



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Medycznej



Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 06.12.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Przemiany konformacyjne amyloidogennych produktów proteolizy insuliny”

przedstawionej przez magistra Roberta Deca

Praca doktorska magistra Roberta Deca dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia biocząsteczek o charakterze amyloidogennym. Tematyka ta od dłuższego czasu znajduje się w centrum zainteresowania naukowców, ponieważ agregacja białek i tworzenie przez nie złożeń amyloidowych powiązane są z szeregiem chorób, w tym także chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy, które dotyczą wielu milionów ludzi na całym świecie i stanowią prawdziwe wyzwanie cywilizacyjne, szczególnie w społeczeństwach świata zachodniego. Poszerzenie wiedzy na temat mechanizmu agregacji i czynników, które mogą mieć dla tego procesu kluczowe znaczenie, jest niezbędne, aby możliwe było zapobieganie i leczenie chorób powiązanych z amyloidogenezą.

Badania podjęte przez Roberta Deca wpisują się znakomicie w to zapotrzebowanie. Rozprawa doktorska dotyczy agregacji insuliny i jest kontynuacją prac prowadzonych w grupie badawczej promotora rozprawy, prof. dr hab. Wojciecha Dzwolaka. Doktorant zajmował się analogami tzw. peptydu H, zidentyfikowanego przez grupę prof. Dzwolaka jako silnie amyloidogenny fragment insuliny wołowej. W ramach niniejszej pracy mgr Robert Dec przebadał 11 analogów peptydu H, wykorzystując do tego celu spektroskopię w podczerwieni, dichroizm kołowy, mikroskopię sił atomowych oraz testy fluorescencyjne z użyciem tioflawiny T i czerwieni Kongo. Zasadniczym celem tych badań było zrozumienie fizykochemicznych i molekularnych uwarunkowań skutkujących bardzo silną skłonnością peptydu H do agregacji. Rozprawa obejmuje kilka wątków, których zbadanie finalizowane było publikacją w recenzowanym czasopiśmie o obiegu międzynarodowym. W opublikowanych pracach zostały opisane: i) badania skłonności peptydu H do agregacji (Dec i wsp. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020); ii) znaczenie dla tendencji agregacyjnych peptydu H zawartych w jego sekwencji mostków disulfidowych (Dec i wsp. *FEBS J.* 2019); iii) wpływ na właściwości amyloidogenne wzajemnego ułożenia łańcuchów A i B peptydu H (Dec & Dzwolak, *Langmuir* 2020); iv) identyfikacja najbardziej amyloidogennego rejonu łańcucha A peptydu H (Dec & Dzwolak, *Int. J. Biol.*

Macromol. 2021); oraz v) wpływ neutralizującego ładunek dodatku jonów na agregację łańcucha A z dołączoną sekwencją polilizynową (Dec i wsp. J. Mat. Chem B, w druku).

Wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy. Jej tematyka jest niezwykle ważna i aktualna, a przy tym peptydy agregujące to trudne i sprawiające wiele problemów obiekty badawcze. Różnorodne czynniki mają wpływ na przebieg procesu agregacji, dlatego uzyskanie spójnych, powtarzalnych wyników wymaga dobrego warsztatu badawczego. Doktorant znakomicie poradził sobie z tym zadaniem i przedstawił w rozprawie ciekawy materiał naukowy. Cele pracy zostały precyzyjnie określone, a do ich realizacji Doktorant zastosował odpowiednio dobrany wachlarz metod. Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać informację m.in. na temat wielkości zarodka agregacji peptydu H, znaczenia mostków disulfidowych i ładunku elektrycznego dla przebiegu tego procesu, a także wytypować pięcioaminokwasowy rdzeń amyloidogenny (GIVEQ). Lektura tekstu rozprawy wskazuje, iż Doktorant potrafi krytycznie kontrastować swoje obserwacje z danymi literaturowymi, a także wyciągać i weryfikować wnioski, także te sprzeczne z wiedzą kanoniczną.

Wysoka ocena wartości merytorycznej rozprawy idzie w parze z wysoką oceną strony redakcyjnej. Swoje pozytywne uwagi i pewne drobne zastrzeżenia w tym zakresie przedstawiam poniżej.

