

Lublin, 1 kwietnia 2016 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk pt. „Rola konformacyjnego efektu pamięci w propagacji wariantów strukturalnych amyloidu insuliny”

Choroby neurodegeneracyjne związane z formowaniem struktur amyloidowych stanowią problem medyczny z kategorii nieomalże chorób cywilizacyjnych. Powstrzymanie rozwoju tego typu schorzeń stanowi aktualne wyzwanie badawcze w obszarze medycyny i farmakologii ale również, a może nawet przede wszystkim, w obszarze podstawowych nauk przyrodniczych, wobec faktu, iż jedynie pełne poznanie mechanizmów molekularnych związanych z formowaniem struktur amyloidowych oraz ich propagacją umożliwić może skuteczne strategie spowalniania a może nawet zapobiegania tego typu schorzeniom. W tym świetle, tematyka rozprawy doktorskiej przedstawionej przez panią mgr Weronikę Surmacz-Chwedoruk jawi się nie tylko interesująca ale również bardzo aktualna i z naukowego punktu widzenia ważna.

Praca pani mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk zrealizowana została pod kierunkiem dr. hab. Wojciecha Dzwolaka, prof. UW, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w Pracowni Oddziaływań Międzymolekularnych oraz w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, według standardowego układu, na 180 stronach maszynopisu. Zawiera 82 rysunki, w większości prezentujące oryginalne wyniki badawcze, oraz 5 tabel. Rozprawa podzielona została przez Autorkę na 9 rozdziałów, z czego rozdział 1 zawiera zwięzłą prezentację celów i założeń pracy zaś rozdział 9 spis wykorzystanego piśmiennictwa. Pozostałe rozdziały zawarte zostały w dwóch częściach; w części mającej charakter analizy doniesień literaturowych dotyczących bezpośrednio tematyki rozprawy (rozdziały 2-4) oraz z części prezentującej wyniki przeprowadzonych prac badawczych oraz ich dyskusję i podsumowanie (rozdziały 5-8). Wstępna część literaturowa zredagowana została, moim zdaniem, w sposób bardzo przejrzysty i logiczny, posiada przy tym znaczne walory dydaktyczne, tak iż polecana być może studentom oraz adeptom nauki jako bardzo cenne opracowanie wprowadzające w tematykę badania białek oraz chorób neurodegeneracyjnych związanych z formowaniem struktur amyloidowych. Chciałbym w tym miejscu swojej analizy podkreślić, iż precyzja sformułowań, elegancja języka oraz dbałość o stronę redakcyjną nie jest jedynie cechą wstępnej części ale całej rozprawy doktorskiej. W trakcie jej lektury zauważyłem jedynie trzy miejsca, w których mógłbym zasugerować drobną modyfikację. Szczególnie wartościowym fragmentem wstępnej części rozprawy wydaje mi się zestawienie porównawcze technik instrumentalnych stosowanych powszechnie w badaniach struktur amyloidowych. W opracowaniach tych, więcej uwagi poświęcono stosowanym w ramach prowadzonych eksperymentów technikom badawczym, w szczególności zastosowaniu sond fluorescencyjnych, spektroskopii absorpcyjnej w obszarze podczerwieni (FTIR) oraz spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). W miejscu tym, chciałbym zaznaczyć, iż stosowanie wielu komplementarnych, zaawansowanych technik badawczych, uważam jako bardzo pozytywny aspekt ocenianej rozprawy. Największą jednak wartość rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk łączy się, moim zdaniem, z wyjątkowo dużą ilością wartościowych wyników badawczych oraz z ich wagą dla postępu badań naukowych w obszarze formowania i propagacji struktur amyloidowych. Wyniki badań dotyczą bezpośrednio insuliny. Uzyskane w ramach rozprawy wyniki mają więc znaczenie jako dotyczące całej klasy białek tworzących potencjalnie struktury amyloidowe. Ponadto, rezultaty wydają się istotne z punktu widzenia zaburzeń wynikających z długookresowego stosowania iniekcji insulinowych, niezbędnych wśród pacjentów cierpiących na cukrzycę typu pierwszego.



