

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 10.06.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Barzowskiej

pt. „Novel approaches for diabetes management by inhibition of DYRK1A kinase”

wykonanej w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem
prof. dr hab. Grzegorza Dubina, oraz promotora pomocniczego dr Anny Czarnej

Cukrzyca jest jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych współczesnych czasów. Dotyka miliony ludzi na całym świecie, a niepokojące statystyki pokazują, że w przyszłości liczba chorych będzie stale rosła. Praktycznie każdy z nas zna kogoś, kto zmagają się z cukrzycą, a większość z nas w starszym wieku może osobiście doświadczyć tego problemu. Ten alarmujący wzrost zachorowań wynika ze współczesnego stylu życia, który charakteryzuje się brakiem aktywności fizycznej, niezdrową dietą i stresem. Cukrzyca nie tylko wpływa na jakość życia chorych, ale również stanowi ogromne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej na całym świecie. Leczenie cukrzycy i jej powikłań, takich jak choroby serca, nerek czy uszkodzenia nerwów, generuje ogromne koszty, które rosną wraz z liczbą pacjentów. Tak poważny problem społeczny prowadzi do wzmożonych badań naukowych poświęconych znalezieniu leku lub terapii, które mogą odwrócić ten zatrważający trend. Dziś możemy znajdować się w podobnej sytuacji, jak 40 lat temu, kiedy świat zmagał się z rozprzestrzeniającym się wirusem HIV. Dziś istnieją doskonałe leki hamujące rozwój tego wirusa. Podobnie, w przypadku cukrzycy, możliwe jest, że dzięki wysiłkom naukowców, takich jak mgr Agata Barzowska, uda się znaleźć skuteczne rozwiązanie tego problemu. Należy jednak pamiętać, że leczenie farmakologiczne to rozwiązanie ostateczne. Jako naukowcy powinniśmy promować zdrowy tryb życia, zdrową dietę, bezstresowy tryb życia oraz regularne badania profilaktyczne.

Recenzowana rozprawa doktorska posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 174. strony maszynopisu i podzielona jest na 7 głównych rozdziałów (tj. Streszczenie, Przegląd literatury, Cele i założenia badawcze, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski i perspektywy na przyszłość, Literatura). Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy. Na początku pracy znajduje

się również lista publikacji Doktorantki oraz lista grantów w ramach których praca doktorska była realizowana. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków, schematów, wykresów oraz świetnej jakości zdjęć komórek i organoidów, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Spis piśmiennictwa obejmuje aż 348 pozycji literaturowych a zdecydowana większość z nich to odniesienia do najnowszych publikacji, co świadczy o tym, że podjęty przez Doktorantkę temat pracy doktorskiej jest nowatorski oraz cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem. Praca doktorska napisana jest w języku angielskim, w sposób poprawny i przystępny a pod względem edycyjnym została przygotowana bardzo starannie. W pracy znalazłam jedynie drobne niedociągnięcia edycyjne, ale nie miały one wpływu na pełne zrozumienie treści rozprawy.

Szczególną uwagę należy zwrócić na podziękowania skierowane do współpracowników i rodziców. Wyróżnia się bardzo dobrze wybrane motto, będące cytatem Disneya, które sugeruje, że osiągnięcie nawet najbardziej ambitnych celów jest możliwe, jeśli tylko jesteśmy gotowi podjąć wyzwanie i pracować nad ich realizacją. W kontekście pracy doktorskiej odczytałam je jako wyraz determinacji i pracowitości Kandydatki, która mimo trudności i przeszkód zdołała wykonać zaplanowane prace laboratoryjne i napisać rozprawę.

