



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Medycznej



Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 16.04.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Katarzyny Puszko,
zatytułowanej: **Synteza, badanie powinowactwa do receptora Neuropiliny-1 oraz aktywności biologicznej nowych peptydomimetyków**

Obiektem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Anny Puszko był receptor neuropiliny-1 (NRP-1). Bierze on udział w wielu procesach fizjologicznych, zarówno na etapie embriogenezy, jak i funkcjonowania dojrzałych tkanek. Do najważniejszych z jego ról należą kontrolowanie wzrostu aksonów, immunosupresja oraz współdziałanie z receptorem czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR) w procesie angiogenezy. Ze względu na zaangażowanie w tworzenie naczyń krwionośnych NRP-1 pełni ważną rolę w rozwoju i metastazie nowotworów, przez co receptor ten od dłuższego czasu pozostaje w polu zainteresowań naukowców zajmujących się poszukiwaniem sposobów na powstrzymanie postępów procesu nowotworowego.

Grupa badawcza kierowana przez prof. dr hab. Aleksandrę Misicką-Kęsik, promotora recenzowanej rozprawy doktorskiej, również zajmuje się tym tematem, skupiając się m.in. na poszukiwaniu związków zdolnych do inhibowania oddziaływań między endogennym ligandem VEGF-A₁₆₅ a receptorem NRP-1, by w ten sposób blokować szlak sygnałowy odpowiedzialny za rozwój naczyń krwionośnych mogących służyć dostarczaniu tlenu i odżywianiu guzów nowotworowych. Początkowa współpraca z zespołem profesora Gerarda Perret z Université Paris 13 zaowocowała odkryciem peptydu A7R i potwierdzeniem jego działania antyangiogennego i przeciwnowotworowego. Plonem dalszych prac było opracowanie sekwencji bardziej skutecznych inhibitorów tworzenia kompleksu NRP-1–VEGF-A₁₆₅: czteroaminokwasowych peptydomimetyków o wzorze ogólnym H-Lys(hArg)-AA²-AA³-Arg-OH, gdzie w pozycjach 2 i 3 znajdowały się odpowiednio reszty Dab-Pro, Pro-Pro lub Pro-Ala. Związki te stanowiły sekwencje wyjściowe do badań podjętych przez mgr Annę Puszko. Zadania jakie zrealizowała Doktorantka obejmowały:

- racjonalne projektowanie kolejnych serii potencjalnych inhibitorów, w których modyfikowano pozycje 2 i 3 sekwencji bazowej, zastępowano wybrane wiązania peptydowe wiązaniem typu mocznikowego, bądź też uzupełniano sekwencję bazową o dodatkową resztę cysteiny lub dipeptydowy fragment Cys-Asp;

- badanie stabilności najbardziej efektywnych pochodnych w płynach fizjologicznych – surowicy i osoczu;
- badanie zdolności zaprojektowanych związków do inhibowania procesu tworzenia kompleksu VEGF-A₁₆₅-NRP-1 z wykorzystaniem testu kompetycyjnego ELISA;
- zweryfikowanie wpływu wybranych peptydomimetyków na żywotność komórek prawidłowych linii pierwotnej śródbłonna naczyń (HUVEC) oraz nowotworowych (raka sutka MDA-MB-231).

Uznanie budzi przekrój technik, które opanowała Doktorantka w trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej. Zajmowała się bowiem zarówno modelowaniem molekularnym w zakresie niezbędnym do wspomagania projektowania potencjalnych inhibitorów, jak też syntezą organiczną, otrzymując samodzielnie niektóre pochodne potrzebne do syntezy peptydomimetyków oraz same peptydomimetyki. Przeprowadziła ponadto badania stabilności proteolitycznej otrzymanych związków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych oraz charakterystykę miejsc cięcia proteolitycznego z wykorzystaniem spektrometrii mas. Zoptymalizowała także procedurę testu ELISA służącego do badania powinowactwa otrzymanych związków do receptora NRP-1 oraz wykonała badania cytotoksyczności otrzymanych inhibitorów na liniach komórkowych. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono niezwykle rzetelnie, z odpowiednio dobranymi próbkami kontrolnymi, a wyniki tych eksperymentów zostały w rozprawie doktorskiej w sposób dojrzały i krytyczny przedyskutowane.

