



Łódź, 10.04.2025

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr **Karoliny Trepczyk** pt. *„Projektowanie i synteza stabilnych proteolitycznie i przenikających przez błony komórkowe aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S oraz zbadanie ich wpływu na aktywność tego enzymu w modelach komórkowych chorób neurodegeneracyjnych”*

Praca wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG.

Zasadność podjętej tematyki

Tematyka pracy jest bardzo ciekawa. Stanowi rozwinięcie zaawansowanych prac prowadzonych od kilku lat w zespole Pani Promotor. Autorka w sposób przekonujący i jasny wprowadza czytelnika w zagadnienie aktywacji proteasomu i wykorzystania do tego celu małych cząsteczek lub peptydów. Proponowana strategia może stać się skuteczna w walce z chorobami neurodegeneracyjnymi, na które współczesna medycyna nie ma jeszcze skutecznej terapii.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Praca liczy 167 stron i ma klasyczny układ prac doktorskich. Składa się z siedmiu rozdziałów, przy czym główny trzon stanowi *Wstęp literaturowy* (7 podrozdziałów), *Metodologia przeprowadzonych badań* (7 podrozdziałów), *Badania własne. Prezentacja i omówienie wyników* (9 podrozdziałów). Całość jest dobrze opracowana edytorsko. Czytanie pracy bardzo ułatwia obecność rysunków i tabel w miejscach, gdzie są omawiane.

W pierwszej części pracy Doktorantka w bardzo ciekawy i przekonujący sposób zarysowała cel swoich badań. Opisała funkcję proteasomu 20S, w zwięzły i przystępny sposób charakteryzując jego strukturę i podjednostki, co było dużym wyzwaniem, bo cała struktura ma masę około 700 kDa. Następnie przedstawiła mechanizm rozpoznawania i degradacji substratów przez proteasom 20S, opisała różnice strukturalne i funkcjonalne jego podtypów. Omówiła główną funkcję proteasomu, degradację białek, omawiając szlak ubikwityna-proteasom 26S oraz degradację niewymagającą uprzedniej ubikwitynylacji.

Autorka dokonała szczegółowego przedstawienia strukturalnych elementów wybranych białek oddziałujących z proteasomem, opisując ich rolę, mechanizm aktywacji, dokonując dogłębnej analizy strukturalnej wzajemnych oddziaływań. Opisała między innymi mechanizm aktywacji proteasomu 20S przez białko PA200 oraz jego drożdżowego odpowiednika, białko Bim10. Następnie Autorka pokazała, że choroby neurodegeneracyjne mogą być wynikiem dysfunkcji, najczęściej związanej z wiekiem, systemów usuwających niepotrzebne/ nieprawidłowo sfałdowane białka z organizmu.

Autorka dokonała przeglądu związków aktywujących proteasom, które mogą służyć powstrzymaniu procesów neurodegeneracyjnych. Zaskoczyło mnie stwierdzenie ze strony 44, że „żaden lek nie został oficjalnie zatwierdzony przez FDA” na chorobę Parkinsona. Czy L-DOPA w kombinacji między innymi z inhibitorem dekarboksylazy, nie jest takim lekiem?

Wśród aktywatorów proteasomu Autorka wyróżniła peptyd Blm-pep zaprojektowany i otrzymany wcześniej w Zespole Promotorki, wywodzący się z Blm10. Białko Blm10 zawiera motyw HbYX na C-końcu, którego znaczenie dla wiązania aktywatorów z rdzeniem proteasomu 20S Autorka wielokrotnie w pracy podkreśla. Doktorantka przywołuje tutaj również prace Promotorki z 2022, gdzie zaprojektowano peptydy TAt1-8,9TOD i TAT1-DEN, dodatkowo naładowane, składające się w dużym stopniu z sekwencji znanych z polepszania przenikalności peptydu do komórki. Związki te złagodziły w organizmach modelowych patologie występujące w AD, jednocześnie wykazując korzystne cechy farmakokinetyczne.

Ostatnie dziesięć stron części literaturowej, Autorka poświęciła opisowi wykorzystania peptydów jako leków. Jest to bardzo jasna i jednocześnie zwięzła część pracy, odwołująca się zarówno do wad jak i zalet tej klasy leków, które zyskują coraz większe znaczenie. Autorka nakreśliła metody modyfikacji i strategię projektowania takich związków, by zwiększyć ich „drug-likeness”.

