



Prof. Łukasz Berlicki
Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej 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"

Pani mgr Karolina Trepczyk wykonała pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Celem pracy było opracowanie nowych peptydów i peptydomimetyków o pożądanych właściwościach, które stymulują aktywność ludzkiego proteasomu 20S.

Podjęty przez Doktorantkę problem badawczy wpisuje się doskonale w nowoczesne trendy poszukiwania leków bazujących na peptydach. Co ważne, zaproponowany cel molekularny – proteasom 20S jest bezpośrednio powiązany z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych, których leczenie stanowi obecnie ogromne wyzwanie. Z jednej strony liczba osób cierpiących na te schorzenia ciągle rośnie, z drugiej, nie ma skutecznej metody leczenia. Aktywacja proteasomu 20S wydaje się być bardzo obiecującą strategią ze względu na możliwość usuwania białka tau, amyloidu β oraz α -synukleiny, których odkładanie się jest bezpośrednią przyczyną chorób Alzheimer'a i Parkinsona. Należy podkreślić, że opracowanie aktywatorów enzymów w ogólności jest zadaniem nietrywialnym, ponieważ, w odróżnieniu od inhibitorów enzymów, nie ma skutecznych metod ich projektowania. Co więcej, proteasom 20S

jest niezwykle skomplikowaną i rozbudowaną maszyną molekularną, co dodatkowo zwiększa trudność problemu postawionego przez Doktorantkę.

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Trepczyk liczy 167 stron formatu A4. Praca jest wydrukowana jednostronnie, co nie pokrywa się z trendem racjonalnego wykorzystania zasobów naturalnych. Układ doktoratu jest klasyczny i obejmuje streszczenie w dwóch językach, wstęp, cel pracy, metodologię, badania własne, podsumowanie, dorobek naukowy oraz 200 referencji do literatury. Rozprawa jest napisana dobrze – język jest poprawny, a dyskutowane problemy przedstawione w sposób zrozumiały. Co ważne, Doktorantka posługuje się precyzyjnymi sformułowaniami i opisuje zagadnienia na odpowiednim poziomie szczegółowości. Nie odnalazłem w tekście błędów językowych, które byłyby warte wspomnienia i powodowały utrudniony odbiór pracy. Niestety strona graficzna pracy jest słabsza. Wiele rysunków jest niskiej jakości i zawiera wtrącenia w języku angielskim (np. Rysunki 2 i 10). Wzory dyskutowanych związków chemicznych są narysowane różnymi stylami (Rysunki 16, 17, 18, 21 i 22).

Wstęp dyskutowanej rozprawy zawarty na 50 stronach jest doskonałym wprowadzeniem do podjętej tematyki. Doktorantka szczegółowo opisuje strukturę, funkcje oraz mechanizmy regulacji proteasomu 20S. Bardzo dobrze przedstawione są także powiązania proteasomu 20S z chorobami neurodegeneracyjnymi oraz znane sposoby aktywacji tego enzymu. Ostatnią część wstępu stanowią rozważania na temat możliwości zastosowania peptydów i ich analogów jako leki. W mojej opinii ten fragment wstępu nie jest potrzebny i zaburza konstrukcję całego wstępu. Co więcej, ujęcie tak obszernego problemu na 9 stronach spowodowało konieczność odniesienia się tylko do wybranych aspektów. Korzystniej byłoby omówienie zastosowanych strategii modyfikacji w części „Badania własne”, w odniesieniu do konkretnych przypadków konstruowanych związków.

Cel pracy został szczegółowo przedstawiony w rozdziale drugim. Co ważne, nadrzędny cel doktoratu – opracowanie związków o pożądanych właściwościach został w tym miejscu przekonująco uzasadniony. Z drugiej strony niepotrzebne wydaje się wskazywanie wszystkich zastosowanych metod eksperymentalnych a nawet niektórych parametrów pomiarów (np. „Związki inkubowałam w osoczu w temperaturze 37 °C”).