W pełni zgadzam się z Autorką rozprawy co do najważniejszych osiągnięć badawczych, wyartykułowanych w ramach rozdziału 8. Podsumowanie. Szczególnie podkreślić chciałbym:

1. Uzyskanie precyzyjnych informacji dotyczących temperatury, powyżej której termiczna degradacja amyloidu insuliny, wpływa na utratę możliwości destabilizowania i przyłączania monomerów do jej lepkiego końca.
2. Wykazanie skuteczności modyfikacji sekwencji aminokwasowej na kinetykę oraz wydajność formowania amyloidów oraz na ich strukturę.
3. Pokazanie, że na drodze efektu pamięci konformacyjnej modelować można złożone struktury białkowe, z potencjalnym zastosowaniem w inżynierii bionanomateriałów.

Tak zaawansowane i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską Pani mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk, pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem może być sformułowanie następujących problemów:

1. Niezwykle pomysłowa metoda stosowana w precyzyjnych badaniach struktur amyloidowych w oparciu o efekt TICT znaczników fluorescencyjnych (na przykład ThT) posiada jednakże niewielki margines niepewności wynikający ze specyficzności wiązania sondy do struktur białkowych. Czy możliwe jest, że uzupełnienie podejścia o badania czasów życia fluorescencji, nie zaś jedynie jej widm emisji, wpłynąć może pozytywnie na walory takiego podejścia?
2. Wśród metod instrumentalnych stosowanych w badaniach amyloidów stosuje się techniki obrazowania (np. AFM) oraz techniki spektroskopowe (np. FTIR). Ostatnio pojawiły się możliwości aparaturowe połączenia tych podejść, na przykład w postaci mikroskopii określanej jako nano-IR. Bardzo interesująca praca w tym zakresie ogłoszona została przed kilkoma miesiącami (F.S. Ruggeri et al., „Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation”, Nature Communications, 6 Article number: 7831). Ciekaw jestem, jakie możliwości, zdaniem Doktorantki, technika



ta stwarza dla badań propagacji struktur amyloidowych? Czy jest to istotny postęp metodologiczny czy może „kolejna zabawka eksperymentatorów”?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Weronika Surmacz-Chwedoruk przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu chemii strukturalnej makromolekuł, spektroskopii molekularnej oraz również umiejętności praktycznych z zakresu preparatyki chemicznej. Większość z zawartych w pracy doktorskiej wyników stało się już podstawą oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach specjalistycznych, w tym w *PloS One*, *Biochemisty* oraz *Langmuir*. W moim odczuciu, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania. Co więcej, zarówno wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań jak i waga uzyskanych wyników, które stanowią podstawę rozprawy, czyni ją, w moim odczuciu, godną wyróżnienia. Uprzejmie proszę o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Panią mgr Weronikę Surmacz-Chwedoruk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



ZAKŁAD BIOCHEMII ANALITYCZNEJ
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Andrzej Kozik

Kraków, dnia 4 kwietnia 2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk
pt. „Rola konformacyjnego efektu pamięci
w propagacji wariantów strukturalnych amyloidu insuliny”

