

Gdańsk, dnia 4.01.2024 roku

Prof. dr hab. Monika Sakowicz-Burkiewicz
Zakład Medycyny Molekularnej
Katedra Biochemii Klinicznej, Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7, bud. 27, 80-211 Gdańsk
tel. 58 349-27-59
e-mail: monika.sakowicz-burkiewicz@gumed.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. JOWITY NOWAKOWSKIEJ-GOŁACKIEJ

pt.: "Rola białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu (APP)"

Choroba Alzheimerera (AD) jest nieodwracalną i najczęściej występującą chorobą otępienną, charakteryzującą się stopniowym pogorszeniem pamięci i zdolności psychomotorycznych. Na całym świecie prawie 50 milionów ludzi, głównie w wieku 65 lat i starszych, może doświadczyć demencji spowodowanej przez chorobę Alzheimerera. Ponadto szacuje się, że w roku 2050 liczba chorych może wzrosnąć nawet trzykrotnie. Ze względu na wzrost w populacji osób w podeszłym wieku wzrasta liczba chorych na to schorzenie neurodegeneracyjne, co jest bardzo istotnym problemem zdrowia publicznego. Wiedza na temat mechanizmów prowadzących do zmian neurodegeneracyjnych w chorobie Alzheimerera, mimo stale dokonującego się postępu w badaniach naukowych, jest niestety nadal niekompletna.

Jedną z cząsteczek, które w głównej mierze przyczyniają się do inicjacji procesów neurodegeneracyjnych, jest beta-amyloid. Powstaje on z białka prekursorowego amyloidu (APP, ang. amyloid precursor protein), które może okazać się celem w nowoczesnej terapii. APP jest obecne we wszystkich komórkach organizmu w stężeniu pikomolarnym, ale jego funkcje nadal są przedmiotem intensywnych badań, co najlepiej oddaje jego druga nazwa „the All Purpose Protein” tj. białko do wszystkich celów. APP to transmembranowa proteina typu I o masie 120 kDa i o stosunkowo dużej, konserwatywnej domenie zewnątrzkomórkowej i krótkim odcinku cytoplazmatycznym. Białko to występuje w kilku izoformach, powstających w wyniku alternatywnego składowania 18 eksonów, z których jest zbudowany krótki gen *APP*, zlokalizowany na chromosomie 21 u człowieka. Izofornie te różnią się liczbą aminokwasów budujących APP i budową cząsteczki białka. Trzy najczęściej występujące izofornie APP to: APP₇₇₀, APP₇₅₁ i najliczniejsza w neuronach, postać APP₆₉₅. W neuronach APP obecne jest we wszystkich strukturach komórki, łącznie z jądrem komórkowym. Izofornie APP ulegają ekspresji także w innych komórkach organizmu, np. w komórkach serca, śledziony, nerek czy mięśni szkieletowych. APP ulega N-glikozylacji w retikulum endoplazmatycznym (ER), a następnie dojrzewaniu w aparacie Golgiego, gdzie jest modyfikowane potranslacyjnie. APP,

ale także jego produkty degradacji mogą ulegać retrotranslokacji z ER do cytozolu w procesie ERAD, który polega na rozpoznawaniu oraz kierowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek do cytozolu, gdzie poddane są degradacji proteasomalnej. W procesie ERAD biorą udział lektyny z rodziny EDEM. Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych peptydowych produktów degradacji APP w komórkach mózgowych pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera indukuje stres retikularny, w wyniku którego dochodzi do hiperfosforylacji białka Tau i dysfunkcji mitochondriów, co uważane jest za jeden z głównych patomechanizmów tej choroby neurodegeneracyjnej.

W ten nurt badań wpisuje się rozprawa doktorska mgr. Jowity Nowakowskiej-Gołackiej prezentująca wyniki badań *in vitro* nad wpływem zwiększonej ekspresji genów kodujących białka z rodziny EDEM na metabolizm białka prekursorowego amyloidu. Doktorantka swoje badania prowadziła na modelach komórkowych, z wykorzystaniem nieneuronalnej linii komórkowej HEK293 i neuronalnej linii komórkowej SH-SY5Y z nadekspresją lub supresją genów kodujących białka z rodziny EDEM i nadekspresją genu kodującego izoformę APP₆₉₅.

Praca zrealizowana została w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Moniki Słomińskiej-Wojewódzkiej, prof. UG.

Temat wybrany przez doktorantkę uważam za aktualny, ważny poznawczo i istotny praktycznie. Dokładne poznanie mechanizmów regulujących ilość APP i jego produktów degradacji w komórkach oraz usuwania agregatów białkowych tworzonych przez beta-amyloid może mieć istotne znaczenie dla opracowania skutecznych metod leczenia chorób neurodegeneracyjnych.

Cel rozprawy doktorskiej - ocena roli białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu w modelu komórkowym z wykorzystaniem nieneuronalnej linii komórkowej HEK293 z nadekspresją lub supresją genów kodujących białka EDEM1, EDEM2 i EDEM3 jest ambitny, a wyniki uzyskane mają znaczną wartość poznawczą dla mechanizmów regulujących ilość białka APP w komórkach.

Przestawiona do oceny praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich i zawarta jest na 92 stronach podzielonych na następujące rozdziały: streszczenie zarówno w języku polskim, jak i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, podsumowanie, dyskusja i wykaz piśmiennictwa. Całość poprzedza informacja o źródle finansowania badań z projektu NCN pt.: „Mechanizmy kierowania białek do kanałów retikulum endoplazmatycznego podczas procesu degradacji polipeptydów związanego z błonami śródkomórkowymi (ERAD)” - 2015/19/B/NZ3/03266; Kierownik projektu: dr hab. Monika Słomińska-Wojewódzka. Jako recenzentowi brakuje mi wykazu używanych skrótów.

Praca rozpoczyna się od streszczenia, co wprowadza w tematykę podjętych badań. Streszczenie jest napisane poprawnym językiem naukowym. We „Wstępie” autorka w pierwszych podrozdziałach przedstawia w sposób zwięzły i klarowny budowę i funkcje retikulum endoplazmatycznego, dokładnie charakteryzuje białka z rodziny EDEM, interakcje tych białek z białkami biorącymi udział w procesie ERAD oraz wybrane substraty procesu ERAD rozpoznawane przez białka z rodziny EDEM. Doktorantka w kolejnych podrozdziałach

wstępu przedstawia aktualny stan wiedzy na temat białka prekursorowego amyloidu oraz jego transportu i obróbki proteolitycznej w komórce. W ostatnim podrozdziale wstępu podkreśla istotną rolę ER w metabolizmie APP zarówno na jego wczesnych etapach dojrzewania, jak i w regulacji jego ilości poprzez degradację proteasomalną.

Celem podjętych przez Doktorantkę badań było ustalenie roli białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu za pomocą:

1. oceny wpływu nadekspresji genów *EDEMI*, *EDEM2* i *EDEM3* w modelu komórkowym HEK293 bez i z nadekspresją izoformy APP₆₉₅ na ilość białka APP oraz jego degradację proteasomalną
2. oceny wpływu supresji genów *EDEMI*, *EDEM2* i *EDEM3* w modelu komórkowym nieneuronalnym HEK293, jaki i neuronalnym SH-SY5Y na ilość endogennego białka APP
3. oceny kolokalizacji białek z rodziny EDEM z białkiem APP i ich roli w transporcie APP z ER do cytozolu
4. oceny wpływu nadekspresji genów *EDEMI*, *EDEM2* i *EDEM3* na wydzielanie beta-amyloidu przez komórki HEK293.

Proszę, żeby Doktorantka wyjaśniała, dlaczego w modelu komórkowym HEK293 z nadprodukcją egzogenego APP wybrała izoformę APP₆₉₅ oraz które izoformy APP są najbardziej amyloidegenne?

Kolejny rozdział zawiera szczegółowy wykaz wraz z opisem materiałów oraz aparatury i programów komputerowych wykorzystanych w pracy badawczej. W rozdziale metody autorka szczegółowo opisuje metody badawcze wykorzystane w pracy.

W następnym rozdziale Doktorantka przedstawia zwięźle i poprawnie wyniki swoich badań w 10 podrozdziałach. Część wyników prezentowanych w tym rozdziale mgr Jowita Nowakowska-Gołacka wraz ze współautarami opublikowała w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Molecular Sciences* - Nowakowska-Gołacka, J., Czapiewska, J., Sominka, H., Sowa-Rogozińska, N., Słomińska-Wojewódzka, M., 2021. EDEM1 Regulates Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolism and Amyloid- β Production. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 117.

Doktorantka w opisie wyników przedstawia reprezentatywne zdjęcia analizy Western blot obrazujące wpływ nadekspresji genów *EDEMI*, *EDEM2* i *EDEM3* na obniżenie ilości endogennych i egzogennych form białka APP w komórkach HEK293. Ciekawi mnie całkowity brak prążka odpowiadającego białku EDEM1, 2 i 3 w lizatach komórek bez nadekspresji genów *EDEMI*, *EDEM2* i *EDEM3* oznaczonych jako kontrola - rycina 10a, 11b, 12a, 13a, 14a i 15a. Czy rzeczywiście geny kodujące białka z rodziny EDEM nie ulegają ekspresji w komórkach HEK293, czy może wynika to z zastosowanej metody detekcji białek?. Proszę doktorantkę o komentarz.

Natomiast na rycinie 13c wdarł się chyba błąd i zamiast „ndAPP₆₉₅ i dAPP₇₅₁ powinno być dAPP₆₉₅ i ndAPP₇₅₁ – proszę o wyjaśnienie tej kwestii opisu wykresu.

Ponadto reprezentatywne zdjęcie wykonane z użyciem mikroskopii konfokalnej obrazujące kolokalizację białka EDEM1 lub 3 z białkiem APP₆₉₅ w komórkach HEK293 (rycina 28) według mnie nie odzwierciedla wartości kolokalizacji (0,87 i 0,75) opisanych w rozdziale 7.9. Chciałabym usłyszeć komentarz Autorki do tego wyniku.

Wyniki badań Doktorantki i współautorów potwierdziły istotną rolę białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu oraz produkcji beta-amyloidu. Zwiększona ekspresji genów kodujących białka EDEM1-3 znacząco obniża ilość endogennych i egzogennych form białka APP w modelu komórkowym HEK293, natomiast supresja tych genów znosi ten efekt zarówno w modelu komórkowym z wykorzystaniem nieneuronalnej linii komórkowej HEK293, jak i neuronalnej linii komórkowej SH-SY5Y. Doktorantka wykazała również zaangażowanie białek EDEM1 i EDEM3 w procesie retrotranslokacji izoformy APP₆₉₅ z ER do cytozolu. Dodatkowo zwiększona ekspresja genów kodujących białka EDEM1 i EDEM3 obniża sekrecję beta-amyloidu przez komórki HEK293. Ponadto otrzymane wyniki wskazują na kluczową rolę białek z rodziny EDEM w degradacji proteasomalnej APP. Wyniki zaprezentowane w pracy ukazały kolejne elementy, które mogą modyfikować mechanizmy leżące u podłoża choroby Alzheimerera. A selektywna nadekspresja genów kodujących białka EDEM1 i EDEM3 może mieć znaczenie dla opracowania skutecznych metod leczenia tej choroby neurodegeneracyjnej.

Wyniki badań zostały poddane szerokiej dyskusji w kolejnym rozdziale, będącej podstawą do postawienia ostatecznych wniosków.

Piśmiennictwo w pracy obejmuje 107 pozycji literaturowych zestawionych zgodnie z kolejnością alfabetyczną, ponadto około 20% stanowią pozycje literaturowe opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat.

Dodatkowo opublikowanie przez Doktorantkę części swoich wyników w czasopiśmie anglojęzycznym z listy filadelfijskiej o IF 6,208 (Doktorantka jest pierwszym autorem) jest efektywnym dowodem przygotowania mgr. Jowity Nowakowskiej-Gołackiej do dalszej samodzielnej pracy naukowej, jak również pozwala wierzyć w dynamiczny Jej rozwój naukowy. Opublikowanie wyników swoich badań eksperymentalnych wymaga przejścia przez wszystkie etapy związane z pracą naukową: stworzenie koncepcji pracy, wykonanie części doświadczalnej i laboratoryjnej, opracowanie i interpretacja wyników, napisanie i przygotowanie manuskryptu do druku, jak również ustosunkowanie się do uwag recenzentów, umiejętność współpracy z innymi badaczami (współautorstwo).

Niestety z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych, nieścisłości merytorycznych i nomenklaturowych w tekście rozprawy. Na przykład, Doktorantka napisała:

- „tworzenie mostków dwusiarczkowych” str. 5, a powinno być tworzenie mostków disiarczkowych według obowiązującej nomenklatury chemicznej;
- „mostkiem dwusiarczowym” str. 15, a powinno być mostkiem disiarczkowym;

- „UDP glukozoglikoproteinoglikozylotransferazę 1 (ang. UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase 1, UGGT1), a powinno być UDP glukozoglikoproteinoglikozylotransferazę 1;

- nazw ludzkich genów (str. 30) małymi literami: „*edem1, edem2, edem3*”, a powinno być *EDEMI* i tak dalej;

- „epoxymycyną” str. 59, a powinno być epoksymycyną.

Wkradły się też błędy edytorskie: brak spacji między wyrazami. Na przykład: str. 17, 34, 78, 82.

Jednakże, nie wpływają one na ogólny poziom naukowy pracy.

Na koniec pragnę podkreślić, że ogólna koncepcja rozprawy doktorskiej mgr. Jowity Nowakowskiej-Gołackiej jest dobrze przemyślana, bardzo logiczna i spójna. Cel badawczy został poprawnie sformułowany. Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat eksperymentalny, umiejętność analizy uzyskanych wyników oraz częściowa ich publikacja w czasopiśmie naukowym. Uważam, że Doktorantka osiągnęła stawiane sobie cele. Wyniki badań eksperymentalnych pozwoliły na wyciągnięcie wniosku sugerującego istotną rolę białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu APP i produkcji beta-amyloidu w komórkach w badaniach *in vitro*.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. JOWITY NOWAKOWSKIEJ-GOŁACKIEJ pt.: ”Rola białek z rodziny EDEM w regulacji metabolizmu białka prekursorowego amyloidu (APP)” spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 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.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. JOWITY NOWAKOWSKIEJ-GOŁACKIEJ do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę szeroki zakres metod badawczych, wartość naukową otrzymanych wyników oraz fakt, iż zostały one już częściowo opublikowane, wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Jowity Nowakowskiej-Gołackiej.



Monika Sakowicz-Burkiewicz