Metodologię badawczą opisano na 28 stronach z odpowiednim poziomem szczegółowości. Przedstawiono opisy syntez bloków budulcowych i peptydów, charakterystykę otrzymanych produktów oraz eksperymenty potwierdzające ich aktywność oraz właściwości. Niestety w tym rozdziale Doktorantka nie ustrzegła się przed błędami:

a) W opisie syntezy w podrozdziale 2.1 (i w kilku kolejnych opisach syntez) wskazano ilość ekwiwalentów, jednakże nie podano skali syntezy, pomimo, że są zdefiniowane ilości rozpuszczalników. Taki zestaw informacji uniemożliwia powtórzenie tego eksperymentu.

b) Przy syntezach peptydów także nie wskazano skali syntezy (np. podrozdział 3.1). Zadeklarowane czasy reakcji nie będą odpowiednie dla każdej ilości żywicy.

c) Nie wskazano nazwy aparatów spektrometrii mas. W opisie MS peptydów powinien być zestawiony wynik odczytany z widma MS (czyli wartość m/z) z wynikiem obliczonym dla danego peptydu. Nie jest także jasne, które peptydy zostały scharakteryzowane metodą MALDI, a które ESI. Co więcej, wyniki MS zostały opisane w Tabeli 7 jako warunki oczyszczania.

d) Nie wskazano czystości otrzymanych peptydów.

Kolejną częścią omawianej rozprawy są „Badania własne” zawarte na 44 stronach. Na początku Doktorantka omawia aktywność peptydów i jednoznacznie wykazuje, że skutecznie stymulują one proteasom 20S. W szczególności związek Bis1, w którym dwa fragmenty peptydowe połączone są relatywnie długim łącznikiem, wydaje się być interesujący, ze względu na możliwość oddziaływania z dwoma miejscami wiązania i poprzez to zwiększoną aktywnością. Jednakże, w tej części wyników brakuje komentarza na temat syntezy peptydów, która nie we wszystkich przypadkach była standardowa.

Druga część wyników dotyczy analizy stabilności proteolitycznej otrzymanych pochodnych. Dane te potwierdzają słuszność podejścia zakładającego wprowadzanie niekanonicznych aminokwasów do sekwencji analizowanych peptydów.

Kolejne modyfikacje aktywnych peptydów związane są z przyłączeniem fragmentu umożliwiającego wnikanie do wnętrza komórki – tat lub 6r. W tym przypadku dla wielu związków zaobserwowano odwrotną zależność stężenie-aktywność, która była spowodowana konkurencją pomiędzy aktywatorem a substratem. Czy w takich przypadkach nie warto byłoby sprawdzić niższych stężeń aktywatora?

W następnych podrozdziałach Doktorantka przekonująco wykazuje w kilku seriach eksperymentów bardzo obiecujące cechy najaktywniejszych peptydów. W szczególności, peptydy te wykazują niewielką cytotoksyczność połączoną z możliwością przenikania przez błony komórkowe, wiązaniem do proteasomu 20S i aktywnością wewnątrz komórek. Co więcej, przenikają one przez barierę krew-mózg i zwiększają degradację α -synukleiny w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona. Należy podkreślić, że tak szeroki panel badań biologicznych opracowanych związków jest niezwykle wartościowy.

W podsumowaniu zestawiono wszystkie najważniejsze rezultaty pracy wykazując bardzo ciekawą charakterystykę otrzymanych związków. Jednakże, brakuje porównania opracowanych związków i tymi znanymi z literatury lub badań klinicznych.

Poza pytaniami zawartymi już w niniejszej recenzji proszę Doktorantkę o odpowiedź na poniższe pytania w czasie obrony pracy doktorskiej:

1. W jaki sposób możliwe byłoby opracowanie kolejnych analogów o zwiększonej aktywności biologicznej?
2. Jakie są możliwe molekularne podstawy działania peptydowych aktywatorów proteasomu 20S, tj. jakie zmiany zachodzą w celu molekularnym po związaniu tych związków?
3. Jakie parametry aktywności biologicznej uzasadniałyby dalsze prace nad peptydowymi inhibitorami proteasomu 20S w kierunku badań klinicznych?

Powyższe pytania są załącznikiem do dyskusji nad rozprawą doktorską i nie stanowią one zarzutów do dyskutowanej pracy.

Podsumowując, moja ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Trepczyk jest bardzo wysoka. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania badawczego, które dodatkowo ma znaczący aspekt praktyczny związany z potencjalną terapią chorób neurodegeneracyjnych. Doktorantka wykazała szeroki zakres umiejętności eksperymentalnych. Pani mgr Karolina Trepczyk otrzymała bloki budulcowe, zsyntezowała i scharakteryzowała zaplanowane peptydy, określiła ich aktywność biologiczną oraz potwierdziła szereg korzystnych właściwości. Niewątpliwie wyniki opisane w dyskutowanej rozprawie stanowią znaczącą nowość naukową i są wartościowym wkładem w poszukiwanie nowych terapeutyków chorób neurodegeneracyjnych.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Trepczyk spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r., z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Karoliny Trepczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

J. Bubił