



Gdańsk 18.09.2023

Dr hab. inż. Piotr Szweda
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Szadkowskiej zatytułowanej:
„Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach
pierwszorzędowych białek litycznych”**

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Zjawisko lekooporności drobnoustrojów staje się jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Szczególnie trudne są terapie zakażeń wywoływanych przez szczepy wielolekooporne zaliczane do tzw. grupy ESKAPE (akronimu wywodzi się od nazw gatunków/rodzajów zaliczanych do tej grupy: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, oraz *Enterobacter*). W trakcie ostatnich dwóch – trzech dekad liczba zakażeń wywołanych przez szczepy o obniżonej wrażliwości na dostępne aktualnie antybiotyki rośnie bardzo szybko. Niestety nie idzie to w parze z identyfikacją i wprowadzaniem do praktyki klinicznej nowych antybiotyków. Stąd konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych i przede wszystkim skutecznych metod profilaktyki i zwalczania infekcji bakteryjnych. Badania, które w ramach swojej pracy doktorskiej prowadziła Pani mgr Monika Szadkowska wpisują się w ten nurt. Na stronie 32 Autorka rozprawy przedstawiła cel swoich badań, którym była analiza aktywności i funkcji peptydów antybakteryjnych, stanowiących regiony większych białek litycznych ze szczególnym uwzględnieniem peptydu antybakteryjnego intecstianliny. Jest to tematyka bardzo ciekawa i przede wszystkim oryginalna. W ramach poszukiwania nowych potencjalnych leków przeciwdrobnoustrojowych aktualnie szczególnie dużą popularnością cieszą się produkty naturalne, nanocząstki metali, fagi czy modyfikacje chemiczne znanych i stosowanych już antybiotyków. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę jednoznacznie wskazują, że peptydy stanowiące fragment białek litycznych także mogą być ciekawą alternatywą dla antybiotyków. W mojej ocenie oryginalna tematyka jest istotnym atutem recenzowanej pracy doktorskiej.

Ocena formalna pracy doktorskiej

Kandydatka do stopnia naukowego doktora Pani mgr Monika Szadkowska przedłożyła rozprawę doktorską pt. „Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach pierwszorzędowych białek litycznych”, która została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Płotka w Katedrze Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Dysertacja Pani mgr Szadkowskiej ma klasyczny układ dla tego typu opracowań, jej najważniejszymi elementami są:

1. Wstęp teoretyczny – strony 12 – 31;
2. Spis stosowanych materiałów – strony 33 – 44;
3. Opis stosowanych metod eksperymentalnych – strony 45 – 55;

4. Przedstawienie i omówienie uzyskanych wyników – strony 56 – 99;
5. Podsumowanie strony - 100 i 101;
6. Dyskusja – strony 102 – 107.

Ponadto w swojej Dysertacji Pani mgr Szadkowska umieściła jasno sformułowany cel pracy (strona 32), streszczenia w dwóch wersjach językowych (strony 10 i 11), suplement, zawierający głównie sekwencje genów kodujących badane białka i sekwencje aminokwasowe „regionów o potencjale antybakteryjnym” (strony 119-140), a także spisy skrótów (strona 8 i 9) oraz tabel i rycin (strony 141-150). Spis piśmiennictwa obejmujący 105 pozycji, w zdecydowanej większości publikacje z renomowanych czasopism naukowych opublikowane w ciągu ostatnich 20 lat, przedstawiono na stronach 108-118.

Na stronach 3 i 4 Doktorantka zaprezentowała spis swojego dorobku, wykaz jednostek, z którymi prowadzona była współpraca naukowa w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz źródła finansowania badań. Taki układ dysertacji jest w mojej ocenie optymalny, nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Należy przyznać, że pod względem edytorskim i formalnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Nie stwierdziłem istotnych błędów w zakresie nazewnictwa fachowego, w tekście rozprawy praktycznie nie występują błędy edytorskie – tzw. literówki. Praca jest bogato ilustrowana, liczne tabele, ryciny, fotografie żeli i fotografie obrazujące wyniki testów aktywności przeciwbakteryjnej (bardzo dobrej jakości) umiejętnie wkomponowano w tekst opracowania, co jest nie tylko istotne ze względów graficznych czy estetycznych, ale przede wszystkim ułatwia czytelnikowi zrozumienie analizowanego tekstu.

Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko o drobnych uchybieniach edytorskich (które nie mają praktycznie żadnego wpływu na ogólną ocenę pracy):

1. Zarówno w polskiej jak i angielskiej wersji językowej streszczenia autorka przedstawiła skrócone nazwy bakterii dwóch gatunków: *Staphylococcus aureus* oraz *Acinetobacter baumannii*. Formalnie nazwy te pojawiają się w pracy po raz pierwszy i Autorka powinna zaprezentować pełne nazwy, tak jak zrobiła to dla bakterii pozostałych gatunków, o których wspomina w streszczeniach. Brak konsekwencji w zakresie zapisu nazw gatunków bakterii zauważyłem także w innych częściach dysertacji, np. strona 15, gdzie dwukrotnie podano pełną nazwę *Escherichia coli*. Prezentację pełnej nazwy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) stwierdziłem na stronach: 16, 17, 23, 30, 51, 56, 76, 103 i jest ona przemiennie stosowana z nazwą skróconą *S. aureus*;
2. Nazwę peptydu intestinaliny, autorka pisze wielką literą. Moim zdaniem nie ma żadnych przesłanek formalnych, żeby nazwę badanych związków w tekstach naukowych pisać dużą literą;
3. Strona 12 – jest „Najważniejszym osiągnięciem medycyny XX wieku uważa się odkrycie antybiotyków”, powinno raczej być: „Jednym z najważniejszych osiągnięć medycyny XX wieku było ...”;
4. Strona 12 – jest „z powodu infekcji wywołanych antybiotykoopornością ...”, proponowałbym raczej: „z powodu infekcji wywołanych przez bakterie antybiotykooporne ...”;
5. Strona 13 – w zdaniu „Dopiero 1981 roku odkryto mechanizm ...” brakuje litery „w”.
6. Strona 16 – jest „Jednym z mechanizmów ich działania jest destabilizacja i permeabilizacja błony komórkowej ściany komórkowej bakterii”, powinno być „Jednym z mechanizmów ich działania jest destabilizacja i permeabilizacja błony komórkowej i/oraz ściany komórkowej bakterii”;
7. Strona nr 18 zamiast enzolizynom powinno być endolizynom.
8. Strona 20 – rozdział 1.5. Autorka rozpoczyna od zdania: „Ostatnią grupą są autolizyny ...” – ale ostatnią grupą czego?;

9. Strona 23 – Autorka pisze „... region katalityczny zawiera atom cynku koordynowany przez aminokwasy His⁵⁰, His¹⁴⁷ i Cys¹⁵⁵...” – oczywiście chodzi tutaj o jon cynku Zn²⁺;
10. Strona 25 – zamiast „spectrum” powinno być spektrum;
11. Strona 46 – w zdaniu „... a elucję białka prowadzono przy 10 ml buforu NPi-150 ...” powinno raczej być z zastosowaniem 10 ml buforu NPi-150;
12. Strona 72 – „... uzyskałam pojedynczy pik o objętości elucyjnej wynoszącej 13,12 ml” moim zdaniem bardziej prawidłowy byłby zapis „uzyskałam pojedynczy pik przy objętości elucyjnej wynoszącej 13,12 ml”;
13. W kilku miejscach w tekście pracy użyto określenia „sonifikacja” w odniesieniu do lizy komórek bakteryjnych za pomocą ultradźwięków, nie jest to określenie prawidłowe – powinna być sonikacja (prawidłową nazwę używała Doktorantka w rozdziale 4.4.1.).

Jak wspomniałem powyżej są to drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość pracy.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym rozprawę oceniam bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań. W zespole promotora pracy Pani dr hab. Magdaleny Płotka zidentyfikowano intestinalinę – peptyd o aktywności przeciwdrobnoustrojowej będący fragmentem białka litycznego LysC (pochodzącego ze szczepu *Clostridium intestinale* URNW). Według informacji przedstawionej na stronie 31 jest to pierwszy opisany w literaturze peptyd przeciwdrobnoustrojowy wywodzący się z większego białka kodowanego przez bakterię, a nie przez bakteriofaga, czy organizm eukariotyczny. Pierwsza część badań przeprowadzona przez Panią mgr Monikę Szadkowską dotyczyła charakterystyki tego właśnie peptydu, w tym zakresie do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