Rozprawa doktorska magistra Deca ma układ klasyczny, przyjęty powszechnie dla tego typu opracowań. Na jej początku przedstawiony został cel i założenia pracy. Pozwala to od razu zorientować się, co było obiektem badań, a także poznać pytania, na które badania te miały przynieść odpowiedź. Stanowiący kolejną część rozprawy, przygotowany w oparciu o źródła literaturowe, opis białek amyloidogennych, w tym insuliny, choć nie jest zbyt rozbudowany (38 stron), to jest prawdziwą skarbnicą wiedzy. Za zaletę uważam zastosowane przez Doktoranta ograniczenie prezentowanych treści do kręgu ściśle związanego z prowadzonymi badaniami. Czytając tę część rozprawy ma się wrażenie, że autor dokładnie przestudiował całą dostępną literaturę na interesujący go temat i wybrał tylko to, co jest niezbędne dla zrozumienia celu i sensu badań. Kolejność i treść poszczególnych podrozdziałów została starannie przemyślana. Przedstawiony aktualny stan wiedzy pozwala zbudować zainteresowanie czytelnika podejmowaną w pracy tematyką, jak również umiejscowić tę tematykę na tle innych badań, aby można było dostrzec i docenić element nowości, jaki wnoszą do istniejących zasobów badania przeprowadzone przez Doktoranta. W części literaturowej umieszczony został także rozdział prezentujący podstawy fizyczne zastosowanych w pracy technik eksperymentalnych – spektroskopii w podczerwieni, dichroizmu kołowego, mikroskopii sił atomowych oraz detekcji amyloidów za pomocą fluorescencyjnych sond molekularnych. Rozdział ten podaje wszelkie szczegóły niezbędne do zrozumienia prezentowanych badań i ich wyników, przez co bardzo dobrze przygotowuje do lektury dalszej części rozprawy.

Na wstępie rozdziału „Badania własne” Doktorant przedstawił ich plan oraz opis wykorzystanych materiałów i metod. Jest to bardzo dobra praktyka, ułatwiająca zrozumienie koncepcji badawczej, jak również umożliwiająca szybkie odnajdywanie informacji technicznych. Rozdział ten zawiera dużą ilość wyników, napisany jest jednak zwięźle i rzeczowo. Zasygnalizowane jest jedynie to, co ilustruje sedno przeprowadzonego eksperymentu i jego wyniku. Dane przedstawione są bez nadmiernej szczegółowości,

w sposób przejrzysty, czyli tak, jak jest to wymagane w dobrych publikacjach naukowych. Wyniki ilustrowane są starannie przygotowanym materiałem graficznym, a dyskusja zawarta w każdym z podrozdziałów systematyzuje i wyjaśnia znaczenie przedstawianych wyników. Zwraca uwagę precyzja sformułowań i odpowiednia doza ostrożności w interpretacji obserwacji. Konkluzje są wyważone, dobrze poparte materiałem eksperymentalnym i odnoszą się w sposób adekwatny do obecnego stanu wiedzy.

Bibliografia pracy jest bardzo bogata i obejmuje odwołania zarówno do publikacji dawniejszych, jak i najnowszych, co pokazuje, iż doktorant dobrze zna literaturę przedmiotu i umie ją odpowiednio dobrać dla zilustrowania zagadnień prezentowanych i dyskutowanych w rozprawie.

Obowiązek recenzencki obliguje do zwrócenia uwagi także na mankamenty, nieścisłości i niejasności, jakie pojawiły się w pracy:

- W Tabeli 1, przy przypisywaniu poszczególnym pasmom amidowym odpowiadających im drgań, należałoby wskazać odpowiednie wiązania, a nie tylko grupy atomów.
- Czy roztwór złożony z fosforanu(V) trisodowego i chlorku sodu można nazwać buforem?
- Na jakiej podstawie stwierdzono, iż stężenia masowe agregatów insuliny i peptydu H w próbkach badanych za pomocą testu tioflawinowego są takie same (str. 76)?
- Co oznacza indeks „Ch” umieszczony przy oznaczeniu insuliny (str. 81) i co to jest stężenie stacjonarne?
- Co oznacza przesuwanie się pasma „ku czerwieni”?
- W jaki sposób usuwano przed pomiarami FTIR chlorowoderek guanidyny lub DMSO z próbek, w których nie powstawały nierozpuszczalne agregaty?
- Czy nie ułatwiłoby interpretacji widm FTIR obliczenie drugich pochodnych dla zarejestrowanych trajektorii pasma amid I?
- Czy można w jakiś sposób zinterpretować znaczący przyrost fluorescencji ThT po 12 godzinach inkubacji próbek peptydu X w pH 4.1, czego nie obserwuje się w niższym pH (Rys. 64)?
- Czy ATP wiąże się z peptydem XI poprzez fragment ACC1-13? Bo na to wskazuje opis Rys. 75.

