



Wrocław, 2014-06-01

Dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

[piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl](mailto:piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl)

## OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wojciechowskiej**

**pt. "Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z peptydami penetrującymi błonę komórkową"**

Pani mgr Monika Wojciechowska wykonała pracę doktorską zatytułowaną: „Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z peptydami penetrującymi błonę komórkową” pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Piotra Rekowskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedłożona rozprawa dotyczy opracowania nowatorskiej metody otrzymywania połączeń peptydowych kwasów nukleinowych z peptydami przenikającymi przez błonę komórkową. Uzyskane połączenia zostały poddane badaniom biologicznym a ich zdolność od oddziaływań z kwasami nukleinowymi została przetestowana metoda elektroforezy kapilarnej.

Peptydowe kwasy nukleinowe to strukturalne analogi kwasów nukleinowych, w których szkielet cukrowo-fosforanowy został zastąpiony szkieletem poliamidowym. Ta modyfikacja strukturalna pozwala uniknąć anionowego charakteru uzyskanego biopolimeru a w rezultacie otrzymać cząsteczki zdolne do oddziaływania z DNA i RNA znacznie silniej niż niemodyfikowane kwasy nukleinowe. Różnica w powinowactwie uwidoczni się zwłaszcza w roztworach i niewielkiej sile jonowej. Jednak, pomimo bardzo silnego wiązania z DNA i RNA, dużej stabilności enzymatycznej i chemicznej, bezpośrednie zastosowania PNA w terapii antysensownej czy też antygenowej są znacząco utrudnione przez ich niewielką zdolność do wnikania do wnętrza komórki. Jednym z rozwiązań tego problemu jest koniugacja PNA z peptydami penetrującymi błonę komórkową. Pomimo, że syntezy takich koniugatów były już wcześniej opisane w literaturze naukowej, zastosowane tu podejście jest oryginalne i nowatorskie ponieważ wykorzystuje stosunkowo niedawno odkrytą reakcję cykloaddycji alkinowo-azydkowej. Reakcja ta, ze względu na selektywność, wysoka wydajność, korzystna kinetykę a także wysoką stabilność powstających koniugatów jest idealną metodą do otrzymywania aktywnych biologicznych makrocząsteczek.



DZIEKANAT  
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 6. 06. 2014

L.dz. 8010-4GA/1P-789/2014



Zatem postawiony problem badawczy ma interesujące implikacje biologiczne i może się przyczynić do opracowania ogólnej metody syntezy substancji aktywnych farmakologiczne, które mogłyby być wykorzystywane do selektywnej regulacji ekspresji białek w komórce.

### **Ocena pracy**

Dysertacja liczy 136 stron i napisana jest jasno i zrozumiale. Zamieszczony materiał graficzny jest wykorzystany w sposób celowy i przemyślany. Ułatwia lekturę pracy i pozwala zorientować się w obszernym materiale eksperymentalnym. Jednak zastrzeżenia może budzić jakość niektórych rycin (zwłaszcza Rys. 15 i Rys. 31) – niewystarczająca jest rozdzielczość co i zbyt mały stopień pisma. Znacząco utrudnia to np. odczytanie mas na reprodukowanych widmach.

Konstrukcja pracy jest poprawna, zaś proporcje między poszczególnymi częściami wyważone. Autorka w jasny i precyzyjny sposób określa cele pracy: zamierza otrzymać koniugat, który regulowałby ekspresję białka STAT1 a w rezultacie hamował procesy miażdżycowe. Realizacja tego celu wymaga opracowania odpowiedniej metody syntezy, wykorzystującej selektywną i efektywną cykloaddycję Huisgena. Plan pracy obejmuje otrzymanie serii analogów PNA (sensownych i antysensownych) peptydów transportujących i ich koniugatów. W celu ułatwienia badań biologicznych, niektóre z substancji miały być połączone ze znacznikiem fluorescencyjnym. Badania miały również objąć testy biologiczne (zbadanie transportu otrzymanych koniugatów przez błonę komórkową) i fizykochemiczne (oddziaływania PNA i ich koniugatów z kwasami nukleinowymi)

Opis części eksperymentalnej jest szczegółowy i zawiera dane niezbędne do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Peptydy wykorzystane w badaniach zostały zsyntezowane na nośniku stałym według strategii Fmoc. Podobnie uzyskano peptydowe kwasy nukleinowe. W syntezie peptydów wykorzystano żywicę 2-Cl-(2'-Cl)-Trt-PS oraz Tenta Gel S RAM natomiast PNA zostały zsyntezowane na podłożu XAL-PEG-PS. W trakcie syntezy na nośniku stałym PNA i peptydy zostały zmodyfikowane przez przyłączenie kwasu azydooctowego lub propynowego. Tak zmodyfikowane peptydy, po odłączeniu od żywicy i oczyszczeniu poddawano koniugacji w obecności jonów  $\text{Cu}^{1+}$  generowanych z  $\text{CuSO}_4$  przez redukcję kwasem askorbinowym. Produkty reakcji zostały poddane oczyszczeniu za pomocą HPLC

Łącznie uzyskano 29 związków o masach cząsteczkowych dochodzących do 5500 Da, wśród których było 6 koniugatów PNA - peptyd transportujący. Tożsamość otrzymanych produktów wykazano porównując eksperymentalnie wyznaczone masy cząsteczkowe z masami cząsteczkowymi obliczonymi teoretycznie na podstawie sekwencji (tabele 4, 7 i 9). Przytoczone dane pozwalają pozytywnie zweryfikować otrzymane sekwencje. Jednorodność wszystkich otrzymanych produktów potwierdzono za pomocą analitycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wydajności otrzymanych produktów są dobre, jeśli uwzględnić stopień trudności



przeprowadzonych syntez. Dużym wyzwaniem eksperymentalnym była skala prowadzonej syntezy wymuszona przez bardzo duży koszt pochodnych stosowanych w syntezie PNA. Doktorantka znakomicie poradziła sobie z tym problemem dowodząc że jest bardzo sprawnym syntetykiem.

