



UNIwersytet GDAŃSKI



nr 58 523 50-90

dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 9 kwietnia 2018 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

anna.legowska@ug.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej
z tytułem „Cykliczne peptydy o aktywności antyangiogennej”**

Angiogeneza, czyli tworzenie nowych włosowatych naczyń krwionośnych z już istniejących, jest procesem fizjologicznym, ale może być też patologicznym. W wypadku zdrowego, dorosłego organizmu, proces angiogenezy ma miejsce np. w czasie gojenia się ran, cyklu menstruacyjnego kobiety, jak i podczas formowania się łożyska, i jest kontrolowany przez organizm produkujący czynniki pro- i antyangiogenne. W warunkach patologicznych jest jednym z elementów biorących udział w powstawaniu i przebiegu np. schorzeń kardiologicznych, gastrologicznych, reumatoidalnych, czy nowotworzenia. W procesie nowotworzenia proces angiogenezy wymyka się spod kontroli, dając w efekcie warunki korzystne dla rozwoju guza. Pierwszym, który zaczął podejrzewać, że wzrost guza wydaje się zależeć od angiogenezy był Judah Folkman. Zauważył on, że wszystkie operowane przez niego guzy były mocno ukrwione przez delikatne naczynia krwionośne, przez które dostarczane im były niezbędne składniki odżywcze. Folkman szybko doszedł do przekonania, że zahamowanie angiogenezy, może prowadzić do pokonania raka i jest sposobem na spowodowanie jego regresji.

Jednym z głównych czynników proangiogennych jest białko VEGF₁₆₅, które wiążąc się do receptora VEGF-R oraz jego koreceptora neuropiliny-1 (NRP-1), występujących na powierzchni komórek endotelialnych naczyń krwionośnych, powoduje zapoczątkowanie wzrostu naczyń włosowatych. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że oddziaływanie VEGF₁₆₅ z NRP-1 jest główną przyczyną patologicznej angiogenezy i w następstwie przyczyną rozrostu tkanki nowotworowej. Poszukiwanie związków mogących selektywnie blokować to oddziaływanie stało się przedmiotem badań wielu grup naukowych. Do tego

nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr Karoliny Grabowskiej, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik.

Zadaniem jakie postawiono przed Doktorantką była synteza bardziej odpornych na degradację enzymatyczną, cyklicznych analogów C-końcowego fragmentu antyangiogenego heptapeptydu A7R, który selektywnie wiąże się z NRP-1, hamując oddziaływanie NRP-1 z VEGF₁₆₅. W dobie intensywnego poszukiwania związków mogących stać się lekami przeciwnowotworowymi temat podjęty przez doktorantkę uważam za bardzo aktualny i ważny, a także ambitny, biorąc pod uwagę trudności jakie napotyka chemik podczas cyklizacji peptydów.

Recenzowana rozprawa napisana została na 171 stronach, a jej układ jest typowy dla prac chemicznych. W rozprawie wyróżniono pięć części: przegląd literaturowy, rozdział poświęcony założeniom i celowi pracy, badania własne, podsumowanie oraz część doświadczalną, zawierającą informacje dotyczące przeprowadzonych syntez. Na końcu rozprawy znajduje się spis rysunków, tabel, wykaz skrótów oraz spis literatury cytowanej – 167 pozycji.

Część pierwsza, zawierająca trzy rozdziały, wprowadza w tematykę badań własnych Kandydatki. Znajduje się w nich opis różnych metod syntezy cyklicznych peptydów, charakterystyka cyklicznych peptydów stosowanych w farmakoterapii oraz rozdział poświęcony angiogenezie i jej inhibitorom. Poziom merytoryczny tej części rozprawy jest właściwy dla tego rodzaju prac i dobrze przygotowuje do czytania rozdziału, w którym omówione zostały badania własne. Umieszczone w pracy rysunki, schematy i tabele, ułatwiają lekturę tekstu.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej była synteza cyklicznych peptydów o potencjalnym działaniu antyangiogenym. Peptydy te zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencję C-końcowego fragmentu heptapeptydu A7R o sekwencji - LPPR, który wykazuje aktywność antyangiogeną. Kolejne cele pracy to przeprowadzenie analizy zależności aktywności od struktury pierwszorzędowej analogów peptydu LPPR. Doktorantka zaplanowała również badania aktywności cyklicznych peptydów przy pomocy testu ELISA, którego celem było sprawdzenie, czy wiążą się one z białkiem NRP-1, hamując tym samym tworzenie układu VEGF₁₆₅/NRP-1, a następnie badania stabilności najaktywniejszych otrzymanych peptydów, w surowicy ludzkiej krwi.

W rozdziale pt: „Badania Własne” Doktorantka w szczegółowy sposób wyjaśniła co wzięła pod uwagę projektując cykliczne peptydy. Były to jeden z dwóch rodzajów cyklizacji: łańcuch boczny-do-łańcucha bocznego lub N-końcowa grupa aminowa-do-łańcucha

bocznego, różna wielkość pierścienia utworzonego w jej wyniku, a zależąca od długości łańcucha bocznego występującego w sekwencji, zasadowego lub kwasowego aminokwasu, czy wreszcie włączenie w cykliczny peptyd D-izomerów wybranych aminokwasów. Peptydy zostały utworzone metodą syntezy na nośniku stałym. Również na nośniku stałym dokonano obu rodzajów cyklizacji. W trakcie cyklizacji mgr Grabowska musiała się zmierzyć z problemem powstawania oprócz peptydów monomerycznych ich cyklicznych dimerów, a nawet trimerów. Już na tym etapie 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. Zarówno ten rozdział, jaki rozdział 3 pracy (31stron), w którym opisane zostały przeprowadzone syntezy, oczyszczanie, charakterystyka fizykochemiczna peptydów, a także sposoby optymalizacji syntez w celu otrzymania głównie monomerycznych cyklicznych peptydów, jest tego dowodem. Jestem pod dużym wrażeniem tego co Pani Karolina wykonała w czasie swojej pracy. W jej efekcie otrzymała, poza jednym, wszystkie zaplanowane peptydy cykliczne.

W rozdziale pt. „Badania własne” Doktorantka przedstawiła również wyniki badań biologicznych przeprowadzonych z udziałem zsyntetyzowanych peptydów. Wyniki testów ELISA pokazały, że pięć spośród peptydów z cyklizacją typu łańcuch boczny–do-łańcucha bocznego, wykazywało wyższą aktywność w hamowaniu układu VEGF₁₆₅/NRP niż wzorcowy peptyd A7R, a w wypadku dwóch z nich, peptydy oznaczone jako **1** i **2**, wyznaczone dla nich wartości IC₅₀ były ponad 30 razy niższe niż dla peptydu wzorcowego. W wypadku peptydów tej serii (peptydy **1-6**) przeprowadzone zostało także modelowanie molekularne, które pokazało, że głównym elementem struktury peptydów odpowiedzialnym za oddziaływanie z kieszenią białka NRP-1 jest C-końcowa reszta L-argininy. Dodatkowo w wypadku czterech pierwszych peptydów z tym typem cyklizacji, możliwym oddziaływaniem jest interakcja N-końcowej grupy aminowej z Glu348 należącym do neuropiliny.

Z zaplanowanych 8 peptydów z typem cyklizacji głowa-do-łańcucha bocznego tylko dwa udało się otrzymać w postaci monomerów, pięć następnym w czasie cyklizacji utworzyło dimery. Najbardziej aktywny w hamowaniu układu VEGF₁₆₅/NRP z grupy dimerów cyklicznych okazał się być peptyd **15** (c[Lys-Pro-Asp]Arg-OH).

Najaktywniejsze trzy peptydy **1**, **2**, i **15** zostały otrzymane w skali 100 mg każdy, co umożliwiło wykonanie badań toksykologicznych na dwóch liniach komórkowych: zdrowych (HUVEC) oraz nowotworowych raka piersi (MDA MB 231). Wyniki tych testów pokazały, że peptydy nie są cytotoksyczne. Peptydy te okazały się także być dosyć stabilne w surowicy

ludzkiej krwi. Najbardziej stabilny był peptyd **15**. Otrzymane wyniki są bardzo obiecujące, jeśli mamy na uwadze potencjalne zastosowanie otrzymanych peptydów w blokowaniu angiogenezy, a przeprowadzone przez Doktorantkę badania zależności między strukturą a aktywnością biologiczną otrzymanych analogów peptydowych z całą pewnością poszerzyły wiedzę dotyczącą związków, które są inhibitorami układu VEGF₁₆₅/NRP-1. Do tej pory, cykliczne peptydy hamujące tworzenie się tego układu nie były znane.

Bardzo ciekawe okazały się także badania dotyczące optymalizacji metody otrzymywania cyklicznych peptydów na nośniku stałym. Celem tych badań było sprawdzenie, jak rodzaj i osadzenie polimeru, zastosowanie w czasie syntezy różnych związków aktywujących grupę karboksylową aminokwasów, konfiguracja reszt aminokwasów biorących udział w tworzeniu wiązania laktamowego oraz użycie mikrofal wpływa na uzyskaną ilość monomerycznego peptydu cyklicznego. Wyniki tych badań przedstawione, w tabeli 33 są wartością nie tylko same w sobie, ale też obrazem umiejętności i ogromu pracy wykonanej na tym etapie przez Doktorantkę.

Lektura rozdziałów drugiego zawierającego liczne chromatogramy analiz HPLC wykonywanych po przeprowadzonych syntezach oraz trzeciego, w którym zebrane zostały opisy przeprowadzonych syntez upewnia, że mgr Grabowska zrealizowała wszystkie zakładane cele pracy doktorskiej.

