

Autoreferat rozprawy doktorskiej

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

Promotor: Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Promotor pomocniczy: dr Karolina Pułka-Ziach

Neuropilina-1 (NRP-1) jest jednym z najważniejszych receptorów naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF- A_{165} . Pełni funkcję ko-receptora dla VEGFR, który jest głównym receptorem dla VEGF- A_{165} . NRP-1 uczestniczy także w zwiększaniu transdukcji sygnału w komórce, ale może również działać niezależnie. NRP-1 odgrywa ważną rolę w angiogenezie, czyli procesie powstawania nowych naczyń włosowatych. Wzrost sieci naczyniowej jest niezbędny dla wielu procesów fizjologicznych, a ponadto występuje w wielu stanach patologicznych zachodzących w organizmie. Jego indukcja wymaga wiązania cząsteczek sygnałowych do receptorów na powierzchni komórek śródbłonka. W przypadku raka lub retinopatii cukrzycowej, jednym z czynników wpływających na progresję choroby jest nadmierna angiogeneza, w przeciwieństwie do upośledzonego gojenia się rany i udaru, które są związane z niewystarczającym tworzeniem naczyń włosowatych. Odpowiednie kompleksy ligand-receptor inicjują szlaki sygnałowe, które promują wzrost i przeżycie nowych naczyń krwionośnych. Nadekspresję NRP-1 wykazano w liniach komórek rakowych, jak również w różnych guzach pierwotnych, np. raka piersi, żołądka i jelita grubego. Korelacja pomiędzy rozwojem nowotworów a zwiększoną gęstością NRP-1 na komórkach sprawia, że receptor ten jest celem terapeutycznym w leczeniu raka. Sugeruje się, że NRP-1 może być głównym receptorem dla VEGF- A_{165} występującym na błonie komórek guza, podczas gdy interakcja VEGF- A_{165} /NRP-1 może być najistotniejszą przyczyną angiogenezy w chorobach nowotworowych. Kompleks ten zwiększa przeżywalność komórek nowotworowych, ich proliferację i stymuluje złośliwy postęp w przerzutach. Metody modulacji angiogenezy mogą być skuteczniejszym narzędziem przeciw chorobom związanym z tym procesem.

Przedstawiona praca doktorska prezentuje optymalizację dwóch testów przesiewowych, które są niezbędne do identyfikacji najlepszych peptydomimetyków wykazujących powinowactwo do NRP-1. Pierwszy z nich pozwolił na określenie aktywności hamującej tworzenie się kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1 zaprojektowanych związków. Badania te przeprowadzono w Institut Imagine w Paryżu, we współpracy z dr Yves Lepelletier. Przedstawione wyniki pokazały, że test typu ELISA z detekcją chemiluminescencyjną był o wiele czulszym narzędziem, w porównaniu z testem kolorymetrycznym używanym wcześniej do badań powinowactwa NRP-1 w Laboratorium Peptydów. Następny test przesiewowy dotyczył stabilności proteolitycznej. Wykazano istotny wpływ przygotowania próbek krwi do procesu degradacji enzymatycznej, w szczególności przy zastosowaniu antykoagulantów.

Drugim celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza oraz badania biologiczne peptydomimetyków o wysokim powinowactwie do NRP-1, przy jednoczesnej wysokiej stabilności enzymatycznej. Z przeprowadzonych do tej pory badań dotyczących wymagań strukturalnych ligandów receptora NRP-1 wynika, że aktywny peptyd powinien spełniać tzw. regułę C-końca (ang. *C-end rule*), czyli posiadać C-terminalny motyw R/KXXR/K. Grupa profesora Perret z Université Paris 13 opracowała i udowodniła antyangiogenną i przeciwnowotworową aktywność heptapeptydu A7R (ATWLPPR). Na podstawie tych badań, w Laboratorium Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego opracowano rozgałęzione peptydy o ogólnym wzorze H-Lys-(*hArg*)-AA²-AA³-Arg-OH, które wykazują lepszą aktywność hamującą kompleks VEGF-A₁₆₅/NRP-1 niż macierzysty peptyd A7R. Zaprojektowane nowe peptydomimetyki były oparte na tejże ogólnej sekwencji aktywnych inhibitorów. Modyfikacje wprowadzano stopniowo w celu optymalizacji poszczególnych fragmentów cząsteczki. Potwierdzono znaczenie C-końcowej grupy karboksylowej Arg obecnej w każdej sekwencji. Następnie zsyntetyzowano rodzinę peptydomimetyków, w której pozycje AA² i/lub AA³ zastąpiono monomerami PNA, sarkozyną i mimetykami Pro o różnej sztywności i wielkości pierścienia. Wyniki powinowactwa do NRP-1 i stabilności enzymatycznej otrzymanych związków umożliwiły wybranie najlepszych analogów o 2-4 razy niższej wartości IC₅₀, w porównaniu do wyjściowych sekwencji. Otrzymane wyniki posłużyły dalej jako podstawa do dalszych modyfikacji struktur cząsteczek.

Badania stabilności enzymatycznej ujawniły, że wiązanie Lys-ε-*hArg* stosunkowo szybko ulega hydrolizie enzymatycznej, dlatego wiązanie amidowe w tym fragmencie zostało zastąpione wiązaniem mocznikowym z użyciem pochodnej Arg (Arg^u). Ta modyfikacja miała korzystny wpływ na stabilność proteolityczną, bez niekorzystnego wpływu na hamującą

aktywność większości związków. Inna zaprojektowana rodzina związków zawierała fragment Cys lub Cys-Asp na N-końcu głównego łańcucha peptydomimetyków, lub na grupie α -aminowej *hArg*. W tej samej kombinacji zastosowano jednostkę mocznikową Cys^u. Badania nad powinowactwem związków do NRP-1 wykazały 100-krotny spadek wartości IC₅₀ dla analogów zawierających Cys w porównaniu z macierzystym peptydomimetykiem, niezależnie od miejsca przyłączenia w sekwencji. Jednakże stabilność enzymatyczna tych związków uległa znacznemu obniżeniu. Otrzymane związki poddano następnie dimeryzacji przez mostki dwusiarczkowe tworzące homodimery. Jeden z dimerów wykazał najwyższe powinowactwo do NRP-1 ze wszystkich zaprojektowanych peptydomimetyków. Co więcej, związek ten był również bardzo odporny na degradację enzymatyczną.

Badano również wpływ najlepszych związków na żywotność śródbłonkowych i nowotworowych linii komórkowych. Testy żywotności komórek nie wykazały znaczącego wpływu peptydomimetyków na szlak sygnałowy związany z proliferacją komórek. Jednak uzyskane wyniki świadczą o braku cytotoksyczności badanych związków.

Wyniki zależności struktura-aktywność przedstawione w ramach zrealizowanej pracy doktorskiej dostarczają nowego wglądu w wymagania strukturalne związków hamujących powstawanie kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1. Opisane peptydomimetyki mogą również przyczynić się do postępu w opracowywaniu nowych leków przeciwko chorobom skorelowanym ze wzrostem naczyń włosowatych. Choroby związane z nadmierną, a także niewystarczającą angiogenezą są jednym z głównych wyzwań we współczesnej medycynie.