

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

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Dudek

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

**wykonanej w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego**

(promotor: dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek)

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) już dzisiaj ostrzega, że oporność przeciwdrobnoustrojowa jest jednym z największych zagrożeń dla globalnego zdrowia, bezpieczeństwa żywnościowego i rozwoju. Oporność przeciwdrobnoustrojowa może dotknąć każdego, w każdym wieku i w każdym kraju. Prowadzi ona do dłuższych pobyków w szpitalu, wyższych kosztów leczenia i zwiększonej śmiertelności. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych, skutecznych sposobów walki z opornymi drobnoustrojami. Wykształcają one coraz to nowe mechanizmy obronne, skutecznie „uciekając” przed dotychczas opracowanymi lekami. Dlatego ciągle przybywa drobnoustrojów opornych na działanie wszelkich antybiotyków. Szybkie tempo wzrostu oporności może doprowadzić do sytuacji, w której leczenie chorych będzie bardzo utrudnione, gdyż nie będzie skutecznych leków. W przyszłości może dojść do groźnych epidemii bakteryjnych czy wirusowych, wobec których medycyna będzie bezsilna, czego doskonałym przykładem jest obecnie panująca epidemia SARS-CoV2. Dlatego poszukuje się nowych metod walki z drobnoustrojami. Jedną z obiecujących klas związków są peptydy przeciwdrobnoustrojowe, na które przeważnie drobnoustroje nie wykazują oporności. Tą klasą związków zdecydowała się zająć mgr inż. Dorota Dudek. Postanowiła w swojej pracy sprawdzić działanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w obecności jonów metali Zn^{2+} i Cu^{2+} . Problem badawczy postawiony w jej pracy doktorskiej dotyczy oceny wpływu obecności tych jonów metali na zwiększoną lub zmniejszoną aktywność biologiczną w korelacji z właściwościami fizykochemicznymi kompleksów peptyd-jon metalu. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska odpowiada na obecne potrzeby ludzkości, co w mojej opinii w pełni uzasadnia celowość jej realizacji.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Magdaleny Rowińskiej-Żyrek na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w ramach projektu NCN SONATA BIS 7.

Całość rozprawy obejmuje 183 strony maszynopisu. Praca doktorska podzielona jest na 5 głównych rozdziałów (tj. wstęp, cel pracy, opis eksperymentów, wyniki i dyskusja oraz literatura). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów oraz krótkie wprowadzenie. Na końcu znajduje się rozdział podsumowujący i opisujący perspektywy rozwoju tematyki pracy doktorskiej a także spis rysunków i tabel, wykaz dorobku naukowego mgr inż. Dudek oraz 5 dołączonych publikacji naukowych współautorstwa Doktorantki, ściśle związanych tematycznie z jej rozprawą doktorską. Spis piśmiennictwa obejmuje 205 pozycji uwzględniających pełne dane bibliograficzne. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków oraz widm UV-Vis, MS, CD i NMR, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii. Praca jest bardzo estetyczna oraz jest napisana bardzo dobrą polszczyzną. Jedynie dwa następujące słowa budzą moje wątpliwości tj. str. 35 „Kalgranulina C jest ekspresjonowana” zamiast ulega ekspresji oraz „reszty histydylowe są uprotonowane” zamiast są sprotonowane. Moje wątpliwości budzi również nazywa grupy peptydów AMP - „protegriny” zamiast protegryny.

Na początku lektury pracy doktorskiej uwagę przyciągają podziękowania, które Doktorantka zamieściła na początku swojej dysertacji. Po ich lekturze, widać, że jest świadoma, iż jej praca powstała dzięki współpracy, pomocy, wsparciu innych ludzi oraz że praca w dobrej, dynamicznej i inspirującej atmosferze jest niezwykle ważna dla młodego naukowca a wartości te będzie pielęgnowała w przyszłości i zaszczerpi je swoim przyszłym współpracownikom.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Wstęp” Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP) i choć istnieje bardzo dużo opracowań na ten temat to rozdział ten przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Doktorantka postarała się ująć najświeższe informacje na temat klasyfikacji, mechanizmu działania, mechanizmy oporności przeciwdrobnoustrojowej wobec AMP oraz zastosowania ich w medycynie. Bardzo podoba mi się graficzne przedstawienie klasyfikacji AMP ze względu na różne parametry. Nieco rozbawiło mnie umieszczenie, w klasyfikacji AMP względem celu działania przeciwdrobnoustrojowego, działanie plemnikobójcze. To tak jakby plemniki były „niedobrymi” drobnoustrojami, które należałoby zwalczać. W rozdziale tym Doktorantka opisała również rolę jonów metali w aktywności przeciwdrobnoustrojowej do której należą np. tzw. odporność odżywcza czy zmiana właściwości fizykochemicznych peptydów i przez to wzmocnienie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W ostatniej części tego rozdziału znalazł się również szczegółowy opis czterech grup peptydów AMP, będących głównymi obiektami badawczymi Doktorantki. Należą do nich: alloferony, kalcyterminy, semenogeliny oraz amyliny.

