



UNIwersytet GDAŃSKI



dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 12 maja 2014 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

Recenzja pracy doktorskiej mgr Moniki Wojciechowskiej
z tytułu pracy „Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych kwasów
nukleinowych z peptydami penetrującymi błonę komórkową”

Już od wielu lat synteza i badania biologiczne biokoniugatów cieszą się dużym zainteresowaniem badaczy. Połączenie dwóch różnych cząsteczek, najczęściej za pomocą wiązania kowalencyjnego, skutkuje otrzymaniem nowych syntetycznie modyfikowanych biomolekuł o zróżnicowanych właściwościach i zastosowaniach. Koniugaty są stosowane między innymi do śledzenia procesów zachodzących w komórkach, wykrywania obecności enzymów, ustalania biodystrybucji białek, obrazowania biomarkerów, czy też wreszcie używane są jako nośniki leków do komórek docelowych. Budowa ich jest różnorodna. Jako składowe koniugatów stosowane są naturalne bądź syntetyczne polimery: węglowodany, peptydy, białka - w tym np. swoiste przeciwciała, które potencjalnie mogą wybiórczo wiązać się z receptorami lub antygenami komórek docelowych, kwasy nukleinowe i ich mimetyki - peptydowe kwasy nukleinowe. W skład koniugatów wchodzi też mniejsze cząsteczki, szczególnie te o właściwościach terapeutycznych np. antybiotyki, czy leki przeciwnowotworowe. Systemy takie projektuje się między innymi w celu zwiększenia efektywności dostarczania, wybiórczości działania i poprawy właściwości farmakologicznych zarówno konwencjonalnych, jak i nowoczesnych leków. Ciekawą grupę polimerów stanowią koniugaty, których jednym ze składników są peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). Jest to grupa związków, w których ujemnie naładowany cukrowo-fosforanowy szkielet kwasów nukleinowych zastąpiony został neutralnym szkieletem poliamidowym zbudowanym z powtarzających się jednostek *N*-(2-aminoetylo)-glicyny. Cztery nukleozasady związane są ze szkieletem PNA przez łączniki metylenokarbonylowe. Molekuły te wykazują zdolność do



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 15.05.2014

L.dz. 8010-4CH/IP-696/2014

wchodzenia w interakcje z komplementarnymi fragmentami DNA i RNA, a dodatkowo cechuje je wysoka stabilność chemiczna, odporność na degradację enzymatyczną oraz niska toksyczność. Niestety mała rozpuszczalność PNA w wodzie, tendencja do agregacji oraz słaba przenikalność przez błony komórkowe ogranicza ich zastosowanie w medycynie, dlatego obecnie wielu badaczy skupia się na łączeniu PNA z różnymi cząsteczkami efektorowymi, które mogą przekazać swoje specyficzne właściwości koniugatowi. Do tego nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr Moniki Wojciechowskiej wykonaną pod kierunkiem prof. Piotra Rekowskiego.

Zadaniem jakie postawiono przed Doktorantką była synteza koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z peptydem penetrującym komórki PDT-4, który jest analogiem zasadowego fragmentu (47-57) białka Tat.

Recenzowana rozprawa napisana została na 135 stronach, a jej układ jest typowy dla prac chemicznych. W rozprawie wyróżniono dwie części: przegląd literaturowy oraz badania własne, w której to części umieszczony został cel i plan pracy, wyjaśniono wybór sekwencji łańcuchów PNA i wybór metody dostarczania PNA do komórek śródbłonna. Ta część zawiera także opis przeprowadzonych eksperymentów i badań biologicznych, podsumowanie wyników, wnioski, oraz spis literatury cytowanej – 185 pozycji.

Część pierwsza, zawierająca pięć rozdziałów, wprowadza w tematykę badań własnych Kandydatki. Znajduje się w nich charakterystyka peptydowych kwasów nukleinowych, opis peptydów penetrujących komórkę oraz przedstawiono w niej metody łączenia biomolekuł w koniugaty. Jako jedna z nich, szerzej opisana została technika „click chemistry”, którą to Doktorantka stosowała do łączenia składników otrzymanych koniugatów. Ostatni rozdział tej części zawiera opis elektroforezy kapilarnej, jako techniki separacyjnej, która idealnie nadaje się do pracy z małymi ilościami materiału, a takimi właśnie dysponowała Doktorantka. Poziom merytoryczny tej części rozprawy jest właściwy dla tego rodzaju prac i dobrze przygotowuje do czytania rozdziałów, w których omówione zostały badania własne. Umieszczone w pracy rysunki i schematy ułatwiają lekturę tekstu. Nie mam też zastrzeżeń do strony językowej, aczkolwiek Kandydatka kilka razy użyła sformułowań, które budzą wątpliwości. Wydaje mi się, że nie można używać nazw: wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka, czy też Hogsteena, dla wiązań wodorowych wiążących komplementarne pary zasad w helisie DNA i hybrydach PNA z DNA, czy RNA. Ponieważ fizycznie są to oddziaływania tego samego typu, a różnią je tylko „miejsca tworzenia”, czyli tworzą się między innymi