Cel pracy

Badania mają szeroki zakres. Doktorantka zsyntezowała 26 peptydów. Zostały one kompleksowo przebadane, od badań oceniających ich farmakokinetykę, przez badanie oddziaływań peptydu z proteasomem 20S, do zdolności stymulacji proteasomu, zarówno w lizacie jak i w modelu komórkowym. Autorka zbadała również cytotoksyczność wybranych związków. Z opisu wnioskuję, że wszystkie te badania wykonywała samodzielnie, co świadczy o wysoce interdyscyplinarnym wykształceniu jakie zdobyła realizując pracę doktorską.

W pierwszej części pracy Autorka zoptymalizowała sekwencje istniejących aktywatorów wywodzących się z analogów Blm-pep, otrzymanych wcześniej w zespole Promotorki. Celem Doktorantki była poprawa ich stabilności proteolitycznej i przenikalności przez błony komórkowe. Wyjściowymi peptydami były sekwencje określone w pracy jako A, B, C, E (Tabela 8). Z nich uzyskano analogi *N*-metylowane lub analogi peptoidowe. Autorka zsyntezowała również aktywatory ze zduplikowanym C-końcem modulatora (Bis1-Bis4), wywodzące się z aktywatorów F oraz A (Bis1). Analogi te miały wzmacniać oddziaływanie z dwiema kieszeniami proteasomu. Kolejno, w celu zwiększenia przenikalności przez błony komórkowe, Autorka wprowadziła do sekwencji wybranych peptydów modyfikacje tat (sekwencja RKKRRQRRR) lub resztę składającą się z sześciu arginin (6r).

W Tabeli 7 Autorka sumiennie zebrała informacje nt. otrzymanych peptydów, pokazując sposoby oczyszczania i ilości surowych oraz oczyszczonych związków. Doceniam, że Autorka nie pominęła takich informacji jak bardzo niskie wydajności niektórych syntez. Wiem, że synteza peptydów, szczególnie modyfikowanych, potrafi być dużym wyzwaniem, ale z ciekawości chciałam spytać, jak Autorka takie wyniki tłumaczy (np. A3, A1-NBD, E1, E2, E3, etc).

Czytając pracę odniosłam wrażenie, że Doktorantka dobrze orientuje się w zawiłościach SAR otrzymanych przez siebie związków i podstawach jakie doprowadziły ją do zaprojektowania takich a nie innych peptydów. Jednak moim zdaniem, przedstawiony tok myślenia jest bardzo skrótowy i ogólnikowy, co utrudnia analizę zarówno procesu projektowania peptydów jak i preferencji strukturalnych, korzystnych dla pożądanej aktywności. Dlatego w czasie obrony chciałabym by Doktorantka odniosła się do poniższych zagadnień związanych z tą częścią.

- a) Sekwencje A, B, C bardzo niewiele się od siebie różnią. Peptyd A różni się od C tylko dwoma aminokwasami, w pozycji 4 i 6 od C-końca. W związku z tym, zastanawia mnie, dlaczego sekwencja B nazywana jest hybrydową (str. 95).
- b) Z powyższym punktem częściowo łączy się motyw GSK, który jest nazywany łącznikiem (str. 97). Nie wynika jasno z pracy, czym są elementy, które z sobą łączy.
- c) Brakuje mi wyników badań stabilności, które pokazałyby, które pozycje w sekwencji powinny być modyfikowane by zwiększyć stabilność. Autorka powołuje się na takie wyniki (str. 96), jednak nie zauważyłam szczegółów ani odnośnika.

- d) Niejasne jest nagłe pojawienie się w pracy nowych sekwencji, poza tymi wprowadzonymi jako analogi A, B, C, E. Mam na myśli związek F, z którego wywodzą się niektóre analogi serii Bis oraz sekwencję D i wywodzące się z niej analogi, D1-tat i D1-tat(R1), które Autorka otrzymała w ramach pracy magisterskiej. Dlaczego peptyd F nie był modyfikowany tak jak pozostałe peptydy serii A, B, C, E?
- e) Sposób zaprojektowania analogów Bis wymaga komentarza. Z jednej strony zasadną wydaje się próba wzmocnienia sygnału. Z drugiej strony, dobór różnorodnych sposobów modyfikacji, zarówno wyjściowej sekwencji, jej długości, jak i sposobu łączenia dwóch łańcuchów peptydowych (PEG, mostek disiarczkowy albo połączenie tioeterowe) nie wynika jasno z tekstu pracy.
- f) Podsumowanie zyskałoby na klarowności dzięki rysunkowi pokazującemu jak poszczególne modyfikacje wpływały na różne cechy otrzymywanych peptydów, wyznaczając jednocześnie kierunki badań w przyszłości.