Rozdział pierwszy, zatytułowany „Streszczenie” to kilkustronicowy, zwięzły opis uzyskanych wyników. W rozdziale drugim pt. „Przegląd literaturowy”, mgr Barzowska wprowadziła czytelnika w problem cukrzycy. Uważam, że jest to doskonały przegląd literaturowy pokazujący podstawy molekularne prowadzące do powstawania tej choroby. Kandydatka opisała również terapie farmakologiczne stosowane obecnie u chorych na cukrzycę. Szkoda że zabrakło informacji o terapiach komórkowych jakie istnieją w zakresie nowoczesnych terapii. Tym bardziej, że w opracowaniu tego typu terapii duże zasługi ma zespół z Polski. Rozdział przeglądu literatury zawiera również opis aktualnego stanu wiedzy na temat roli kinazy DYRK1A w regulacji komórek β . Omówiono również wcześniejsze badania nad różnymi inhibitorami DYRK1A, w tym inhibitora o nazwie harmine, oraz jego potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Przegląd literaturowy pokazuje, że białko DYRK1A (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase A) odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy insuliny i przeżywalności komórek β , co czyni go atrakcyjnym celem dla nowych terapii przeciwcukrzycowych. Należy podkreślić, że materiał zawarty w części literaturowej jest poparty bogatą literaturą naukową. Pokazuje również doskonałe przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie molekularnych podstaw cukrzycy.

Celem badawczym recenzowanej pracy było **przeprowadzenie badań prowadzących do odkrycia nowych, bardziej efektywnych metod leczenia cukrzycy poprzez poprawę funkcji i zwiększenie ilości komórek β w trzustce**. W tym celu Doktorantka postanowiła zbadać wpływ nowych inhibitorów DYRK1A oraz ich formulację na proliferację i funkcjonowanie komórek β trzustki w różnych modelach badawczych, w tym w komórkach INS-1E i MIN6, izolowanych wysepkach mysich oraz organoidach trzustkowych pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek

macierzystych (hiPSC). Badania miały również na celu ocenę bioaktywności i potencjalnych zastosowań terapeutycznych tych związków w leczeniu cukrzycy. Dodatkowym celem pracy było określenie roli białka SPOP w degradacji PDX1 oraz na możliwości zastosowania inhibitorów SPOP w celu poprawy kondycji komórek β i homeostazy glukozy.

Następny rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Materiały i metody”, został podzielony przez Doktorantkę na kilkanaście podrozdziałów dotyczących metod i technik badawczych stosowanych w szeroko pojętej biologii molekularnej. Mam jedno pytanie dotyczące tego rozdziału: Doktorantka otrzymała inhibitory od prof. Nathanaela Grey z Dana-Farber Cancer Institute w Bostonie, MA, USA. Kto zaprojektował te związki? Czy prof. Grey je zsyntezował, czy również zaprojektował? Nie było to dla mnie jasne. Zastosowane przez Kandydatkę metody i techniki, opisane w tym rozdziale, zostały świetnie dobrane do przeprowadzenia zaplanowanych badań nad inhibitorami kinazy DYRK1A oraz modelami organoidów trzustkowych w kontekście leczenia cukrzycy. Ilość zastosowanych technik badawczych, a tym samym doświadczenie zdobyte przez Doktorantkę, jest imponujące. Z pewnością wiązało się to z nowymi wyzwaniami oraz dużą ilością czasu poświęconego na naukę tych technik.

Kolejny podrozdział zatytułowany „Wyniki i dyskusja” Doktorantka podzieliła na cztery główne podrozdziały. W pierwszym z nich (4.1) opisała badania nad inhibitorami kinazy DYRK1A i ich wpływem na przeżycie komórek β oraz homeostazę insuliny. Badania te koncentrują się na ocenie efektywności różnych inhibitorów w promowaniu proliferacji komórek β i poprawne wydzielania insuliny. W wyniku realizacji tej części badań okazało się, że o nowe inhibitory wykazują lepsze efekty niż harmine. Inhibitory te mogą również rekrutować inne czynniki, które promują proliferację komórek β , co podkreśla znaczenie kinomu diabetologicznego jako potencjalnego celu terapeutycznego. Inhibitory DYRK1A wykazują również wpływ na inne kinazy, takie jak GSK3, które są kluczowe dla sygnalizacji insuliny i replikacji komórek β . W tej części pracy zauważyłam jedynie, że mgr Barzowska pisząc o inhibitorach TGF- β ma prawdopodobnie na myśli inhibitory ścieżki sygnałowej TGF- β a nie ligandy wiążące się do TGF- β . Czy Kandydatka mogłaby się pokusić o ograniczoną analizę SAR dla przebadanych związków (korelacja budowy chemicznej inhibitora względem aktywności biologicznej). Czy znana jest struktura 3D kompleksów DYRK1A-inhibitor?

