

Streszczenie

Peptydy penetrujące błony komórkowe (ang. *Cell penetrating peptides*, CPP) to krótkie związki zawierające w sekwencji od 5 do 30 reszt aminokwasowych. CPP posiadają zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne nie powodując zakłócenia ich funkcji, pośredniczą one również w wewnątrzkomórkowym transporcie innych związków biologicznie czynnych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza oraz badania biologiczne nowej klasy peptydomimetyków penetrujących błony komórkowe. Wykonano syntezę analogicznych związków zawierających w sekwencji reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego połączone wiązaniem peptydowym. Grupy β -aminowe każdej z reszt Dap zostały zmodyfikowane poprzez przyłączenie oksakwasów sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem guanidynowym, grupą aminową lub hydroksylową. Związki znakowane były fluorescencyjnie lub posiadały wolny N-koniec.

W pierwszym etapie przeprowadzono testy oceny cytotoksyczności, które potwierdziły, iż związki te, w stężeniu 10 μ M, nie są toksyczne wobec analizowanych linii komórkowych. Następnie zostały zbadane zdolności penetrujące zsyntezowanych peptydomimetyków wobec błon komórkowych. W tym celu związki poddano 24-godzinnej inkubacji z liniami komórkowymi piersi: zdrowymi – HB2 oraz nowotworowymi – MDA-MB-231. Wykonane obserwacje mikroskopowe potwierdziły, iż związki zawierające w sekwencji 6 lub 8 ugrupowań guanidynowych najefektywniej wnikają do wnętrza komórek. Ugrupowanie guanidynowe jest decydującym czynnikiem w przenoszeniu peptydomimetyków przez błony biologiczne. Zastąpienie ich resztą aminową $-\text{NH}_2$ powodowało znaczne zmniejszenie właściwości penetrujących, natomiast zamiana ich na reszty hydroksylowe $-\text{OH}$ skutkowała całkowitym zanikiem zdolności do przenikania przez błony cytoplazmatyczne. Peptydomimetyki najefektywniej penetrujące membrany biologiczne wnikają do wnętrza większości badanych linii komórkowych piersi, pęcherza moczowego, skóry, a także podocytów szczurzych oraz makrofagów białaczki mysiej. W tym celu stosują mieszany mechanizm penetracji błon biologicznych, wykorzystując endocytozę oraz transport bezpośredni. Dalsze badania biologiczne wykazały, że peptydomimetyki nie wpływają znacząco na przebieg cyklu komórkowego wyżej wymienionych linii komórkowych.

W kolejnym etapie zostały przeprowadzone badania wykorzystujące techniki elektroforetyczne, MST oraz SPR, które potwierdziły tworzenie się oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami zawierającymi ugrupowania guanidynowe, a jednoniciowym oraz dwuniciowym fragmentem DNA w zakresie mikromolowym. Siła tworzących się oddziaływań związana jest z ilością grup guanidynowych w sekwencji związków i rośnie wraz ze wzrostem ich liczby. Następnie sprawdzony został wpływ utworzonych peptydomimetyków na kondensację plazmidowego DNA przy użyciu techniki AFM. Uzyskane wyniki wskazują, iż związki zawierające w sekwencji liczne ugrupowania guanidynowe powodują powstawanie większych struktur, których złożoność rośnie wraz ze wzrostem liczby ugrupowań guanidynowych. W konsekwencji dochodzi do kondensacji plazmidowego DNA oraz do zmniejszenia wartości jego ładunku, w związku z czym zsyntezowane peptydomimetyki mogą pośredniczyć w transporcie DNA do wnętrza komórek.

Ponadto, zsyntezowane peptydomimetyki mogą być również mediatorem w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu białek. Dotyczy to zarówno znakowanych cząsteczek nieposiadających aktywności biologicznej, jak i tych wykazujących działanie enzymatyczne.