



Dr hab. Beata Żołnowska

Gdańsk, 7.04.2025

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny GUMed

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

WYDZIAŁ CHEMII UNIWERSYTETU GDAŃSKIEGO

MGR KAROLINA TREPCZYK

z Katedry Chemii Biomedycznej

Uniwersytetu Gdańskiego

**PT. „PROJEKTOWANIE I SYNTEZA STABILNYCH PROTEOLITYCZNIE I PRZENIKAJĄCYCH
PRZEZ BŁONY KOMÓRKOWE AKTYWATORÓW LUDZKIEGO PROTEASOMU 20S ORAZ
ZBADANIE ICH WPLYWU NA AKTYWNOŚĆ TEGO ENZYMU W MODELACH KOMÓRKOWYCH
CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH”**

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera i choroba Parkinsona, stanowią poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny, zarówno pod względem diagnostyki, jak i terapii. Wspólnym elementem tych schorzeń jest gromadzenie się nieprawidłowych białek, co prowadzi do uszkodzenia i degeneracji komórek nerwowych. W przypadku Alzheimera, kluczową rolę odgrywają agregaty amyloidu β oraz splątki Tau, podczas gdy w chorobie Parkinsona to α -synukleina. Zrozumienie mechanizmów ich powstawania oraz opracowanie skutecznych metod leczenia wymaga wieloaspektowych badań, szczególnie w zakresie analizy białek zaangażowanych w ich patogenezę.

W odniesieniu do chorób neurodegeneracyjnych szczególne znaczenia ma rola proteasomu, który jest kluczowym mechanizmem komórkowym odpowiedzialnym za degradację uszkodzonych, nieprawidłowych oraz niepotrzebnych białek, a jego nieprawidłowe działanie przyczynia się do akumulacji patologicznych struktur i rozwoju neurodegeneracji. W związku z tym stymulowanie aktywności proteasomu stanowi jeden z obiecujących

kierunków terapii, które może pomóc w zapobieganiu gromadzenia się toksycznych agregatów białkowych w mózgu.

Na tle współczesnych strategii walki z chorobami neurodegeneracyjnymi tematyka podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej wpisuje się w aktualne nurty badawcze i stanowi cenny wkład w rozwój wiedzy na temat proteasomu 20S oraz jego potencjalnych stymulatorów o zastosowaniu terapeutycznym. Doktorantka przeprowadziła szeroko zakrojone badania nad nowymi aktywatorami proteasomu, opierając się na naturalnych regulatorach białkowych, co stanowi innowacyjne podejście w poszukiwaniu skutecznych metod ograniczania akumulacji uszkodzonych białek w komórkach.

Przedstawiony w rozprawie doktorskiej przegląd literatury wskazuje, iż Doktorantka zgłębiła tematykę dotyczącą budowy, funkcji oraz mechanizmów działania 20S, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w procesach degradacji białek. Sprawnie zostały omówione zarówno klasyczne szlaki proteolityczne, w tym ubikwityna-proteasom, jak i specyficzne mechanizmy aktywacji proteasomu przez regulatory, takie jak 19S, 11S, PA200, Bln10 oraz motyw HbYX, co dostarcza cennych informacji na temat możliwości modulacji jego aktywności i stanowi podstawę do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Doktorantka opisała również znaczenie proteasomalnego systemu degradacji białek w kontekście procesów starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych, podkreślając wpływ zaburzeń w jego funkcjonowaniu na progresję patologii neurologicznych. Szczególną uwagę poświęciła koncepcji przeciwdziałania neurodegeneracji poprzez aktywację proteasomu, przy czym rozważyła zarówno strategie jego bezpośredniej stymulacji, jak i metody pośrednie, obejmujące nadekspresję jednostek proteasomu oraz modulację aktywności kinaz. W sposób zwięzły i przejrzysty Doktorantka przedyskutowała zastosowanie peptydów jako leki. Rola peptydów, jako potencjalnych kandydatów na leki jest obiecującym kierunkiem badań, zwłaszcza w kontekście stabilności proteolitycznej oraz przenikalności przez błony komórkowe. Omówienie mechanizmu działania CPP (ang. cell penetrating peptide) jest szczególnie interesujące, ponieważ peptydy przenikające przez błony mogą stanowić nowoczesne narzędzie terapeutyczne.