1. Wykazanie wyższej aktywności przeciwoznaczającej intestinaliny aniżeli enzymu z którego wywodzi się ten peptyd (wartości IC₅₀ dla peptydu i białka wynosiły odpowiednio 1,5 μM oraz 8,55 μM);
2. Wykazanie obiecującej aktywności peptydu w stosunku do szerokiego spektrum bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, oraz zdolności hamowania procesu tworzenia biofilmu przez te bakterie;
3. Identyfikację błony komórkowej jako celu molekularnego intestinaliny (wykorzystano zaawansowane techniki badawcze – mikroskopię fluorescencyjną oraz analizę potencjału błonowego);
4. Wykazanie w oparciu o analizę widm dichroizmu kołowego, że roztworze wodnym peptyd ma strukturę niezorganizowaną, jednak pod wpływem detergentów (oraz prawdopodobnie w środowisku błony komórkowej) przyjmuje konformację α-helikálną. Ponadto wykazano (stosując ultrawirowanie analityczne), że peptyd ten tworzy struktury oligomeryczne – najprawdopodobniej trimery.

Pewnym zaskoczeniem jest dla mnie zaprezentowanie części bardzo interesujących wyników dotyczących właściwości intestinaliny w dyskusji (strony 104-106). Szczególną uwagę chciałbym zwrócić na badania, które wykazały niską aktywność cytotoksyczną peptydu. Stosowanie antybiotyków, których celem molekularnym jest błona komórkowa zdecydowanie ogranicza ryzyko rozwoju szczepów opornych. Niestety często obserwowaną wadą chemioterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych oddziałujących z błoną komórkową jest ich wysoka cytotoksyczność i co za tym idzie niskie wartości indeksu selektywności (porównanie wartości stężeń wywołujących efekt cytotoksyczny i bakteriobójczy). Przykładem takiej sytuacji jest antybiotyk przeciwgrzybowy – amfoterycyna B. Oczywiście należy potwierdzić tą zaletę w badaniach *in vitro* z zastosowaniem większej liczby linii komórkowych, a następnie w warunkach *in vivo*, ale wstępne wyniki są bardzo obiecujące.

W dalszej części swoich badań Doktorantka wykorzystwała metody *in silico* do identyfikacji białek podobnych do LysC, a następnie w obrębie sekwencji tych białek Pani mgr

Szadkowska wytypowała „regiony” (sekwencje peptydów) o potencjale antybakteryjnym. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano trzy białka zawierające w swoich sekwencjach potencjalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe:

1. PhiKo pochodzące z bakteriofaga phiKo *Thermus thermophilus* HB27, wytypowano peptydu RAP-29, który odpowiadał resztom aminokwasowym 105-133 C- końcowej części białka;
2. GasC pochodzące z Gram-dodatniej bakterii *Clostridium gasigenes*, w N-terminalnej części białka (reszty aminokwasowe 4-23) wytypowano peptyd VVR-20;
3. CT4 pochodzące z bakterii *Clostridium manihotivorum*, w N-terminalnej części (reszty aminokwasowe 4-23) wytypowano peptyd IFR-20, we wszystkich przypadkach nazwy peptydów wywodzą się od nazwy trzech pierwszych aminokwasów oraz całkowitej ich długości.

We wszystkich trzech przypadkach Doktorantka uzyskała wydajną produkcję białek rekombinantowych w komórkach bakterii *E. coli* oraz zsyntetyzowała odpowiednie peptydy, a następnie określiła i porównała aktywność przeciwbakteryjną tych sześciu substancji. Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe i obiecujące.

