



Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Górską-Ponikowska
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 20.01.2025 r.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej

mgr Darii Sowik

pod tytułem

„Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Darii Sowik pod tytułem „Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego” została wykonana pod promotorstwem dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG z Katedry Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pomocniczym rozprawy była dr Ewa Wieczerek.

Rozprawa doktorska Pani mgr Darii Sowik liczy 212 numerowanych stron. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały: **I.** Założenia i cel pracy, **II.** Wstęp literaturowy (z podrozdziałami: Systemy proteolityczne, Amyloidozy, Amylina), **III.** Badania własne, **IV.** Podsumowanie, **V.** Metodologia prowadzonych badań, **VI.** Przypisy. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści oraz wykazem skrótów. Rozprawa zilustrowana została przez 72 ryciny, 4 tabele, zaś bibliografia obejmuje 232 pozycje literaturowe.

Doktorantka podjęła istotny, ambitny i trudny metodycznie temat badawczy jakim jest charakterystyka przebiegu oligomeryzacji amyliny, zbadanie wpływu jej oligomerów na aktywność proteolityczną proteasomu 20S, a także opracowanie związków peptydomimetycznych regulujących aktywność proteasomu 20S. Doktorantka skupiła się na badaniu agregacji amyliny i ewentualnych konsekwencjach klinicznych tego procesu. Z danych wynika natomiast, że w kontrolę proteolityczną poziomu amyliny zaangażowany jest proteasom 20S. Amyloidoza, czyli schorzenie polegające na gromadzeniu się grupy protein o wysokim stopniu samoorganizacji opartej na strukturach oligomerycznych w tkankach i narządach agregatów białek, jest coraz częściej łączone nie tylko z neurodegeneracjami, ale także chorobami metabolicznymi, takimi jak cukrzyca typu 2. Stąd też, temat wybrany przez doktorantkę jest ważny także w kontekście społecznym i klinicznym.

W pierwszym rozdziale Doktorantka przedstawia założenia i cel pracy. Jak wskazuje:



1. Głównym celem pracy doktorskiej była charakterystyka przebiegu oligomeryzacji amyliny, a następnie zbadanie wpływu jej oligomerów na aktywność proteolityczną proteasomu 20S.
2. Kolejnym celem było określenie wpływu peptydów biomimetycznych na aktywność proteasomu 20S.

We wstępie teoretycznym liczącym 40 stron Doktorantka logicznie oraz konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Doktorantka opisuje systemy proteolityczne, włączając aktywność komórkową i budowę proteasomu 20S.

Przy tej części pracy doktorskiej proszę Doktorantkę o uzupełnienie powiązania molekularnego i potencjalnej implikacji klinicznej pomiędzy białkiem szoku termicznego Hsp70 a wpływem na agregację i konsekwentnie, toksyczność amyliny. Czy wedle Doktorantki nadekspresja tego białka może być przyczyną amyloidaz, w tym cukrzycy typu 2?

Kolejno, Doktorantka szczegółowo omawia naturalne regulatory oraz hybrydy proteasomu 20S, co stanowi spójne wprowadzenie do problematyki amyloidaz. Następnie analizuje neurotoksyczną rolę oligomerów białka tau w kontekście choroby Parkinsona. Kolejnym zagadnieniem jest cukrzyca, obejmująca jej klasyfikację oraz mechanizmy patofizjologiczne. W dalszej części skupia się na budowie i funkcji amyliny, zwracając przy tym uwagę na specyficzność obecności receptorów amyliny w mózgu w obrębie bariery krew-mózg lub ich lokalizacji poza tą barierą, podobnie jak odpowiednio receptor AMY1 lub AMY3 (strona 42).

W tej części rozprawy doktorskiej, chciałabym zapytać Doktorantkę czy znane są jej dane dotyczące powiązania zaburzeń oligomeryzacji amyliny z chorobami neurodegeneracyjnymi?

Kolejnym zagadnieniem, które podejmuje Doktorantka, jest kontrola proteolityczna oraz skutki wadliwego funkcjonowania układów degradacyjnych.

Na stronie 46 Doktorantka pisze „Kontrolę nad agregacją amyliny pełnią również chaperony, które są zdolne do wychwytywania jej cząsteczek” i wskazuje na rolę Hsp70. Czy wyłącznie białko szoku termicznego Hsp70 pełni tę rolę?

Następnie, omówione zostały mechanizmy cytotoksyczności amyliny skupiając się na cukrzycy i chorobie Alzheimera.

Należy podkreślić, że informacje we „Wstępie teoretycznym” są przedstawione w sposób klarowny, ułatwiający czytelnikowi zrozumienie tematyki badań Doktorantki. Uwagę recenzenta stanowi naprzemienne używanie określeń amyliny oraz IAPP, wprowadza to niepotrzebne zamieszanie i powinno zostać ujednolicone. Niemniej jednak, treść tego rozdziału wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i znajomość tematu obszaru badań.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka przedstawia „Badania własne”. Realizację założonych celów rozpoczęła od syntezy ludzkiej amyliny, po czym przeprowadziła optymalizację eksperymentu mającego na celu zbadanie przebiegu jej oligomeryzacji. Do charakterystyki powstających form oligomerycznych wykorzystwała zaawansowane techniki badawcze w warunkach natywnych i



denaturujących, stosując sieciowanie chemiczne oraz fotosieciowanie w celu stabilizacji oligomerów. W wykonanych badaniach wskazała, że postęp oligomeryzacji amyliny jest wysoce zależny od jej stężenia. Zoptymalizowała także inne parametry, które mają wpływ na oligomeryzację: obecność chlorku sodu, wytrząsanie próbek, czy temperatura inkubacji.