W części eksperymentalnej Doktorantce nie udało się jednak uniknąć niedopowiedzeń i drobnych nieścisłości. W opisie eksperymentu nie znalazłem danych dotyczących zastosowanych odczynników. O ile, rozpuszczalniki i pochodne aminokwasów są powszechnie dostępne a materiały dostarczane przez różne firmy są zbliżone pod względem jakości podanie pochodzenia pochodnych stosowanych w syntezie PNA wydaje się dość istotne. W danych dotyczących widm MS, brakuje informacji, czy zmierzono (i obliczono) masy monoizotopowe czy też średnie masy cząsteczkowe. Klasa zastosowanych spektrometrów sugeruje, że były dostępne dane na temat mas monoizotopowych. Dane w tabelach 4, 7 oraz 9 dotyczące eksperymentalnych mas cząsteczkowych są nieścisłe, ponieważ dla widm MALDI bezpośrednio porównano masy odczytane na widmach z danymi obliczonymi teoretycznie. Jednak dane teoretycznie obliczone odnoszą się do mas cząsteczkowych obojętnych cząsteczek, zaś dane na widmach do jonów pseudomolekularnych  $MH^+$ . Różnica (1Da) nie jest duża w porównaniu z masami analizowanych związków, jednak dla ścisłości należałoby ją uwzględnić. Dodatkowo na Rys. 31 występuje kilka błędów – widma związków 7, 9 i 14 nie odpowiadają masom cząsteczkowym podanym w Tabeli 4. Według mnie, w tym rysunku omyłkowo wykorzystano niewłaściwe widma. Nie jest to problem merytoryczny – dane w tabeli są poprawne, jednak jest to niewątpliwie błąd redakcyjny.

Zastanawia mnie też dobór żywic stosowanych w syntezie. Może byłoby warto przetestować dostępne ostatnio żywice Chemmatrix, na podłożu z sieciowanego glikolu polietylenowego? Często jakość otrzymanych na tych żywicach produktów jest znacznie lepsza niż na żywicach polistyrenowych czy typu Tenta Gel.

Biologiczne badania otrzymanych koniugatów dowiodły, że badane związki przenikały do cytoplazmy komórki. Badania z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego jednoznacznie wykazały, że dołączone sekwencje peptydowe umożliwiają transport przez błonę komórkową. Trypsynizacja komórek potwierdziła, że znakowany fluorescencyjnie koniugat nie jest absorbowany na powierzchni komórki, a jest efektywnie przenoszony do cytoplazmy. Badanie wykorzystujące elektroforezę kapilarną pozwoliły potwierdzić oddziaływania PNA i ich koniugatów z kwasami nukleinowymi jednocześnie wskazując że obecność peptydu transportującego ani sondy fluorescencyjnej nie zmienia specyfiki oddziaływań PNA z kwasami nukleinowymi.

Przeprowadzone eksperymenty udowodniły możliwość otrzymania koniugatów PNA - peptyd transportujący z wykorzystaniem „click chemistry”, wykazały że otrzymane substancje wnikają do komórek śródbłona a także skutecznie wiążą się z kwasami nukleinowymi. Te ustalone fakty otwierają drogę do farmakologicznych zastosowań połączeń PNA z peptydami penetrującymi błony komórkowe.



Praca pod względem językowym jest dobrze zredagowana. Udało mi się znaleźć jedynie bardzo nieliczne błędy literowe. Spis literatury obejmuje 185 publikacji, głównie oryginalnych prac badawczych. Bibliografia uwzględniająca najnowsze pozycje literaturowe sięga roku 2013 i została sporządzona starannie i jednolicie. Występujące sporadycznie strony sieciowe cytowane są poprawnie, z podaniem daty dostępu.

Nieliczne błędy które dostrzegłem w ocenianej pracy mają głównie charakter redakcyjny. Nie utrudniają w znaczący sposób lektury pracy i nie mogą wpływać na jej ocenę merytoryczną. Wykonane badania odpowiadają na pytania postawione w celu pracy. Eksperymenty zostały poprawnie zaprojektowane, starannie wykonane oraz przedstawione w przejrzysty sposób.

Łączny dorobek naukowy Doktorantki obejmuje aktualnie 9 publikacji. Trzy z nich zostały opublikowane w czasopismach z „listy filadelfijskiej” Należy odnotować, że Doktorantka jest pierwszym autorem w czterech z tych publikacji. Sumaryczny współczynnik wpływu prac Doktorantki wynosi 5.90. Dodatkowo wyniki przedstawiono w jedenastu wystąpieniach konferencyjnych w tym także na konferencjach międzynarodowych.

Stwierdzam, że wykonana przez mgr Monikę Wojciechowską praca doktorska zatytułowana „Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z peptydami penetrującymi błonę komórkową” spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 18 marca 2011 jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Piotr Stefanowicz