W następnym rozdziale mgr inż. Dorota Dudek przedstawiła cel główny swojej pracy, którym było **zrozumienie chemii bionieorganicznej kompleksów Zn^{2+} i Cu^{2+} z wybranymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi oraz ocena wpływu obecności tych jonów na właściwości fizykochemiczne i biologiczne tych peptydów**. Wybrane przez Doktorantkę peptydy AMP zostały już wcześniej opisane w literaturze.

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Opis eksperymentów” i zawiera opis metod oraz procedur analitycznych stosowanych przez Doktorantkę. W mojej opinii

Pani mgr inż. Dudek zastosowała właściwe metody i procedury wymagane od chemika zajmującego się chemią bioorganiczną i analizą fizykochemiczną kompleksów peptyd-jon metalu. Wszystkie procedury dotyczące charakterystyki spektralnej (UV-Vis, CD, 1 i 2D NMR oraz MS), potencjometrycznej i mikroskopowej (AFM) badanych związków zostały szczegółowo opisane oraz nie budzą moich wątpliwości. W tej części rozdziału Doktorantka opisała również bardzo ogólnie metody stosowane podczas przeprowadzania badań biologicznych. Badania te zostały wykonane we współpracy z dr inż. Agnieszką Materą-Witkiewicz na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Ostatni rozdział dysertacji został zatytułowany „Wyniki i dyskusja”. Rozdział ten został przez Doktorantkę podzielony na cztery zasadnicze podrozdziały. Każdy z nich dotyczy innej grupy peptydów, opisanych wcześniej we Wstępie. W pierwszej grupie badanych związków znajdowały się dwa peptydy alloferon 1 i 2, w drugiej grupie kalcytermina oraz jej trzy analogi, w trzeciej grupie badanych związków znajdowały się trzy peptydy semenogelinowe a w ostatniej amylinu szczurza i jej analogi. Dla każdej grupy peptydów wykonane zostały podobne badania tj. (i) określenie stechiometrii kompleksów peptyd-jon metalu, (ii) wyznaczenie stałych protonacji ligandów, (iii) obliczenie stałych tworzenia kompleksów jonów Zn^{2+} i Cu^{2+} z peptydami, (iv) identyfikacja atomów donorowych biorących udział w wiązaniu jonu metalu w funkcji zmiany pH, (v) badania konformacyjne CD (jedynie dla kalcyterminu i amylinu) dla wolnych peptydów oraz w kompleksie z jodem metalu, (vi) badania obrazowe AFM dla fibryli utworzonych przez amyliny oraz (vii) badania mikrobiologiczne i cytotoksyczności wobec komórek ludzkich. Najważniejszym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę jest pokazanie, że najbardziej skutecznymi sposobami koordynacji jonów Zn^{2+} i Cu^{2+} są: (i) histaminowy sposób koordynacji, w którym udział bierze N-końcowa grupa aminowa oraz grupa imidazolowa pierwszej reszty histydylowej, (ii) koordynacja typu 4N przez wolną grupę aminową i 3 azoty imidazolowe oraz (iii) koordynacja 3N lub 4N przez znajdujące się w niektórych ligandach charakterystyczne motywy (HXXXH lub HXH...HH...HH). Ze wszystkich przebadanych układów peptyd-jon metalu najciekawsze wyniki badań biologicznych Doktorantka uzyskała dla kalcyterminu i jej analogów. Związki te swoje działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze osiągają najprawdopodobniej w wyniku lokalnej zmiany ładunku i/lub struktury. Bardzo interesujące okazały się również wyniki badań przeciwgrzybiczych dla kompleksu pramlintyd- Zn^{2+} . Doktorantka pokazała że najprawdopodobniej za właściwości przeciwgrzybicze odpowiedzialne są zmiany strukturalne peptydu, prowadzące do formowania się struktur fibrylarnych. Niestety nie udało się Doktorantce uzyskać niektórych wyników badań biologicznych zgodnych z wcześniej opisanymi w literaturze, co najprawdopodobniej wynikało z różnic metodologicznych pomiędzy badaniami.

