



Wroclaw, 19.12.2024 r.

Dr hab. inż. Wioletta Rut-Schedlok, prof. uczelni
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wroclawska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Sowik
pt. „Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są
przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2,
poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu
proteolitycznego”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Darii Sowik pt. „Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego” została zrealizowana w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG oraz dr Ewy Wiczerzak. Została ona poświęcona badaniom mającym na celu ocenę wpływu oligomerów amyliny na aktywność ludzkiego proteasomu 20S oraz zastosowaniu peptydomimetycznych związków o charakterze aktywatorów proteasomu w procesie hamowania akumulacji oligomerycznych form amyliny.

Praca doktorska Pani mgr Darii Sowik ma układ typowy dla tego typu dysertacji i obejmuje: wykaz skrótów, założenia i cel pracy, przegląd literaturowy, badania własne, podsumowanie, część eksperymentalną oraz bibliografię. Dodatkowo na końcu pracy zamieszczony został wykaz dorobku naukowego oraz lista wystąpień konferencyjnych.

Część literaturowa recenzowanej pracy doktorskiej została poświęcona charakterystyce ludzkiego kompleksu enzymatycznego - proteasomu 20S, jego budowie, roli w komórce oraz aktywatorom. W dalszej części przeglądu literaturowego Doktorantka opisała choroby o podłożu amyloidowym takie jak:



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wroclaw

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434

choroba Alzheimera i cukrzyca, a w ostatniej części wstępu literaturowego scharakteryzowała amylinę. Przegląd literaturowy został napisany w sposób zwięzły, przejrzysty i spójny w oparciu o dobrze dobraną, aktualną literaturę. Stanowi dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Charakteryzuje się starannie opracowaną szatą graficzną. Przedstawiane zagadnienia są zilustrowane odpowiednimi schematami i rysunkami. Przy tworzeniu pracy doktorskiej trudno uniknąć jednak drobnych błędów lub mniej precyzyjnych sformułowań, lecz nie mają one wpływu na ocenę rozprawy.

Założenia i cel badań został umieszczony jako pierwszy rozdział doktoratu, w którym Doktorantka precyzyjnie opisała co jest celem rozprawy doktorskiej oraz w jaki sposób został on osiągnięty, nakreślając plan pracy. W rozdziale tym Doktorantka nie zamieściła jednak przypisów bibliograficznych, które powinny zostać zamieszczone szczególnie w pierwszej części tego rozdziału, gdzie Doktorantka odnosi się do aktualnej wiedzy na temat cukrzycy typu 2.

W opisie badań własnych można wyróżnić dwie zasadnicze części: w pierwszej Doktorantka dokonała charakterystyki oligomerów amyliny, a w drugiej przedstawiła wyniki badań dotyczących wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteasomu 20S przy braku oraz w obecności jego aktywatorów. W pierwszym etapie badań Pani mgr Sowik zoptymalizowała warunki oligomeryzacji amyliny, dobierając stężenie próbki, skład buforu do inkubacji, pH, stężenie soli oraz temperaturę. Uzyskane wyniki przedstawiła na rysunkach 18-25 zamieszczając dane tylko z jednego powtórzenia. Proszę o komentarz ze strony Doktorantki podczas publicznej obrony, dlaczego na wykresach nie przedstawiła wartości średniej z co najmniej trzech powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym. Kolejne badania obejmowały charakterystykę amyliny oraz produktów jej oligomeryzacji za pomocą wielu technik takich jak: dichroizm kołowy, technika dynamicznego rozpraszania światła, elektroforeza w warunkach natywnych oraz denaturujących, chromatografia wykluczania oraz elektroforeza kapilarna. Ze względu na trudności w oczyszczaniu i separacji oligomerów amyliny w dalszych badaniach Doktorantka wykorzystwała ich mieszaninę. Na uznanie w tej części rozprawy doktorskie zasługuje znajomość i ilość technik, które Pani mgr Daria Sowik zastosowała w swoich badaniach oraz pracowitość samych badań. Z własnego doświadczenia wiem, jak zmuśne i czasochłonne są badania dotyczące optymalizacji warunków reakcji i oczyszczania jej produktów.