W przypadku białka PhiKo oraz wywodzącego się z niego peptydu RAP-29 zaobserwowano znaczne różnice w zakresie aktywności przeciwbakteryjnej. Co ciekawe to peptyd wykazywał zdecydowanie większą aktywność w stosunku do szerokiego spektrum patogennych gatunków bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Natomiast stosując test redukcji zmętnienia Doktorantka potwierdziła aktywność lityczną białka PhiKo w stosunku do bakterii termofilnych *T. thermophilus*. Chciałbym w tym miejscu zwrócić uwagę na istotne różnice w warunkach w jakich prowadzone były testy aktywności w stosunku do bakterii termofilnych i patogennych (Gram-dodatnich i Gram-ujemnych). W pierwszym przypadku analizę prowadzono w temperaturze 60 °C co odpowiada warunkom w jakich ten enzym działa w naturze, z kolei w przypadku bakterii patogennych analizy prowadzono w 37 °C co zdecydowanie odbiega od warunków działania białka w środowisku naturalnym. Doktorantka przeprowadziła bardzo ciekawą analizę dotyczącą określenia optymalnego pH działania enzymu (wyniki zaprezentowano na Rycinie nr 27). Szkoda, że nie wykonano podobnej analizy w zakresie wyznaczenia optymalnej temperatury działania tego białka. Oczywiście taka analiza miałaby wartość czysto poznawczą (trudno sobie wyobrazić stosowanie w praktyce klinicznej białka przeciwbakteryjnego działającego tylko w temperaturach zbliżonych do 60 °C), ale na pewno byłaby cennym uzupełnieniem charakterystyki lizyny bakteriofaga PhiKo. Przeprowadzone badania wykazały także, że podobnie jak przypadku intestinaliny targetem – celem molekularnym peptydu RAP-29 jest błona komórkowa. Czy przeprowadzono badania mające na celu ustalenie cytotoksyczności tej substancji?

Na stronie 107 Autorka pracy pisze, że „Pomimo, iż wszystkie cztery wytypowane peptydy: Intestinalina (P30), RAP-29, VVR-20 i IFR-20 miały posiadać aktywność antybakteryjną, tylko dwa (Intestinalina (P30) i RAP-29) wykazują duży potencjał antybakteryjny potwierdzony zarówno w testach antybakteryjnych, jak i wartościach MIC.”. W mojej ocenie identyfikację dwóch substancji o znaczącym potencjale aplikacyjnym/terapeutycznym (jako nowe leki przeciwdrobnoustrojowe) należy uznać za duży sukces Doktorantki. Biorąc pod uwagę przedstawione w pracy wyniki, nie rezygnowałbym także z dalszego badania potencjału terapeutycznego peptydu IFR-20. Obserwowany brak aktywności (do stężenia 265 µM) tej substancji w stosunku do bakterii *S. aureus* może rzeczywiście wynikać z kwestii czysto metodycznych, natomiast aktywność w stosunku do *A. baumannii* (MIC=8,3 µM) zaklasyfikowałbym jako zadowalającą.

Poniżej przedstawiłem kilka uwag merytorycznych odnośnie informacji zawartych w tekście dysertacji:

1. Na stronie 20 Doktorantka stwierdza: „Do kolejnych mocnych stron endolizyn jako środków przeciwbakteryjnych zaliczamy małe prawdopodobieństwo wystąpienia oporności bakteryjnej, a także wysoką aktywność enzymatyczną, dzięki której liza komórek bakteryjnych może wystąpić już w ciągu kilku minut, a nawet sekund (Son et al., 2012).” – w literaturze, wysoką aktywność lityczną endolizyn rzeczywiście zwykle klasyfikuje się jako istotną zaletę. Natomiast należy pamiętać, że w warunkach *in vivo* skutkuje to bardzo szybkim uwalnianiem do organizmu/krwiobiegu gospodarza (np. człowieka lub zwierzęcia) dużej ilości czynników prozapalnych (np. fragmentów peptydoglikanu) co z kolei może spowodować bardzo intensywną (niepożądaną) reakcję układu immunologicznego.
2. Na stronie 35 w kolumnie „Charakterystyka” w Tabeli 3 opisy dwóch plazmidów: pET15b_GasC oraz Pet15b_CT4 są identyczne, w przypadku drugiego z wymienionych plazmidów prawdopodobnie wpisano niewłaściwą nazwę genu kodującego białko.
3. Strona 37 – Doktorantka przedstawiła charakterystykę płytek 96-cio dołkowych czterech różnych producentów. Czy był jakiś konkretny powód stosowania w badaniach płytek z czterech różnych źródeł?
4. Strona 41 – w mojej ocenie należało przedstawić dodatkowe informacje dotyczące stosowanego złoza chromatograficznego oraz (mniej istotne) worka dializacyjnego. Co prawda Autorka podaje numery katalogowe stosowanych produktów, ale uważam, że podstawowe informacje na ich temat (chociażby jaki typ chromatografii stosowano do oczyszczania białek rekombinantowych) powinny być zawarte w tekście rozprawy.
5. Strona 42 – czy w przypadku buforów do oczyszczania (NPI-10 i NPI-20) stężenie imidazolu rzeczywiście wynosiło odpowiednio 0,001 i 0,002 M?
6. W części metodycznej (punkty 4.1-4.3) należało wspomnieć, że wszystkie te operacje prowadzono z wykorzystaniem komórek bakterii *E. coli* BL21(DE3)[pRARE]
7. Strona 50, rozdział 4.10. Testy formowania biofilmu – autorka podaje użyte stężenia peptydu (5 i 10 μ M) – moim zdaniem test powinien być przeprowadzony z wykorzystaniem subinhibitorowych stężeń badanych peptydów (1/2 i 1/4 MIC) i w takiej formie powinno się te stężenia podawać, ale oczywiście akceptuję propozycję Doktorantki.
8. W rozdziale 5.2.2 stwierdziłem pewne nieścisłości w zakresie opisu Ryciny nr 18 – nie bardzo rozumiem jaką próbkę analizowano w ścieżce nr 6. W opisie ponad ryciną brak na ten temat informacji. Natomiast informacja przedstawiona w legendzie do tej ryciny, jakoby jest to przesącz, wydaje mi się mało realna (zresztą ta informacja jest niezgodna z opisem przedstawionym powyżej – przesącz analizowany był w ścieżce nr 4). W legendzie pod ryciną z kolei umieszczono informację, że w ścieżce nr 4 analizowano supernatant po sonikacji.
9. Strona 76 – powinien być punkt 5.2.5. a nie jak zaprezentowano 5.3.5..
10. Strona 79, w punkcie 5.2.7. nie analizowano struktury oligomerycznej peptydu RAP-29.
11. Strona nr 89 i 95 - także nie do końca zgadzam się z opisami obrazów elektroforetycznych w tekście – w ścieżkach nr 4 nie badano efektu wiązania białka ze złożem (ten opisy są niezgodne z legendami do Rycin 32 i 38). Być może źle interpretuję te opisy – będę wdzięczny za komentarz w trakcie obrony.

