



prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

Wrocław, 27.01.2025r.

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

Rozprawa doktorska mgr Darii Sowik została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UMW, i pani promotor pomocniczej, dr Ewy Wieczerek, w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego, a jej główne konkluzje stanowią istotny wkład w badania nad rolą proteolitycznej aktywności proteasomu 20S w kontekście jego roli w degradacji toksycznych agregatów amyliny i innych amyloidów.

Praca została przygotowana w formie tradycyjnej; zawiera szereg typowych dla prac doktorskich sekcji i obejmuje wszystkie niezbędne elementy formalne. Jedynym drobnym odstępstwem od ‘tradycyjności’ pracy jest to, że cel rozprawy jest sformułowany już w pierwszym jej rozdziale, jeszcze przed literaturowym wprowadzeniem do tematyki – jest to ciekawy zabieg, który w mojej opinii jeszcze bardziej zaciekawia czytelnika tym, co ma nastąpić w dalszych częściach rozprawy. Doktorantka w sposób klarowny formułuje cele swojej pracy, które obejmują: (i) charakterystykę oligomeryzacji amyliny; (ii) zbadanie wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną proteasomu 20S (oparta na literaturze hipoteza stawiana przez Doktorantkę twierdzi, że jest to wpływ hamujący) oraz (iii) zaprojektowanie i wykorzystanie peptydomimetyków do aktywacji zdolności proteolitycznych proteasomu 20S.

We wstępie literaturowym, który następuje po opisie celów pracy, Doktorantka wprowadza czytelnika w problematykę chorób amyloidowych, skupiając się szczególnie na roli amyliny w cukrzycy typu 2 oraz na roli amyloidu beta w chorobie Alzheimera, przedstawiając ich rosnącą epidemiologię oraz ogromne obciążenie dla



prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

systemów zdrowotnych na całym świecie. Obszerna, trafnie opisana część literaturowa wprowadza czytelnika w temat mechanizmu proteolitycznego proteasomu 20S, szczegółowo omawiając jego naturalne regulatory. Wstęp pracy dostarcza również wiele szczegółowych i cennych informacji na temat amyliny i mechanizmów jej cytotoksyczności, szczególnie w kontekście wadliwie działających układów proteolitycznych. Czytelnik dowiaduje się również sporo na temat strategii leczenia cukrzycy typu 2 i na temat roli amyliny w chorobie Alzheimerera.

W przypadku choroby Alzheimerera, Parkinsona i Huntingtona przyjmuje się, że rozpuszczalne formy fibrylarnych białek zaangażowanych w neurodegenerację to formy najbardziej toksyczne dla komórek.

U pacjentów z cukrzycą typu 2 dochodzi do gromadzenia się w trzustce cytotoksycznych form amyliny, której właściwości agregacyjne są jeszcze silniejsze niż te amyloidu beta. Wspólne cechy fizykochemiczne, w tym amyloidogenność obu tych peptydów sugeruje podobny mechanizm cytotoksyczności. Ponieważ amyloid beta hamuje funkcjonowanie proteasomu 20S, Doktorantka postawiła słuszną hipotezę zakładającą, że podobny mechanizm będzie obserwowany również w przypadku amyliny.

Tło teoretyczne jest przygotowane w sposób przemyślany i kompleksowy; jest ono bardzo użyteczne dla czytelnika i pozwala na jeszcze lepsze zrozumienie opisanych wcześniej założeń badawczych.

Kolejna część pracy – 'badania własne' – jest w moim odczuciu najciekawszą częścią rozprawy. Również ta część pracy nie jest opisana w do końca tradycyjny sposób – część eksperymentalna jest wyodrębniona jako osobny rozdział, który następuje po części, która opisuje uzyskane wyniki; bardzo cieszy mnie taki układ pracy, ponieważ najbardziej ekscytująca część zostaje tu zaprezentowana jako pierwsza.

Z każdego z poszczególnych rozdziałów dowiadujemy się, że mgr Sowik bardzo dobrze zna metodologię stosowanych przez siebie badań; praca wyróżnia się starannie dobranym, uzupełniającym się zestawem licznych metod badawczych, które umożliwiły Autorce uzyskanie szeregu precyzyjnych wyników. Doktorantka zastosowała fluorymetrię, dichroizm kołowy, DLS, elektroforezę i metody chromatograficzne do analizy oligomerów amyliny; aby scharakteryzować jej



WYDZIAŁ CHEMII

prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

oddziaływania z ludzkim proteasomem, użyła termoforezy mikroskalowej, spektrometrii mas i mikroskopii krioelektronowej; do opisanie oddziaływań amyliny z przeciwciałem A11 użyła techniki Western blot i testu immunoneutralizacji. Równie imponująca jest też metodologia stosowana przez Doktorantkę w badaniach biologicznych i lekkość, z jaką porusza się w stosowanej przez nią (imponującej ilościowo i jakościowo) metodologii – od syntezy, poprzez analizę, po badania biologiczne.

Rozdział opisujący główne wyniki pracy jest rozbudowany i wypełniony wartościowymi danymi, które są rzetelnie analizowane i interpretowane. Czytelnik dowiaduje się, że amyлина agreguje w postaci rozpuszczalnych oligomerów (uznawanych za najbardziej toksyczne) po ośmiu godzinach po rozpoczęciu inkubacji, natomiast stabilizacja i wysycenie form fibrylarnych następuje po pełnej dobie.

Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała powstające niskocząsteczkowe oligomery amyliny (od dimerów po heptamery), charakterystyczne dla początkowych reakcji agregacji i potwierdziła ich silne oddziaływanie z proteasomem 20S, na podstawie wyznaczonych wartości EC50. Wskazanie bezpośredniego miejsca oddziaływania proteasomu 20S z amyliną okazało się nie lada wyzwaniem i najprawdopodobniej nie jest możliwe ze względu na fakt, że takich miejsc może być co najmniej kilka.

W kolejnym etapie badań Doktorantka potwierdziła swoją hipotezę badawczą, wykazując hamujący wpływ opisanych wcześniej oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną proteasomu 20S i udowadniając, że amyлина hamuje go w sposób allosteryczny.

Równie ciekawe okazały się wyniki testów niwelowania hamującego działania oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną proteasomu 20S. Kilka z testowanych przez Doktorantkę peptydomimetyków, w szczególności tego z grupy

**WYDZIAŁ CHEMII**

prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

Blm i BisBlm jest w stanie znosić hamujące proteasom działanie oligomerów amyliny, a kilka z nich jest nawet w stanie ją pobudzić.

Mgr Sowik potwierdziła, że rozpuszczalne oligomery amyliny mogą być substratem dla proteasomu 20S, a ich degradacja może być dodatkowo pobudzana przez wyżej wspomniane peptydomimetyki Blm i BisBlm, będące fragmentami białka Blm10.

Rozprawę wieńczą streszczenia w języku polskim i angielskim, które trafnie podsumowują kluczowe osiągnięcia badawcze.

Główna część rozprawy jest napisana na 212 stronach, zawiera 72 ryciny i 4 tabele oraz cytuje 232 odniesień do literatury. Praca jest bardzo przyjemna w odbiorze, dobrze napisana (Doktorantka ma tzw. „lekkie pióro”), a przeprowadzone badania są wysokiej jakości. Jedynym zastrzeżeniem cytowania prac, które wskazują jedynie pierwszego autora, którego współpracownicy figurują jako ‘et al.’.

W rozprawie nie zauważyłam żadnych poważniejszych braków, poza bardzo drobnymi błędami redakcyjnymi, które są na tyle drobne, że nie ma potrzeby o nich wspominać w piśmie, i które nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Wszelkie uwagi zawarte w recenzji wynikają z ciekawości i również nie wpływają na wysoką ocenę poziomu merytorycznego pracy, sposobu jej prezentacji i wyciągniętych z niej wniosków.

Wyniki rozprawy doktorskiej mgr Sowik mają zarówno znaczenie teoretyczne, jak i potencjalne zastosowanie kliniczne. Praca jest napisana klarownie i spójnie, co sprawia, że jest przyjemna w odbiorze, a sposób przedstawienia wyników jest bardzo przystępny, czego naturalną konsekwencją jest chęć dowiedzenia się więcej na temat potencjalnych inhibitorów proteasomu 20S:

1. Na jakiej zasadzie zostały zaprojektowane aktywatory proteasomu 20S? Dlaczego akurat C-końcowy fragment białka Blm10? Rozumiem, że Doktorantka wzorowała się na pracach Smitha, który produkował analogiczne związki – modulatory innego proteasomu i że kluczowa jest tutaj pętla aktywacyjna – projektowana na podstawie naturalnego aktywatora 11S. Nurtuje mnie pytanie, czy związki z grupy Blm i BisBlm



prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

można jeszcze bardziej ulepszyć? Jeśli tak, to w jaki sposób, w którym kierunku powinny pójść badania?

2. Czy wspomniane wyżej modulatory aktywności proteasomu 20S będą stabilne proteolitycznie/hydrolitycznie w osoczu? W jaki sposób można wzmocnić taką stabilność?

3. Jakie korzyści kliniczne mogłoby przynieść wprowadzenie diagnostycznych markerów szacujących aktywność proteasomu 20S?

4. Co okazało się być największym wyzwaniem i z jakiego wyniku Doktorantka jest najbardziej dumna?

Mierzalnym efektem pracy mgr Sowik są dwie publikacje i sześć konferencji, na których osobiście przedstawiała wyniki swojej pracy i siedem kolejnych, na której przedstawiano jej wyniki.

Doktorantka była wykonawczynią grantu Opus NCN; kierowała trzema projektami dla młodych naukowców przyznawanymi przez Uniwersytet Gdański.

Kandydatka wykazała się umiejętnością wszechstronnej analizy wyników, a napisana przez nią praca ma istotny wpływ na dziedzinę, interdyscyplinarny charakter i bardzo dobrą jakość naukową; wnioski płynące z pracy znacząco wzbogacają naszą wiedzę o chorobach amyloidowych.

Badania przeprowadzone przez mgr Sowik mają również potencjalne znaczenie kliniczne – wyniki pracy przybliżają nas do poznania mechanizmów będących molekularną podstawą cukrzycy typu 2, a zaprojektowanie aktywatory proteasomu 20S rzucają nowe światło na możliwości terapii chorób, których molekularną podstawą są złogi amyloidowe.

Omawiana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i tym samym w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3



WYDZIAŁ CHEMII

prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Zespół Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r., z późniejszymi zmianami.

W związku z powyższym rekomenduję Radzie Naukowej Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Darii Sowik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

Z poważaniem,

Magdalena Rowińska-Żyrek