Z prawdziwą przyjemnością zapoznałem się z pracą doktorską mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk, przygotowaną pod kierunkiem dr hab. prof. Wojciecha Dzwolaka w Pracowni Oddziaływań Międzymolekularnych Zakładu Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Przedmiotem rozważań autorki rozprawy jest zjawisko przekształcania form natywnych wielu białek w formy amyloidalne – nierozpuszczalne włókniste agregaty, w których łańcuchy polipeptydowe przyjmują w przeważającej części drugorzędową strukturę typu β -arkusza. Proces ten może zachodzić w organizmie i ma wtedy dramatyczne konsekwencje kliniczne, gdyż amyloidalne formy szeregu białek związane są z patogenezą śmiertelnych chorób, takich jak m.in. neurodegeneracyjne choroby Alzheimera, Parkinsona czy Creutzfeldta-Jacoba. Zjawisko to ma również fascynujący aspekt poznawczy, gdyż stawia wyzwanie klasycznym poglądom na temat stabilności strukturalnej i fałdowania białek, zgodnie z którymi struktura natywna białek, tj. ta, w której pełnią one swoją naturalną funkcję, jest zarazem strukturą najbardziej stabilną pod względem energetycznym. Wiele grup badawczych, pracujących w tej dziedzinie, przyjmuje założenie, że w obu tych aspektach doniosłe wnioski wysnuć można z analizy procesu amyloidogenezy w białkach modelowych, tworzących te włókniste agregaty w postaci czystej w kontrolowanych warunkach *in vitro*. Nawet jeśli akurat w przypadku tych białek nie została dotąd opisana jednostka chorobowa, którą można byłoby przypisać tworzeniu formy amyloidalnej *in vivo*. Jednym z takich modelowych białek może być insulina – obiekt badań eksperymentalnych, opisanych w recenzowanej rozprawie.

Motywy przewodnim tych badań był wpływ konformacji zarodków, na bazie których następuje narastanie włókna amyloidalnego, na jego ostateczną strukturę. Efekt ten obrazowo określany jest

jako „pamięć konformacyjna”. Przeprowadzone przez doktorantkę badania reprezentują bardzo wysoki poziom merytoryczny. W rozprawie przedstawiona została imponująca ilość danych doświadczalnych, które doktorantka uzyskała na drodze drobiazgowych i często bardzo czasochłonnych analiz z zastosowaniem różnorodnych metod, obejmujących termogravimetrię, różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), spektrometrię mas (MS), mikroskopię sił atomowych (AFM), mikroskopię elektronową – transmisyjną (TEM) i skaningową (SEM), spektrofluorymetrię z zastosowaniem sond molekularnych, fourierowską spektrofotometrię absorpcyjną w podczerwieni (FTIR), pomiary dichroizmu kołowego (CD), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) i inne. Nie ulega wątpliwości, że oryginalne wyniki, przedstawione w rozprawie wnoszą znaczący wkład w rozumienie procesów powstawania amyloidalnych form białek. O bardzo dużej wartości tych badań świadczy m.in. fakt, że znakomita większość przedstawionych w rozprawie wyników zawarta jest w czterech pełnych artykułach oryginalnych, które zostały już opublikowane w latach 2012-2014, a których współautorem (w trzech przypadkach pierwszym) jest W. Surmacz-Chwedoruk. Są to znakomite prace, opublikowane w tak renomowanych czasopismach jak *PLoS One*, *Journal of Physical Chemistry B*, *Langmuir* i *Biochemistry*. Fakt ten jest z jednej strony godny wielkiego uznania, ale z drugiej strony - skoro prace te spełniły surowe kryteria redakcyjne tych czasopism - odebrał mi sporą część pracy nad merytoryczną oceną rozprawy.

Zadaniem recenzenta jest jednak – szczególnie w takim właśnie przypadku – ocena całości rozprawy doktorskiej - pod względem ogólnej koncepcji, spójności wywodów, prawidłowości wysnutych wniosków, zgodności ze standardami redakcyjnymi tego typu prac, prawidłowości zastosowanej terminologii na gruncie języka rozprawy (polskiego) czy poprawności czysto językowej.

Doktorantka zastosowała dość nietypową organizację swojej rozprawy doktorskiej, która w zasadzie składa się z dwóch dużych, odrębnych rozdziałów, określonych jako „Część literaturowa” i „Badania własne”. Osobiście nie mam nic przeciwko takiemu zabiegowi redakcyjnemu, aczkolwiek spójność pomiędzy obiema częściami nie została w pełni zrealizowana, o czym za chwilę. Przed „Częścią literaturową” podana została obowiązkowa lista skrótów, po której następuje zwięzłe (jednostronicowe) sformułowanie przesłanek, celu i głównych zadań badawczych pracy (rozdział 1). Zadaniem tymi były analizy:

- (1) termicznej stabilności zarodków amyloidu insuliny w kontekście ich zdolności indukowania kolejnych pokoleń włókien,
- (2) wpływu podstawień reszt aminokwasowych w sekwencji insuliny poza rejonem rdzenia amyloidu na strukturę powstających włókien,
- (3) propagacji fenotypu zarodka amyloidu w potomnych pokoleniach włókien.

Uprzedzając moje dalsze, bardziej szczegółowe rozważania dotyczące części „Badania własne”, pragnę w tym miejscu stwierdzić, że ogólny cel pracy oraz główne zadania badawcze zostały przez doktorantkę w pełni zrealizowane.

Dwie główne części rozprawy ocenię osobno, gdyż wymagają nieco odmiennego podejścia. „Część literaturowa” jest ogromna – zajmuje prawie połowę całego zasadniczego tekstu rozprawy (78 stron). Zakrojona została na szeroką skalę, co miało ten efekt uboczny, że niektóre informacje są potraktowane nieco pobieżnie. Składa się z trzech rozdziałów, zawierających:

- (1) w rozdziale 2 - podstawowe informacje o procesie zwijania łańcuchów polipeptydowych białek w strukturę natywną oraz struktury amyloidalne, ze szczegółowym omówieniem patogennych konsekwencji amyloidogenezy, mechanizmu agregacji inicjowanej przez pierwotną nukleację, kinetyki agregacji, struktury i stabilności amyloidów oraz polimorfizmu włókien;
- (2) w rozdziale 3 - charakterystykę insuliny – jej struktury, biosyntezy i funkcji w organizmie, jej analogów strukturalnych, uzasadnienie tezy, że insulina może być dobrym modelem do badań amyloidogenezy, oraz szczegółową charakterystykę strukturalną amyloidu insuliny;
- (3) w rozdziale 4 - podstawy metod badania amyloidów – technik wysokorozdzielczych (rentgenografia strukturalna włókien i kryształów białek, NMR); technik mikroskopowych (AFM, mikroskopia elektronowa), metod spektroskopowych (głównie spektrofluorymetrii) opartych o zastosowanie sond molekularnych takich jak tioflawina T, czerwień Kongo czy ANS; spektroskopii FTIR oraz spektroskopii dichroizmu kołowego.

Mimo obszerności tej „Części literaturowej” oraz drobnych potknięć, które wymieniam poniżej, przyznaję, że ten rozdział wstępny, napisany przejrzysto i przystępnie, czytałem z dużym zainteresowaniem a wobec różnorodności poruszanych zagadnień narastała we mnie coraz mocniej ciekawość, co znajdę w dalszej części, opisującej badania własne autorki. Wychodziłem bowiem z założenia, że w części wstępnej powinny być głównie informacje, stanowiące podstawę do późniejszej interpretacji uzyskanych wyników i ich szerszej dyskusji. Po lekturze całej rozprawy wydaje mi się teraz, że niektóre dane, zamieszczone we wstępie, mogłyby być pominięte, zwłaszcza że niekiedy są zbyt elementarne, jak na rozprawę doktorską. Mam na myśli przede wszystkim rozdział, poświęcony metodom badania amyloidów. Nieco razi pobieżność opisu technik wysokorozdzielczych (rentgenografia, spektroskopia NMR), którą autorka usprawiedliwia tym, że „nie były wykorzystane do badań własnych”. Jakieś teoretyczne wprowadzenie do tych metod jednak by się przydało, zwłaszcza w kontekście czasem zbyt szczegółowych opisów innych metod, np. FTIR, w przypadku której niezbyt chyba potrzebnie autorka rozwodzi się nad teorią Miyazawy. Z drugiej strony – niektóre metody, faktycznie przez nią zastosowane w badaniach, takie jak termogravimetria

czy różnicowa kalorymetria skanująca (DSC) nie zostały omówione w części wstępnej. Zwłaszcza ta ostatnia chyba na to zasługiwała, gdyż jest jedną z najważniejszych metod badania stabilności strukturalnej białek.

Analizując „Część literaturową” rozprawy pod względem zgodności z przyjętymi standardami redakcyjnymi, dostrzegłem dwa uchybienia. Jedno (pojawiające się w całej rozprawie) dotyczy sposobu cytowania odnośników literaturowych w tekście – autorka cytuje je, podając tylko nazwisko pierwszego autora i rok opublikowania pracy. Standardowo tak cytuje się tylko prace pojedynczego autora; gdy jest ich dwóch – wymienia się oba nazwiska, gdy jest ich więcej – pisze się nazwisko autora pierwszego i dodaje się „i inni” lub „i wsp.”. Cytując monografię lub książkę, w której różne rozdziały napisane są przez różnych autorów, należy wymienić nazwisko autora rozdziału, tytuł rozdziału, nazwisko redaktora całości, tytuł całej książki, strony, rok, wydawnictwo, miejsce wydania. W tych ostatnich przypadkach doktorantka niekiedy stosuje cytowanie według dziwnego wzoru [Otzen Ed., 2013] (str. 12-13). Drugie niedociągnięcie dotyczy rysunków w tej części rozprawy. Są skopiowane z oryginalnych prac, a zatem mają opisy w języku angielskim, co jest nieeleganckie, gdyż rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Ponadto jakość tak wygenerowanych rysunków jest czasem niewystarczająca (np. rys. 43).

Jako recenzent, muszę wytknąć ponadto kilka potknięć terminologicznych, z których niektóre przewijają się niestety przez całą rozprawę. Mówiąc o sekwencji białek należy używać terminów „reszty aminokwasowe” a nie „aminokwasy” - te ostatnie przestały istnieć jako odrębne substancje chemiczne z chwilą utworzenia peptydu. Z tych samych względów niepokojąco brzmi termin „aminokwasy hydrofobowe” (str. 10) – należy użyć słów: „reszty aminokwasowe z hydrofobowym łańcuchem bocznym”. Nie można wymieniać nazw aminokwasów w liczbie mnogiej, jak np. na str. 40, gdzie mowa jest o cysteinach A7 i B7 oraz A20 i B19 - L-cysteina jest naprawdę tylko jedna). Nieprawidłowe jest określenie „energia Gibbsa” – ta funkcja termodynamiczna (G) nazywa się „energiami swobodną Gibbsa”, a najlepiej „entalpią swobodną”. Zgodnie z aktualnymi wymogami, efekty energetyczne należy wyrażać w dżulach (J) a nie kaloriach (cal). Eksperyment myślowy, który do literatury przeszedł jako „paradoks Levinthala” trudno nazywać rzeczywistą obserwacją albo nawet teorią (str. 11). Fatalnie brzmi często powtarzane określenie „cięcie enzymatyczne” – chodzi tu o katalizowane przez enzym rozszczepienie wiązania chemicznego, a konkretnie – hydrolityczne, gdyż mowa tu o enzymach proteolitycznych. Zamiast „polipeptydy natywnie nieustrukturyzowane” z pewnością lepsze byłoby określenie „białka inherentnie nieuporządkowane” (str. 13). Zamiast „wydłużone regiony glutaminowe” (tabela 1 i str. 18) lepiej brzmiałoby np.: „wydłużone regiony sekwencji, z wielokrotnie powtarzającymi się resztami glutaminy”. Zamiast „mobilność elektroforetyczna” na str. 35 powinno być „ruchliwość elektroforetyczna”, zamiast insulinooporności (str. 45) – „insulinooporność”, zamiast „inhibuje” (str. 49) – „hamuje”, zamiast „pasma amidowe” (str. 67) lepiej

byłoby „pasma Amid” (pasma, związane z oscylacjami atomów wiązania amidowego), zamiast „kwasu retinolowego” (str. 82) powinno być „kwasu retinowego”. Nie mówiąc już o niespodziewanym prezencie od programu Word w postaci „kwaśnicy metabolicznej” (str. 45). Muszę jednak przyznać, że tych mniej lub bardziej przypadkowych błędów terminologicznych jest w recenzowanej rozprawie stosunkowo niewiele, w porównaniu z innymi pracami doktorskimi, które dotąd wpadły w moje ręce.

W paru miejscach zauważyłem potknięcia, które najprawdopodobniej są wynikiem zwykłego przejęzyczenia, aczkolwiek literalnie potraktowane mogłyby być jako błędy merytoryczne. Na str. 18, w tekście dotyczącym wyjątkowości prionów jako cząstek zakaźnych, pada stwierdzenie, że przed ich odkryciem „uważano, że wszystkie choroby zakaźne przenoszone są przez wirusy i bakterie”. A co z infekcjami, spowodowanymi przez inne mikroorganizmy, np. grzyby? Skrótno omawiając podstawy metody FTIR (str 65-66), doktorantka przywołuje wyłącznie model oscylatora harmonicznego, dla którego obowiązuje reguła wyboru, że dozwolone są wyłącznie przejścia ze zmianą kwantowej liczby oscylacji o ± 1 . Osłabienie tej reguły wyboru, a w konsekwencji możliwość pojawienia się nadtonów, dotyczy oscylatora anharmonicznego.

Druga główna część rozprawy, zatytułowana „Badania wstępne”, liczy 77 stron i jest raportem z badań eksperymentalnych, przeprowadzonych przez doktorantkę. Ma niekonwencjonalną organizację tekstu, obejmując kilka rozdziałów, wyglądających jak osobne publikacje. Każdy ma wstęp, wyprowadzający cel pracy, opis zastosowanych materiałów i metod oraz omówienie otrzymanych wyników połączone w jeden podrozdział z ich interpretacją i dyskusją. Taka koncepcja nadaje części eksperymentalnej wyjątkową przejrzystość, ale ma jedną wadę - dotkliwie daje się odczuć brak osobnej dyskusji, która zapewniłaby integrację wniosków, płynących z badań przeprowadzonych w odrębnych nurtach oraz łączne ich naświetlenie w wystarczająco szerokim aspekcie. Roli tej nie spełnia zamieszczone na końcu tej części czterostronicowe podsumowanie (rozdział 8), z którego dopiero dowiadujemy się, jakie konkretnie publikacje stanowiły podstawę kolejnych rozdziałów.

- (1) Rozdział 5 jest w zasadzie przekładem na język polski pracy Surmacz-Chwedoruk i in. (2014) opublikowanej w czasopiśmie *PLoS One* i poświęcony jest analizie stabilności termicznej amyloidu insuliny. Praca ta jest ważną polemiką w stosunku do literaturowych doniesień Browna i wsp. (1990) o niezwykłej trwałości - niemal niezniszczalności - białek prionowych. Doktorantka wykazała jednak, że amyloid insuliny traci swą „infekcyjność” już po ogrzewaniu w temperaturze 200°C.
- (2) Kolejny rozdział 6 przygotowany został w oparciu o część pracy Surmacz-Chwedoruk i in. (2012), opublikowanej w czasopiśmie *Biochemistry*, dowodzącą, że punktowe podstawienia

reszt aminokwasowych w „sekwencji aminokwasowej insuliny poza segmentem rdzeniowym prowadzą do powstania konformacyjnie odmiennych fibryli”.