Podsumowując, wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w rozprawie. Zostały one bardzo dobrze zaplanowane i wykonane, a ich zakres jest szeroki: od trudnych i pracochłonnych syntez chemicznych, przez badania modelowania komputerowego, do badań biologicznych. Na uznanie zasługuje także sposób prezentacji wyników i prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona dobrze przygotowana do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych. Efektem wykonanych przez Kandydatkę syntez i badań są również dwie publikacje w czasopismach z listy JCR oraz dwa zgłoszenia patentowe.

Pracę mgr Grabowskiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem, co przyczyniło się też do znalezienia kilku nieścisłości i niefortunnych według mnie określeń, które z obowiązku recenzenta przedstawię.

Za niepoprawne uważam sformułowanie „kąt psi występuje pomiędzy C_α-C, kąt phi pomiędzy N-C_α”. Dwuścienne kąty psi, phi nie „występują” pomiędzy atomami, a opisują obrót wokół wymienionych wiązań. Moje zdziwienie wywołało także nazwanie endogennych cyklicznych peptydów np. oksytocyny, wazopresyny czy insuliny peptydomimetykami i

uznanie każdej cyklizacji liniowego łańcucha peptydowego jako metody otrzymywania peptydomimetyku.

Na str. 60 Doktorantka umieściła rys. 65, który przedstawia ogólny wzór cyklicznych peptydów będących celem pracy doktorskiej. Wydaje mi się, że bez umieszczenia dodatkowych wyjaśnień i założeń, narysowanie tylko jednego wzoru ogólnego zarówno dla peptydów zawierających cyklizację typu łańcuch boczny-do-łańcucha bocznego jak i w wypadku cyklizacji *N*-koniec-do-łańcucha bocznego sprawia, że wzór ten jest niejasny. Trochę czasu zajęło mi ustalenie, że zapis „ $-(CH_2)_c-NH_2$ ” przy $c=0$ oznacza grupę aminową. Kontynuując, zmienna n również powinna móc przyjmować wartość zero, gdy wzór przedstawia peptyd z cyklizacją typu *N*-koniec-do-łańcucha bocznego. Zrozumienie omawianego wzoru utrudnia także błędne przedstawienie wzoru podstawnika A, który wygląda jak wzór acetamidu, a powinien przedstawiać wiązanie peptydowe.

Na str. 70 na rys.73 przedstawiony został schemat syntezy peptydu **2**, a nie, jak jest napisane w opisie rysunku, peptydu **1**. Na tej samej stronie w tabeli 17, w zapisie przedstawiającym peptyd **6** brakuje reszty Arg. W tabeli tej jak i w następnych, w których znajduje się kolumna przedstawiająca budowę omawianych cyklicznych peptydów, pojawia się nagłówek „sekwencja”. Wydaje mi się, że nie jest on zbyt fortunny, a w szczególności gdy przedstawiona jest budowa dimerów. Kolumna ta według mnie zawiera oznaczenia peptydów, a nie ich sekwencje. Zdaję sobie sprawę, że zapisanie peptydu w taki sposób, aby wynikała z niego jego budowa, a dodatkowo aby zapis ten mieścił się w jednej linii, może przysparzać trudności. Pomocną w tej sprawie może być dla Doktorantki publikacja grupy F. Albericio z 2005 r, (Spengler, J.; Jimenez, J. C.; Burger, K.; Giralt, E.; Albericio, F. Abbreviated nomenclature for cyclic and branched homo- and hetero-detic peptides *J. Pept. Sci.* 2005, 65, 550).

Na str. 110 Doktorantka napisała: „W przypadku peptydów z typem cyklizacji głowa-do-ogona”, a powinno być napisane: z typem cyklizacji głowa-do-łańcucha bocznego, bo peptydów z cyklizacją *N*-do *C*-końca Doktorantka nie otrzymywała.

Błędny zapis, dotyczący użytej do syntez żywicy z osadzonym pierwszym aminokwasem, pojawił się we wszystkich podrozdziałach rozdziałów 3.6 i 3.7. Jak wynika z sekwencji otrzymanych peptydów, zamiast zapisu „ilość surowej żywicy Boc-Arg(Tos)-Arg-Merrifield Resin” powinno być napisane: ilość surowej żywicy Boc-Arg(Tos)-Merrifield Resin. Zagadką jest też dla mnie pojęcie „surowej” żywicy. W tytule rozdziału 3.7 zamiast „cyklizacji łańcuch boczny-do-łańcucha bocznego” powinno być napisane *N*-koniec-do-łańcucha bocznego.

Dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości w żadnym razie nie mają wpływu na wartość naukową pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie kryteria ustawowe (Ustawa o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2016, poz. 882), rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego: w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 26 września 2016 r. (Dz. U. poz. 1586)) i zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny wykonanych i przedstawionych badań, nowatorstwo i szeroki ich zakres, umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka syntetyzując i oczyszczając cykliczne peptydy oraz fakt, że wynikiem tej pracy są dwie publikacje, w których jest pierwszym autorem i dwa zgłoszenia patentowe, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej.

Anna Stęgoska