Byłbym wdzięczny gdyby doktorantka mogła się krótko odnieść do powyższych uwag/komentarzy w trakcie publicznej obrony.

Opis Dorobku Doktorantki

Cześć wyników badań związanych z pracą doktorską Pani mgr Moniki Szadkowskiej została już opublikowana w dwóch artykułach, które ukazały się w renomowanych czasopismach o wysokich wartościach IF:

1. 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> (IF = 6.208, 140 pkt MEiN, przy czym IF z roku wydania pracy wynosił 5,924)
2. 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 cel membrane permeabilization mechanism*. Microbiology Spectrum 2022, <https://doi.org/10.1128/spectrum.01657-22> (IF = 9.043, 100 pkt MEiN)

Pani mgr Szadkowska jest odpowiednio drugim i pierwszym autorem tych prac, co świadczy o jej istotnym udziale w realizacji badań. Jest to bez wątpienia bardzo duży sukces Doktorantki jak i Pani Promotor. W trakcie realizacji pracy doktorskiej Pani mgr Monika Szadkowska miała możliwość zapoznania się z szerokim spektrum nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej i mikrobiologii. Ponadto, co jest bardzo ważne miała możliwość współpracy ze specjalistami z innych obszarów badawczych – na stronie nr 4 wymieniono łącznie pięć zespołów, z którymi prowadzono współpracę. Badania były finansowane w ramach dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki w Krakowie, co potwierdza wysoką wartość naukową tematyki, której dotyczyła rozprawa. Ponadto chciałbym podkreślić, że Pani mgr Szadkowska jest także współautorem trzech innych publikacji, które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych. Świadczy to o jej dużym zaangażowaniu w działalność naukową Katedry, w której miała możliwość pracować.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Szadkowskiej pt.: „Charakterystyka nowych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach pierwszorzędowych białek litycznych” jest oryginalną, cenną zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym, rzetelnie i starannie przygotowaną pracą naukową, która spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim - określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U.2018 poz. 1668 z póź. zm). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr. Moniki Szadkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w postaci dwóch artykułów w renomowanych czasopismach naukowych (IF obydwu czasopism > 6) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. inż. Piotr Szweda, prof. PG

Piotr Szweda

POLITECHNIKA GDAŃSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Katedra Technologii Leków i Biochemii
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
tel. 58 347 18 06, faks 58 347 11 44
NIP 584-020-35-93 REGON 000001620