Za główny cel badań Doktorantka postawiła sobie opracowanie i zbadanie nowych stymulatorów proteasomu 20S, które charakteryzują się zdolnością do przenikania przez błony komórkowe oraz wysoką stabilnością proteolityczną. Ostatecznym zamierzeniem było stworzenie potencjalnych aktywatorów proteasomu, które mogłyby wspomagać eliminację patologicznych agregatów białkowych, takich jak α -synukleina i białko tau. Ich zastosowanie mogłoby przyczynić się do rozwoju terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Autorka zaprojektowała i zsyntetyzowała 26 nowych aktywatorów proteasomu na podstawie sekwencji Blm10, wykorzystując metodologię Fmoc na nośniku stałym. Związki te zawierały istotny motyw HbYX, który okazał się kluczowy w aktywacji proteasomu. Ponadto, zastosowane modyfikacje peptydomimetyczne w grupie 1, bispeptydy w grupie 2 oraz sekwencje CPP w grupie 3, znacząco zwiększyły stabilność i biodostępność aktywatorów. Peptydomimetyki poprawiły stabilność proteolityczną, bispeptydy umożliwiły wiązanie w dwóch sąsiadujących kieszeniach proteasomu, a sekwencje CPP umożliwiły skuteczne przenikanie związków przez błony komórkowe oraz barierę krew-mózg.

Pytanie: Jakie były przesłanki wyboru sekwencji TAT 49-57 (fragmentu 49-57 białka HIV-1 Tat) oraz sześćiopeptydu argininowego jako elementów poprawiających przenikalność bariery krew-mózg? Jakie kryteria zdecydowały o selekcji właśnie tych CPP z grupy licznych modyfikacji poprawiających przenikalność przez błony komórkowe, opisanych przez Doktorantkę w rozdziale 7.3?

W badaniach aktywności proteasomu Autorka wykazała, że zmodyfikowane aktywatory skutecznie stymulują proteasom 20S, co zostało potwierdzone w testach fluorometrycznych oraz w badaniach na lizatach komórkowych z wykorzystaniem substratów FRET i Suc-LLVY-AMC. W szczególności, badania nad degradacją białek neurotoksycznych, takich jak agregaty α -synukleiny i tau-441, wykazały skuteczność aktywatorów w degradacji tych białek, co ma kluczowe znaczenie w chorobach Parkinsona i Alzheimerera.

Otrzymane aktywatory zbadano także pod kątem stabilności proteolitycznej w ludzkim osoczu, analizując produkty degradacji metodą UHPLC i spektrometrii mas. Modyfikacje na N- i C-końcu znacząco zwiększyły odporność na enzymy proteolityczne, co wykazano dla związków A3, B2, C3, C6 i E3. Najniższą stabilność miały A4, C5 i E2, co sugeruje, że określone modyfikacje wpływają na degradację w różnych miejscach sekwencji. Z kolei aktywatory z grupy Bis wykazywały stabilność zależną od obecności nienaturalnych reszt aminokwasowych.

Pytanie: Czy można opisać zależność między strukturą fragmentu sekwencji aktywatora, powstałego w wyniku inkubacji z ludzkim osoczem, a jego ogólną stabilnością proteolityczną? Jakie cechy strukturalne mogą decydować o zwiększonej lub obniżonej odporności na degradację?

Z zastosowaniem testu PAMPA Doktorantka wykazała, że aktywatory z sekwencją CPP, A1-tat i A1-6r skutecznie pokonują barierę krew-mózg, co jest istotnym krokiem w kierunku ich potencjalnego zastosowania terapeutycznego. W badaniach dotyczących przenikania związków przez barierę krew-mózg Autorka nie uwzględniła Bis1-tat, mimo że

został on opisany jako stabilny proteolitycznie aktywator proteasomu. **Co było powodem pominięcia Bis1-tat w testach PAMPA?**

W badaniach Doktorantka udowodniła, że aktywatory proteasomu przyspieszają degradację neurotoksycznych białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. Stwierdzono, że białko tau, kluczowe w patogenezie choroby Alzheimera, było degradowane znacznie efektywniej niż α -synukleina, której agregacja odgrywa kluczową rolę w chorobie Parkinsona. Wyniki uzyskane przez Autorkę pokazują, że aktywacja proteasomu może być skuteczną strategią w redukcji toksycznych agregatów białkowych.

Dodatkowo, zastosowanie przez Doktorantkę sondy fluorescencyjnej TAS3 stanowi istotny wkład w metodologię badań nad aktywnością proteasomu w warunkach komórkowych. Opracowana metoda pozwoliła na precyzyjną ocenę skuteczności różnych aktywatorów proteasomu 20S, co otwiera nowe możliwości w badaniach nad regulacją degradacji białek. Wyniki eksperymentów potwierdziły nie tylko funkcjonalność sondy, ale także jej przydatność do oceny wpływu związków bioaktywnych na proteasom, co może znaleźć zastosowanie w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych.