- (3) Kolejny, najobszerniejszy rozdział części eksperymentalnej rozprawy (rozdział 7) podzielony jest na kilka podrozdziałów (z taką samą organizacją, jak poprzednich pełnych rozdziałów), których wspólnym celem jest badanie różnych aspektów konformacyjnego efektu pamięci. Najpierw (podrozdział 7.1) opisane są badania tego efektu w zasiewaniu krzyżowym. Wykazano, że „molekuły insuliny przyłączając się do heterologicznego zarodka, przyjmują dość bardzo podobną konformację zarówno w obrębie łańcucha głównego jak i w sposobie upakowania łańcuchów bocznych”. Jednakże struktura wyższego rzędu jest determinowana przez rodzaj cząsteczek budujących włókno, a nie rodzaj zarodkującego szablonu. W podrozdziale 7.2 przedstawiono wyniki badań nad stabilnością termodynamiczną szczepów amyloidalnych z zastosowaniem DMSO jako czynnika denaturującego. Oba te podrozdziały przygotowane zostały na podstawie dalszej części wymienionej wyżej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Biochemistry*. Z kolei w podrozdziale 7.3, na podstawie artykułu Dzwolak i wsp. (2013), opublikowanego w czasopiśmie *Langmuir*, opisano efekt pamięci konformacyjnej w procesie agregacji insuliny prowadzącej do powstawania superstruktur o charakterze chiralnym, co zachodzi w trakcie intensywnego wytrząsania próbek amyloidu. Dalszy rozdział 7.4 to opis niezmiernie interesujących badań efektu pamięci konformacyjnej podczas zasiewania dwóch różnych form insuliny mieszaniną zarodków dwojakiego typu strukturalnego. Wykazano m.in., że konformację włókien potomnych determinuje zarodek homologiczny, ale w procesie tym zarodek heterologiczny może pełnić funkcję katalizatora. Wyniki te opublikowano w czasopiśmie *Journal of Physical Chemistry B* (Surmacz-Chwedoruk i in., 2014). Ostatni z podrozdziałów (7.5), jako jedyny, zawiera wyniki dotąd nie opublikowane (aczkolwiek na str. 179 autorka deklaruje, że na ich podstawie został już przygotowany maszynopis, wysłany do druku). Dotyczy badań nad trwałością efektu pamięci konformacyjnej w serii następujących po sobie zasiewań.

Nie mam żadnych istotnych merytorycznych zastrzeżeń odnośnie eksperymentalnej części tej rozprawy. Eksperymenty zostały starannie zaplanowane. Celowość ich przeprowadzenia nie budzi wątpliwości. Wykonane zostały profesjonalnie, przy zastosowaniu adekwatnych metod. Uzyskane wyniki stanowią doniosłą nowość naukową.

Nie mam również uwag krytycznych względem redakcyjnej strony tej części rozprawy. Tym razem rysunki, mimo iż zaczerpnięte z prac opublikowanych w języku angielskim, są przygotowane w wersji z opisami w języku polskim. Materiał ilustracyjny jest bardzo dobrze opracowany pod względem graficznym.

Jedynym zauważonym przeze mnie potknięciem terminologicznym w tej części rozprawy jest używanie enigmatycznych określeń „intesywność spektralna” (str. 134) czy „intesywność sygnału” (str. 136) w odniesieniu do pomiarów metodą FTIR. Ponieważ jest to spektroskopia absorpcyjna, to wielkością wyznaczaną jest absorbancja – tak, jak prawidłowo zaznaczono na odpowiednich rysunkach, z wyjątkiem rys. 67. Pod względem językowym wątpliwości moje budzą określenia takie jak: „czas relewantny biologicznie” (str. 139), czy „zaadresowanie wątpliwości” (str. 141). Nie spotkałem się dotąd z terminem „frustracja termodynamiczna” (str. 140).

Po części eksperymentalnej rozprawy następuje spis całości piśmiennictwa, zawierający gigantyczną liczbę pozycji (383!, nie uwzględniając zduplikowanej pozycji Nelson i in., 2005). Są to w znacznej części publikacje z ostatniej dekady. Świadczy to o znakomitym przygotowaniu doktorantki do realizacji postawionych celów eksperymentalnych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Dalej, niejako poza konkursem, scharakteryzowany został godny uznania całkowity dorobek naukowy autorki, obejmujący łącznie osiem znakomitych publikacji oryginalnych oraz jeden maszynopis wysłany do druku. Rozprawę wieńczy, zgodnie z formalnymi wymogami, streszczenie w języku angielskim, które tutaj określane jest jako „Autoreferat rozprawy doktorskiej”. Pod względem językowym jest ono prawie bez zarzutu.

