



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Chemii Biomolekularnej

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. +4842 272 5706; fax +4842 272 5694

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka

Łódź, 13.04.2018

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Anna Katarzyny Puszko

**pt. „Synteza, badanie powinowactwa do receptora Neuropiliny-1 oraz aktywności
biologicznej nowych peptydomimetyków”**

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Poszukiwania nowych strategii terapeutycznych chorób nowotworowych są przedmiotem badań wielu laboratoriów na świecie. W badaniach tych wykorzystywane są zarówno związki naturalne izolowane z roślin, jak również różne klasy związków syntetycznych. W tym drugim przypadku zespół syntetyczny wybiera zwykle określony szkielet, na bazie którego można otrzymać szeroką gamę pochodnych, różniących się podstawnikami. Pozwala to na optymalizację wybranych struktur pod kątem pożądanego efektu biologicznego i w konsekwencji terapeutycznego.

W ten tak ważny nurt poszukiwań związków mogących znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej wpisuje się tematyka rozprawy doktorskiej mgr Anny Puszko, wykonana w Pracowni Peptydów Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik.

W swej dysertacji Doktorantka skoncentrowała się na neuropiline-1 (NRP-1), ko-receptorze naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), który odgrywa ważną rolę w angiogenezie. Tworzenie sieci nowych naczyń krwionośnych jest ważnym elementem rozwoju nowotworu i powstawania przerzutów. Podwyższony poziom ekspresji NRP-1 stwierdzono w wielu typach nowotworów i był on zwykle skorelowany z występowaniem przerzutów. Z tego względu NRP-1 stała się celem badań nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi.

Praca doktorska Pani Anny Puszko stanowi kontynuację kompleksowych badań różnych biologicznie ważnych peptydów, prowadzonych od lat przez zespół profesor Aleksandry Misickiej. Grupa ta odnotowała na swoim koncie wiele osiągnięć, a jej dokonania są znane i cenione w ośrodkach naukowych zajmujących się chemią leków w kraju i za granicą. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania otrzymania serii peptydomimetyków, które hamowałyby tworzenie kompleksu NRP-1 z izoformą białka VEGF-A₁₆₅, uważanego za najsilniejszy stymulator angiogenezy. Analogi o dużym powinowactwie do receptora NRP-1 uniemożliwiają na drodze inhibicji kompetycyjnej powstawanie kompleksu VEGF-A₁₆₅ z tym receptorem.

Dysertacja napisana jest w sposób klasyczny, obejmuje 135 stron i 220 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Rozpoczyna ją rozdział *Założenia i Cel Pracy*, w którym Doktorantka przedstawia zwięźle motywy, które skłoniły ją do zajęcia się syntezą związków hamujących tworzenie kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1, w poszukiwaniu nowych struktur o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, w szczególności przeciwingiennym.

W przeglądzie literatury na 36 stronach Doktorantka przedstawiła obecny stan wiedzy dotyczący neuropiliny, obejmujący budowę tego receptora oraz omówienie szlaków w komórce aktywowanych przez ten receptor. W kolejnych rozdziałach Autorka omówiła naturalne ligandy neuropiliny, takie jak rodzina semaforyn-3 i rodzina czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego, a następnie syntetyczne ligandy tego receptora o budowie peptydowej i niepeptydowej. Wybór zagadnień przedstawionych w części teoretycznej świadczy o właściwym zrozumieniu roli tej części dysertacji, stanowiącej wprowadzenie i uzasadnienie podjętych w pracy doktorskiej badań. Poszczególne zagadnienia zostały opisane w kompetentny sposób i bogato ilustrowane rysunkami, zwiększającymi przejrzystość tekstu.

Kolejny rozdział stanowią *Badania Własne*. W tym miejscu należy stwierdzić, że postawione przed Doktorantką zadania były bardzo ambitne, obejmowały bowiem zarówno projektowanie i syntezę kilku serii peptydomimetyków o ciekawej strukturze jak i określenie ich profilu farmakologicznego. Podjęcie tak różnorodnych badań wymagało od Doktorantki oprócz dobrego opanowania warsztatu eksperymentatorskiego także szerokiej znajomości zagadnień teoretycznych związanych z realizowaną tematyką.

Badania nad ligandami receptora NRP-1 były zapoczątkowane współpracą z grupą profesora Gerarda Perret'a z Universite Paris, która opracowała heptapeptyd nazwany A7R, wykazujący aktywność antyangiogenną *in vitro*. W Pracowni Peptydów otrzymano następnie rozgałęzione tetrapeptydy o ogólnym wzorze Lys-(*h*-Arg)-AA²-AA³-Arg-OH, które silniej niż A7R hamowały tworzenie kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1. Doktorantka zaplanowała

kolejne modyfikacje tej struktury wiodącej i zsyntezowała 30 peptydomimetyków. Zaproponowane modyfikacje polegały na zastąpieniu C-końcowej grupy karboksylowej grupą amidową oraz wstawieniu monomerów kwasów peptydonukleinowych, sarkozyny lub pochodnych proliny w pozycję 2 i 3. W kolejnych analogach homo-arginina została zastąpiona pochodną mocznika. Ciekawą modyfikacją było wstawienie reszty Cys lub fragmentu Cys-Asp oraz pochodnej Cys wydłużonej o cząsteczkę mocznika na N-końcu peptydu lub w rozgałęzieniu. Te ostatnie modyfikacje pozwoliły Doktorantce na otrzymanie homodimerów poszczególnych analogów połączonych mostkiem disiarczkowym. Jeden z otrzymanych dimerów okazał się być najaktywniejszym ze wszystkich zsyntetyzowanych związków.

Dla jednego z analogów (27) wykonana też została prosta symulacja jego dokowania w kieszeni receptora. Ze symulacji tej wynika, że zamiana *hArg* w rozgałęzieniu peptydu na analog, w którym przyłączenie Arg nastąpiło poprzez wiązanie mocznikowe a nie amidowe (Arg^{u}) może zwiększać ilość interakcji związku z receptorem, wpływając jednocześnie tylko w małym stopniu na jego powinowactwo do NRP-1.

Następnie mgr Puszko zbadała wpływ otrzymanych analogów na tworzenie kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1. Do tego celu adaptowała do warunków własnego laboratorium opisany wcześniej przez współpracującą grupę z Paryża test ELISA. Należy tu podkreślić, że Doktorantka z dużą dozą krytycyzmu podeszła do otrzymanych przez siebie wyników, które otrzymała w pierwszej kolejności dla znanych związków i porównała je z danymi z literatury. Przeprowadziła testy dwukrotnie, z wykorzystaniem oznaczenia kolorymetrycznego i chemiluminescyjnego i wybrała metodę dającą wyniki porównywalne do literaturowych. Opis różnic w oznaczeniach przeprowadzonych tymi dwiema metodami i przedyskutowanie z czego te różnice mogą wynikać uważam za bardzo cenny.

Drugim testem biologicznym opracowanym przez mgr Puszko było badanie stabilności enzymatycznej otrzymanych analogów w ludzkim osoczu i surowicy krwi. Przeprowadzenie testów z kilkoma anty-koagulantami dodawanymi do świeżo pobranej krwi w celu uniknięcia jej krzepnięcia pozwoliło Doktorantce wybrać anty-koagulant o najmniejszym wpływie na degradację peptydów. Wartościowym elementem tego etapu pracy było też zaproponowanie, na podstawie analizy HPLC otrzymanych w wyniku trawienia fragmentów, które wiązania okazały się najbardziej narażone na rozerwanie.

Jako ostatni element pracy mgr Puszko zbadała wpływ kilku wybranych peptydomimetyków na przeżywalność komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 i prawidłowych komórek linii HUVEC. Niestety żaden z badanych związków nie wykazał

istotnego wpływu na proliferację komórek nowotworowych. Ten wynik wydaje się dziwny w świetle faktu, że większość nowych analogów miała duże powinowactwo do NRP-1. Chciałabym, aby Doktorantka spróbowała się odnieść do niego w czasie obrony.

W rozdziale *Część Eksperymentalna* Autorka opisała metody otrzymywania substratów, a następnie zaprojektowanych peptydów, które syntetyzowane były na nośniku polimerowym. Rozprawę cechuje solidny warsztat badawczy, Doktorantka bardzo dobrze panuje nad metodologią syntezy peptydów i chromatograficznymi metodami ich oczyszczania. Dokładnie opisane zostały też przeprowadzone testy biologiczne i symulacja dokowania ligandów do NRP-1.

W moim odczuciu w pracy brakuje informacji, czy otrzymane wyniki są już w części opublikowane lub będą przygotowane do druku w najbliższym czasie. Spis publikacji Doktorantki na końcu dysertacji byłyby mile widziany.

