



Wrocław, 16.11.2024

Prof. dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka

Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej

e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl**RECENZJA****rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Cekały****pt. „Peptydy i peptydomimetyki wywodzące się z białek Rpt5 i Blm10 jako stymulatory ludzkiego proteasomu 20S *in vitro* i *in cellulo*”, wykonanej w Pracowni Chemii Medycznej Katedry Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotor dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG, oraz promotor pomocniczej dr Ewy Wieczerek**

Spółcześnie kraje rozwijające się szybko się starzeją, a do 2030 r. liczba osób w wieku 65 lat i więcej będzie stanowić około 20% populacji. Wraz ze wzrostem średniej długości życia, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, dramatycznie wzrasta częstość występowania chorób neurodegeneracyjnych, których wspólną cechą jest ekspresja nieprawidłowo sfałdowanych białek i tworzenie złogów, które uszkodzają komórki nerwowe. Jednym z najważniejszych systemów degradacji białek pozwalających na utrzymanie homeostazy komórkowej jest system ubikwityna-proteasom (UPS), który degradowuje większość (aż do 90%) białek komórkowych. Zauważono jednak, że stosunek ilości poszczególnych typów proteasomu zmienia się wraz z wiekiem, na korzyść ubikwityno-niezależnego systemu proteasomowego (UIPS), który wymaga przyłączenia części regulatorowej w celu wydajnego trawienia białek. Jednocześnie wzrost poziomu nieprawidłowo sfałdowanych białek, a także puli proteasomu 20S bez przyłączonego regulatora jego aktywności, kieruje oczy naukowców na możliwość wprowadzenia zewnętrznych aktywatorów jego aktywności, które pobudzałyby enzym do trawienia białek o potencjale agregacyjnym, spowalniając w ten sposób postęp wielu proteinopatii. Ze względu na złożoność kompleksu 20S, poszukiwania optymalnej struktury, która w sposób specyficzny oddziaływałaby z enzymem należą do bardzo czasochłonnych. Dobrym sposobem wydaje się oparcie ich struktury na natywnych regulatorach tego enzymu, takich jak białko Blm10 lub regulatory 19S i 11S, jednakże takie peptydowe aktywatory często nie mogą w pełni spełniać swojej roli jako leki ze względu na niską odporność proteolityczną, wysokie koszty produkcji, a także konieczność stworzenia systemu dostarczania tych cząsteczek do wnętrza komórki. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Katarzyny Cekały dotyczy właśnie tego zagadnienia, a została wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG., której uwaga od dawna skoncentrowana jest na badaniach z tej dziedziny.

Badania dotyczące aktywatorów proteasomu, szczególnie jego formy 20S, przyciągają coraz większą uwagę w kontekście zarówno mechanizmów starzenia się komórek, jak i leczenia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimerera. Kluczowym wyzwaniem jest



ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ I MEDYCZNEJ

ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 72 51

www.uni.wroc.pl

stworzenie związków, które w sposób selektywny i efektywny będą stymulować aktywność proteasomu, umożliwiając degradację białek o potencjale agregacyjnym. Niskocząsteczkowe związki organiczne, szczególnie pochodzenia naturalnego, stanowią znaczącą grupę w badaniach nad aktywatorami proteasomu. Ich zalety obejmują m.in. lepszą penetrację komórek oraz niższe koszty syntezy. Niemniej jednak, związki te często są niespecyficzne, co może prowadzić do efektów ubocznych, takich jak nieselektywna aktywacja proteasomu w różnych tkankach.

Peptydowe aktywatory proteasomu, takie jak te badane w ramach rozprawy mgr Katarzyny Cekały, oferują unikalne korzyści. Przede wszystkim, dzięki możliwości projektowania sekwencji peptydowych opartych na naturalnych regulatorach, takich jak Blm10 czy podjednostki regulatora 19S, można precyzyjnie ukierunkować ich działanie na wybrane formy proteasomu, np. 20S. Dodatkowo, takie podejście pozwala na modyfikacje strukturalne w celu zwiększenia stabilności proteolitycznej oraz poprawy właściwości farmakokinetycznych, co jest kluczowe w potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych. Mimo tych zalet, literatura wskazuje na ograniczoną ilość badań skupionych na peptydowych aktywatorach proteasomu, co czyni pracę mgr Cekały pionierskim wkładem w tę dziedzinę.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Cekały wyróżnia się nie tylko zastosowaniem peptydów i peptydomimetyków jako potencjalnych aktywatorów proteasomu, ale także kompleksowym podejściem do ich projektowania, syntezy oraz testowania biologicznego. Badania przedstawione w pracy poszerzają aktualny stan wiedzy o nowe koncepcje, szczególnie dotyczące wykorzystania fragmentów regulatora 19S oraz Blm10 jako wzorców strukturalnych. Ponadto, po raz pierwszy zademonstrowano skuteczność wybranych aktywatorów peptydowych w modelach *in cellulo*, co otwiera drogę do dalszych badań nad ich zastosowaniem w terapiach chorób neurodegeneracyjnych.

Praca Doktorantki nie tylko wypełnia istniejącą lukę w literaturze, ale również stanowi ważny krok w kierunku opracowania innowacyjnych strategii terapeutycznych opartych na modulacji aktywności proteasomu przy użyciu peptydowych stymulatorów. To badanie pokazuje, że peptydy, mimo wyzwań związanych z ich stabilnością i biodostępnością, mogą stanowić obiecującą alternatywę dla niskocząsteczkowych związków organicznych, oferując jednocześnie wyższą specyficzność działania i potencjalnie lepszy profil bezpieczeństwa. Tematyka dysertacji jest zatem bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na poszerzenie wiedzy w przedmiotowej dziedzinie.

Recenzowana dysertacja przedstawiona została w formie opracowania (162 strony), w którym zaprezentowane zostały tezy oraz najważniejsze osiągnięcia rozprawy. W obszernym opracowaniu Doktorantka przedstawiła wstęp teoretyczny, założenia i cele pracy, wyniki i analizę danych, wnioski i dyskusję oraz metodologię pracy, po których znajduje się bibliografia zawierająca 198 pozycji literaturowych oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. W ostatnim rozdziale Doktorantka zamieściła również wykaz swojego dorobku naukowego. Przedstawiła listę publikacji, których jest współautorką (8 prac, jednak trud określenia, które publikacje naukowe są tematycznie związane z rozprawą doktorską Autorka pozostawiła czytelnikom/recenzentom), udział w projektach badawczych oraz listę komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych w formie



plakatów (25 prezentacji) oraz referatu ustnego (1 prezentacja), co pozwala na szerszy ogłęd Jej aktywności naukowej.

Podoba mi się sposób prezentacji informacji, który we wstępie wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą proteasomalnej degradacji białek, ubikwitynozależnego oraz niezależnego od ubikwityny systemu proteasomalnego, odpowiednio 26S oraz 20S, ich obecności i stężeń w różnych stanach fizjologicznych organizmu, jak również niskocząsteczkowych aktywatorów tych enzymatycznych kompleksów, a wszystko w kontekście procesów starzeniowych i chorób neurodegeneracyjnych. Autorka dysertacji dyskutuje szczegółowo wady i zalety peptydowych terapeutyków i definiuje wymogi strukturalne, które muszą spełniać peptydy i peptydomimetyki jako związki kandydujące na potencjalnych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S. Uzasadniając poszczególne aspekty budowy wynikające z wymogów proteolitycznej trwałości oraz sposobów transportu komórkowego, Pani mgr Katarzyna Cekała jasno formułuje założenia i cele pracy.

W rozdziale zatytułowanym *Badania własne*, Doktorantka w sposób szczegółowy, bardzo uporządkowany i klarowny przeprowadza czytelnika przez opis kluczowych wyników oraz analizę danych eksperymentalnych, dzieląc materiał na dwie części: peptydy wywodzące się z regulatora 19S oraz z białkowego aktywatora Blm10. Rozdziały te stanowią spójną całość, w której Doktorantka opisuje genezę projektowania poszczególnych związków, tj. syntezę peptydów oraz peptydomimetyków, zwraca uwagę, jakimi przesłankami kierowała się przy wyborze sekwencji, zamianie poszczególnych aminokwasów, etc. oraz jakimi metodami potwierdziła tożsamość chemiczną otrzymanych związków. W kolejnym etapie przedstawia badania biologiczne, które stanowiły bardzo istotny element recenzowanej rozprawy. Z wykorzystaniem testów fluorymetrycznych Doktorantka przebadła wpływ zsyntezowanych związków na aktywność ludzkiego proteasomu. Zbadła również, czy aktywatory są w stanie pobudzać także degradację substratów białkowych. Należy podkreślić fakt, że badania efektywności zsyntezowanych związków przeprowadziła na enzymie, który samodzielnie wyizolowała z ludzkich erytrocytów. W kolejnych etapach pracy najlepsze otrzymane stymulatory podała badaniom komórkowym, testując ich cytotoksyczność, a także wpływ na aktywność proteasomu w lizatach komórkowych, a co jest szczególnie istotne otrzymała aktywator zdolny do przenikania błony komórkowej i stymulacji proteasomu w żywych komórkach, co zostało opisane po raz pierwszy dla związków o charakterze peptydowym.

W rozdziale poświęconym opisowi stosowanych procedur oraz metodologii badań, Doktorantka w sposób zwięzły przedstawiła protokoły syntezy i oczyszczania peptydów (czystość otrzymanych peptydów potwierdzono wykorzystując RP-HPLC oraz spektrometrię mas) oraz procedury eksperymentalne badań biologicznych, tj. określenie zdolności modulujących otrzymanych peptydów względem ludzkiego proteasomu 20S *in vitro* oraz *in cellulo*. W badaniach biologicznych na podkreślenie zasługuje wykorzystanie szerokiego protokołu eksperymentalnego i różnorodność zastosowanej metodologii, jak również trudność korelacji wyników, co jednak Autorce udało się znakomicie.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w bardzo systematyczny i czytelny sposób, pomimo trudności korelacji wyników badań biologicznych. W dysertacji Doktorantka



ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ I MEDYCZNEJ

ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 72 51

www.uni.wroc.pl

zawarła wybrane wykresy aktywności biologicznej – przygotowane w bardzo staranny i przemyślany sposób, ułatwiające czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników. Na podstawie przedstawionej dyskusji można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników. W ostatnim rozdziale części merytorycznej dysertacji mgr Katarzyna Cekała podsumowała wyniki swoich badań, podkreślając aktywność biologiczną poszczególnych modulatorów.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Cekały, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Przeprowadzenie szczegółowego przeglądu literatury oraz podsumowania stanu wiedzy na temat mechanizmów działania oraz aktywatorów proteasomu 20S; wskazanie nowej koncepcji poszukiwania peptydowych stymulatorów w oparciu o sekwencje obecne w natywnych białkach regulujących jego aktywność;
- Zaprojektowanie, syntezę i charakterystykę strukturalną serii nowych peptydów o sekwencjach wywodzących się z C-końcowych podjednostek Rpt regulatora 19S oraz optymalizacja najbardziej obiecującego peptydu – Rpt5(10); w sumie otrzymano i przebadano 42 analogi;
- Zbadanie stabilności peptydowych aktywatorów wobec proteasomu 20S i/lub ludzkiego osocza, a następnie zsyntezowanie peptydomimetyków o podwyższonej odporności na trawienie zawierających podstawienia nienaturalnymi resztami aminokwasowymi lub zredukowane wiązanie peptydowe;
- Określenie aktywności biologicznej i cytotoksyczności otrzymanych modulatorów w stosunku do ludzkiego proteasomu 20S oraz szczegółową analizę struktura-aktywność;
- Wykazanie szczególnych właściwości modulujących *in vitro* dla 12 związków oraz *in cellulo* dla 3 związków: Tat-Rpt5(10), Tat-K4, Tat-Nle8;
- Pokazanie i udokumentowanie potencjału peptydów i ich analogów jako aktywatorów h20S; na przykładzie najefektywniejszych związków – Rpt5(K4), Rpt5(Nle8)–oraz ich analogów z przyłączoną sekwencją peptydu penetrującego błonę komórkową: Tat(48-57) - wskazanie i modyfikację kluczowych elementów struktury pozwalających na zwiększenie odporności proteolitycznej, jak również możliwości transportu przez błony biologiczne – kluczowych parametrów często dyskwalifikujących peptydy w zastosowaniach terapeutycznych;
- Zaprojektowanie, syntezę i zbadanie wpływu na aktywność proteasomu serii peptydów i peptydomimetyków wywodzących się z białkowego aktywatora Blm10; w sumie otrzymano i zbadano 17 związków;
- Otrzymanie związków aktywujących proteasom do trawienia substratów białkowych o potencjale agregacyjnym, takich jak α -synukleina – białko wewnętrznie nieuporządkowane, które ściśle powiązane z chorobą Parkinsona oraz formy ultenione białek, które powstają w organizmie m.in. na skutek oddziaływania stresu oksydacyjnego;
- Wykazanie potencjału stymulującego najlepszych analogów na aktywność proteasomu w lizatach komórkowych.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu (*International Journal*