Podsumowanie

Jak wynika z powyższych rozważań, niewiele mam uwag krytycznych względem rozprawy doktorskiej mgr W. Surmacz-Chwedoruk. Są one wyłącznie formalne (terminologiczne lub redakcyjne) i w zasadzie dotyczą przede wszystkim części wstępnej. Nie mogą one przesłonić zasadniczej zalety rozprawy, jaką jest przedstawienie dużej ilości wyników o ogromnej wartości poznawczej, uzyskanych samodzielnie przez doktorantkę przy zastosowaniu wielu nowoczesnych metod badawczych i w znacznej większości już opublikowanych w czasopismach biochemicznych wysokiej rangi.

Stwierdzam zatem, że praca doktorska mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk spełnia zwyczajowe wymogi merytoryczne, redakcyjne, terminologiczne i językowe, stawiane rozprawom doktorskim z zakresu biochemii oraz formalne wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 r. Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego proszę o przyjęcie mojego wniosku o dopuszczenie mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, doniosłość naukową uzyskanych wyników, a także staranną formę redakcyjną i językową opracowania, proponuję stosowne wyróżnienie tej wyjątkowej pracy doktorskiej.

Audyt Uroch



ZAKŁAD BIOCHEMII ANALITYCZNEJ
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
UNIwersytet Jagielloński
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Andrzej Kozik

Kraków, dnia 4 kwietnia 2016 r.

Rada Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Weroniki Surmacz-Chwedoruk
pt. „Rola konformacyjnego efektu pamięci
w propagacji wariantów strukturalnych amyloidu insuliny”

Rozważywszy wymienione niżej wyjątkowe zalety rozprawy doktorskiej mgr W. Surmacz-Chwedoruk, jako recenzent tej pracy składam wniosek o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Za wnioskiem tym przemawiają:

1. Doniosły aspekt poznawczy podjętej tematyki badawczej. Praca wnosi znaczący wkład w rozumienie roli procesu amyloidogenezy na tle ogólniejszej wiedzy nt. przyjmowania przez białka stabilnej struktury przestrzennej.
2. Implikacje medyczne tematyki badawczej. Przeprowadzone przez doktorantkę modelowe badania nad amyloidogenezą insuliny mogą być w pewnym stopniu ekstrapolowane na zjawisko tworzenia amyloidów *in vivo*, którego konsekwencją są poważne choroby, m.in. neurodegeneracyjne.
3. Wyjątkowo wysoka wartość merytoryczna rozprawy. Eksperymenty zostały starannie zaplanowane. Celowość ich przeprowadzenia nie budzi wątpliwości. Doktorantka przedstawiła imponującą ilość danych doświadczalnych, które uzyskała na drodze drobiazgowych i często bardzo czasochłonnych analiz, wykonanych profesjonalnie z zastosowaniem różnorodnych, adekwatnych metod, obejmujących termogravimetrię, różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), spektrometrię mas (MS), mikroskopię sił atomowych (AFM), mikroskopię elektronową – transmisyjną (TEM) i skaningową (SEM),

spektrofluorymetrię z zastosowaniem sond molekularnych, fourierowską spektrofotometrię absorpcyjną w podczerwieni (FTIR), pomiary dichroizmu kołowego (CD) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

4. Oryginalność i nowość naukowa uzyskanych wyników.
5. Opublikowanie większości uzyskanych wyników w znakomitych czasopismach naukowych. Są to cztery oryginalne artykuły opublikowane w latach 2012-2014 w *PLoS One*, *Journal of Physical Chemistry B*, *Langmuir* i *Biochemistry*, których współautorem (w trzech przypadkach pierwszym) jest W. Surmacz-Chwedoruk.
6. Bardzo dobre przygotowanie rozprawy pod względem redakcyjnym i językowym.
7. Bardzo dobra orientacja doktorantki w literaturze przedmiotu.
8. Znakomity całkowity dorobek naukowy doktorantki, obejmujący łącznie osiem znakomitych publikacji oryginalnych oraz jeden maszynopis wysłany do druku.

Andy Uorik