Autorka gruntownie przebadła otrzymane analogi. Zaczęła od sprawdzenia ich stabilności proteolitycznej. Niewątpliwie osiągnęła swój cel, ponieważ obserwowała zwiększenie stabilności związków (rys. 33, str. 108) względem niemodyfikowanych peptydów A, B, C, E. Z tabeli 10 (str. 111) zawierającej fragmenty sekwencji, które nie uległy degradacji podczas inkubacji w osoczu, można wnioskować, że najmniej skutecznie chroniony był C-koniec peptydów, który jest bardzo istotny dla aktywności tych związków względem proteasomu ze względu na obecność sekwencji HbYX. *Zastanawia mnie, jaki to może mieć wpływ na dalsze losy otrzymanych związków. Proszę o komentarz w czasie obrony.* Serię Bis również charakteryzuje wyższa stabilność, a wśród analogów modyfikowanych sekwencjami CPP, cztery z pięciu peptydów po 30 minutach inkubacji zostały zdegradowane w stopniu nie wyższym niż 50%.

Kolejno, w celu zwiększenia przenikalności przez błony komórkowe, Autorka wprowadziła do sekwencji wybranych peptydów modyfikacje tat (sekwencja RKKRRQRRR) lub resztę składającą się z sześciu arginin (6r). Aktywność ChT-L i C-L proteasomu znacząco wzrosła względem wyjściowych związków, natomiast aktywność względem T-L wzrosła ponad ośmiokrotnie (dla A1-6r) przy najniższym z badanych stężeń (0.5 mM), natomiast wraz ze wzrostem stężenia aktywatora malała. *Autorka stawie hipotezę, że obserwowany trend może być wynikiem rywalizacji aktywatorów z substratem T-L. Proszę o podanie szczegółów weryfikacji tej hipotezy, o której Autorka wspomina na str. 116.*

W celu stwierdzenia, czy wprowadzenie reszt peptydowych poprawia przenikalność przez błony komórkowe, Autorka modyfikowała peptydy za pomocą barwnika fluorescencyjnego NBD. Po 3 godzinach inkubacji z komórkami HEK298T, stwierdziła za pomocą pomiaru mikroskopowego, że aktywatory posiadające tat lub 6r wniknęły do komórki, podczas gdy nie odnotowano odpowiedniego sygnału w cytozolu, gdy zastosowano peptyd A1-NBD. Doktorantka badała również zdolność aktywatorów do przenikania bariery krew-mózg. Wykorzystała do tego celu test PAMPA. Wykazała, że związek A1-tat ma znacznie większą przenikalność niż wyjściowy analog A1. *Jaką rolę w teście PAMPA pełni fluorescamina?*

Następnie Autorka badała zdolność otrzymanych związków do stymulacji proteasomu. W pierwszej kolejności przeprowadziła testy na lizatach komórkowych. Związki posiadające modyfikacje CPP (Rys. 41B) silniej aktywowały proteasom (aktywność chymotrypsynopodobna) niż pierwsza grupa. Taki wynik rodzi pytanie: *na ile modyfikacja CPP wpływa na przepuszczalność przez błony komórkowe a na ile zwiększa zdolności aktywacyjne proteasomu? Po drugie, jaki Autorka ma pogląd na spadek aktywacji proteasomu przy najwyższych użytych stężeniach aktywatorów (Rys. 41)?*

Następnie Autorka badała stymulację proteasomu w komórkach HEK293T. W tym celu zsyntezowała sondę TAS3, której fluorescencja miała służyć do oceny aktywności badanych

peptydów. Na podstawie Rys. 43-45 można wnioskować, że zwiększanie stężenia aktywatora nie wpływa znacząco na stymulację proteasomu, natomiast poziom aktywacji wzrasta z czasem. Zależność stężeniowa była bardziej widoczna w testach na lizatach. Największy efekt Autorka zaobserwowała dla związku Bis1-tat.