W drugiej części pracy Doktorantka skupiła się na zbadaniu wpływu oligomerów amyliny na aktywność ludzkiego proteasomu 20S. Z przeprowadzonych badań wynika, iż najsilniej z proteasomem oddziałują niskocząsteczkowe oligomery amyliny, występujące w początkowych fazach oligomeryzacji oraz może istnieć kilka miejsc oddziaływania amyliny z proteasomem. W dalszych badaniach Pani mgr Sowik wykazała hamujący wpływ oligomerów amyliny na aktywność proteasomu oraz rolę aktywatorów proteasomu w procesie przywracania jego aktywności.

Doktorantka w opisie badań dotyczących analizy lokalizacji miejsc oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem wspomniała o badaniach zaplanowanych z użyciem wysokorozdzielczego mikroskopu elektronowego, czy są dostępne wyniki tych badań?

Rozdział „Badania własne” napisany jest w sposób przejrzysty, a starannie przygotowane rysunki i tabele dokumentują uzyskane wyniki i wysunięte na ich podstawie wnioski. W opisach wykonywanych badań obecne są nieliczne błędy czy też mniej precyzyjne sformułowania jak np. str. 97 „ale w dalszej analizie mogłoby to nie być pożądane.” nasuwa to pytanie dlaczego?; str. 123 „W ten sam sposób przygotowywałam frakcje kontrolne z użyciem buforu proteosomalnego”; str. 162 „Pomiary wykonywałam w buforze reakcyjnym, który w większości składał się z”. Na rysunkach nr 43 i 61 nie umieszczono markera masy cząsteczkowej białek. Analiza wyników przedstawionych na rysunku 45A (membrana western blot) jest utrudniona. Proszę o komentarz ze strony Doktorantki odnośnie badań z aktywatorami proteasomu, a mianowicie na jakiej podstawie wybrano czas po którym do mieszaniny oligomerów amyliny i proteasomu dodawano aktywatorów (w pracy jest to 5 minut), czy wykonano eksperymenty w których proteasom był dodawany jednocześnie z aktywatorami lub aktywatory dodawane były po dłuższym czasie inkubacji proteasomu z oligomerami amyliny? Doktorantka wspomniała również, że „Każdy z eksperymentów został wykonany z wykorzystaniem specjalnie opracowanej przez nas wysokowydajnej metody z użyciem pipety wielokanałowej.” – proszę o komentarz jaka to metoda.

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka przypomniała co było celem pracy oraz w jaki sposób cel ten został osiągnięty. Do najważniejszych osiągnięć prowadzonych badań należą:

- charakterystyka procesu oligomeryzacji amyliny,
- potwierdzenie oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem,
- wykazanie hamującego wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteasomu 20S,
- wykazanie, iż aktywatory proteasomu umożliwiają przywrócenie jego aktywności po inhibicji przez oligomery amyliny,
- potwierdzenie oddziaływania oligomerów amyliny z przeciwciałem A11,
- wykazanie, iż niskocząsteczkowe oligomery amyliny mogą być degradowane przez proteasom 20S.

W części eksperymentalnej (rozdział V) Pani mgr Sowik opisała metodykę prowadzonych badań. Przedstawione opisy zawierają niezbędne informacje do przeprowadzenia tego typu eksperymentów. Zabrakło jedynie widm z analizy HPLC potwierdzających czystość otrzymanych peptydów (amyliny i aktywatorów proteasomu) oraz informacji o stopniu ich czystości.

Wyniki uzyskane przez Pani mgr Sowik stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny oraz z pewnością zostaną wykorzystane w dalszych badaniach prowadzonych w zespole Promotorów rozprawy oraz opublikowane w czasopiśmie naukowym. Potwierdzają one wiedzę oraz umiejętności

samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. Na uznanie zasługuje znajomość różnorodnych metod i technik badawczych wykorzystanych w realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. Bardzo doceniam również ilość pracy włożoną w proces optymalizacji prowadzonych eksperymentów.

Podsumowując stwierdzam, iż wyniki opisane w rozprawie doktorskiej stanowią oryginalne, wartościowe i znaczące osiągnięcie Doktorantki. W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023r. poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Darii Sowik do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wioletta Rut-Schedlok