Opisane eksperymenty, ich analiza i płynące z badań wnioski zostały już wcześniej poddane ocenie recenzentów w czasopiśmie w których zostały opublikowane. Stąd moja rola jako recenzenta jest znacznie ułatwiona. Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniam najważniejsze pytania oraz drobne uwagi dotyczące dysertacji:

1. Str. 58. Czy planowane są inne badania biologiczne dla alloferonu 1 i 2 w kompleksach z jonami metali np. przeciwnowotworowe czy przeciwwirusowe? W literaturze naukowej opisano szereg bardzo ciekawych właściwości biologicznych tych peptydów a uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazały brak aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Być może należałoby poszerzyć zakres badań biologicznych?
2. Czy dla badanych układów sprawdzana była stabilność peptydów i kompleksów peptyd-jon metalu w warunkach eksperymentu biologicznego? Być może niektóre peptydy ulegały degradacji w stosowanym medium i stąd nie był widoczny ich efekt biologiczny.
3. Str. 61. Proszę o wyjaśnienie czy nazwane w pracy doktorskiej peptydy: mutant H9A, H11A oraz H13A to naturalne mutanty białka z którego powstają kalcyterminy czy są to analogi kalcyterminy?
4. Str. 94. Dlaczego dla żadnego badanego układu nie określono wartości MBC/MFC?
5. Doktorantka identyfikowała atomy donorowe w wiązaniu jonu metalu w funkcji pH. Jak ten eksperyment odnosi się do warunków panujących podczas eksperymentu biologicznego? Jakie było pH medium ? Czy wzrost bakterii nie powodował zmian pH w środowisku a tym samym zmian w sposobie wiązania jonu metalu badanego peptydu?
6. Doktorantka napisała, że struktury fibrylarne, prawdopodobnie niszczą komórkę grzybiczą w sposób przypominający „nakłucie igłą”. Proszę o wyjaśnienia na czym polega to zjawisko? Według mojej wiedzy fibryle mogą tworzyć oligomery w błonie komórkowej, przypominające pory, przez które zawartość komórki może wpływać na zewnątrz. Natomiast dojrzałe fibryle peptydowe mogą ograniczać swobodny dostęp substancji odżywczych do komórki i prowadzić do jej obumarcia.
7. W pracy doktorskiej znaleźć można piękne struktury kompleksów peptyd-jon metalu. W jaki sposób zbudowane zostały takie kompleksy. Jak obliczona została struktura tych kompleksów?
8. Czy w literaturze znane są inne przykłady „antyfibrylarnego” działania jonów Cu^{2+} na inne peptydy/białka niż amyliny?
9. Jakiego rodzaju struktury wg Doktorantki mogą się kryć w „sferycznych oligomerach” widocznych na zdjęciach AFM pramlintydu?

Przytoczone uwagi krytyczne recenzowanej pracy doktorskiej nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wysokiej wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Dudek to bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Kandydatka wykazała się ponadto znajomością kilku różnorodnych technik eksperymentalnych, które z powodzeniem stosowała do pełnego zrozumienia badanych procesów. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w 5 publikacjach. Na opublikowany dorobek mgr inż. Doroty Dudek łącznie składa się 12 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR oraz 2 artykuły znajdujące się w recenzji. Jest to ponadprzeciętny dorobek publikacyjny jak na tak młodego adepta nauki.

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie. Reasumując,

uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr inż. Doroty Dudek zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr inż. Doroty Dudek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w prace nad badaniem wpływu jonów metali na strukturę wybranych peptydów AMP i ich właściwości biologiczne oraz doskonały dorobek publikacyjny (5 publikacji tematycznie związanych z rozprawą doktorską) zwracam się jednocześnie do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

