

Kielce, 10.08.2023

Dr hab. Michał Arabski, prof. UJK
Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Moniki Szadkowskiej

*Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach
pierwszorzędowych białek litycznych*

w celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Antybiotykooporność i ograniczenia skuteczności klasycznych terapii przeciwbakteryjnych stanowią globalny problem kliniczny. Obecnie rozważa się na różnym etapie badań zastosowanie nowych czynników bójczych wspomagających działanie antybiotyków czy też stanowiących dla nich alternatywę. Istotnym elementem tych poszukiwań jest ich potencjalna aplikacyjność i możliwość opracowania zdefiniowanych terapii przeciwbakteryjnych. Badania te wymagają prac interdyscyplinarnych o szerokim warsztacie metodycznym od analiz bioinformatycznych poprzez zastosowanie narzędzi biologii molekularnej po złożone badania z wykorzystaniem technik hodowlanych. Peptydy przeciwbakteryjne stanowią obiecujące narzędzie w eradykacji bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wywołujące trudne w leczeniu zakażenia za czym przemawia ich powszechność, możliwość oddziaływania ze składnikami błony komórkowej, wysoka aktywność bójcza krótkich sekwencji, co stwarza możliwości syntezy chemicznych oraz produkcji w różnych systemach ekspresyjnych oraz możliwość modyfikacji z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Moniki Szadkowskiej pt. *Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach pierwszorzędowych białek litycznych* w pełni wpisuje się w powyższą tematykę. Osiągnięcie naukowe Pani mgr M. Szadkowskiej wykonane pod opieką dr hab. Magdaleny Płotki, prof. UG w Katedra

Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego zostało częściowo opublikowane na łamach dwóch wysoko punktowanych czasopismach:

- Plotka M., Szadkowska M, Håkansson M, Kovačič R, Al-Karadaghi S, Walse B, Werbowy O, Kaczorowska AK and Kaczorowski T. Molecular characterization of a novel lytic enzyme LysC from *Clostridium intestinale* URNW and its antibacterial activity mediated by positively charged N-terminal extension. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(14), [https://10.3390/ijms21144894](https://doi.org/10.3390/ijms21144894) (IF = 6.208, 140 pkt MEiN)
- Szadkowska M, Olewniczak M, Kloska A., Jankowska E, Kapusta M, Rybak B, Wyrzykowski D, Zmudzinska W, Gieldon A, Kocot A, Kaczorowska AK, Nierzwicki L, Makowska J, Kaczorowski T, Plotka M. A novel cryptic clostridial peptide that kills bacteria by a cell membrane permeabilization mechanism. *Microbiology Spectrum* 2022, <https://doi.org/10.1128/spectrum.01657-22> (IF = 9.043, 100 pkt MEiN)

Badania prowadzono w ramach dwóch projektów Miniatura 3 nr 2019/03/X/NZ1/00394 oraz OPUS 20 nr 2020/39/B/NZ6/00589. Należy podkreślić nowatorski charakter badań odnoszących się do przedmiotu badań tzn. peptydu Intestinalinie wywodzącej się z białka litycznego LysC opisanego pierwszy raz w laboratorium w którym realizowana była rozprawa doktorska.

W dalszej części recenzji odniosę się do poszczególnych jej rozdziałów podkreślając staranność przygotowanej rozprawy.

Wstęp rozprawy doktorskiej to pełne i aktualne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej oparte na najnowszej, prawidłowo dobranej literaturze. Autorka w sposób szczegółowy i systematyczny omówiła problem oporności bakterii na antybiotyki uwzględniający rys historyczny tego problemu, charakterystykę złożonej grupy enzymów hydrolitycznych peptydoglikanu oraz peptydów przeciwbakteryjnych tj. ich właściwości, podział oraz mechanizm działania uwzględniający możliwości dezorganizacji błony komórkowej. Na podkreślenie zasługuje rozdział dotyczący peptydów przeciwbakteryjnych ukrytych w białkach, co w nawiązaniu do postępu w opracowaniu nowych strategii bioinformatycznych stwarza nadzieje w poszukiwaniu skutecznych alternatyw dla antybiotyków. Omawiane treści są uzupełnione bardzo dobrymi grafikami ułatwiającymi zrozumienie omawianych treści. Do tej części recenzji mam pytanie dotyczące możliwości wykorzystania peptydów przeciwbakteryjnych jako mimetyków holiny w układzie bójczym z endolizyną. Czy taki układ może stanowić system degradacji peptydoglikanu jako narzędzie eradykacji bakterii Gram-ujemnych tj. pokonanie bariery w postaci zewnętrznej błony komórkowej przy udziale badanych peptydów przeciwbakteryjnych tworzących pory w błonie

komórkowej dla endolizyn? Czy efekt ten może być zależny od mechanizmu dezorganizacji błony komórkowej czy też struktury drugorzędowej peptydu?

Cel pracy został jasno sformuowany i dotyczy on zarówno analizy aktywności jak i funkcji peptydów przeciwbakteryjnych stanowiących regiony większych białek litycznych ze szczególnym uwzględnieniem Intestinaliny. Powyższy cel został osiągnięty poprzez realizację poszczególnych celów szczegółowych uwzględniających specyficzność substratową peptydu Intestinaliny, mechanizm aktywności, efekt na biofilm bakteryjny oraz analizy bioinformatyczne dotyczące obecności sekwencji peptydów podobnych do Intestinaliny w sekwencjach innych białek litycznych.

