



### **Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Eweliny Stefaniak**

Tytuł rozprawy w języku polskim : „ *Dystrybucja jonów miedzi pomiędzy peptydami amyloidu- $\beta$  a biomolekułami obecnymi w szczelinie synaptycznej w chorobie Alzheimerera* ”

Tytuł rozprawy w języku angielskim : ” *Distribution of copper ions between amyloid-  $\beta$  peptides and biomolecules present in the synaptic cleft in Alzheimer's disease* ”

Wydział Chemii

### **Uwagi ogólne**

Pani mgr inż. Ewelina Stefaniak wykonała pracę doktorską w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod opieką pana profesora dr hab. Wojciecha Bala. Recenzowana praca wpisuje się w prowadzone od wielu lat w grupie profesora Bala badania nad molekularnymi mechanizmami chorób neurodegeneracyjnych. Tematem wiodącym w tych badaniach jest poznanie oddziaływań jonów miedzi z amyloidowymi peptydami  $\beta$  i ich roli w molekularnych mechanizmach odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój choroby Alzheimerera. Pomimo intensywnych badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na świecie nadal nie poznaliśmy patogenezę tego schorzenia na tyle aby móc skutecznie zapobiegać jego powstawaniu i rozwojowi. Istnieją różne hipotezy na temat molekularnych mechanizmów choroby Alzheimerera. Należą do nich między innymi hipoteza kaskady amyloidowej, hipoteza związana z zaburzeniami homeostazy pewnych jonów metali czy hipoteza stresu oksydacyjnego. Tematem wiodącym w rozległych badaniach zespołu kierowanego przez profesora W. Bala jest poznanie oddziaływań jonów miedzi z amyloidowymi peptydami  $\beta$  oraz określenie ich roli w molekularnych mechanizmach choroby Alzheimerera. W tym obszarze badawczym Panią mgr inż. Ewelinę Stefaniak zainteresowało szczególnie zagadnienie dystrybucji jonów miedzi pomiędzy peptydami amyloidu –  $\beta$  a

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

biomolekułami obecnymi w szczelinie synaptycznej w chorobie Alzheimera i temu zagadnieniu poświęciła swój doktorat.

Rezultaty dotychczasowej działalności badawczej doktorantki zostały ujęte łącznie w 11 publikacjach, których doktorantka jest współautorem. W czterech pracach jest pierwszym autorem a w jednej z nich również autorem korespondującym. Warto podkreślić, iż wszystkie prace ukazały się w bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu takich jak : Inorg.Chem., Chem. Eur.J., Chem. Commun., Angew. Chem. Int. Ed. czy Metallomics. Sześć z tych publikacji stanowi podstawę rozprawy doktorskiej. Badania prowadzone przez doktorantkę finansowane były z pięciu grantów : czterech uzyskanych przez nią (dwa granty przyznane przez NCN - Etiuda i Preludium, grant uzyskany z Fundacji Kościuszkowskiej i grant finansowany przez Szkołę Biologii Molekularnej IBB PAN ) oraz grantu Opus kierowanego przez profesora W. Bala. Wyniki swoich badań prezentowała również na konferencjach naukowych. Za dotychczasową działalność naukową uzyskała nagrody i wyróżnienia, między innymi dwukrotnie stypendium dla najlepszego doktoranta IBB PAN oraz nagrody za prezentacje konferencyjne i publikacje.

### **Ocena formalna i merytoryczna pracy.**

Z formalnego punktu oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona w postaci sześciu opublikowanych artykułów naukowych, których doktorantka jest współautorem oraz dołączonego do nich komentarza w języku angielskim. Komentarz zawiera wykaz grantów, z których finansowane były badania, spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, opis hipotezy badawczej i sposobu jej weryfikacji , listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wyniki pracy , dyskusję i konkluzje, listę publikacji współautorstwa doktorantki, które nie weszły w skład pracy doktorskiej, wykaz nagród i wyróżnień, oraz spis cytowanej literatury. We wprowadzeniu doktorantka w oparciu o najnowszą literaturę omawia stan wiedzy w zakresie badawczym istotnym dla jej pracy. Sposób prezentacji uzyskanych przez doktorantkę wyników uważam za bardzo trafny i rzetelny. Każda z publikacji wchodzących w skład doktoratu

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



jest omówiona w komentarzu w następujący sposób: najpierw przedstawiony jest cel badań opisanych w publikacji i bardzo skrótowo podane są rezultaty tych badań a na zakończenie doktorantka precyzyjnie omawia swój udział w tych badaniach oraz publikacji. Taki sposób prezentacji osiągniętych wyników znakomicie pozwala z jednej strony poznać całościowe rozwiązanie postawionego problemu badawczego powstałe w wyniku pracy wszystkich współautorów publikacji a z drugiej strony ocenić realne zaangażowanie doktorantki w tej zespołowej pracy.

W ramach podrozdziału Hipoteza doktorantka przedstawia swój problem badawczy traktujący o postulowanej dla peptydów  $A\beta_{4-x}$  funkcji fizjologicznych zmiataczy jonów miedzi w szczelinie synaptycznej podczas neurotransmisji oraz o wpływie oddziaływań pomiędzy jonami Cu(I/II), peptydami  $A\beta_{4-x}$ , neurotransmiterami i innymi biomolekułami współistniejącymi w szczelinie synaptycznej na aktywność synaptyczną w warunkach patofizjologicznych. Następnie proponuje aby przed przystąpieniem do weryfikacji tej hipotezy w badaniach *in vitro* czy *in vivo* sprawdzone zostały pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i reaktywności na poziomie molekularnym istotne dla tej hipotezy układy modelowe:

- a) zbadanie czy jony Cu(II) związane z peptydami  $A\beta_{4-x}$  (motyw ATCUN) mogą być wymieniane z jonami Zn w metalotioneinie Zn7MT-3 i możliwość przyspieszenia tej wymiany poprzez oddziaływanie z cząsteczką glutaminianu
- b) zbadanie oddziaływań pomiędzy peptydami  $A\beta_{1-16}$ ,  $A\beta_{4-16}$ , hCtrl<sub>1-14</sub> -związkiem koordynującym wymianę Cu i Zn w mózgu oraz jonami Cu(I/II) w kontekście dostarczania miedzi przez peptydy  $A\beta$  do cząsteczki transportującej (hCtrl) do komórek
- c) zbadanie możliwości przekazania jonów miedzi związanych przez albuminę ( motyw ATCUN) do hCtrl
- d) wyznaczenie stałych szybkości dysocjacji i asocjacji dla Cu(II)  $A\beta_{4-x}$
- e) sprawdzenie pod względem kinetycznym możliwości redukcji Cu(II)  $A\beta_{4-x}$  przez glutation GSH



Uzyskane w cząstkowych badaniach rezultaty, po ich łącznym przedyskutowaniu w podrozdziale Dyskusja, prowadzą doktorantkę do wniosków przedstawionych w podrozdziale Konkluzje. Najważniejszym wnioskiem jest stwierdzenie, iż wszystkie opisane w sześciu publikacjach rezultaty wskazują na spełnienie przez peptydy  $A\beta_{4-x}$  istotnych kryteriów chemicznych do pełnienia funkcji zmiataczy jonów miedzi w przestrzeni synaptycznej i obniżania toksyczności jonów  $Cu(II)$ . Jednocześnie doktorantka wskazuje, że uzyskane przez nią wyniki, mogą wnieść nową jakość do poszukiwania leków na chorobę Alzheimera poprzez zwrócenie uwagi przy ich projektowaniu na brak interferencji z systemem usuwania jonów  $Cu(II)$  opartym na peptydach  $A\beta_{4-x}$ .

Na zakończenie pracy doktorantka przedstawia kilka pomysłów na dalsze badania nad poruszonym w doktoracie problemem, ale już w modelowych układach *in vitro* lub *in vivo*.

W ocenie recenzenta zarysowane przez doktorantkę cele pracy zostały osiągnięte. W trakcie obrony poproszę doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

-dlaczego publikacja : Stefaniak E\*, Bal, W\*, „Binding Properties of N-Truncated  $A\beta$  Peptides: In search of Biological Function.” *Inorg.. Chem.* 2019, 58 (20) 13561-13577 nie została ujęta w pracy doktorskiej?

-wyjaśnienie jakie biomolekuły istotne dla przestrzeni synaptycznej mogłyby być jeszcze rozpatrywane?

- czy rzeczywiście wszystkie odnośniki literaturowe (364 ) były potrzebne do tej pracy doktorskiej?

Drobne potknięcia w postaci błędów językowych, gramatycznych, stylistycznych czy edytorskich oraz czasami niewłaściwych sformułowań nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny przedstawionych osiągnięć naukowych Pani mgr inż. Eweliny Stefaniak.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny od strony merytorycznej i edytorskiej a także przedstawiona w przyjaznej dla czytelnika formie. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników, poprawnie sformułowane wnioski. W sytuacji, kiedy



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

wszystkie wyniki zostały już opublikowane w renomowanych czasopismach ,  
Recenzent pracy doktorskiej szczególną uwagę zwraca na umiejętność  
zarysowania całościowego problemu badawczego, właściwe postawienie  
celów szczegółowych i sposoby ich realizacji, umiejętne połączenie  
wniosków płynących z poszczególnych prac w kontekście rozwiązania  
całościowego problemu badawczego. Pani mgr inż. Ewelina Stefaniak ze  
wszystkich tych oczekiwań wywiązała się znakomicie. Cel pracy został w  
pełni zrealizowany a otrzymane przez autorkę wyniki badań poszerzają naszą  
wiedzę z zakresu chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej wnosząc cenne  
informacje w zakresie zaburzeń i regulacji homeostazy jonów metali  
istotnych w rozważaniach nad molekularnymi mechanizmami chorób  
neurodegeneracyjnych, zwłaszcza choroby Alzheimera. Stwierdzam, że  
przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia kryteria  
stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 186 Ustawy z dnia 20 lipca  
2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z  
późn. zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i  
Biofizyki PAN o dopuszczenie pani mgr inż. Eweliny Stefaniak do dalszych  
etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki  
poziom naukowy tej rozprawy jak i fakt, iż jej wyniki zostały opublikowane  
w sześciu pracach w bardzo dobrych czasopismach wnoszę o wyróżnienie  
pracy doktorskiej pani mgr inż. Eweliny Stefaniak.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl