



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 17 grudnia 2021 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Roberta Deca
pt. „Przemiany konformacyjne amyloidogennych produktów proteolizy
insuliny”**

Choroby neurodegeneracyjne, powiązane zależnościami przyczynowo skutkowymi z formowaniem białkowych struktur amyloidowych w mózgu, stanowią ogromne zagrożenie dla członków naszego społeczeństwa, wobec wydłużającej się średniej długości życia ludzi. Nie budzi więc zdziwienia fakt, iż zrozumienie mechanizmów molekularnych powiązanych z etiologią tych chorób stanowi ważne oraz aktualne wyzwanie podejmowane przez liczne zespoły naukowe na świecie. Spontaniczne formowanie agregatów molekularnych białek, dalekich w swojej strukturze od natywnych form warunkujących ich funkcjonalność w organizmie, wpisuje się również do katalogu istotnych problemów w obszarze biotechnologii oraz przemysłu farmaceutycznego polipeptydów, w tym również hormonu insuliny, którego produkcja odpowiadać musi na ogromne zapotrzebowanie ze strony pacjentów

KATEDRA 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

cierpiących na cukrzycę. Badaniom amyloidogennych właściwości insuliny oraz produktów jej proteolizy poświęcona została rozprawa doktorska mgr. Roberta Deca. Wobec zarysowanych powyżej wyzwań naukowych oraz cywilizacyjnych podjętą przez doktoranta tematykę postrzegam nie tylko w kategoriach interesujących, ale również bardzo ważnych.

Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem prof. Wojciecha Dzwolaka w Pracowni Oddziaływań Międzymolekularnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w renomowanym ośrodku, którego wysoka aktywność wpisuje się w wysiłki środowisk naukowych na świecie zogniskowane na problemach organizacji molekularnej struktur amyloidowych. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 153 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o klarowny, optymalny w moim odczuciu schemat. Po spisie treści i wykazie skrótów, zaprezentowane zostały założenia pracy oraz jej cele strategiczne, w ramach rozdziału 1. Kolejne rozdziały rozprawy przedstawione zostały w ramach „Części Literaturowej” (rozdziały 2, 3 i 4) oraz „Badań Własnych” (rozdziały 5-10 plus wykaz cytowanego piśmiennictwa jako rozdział 11 pt. Bibliografia). Rozprawę zamyka okazałe zestawienie dorobku naukowego autora rozprawy. Wstępna część opisowa stanowi doskonale wprowadzenie w problematykę pracy doktorskiej. W sposób zwięzły, a zarazem klarowny, przedstawione zostały w niej podstawowe informacje dotyczące białek, agregatów amyloidowych oraz insuliny. Znaczną wartość stanowi również, w moim odbiorze, zestawienie charakterystyk podstawowych technik instrumentalnych stosowanych tradycyjnie w badaniach struktur amyloidowych, włączając spektroskopię absorpcyjną w obszarze IR, spektroskopię absorpcyjną i fluorescencyjną sond molekularnych specyficznie oddziałujących z agregatami białkowymi, spektroskopię CD oraz mikroskopię sił atomowych (AFM). Blok rozprawy doktorskiej prezentujący wyniki badań własnych rozpoczyna krótki rozdział 5. pt. „Ogólny plan badań, materiały i metody”. Treść zawarta w ramach tego rozdziału jest, moim zdaniem, bardzo cenna, strukturalizując dalszą lekturę rozprawy. Kolejne rozdziały poświęcone zostały szczegółowym opisom odrębnych projektów badawczych, uwzględniającym

prezentacje założeń metodologicznych, szczegółów przygotowywania próbek i prowadzenia pomiarów. Każdorazowo, w sposób precyzyjny przedstawione zostały wyniki badań, ich interpretacja oraz dyskusja w kontekście doniesień literaturowych oraz konkluzji z poprzedzających rozdziałów zaprezentowanych w ramach pracy doktorskiej. Takie powiązanie treści sprawia, iż rozprawę czyta się z zainteresowaniem, pomimo wysokiej kondensacji wyników i analiz. Adresowane w ramach projektu doktorskiego problemy poznawcze dotyczyły, między innymi, charakterystyki struktur amyloidowych formowanych przez peptyd H oraz mechanizmów molekularnych, na drodze których peptyd H tworzy formy zagregowane. Przeprowadzone zostało również mapowanie segmentów peptydu H szczególnie sprzyjających amyloidogenezie. Ważnym elementem projektu doktorskiego były również, w moim doczuciu, badania jednołańcuchowych syntetycznych peptydów zawierających amyloidogenną domenę peptydu H. Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki wskazujące precyzyjnie na determinanty strukturalne wpływające na proces formowania agregatów amyloidowych insuliny oraz produktów jej proteolizy. Co więcej, uzyskane wyniki posiadają, moim zdaniem, o wiele szerszą wartość poznawczą i mogą być uogólniane na inne peptydy oraz proces formowania struktur amyloidowych. Poza znaczącymi osiągnięciami poznawczymi, Doktorant wniósł również bardzo cenny wkład metodologiczny opracowując podejście umożliwiające wyznaczenie energii oddziaływania cząsteczek sond molekularnych z amyloidami.

