



Prof. dr hab. Maciej Kozak
Kierownik Zakładu Fizyki Biomedycznej UAM
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 18 listopada 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Cekały
zatytułowanej

**“Peptydy i peptydomimetyki wywodzące się z białek Rpt5 i Blm10 jako stymulatory
ludzkiego proteasomu 20S *in vitro* i *in cellulo*”**

Opinia recenzencka na temat pracy doktorskiej mgr Katarzyny Cekały przygotowana została na wniosek przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne prof. UG dr. hab. Zbigniewa Kaczyńskiego (uchwała z dnia 16 października 2024 roku w sprawie powołania recenzentów w postępowaniu doktorskim mgr Katarzyny Cekały).

Przybliżając nieco obszar tematyczny rozprawy warto zwrócić uwagę na fakt, że patogeneza licznych schorzeń, na poziomie molekularnym, powiązana jest z zaburzeniami procesów proteolizy białek i poprawnego funkcjonowania mechanizmów ich utylizacji. Jedną ze ścieżek kontrolowanej degradacji białek jest proteoliza odbywająca się z pomocą proteasomu. Zrozumienie mechanizmów funkcjonowania tych kompleksów proteolitycznych, w tym modulacji ich aktywności, pozwala na rozpoznanie przyczyn powstawania licznych chorób, włączając choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne. Patologiczne zmiany zachodzące na poziomie molekularnym w komórkach podczas starzenia ściśle powiązane są ze zmianami efektywności funkcjonowania mechanizmów proteolitycznych usuwających między innymi białka lub peptydy o właściwościach amyloidogennych. Znalezienie skutecznych i stabilnych aktywatorów proteasomu, które przywróciłyby odpowiedni poziom aktywności proteolitycznej, może stanowić przełomowy etap w opracowaniu skutecznych leków na choroby neurodegeneracyjne.

Przekazana mi do recenzji dysertacja przygotowana została przez mgr Cekałę w Pracowni Chemii Medycznej, Katedry Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego

doskonale wpisuje się w ten nurt badań. Doktorantka swoje badania realizowała pod opieką promotorską prof. UG dr hab. Elżbiety Jankowskiej oraz dr Ewy Wieczerzak. Tematyka badań strukturalnych i funkcjonalnych proteasomu oraz jego modulatorów jest od dawna z sukcesami rozwijana w zespole prof. Elżbiety Jankowskiej, która obecnie jest jedną z najlepszych specjalistek z tego obszaru badań w kraju.

Praca doktorska mgr Cekały, licząca 162 strony, zredagowana została w postaci standardowego manuskryptu przy zastosowaniu nieco niestandardowego układu edytorskiego. Maszynopis podzielony został na dziewięć rozdziałów, gdzie w pierwszym z nich Doktorantka zamieściła przegląd literaturowy o objętości 43 stron, dotyczący proteosomalnej degradacji białek, roli proteasomu 20S w procesach starzeniowych i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych oraz aktywacji proteasomu 20S przy pomocy niskomolekularnych aktywatorów. W ocenie recenzenta rozdział ten zredagowany został bardzo starannie i stanowi dobre kompendium aktualnego stanu wiedzy z tematyki poruszanej w rozprawie. Na uznanie zasługuje syntetyczne przedstawienie architektury proteasomu i jego różnych form oraz mechanizmu proteolizy.

W rozdziale drugim mgr Cekała definiuje cele pracy. Podkreśla, że inspiracją do syntezy peptydowych proteasomu były zawierające charakterystyczny motyw sekwencji kompleksu 19S oraz białka Blm10. W swoich poszukiwaniach naukowych chciała uzyskać nie tylko efektywne aktywatory proteasomu, które będą wykazywały efekty *in vitro*, ale też pozostaną wystarczająco stabilne i funkcjonować będą również w komórkach. Zdefiniowane przez Doktorantkę cele badawcze obejmują:

1. „Określenie wymogów strukturalnych względem peptydowych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S, wywodzących się z białkowych modulatorów jego aktywności, poprzez projektowanie, syntezę oraz badania aktywności tych związków.
2. Zbadanie stabilności peptydowych aktywatorów i syntezę peptydomimetyków o potencjalnie podwyższonej stabilności.

3. Sprawdzenie wpływu najlepszych związków na trawienie białek będących substratami proteasomu 20S.
4. Zbadanie wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu w żywych komórkach.”

W kolejnym rozdziale, liczącym 45 stron, mgr Cekała prezentuje uzyskane przez siebie wyniki, przy czym dzieli je na dwie części, pierwszą dotyczącą serii peptydów otrzymanych na bazie sekwencji regulatora 20S oraz drugą omawiającą badania peptydów syntetyzowanych na motywach sekwencji białkowego aktywatora Blm10.

