak wspominałam powyżej, cykl pięciu publikacji (P1-P5) uzupełniony o zwięzły opis – „przewodnik” (26 stron), w którym wyodrębniono cztery kluczowe elementy: wprowadzenie - przegląd literatury (*rozdział 1*), cel pracy i zakres pracy doktorskiej (*rozdział 2*), wyniki badań (*rozdział 3*) oraz podsumowanie (*rozdział 4*). Ten syntetyczny opis kończy się spisem literatury liczącym 58 pozycji.

Do pracy dołączono ponadto oświadczenia współautorów publikacji oraz opis dorobku naukowego Doktorantki, na który składa się:

- 6 publikacji w czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływań IF = 24,399, przy czym w zakresie pracy doktorskiej wchodzi pięć pozycji o łącznym IF = 24,399
- udział w trzech projektach badawczych (w tym PRELUDIUM – kierownik projektu), a także udział kilkunastu konferencjach naukowych.

W rozpoczynającym pracę wprowadzeniu Doktorantka w sposób zwięzły i bardzo klarowny przedstawiła rolę peptydów w procesach rozpoznania molekularnego. Wskazała kierunki badań mające na celu wytworzenie receptorów molekularnych o oczekiwanych parametrach, podkreślając jednocześnie, że prace badawcze będące podstawą rozprawy doktorskiej wpisują się we współczesne trendy naukowe związane z poszukiwaniem inspirowanych naturą receptorów molekularnych do oznaczania anionów. Zwróciła szczególną uwagę, w kontekście kontroli analitycznej, na aniony fosforanowe (V) (istotne zarówno w ochronie środowiska naturalnego jak i diagnostyce medycznej). Interesującym rozwiązaniem analitycznym, w opinii Doktorantki, w kontroli obecności i stężenia fosforanów w próbkach płynnych wydaje się konstrukcja sensorów chemicznych. Wiąże się to jednak z trudnościami dotyczącymi selektywności i czułości stosowanych w tych



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



urządzeniach receptorów. W związku z tym receptory bioanalityczne dość rzadko spełniają warunki i wymagania badań środowiskowych.

W warunkach naturalnych rozpoznawanie anionów fosforanowych (V) odbywa się przede wszystkim przez oddziaływanie międzycząsteczkowe (głównie wodorowe). Peptydy są zdolne do udziału w tego typu rozpoznaniach, w związku z czym ważne wydają się prace ukierunkowane na wytwarzanie syntetycznych receptorów fosforanów inspirowanych naturą.

W trakcie zaplanowanych badań własnych Doktorantka wykorzystwała peptydokationy (Cu(II) i Ni(II)) wyposażone w histydynowe reszty typu His2, obecność reszt histydynowych w pozycji drugiej takich struktur pomaga w stabilizacji termodynamicznej układów typu 3N z charakterystyczną niewysyoną sferą koordynacyjną, a jon metalu przejściowego odpowiada za możliwość obserwowania oddziaływań receptor-analit za pomocą technik elektrochemicznych.

Tego typu ujęcie tematu stanowi oryginalny wkład badań Doktorantki w obecny stan wiedzy – gdzie kation metalu przejściowego pełni jednocześnie funkcję centrum rozpoznawczego i znacznika redoks.

Badania kompleksowania peptydów z kationami miedzi (II), które przeprowadziła mgr A. Tobolska pozwoliły jej na wyłonienie z szeregu  $\beta$ -amyloidów ( $A\beta_{5-x}$ ), układu zbudowanego z pięciu reszt aminokwasowych – analogu  $A\beta_{5-9}$ , którym przypisała właściwości receptorowe. Kryterium wyboru było związane z usytuowaniem oraz liczbą reszt histydynowych ww. sekwencji aminokwasu oraz charakter elektrochemicznej odpowiedzi metalokompleksów.

Studia nad wybranym amyloidem (termodynamiczne i strukturalne oddziaływania jonów  $Cu^{2+}$  z  $\beta$ -amyloidami, właściwości redoks utworzonych kompleksów) potwierdziły jego zdolności do kompleksowania, natomiast prowadzone w pH 7,4 pomiary wykazały preferencyjne oddziaływanie metalopeptydów z anionami fosforanowymi (V) oraz resztami fosforanowymi nukleotydów (dzięki znacznemu obniżeniu potencjału utleniania centrum metalicznego). Rejestrowane w trakcie badań odpowiedzi prądowe dla nukleotydów wyposażonych w jedną/trzy reszty fosforanowe, różniły się, co pozwoliło przypuszczać o selektywności układu. Ważnym rezultatem badań była również ocena zdolności amyloidowych metalokompleksów do tworzenia układów ternarnych.

Realizując kolejne założenia projektu badawczego mgr A. Tobolska udowodniła, że budowa metalopeptydu wpływa znacząco nie tylko na właściwości strukturalne, elektrochemiczne powstających kompleksów, ale również na zdolności do selektywnego rozpoznawania anionów fosforanowych (V). Oddziaływania kompleksu  $Cu(II)-A\beta_{5-9}$  z anionami fosforanowymi (V) Doktorantka weryfikowała za pomocą analizy woltamperometrycznej, uzupełnionej pomiarami spektroskopowymi dichroizmu kołowego i UV-vis. Z przeprowadzonych badań wynikało, że oddziaływania metalokompleksu z ligandem fosforanowym są dość słabe.

Ocenę selektywności rozpoznawania anionów fosforanowych (V) przez wybrany metalokompleks Pani Aleksandra prowadziła w obecności wybranych jonów (chlorkowych, siarczanowych (VI) oraz octanowych). Doktorantka nie obserwowała wpływu na wynik ww. jonów interferujących tym samym potwierdziła selektywność układu wobec jonów fosforanowych (V) w mieszaninie z wybranymi interferentami.