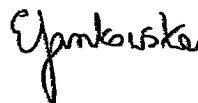
Bardzo liczne są usterki redakcyjne, w rodzaju błędnych końcówek, zamiany kolejności liter, bądź ich braku w słowach. Czasem taka usterka prowadzi do zmiany sensu, jak np. w sformułowaniu „stała szybkość procesu elongacji” zamiast stała szybkości tego procesu (Rys. 9), „odziaływań CD-amyloid” zamiast CR-amyloid (Rys. 32), „oscylującej w graniach” zamiast oscylującej w granicach (str. 123), czy też „pożądania” zamiast podążania (str. 119). Doktorant nie ustrzegł się kolokwializmu („obrabianie widm/wyników”), kilkukrotnie powtórnego w tekście rozprawy, choć trzeba przyznać, że zasadniczo język pracy jest jasny, precyzyjny i poprawny pod względem stylistycznym, gramatycznym i interpunkcyjnym.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Roberta Deca jest spójna merytorycznie i ciekawa, a przedstawione wyniki wnoszą nową wartość do bieżącego stanu wiedzy. Rozprawę czyta się bardzo dobrze, ponieważ jej treść przedstawiona jest zwięźle i klarownie. Nie budzi zastrzeżeń sposób prezentacji wyników – dobór rysunków, tabel, jak i ich czytelność. Badania zostały

przeprowadzone w sposób kompetentny, z zastosowaniem właściwej metodologii badawczej. Uzyskane wyniki zostały poprawnie zinterpretowane oraz właściwie skontrastowane ze stanem wiedzy. Wnioski wyciągnięte przez autora są wyważone, brak w nich przesady i nadinterpretacji.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż dorobek Doktoranta obejmuje 19 prac naukowych, w tym 6 prac pierwszoautorskich, bezpośrednio powiązanych z tematyką rozprawy. Łącznie stanowi to dorobek naprawdę imponujący na tym etapie kariery naukowej.

Z przedstawionych powyżej powodów stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska z naddatkiem spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Dorobek naukowy Doktoranta i jego dojrzałość naukowa w pełni uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora. Wnioskuje o dopuszczenie magistra Roberta Deca do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnoszę również o wyróżnienie jego rozprawy, o ile pozwalają na to reguły przyjęte przez Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.



dr hab. Elżbieta Jankowska



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Medycznej



Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 6.12.2021

Jako uzupełnienie do złożonej recenzji rozprawy doktorskiej magistra Roberta Deca niniejszym składam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

W odczuciu recenzenta szczególną wartością tej rozprawy jest identyfikacja *N*-terminalnego fragmentu łańcucha A insuliny jako silnie amyloidogennego rejonu, mogącego w znacznym stopniu przyczynić się do agregacji całego białka. Skierowanie uwagi naukowców na ten fragment, wraz z wynikami dalszych badań Doktoranta, dowodzących kluczowej roli sekwencji GIVEQ⁵ oraz mostka disulfidowego Cys6-Cys11 w amyloidogenezie segmentu A, stwarza podstawy do kontrolowania niepożądanego agregacji insuliny. Ma to istotne znaczenie zarówno w aspekcie medycznym, jak i przemysłowym.

Istotnym wskazaniem do wyróżnienia tej rozprawy jest również:

- opublikowanie wyników badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej w postaci sześciu prac, w których Doktorant jest pierwszym autorem;
- istotny współczynnik wpływu czasopism, w których opublikowane zostały wyniki – średni współczynnik przypadający na pracę wynosi ponad 5,0;
- imponujący, jak na ten etap rozwoju naukowego, ogólny dorobek publikacyjny Doktoranta, obejmujący łącznie 19 prac, które ukazały się w renomowanych czasopismach o obiegu międzynarodowym.

Elzbieta Jankowska