



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Dr hab. Sławomir Makowiec prof. PG
Katedra Chemii Organicznej
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 08-11-2024

**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”**

Procesy demograficzne skutkujące starzeniem się społeczeństw są źródłem nowych schorzeń będących wyzwaniem dla medycyny, które na poziomie mikrobiologicznym wynikają z nieprawidłowego funkcjonowania białek jak i systemów ich syntezy i degradacji.

Systemy pozwalające zachować homeostazę organizmu w zakresie prawidłowego funkcjonowania białek w intuicyjny sposób stają się celem badań na styku chemii – biologii i medycyny. Odzyskanie kontroli nad systemami syntezy i degradacji białek zdaje się być jedynym racjonalnym rozwiązaniem w przypadku chorób neurodegeneracyjnych takich jak np. choroba Alzheimera. W przypadku tego typu schorzeń bezpośrednią przyczyną zmian chorobowych są gromadzące się w neuronach agregaty nieprawidłowych białek. Co więcej naturalna chronologia pojawiania się tego typu schorzeń koreluje z osłabiającymi się możliwościami autoregulacyjnymi organizmu pacjenta, potęgując uszkodzenia układu nerwowego. Jednym z takich systemów pozwalających na usuwanie nieprawidłowych białek jest proteasom 20S zwany też popularnonaukowo „komórkowym niszcycielem białek”, ta skomplikowana białkowa maszyna dysponuje kilkoma sposobami na destrukcję niepożądanych białek pozwalając zarazem na modulowanie swej aktywności. Problematyka regulowania aktywności proteasomu 20S zwróciła uwagę mgr Katarzyny Cekały doktorantki pracującej po kierunku profesor Elżbiety Jankowskiej oraz dr Ewy Wieczerek, stając się tematyką przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Mgr Katarzyna Cekała zajęła się aktualnym problemem jaki stawia medycyna i biochemia przed chemikami zajmującymi się syntezą organiczną – poszukiwaniem związków chemicznych pozwalających na cofnięcie lub zatrzymanie procesów neurodegeneracyjnych poprzez aktywizację naturalnie istniejących w komórkach organizmu procesów naprawczych. Sedno rozprawy stanowią poszukiwania sekwencji peptydowych lub pseudopeptydowych w optymalny sposób aktywujących działanie proteasomu 20 S w trawieniu modelowych substratów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została napisana na 162 stronach i zawiera wszystkie tradycyjnie uznane elementy takie jak: Część literaturowa, Cel badań, Badania Własne, Metodologię opisującą procedury eksperymentalne oraz Cytowaną Literaturę. Układ

pracy jest klasyczny a sposób prowadzenia narracji w szczególności w najważniejszym elemencie, czyli w „Badaniach Własnych” typowy dla rozpraw technicznych.

Wstęp literaturowy przedstawiony został na około 50 stronach i jest on ściśle związany z tematyką prowadzonych przez Autorkę badań. Część ta jest dość obszerna i momentami bardzo szczegółowa, jednakże napisana dobrym językiem jest przyjazna dla czytelnika. Zawiera podrozdziały konieczne do wyjaśnienia kluczowych pojęć związanych z proteosomalną degradacją białek, mechanizmem działania proteasomu 20S, miejscem katalitycznym, wewnątrzkomórkowymi regulatorami jego aktywności oraz co szczególnie potrzebne w kontekście podjętych badań, znanymi małowcząsteczkowymi aktywatorami.

Do części teoretycznej mam dwie uwagi. Na rysunkach 4b i 4c przedstawiony został poprawny mechanizm rozpadu wiązania amidowego promowany przez grupę hydroksylową treoniny, jednakże nazwania tych etapów przegrupowaniem nie mogę uznać za poprawne. Druga uwaga znajduje się również w kontekście nomenklaturowym i dotyczy nazwania SDS oraz związków z tabeli nr 1 „agonistami”, który to termin zarezerwowany jest dla receptorów. Jest to jednak kwestia semantyczna, niezminiająca merytoryki prezentowanych informacji a dodatkowo należy dodać, iż zwrot „agonista” pojawia się tylko dwukrotnie natomiast najczęściej związki, o których mowa nazywane są aktywatorami lub modulatorami które znacznie lepiej pasują do opisu zjawiska.

Za cel badawczy Doktorantka postawiła sobie wyznaczenie wymogów strukturalnych dla peptydowych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S, zbadanie ich stabilności w osoczu i co najważniejsze ich aktywności w przypadku żywych komórek z uwzględnieniem sposobów na transport do wnętrza komórek.

Badania Własne rozpoczyna Autorka od syntezy i weryfikacji aktywności ośmioaminokwasowych fragmentów regulatora 19S na ludzki proteasom 20S. Co słuszne, wspiera się w tym początkowym etapie informacjami dostępnymi na temat zachowania króliczego proteasomu 20S przy aktywacji za pomocą krótszych 4-7 aminokwasowych fragmentów Rpt. Wyniki tak przeprowadzonych eksperymentów wskazały na sekwencję Rpt5(8), która powodowała wzrost wszystkich trzech aktywności proteasomu tj. chymotrypsynopodobnej, trypsynopodobnej i kaspazopodobnej. Autorka zauważyła także nietypowy wzrost aktywności chymotrypsynopodobnej w przypadku zastosowania sekwencji Rpt6(8) malejący przy zwiększaniu stężenia aktywatora, dlatego rozszerzyła swoje pomiary na stężenia niższe niż 10 μ M. W tym miejscu mam pytanie dotyczące wyników pomiarów: na rysunku 17, wg wykresu dla aktywności ChT-L peptyd Rpt6(8) przy stężeniu 10 μ M zwiększa względną aktywność proteasomu do ponad 200%, natomiast rozszerzone badania w zakresie stężeń 1-50 μ M prezentowane na rysunku dane wskazują na względną aktywność 120% przy 10 μ M, z maksimum 180% przy stężeniu 5 μ M aktywatora, z czego wynika ten rozrzut wartości względnej aktywności?

W dalszym ciągu badań mgr Katarzyna Cekała przeprowadza systematyczne poszukiwania zależności pomiędzy sekwencją aminokwasów w aktywatorze oraz długością a jego wpływem na proteasom. Sprawdza wpływ wydłużenia łańcucha Rpt do 10 i 12 reszt aminokwasowych, podstawienia kolejnych aminokwasów alaniną, czy wprowadzania aminokwasów o charakterze kwasowym, zasadowym i obojętnym.

Jako że sprawdzona przez Autorkę stabilność proteolityczna dla optymalnej pod względem aktywności sekwencji Rpt5(10) nie była zadowalająca, Doktorantka słusznie

postanawia wprowadzić do sekwencji nienaturalne aminokwasy lub wiązanie pseudopeptydowe. Wprowadzone zmiany skutkowały zamierzonym efektem zwiększonej odporności proteolitycznej, nie pozostając jednak bez wpływu na zdolność do aktywacji proteasomu.

Istotnym działaniem podjętym przez mgr Katarzynę Cekałę było dodanie do badanych peptydów sekwencji pozwalających na efektywny transport do wnętrza komórek. Co zostało potwierdzone obserwacją fluorescencji znakowanych peptydów wewnątrz komórek HEK293.

Doktorantka nie ograniczyła się do badań z udziałem sekwencji Rpt pochodzących z regulatora 19S, ale także podobnie skrupulatne badania przeprowadziła w przypadku sekwencji wywodzących się z białka Blm10. W tym przypadku syntezy sekwencji poprzedzone zostały modelowaniem molekularnym wykonanym przez dr. hab. Artura Gieldonia. Co w połączeniu z danymi z poprzednich badań prowadzonych w zespole pozwoliło zawęzić krąg poszukiwań wstępnie do trzech modulatorów, które poddawane były kolejnym modyfikacjom i weryfikacji aktywności.

Podsumowując całokształt przeprowadzonych badań należy zwrócić uwagę na obszerny materiał doświadczalny uzyskany przez mgr Katarzynę Cekałę wynikający z przeprowadzenia skrupulatnej i drobiazgowej procedury poszukiwania optymalnej sekwencji modulatora. Badania jakkolwiek wpierane nowoczesną aparaturą (syntezator peptydów i preparatywna chromatografia HPLC) w przypadku otrzymania ponad 50-ciu sekwencji, ich oczyszczenia i sprawdzenia aktywności stają się czasowo wymagające.

Doktorantka opisała metody oczyszczania jak i analizowania otrzymanych peptydów w tym podane zostały wartości m/z otrzymane ze spektrometrii mas, zabrakło mi jednak w charakterystyce otrzymanych peptydów informacji o ich czystości – chociażby w skrótovej wersji w tabeli nr 18 w postaci dodatkowej kolumny raportującej powierzchnię pod głównym pikiem przy określonej długości fali. Poruszam ten problem także w kontekście ewentualnej punktowej racemizacji podczas syntezy skutkującej pojawieniem się możliwych diastereoizomerycznych zanieczyszczeń, co prawda protokół syntezy przewidywał stosowanie oksymu 2-keto-cyjanooctanu etylu co jednak nie wyklucza całkowicie możliwości racemizacji. W tej sytuacji wgląd w informacje z chromatogramu analitycznego uciałyby ewentualne dywagacje na temat czystości otrzymanych związków.

Natomiast w świetle zebranego materiału badawczego i wiedzy na temat wymagań strukturalnych dotyczących skutecznego aktywatora proteasomu, chciałbym zapytać Doktorantkę o opinię dotyczącą możliwości wykorzystania tych informacji do ewentualnego zaprojektowania małowcząsteczkowego izosterycznego z peptydem aktywatora, cząsteczki będącej przeciwieństwem do znanego inhibitora Bortezomib'idu – oczywiście z innym miejscem wiązania do białka.

Mimo poczynionych uwag rozprawę oceniam pozytywnie. Za największe osiągnięcie przedstawionej dysertacji uznaję wyselekcjonowanie i otrzymanie peptydowych aktywatorów wyposażonych w sekwencję TAT skutecznie przenikających do żywych komórek. Stawiane przeze mnie pytania są elementem dyskusji naukowej nad wynikami badań przedstawionymi przez mgr Katarzynę Cekałę nie podważając ich wartości naukowej. Doktorantka osiągnęła zamierzone cele badawcze i zgromadziła znaczący materiał badawczy, który nosi cechy nowości naukowej. Wyniki badań naukowych przeprowadzonych przez Doktorantkę stały się

treścią publikacji w czasopismach: *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1–13; *Biomolecules*, 12, 1–13; oraz *Biomolecules*, 11, 1–10.

Stwierdzam, iż rozprawa zatytułowana „Peptydy i peptydomimetyki wywodzące się z białek Rpt5 i Blm10 jako stymulatory ludzkiego proteasomu 20S in vitro i in cellulo”, spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i w konsekwencji wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Kandydatki do stopnia naukowego doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Sławomir Makowiec, prof. PG