Ponadto mgr A. Tobolska sprawdziła zdolność metalokompleksu do rozpoznawania grupy fosforanowej (V) np. w nukleotydach. Zbliżone wartości potencjałów utleniania jonów



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



miedzi (II) w układzie ternarnym z anionami fosforanowymi oraz AMP/ATP sugerowały oddziaływania metalokompleksu z grupami fosforanowymi nukleotydów.

W kolejnych badaniach Doktorantka otrzymała kompleksy  $A\beta_{5-9}$  z jonami niklu (II), takie metalokompleksy (podobnie jak miedziowe) w roztworze o pH 7,4 preferencyjnie oddziaływają z anionami fosforanowymi (V) oraz resztami fosforanowymi nukleotydów, co związane jest bezpośrednio ze znacznym obniżeniem potencjału utleniania ich centrum metalicznego, warto podkreślić, że w przypadku kompleksów niklowych rejestrowane były zróżnicowane odpowiedzi prądowe dla nukleotydów w zależności od ilości reszt fosforanowych, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia selektywności układu.

W kolejnym etapie badań, które obejmowały zaprojektowanie oraz syntezę peptydów (biblioteka), których sekwencje bazowały na modelu  $A\beta_{5-9}$ , mgr A. Tobolska podjęła próby wyselekcjonowania struktury amyloidowej, której metalokompleks charakteryzowałby się największym powinowactwem względem anionów fosforanowych (V). Doktorantka wybrała dwie takie sekwencje o najbardziej obiecujących właściwościach receptorowych, selektywnym rozpoznawaniu reszt fosforanowych.

Interesującym rezultatem badań Doktorantki było również zastosowanie kompleksów metalopeptydowych do dyskryminacji oligopeptydów typu His2 opierając się na analizie chemometrycznej sygnałów elektrochemicznych mierzonych w roztworach ich układów dwu- lub trójskładnikowych, przy czym zgodnie z rezultatem badań mgr A. Tobolskiej, możliwe było rozróżnienie nawet bardzo podobnych strukturalnie peptydów

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jednoznacznie dowodzi, że mgr inż. Aleksandra Tobolska posiada w stopniu bardzo wysokim doświadczenie i umiejętności niezbędne w pracy badawczej. Potrafi rozwiązywać problemy oraz w sposób krytyczny i szczegółowy analizować otrzymane wyniki.

Widocznym efektem tego typu prac są liczne publikacje w czasopiśmie o wysokim stopniu rozpoznawalności naukowej, udział Doktorantki w licznych konferencjach naukowych oraz prace w projektach naukowych (kierowanie jednym z nich). Z załączonych oświadczeń wynika ponadto wiodący udział Pani Aleksandry w opublikowanych pracach, dotyczył on opracowania koncepcji badań, projektowania oraz przeprowadzenie eksperymentów elektrochemicznych, pomiarów spektroskopowych, analizy rezultatów, redagowaniu materiału. Doktorantka była (w części z nich) autorem korespondencyjnym co dodatkowo wskazuje na jej zaangażowanie w realizowane badania.

Cennym, w moim odczuciu, jest też wstęp do rozprawy, w którym Doktorantka w sposób niezwykle umiejętny wprowadza czytelnika w idee celów badawczych projektu, ułatwiając jednocześnie właściwy pogląd na analizowane wyniki naukowe.

Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dowodzi, że Doktorantka posiada wiedzę i umiejętności niezbędne dla uzyskania stopnia doktora.

Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Tobolskiej jest bogata merytorycznie, a jednocześnie przedstawiona zwięźle i niezwykle klarownie, edytorsko - przygotowana bardzo starannie.

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tobolskiej nasunęła mi się jednak pewna uwaga, którą podzielę się, co wynika z przywileju i obowiązku recenzenta.

W moim odczuciu, pisanie pracy doktorskiej w formie bezosobowej nie końca jest właściwe, mimo, że zwyczajowo akceptowane. Niemniej jednak utrudnia ocenę wkładu pracy własnej Doktorantki w tzw. badaniach własnych. Pomimo tego, że w oświadczeniach Pani



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Aleksandra wskazuje swój udział w przygotowanie każdej z pięciu publikacji, to użycie pierwszej osoby w opisie, który jest „przewodnikiem” po cyklu publikacyjnym, byłoby miłym akcentem, podkreślającym jednocześnie ogromny nakład pracy autorki.

Powyższa uwaga nie zmienia jednak mojej bardzo dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tobolskiej. Realizacja tego projektu badawczego oraz redakcja rozprawy dowodzi, że Doktorantka jest wykształconym i dojrzałym naukowcem, zdolnym do rozwiązywania zadań badawczych przy wykorzystaniu wielu narzędzi analitycznych, technik elektrochemicznych i spektroskopowych oraz do pracy z zespołem.

Jestem w pełni przekonana, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez ustawę z dnia 20 lipca 2018 roku – *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 poz. 1668) wraz z późniejszymi zmianami. Pozwala mi to wystąpić, z pełnym przekonaniem, z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Tobolskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę nakład pracy eksperymentalnej (przekraczający pewne normy zwyczajowe), dojrzałość w planowaniu eksperymentów i analizowaniu wyników oraz opublikowany znaczący, wybitny dorobek naukowy Doktorantki, **wnioskuje o wyróżnienie** rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tobolskiej.

Wrocław, 27 stycznia 2023 r.

Joanna Cabaj



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434