

dr hab., prof. UG
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 1 grudnia 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Stefaniak

pt. „*Distribution of copper ions between amyloid- β peptides and biomolecules present in the synaptic cleft in the context of neurotoxicity of Alzheimer's disease*”

wykonanej w Zakładzie Biofizyki w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

(promotor: Prof. dr hab. Wojciech Bal)

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy niezwykle ważkich, i, pomimo wielu lat intensywnych badań, wciąż nie do końca poznanych i zrozumiałych relacji między peptydem beta-amyloidowym, w szczególności jego różnymi formami, a chorobą Alzheimera. Wysiłki wielu grup badawczych na całym świecie doprowadziły do stworzenia kilku teorii na temat powstawania i rozwoju tej plagi naszych czasów, żadna jednak nie jest na tyle pełna, by zaowocowała skuteczną terapią. Dlatego też wszelkie wysiłki, w których odchodzi się nieco od głównego nurtu i obiektu badań jakim jest peptyd beta-amyloidowy w jego klasycznej 40 lub 42 aminokwasowej formie ($A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$) i jego agregacja wraz z czynnikami ją promującymi, na rzecz alternatywnych celów cząsteczkowych są jak najbardziej pożądane. W ten nurt badań wpisuje się dysertacja mgr inż. Eweliny Stefaniak. Praca wykonana została w zespole naukowym prof. Wojciecha Bala, uznanego specjalisty w dziedzinie chemii bionieorganicznej. W swym meritum nie odchodzi co prawda bardzo daleko od uznanego za niesławny peptydu $A\beta_{1-40/42}$, koncentrując się na jego N-terminalnie skróconych wersjach, wnosi jednak wiele nowych i istotnych informacji niezbędnych do lepszego zrozumienia jego roli w mózgu, zarówno zdrowych jak i dotkniętych neurodegeneracją.

Mgr Stefaniak postawiła sobie zadanie zbadanie potencjalnie fizjologicznej roli peptydu $A\beta_{4-x}$ (gdzie $x=16$ lub 42) jako swego rodzaju „zmiatacza” jonów $Cu(II)$ w szczeliny synaptycznej i potencjalnego transportera tychże jonów. W badaniach swoich uwzględniła również wpływ kilku naturalnie występujących w tej lokalizacji cząsteczek na stabilność odpowiednich kompleksów oraz możliwości wymiany jonów metalu między różnymi jego ligandami. Doktorantka przeprowadziła także badania kinetyczne tworzenia kompleksów między $A\beta_{4-x}$ i jonami miedzi(II), wynikiem których była propozycja modelu mechanizmu reakcji wiązania $Cu(II)$ z $A\beta_{4-16}$.

Wyniki swojej pracy mgr inż. Ewelina Stefaniak przedstawiła w postaci dysertacji doktorskiej będącej zbiorem publikacji opatrzonych wstępem i syntetycznym opisem uzyskanych rezultatów badań. Ta część pracy zawarta jest na 88 stronach maszynopisu. Otwiera ją wykaz źródeł finansowania, które umożliwiły Doktorantce przeprowadzenie zaplanowanych eksperymentów, w tym grantów dzięki którym możliwe były staże mgr Stefaniak w ośrodkach zagranicznych, które istotnie przyczyniły się do weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Następnie

przedstawiony jest spis stosowanych skrótów i symboli, po którym następują streszczenia pracy w języku angielskim i polskim, a następnie kolejno wprowadzenie, cel pracy/hipoteza badawcza, lista publikacji, na których oparto dysertację, omówienie wyników prezentowanych w tych publikacjach, dyskusja i podsumowanie. Dodatkowo Doktorantka przedstawia listę innych swoich publikacji, które nie zostały omówione szczegółowo w rozprawie oraz wymienia swoje osiągnięcia i uzyskane nagrody. Tę część pracy zamyka wykaz 364 pozycji literaturowych cytowanych przez autorkę. Praca napisana jest w języku angielskim, w sposób poprawny i przystępny. Nie jest zbyt bogato ilustrowana rysunkami czy tabelami, czytelnik może jednak zawsze odwołać się do oryginalnych publikacji przedstawionych w załączniku na końcu pracy.

W krótkim wprowadzeniu do dysertacji, mgr inż. Ewelina Stefaniak podjęła się niełatwego zadania jakim jest przedstawienie w sposób możliwie syntetyczny, jak to sama określiła „*state of play*” czyli informacji na temat choroby Alzheimerera, peptydu beta-amyloidowego i jego roli fizjologicznej i patologicznej oraz mechanizmów jego degradacji i usuwania z komórek. Z zadania tego Autorka wywiązała się bardzo dobrze. Ilość informacji przedstawiona na niespełna 18 stronach, z których jedna zajęta jest w całości przez tabelę przedstawiającą sekwencje różnych form proteolitycznych peptydu beta-amyloidowego, a 2/3 kolejnej przez inną tabelę przedstawiającą warianty rodzinne tegoż, jest doprawdy imponująca. Każde zdanie niesie ze sobą dawkę wiedzy, nie ma tu zdań pustych, niepotrzebnych. Na marginesie – obie tabele nie wnoszą zbyt wiele do tekstu i mogły być przedstawione w postaci krótkiego omówienia i odwołania do literatury. W podobny sposób podane zostały informacje dotyczące związków między peptydem A β w jego pełnej oraz N-terminalnie skróconej postaci z jonami miedzi na różnych stopniach utlenienia oraz aktywności synaptycznej. To ostatnie zadanie potraktowane zostało jednak przez Autorkę aż nazbyt syntetycznie ponieważ trudno znaleźć w tym jednostronicowym rozdziale informacje na tytułowy temat. Lektura całego fragmentu pracy pokazuje dużą biegłość Doktorantki w wyławianiu z morza publikacji dotyczących choroby Alzheimerera i peptydu A β tych najważniejszych i wyłuskiwania z nich najistotniejszych informacji.

Bardzo wysoko oceniam kolejny rozdział pracy zatytułowany „Hipoteza”, w którym, w charakterystyczny dla siebie, zwięzły sposób mgr inż. Ewelina Stefaniak przedstawiła problem badawczy i wynikające z niego hipotezy. Logiczny, doskonale uzasadniony aktualnym stanem wiedzy wywód prowadzi czytelnika przez kolejne problemy, z którymi postanowiła zmierzyć się Doktorantka. Dodatkowa ilustracja, jedna z niewielu jak już wspomniano, zatem tym cenniejsza, pokazuje jak głęboko poza tzw. „mainstream” w badaniach nad chorobą Alzheimerera sięgają badania prowadzone przez mgr Stefaniak. Tym bardziej są więc one ciekawe, a ich wyniki zdecydowanie wzbogacają stan wiedzy na temat peptydu beta-amyloidowego, zdejmując z niego, przynajmniej częściowo, odium szkarłatnej litery jednej z najgorszych cząsteczek w ludzkim organizmie. Jasno zdefiniowane cele szczegółowe służą do zbudowania jak najpełniejszego obrazu związków pomiędzy peptydem A β (dokładniej jego reprezentatywnymi fragmentami) a innymi fizjologicznie istotnymi molekułami. Zaliczyć do nich należy m.in. metalotioneinę-3, koordynującą w mózgu metabolizm miedzi i cynku oraz kontrolującą toksyczność oksydacyjną kompleksów CuA β . Innymi badanymi w połączeniu z A β w pracy molekułami są transbłonowy receptor miedzi hCtr1 czy klasyczny przenośnik jonów miedzi jakim jest surowicza albumina (HSA).

Kolejny rozdział zatytułowany „Wyniki” przedstawia założenia i wyniki pięciu opublikowanych oraz jednej zaakceptowanej do druku publikacji, stanowiących rdzeń rozprawy. Publikacje przedstawione są w porządku chronologicznym, a każdy rozdział zwiiera informacje na temat wkładu Doktorantki w powstanie manuskryptu. Dodatkowo potwierdzone są one informacjami od pozostałych współautorów dotyczących ich wkładu pracy w przywoływane publikacje, zatem „prawa” Doktorantki do wykorzystania tych publikacji są uzasadnione.

Lektura poszczególnych rozdziałów w kontekście wkładu pracy mgr Stefaniak pokazuje jej rozwój jako coraz bardziej samodzielnej badaczki – od wykonawcy zaangażowanego w rejestrację i analizę widm UV-Vis czy CD czy ekspresji białka w dwóch pierwszych publikacjach dotyczących związków między A β a metalotioneiną-3, po samodzielne zaprojektowanie na podstawie przeglądu literatury i poprowadzenie projektu naukowego, co przedstawione zostało w kolejnych dwóch pracach dotyczących receptora hCtr-1. Ostatnia z przedstawionych publikacji również przedstawia weryfikację hipotezy badawczej postawionej przez mgr Stefaniak, a dotyczącej możliwości zaangażowania fragmentów peptydu beta-amyloidowego jako molekuł przenoszących jony miedzi przez barierę krew-mózg.

Uzyskane wyniki składają się na spójny obraz skróconego peptydu A β 4-x jako potencjalnego efektywnego transportera jonów miedzi o właściwościach chaperonowych. Jego wysoka dystrybucja w hipokampie i korze mózgowej, zdolność do szybkiej i bardzo efektywnej sekwestracji jonów miedzi dzięki obecności N-terminalnego motywu ATCUN z jednoczesnym wyciszaniem ich właściwości redoksowych (w odróżnieniu od peptydu pełnej długości) zdaje się potwierdzać taki właśnie charakter tego peptydu. Do najważniejszych osiągnięć szczegółowych pracy, stanowiących element nowości naukowej recenzowanej rozprawy zaliczyć należy:

- (i) Wykazanie odporności kompleksu CuA β 4-x na wymianę jonów miedzi z wysyconą jonami cynku metalotioneiną 3 (Zn₇MT-3) przez co obie te cząsteczki mogą potencjalnie pełnić rolę niezależnych chaperonów w synaptycznym klirensie jonów miedzi
- (ii) Reewaluację wartości stałej wiązania miedzi(II) przez fragment receptora jonów miedzi hCtr1-14 i wzmocnienie roli HSA jako transportera jonów miedzi oraz zaproponowanie jego roli na wczesnych etapach importu jonów tego metalu do wnętrza komórki
- (iii) Zbadanie kinetyki reakcji kompleksowania jonów Cu(II) przez A β 4-16 i zaproponowanie modelu tego procesu jako mechanizmu biegnącego przez produkty pośrednie o czasach życia porównywalnych z wartościami dla cykli uwalniania neurotransmiterów w szczelinie synaptycznej.

Uzyskane wyniki, mimo że bardzo interesujące, nie przesłaniają Doktorantce faktu, że są one czysto modelowe, oparte na bardzo uproszczonym układzie izolowanych molekuł badanych w probówce laboratoryjnej bez uwzględnienia wpływu całego uniwersum innych cząsteczek obecnych w warunkach *in vivo*. Mgr Stefaniak ma tego pełną świadomość i proponuje kolejne badania, które powinny poszerzyć obecny stan wiedzy uwzględniający również rezultaty jej eksperymentów. Świadczy to dobrze o jej dojrzałości naukowej i gotowości do podejmowania nowych, samodzielnych wyzwań. Dobre opanowanie warsztatu eksperymentalnego, o którym można wnioskować z przedstawionych w pracy publikacji, daje nadzieję na kolejne sukcesy naukowe Doktorantki.

Recenzowanie pracy będącej zastawieniem już ocenionych publikacji nie ułatwia Recenzentowi zadania spełnienia tzw. „obowiązku recenzenckiego” czyli wyszukania jej słabszych punktów. W przedstawionej dysertacji udało mi się znaleźć ich ledwie kilka. Są to pojedyncze literówki, występujące m.in. w streszczeniu w języku polskim („Ponowne wyznaczenie w tej pracy powinowactwo” chyba powinno być „powinowactwa”); „W celu potwierdzenia udziału A β 4-x w sekwestracji Cu(II) podczas neurotransmisji” – neurotransmisji) czy dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego „proces trwa około 20 razy wolniej” zamiast „dłużej”. W tekście podano też błędne odwołanie do ryciny 1C zamiast 3C. Na stronie 39 brakuje moim zdaniem odnośnika literaturowego do informacji na temat hiperaktywacji aktywnych neuronów przez dimery A β . Chciałabym również prosić Doktorantkę o nieco bardziej szczegółowe odniesienie się do definicji rodzinnej formy choroby Alzheimera. Stwierdzenie z pracy, że diagnozuje się ją, gdy w rodzinie pacjenta występują co najmniej dwa przypadki zachorowania na demencję jest sporym

uproszczeniem. Na koniec proszę również o zrekapitulowanie wyników uzyskanych przez Doktorantkę w kontekście choroby Alzheimera, co sugeruje tytuł pracy. Omówienia takiego zabrakło mi w przedstawionej dysertacji.

Przytoczone uwagi nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez Autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Wartość merytoryczną rozprawy mgr inż. Eweliny Stefaniak potwierdza fakt, że jest to materiał już opublikowany, a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie. Uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w czasopiśmie o szerokim zasięgu międzynarodowym, w tym w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania. W połowie z zaprezentowanych prac tych Pani Stefaniak jest pierwszym lub równorzędnym Autorem, co świadczy o jej wiodącej roli w prowadzonych badaniach.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Stefaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, bardzo dobry dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,



Sylwia Rodziewicz-Motelnicka