W kolejnych eksperymentach Doktorantka wykorzystwała modelowe układy, w których badano jak wybrane związki stymulują izolowany proteasom 20S do degradacji dwóch modelowych białek, związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, białka α -synukleiny (PD) oraz białka tau (AD). Modulatory efektywniej wpływały na poziom białek tau niż α -synukleiny. B1 nieco wydajniej stymulował degradację tau w porównaniu z serią aktywatorów wywodzących się z A1. Wykazano, że obecność detergentu SDS obniżało efektywność degradacji.

W celu potwierdzenia zdolności aktywatorów do tworzenia kompleksu z proteasomem, Autorka wykorzystwała technikę termoforezy mikroskalowej (MST). Porównanie powinowactwa między niemodyfikowanym analogiem Bis1 a jego formą Bis1-tat, wskazuje, że sekwencja tat może nie tylko poprawiać przenikalność, ale również zwiększać oddziaływanie z proteasomem, co wydaje się być zgodne z efektem obserwowanym w teście na lizatach komórkowych (patrz wyżej).

Uwieńczeniem pracy Doktorantki był staż zagraniczny na Uniwersytecie w Helsinkach, gdzie Autorka miała możliwość sprawdzenia aktywności wybranych modulatorów proteasomu na komórkowym modelu mysim choroby Parkinsona. Obserwowała brak cytotoksyczności swoich związków, a w niektórych wypadkach minimalne podwyższenie liczby komórek, co może wskazywać na efekt neuroprotektyny. Badane związki, Bis1-tat, A1-6r, A1-tat redukowały ilość agregatów α -synukleiny w komórkach hipokampalnych. *Podczas gdy efekt ten dla Bis1-tat i A1-6r (Rys. 51) wskazuje na zależność degradacji od stężenia, w przypadku związku A1-tat efekt wydaje się być odwrotny. Autorka poza podsumowaniem wyników dla tego peptydów, nie załączyła obrazów mikroskopowych. Być może tam efekt jest klarowniejszy. Proszę o komentarz w trakcie obrony.*

Poniżej przedstawiam kilka uwag ogólnych/ edytorskich:

- Str. 32-33: powtórzenie fragmentu tekstu o aktywacji proteasomu 20S przez białko 11S
- Str. 54: odnośnik 172 pochodzi z 1925, a tekst, przy którym został podany, wydaje się opisywać późniejsze doniesienia.
- Nie wszystkie skróty zostały zdefiniowane (np. str. 68: MSNT, Mlm, żywica Cl-TCP(Cl) ProTide, ivDde-OH), osłona Lys Mtt(str. 74), ester aktywny TFph (str. 76)
- str. 97: rysunek 309B, zamiast Rys. 30B
- Rys. 45A: kolorystyka i kształt „linii” są zbyt podobne dla „blank” i kontroli, co jest mylące;
- Str. 135, rys. 49: niektórym wykresom z pomiarów MST brakuje punktów do wyznaczenia powinowactwa, choć trend jest widoczny;
- str. 137: zamiast rys. 50 powinno być rys. 51/52?
- Rys. 43: Autorka dwa wyniki podpisuje symbolem A1-tat i wprowadza symbol A1-tat(R1), który wcześniej nie był dyskutowany.

Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca jest projektem interdyscyplinarnym, zawierającym bogaty, logiczny i spójny materiał eksperymentalny, w którym Autorka zajmowała się nie tylko syntezą odpowiednio zaprojektowanych peptydów, ale również ich charakterystyką biologiczną. Wyniki tych badań są bardzo wartościowe. Autorka jest współautorką co najmniej czterech publikacji (dwie pojawiły się po złożeniu pracy), które zostały opublikowane w dobrze punktowanych w rankingach międzynarodowych czasopismach, niestety nie ma wśród nich

pracy, w której Doktorantka pełniłaby rolę wiodącą. Stwierdzam, że Doktorantka trafnie wybrała tematykę badań, jasno sformułowała cel pracy, dobrze zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością dyskusji wyników, a także umiejętnie sformułowała podsumowanie pracy. Doktorantka osiągnęła zamierzony cel, otrzymując związki o zwiększonej stabilności proteolitycznej, zwiększonej przenikalności przez błony komórkowe. Jednocześnie związki te nie straciły aktywności stymulującej względem proteasomu, dając podstawę do dalszych badań nad ich zastosowaniem w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Katarzyna Błazewska