

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tobolskiej**

**pt. „Projektowanie receptorów molekularnych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe”**  
wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dwóch promotorów: prof. dr hab. inż. Wojciecha Wróblewskiego z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej oraz prof. dr hab. Sławomira Sęka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Tematyka przedstawionej mi do recenzji dysertacji dotyczy syntezy chemicznej i charakterystyki metalopeptydów oraz badania ich właściwości kompleksotwórczych wobec jonów fosforanowych. Peptydy ze względu na ich mały rozmiar, wysoką specyficzność i niską toksyczność są szeroko badane pod kątem ich potencjalnych zastosowań w medycynie, w tym jako narzędzia w testach diagnostycznych. Zdolność peptydów do selektywnego wiązania się z docelowymi cząsteczkami lub komórkami stanowi podstawę do ich wykorzystania w opracowaniu skutecznych testów diagnostycznych. Ponadto, peptydy mogą być modyfikowane różnymi znacznikami lub etykietami, co pozwala na wykrywanie i kwantyfikację docelowych cząsteczek w próbkach biologicznych lub środowiskowych. Istnieje nieskończona liczba możliwych kombinacji sekwencji peptydów lub ich modyfikowanych chemicznie odpowiedników więc wydaje się, że istnieje wiele nieodkrytych możliwości w ich zastosowaniu. Dzięki tym wielkim możliwościom jakie dają peptydy a także nieodkrytym zastosowaniom naukowcy będą mogli je badać przez wiele najbliższych lat. I choć wydawałoby się, że za jakiś czas sztuczna inteligencja (SI) znajdzie wszystkie możliwe rozwiązania (sekwencje i zastosowania peptydów) to w mojej ocenie nigdy nie osiągnie poziomu wyobraźni ludzkiej. Po zadaniu następującego pytania sztucznej inteligencji: „podaj sekwencję peptydu kompleksującego jony miedzi i służącego do wykrywania jonów fosforanowych” uzyskałam od SI następującą odpowiedź: „Niestety, jako model językowy nie jestem w stanie zaproponować sekwencji peptydu kompleksującego jony miedzi, który jednocześnie służyłby do wykrywania jonów fosforanowych. W literaturze naukowej znane są peptydy zdolne do kompleksowania jonów miedzi, takie jak np. His-His-Lys, który posiada aminokwasy histydyne, lizynę oraz dwukrotnie histydyne, która jest silnym ligandem jonów miedzi. Jeśli chodzi o wykrywanie jonów

fosforanowych, to znany jest peptyd RRAKGR, który posiada aminokwasy argininę oraz lizynę, zdolne do wiązania anionów fosforanowych. Peptyd ten jest wykorzystywany jako sondy do wykrywania aktywności kinaz białkowych, które są odpowiedzialne za fosforylację białek. Należy jednak zaznaczyć, że jedna sekwencja peptydu nie może jednocześnie kompleksować jony miedzi i służyć do wykrywania jonów fosforanowych”. Również bazy danych nie poradziły sobie z odpowiedzią na to pytanie. Bardzo ucieszyła mnie odpowiedź SI i zbiorowej pamięci zapisanej w światowym internecie, gdyż pokazała że nie jest w stanie zastąpić człowieka w pomysłowości i w proponowaniu nowych rozwiązań oraz układów badawczych. Okazuje się, że człowiek jest ciągle potrzebny! Pomysłowością w znalezieniu układu wiążącego selektywnie jony fosforanowe wykazała się Doktorantka – mgr inż. Aleksandra Tobolska, której pracę doktorską otrzymałam do oceny. Celem rozprawy było zaprojektowanie i opis właściwości fizykochemicznych metalopeptydów (posiadających domenę wiążącą His2 z kationami metali przejściowych jako narzędzi diagnostycznych w identyfikacji jonów fosforanowych w tym np. AMP lub ADP.

Wyniki swojej pracy mgr inż. Aleksandra Tobolska przedstawiła w postaci dysertacji doktorskiej będącej zbiorem pięciu publikacji opatrzonej wstępem i syntetycznym opisem uzyskanych rezultatów badań. Ta część pracy zawarta jest na 39 stronach maszynopisu. Otwiera ją informacja o źródle finansowania stypendium doktorskiego, którym był projekt Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich TRI-BIO-CHEM. Następnie przedstawione zostały streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, po których znajdowały się kolejno rozdziały zatytułowane: wprowadzenie, cel i zakres pracy, wyniki badań i podsumowanie. Tę część pracy zamyka wykaz 58 pozycji literaturowych cytowanych przez autorkę. Następnie Doktorantka umieściła szczegółowe oświadczenia współautorów oraz publikacje (P1 – P5), na których oparła swoją dysertację. Praca napisana jest w języku polskim, w sposób poprawny i przystępny. W pracy znajduje się kilka ogólnych rysunków oraz odwołań do rysunków znajdujących się w publikacjach P1 – P5. Na uwagę zasługują podziękowania, które Doktorantka zamieściła na początku swojej dysertacji. Po ich lekturze, widać, że jest świadoma, iż jej praca powstała dzięki współpracy, pomocy, wsparciu innych osób oraz że praca w dobrej, dynamicznej i inspirującej atmosferze jest niezwykle ważna.

W krótkim wprowadzeniu do dysertacji, mgr inż. Tobolska podjęła się niełatwego zadania jakim było przedstawienie w sposób możliwie syntetyczny informacji na temat peptydów wykorzystywanych w procesach rozpoznawania molekularnego, ze szczególnym uwzględnieniem peptydu beta-amyloidowego i roli jego N-terminalnie skróconej postaci w wiązaniu jonów metali przejściowych. Opisała również stan wiedzy na temat receptorów rozpoznających aniony fosforanowe. Po tym krótkim wstępie Doktorantka przedstawiła cele pracy doktorskiej w którym w krótko przedstawiła problem badawczy i postawione sobie zadania badawcze. Postanowiła skonstruować skuteczny receptor (w postaci metalopeptydu) do wykrywania anionów

fosforanowych. Pani Tobolska wybrała ten rodzaj anionów z uwagi na ich duże znaczenie fizjologiczne oraz składnik cząsteczek magazynujących energię (ATP, ADP) czy cząsteczek budulcowych kwasów nukleinowych.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wyniki badań” Doktorantka przedstawia założenia i wyniki pięciu wydanych publikacji, stanowiących główny rdzeń rozprawy. Wkład Doktorantki w powstanie manuskryptów został potwierdzony oświadczeniami od pozostałych współautorów. W mojej opinii Doktorantka miała duży udział w ich powstanie i dlatego uzasadnione jest wykorzystanie tych publikacji w jej rozprawie doktorskiej. Lektura poszczególnych oświadczeń w kontekście wkładu pracy mgr inż. Tobolskiej pokazuje jej rozwój jako coraz bardziej samodzielnego badacza. Od wykonawcy, zaangażowanego w rejestrację i analizę eksperymentów woltamperometrycznych oraz pomiarów spektroskopowych w pierwszej publikacji, dotyczącej wyboru najlepszego peptydu wiążącego jony Cu(II), po współudział w opracowaniu całej koncepcji badań, zaprojektowaniu eksperymentów elektrochemicznych i ich wykonaniu, przeprowadzeniu pomiarów spektroskopowych i potencjometrycznych, współudziale w analizie i interpretacji wyników. O Jej istotnym wkładzie w przygotowanie oraz współredagowanie publikacji P2 – P5 świadczy fakt, że jest ich autorem korespondencyjnym, co nie zdarza się często w przypadku Doktorantów i co zasługuje na szczególną pochwałę!

Publikacje przedstawione są w porządku chronologicznym ale co ważniejsze w porządku skutkowo-przyczynowym. Oznacza to, że każda kolejna publikacja stanowi rozwinięcie badań uzyskanych wcześniej. W publikacji P1 Kandydatka opisała wyniki badań dla różnych peptydów, będących analogami N-końcowego fragmentu peptydu A $\beta$ 5-x. Peptydy te zawierały resztę histydyny w pozycji 2. Najlepsze właściwości pod względem wiązania jonów miedzi miał peptyd o sekwencji RHDSG (A $\beta$ 5-9). Peptyd ten został wybrany i opisany w kolejnej publikacji P2, w której metalopeptyd był badany pod względem oddziaływania z anionami fosforanowymi(V) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. W receptorach tych jon metalu pełnił rolę centrum metalicznego, które jest zarówno miejscem rozpoznającym analit, jak i znacznikiem redoks o właściwościach elektrochemicznych określanymi przez otoczenie koordynacyjne. Uzyskane wyniki pokazały, że Doktorantce udało się uzyskać selektywny receptor. W trzeciej publikacji P3 Kandydatka przeprowadziła badania kompleksowania jonów Ni(II) chcąc sprawdzić, czy po pierwsze peptydy te wiążą jony niklu oraz czy podobnie jak kompleksy z jonami miedzi(II) wiążą jony fosforanowe(V). Doktorantka przeprowadziła pełną charakterystykę fizykochemiczną kompleksu (A $\beta$ 5-9)-Ni(II) a w publikacji P4 rozszerzyła zakres badań i pokazała, że struktura kompleksu peptydu z jonami niklu(II) jest zupełnie inna niż z jonami miedzi(II) oraz że rozróżnia on nukleotydy posiadające jedno lub trzy ugrupowania fosforanowe. Jest to bardzo ciekawe i ważne odkrycie, gdyż dotychczas nie ma doniesień literaturowych na ten temat. W publikacji P5 Doktorantka opisała proces optymalizacji struktury metalopeptydu A $\beta$ 5-9-Cu(II) w taki sposób aby