Rozdział *Materiały i metody* jest napisany w sposób bardzo szczegółowy, co w pełni umożliwia odtworzenie części doświadczalnej rozprawy. Przedstawiono kompletną charakterystykę użytych szczepów i plazmidów bakteryjnych, sekwencje aminokwasowe białek w tym rekombinowanych, peptydów przeciwbakteryjnych, jak również skład podłoży wzrostowych, odczynników do elektroforezy poliakrylamidowej, oczyszczania białek, mikroskopii fluorescencyjnej oraz buforów wykorzystanych do analizy białek, określenia optimum aktywności oraz pomiaru stężenia białka metodą Bradford. Metody zastosowane w rozprawie zostały opisane również na wysokim poziomie szczegółowości zarówno dotyczące złożonych technik biologii molekularnej, oczyszczania i pomiaru stężenia białka, elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących oraz analiz bioinformatycznych z wykorzystaniem oprogramowania CLUSTAL Omega oraz czterech różnych algorytmów: Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) i Discriminant Analysis (DA). Ponadto, precyzyjnie opisano metodykę badań o charakterze mikrobiologicznych technik hodowalnych wzbogaconych analizami opartymi na transmisyjnej mikroskopii elektronowej i fluorescencyjnej oraz oznaczeń biofizycznych i biochemicznych struktury, aktywności i specyfiki substratowej białka pozwalające na złożoną ocenę właściwości przeciwbakteryjnych białka lub peptydu. W tej części rozprawy chciałbym podkreślić zróżnicowanie metod badawczych realizowanych w ramach szerokiej współpracy naukowej, które nadają badaniom charakter interdyscyplinarny.

Rozdział *Wyniki* to systematyczny i rzetelny opis przebiegu i interpretacji uzyskanych rezultatów badań. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż ich opis jest poprzedzony charakterystyką celowości badań w odniesieniu do aktualnych danych literaturowych. W pierwszej części badań, efekt analiz *in silico* dał podstawę do syntezy peptydu Intestinaliny pochodzącego z N-końcowego regionu białka LysC, dla którego wyznaczono IC50 przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Konsekwentnie, wykazano następnie potencjał przeciwbakteryjny zarówno badanego peptydu jak i białka LysC wobec szeregu szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W kolejnym etapie badań Doktorantka

skupiła się na szerokiej ocenie efektu przeciwbakteryjnego peptydu Intestinaliny wykazując jego efekt hamujący tworzenie biofilmu, spadek żywotność bakterii z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz spadek potencjału błonowego w wyniku uszkodzenie błon komórkowych. W kolejnej części opisu wyników Doktorantka przedstawia charakterystykę fizykochemiczną peptydu tj. jego strukturę przestrzenną, analizę struktury oraz stopnia oligomeryzacji. Powyższe wyniki badań pozwoliły na uprawnioną charakterystykę mechanizmu działania peptydu, który w roztworze wodnym ma strukturę niezorganizowaną, jednak w obecności detergentów tworzy oligomery, co powoduje spadek potencjału błonowego i dezintegracja błony komórkowej bakterii. Druga część badań dotyczy poszukiwania białek podobnych do białka litycznego LysC z *Clostridium* oraz *Thermus*, które mogą zawierać „ukryte” sekwencje peptydów przeciwbakteryjnych, z wykorzystaniem metod bioinformatycznych. Wytypowano trzy białka: PhiKo, GasC oraz CT4, następnie określono na ile podobieństwo sekwencji aminokwasowej znajduje odzwierciedlenie w ich strukturze i właściwościach litycznych i uzyskano ich formy rekombinowane z wykorzystaniem dedykowanych systemów ekspresyjnych. Ponadto, Doktorantka określiła regiony o charakterze przeciwbakteryjnym w sekwencjach wytypowanych białek i zsyntetyzowała odpowiadające im peptydy tj. RAP-29 z regionu C-terminalnego białka PhiKo, VVR-20 z N-terminalnego regionu białka GasC oraz IFR-20 z N-terminalnego regionu białka CT4. Powyższe białka i peptydy Doktorantka scharakteryzowała pod kątem fizykochemicznym oraz oceniała zróżnicowaną aktywność przeciwbakteryjną. W tym miejscu mam pytanie dotyczące oceny potencjalnego efektu cytotoksycznego analizowanych peptydów i białka wobec modelowych linii komórek eukariotycznych, w tym integralności błony komórkowej w powiązaniu z aktywnością metaboliczną badanych komórek. Ta część rozprawy wymaga szczególnego wyróżnienia biorąc pod uwagę umiejętności Doktorantki w opanowaniu szerokiego wachlarza metod z zakresu bioinformatyki, biotechnologii, biochemii i mikrobiologii, składających się na kompletny warsztat metodyczny pozwalający na poszukiwanie peptydów o właściwościach przeciwbakteryjnych.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka odnosi się do najnowszych danych literaturowych dobranych zgodnie z tematyką pracy. Wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i wyznacza nowe kierunki badań, zwłaszcza w przypadku peptydów Intestinalina (P30) i RAP-29 m in. w kontekście badań aplikacyjnych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Szadkowskiej pt. *Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach pierwszorzędowych białek litycznych* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.

2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę udokumentowaną umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz wiedzę teoretyczną wnosząc do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Moniki Szadkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę interdyscyplinarny i nowatorski charakter badań o znaczeniu aplikacyjnym, opanowanie szerokiego wachlarza metod przez Doktorantkę oraz rzetelność opisu i wnioskowania na podstawie uzyskanych wyników badań wnosząc do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Szadkowskiej pt. *Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach pierwszorzędowych białek litycznych.*

Z poważaniem