Rozprawa doktorska mgr Anny Puszek obejmuje łącznie 135 stron. Ciekawy jest układ pracy. Na samym jej początku umieszczono streszczenie w języku angielskim, a zaraz po nim przedstawione zostały założenia i cel pracy, co znakomicie ułatwiło zrozumienie od pierwszego zetknięcia z rozprawą zarówno jaki będzie obiekt badań, jak i zakres prac. Przegląd literatury zawarty został na ok. 40 stronach. Znalazły się w nim najważniejsze informacje na temat budowy i funkcji receptorów NRP oraz ich naturalnych i syntetycznych ligandów. Tekst opracowany został w oparciu o 150 pozycji literaturowych, obejmujących najnowsze doniesienia z czasopism o zasięgu międzynarodowym. Jest bogato ilustrowany, w sposób zwięzły i klarowny prezentując treści niezbędne do zrozumienia dalszej części rozprawy.

Opis badań własnych wsparty został dalszymi 70 odniesieniami do światowej literatury naukowej. Tekst podzielono na dwa zasadnicze rozdziały, zawierające odpowiednio omówienie przeprowadzonych eksperymentów oraz opis zastosowanych procedur i charakterystykę otrzymanych związków. Ten sposób przedstawienia wyników bardzo dobrze wpłynął na ogólną percepcję treści, gdyż ciąg logiczny planowania kolejnych zadań badawczych na podstawie już uzyskanych wyników nie jest tu zaburzany przez wprowadzanie szczegółów technicznych wykonywanych eksperymentów. Uzyskane wyniki przedstawione zostały niezwykle jasno i precyzyjnie, a do szczególnie mocnych atutów rozprawy należy zaliczyć analizę i interpretację wyników. Dokonywana jest ona przez Doktorantkę każdorazowo z odpowiednią dawką krytycyzmu i stanowi podstawę do wyciągania rozsądnych i jak najbardziej uprawnionych wniosków. Zastrzeżeń nie budzi czytelność wykresów, czy tabel, jedynie rysunki, choć starannie przygotowane, czasem są zbyt małych rozmiarów, by umożliwić analizowanie szczegółów. Dotyczy to zwłaszcza wygenerowanych

struktur z dokowania ligandów do receptora, jednakże w połączeniu z klarownym opisem oddziaływań również ta część wyników pozostaje całkowicie zrozumiała.

Korekta językowa wykonana została bardzo starannie, w tekście rozprawy sporadycznie zdarzają się usterki edycyjne. Mimo starannej korekty nie uniknięto jednak pewnych nieprawidłowych sformułowań, takich jak „konformery cis i trans” (str. 59, 68), „węglowodory α ” (str. 66), czy „ kwas karboksylowy C-końcowej reszty Arg” (str. 36). Do żargonowych sformułowań, których powinno się unikać w tekście pracy naukowej, należy „pulowanie osocza” (str. 82). Trudny do zrozumienia jest powtarzający się wielokrotnie skrót myślowy na temat właściwości inhibicyjnych kompleksu VEGF-A₁₆₅-NRP-1 (np. str. 61, 63, 66), a także fragmenty: „rezultatem optymalizacji struktury dokowania peptydomimetyku 3” (str. 60), czy „opracowanie metody (..) do badań powinowactwa inhibicji” (str. 101).

Ponadto:

- uzupełnienia wymaga rozwinięcie skrótu Pbf (str. 2);
- czy można powiedzieć, że eksony mają sekwencje aminokwasowe? Bo taką wymowę ma tekst: „kodowany przez alternatywny ekson o sekwencji RSLTRKD” (str.25);
- sformułowania o ograniczaniu konformacji („konformacja związku została dodatkowo ograniczona” (str. 34); czy „obejmują ograniczenie konformacji” (str. 44)) należałoby raczej zastąpić wyrażeniami „konformacja związku została usztywniona” lub „ograniczona została swoboda konformacyjna”;
- sformułowanie „wyniki przedstawiono jako \pm SEM”, powtarzające się w przypisach do tabel, jest nieprecyzyjne. Należałoby tę informację umieścić raczej w tytule tabeli, tak by było zrozumiałe jaki parametr podano z uwzględnieniem standardowego błędu pomiaru;
- używanie pojęcia „natywny” (podpis do tabeli 9) w odniesieniu do modelowego/macierzystego peptydomimetyku jest pewnym nadużyciem; cytując za Słownikiem Języka Polskiego „natywny” to „taki jak w warunkach naturalnych”.

