

Wrocław, 16.12.2023

prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Wrocławski

**Ocena rozprawy doktorskiej**  
**mgr Jowity Nowakowskiej-Gołąckiej**  
**pt. „Rola białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu**  
**(APP)”**

Uzyskanie kontroli terapeutycznej na homeostazą białkową komórek pozostaje kluczowym do rozwiązania problemem na drodze do opracowania skutecznych terapii na zarówno rzadkie schorzenia o podłożu genetycznym jak i cywilizacyjnym. Jest to tym trudniejsze, że poza ilością i czasem życia białek w komórce, równie ważna jest ich właściwa lokalizacja oraz struktura funkcjonalna biologicznie uzyskana w procesie zwijania. Czynniki środowiskowe, jak i mutacje genetyczne mogą bowiem uniemożliwić białkom uzyskanie ich natywnej formy, i w konsekwencji skazywać takie dysfunkcyjne proteiny na degradację. Z uwagi na swoje przeznaczenie, białka błonowe i sekrecyjne dojrzewają i są zwijane w retikulum endoplazmatycznym (ER), by ewentualnie po akceptacji przez mechanizm kontroli tego organellum, ulegać dalszym modyfikacjom potranslacyjnym w aparacie Golgiego i trafić do swojej lokalizacji docelowej. Natomiast białka, którym nie udało się uzyskać poprawnej struktury w ER, są kierowane do degradacji w cytozolu za pośrednictwem systemu ERAD. System ERAD, poprzez usuwanie ze światła ER, źle zwiniętych łańcuchów peptydowych zapobiega ich agregacji i zapewnia ciągłość funkcji retikulum endoplazmatycznego. Stanowi on tym samym niezwykle ciekawy i jak pokazuje przykład obecnej skutecznej terapii na mukowiscydozę (gdzie chroni się źle zwinięty zmutowany CFTR przed ERAD'em), cel terapeutyczny. Należy jednak mieć na względzie, że zaadresowanie różnorodność funkcji jak i struktur białkowych procesowanych w ER, wymusza nie tylko dużą plastyczność, ale i również złożoność mechanizmów ERAD. Koniecznym jest więc dogłębne zrozumienie działania tej komponenty ER nie tylko w ujęciu ogólnym, ale również poszczególnych białek o określonej roli w patogenezie ludzkich schorzeń, jak wspomniany CFTR, czy kluczowy dla choroby Alzheimera, prekursor amyloidu (APP).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Jowity Nowakowskiej-Gołackiej wykonana pod kierunkiem dr hab. Moniki Słonimskiej Wojewódzkiej prof. Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej, stanowi cenny wkład do wiedzy dotyczącej tego ostatniego aspektu powyższej tematyki.

Rezultaty badań przedstawione w rozprawie doktorskiej miały bowiem za cel zrozumienie roli wybranych składowych ERAD, białek z rodziny EDEM, w procesach dojrzewania i degradacji APP.

Do recenzji przedłożono rozprawę doktorską liczącą 92 strony łącznie z wykazem piśmiennictwa współautorów. Przedstawiona praca zawiera wszystkie wymagane części i składa się z wstępu, celu pracy, omówienia kolejno materiałów, metod oraz uzyskanych wyników, podsumowania w formie syntetycznych wniosków jak i dyskusji.

**Wstęp** rozprawy obejmuje 19 stron a omawiany w tym rozdziale aktualny stan wiedzy dobrze ilustruje podjęty problem badawczy. Kandydatka rozpoczyna ten rozdział bardzo klasycznie, od ogólnego przedstawienia funkcji ER, zawężając stopniowo tematykę do procesów syntezy i dojrzewania białek w tym organellum. Konsekwentnie, omawia znaczenie mechanizmów kontroli jakości związania białek w ER aby podkreślić znaczenie systemu ERAD i omówić aktualny stan wiedzy odnośnie jego funkcji i składowych i substratów. Wstęp jest zwieńczony przybliżeniem biogenezy APP i odpowiednio roli ER i ERAD w tym procesie. Podsumowując, omawiany rozdział rzetelnie i syntetycznie a przede wszystkim logicznie przedstawia i porządkuje problematykę badawczą rozprawy. W opinii recenzenta Autorka sprostała trudnemu wyzwaniu doboru właściwych dla jej rozprawy informacji i przedstawieniu ich w sposób wyważony, co stanowi bardzo dobre wprowadzenie do wnikliwego omówienia opublikowanych badań. Również przegląd rozważnie dobranych 106ciu pozycji aktualnego piśmiennictwa, wskazuje na **bardzo dobre przygotowanie Doktorantki** i zrozumienie podjętej tematyki badawczej.