Co istotne, przeprowadzone podczas stażu na Uniwersytecie w Helsinkach eksperymenty w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona wykazały, że aktywatory nie tylko skutecznie redukują ilość agregatów α -synukleiny, ale również mogą mieć właściwości neuroprotektoryjne. Doktorantka wykazała, że testowane związki już w niskich stężeniach zmniejszały ilość zagregowanego białka o 50%, co zostało potwierdzone metodami immunobarwienia i mikroskopii fluorescencyjnej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska dostarcza istotnych dowodów na skuteczność aktywatorów proteasomu 20S, a osiągnięcia Doktorantki mają kluczowe znaczenie dla przyszłych badań nad chorobami neurodegeneracyjnymi. Jako recenzent pragnę jednocześnie zasygnalizować kilka możliwych kierunków dalszych badań, które – choć wykraczają poza zakres niniejszej rozprawy – mogłyby znacząco przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmu działania opracowanych aktywatorów oraz ich potencjalnych zastosowań terapeutycznych. W tym kontekście warto rozważyć zastosowanie modelowania molekularnego, które mogłoby dostarczyć cennych informacji na temat interakcji tych związków z proteasomem, a tym samym umożliwić bardziej precyzyjne projektowanie kolejnych analogów o zoptymalizowanych właściwościach. Ponadto, w celu dalszej oceny potencjału terapeutycznego tych związków, zasadne byłoby przeprowadzenie badań farmakokinetycznych oraz testów na zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych. Pozwoliłoby to nie tylko na weryfikację skuteczności aktywatorów w warunkach

fizjologicznych, lecz również na ocenę ich wpływu na redukcję patologicznych agregatów białkowych *in vivo*. Moje sugestie mają na celu jedynie otwarcie przestrzeni do dyskusji na temat możliwości rozwoju tego fascynującego tematu, a nie stanowią wskazania na jakiegokolwiek niedociągnięcia pracy. Pragnę podkreślić, iż praca Doktorantki nie tylko potwierdziła skuteczność badanych związków, ale również otworzyła nowe kierunki badań, które mogą przyczynić się do opracowania innowacyjnych terapii chorób neurodegeneracyjnych.

W trakcie recenzowania pracy nasunęło mi się kilka kwestii wymagających doprecyzowania:

- Jaka była czystość otrzymanych związków?
- Czy dla syntezowanych związków określono ich czasy retencji techniką HPLC?
- Czy w projektowaniu zaplanowanych w pracy związków (oprócz Bis1) wykorzystano modelowanie molekularne?
- Czy dostępne są szczegółowe wyniki modelowania molekularnego dla Bis1, takie jak Docking Score, RMSD czy odległości między atomami?
- Jakie dalsze eksperymenty Doktorantka proponuje w celu jednoznacznego potwierdzenia kolokalizacji modulatora i proteasomu, o której pisze (str. 119): „Na obrazach uzyskanych przez nałożenie sygnałów pochodzących od odczynnika Hoechst 33342, barwiącego jądra komórkowe, oraz NBD aktywatorów obserwuje się pewną fluorescencję cytozolową, co wskazuje na kolokalizację modulatorów i proteasomu, który obecny jest głównie w cytozolu.”

Pod względem formalnym praca została przygotowana właściwie, uwzględniając poprawność językową, stylistyczną oraz interpunkcyjną. Układ i struktura pracy są standardowe dla tego typu opracowań. Praca zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp literaturowy, cel pracy, metodologię przeprowadzonych badań, badania własne i prezentację, omówienie wyników, podsumowanie, spis rysunków i tabel, dorobek naukowy oraz wykaz piśmiennictwa.

Pod względem redakcyjnym i graficznym praca przygotowana została starannie, liczy łącznie 167 stron numerowanych, zawiera 52 rysunki, 12 tabel i 200 pozycji piśmiennictwa cytowanego, z czego 83 pozycje pochodzą z ostatniego dziesięciolecia, co świadczy o aktualności podjętej tematyki badawczej. Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Poniżej przedstawiam spostrzeżenia dotyczące zagadnień formalnych i redakcyjnych:

- Podrozdział 3.3 – brak odniesienia w tekście do rysunków 6A i 6B.
- Str. 70 – zamiast sformułowania „podwójne acylowanie” proponuję „dwukrotne acylowanie”.
- Tabela 2, str. 70 – w kolumnie Czas [min] należy wyjaśnić znaczenie zapisu np. 5 x 1.
- Tabela 3, str. 71 – warto rozważyć uwzględnienie mocy promieniowania mikrofalowego.
- Str. 72 – w zestawie skrótów i symboli brakuje ivDde-OH.
- Str. 96 – aktywator B2 został sklasyfikowany jako aktywator z modyfikacją w rejonie N-końca, jednak w ocenie recenzenta dotyczy to C-końca.
- Str. 98 – w tekście widnieje „Rysunek 309C”; powinno być „Rysunek 30 A,C”.
- Str. 99 – w tekście widnieje „Rysunek 309D”; powinno być „Rysunek 30 D”.
- Str. 99, 141, 144 – pojedyncze błędy interpunkcyjne oraz błąd typograficzny.
- Str. 113 – brak tytułu i autora przytoczonej w tekście pracy magisterskiej.
- Str. 119 – zamiast „zdjęcia spod mikroskopu” proponuję użycie terminu „zdjęcia mikroskopowe”.
- Str. 137 – brak odniesienia w tekście do Rysunku 51, który przedstawia ilość ciał Lewy’ego.
- Str. 137 – w tekście błędnie przywołano „Rysunek 51” zamiast „Rysunek 52”.
- Rozdział VII – brak pełnego cytowania odnośników 10 i 123.

Pragnę podkreślić jednak, że przedstawione uwagi mają głównie charakter techniczny, redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje trzy publikacje o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 14,9$ (Pkt. MNiSW = 340). Doktorantka aktywnie uczestniczyła w konferencjach naukowych, prezentując wyniki badań w postaci trzech prezentacji ustnej (2023-2024) oraz dziesięciu posterów (2022-2023). Jej prace badawcze były wspierane finansowo przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium Bis (kierownik projektu - dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG) oraz przez trzy wewnętrzne finansowania Uniwersytetu Gdańskiego w ramach programu „Badania dla Młodych Naukowców”.

Praca doktorska mgr Karoliny Trepczyk stanowi istotny krok w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych opartych na aktywacji proteasomu 20S w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Doktorantka wykazała się wysokimi umiejętnościami syntetycznymi i analitycznymi, a uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad potencjalnymi lekami. Szczególnie wartościowe są osiągnięcia związane ze skuteczną aktywacją proteasomu, poprawą stabilności oraz zdolnością do przenikania przez barierę krew-mózg, co wskazuje na potencjalne zastosowanie kliniczne opracowanych modulatorów.

Na szczególne uznanie zasługuje wysoka jakość merytoryczna pracy oraz ogromny nakład pracy włożony w jej realizację. Doktorantka wykazała się dużą samodzielnością badawczą, starannością w planowaniu eksperymentów oraz umiejętnością ich precyzyjnej interpretacji. Przeprowadzone badania biologiczne wymagają zarówno dogłębnej wiedzy teoretycznej, jak i znacznego doświadczenia laboratoryjnego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są spójne, wartościowe i jednoznacznie potwierdzają postawioną hipotezę badawczą, co świadczy o jej wysokich kompetencjach naukowych.

Istotnym atutem dysertacji jest także dorobek naukowy Doktorantki oraz jej aktywność na arenie międzynarodowej. Wyniki badań Doktoranta publikowała w renomowanych czasopismach i przedstawiała na prestiżowych konferencjach, co potwierdza ich znaczenie dla społeczności naukowej. Autorka wykazała się nie tylko znakomitą warsztatą badawczą, ale także umiejętnością efektywnej komunikacji wyników oraz zaangażowaniem w rozwój nauki na poziomie międzynarodowym.

Podsumowując, praca wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym, rzetelnością wykonania oraz istotnym wkładem w rozwój badań nad proteasomem. To starannie zaplanowany i przeprowadzony projekt badawczy, który może stanowić ważny fundament dla przyszłych badań w tej dziedzinie.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Trepczyk pt.: „Projektowanie i synteza stabilnych proteolitycznie oraz przenikających przez błony komórkowe aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S oraz analiza ich wpływu na aktywność tego enzymu w modelach komórkowych chorób neurodegeneracyjnych.”, wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym i wartościowym oraz spełnia wymagania merytoryczne i formalne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązującej ustawie „Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1668 z późn. zm.)”. Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Karoliny Trepczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Beata Żołnowska

**Katedra i Zakład
Chemii Organicznej**

Beata Żołnowska
dr hab. Beata Żołnowska
adiunkt

Strona 7