Kolejno, Doktorantka skupiła się na analizie struktury drugorzędowej amyliny i jej wariantów za pomocą dichroizmu kołowego. Następnie zbadała siłę oddziaływania rozpuszczalnych oligomerów amyliny z proteasomem 20S, który samodzielnie wyizolowała z ludzkiej krwi. W ramach dalszych prac zsyntezowała wariant amyliny zawierający resztę fotosieciującą i zastosowała dwie niezależne techniki badawcze: sieciowanie chemiczne połączone ze spektrometrią mas oraz mikroskopię krioelektronową. Przeprowadziła również eksperymenty z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych substratów fluorogenicznych, określając m.in. kinetykę inhibicji. Dodatkowo wykonała testy oceniające oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem A11.

Następnie zbadała potencjał peptydomimetyków do znoszenia inhibicji h2OS przez oligomery na wyizolowanym proteasomie 20S, ale także w lizacie ludzkich komórek HEK293-T. Zweryfikowała cytotoksyczność frakcji zawierających niskocząsteczkowe oligomery amyliny względem tej linii komórkowej. W kolejnym etapie zweryfikowała czy oligomery amyliny o niskiej masie cząsteczkowej mogą być substratem dla proteasomu 20S oraz czy związki aktywujące są w stanie stymulować ich proteolizę.

Doktorantka określiła także cytotoksyczność oligomerów amyliny wobec komórek HEK293-T.

Przy tym punkcie prosiłabym o wyjaśnienie wyboru komórkowego modelu badania cytotoksyczności.

Prosiłabym również o wyjaśnienie zdania „Natomiast rozpoznany już, ogólny mechanizm cytotoksyczności oligomerów względem błony komórkowej” – co oznacza cytotoksyczność względem błony komórkowej? (strona 130).

Następnym powyższego rozdziału jest „Podsumowanie” w którym Doktorantka przedstawia kolejny raz główny cel pracy oraz skrótowo opisuje otrzymane wyniki badań. *Bardzo podobny opis znajduje się w punkcie I. Założenia i Cel pracy.*

Rozdział pracy, „Metodologia prowadzonych badań” napisany jest przejrzysto i starannie. Doktorantka opisuje syntezę i oczyszczanie amyliny oraz jej wariantów; charakterystykę oligomerów amyliny; oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem konformacyjnym A11; oczyszczanie ludzkiego proteasomu 20S; badania oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem 20S; zdolność proteasomu 20S do trawienia oligomerów amyliny; badania wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną h2OS oraz badania komórkowe. Doktorantka dokładnie opisała użyte materiały, włączając skład buforów stosowanych podczas analiz, a także użyty sprzęt w procedurach eksperymentalnych.

Podsumowując, rozdział „Metodologia prowadzonych badań” w sposób skrupulatny i wyczerpujący opisuje całość zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, pozwalając na odtworzenie warunków i weryfikację uzyskanych wyników przez innych badaczy. Zdaniem recenzenta wybór oraz



zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod i technik badawczych z dziedzin chemii, biologii molekularnej oraz biologii komórki jest imponujący i świadczy o ogromie poświęconej pracy oraz dużym potencjale naukowym Doktorantki.

Rozprawa doktorska zakończona zostaje streszczeniem w języku angielskim oraz polskim, wykazem dorobku naukowego oraz udziałem w projektach naukowych. Ostatni punkt pracy zawiera przypisy - spis rysunków, spisem tabel oraz bibliografię.

Podsumowanie

Amyloidozy to grupa chorób bezpośrednio związanych z nieprawidłowościami w przemianach błędnie sfałdowanych białek, często wynikającymi z wadliwości systemów degradacyjnych. Do proteolitycznych układów kontroli homeostazy białkowej zaliczyć można proteasom 20S. Zaprezentowana przez Doktorantkę rozprawa doktorska w sposób logiczny i konsekwentny odzwierciedla kontekst badań i potwierdza dużą znajomość regulacji aktywności proteasomu 20S. Doktorantka podjęła ambitny temat określenia mechanizmów oligomeryzacji amyliny i jej potencjalnej cytotoksyczności, jak również roli w patomechanizmie chorób t.j. cukrzyca. Wyniki stanowią podstawę do dalszych badań uwzględniających badania komórkowe i kolejno, dodatkowe modele badawcze.

Rozprawa doktorska nie jest napisana w sposób tradycyjny, co niestety utrudnia jej lekturę i recenzję. *Przede wszystkim w przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej brakuje dyskusji z literaturą naukową. Cytowanie literatury Doktorantka stosuje wyłącznie we wstępie teoretycznym. Ponadto, brakuje także jasno postawionej hipotezy badawczej oraz wypunktowania konkretnych wniosków z otrzymanych wyników badań wraz z ich krytyczną analizą. Zarówno dyskusja jak i hipoteza badawcza są bardzo ważnymi składowymi rozprawy doktorskiej.* Te uwagi jednak nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno merytoryczna jak i metodyczna strona rozprawy doktorskiej zasługuje na uznanie.

Rozprawa doktorska Pani mgr Darii Sowik pod tytułem „Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 z późniejszymi zmianami.

Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Darii Sowik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Chemii Medycznej
prof. dr hab. Magdalena Górka-Ponikowska
Magdalena Górka-Ponikowska
Kierownik