charakteryzował się on większym powinowactwem względem anionów fosforanowych(V) w stosunku do peptydu wcześniej wyselekcjonowanego. Analiza wyników pozwoliła na wybór peptydów RHGSG i RHRSRG, które w połączeniu z jonami Cu(II) wykazywały najwyższą selektywność i czułość względem wspomnianych anionów. Nowością w tej publikacji było zastosowanie analizy chemometrycznej odpowiedzi elektrochemicznych zarejestrowanych w roztworach zawierających układy dwuskładnikowe i trójskładnikowe do rozróżniania oligopeptydów z His2. Wyniki tej analizy były dla mnie zaskakujące, gdyż umożliwiły pogrupowanie peptydów na klastera pomimo ich znacznie podobnej sekwencji aminokwasowej.

Recenzowanie pracy będącej zastawieniem już ocenionych publikacji nie ułatwia Recenzentowi zadania spełnienia tzw. „obowiązku recenzenckiego” czyli wyszukania jej słabszych punktów. Po lekturze pracy doktorskiej nasunęły mi się jedynie następujące pytania:

- 1) Podczas badań nie był stosowany peptyd kontrolny o przemieszanej sekwencji w stosunku do sekwencji oryginalnej? Czy stosowanie takiego peptydu lub peptydów kontrolnych podczas prowadzonych elektrochemicznych i spektroskopowych? Czy zastosowanie takich peptydów kontrolnych wspomogłoby analizę chemometryczną?
- 2) Czy możliwe byłoby zastosowanie technologii *phage display* do znalezienia jeszcze lepszego metalokompleksu do wykrywania anionów fosforanowych? Jakie mogą być inne niż peptyd A $\beta$  lub *phage display* inspiracje w poszukiwaniu idealnego metalokompleksu?
- 3) Proszę o pokazanie chromatogramów oraz widm MS dla wybranych peptydów. Jaka była wydajność syntezy peptydów?
- 4) Czy istnieją dzisiaj innej metody fizykochemiczne do odróżniania cząsteczek AMP od ADP? Jak pod względem ekonomicznym można oszacować zastosowanie tych metod w laboratorium diagnostycznym?
- 5) Na str. 38 Doktorantka napisała, że „istnieje potencjalna możliwość wykorzystania takiego podejścia do rozróżniania peptydów, istotnych z punktu widzenia choroby Alzheimera. Jest to nowy kierunek badań, który zostanie podjęty w dalszej pracy badawczej autorki niniejszej rozprawy”. Proszę o rozwinięcie tej myśli. Jakie to podejście do rozróżniania peptydów?
- 6) Jak od strony technicznej mogłoby być zbudowane urządzenie do wykrywania lub rozróżniania cząsteczek ATP i ADP w materiale biologicznym? Czy planowane są w przyszłości badania na rzeczywistych próbkach biologicznych?

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez Autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Wartość merytoryczną rozprawy mgr inż. Aleksandry Tobolskiej

potwierdza fakt, że jest to materiał już opublikowany, a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie. Uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w czasopismach o szerokim zasięgu międzynarodowym, w tym w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam **pokazanie, że skrócony peptyd A $\beta$ 5-9 efektywnie wiąże jony miedzi(II) i niklu(II) a utworzony metalopeptyd jest skutecznym receptorem dla anionów fosforanowych**. Na podkreślenie zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę pełnej, często zmuudnej i czasochłonnej charakterystyki fizykochemicznej badanych metalokompleksów.

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Aleksandra Tobolska jest współautorem pięciu publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR oraz w jednej znajdującej się w materiałach zjazdowych. W pięciu z nich jest pierwszym autorem, i w jednej trzecim autorem, co dowodzi na jego duży wkład merytoryczny w powstałe prace. Brała udział w prezentowaniu wyników naukowych w formie doniesień konferencyjnych (jedenaście). Doktorantka uczestniczyła jako wykonawca w realizacji jednego projektu naukowego (OPUS), jednego projektu uczelnianego (IDUB) oraz była kierownikiem własnego grantu badawczego (PRELUDIUM). Dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący i zasługuje na szczególną pochwałę.

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie. Rozprawa mgr inż. Aleksandry Tobolskiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Tobolskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne. Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w zaprojektowanie i szerokie przebadanie nowych metalokompleksów, wykrywających jony fosforanowe(V) zwracam się jednocześnie do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

