



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Lipsk, 03/06/2021

Dr hab. Joanna Burger

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Ul Borowska 211, 50-556 Wrocław

Tel. 071 7840615

e-mail: joanna.burger@umed.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Doroty Dudek

**pt. „Oddziaływanie jonów cynku i miedzi z wybranymi peptydami
przeciwdrobnoustrojowymi”**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Dudek została wykonana w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. inż. Magdaleny Rowińskiej-Żyrek.

Doktorantka podejmuje się badania chemii koordynacyjnej grupy naturalnie występujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP - ang. *antimicrobial peptides*) oraz ich analogów wobec wybranych jonów metali. AMP to bardzo ciekawa, zróżnicowana grupa związków, które stanowią nieswoistą odpowiedź odpornościową organizmów żywych w walce z patogennymi drobnoustrojami. Wybór tematyki rozprawy jest niezwykle aktualny, wpisuje się w nurt badań będących odpowiedzią na ogromną potrzebę znalezienia alternatywy dla klasycznych antybiotyków, które ze względu na wykształcone przez drobnoustroje mechanizmy oporności, często prowadzą do punktu, kiedy medycyna jest bezsilna w leczeniu pacjentów, którzy są zakażeni wielolekoopornymi szczepami. Do badań Doktorantka wybrała z dostępnych w bazie *Antimicrobial Peptide Database* APD3 związki sklasyfikowane jako mające aktywność p/drobnoustrojową i jest to następujących jedenaście

peptydów; alloferon 1 i alloferon 2, kalcytermina oraz jej trzy mutanty (H9A, H11A i H13A), fragmenty semenogelin: Sg-15, SgI-29 i SgIIA oraz analogi amyliny ludzkiej: amyлина szczurza i pramlintyd. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe, mówiące o pozytywnym wpływie jonów metali na aktywność p/drobnoustrojową AMP, realizowaną na drodze mechanizmu odporności odżywczej lub/i zmianie właściwości fizykochemicznych peptydu po związaniu do jonu metalu, Doktorantka podejmuje się zbadania tegoż wpływu stosując jony Zn^{2+} i Cu^{2+} oraz stawia sobie za cel główny poznanie chemii bionieorganicznej badanych układów i ustalenie zależności między ich chemią koordynacyjną/strukturą a aktywnością biologiczną. To bardzo ambitny cel, biorąc pod uwagę złożoność układów i różnorodne sposoby uzyskiwania przez peptydy AMP aktywności p/drobnoustrojowej, której mechanizmy są nadal do końca nie poznane.

Rozprawa zawarta jest na 237 stronach maszynopisu, z czego 180 stron stanowi właściwą rozprawę, po której Doktorantka zamieściła notę dotyczącą podsumowania swojego dorobku naukowego oraz kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy. Praca ma klasyczny dla doktoratów o charakterze eksperymentalnym układ i składa się z następujących części: wstęp (poprzedzony wykazem skrótów i wprowadzeniem), cele pracy, opis eksperymentów, wyniki i dyskusja, podsumowanie i perspektywa rozwoju tematu, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz rysunków i tabel oraz bibliografia (205 cytowań).

Praca napisana jest bardzo dobrze, czyta się ją łatwo, następujące po sobie rozdziały i podrozdziały układają się w logiczną całość. Jest bardzo bogato ilustrowana (122 rysunki), szczególnie podobają mi się rysunki proponowanych struktur związków kompleksowych wykonane w programie PyMOL. Jasno widać znakomite przygotowanie Doktorantki zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym. Autorka metodycznie i skrupulatnie opracowała każdą część pracy, szczególnie wyniki i dyskusję. Nie mam wrażenia, że cokolwiek zostało pominięte lub przeoczone.

Rozprawę otwiera wstęp poświęcony peptydom p/drobnoustrojowym, ich występowaniu, mechanizmom działania, roli jonów metali w indukowaniu ich aktywności biologicznej oraz opis oporności, jaką drobnoustroje zdołały rozbudować wobec AMP. Autorka opisuje także wykorzystanie AMP w medycynie, które jest pokaźne, bo obejmuje dziesięć leków dopuszczonych do stosowania. Podoba mi się, że Autorka przedstawia omawianą grupę związków obiektywnie, dyskutuje bowiem także ich słabsze strony; tj. brak odporności na degradację enzymatyczną. Podaje również opisane w literaturze sposoby na próby zniwelowania tego zjawiska. To bardzo ciekawa część pracy, Doktorantka z dużą starannością wprowadza czytelnika w tematykę i daje rzetelny obraz aktualnej wiedzy na temat AMP, łatwo rozumieć motywację przyświecającą podjęciu badań, zorientować się skąd wynika dobór metod badawczych oraz jakie aspekty oddziaływań AMP mogą mieć znaczenie dla ich działania.

Rozprawa doktorska powstała w ramach projektu NCN SONATA BIS 7. 2017/26/E/ST5/00364 pt. „Oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowych peptydów z jonami metali - zrozumienie relacji między chemią koordynacyjną, strukturą, termodynamiką a sposobem działania”. Warto dodać, że Doktorantka oprócz realizacji wspomnianego projektu była zaangażowana w wykonywanie badań w ramach projektu Sonata NCN realizowanego w latach 2017-2020 przez dr hab. inż. Magdalенę Rowińską-Żyrek pt. „Zrozumienie oddziaływań cynku z cynkoforami i transporterami $Zn(II)$ w grzybowych patogenach”. Z kolei na swoje badania zdobyła finansowanie w ramach grantu naukowego dla młodych naukowców i uczestników studium doktoranckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, realizowanego w latach 2018-2019. Doktorantka

jawi się jako osoba bardzo pracowita. Przeprowadziła ogrom badań w ramach swojej rozprawy doktorskiej, opublikowała w renomowanych czasopismach wyniki, będąc pierwszym autorem czterech z pięciu prac wchodzących w skład rozprawy (a według dokumentacji dwie następne są w przygotowaniu), angażowała się czynnie w inną tematykę badawczą (jest współautorką aż siedmiu publikacji niezwiązanych tematycznie z rozprawą), wyjeżdżała na staże naukowe (w tym jeden dłuższy, 6-cio miesięczny), prezentowała wyniki na konferencjach. Dlatego tym bardziej na uznanie zasługuje przygotowanie obszernej, rzetelnie napisanej i prezentującej wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej.

Praca jest naturalnie ulokowana w dyscyplinie *nauki chemiczne*, ale zawiera również elementy *nauk farmaceutycznych* i *nauk biologicznych*. Badania Doktorantki, które wykonała na macierzystym Wydziale; tj. potencjometria, spektrometria mas oraz spektroskopie: NMR, UV-Vis i CD, są wspierane przez rezultaty uzyskane we współpracy z czterema świetnymi ośrodkami, co czyni rozprawę interdyscyplinarną. Wspomniane ośrodki to Wydział Biotechnologii, Chemii i Farmacji Uniwersytetu w Sienie (prof. Daniela Valensin), gdzie Doktorantka odbyła staż, Uniwersytet Nauki i Techniki Króla Abdullaha w Arabii Saudyjskiej (prof. Mariusz Jaremko), Pracownia Przesiewowych Testów Aktywności Biologicznej i Gromadzenia Materiału Biologicznego na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (dr Agnieszka Matera-Witkiewicz) oraz Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej (dr hab. Joanna Olesiak-Bańska). Dzięki tym współpracom uzyskano wyniki spektroskopii NMR badanych peptydów z jonami Cu^{2+} , potwierdzono lub wykluczono aktywność p/drobnoustrojową badanych ligandów i ich kompleksów z jonami metali poprzez wyznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego MIC oraz minimalnego stężenia bakterio- lub grzybobójczego MBC/MFC oraz wykorzystano mikroskopię sił atomowych do badania zjawiska agregacji pochodnych amyliny. W mojej ocenie to wzorowe podejście do próby rozwiązania złożonych problemów natury biologicznej, którym jedynie interdyscyplinarne spojrzenie daje szansę na rozwiązanie. Dzięki takiemu podejściu Doktorantka w pełni zrealizowała postawione sobie cele szczegółowe pracy.

Za najmocniejsze strony rozprawy doktorskiej uważam:

- Szczegółowe określenie właściwości koordynacyjnych badanych kompleksów za pomocą metod spektroskopowych (spektroskopii UV-Vis, CD oraz NMR). Na słowa uznania szczególnie zasługują badania 2DNMR z jonami metali dla peptydów zawierających wiele reszt histydylowych, których rozróżnienie spektroskopowe i przypisanie atomów donorowych nie należy do najłatwiejszych,
- Pomiar spektrometrii mas dla wszystkich analizowanych układów, które dla związków kompleksowych potrafią być skomplikowane i nieczytelne oraz wymagają odpowiedniego podejścia eksperymentalnego. Tutaj jawią się jako bardzo proste, ale tylko pozornie, wymagały bowiem sporego nakładu pracy, którą Doktorantka włożyła w skrupulatne zmierzenie badanych układów i jasną prezentację otrzymanych wyników,
- Badania agregacji pochodnych amyliny, które - podobnie jak badania biologiczne - wprowadzają do rozprawy element interdyscyplinarności i wiele wnoszą dla prób zrozumienia sposobu działania badanych peptydów AMP ukazując wybiórczą zdolność do fibrylacji. Jak sama Doktorantka pisze 'piękna' zależność pomiędzy chemią koordynacyjną, morfologią a sposobem działania jest rzeczywiście niezmiernie interesująca i stanowi w moich oczach znakomity punkt rozprawy. Związek kompleksowy Zn^{2+} -pramlinydyd jako jedyny z grupy

badanych amylin charakteryzuje się aktywnością p/drobnoustrojową i okazał się być także jedynym układem tworzącym fibryle, które formują się na skutek wymuszonego koordynacją jonu metalu konformacyjnego zgięcia peptydu, co może być bezpośrednim źródłem udowodnionej aktywności. Tym bardziej jest to przekonująca zależność struktura-aktywność, że dla jonów Cu^{2+} takie zjawisko strukturalne nie zostało zaobserwowane i te układy nie wykazywały także aktywności biologicznej,

- Analizę drugorzędowej struktury peptydów i ich kompleksów, szczególnie w kontekście wpływu tejże struktury na działanie p/drobnoustrojowe badanych związków (kalcytermina str. 93, amylin, str. 144),
- Określenie sposobu koordynacji alloferonów wobec jonów Zn^{2+} . Peptydy te różnią się jedynie jedną resztą aminokwasową, ale ponieważ jest to histydyna w pierwszej pozycji, warunkuje ona realizację wiązania metalu w inny sposób w warunkach pH fizjologicznego. W alloferonie 1 jest to wiązanie typu histaminowego (N-końcowa grupa aminowa oraz atomy azotów imidazolowych His-1, His-6 i His-9) a His-12 nie jest zaangażowana w pierwszą sferę koordynacyjną jonu metalu. Alloferon 2 z kolei koordynuje do jonów Zn^{2+} przez N-końcową grupę aminową i wszystkie trzy dostępne atomy azotów imidazolowych histydyn (His-4, His-7 i His-13).
- Wykazanie wysokiej aktywności p/bakteryjnej i p/grzybiczej kalcyterminy i jej mutantów, dla których dodatek jonów metali warunkuje lub znacząco wzmacnia działanie p/drobnoustrojowe. Na podstawie porównania sposobu koordynacji i stałych trwałości Doktorantka zasugerowała, że mechanizm działania kalcyterminy jest mechanizmem opartym na zmianach strukturalnych, które zachodzą po związaniu jonu metalu i stąd wynika pozytywny wpływ tychże jonów na jej działanie.

Według mnie rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Dudek prezentuje znakomity poziom naukowy, co zostało potwierdzone faktem opublikowania uzyskanych wyników w pięciu artykułach w bardzo dobrych czasopismach (cztery prace oryginalne i jedna typu *perspective*); tj. *Inorganic Chemistry* (1 artykuł, IF: 4,825), *Journal of Inorganic Biochemistry* (2 artykuły, IF: 3,212 i 3,063), *Dalton Transactions* (1 artykuł, IF: 4,174), *New Journal of Chemistry* (1 artykuł, IF: 3,069). Wyniki przeszły zatem już restrykcyjny proces oceny merytorycznej, dokonanej przez recenzentów poszczególnych artykułów. Tym niemniej w przedłożonej rozprawie Doktorantka nie ustrzegła się paru błędów czy raczej uchybień, które z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej. Kaliber tych uchybień jest bardzo mały w stosunku do ogromu pracy włożonej w przeprowadzenie prezentowanych badań oraz napisanie rozprawy i nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę dysertacji, co pragnę wyraźnie podkreślić.

- Sole nadchloranowe jonów Cu^{2+} i Zn^{2+} były zapewne solami uwodnionymi, a nie jak Doktorantka podaje bezwodnymi (str. 42). W publikacjach mamy już poprawną informację zatem w rozprawie jest to przeoczenie. Tym niemniej pracując z solami nadchloranów zawsze należy pamiętać o tym, że bezwodne sole są ekstremalnie niebezpieczne i należy o tym jednoznacznie wspominać, mając na uwadze fakt, że ktoś może zechcieć odtworzyć wiernie nasz eksperyment,
- W Tabeli 1 Doktorantka pisze o doustnym sposobie podawania wankomycyny, podczas gdy jest to antybiotyk podawany w praktyce jedynie dożylnie, ze względu na niską biodostępność po podaniu doustnym,

- Na str. 59 Autorka dyskutuje wykresy kompetycyjne kompleksów jonów Zn^{2+} z alloferonami pisząc o jednym kompleksie w całym zakresie pH, myślę, że chodziło jednak o zestaw form kompleksowych,
- Nie wiadomo do końca, w jakim elektrolicie były prowadzone badania potencjometryczne. W publikacjach mamy; KNO_3 (*IC* 2020, 59, 2527–2535), $NaNO_3$ (*JIB* 213, 2020, 111275), $NaClO_4$ (*Dalton Trans.*, 2019, 48, 13740–13752) i $KClO_4$ (*JIB* 174, 2017, 150–155), natomiast w rozprawie Doktorantka pisze na str. 43, iż ‘ligandy przygotowywano w (...) sile jonowej 100 mM ($KClO_4$)’. Ponadto, biorąc także pod uwagę niską rozpuszczalność $KClO_4$ w wodzie, zastanawiam się czy to na pewno nie jest jednak błąd.
Kolejna moja uwaga odnośnie miareczkowań potencjometrycznych dotyczy wyznaczenia stałych protonacji i stałych trwałości dla semenogelin. Przykładowo, Doktorantka wyznaczyła dla SgIIA 17 stałych protonacji (a dla układu Cu^{2+} -SgIIA 13 form kompleksowych). Jeżeli rozpatrzmy zakres pH 2.77-10.34 (dla stałych protonacji), to ile punktów pomiarowych przypada na jedną stałą? Należałoby się zastanowić, czy dla takich układów nie są jednak potrzebne miareczkowania większych objętości ligandów, bądź pomiary ze zmniejszoną kroplą. Być może tak właśnie były prowadzone te badania, ale nie znalazłam o tym informacji w części eksperymentalnej,
- Poprawne, i swoją drogą bardziej czytelne, jest pisanie o przesunięciach bato- i hipsochromowych podając obydwie wartości maksimum długości fal na widmach elektronowych, czyli ‘skąd-dokąd’ mamy przesunięcie, tak jak jest do podane na stronie 120, a nie tylko ‘dokąd’, jak na str. 118,
- Znalazłam kilka niefortunnych stwierdzeń; ‘wartości pH około fizjologicznej’ (str. 18), ‘cztery miejsca uległy już deprotonacji’ (str. 75), ‘na widmach przeprowadzonych w pH 7.4’ (str. 76), ‘w najbardziej zasadowych wartościach pH’ (str. 84); i literówek: ‘pozostałe deprotonację’ (str. 75).

Podsumowując, z całym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Dudek spełnia wymagania Ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 Poz. 595 z późniejszymi zmianami). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Doroty Dudek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych przez Doktorantkę badań, ich interdyscyplinarność oraz opublikowanie rezultatów (5 publikacji o łącznym IF 18,343, 9 doniesień konferencyjnych, w tym 4 prezentacji ustnych) mających w mojej ocenie duży wpływ na rozwój dyscypliny *nauki chemiczne*, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Joanna Burger