Przywilejem i obowiązkiem recenzenta jest wskazanie tych fragmentów pracy, które nasuwają mu uwagi krytyczne:

1. Str. 5 - zdanie " Opracowanie metody do badań powinowactwa inhibicji układu VEGF-A₁₆₅/NRP-1" jest źle sformułowane, powinowactwo jest do receptora a nie do inhibicji.
2. Na str. 57 Autorka pisze, że zastąpiła niestabilne wiązanie Lys-ε-hArg wiązaniem mocznikowym. Uważam stwierdzenie, że wiązanie amidowe jest niestabilne za niezbyt fortunne. Wiązanie amidowe zostało zastąpione jeszcze trwalszym, bardziej odpornym na hydrolizę wiązaniem mocznikowym.
3. Rozdział 3.3.1. - "Optymalizacja platformy do badania inhibicji.." zastąpiłabym raczej polskim słowem optymalizacja metody badania.
4. Tytuł podrozdziału 3.3.1. jest źle sformułowany. Chodzi tu chyba o wpływ struktury C-końca analogu na tworzenie kompleksu VEGF/NRP.
5. W podrozdziale 3.3.2 napisane jest "postanowiłam zmodyfikować środkową część struktury peptydomimetyków ... ze względu na wysokie powinowactwo związków do NRP-1". Chodziło o otrzymanie związków o jeszcze lepszym powinowactwie, więc zdanie jest trochę nielogiczne.
6. Str 63 - "...ze względu na właściwości inhibicyjne kompleksu VEGF/NRP-1.." Kompleks nie ma właściwości inhibicyjnych, tylko związki hamują tworzenie kompleksu.

Te drobne uwagi krytyczne nie umniejszają oczywiście wartości przedstawionej mi do recenzji pracy, którą oceniam bardzo pozytywnie.

Podsumowując, z lektury recenzowanej pracy wynika jasno, iż przesłanki jakie skłoniły Doktorankę do podjęcia badań były właściwe. Należy tu podkreślić multidyscyplinarny charakter pracy, obejmującej oprócz syntez i charakteryzacji spektralnej otrzymanych peptydomimetyków określenie ich właściwości farmakologicznych w testach *in vitro*. Praca wnosi elementy nowości naukowej, przyczynia się bowiem do lepszego poznania relacji pomiędzy strukturą a powinowactwem ligandów do neuropiliny. Moim zdaniem, Autorka wykonując zaplanowane badanie, a później pisząc pracę, wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną i udowodniła, że umie posługiwać się najnowszą literaturą i samodzielnie rozwiązywać problemy naukowe. Ze względu na szeroki panel zastosowanych metod badawczych, wagę uzyskanych wyników, ogromny wkład pracy, a także bardzo staranne przygotowanie rozprawy, uważam pracę doktorską za wyróżniającą.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Puszko w pełni spełnia wymagania stawiane Kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Wnoszę więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Anny Puszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aleh', is positioned in the lower right quadrant of the page.



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Chemii Biomolekularnej

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. 42-2725706; e-mail anna.janecka@umed.lodz.pl

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka

Prof. dr hab. Anna Janecka

Łódź, 13.04.2018.

**Wniosek
o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anna Katarzyny Puszko**

Jako recenzent rozprawy doktorskiej mgr Anny Katarzyny Puszko pt. „**Synteza, badanie powinowactwa do receptora Neuropiliny-1 oraz aktywności biologicznej nowych peptydomimetyków**” pragnę stwierdzić, że przedłożoną mi do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Jest ona bardzo starannie przygotowana i zawiera obszerny i bardzo wartościowy materiał eksperymentalny. Doktorantka do jej wykonania musiała opanować szeroki panel metod badawczych, obejmujących syntezę bloków budulcowych do syntezy peptydomimetyków, syntezę peptydów na fazie stałej, tworzenie mostków disulfidowych, oczyszczanie otrzymanych związków metodą chromatografii cieczowej oraz potwierdzanie ich struktury przy pomocy widm masowych, a także kilka testów biologicznych (test powinowactwa analogów do neuropiliny z detekcją kolorymetryczną i chemiluminescencyjna, badanie stabilności analogów w osoczu i surowicy krwi oraz badanie wpływu nowych związków na przeżywalność komórek in vitro).

Biorąc pod uwagę multi-dyscyplinarny charakter rozprawy, wagę uzyskanych wyników i ogromny wkład pracy włożony w jej przygotowanie, wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o jej wyróżnienie.