Następny podrozdział (4.2) rozprawy doktorskiej p. Agaty Barzowskiej opisuje badania nad leucetynami, inhibitorami kinazy DYRK1A, oraz inhibitorami sygnalizacji TGF- β , które wspólnie stymulują produkcję insuliny w komórkach β , organoidach i izolowanych wysepkach trzustkowych myszy. Badania te miały na celu ocenę skuteczności tych związków w poprawie funkcji komórek β oraz ich potencjału w leczeniu cukrzycy. Uzyskane wyniki sugerują, że leucetyny, szczególnie w połączeniu z inhibitorami sygnalizacji TGF- β , mogą mieć znaczący potencjał terapeutyczny w leczeniu cukrzycy poprzez stymulowanie proliferacji komórek β i poprawę ich funkcji. Badania te

dostarczyły ważnych dowodów na to, że inhibicja DYRK1A może być skuteczną strategią w terapii regeneracyjnej komórek β .

Następny podrozdział (4.3) opisuje, w jaki sposób enkapsulacja inhibitorów DYRK1A może poprawić ich skuteczność w przywracaniu funkcji komórek β . Doktorantka prowadziła badania które koncentrują się na wykorzystaniu polimerów do ulepszania właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych tych inhibitorów. Doktorantka zastosowała kopolimery pluronowe, które są cząsteczkami surfaktantów składającymi się z dwóch segmentów hydrofilowych poli(tlenek etylenu) (PEO) oraz jednego segmentu hydrofobowego poli(tlenek propylenu) (PPO), zorganizowanych w strukturę trójczłonową PEO-PPO-PEO. Są one często stosowane jako nośnik i prowadzą do zwiększonej biodostępności, przedłużonego czasu działania leku oraz jego celowanego dostarczenia do pożądaných komórek lub tkanek. Najważniejszym wynikiem też części pracy był fakt, że enkapsulacja inhibitorów DYRK1A w polimerowych nanocząstkach, znacząco poprawiła ich właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Co zdecydowało, że do badań wybrała Pani właśnie ten a nie inny nośnik? W tej formulacji, inhibitor AC27 wykazał zdolność do znacznej poprawy wydzielania insuliny indukowanego glukozą w organoidach komórek β pochodzących z iPSC oraz izolowanych wysepek trzustkowych myszy. Czy, oprócz badań komórkowych przeprowadzone były badania kinetyki uwalniania inhibitora z nośnika polimerowego oraz stabilności takiego układu w surowicy? Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi wynikami Doktorantki, że inhibicja DYRK1A indukuje proliferację ludzkich komórek β . Podsumowując, badania te wskazują na obiecujące możliwości zastosowania enkapsulacji inhibitorów DYRK1A w nanocząstkach jako strategii zwiększającej ich skuteczność w przywracaniu funkcji komórek β i poprawie homeostazy glukozy, co może mieć istotne znaczenie dla terapii cukrzycy. Czy istnieje możliwość modyfikacji składu nanocząstki w taki sposób, aby była bardziej selektywna wobec komórek β , co pozwoliłoby inhibitorom bardziej precyzyjnie celować w białko DYRK1A znajdujące się w trzustce? Czy badano potencjał związku AC27 w kontekście procesów regeneracyjnych komórek nerwowych, które uczestniczą w rozwoju tzw. cukrzycy typu 3? Czy byłoby to zasadne? Może związek AC27 mógłby pomóc osobom cierpiącym na demencję? Nawiązując do cukrzycy typu 3 i informacji zawartych we wstępie literaturowym, czy można jednoznacznie określić, czy peptydy A β wywołują cukrzycę, czy też cukrzyca prowadzi do odkładania się fibryli A β w chorobie Alzheimera? To przypomina klasyczne pytanie „co było pierwsze: jajko czy kura?”, ale być może istnieją jakieś badania na ten temat?

Ostatni podrozdział (4.4) dotyczył badania pętli homeostazy SPOP-PDX1 jako nowego celu terapeutycznego w leczeniu cukrzycy. PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym do przetrwania komórek β i produkcji insuliny. Badania Doktorantki skupiały się na roli białka SPOP (Speckled POZ Protein) w degradacji PDX1 oraz na możliwości zastosowania inhibitorów SPOP w celu poprawy kondycji komórek β i homeostazy glukozy. Pani Barzowska pokazała, że PDX1 jest niezbędny do różnicowania komórek β i kontroli transkrypcji proinsuliny oraz innych genów związanych z detekcją glukozy i metabolizmem. Myszy

heterozygotyczne dla PDX1+/- wykazały zwiększoną apoptozę komórek β , postępującą nietolerancję glukozy i defekty w wydzielaniu insuliny stymulowanej glukozą. Ten wynik dowodzi, że inhibitory SPOP mają potencjał terapeutyczny do poprawy funkcjonowania komórek β poprzez zapobieganie degradacji PDX1. Wstępne wyniki wskazują na silne i korzystne efekty dotyczące wydzielania insuliny przy użyciu inhibitorów SPOP, które co najważniejsze nie są toksyczne dla komórek β . Wyniki tych badań mogą w przyszłości doprowadzić do opracowania nowych, bezpiecznych i efektywnych terapii przeciwcukrzycowych.

Lektura całego rozdziału „Wyniki i dyskusja” pokazuje bardzo dużą dojrzałość naukową Doktorantki, gdyż wszystkie uzyskane wyniki zostały gruntownie przedyskutowane w świetle dostępnych informacji. Szczególnie podobają mi się badania praktycznego wykorzystania enkapsulowanych inhibitorów DYRK1A w kontroli glikemii i regeneracji komórek β a tym samym w leczeniu cukrzycy. Ważne jest również to, że Kandydatka patrzy krytycznie na wyniki swoich badań i wie jaka ich część wymaga dalszej pracy oraz optymalizacji. Pani Agaty Barzowska opisała wyzwania i ograniczenia napotkane podczas realizacji badań i problemów póki co nierozwiązywalnych jak np. pomiar masy komórek β w ludzkim organizmie itd.

Ostatni rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Podsumowanie i plany na przyszłość” zawiera krótkie zestawienie uzyskanych wyników pracy doktorskiej oraz plany na przyszłe badania, które powinny koncentrować się na dalszej optymalizacji struktury inhibitorów (czy prowadzone są takie badania?) oraz ich ocenie w bardziej zaawansowanych modelach przedklinicznych i klinicznych. Doktorantka podkreśliła, że dalsze zrozumienie mechanizmów molekularnych związanych z działaniem inhibitorów DYRK1A może przyczynić się do odkrycia nowych celów terapeutycznych w leczeniu cukrzycy.

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Agata Barzowska jest współautorem czterech publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR wchodzących w tematykę jej rozprawy doktorskiej oraz pięciu publikacji spoza cyklu.

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle pogarszających się statystyk zachorowalności na cukrzycę oraz braku skutecznych leków. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki doskonale przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa doktorska magister Agaty Barzowskiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Praca doktorska zawiera ważne wnioski dotyczące roli białek DYRK1A oraz SPOP w regulacji procesów regeneracyjnych komórek β oraz, że inhibitory (w szczególności AC27 i leucetyna) tych białek posiadają bardzo duży potencjał terapeutyczny. Doktorantka wskazuje także na potencjalne perspektywy dalszych badań, co jest istotne w kontekście przyszłych kierunków rozwoju terapii przeciwcukrzycowych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20

lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie magister Agaty Barzowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w uzyskanie nowych w skali światowej wyników badań, pokazujących nowe kierunki terapii przeciwcukrzycowych, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Sybirie Rodziewicz-Motowidło