Zaprezentowany w pierwszej części rozdziału trzeciego (Część IIIA) schemat prowadzonych badań był logiczny i obejmował systematyczne poszukiwania aktywatorów peptydowych. W przypadku peptydów otrzymanych na bazie sekwencji regulatora 20S badania objęły na wstępie testy sześciu oktapeptydów, co pozwoliło wytypować peptyd Rpt5(8) jako najbardziej obiecujący aktywator proteasomu h20S. Dalsze badania objęły testy modyfikacji Rpt5 o długości od 8 do 12 aminokwasów. Wybrany do dalszych badań dekapeptyd Rpt5(10) następnie testowano wprowadzając do sekwencji substytucje alaninowe (skan alaninowy) oraz modyfikując sekwencję w pozycjach od 1 do 7 aminokwasami obdarzonymi obojętnymi, kwaśnymi i zasadowymi. Układy te zostały przetestowane pod kątem aktywacji proteasomu 20S. Naturalnym krokiem było też zaprojektowanie i przetestowanie serii peptydomimetyków zawierających zmodyfikowane wiązanie peptydowe lub niestandardowe aminokwasy, między innymi norleucynę. Ten ostatni peptydomimetyk z norleucyną w pozycji 8 wykazywał się najlepszymi parametrami aktywacji proteasomu 20S. W dalszych badaniach wykazywał się pożądanymi parametrami w testach *in vitro* oraz w lizacie komórkowym. Ważnym aspektem badań omówionych w części dotyczącej peptydów otrzymanych na bazie sekwencji regulatora 20S były też testy komórkowe na linii HRK 293T wybranych aktywatorów z wykorzystaniem sekwencji penetracyjnej, znacznika fluorescencyjnego oraz również sondy TAS3. Najefektywniejszym okazał tu się również peptydomimetyk zawierający norleucynę – Tat-Nle8.

W drugiej części rozdziału trzeciego (część IIIB) mgr Cekała skupiła się na omówieniu badań aktywatorów peptydowych zaprojektowanych na bazie sekwencji aktywatora

białkowego Blm10. Opisane tu wyniki badań również wskazują na przemyślaną strategię poszukiwań tej serii modulatorów peptydowych. Badania laboratoryjne poprzedzone zostały badaniami *in silico*, które pozwoliły zaproponować i zsyntetyzować trzy peptydy o różnej długości linkera, które stanowiły punkt wyjściowy do dalszych badań. Podobnie jak w przypadku opisanych w pierwszej części rezultatów Doktorantka modyfikowała sekwencję wybranego peptydu M2-6, który wykazywał najsilniejszy efekt aktywujący. Dalsze badania prowadzono na peptydomimetykach opartych o jego sekwencję. Obejmowały one termoforetyczne analizy oddziaływania wybranych białek (ludzką enolazę oraz α -synukleinę w formach natywnej i utlenionej) z proteasomem 20S oraz testy modulatorów na proteolizę białek przez proteasom 20S. Cykl badań wieńczą badania komórkowe obejmujące testy cytotoksyczności wybranych aktywatorów wobec linii komórkowej HEK 293T oraz test stabilności modulatorów w obecności osocza. Po omówieniu wyników badań Autorka krótko dosumowała uzyskane wyniki w rozdziale czwartym.

W kolejnym rozdziale, liczącym 33 strony Autorka przedstawiła metodologię prowadzonych badań, począwszy od procedur syntezy, oczyszczania i charakterystyki przeznaczonych do badań peptydów oraz synteze sondy TAS. Omówiony został także stosowany w badaniach warsztat aparaturowy oraz procedury przygotowania proteasomu, badań oddziaływania białek z proteasomem oraz testów komórkowych. Warto podkreślić, że opis metodyki jest bardzo szczegółowy, co z pewnością pozwoliłoby odtworzyć omawiane w pracy badania.

Rozdział szósty zawiera bogaty wykaz literatury cytowanej w rozprawie, obejmujący 198 pozycji. W rozdziałach siódmym i ósmym zamieszczone zostało streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Zamykający rozprawą rozdział dziewiąty prezentuje dorobek naukowy mgr Katarzyny Cekały.

W tym miejscu warto zastanowić się czy Doktorantka zrealizowała postawione wcześniej cele badań. Autorka konsekwentnie typowała i weryfikowała skuteczne aktywatory proteasomu, kilka z nich okazało się niezwykle obiecującymi związkami zdolnymi do modulacji aktywności proteasomu. Dalsze badania potwierdziły skuteczność wytypowanych modulatorów peptydowych, co należy uznać za sukces i skuteczną realizację celu pracy.

Zdaniem recenzenta najważniejszymi osiągnięciami pracy doktorskiej mgr Cekały są:

- zaproponowanie i otrzymanie aktywatora peptydowego o optymalnej sekwencji (peptyd Rpt5(10)) zdolnej do aktywacji ludzkiego proteasomu 20S oraz
- otrzymanie peptydomimetycznego aktywatora z nienaturalną resztą norleucyny w pozycji 8, który stymulował proteasom *in vitro*, jak i w lizacie komórkowym oraz testach komórkowych.

Podczas lektury dysertacji nasunęły się jednak pewne krytyczne uwagi, pytania lub sugestie, które warto wyartykułować w tym miejscu.

- O ile bardzo wysoko oceniam przegląd literaturowy zaprezentowany w rozdziale pierwszym, który dobrze przybliżył temat pracy, to nie jest dla mnie jasne cel zamieszczenia w nim rysunku nr 16. Prezentuje on bowiem bardzo szeroki przegląd graficzny systemów dostarczania leków co w mojej ocenie nie ma tu istotnego znaczenia.
- Dla czytelnika bardzo pomocne byłyby porównania sekwencji zarówno proteasomów, jak i białek uczestniczących w aktywacji proteasomu pochodzących z różnych organizmów. Wówczas wybór sekwencji wykorzystanych do projektowania sekwencji aktywatorów byłby dla czytelnika bardziej przejrzysty.
- Podobnie ma się sprawa z porównaniem sekwencji wariantów ludzkiego proteasomu (proteasom 20S, tymoproteasom 20S oraz immunoproteasom). Co prawda Autorka przedstawia schematycznie struktury kompleksów proteasomu, jednakże takie porównanie wzbogaciłoby część literaturową.
- Czy Autorka oprócz nadmienionej w rozprawie współpracy z prof. UG dr hab. Arturem Giełdoniem wykorzystywała szerzej narzędzia bioinformatyczne, a w szczególności techniki dokowania molekularnego aby zoptymalizować sekwencje aktywatorów peptydowych z serii Rpt?
- Pewną niedogodnością dla czytelnika, w subiektywnej ocenie recenzenta, jest zamieszczenie części eksperymentalnej po rozdziale, w którym omawiała wyniki badań.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Część mojej opinii chcę poświęcić również ocenie strony edytorskiej dysertacji mgr Katarzyny Cekały. Jak wcześniej wspomniałem układ pracy jest nieco niestandardowy. Autorka podzieliła pracę na kilka rozdziałów oznaczanych cyframi rzymskimi oraz kontynuowała niezależnie numerację podrozdziałów notacją arabską. Co więcej w tytułach rozdziałów pojawiają się też niezależnie elementy kolejnego stopnia numeracji związanej z podziałem treści części doświadczalnej. Konkretnie chodzi o wprowadzenie do tytułów rozdziałów oznaczeń rzymskich i opisowych:

III BADANIA WŁASNE. Prezentacja i omówienie wyników

IIIA CZĘŚĆ PIERWSZA – peptydy wywodzące się z regulatora 19S

IIIB CZĘŚĆ DRUGA – peptydy wywodzące się z białkowego aktywatora Blm10

W efekcie schemat podziału pracy jest nieco zawiły co niekiedy utrudnia lekturę manuskryptu, zwłaszcza gdy czytelnik chce szybko przejść do innych podrozdziałów. Pomimo krytycznej uwagi dotyczącej podziału tekstu chciałbym podkreślić, że praca została przez mgr Cekałę przygotowana starannie. Podczas lektury manuskryptu znalazłem jedynie nieliczne drobne błędy edytorskie (tzw. literówki). Doktorantka przygotowała też liczne rysunki i diagramy, które doskonale ilustrują omawiane w pracy aspekty, jednakże niektóre z nich są zbyt małe, co niekiedy odbija się na czytelności niektórych detali. Powiększenie ich o dodatkowe 50% raczej nie zwiększyłoby znacząco objętości pracy, a detale na rysunkach byłyby czytelne. Docenić należy też szczegółowy wykaz skrótów stosowanych w pracy, co znacząco ułatwiało analizę tekstu dysertacji.

Reasumując, pozytywnie oceniam stronę edytorską dysertacji przygotowanej przez mgr Katarzynę Cekałę.

Podsumowanie

W podsumowaniu, stwierdzam, że mgr Katarzyna Cekała zrealizowała cele badawcze, które sformułowała w rozdziale trzecim dysertacji. Dobór metod badawczych oraz procedur



laboratoryjnych nie budzi wątpliwości. Swoje wyniki omówiła i zaprezentowała w sposób jasny i przejrzysty. Podczas prezentacji uzyskanych wyników widoczny jest postęp prowadzonych przez mgr Cekałę eksperymentów prowadzących w efekcie do wyłonienia optymalnych aktywatorów peptydowych. Uzyskane wyniki zostały opublikowane i są w mojej ocenie bardzo ważne oraz cechują się nowatorstwem. Potencjalnie wyniki prac mgr Cekały mogą mieć ogromne znaczenie w poszukiwaniu terapii tak ciężkich schorzeń jakimi są choroby neurodegeneracyjne.

W konkluzji jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Katarzynę Cekałę rozprawa doktorska zatytułowana „*Peptydy i peptydomimetyki wywodzące się z białek Rpt5 i Bln10 jako stymulatory ludzkiego proteasomu 20S in vitro i in cellulo*” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 r., z późniejszymi zmianami. Przedkładam tedy wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Cekały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.