Konsekwencją tego ukierunkowanego przedstawienia problematyki badawczej jest określenie przez Kandydatkę głównego celu badań oraz szczegółowych zadań badawczych. Mimo że, jest to ogólnie przyjęta konwencja, to jednak taka konstrukcja tego rozdziału mylnie wskazuje na obserwacyjny charakter badań, podczas gdy zaproponowanie mechanistycznej hipotezy badawczej, podkreśliłoby wysoką wartość naukową i „elegancję” realizowanych założeń eksperymentalnych. *Korzystając z okazji prosilbym Kandydatkę o zdefiniowanie takiej hipotezy.*

Nie mam również większych zastrzeżeń do podsumowania metodyki. Jest to staranny zbiór protokołów umożliwiający replikację wyników. Z obowiązku recenzenta proszę jedynie o doprecyzowanie: 1. *Jak weryfikowano poprawność reakcji qPCR vide Tabela 4.* 2. *Jakie były przesłanki do wykorzystania GAPDH w charakterze kontroli odniesienia w przypadku tej metody a beta-aktyny w przypadku WB.*

Rozdział **wyniki** otwiera prezentacja dystrybucji endogennych form APP w komórkach HEK293 (*prosilbym tu o krótkie umocowanie tego modelu w kontekście schorzeń neurodegeneracyjnych*), oraz

ekspresji egzogenego APP<sub>695</sub> oraz APP<sub>751</sub> (Ryc. 7). Szczególnie w przypadku egzogenego APP<sub>751</sub>, białko akumuluje się głównie w formie niedojrzałej w ER. *Czy określano stosunek poszczególnych form, jak on się ma do ekspresji egzogennej?*

Następnie Kandydatka wprowadza do modelu egzogenne białka EDEM (Ryc. 8) i obserwuje w teście ELISA znaczący spadek endogenego na poziomie całkowitym APP. Następnie analogiczne pomiary wykonano w modelu egzogennych EDEM i APP<sub>695</sub> obserwując znacznie bardziej spektakularne efekty (Ryc. 9). *Nie wykazano czy wprowadzenie dwóch białek egzogennych nie prowadzi do obniżenia poziomu ich produkcji na skutek osiągnięcia maksymalnej wydolności ER dla syntezy i dojrzewania białek. Nie przedstawiono kontroli pozytywnej w postaci oceny zmian ekspresji innego kanonicznego substratu ERAD. Prosiłbym Kandydatkę o ustosunkowanie się do powyższych uwag.*

W kolejnych rozdziałach przedstawiono efekty nadekspresji EDEM na endogenne APP oraz analogiczne wyniki dla egzogennych izoform APP, wykazując, że zwiększenie ilości białek z rodziny EDEM prowadzi najczęściej do obniżenia ilości zarówno dojrzałego jak i niedojrzałego APP. O ile spodziewać się można redukcji na drodze ERAD formy niedojrzałej, *to prosiłbym o komentarz odnośnie do obniżonego poziomu dojrzałego APP.*

Kandydatka testuje bowiem dalej hipotezę, że za degradację APP odpowiada oś ERAD proteasom. Wykorzystuje w tym celu inhibitor proteasomu epoksomycynę. *Czemu na rycinach 16-21 nie przedstawiono kontroli nie traktowanej tym związkiem?* Epoksomycyna prowadzi do deregulacji homeostazy ER (stres ER, co jest dyskutowane przez Kandydatkę), *jakie eksperymenty należy przeprowadzić mając na względzie ten efekt epoksymycyny aby wnioski były w pełni uzasadnione?*

Kanonicznie, Kadydatka w dalszej części pracy podejmuje się wyciszenia ekspresji endogennych EDEM i i obserwuje akumulację APP<sub>751</sub>. Czy wyciszenie EDEM prowadziło do aktywacji UPR? Czy badano wpływ wyciszenia na inne substraty ERAD?

Na pochwałę zasługują wyniki trudnych technicznie eksperymentów przedstawionych na Ryc. 26 i 27, gdzie widać wpływ EDEM1 i EDEM2 na translokację APP<sub>695</sub> z ER do cytozolu, oraz wyniki przedstawione na rycinach 31 i 32, gdzie wykazano analogiczne efekty na wydzielane A $\beta$ .

Na koniec chciałbym zapytać kandydatkę jakich wyników spodziewałaby się, gdyby zamiast epoksomycyny użyła odpowiednio tunikamycyny oraz beferdyny A? . Prosiłbym również o doprecyzowanie wnioskowanego znaczenia terapeutycznego prezentowanych wyników.

Jednocześnie pragnę podkreślić, iż bardzo wysoko oceniam zarówno warsztat, nakład pracy jak i przygotowanie doktorantki. Wyniki mają bardzo dużą wartość naukową i potencjalnie medyczną. Moje pytania wynikają nie z braków w pracy, a powodowanego jej wysokim poziomem merytorycznym dążenia do lepszego zrozumienia prezentowanych wyników. **Należy podkreślić bardzo dojrzałą**

**dyskusję**, jaką Kandydatka przedstawiła uzasadniając swoją interpretację wyników eksperymentalnych i wskazując na istotne czynniki wpływające na końcowe efekty prowadzonych badań. Dyskusja jest krytyczna nie nadinterpretowała znaczenia poszczególnych obserwacji, rzeczowo i konsekwentnie przedstawia przyjętą linię rozumowania.

Rozprawa Pani Jowity Nowakowskiej-Gołackiej świadczy jednoznacznie o jej **samodzielności, bogatym warsztacie badawczym, ogromie zaangażowania i ciężkiej pracy eksperymentalnej, a co najważniejsze dojrzałości naukowej.**

Rozprawa Jowity Nowakowskiej-Gołackiej spełnia więc wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i znakomicie dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy.

#### **Wnioski końcowe**

Recenzowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko z uwagi na unikalny warsztat badawczy, duże walory naukowe i społeczne uzyskanych wyników i **wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o jej wyróżnienie,**

**W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w Art. 13 obowiązującej ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późn. zm.) , w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz.1669 z późn. Zm.).**

**Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Jowity Nowakowskiej-Gołackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Wrocław, 16.12.2023

RB<sub>4</sub>