Lektura rozprawy nasuwa też kilka pytań:

- W jaki sposób różnorodność elementów konstrukcyjnych zapewniana przez aminokwasy nienaturalne jest zależna od ich aktywności farmakologicznej? (str. 45)
- Czy przy badaniu stabilności w osoczu inhibitorów z wolną grupą sulfhydrylową analizowano za pomocą spektrometrii mas próbki z początkowego okresu inkubacji, gdy zmiany zachodziły dość gwałtownie? (wykres 3, str. 96)
- Czy jest możliwe alkiłowanie reszty proliny występującej w sekwencji peptydu? („wykazano, że N-alkilowanie Pro w sekwencji aktywnego peptydu może być istotne” (str. 66))
- Czy prawidłową strukturę ma analog 38 przedstawiony na rys. 65?

Dostrzeżone w rozprawie nieprawidłowości czy usterki w żaden sposób nie umniejszają jednak jej wartości merytorycznej. W swojej pracy mgr Anna Puszek zaprezentowała bardzo interesujące i wartościowe wyniki. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy, zdaniem recenzenta:

1. Uzyskanie inhibitora skuteczniej niż wszystkie znane dotąd blokującego szlak sygnałowy oparty na oddziaływaniu VEGF-A₁₆₅-NRP-1 (IC₅₀ 20 nM), a jednocześnie cechującego się znaczną stabilnością proteolityczną ($t_{1/2} > 96$ h).
2. Opracowanie metody przesiewowej typu ELISA, służącej do badania zdolności projektowanych związków do inhibicji tworzenia kompleksu VEGF-A₁₆₅-NRP-1, oraz zoptymalizowanie metodologii przygotowania próbek fizjologicznych do badania stabilności proteolitycznej badanych inhibitorów. Oba te osiągnięcia mają wymiar szerszy, wykraczający poza ramy pracy doktorskiej mgr Puszko. Opracowane metody badawcze mogą być bowiem wykorzystywane w dalszych badaniach dotyczących ligandów receptora NRP-1.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż mgr Anna Puszko jest współautorką 8 publikacji oryginalnych oraz sześciu prac opublikowanych w materiałach pokonferencyjnych europejskich zjazdów naukowych. Jest wśród nich tylko jedna praca, w której Doktorantka jest pierwszą autorką, ale zważywszy na jakość uzyskanych wyników pojawienie się kolejnych publikacji, obejmujących materiał przedstawiony w rozprawie doktorskiej, pozostaje zapewne jedynie kwestią czasu.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Anny Katarzyny Puszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ejmkowska



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Medycznej



CHEMIA UG

Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 16.04.2018

Jako uzupełnienie do złożonej recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Katarzyny Puszek niniejszym składam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

Szczególne wartości tej rozprawy, z powodu której w odczuciu recenzenta zasługuje ona na wyróżnienie, wynika przede wszystkim z:

- interdyscyplinarnego charakteru podjętych przez Doktorantkę badań;
- wykorzystania przez Doktorantkę do zrealizowania badań nowoczesnych metod takich jak modelowanie molekularne, czy testy ELISA;
- samodzielności Doktorantki w wykonywaniu prac badawczych obejmujących różnorodne dziedziny – syntezę organiczną, modelowanie molekularne, badania z wykorzystaniem zaawansowanych technik immunochemicznych, badania komórkowe;
- opracowania przez Doktorantkę metody przesiewowej typu ELISA, które to osiągnięcie ma wymiar wykraczający poza ramy pracy doktorskiej, może być bowiem wykorzystane w dalszych badaniach dotyczących ligandów receptora NRP-1.

Elzbieta Jankowska