

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr Joanny Pianki

„Projektowanie i synteza chemiczna analogów RTD-2 oraz analiza ich aktywności biologicznej wobec linii komórkowych raka piersi”

Promotor: prof. dr hab. Adam Lesner

Kopromotor: dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed

Promotor pomocniczy: dr Natalia Gruba

Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Środowiska, Zespole Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Tematyka rozprawy doktorskiej związana jest z syntezą i oceną biologiczną analogów peptydów przeciwdrobnoustrojowych o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Badania dowiodły, że niektóre peptydy modulują działanie układu odpornościowego, zwalczają zakażenia i wykazują szeroką cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych. Są częścią wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, stymulują gojenie ran, regulują stan zapalny oraz inicjują odporność nabytą. Zakres prowadzonych przeze mnie badań dotyczył pochodnych defensyn – białek kationowych wykazujących aktywność przeciw bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, wirusom, grzybom oraz pasożytom. Ich szerokie spektrum działania czyni je niezwykle interesującymi molekułami w opracowywaniu nowego rodzaju leków peptydowych. Niestety istotny problem stanowi niska wydajność syntezy chemicznej oraz otrzymanie właściwego motywu mostków disulfidowych.

Celem prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badań była ocena zdolności uproszczonych, biologicznie aktywnych analogów θ -defensyn do selektywnego celowania w różnego typu komórki raka piersi. Ponieważ synteza peptydów zawierających wiele reszt cysteinowych jest dość trudna i mało opłacalna, zsyntezowane peptydy zawierały tylko jedno wiązanie disulfidowe, stanowiąc atrakcyjną alternatywę związków o potencjalnym zastosowaniu farmaceutycznym.

Część eksperymentalna mojej pracy obejmowała:

1. Projektowanie i syntezę analogów RTD-2, które wykorzystałam jako narzędzia chemiczne do wyjaśnienia właściwości przeciwnowotworowych,
2. Ocenę biologiczną potencjału cytotoksycznego syntetyzowanych związków wobec wybranych linii komórkowych raka piersi.

Syntezę analogów RTD-2 wykonałam manualnie na nośniku stałym przy użyciu strategii Fmoc/tBu. Po usunięciu peptydów z żywicy przeprowadziłam reakcję utleniania jodem w celu utworzenia mostka disulfidowego pomiędzy resztami cysteiny, a następnie wewnątrzcząsteczkową cyklizację „głowa-ogon”. Celem potwierdzenia poprawności poszczególnych etapów syntezy, otrzymane związki poddałam analizie metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej. Masę cząsteczkową zsyntetyzowanych peptydów potwierdziłam poprzez analizę spektrometrii mas przy zastosowaniu techniki MALDI-TOF. Potencjał cytotoksyczny syntetyzowanych związków w stosunku do wybranych linii komórkowych raka piersi określono za pomocą testu MTT. Ponadto dla wybranych analogów RTD-2 przeprowadziłam trójwymiarowe hodowle komórkowe (hodowle 3D), powszechnie wykorzystywane w badaniach biologii komórek nowotworowych. Kolejnym etapem mojej pracy było ustalenie lokalizacji komórkowej zsyntetyzowanych związków metodą mikroskopii fluorescencyjnej. Do tego celu wykorzystałam najbardziej aktywny peptyd RTD-2 bogaty w reszty seryny i zawierający w sekwencji fluorofor ($[\text{Ser}^{3,7,12,16}]$ -Ala(2-BAD)RTD-2; $[\text{Ser}^{3,7,12,16}]$ -Lys(HOC)RTD-2) Dodatkowo wykonałam syntezę analogu zawierającego cząsteczkę biotyny ($[\text{Ser}^{3,7,12,16}]$ -Lys(Bt)RTD-2). Umożliwiło mi to przeprowadzenie reakcji immunoprecypitacji, stanowiącej kluczowy punkt badań nad identyfikacją domniemanych partnerów molekularnych RTD-2.

Joana Piątek