of *Molecular Sciences* 2024 oraz *Biomolecules* 2022) i zostały już poddane gruntownej ocenie merytorycznej. W obu artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką, co podkreśla Jej wiodący udział.

Z przedstawionego w dysertacji opisu, jasno wynika, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła w projektowaniu struktury peptydów i peptydomimetyków, prowadziła syntezy i charakterystykę związków, badania biologiczne, interpretację otrzymanych wyników. Nie mam zatem wątpliwości, że wkład pracy Doktorantki świadczy o Jej dojrzałości naukowo-badawczej.

Poniżej, z ciekawości, wymieniam pytania ogólne pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej i prac:

- 1) Jakie są potencjalne mechanizmy stymulacji proteasomu 20S przez niskocząsteczkowe modulatory? Czy można sobie wyobrazić połączenie elementów peptydowych i wspomnianych związków w celu wywołania efektu synergistycznego?
- 2) Jakie mechanizmy molekularne wyjaśniają różnice w aktywności proteasomu 20S w odpowiedzi na różne peptydomimetyki? Jak można wyjaśnić obserwowane różnice w wynikach *in vitro* i *in cellulo*?
- 3) α -Synukleina ma silną tendencję do tworzenia kompleksów z jonami metali, m.in. miedzi, które to stymulują jej agregację. Czy w opinii Doktorantki, proces kompleksowania będzie wpływał na mechanizmy jego proteosomalnej degradacji i czy rozważała przetestowanie aktywności zaprojektowanych modulatorów również na kompleksach metali?
- 4) W jaki sposób badania aktywności proteasomu z wykorzystaniem peptydomimetyków mogą być zastosowane w terapii chorób neurodegeneracyjnych? Proszę o przedstawienie potencjalnych kierunków aplikacyjnych wyników badań w leczeniu schorzeń takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona?
- 5) Jakie dalsze badania są planowane w celu walidacji aktywności peptydomimetyków w modelach *in vivo*? Czy przewiduje się badania na modelach zwierzęcych, aby potwierdzić skuteczność i bezpieczeństwo zaproponowanych związków?

Na koniec, zwracam uwagę na imponującą staranność edytorską, która stanowczo ułatwia odbiór przedstawionych treści merytorycznych, i zachęca do dalszej, szczegółowej lektury artykułów autorstwa Doktorantki.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, rozprawa doktorska prezentuje nie tylko ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Katarzyny Cekały z zakresu badanej tematyki, ale pokazuje Jej istotny wkład w poszerzenie zakresu tej wiedzy poprzez postawienie hipotez badawczych, syntezę zaprojektowanych związków, skrupulatną analizę otrzymanych wyników biologicznych i interpretację obserwowanych efektów. Uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za dobry przykład racjonalnego projektowania, potwierdzonego syntezą peptydów i ich analogów oraz efektu ich działania w postaci aktywności modulującej aktywność h2OS. Przeprowadzone badania jasno potwierdzają jak ważne jest szczegółowe badanie zależności między strukturą chemiczną (lub



ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ I MEDYCZNEJ

ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 72 51

www.uni.wroc.pl

właściwościami związanymi ze strukturą) a aktywnością biologiczną badanych związków, pozwalające w konsekwencji na skuteczne projektowanie związków o pożądanych właściwościach.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Cekały spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 190 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (ze zm.), i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Cekały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy z uwagi na interesujące wyniki oraz wysoki poziom naukowy prowadzonych badań.