atomami tlenu, czy azotu i wodoru, za poprawniejsze sformułowania uważam: parowanie typu Watsona-Cricka, czy odpowiednio parowanie typu Hoogsteena. Za niepoprawne uważam także nazwanie wiązania amidowego łączącego dwa monomery PNA wiązaniem peptydowym (rys. 4. str.21), bo z definicji jest to wiązanie amidowe łączące ze sobą dwa aminokwasy. Nie podoba mi się również nazywanie otrzymanych łańcuchów PNA fragmentami PNA. Słowo fragment sugeruje, że wywodzą się one z jakiegoś większego polimeru, a tak nie jest. Zostały one zaprojektowane niezależnie, aby stworzyć łańcuchy PNA sensowne i antysensowne, komplementarne dla fragmentu mRNA STAT1.

Celem pracy doktorskiej była chemiczna synteza koniugatów PNA z peptydem penetrującym komórki PTD-4. Początkowo koniugaty te próbowano otrzymać metodą krok po kroku na nośniku stałym, niestety tak zaplanowana synteza nie powiodła się. Następnym etapem pracy było więc otrzymanie ośmiu łańcuchów PNA zbudowanych z 13 monomerów, sześciu zbudowanych z 18 monomerów oraz siedmiu modyfikowanych peptydów PTD-4. Ponieważ koniugaty zaprojektowano między innymi w celu wprowadzenia ich do komórek śródbłonna, aby móc śledzić to wejście, do większości wymienionych molekuł przyłączono cząsteczkę fluoroforu - 5-karboksytetrametylorodaminy (TAMRA). Już na tym etapie każdy doświadczony chemik może zauważyć, że postawione Doktorantce zadanie było nie lada wyzwaniem. Jego realizacja oprócz studiów literaturowych wymagała dużej sprawności laboratoryjnej, a także pracowitości i cierpliwości. Jeśli dołożymy do tego fakt, że molekuly zostały ze sobą połączone przy zastosowaniu strategii „click chemistry” do cech Doktorantki dołączyć trzeba również odporność na stres i wytrwałość. Rozdział 11 pracy (34 strony), w którym opisane zostały przeprowadzone syntezy, oczyszczanie, charakterystyka fizykochemiczna peptydów, PNA i koniugatów, jest tego dowodem. Jestem pod dużym wrażeniem tego co Pani Monika wykonała, tym bardziej, że grupa prof. Rekowskiego nie miała na tym polu dużego doświadczenia, bo w tę tematykę weszła właściwie równocześnie z Doktorantką.

Syntezy zarówno peptydów jak i PNA zostały przeprowadzone metodą na nośniku stałym. Do niektórych cząsteczek PNA, jeszcze na nośniku, przyłączone zostały cząsteczki kwasu propynowego, bądź Fmoc-propargilglicyny, które zawierają ugrupowanie alkinowe. W przypadku peptydów, C-końcową resztę zawierającą ugrupowanie azydkowe (kwas azydooctowy) utworzono w dwóch etapach, bezpośrednio na żywicy. W pierwszym etapie do nośnika przyłączony został kwas bromooctowy, a następnie atom bromu został podstawiony ugrupowaniem azydkowym. Podrozdział opisujący ten proces Doktorantka zatytułowała

„Przyłączanie kwasu azydooctowego do PDT-4”, co biorąc pod uwagę zastosowaną procedurę uważam za niepoprawne.

W celu otrzymania koniugatów alkinowe analogi PNA oraz azydkowe pochodne analogów PTD-4 zostały połączone z wykorzystaniem reakcji „click”. Aby ustalić warunki dla uzyskania jak najlepszych wydajności cząsteczkę TAMRY, ugrupowanie alkinowe i azydkowe umieszczano w różnych miejscach. Był to zarówno łańcuch główny peptydu czy PNA, jak i łańcuchy boczne monomerów. Największe wydajności sprzęgania uzyskano w przypadku koniugatów, w których ugrupowanie alkinowe znajdowało się w łańcuchu głównym PNA, ugrupowanie azydkowe w łańcuchu bocznym PTD-4, a TAMRA przyłączona była do łańcucha bocznego reszty aminokwasu należącego do peptydu. Niestety tą metodą nie udało się otrzymać związku 27, oraz koniugatów z PNA zbudowanymi z 18 monomerów.

Wszystkie otrzymane analogi PNA, analogi peptydów PTD-4 oraz koniugaty, po syntezie zostały oczyszczone i scharakteryzowane. Omawiany rozdział pracy zawiera chromatogramy RP-HPLC wszystkich otrzymanych związków, zarówno surowych jak i oczyszczonych oraz widma masowe oczyszczonych produktów. Cała przedstawiona dokumentacja jest dowodem na to, że Doktorantka zrealizowała cel pracy.

W omawianej części znalazłam parę błędów i nieścisłości np. podpis pod rys. 27 na stronie 63 pokazującym budowę koniugatów brzmi: „schematyczne (pisownia oryginalna) struktury zaplanowanych do syntezy koniugatów PNA – PTD-4”, a powinien brzmieć „Schemat budowy zaplanowanych do syntezy koniugatów PNA – PTD-4”. W pracy zdarzają się także nieprecyzyjne opisy, np. na stronie 68, w opisie metody przyłączania Fmoc-Gly do PNA można przeczytać: „Aminokwas przyłączałam dwukrotnie z wykorzystaniem 3-krotnego i 1,5-krotnego molowego nadmiaru aminokwasu względem osadzenia żywicy z dodatkiem mieszaniny HATU, HOAt...” itd. Zastosowanie słowa „dodatek” w stosunku do środka sprzęgającego wydaje mi się nieodpowiednie, tym bardziej, że użyto go w ilości równomolowej w stosunku do Fmoc-Gly. Na stronie 93, w opisie syntezy TAMRA-PEG₃-Tra(1,4)-C(O)-PDT-4-NH₂ znajduje się informacja, że użyto do syntezy analog PDT-4, a powinno być amid analogu PDT-4. Dziwne też wydaje mi się to, że czasy retencji podane na chromatogramach (str. 76) i w tabeli 4 (str. 80) w przypadku dwóch par związków Pra-Gly-PNA(13)_A i TAMRA-Pra-Gly-PNA(13)_A (czas retencji odpowiednio 12,91 i 12,74 min.) oraz Gly-PNA(18)_A i TAMRA-Gly-PNA(18)_A (czas retencji odpowiednio 17,25 i 17,75 min.) są

prawie jednakowe. Chyba nastąpiła tu jakaś pomyłka, bo w przypadku innych tego typu par różnica w czasach retencji po przyłączeniu TAMRA wynosi nawet 3 minuty.

Otrzymane przez Doktorantkę związki zostały przebadane w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kątem zdolności do przechodzenia przez błonę komórkową komórek śródbłonna. Badania potwierdziły, że peptyd PTD-4 może służyć jako związek przenoszący PNA do wnętrza komórek i to zarówno wtedy, gdy jest z nim związany kowalencyjnie jak i wtedy, gdy tworzy z PNA kompleksy niekowalencyjne. Niestety, muszę w tym miejscu zaznaczyć, że zła jakość umieszczonych w pracy czarno-białych zdjęć dokumentujących te badania sprawia, że są one mało czytelne.

Ostatnim etapem pracy były badania z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej, które potwierdziły tworzenie się kompleksów antysensownych PNA zarówno z jednoniciowymi mRNA i DNA jak i z dwuniciowym DNA.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała cele rozprawy. Otrzymała koniugaty PNA z peptydem penetrującym komórki PTD-4, opracowując równocześnie wydajną metodę ich otrzymywania. Sekwencje PNA zostały tak zaprojektowane, aby ich koniugaty mogły być wykorzystane w terapii lub diagnostyce medycznej miażdżycy, a fakt, że wchodzą one do komórek daje taką nadzieję. Wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w rozprawie. Ich zakres jest szeroki: od trudnych, skomplikowanych i pracochłonnych syntez chemicznych, przez badania powstających kompleksów, do badań biologicznych. Na uznanie zasługuje także sposób prezentacji wyników i prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu, a dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości nie obniżają wartości pracy. Wszystkie umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona dobrze przygotowana do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych, a zdobyte w trakcie pracy doświadczenie sprawiło, że Doktorantka w marcu tego roku została zatrudniona na etacie asystenta naukowego w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Efektem wykonanych przez Kandydatkę syntez i badań są również trzy publikacje (dwie z nadanym numerem DOI, trzecia przyjęta do druku) w czasopismach z listy JCR. Doktorantka jest także współautorką czterech artykułów, które ukazały się w cyklu monografii pt.: "Na pograniczu chemii i biologii" ukazujących się nakładem Wydawnictw Naukowych Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, dwóch w Copernican Letters, jednego opublikowanego w

materiałach pozjazdowych i 10 komunikatów wygłoszonych bądź zaprezentowanych na konferencjach naukowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie kryteria ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. IJ. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr782, poz. 7228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz.455) i zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Moniki Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Jęgorvska