Bardzo wysoko oceniam również stronę redakcyjną rozprawy, zarówno w aspekcie klarowności przekazu jak i jakości grafik. Mógłbym zaproponować Autorowi rozprawy, pod roz wagę nieliczne korekty formalne. Oto ich krótka lista:

1. Str. 19, 4 wiersz od dołu, „poliformy” zamiast „polimofrmy”,
2. str. 23, 3 wiersz od dołu, „pierwsze” zamiast „pierwsza”,
3. str. 33, 10 wiersz od dołu, proponuję „disiarczkowych” w miejsce „dwusiarczkowych”, chociaż obydwie formy są zrozumiałe,
4. str. 47, 16 wiersz od dołu, „sigmoidalnego” w miejsce „sigmodialnego”,

5. str. 49, legenda Rys. 19. Przedstawione widmo nie jest widmem transmisyjnym, ale absorpcyjnym chociaż mogło być zarejestrowane w trybie transmisyjnym,
6. str. 96, 1 wiersz od góry, „sam” w miejsce „samo”.

Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pana mgr. Roberta Deca, dostarcza bardzo wielu cennych informacji, rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Zastanawiam się nad procesem obniżania się poziomu fluorescencji ThT po osiągnięciu początkowego maksimum, obserwowane w wielu eksperymentach (np. wyniki przedstawiane na Rys. 18, str. 48). Czy możliwe jest, że na ten proces ma również wpływ formowanie agregatów samego fluoroforu, w tym również na powierzchni amyloidu? Znanym jest bowiem mechanizm obniżenia wydajności kwantowej fluorescencji cząsteczek jako skutek ich agregacji. Może wykorzystanie analizy czasów życia fluorescencji mogłoby ułatwić rozwiązanie tego problemu? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktoranta w tym zakresie.

2. Analizy porównawcze większości widm absorpcyjnych w obszarze IR zarejestrowane z zastosowaniem techniki ATR-FTIR przeprowadzone były po znormalizowaniu ich w maksimum pasma amid I (np. Rys. 50A, str. 99). Zastanawiam się, na ile celowe byłoby przeprowadzenie normalizacji polem powierzchni pod poszczególnymi widmami? Nie wpłynęłoby to oczywiście na położenia poszczególnych składowych pasm, ale pozwoliło na ocenę faktycznego wkładu w widmo poszczególnych form spektralnych peptydów. Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktoranta?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Robert Dec przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz pieczołowicie przeprowadzonych zadań badawczych. Badania te wymagały wiedzy i umiejętności w zakresie preparatyki biochemicznej białek jak i spektroskopii molekularnej. Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu doktorskiego opublikowane zostały równolegle w 6 oryginalnych artykułach badawczych, które ukazały się z znakomitych, międzynarodowych czasopismach specjalistycznych. Doktorant kształtował również swój warsztat naukowy w ramach innych projektów badawczych, których rezultatem jest 13 bardzo dobrych publikacji oraz liczne doniesienia konferencyjne.

Moim zdaniem, przedstawiona przez mgr. Roberta Deca rozprawa doktorska zawiera rozwiązania aktualnych, ważnych i interesujących problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w art. 187. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Roberta Deca do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Wielość uzyskanych wyników naukowych oraz, przede wszystkim ich ranga poznawcza skłania mnie również do wnioskowania o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.





KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 17 grudnia 2021 r.

Prof. dr hab. Paweł Krysiński
Przewodniczący Komisji Doktorskiej

Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Wniosek o uznanie rozprawy doktorskiej mgr. Roberta Deca jako wyróżniającej

Szanowni Państwo,

Uprzejmie proszę o rozważenie możliwości uznania za wyróżniającą rozprawy doktorskiej pana mgr. Roberta Deca, zatytułowanej: „Przemiany konformacyjne amyloidogennych produktów proteolizy insuliny”.

Przedmiotowa rozprawa doktorska opiera się na znacznej liczbie bardzo wartościowych wyników naukowych, wnoszących istotny wkład do naszej wiedzy o mechanizmach formowania struktur amyloidowych insuliny, które można uogólnić na wiele innych peptydów, w tym istotnych z punktu widzenia etiologii chorób neurodegeneracyjnych. Za osiągnięcie o szczególnej randze poznawczej uznaję identyfikację sekwencji aminokwasów we fragmencie N-terminalnym łańcucha A insuliny (GIVEQ), odpowiadającej za wysoką podatność na formowanie struktur zagregowanych białka oraz wzmocnienie tych właściwości poprzez obecność mostka disiarczkowego w pozycji A6-A11. Znaczną wartością rozprawy jest również opracowanie oryginalnego podejścia metodologicznego umożliwiającego wyznaczenie energii oddziaływania małych cząsteczek sond molekularnych ze strukturami amyloidowymi.

Bardzo wysoką rangę osiągnięć naukowych zawartych w rozprawie doktorskiej potwierdza fakt równoległego ogłoszenia uzyskanych wyników w 6 artykułach opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki