



Politechnika
Śląska



UCZELNIA
BADAWCZA
INICJATYWA DOSKONAŁOŚCI

Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

Dr hab. inż
Ilona Wandzik, prof. PS.

Gliwice, 16.06.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mileny Reszki

pt. „Fluorescencyjne wskaźniki aktywności β -glikozydaz wykazujące zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym”

wykonanej w Zespole Glikochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora **dr hab. Beaty Liberek, prof. UG** oraz promotora pomocniczego **dra Illi E. Serdiuka**

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium UMO-2018/31/N/ST4/00227 pt. „Pochodne 3-hydroksychromen-4-onu jako efektywne fluorescencyjne wskaźniki aktywności glikozydaz”

Badania prowadzone przez Doktorantkę w ramach pracy doktorskiej miały na celu otrzymanie nowych połączeń cukrowych z fluoroforami, które zostały wykorzystane jako wskaźniki aktywności β -glikozydaz. Glikozydazy, to enzymy z grupy hydrolaz glikozydowych, które katalizują hydrolizę disacharydów, oligosacharydów i glikokoniuatów. Glikozydazy są bardzo ważną grupą enzymów biorących udział w wielu procesach zachodzących w organizmach żywych. W zdrowym organizmie stężenie i aktywność enzymów utrzymuje się w ściśle określonym zakresie. Zaburzenie aktywności i zmiany w strukturze niektórych glikozydaz są powodem zaburzeń genetycznych i wskazują na poważne choroby dziedziczne, przede wszystkim dotyczy to lizosomalnych chorób spichrzeniowych, takich jak: choroba Gauchera czy choroba Taya-Sachsa. Ponadto zaburzenia aktywności tych enzymów mogą mieć wpływ na wiele procesów, takich jak infekcje bakteryjne i wirusowe czy rozwój komórek nowotworowych. Z uwagi na to, że zmiany aktywności enzymów we krwi, często są odzwierciedleniem zmian patologicznych zachodzących w narządach, bardzo ważne jest monitorowanie stężenia glikozydaz w próbkach biologicznych. Stąd projektowanie i synteza selektywnych wskaźników enzymatycznych ma duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka zaproponowała fluorescencyjne sondy, o charakterze glikozydów, w których częścią cukrową jest monocukier, który ma być rozpoznawany przez glikozydazę, natomiast aglikonami są pochodne chromen-4-onu, wykazujące fluorescencję. Ponadto fluorofory wykazują zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym (ang. Excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT). Działanie sondy polega na tym, że pod wpływem glikozydazy nastąpi hydroliza wiązania glikozydowego i uwolnienie fluoroforu, który poprzez zjawisko ESIPT posłuży do monitorowania

Politechnika Śląska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

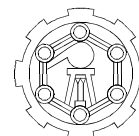
ul. Krzywoustego 8, pok. 013, 44-100 Gliwice

+48 32 237 20 28

ilona.wandzik@polsl.pl

NIP 631 020 07 36

ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



aktywności β -glikozydaz. Takie zadanie badawcze jest uzasadnione, aktualne i ma potencjał aplikacyjny, szczególnie ze względu na to, że fluorofory ESIPT mają przewagę nad aktualnie stosowanymi znacznikami: 4-metyloumbeliferonem i fluoresceiną. Autorka argumentuje, że przewaga polega na tym, że fluorescencja proponowanych sond jest niewrażliwa na reabsorpcję ze względu na znaczne przesunięcie Stokesa. Dzięki temu metoda będzie odtwarzalna na poziomie pomiarów fluorescencji i mniej podatna na rozpraszanie światła w mętnych próbkach biologicznych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter tradycyjny i zawiera następujące rozdziały: streszczenie, część literaturową, cel pracy, część doświadczalną, omówienie wyników, podsumowanie, spis literatury i dorobek naukowy Autorki. Przedłożona praca zawiera 142 strony, 7 schematów, 54 rysunki, 41 tabel, 183 odnośniki literaturowe. Najobszerniejszą częścią rozprawy jest omówienie wyników (55 stron).

Rozprawa jest napisana zwięzłym i komunikatywnym językiem, co sprawia, że czyta się ją z zainteresowaniem. Nie znalazłam poważnych błędów merytorycznych, ani metodycznych, niemniej jednak chciałam przedstawić kilka uwag w kolejności takiej, jak zostało opisane w przedłożonej rozprawie.

Część literaturowa składa się z dwóch obszernych rozdziałów. W pierwszym z nich (rozdział 1.1) Doktorantka bardzo wyczerpująco opisuje glikozydazy pod względem klasyfikacji, źródeł, mechanizmów działania, inhibitorów i zastosowania. Autorka nie zawsze jest konsekwentna w stosowanym nazewnictwie, np. mając na uwadze mechanizm reakcji enzymatycznej na ogół mówi o enzymach inwertujących i retencyjnych, ale czasami o odwracających i zachowujących (np. Rys. 1), podobnie wymiennie stosuje „molekuły” i „cząsteczki”.

Na Rys. 2 przedstawione są struktury 3D trzech β -glikozydaz, wyodrębnionych odpowiednio z bakterii *Clostridium cellulovorans*, grzybów *Trichoderma reesei* oraz z termitów *Neotermes koshunensis*. Autorka komentuje, że enzymy te są strukturalnie bardzo podobne i posiadają typową strukturę baryłkową typu TIM ((α/β)₈-TIM). W tym miejscu na lepsze zobrazowanie podobieństwa można było po pierwsze porównać sekwencje trzech enzymów, a po drugie nałożyć na siebie struktury 3D kompleksów, aby zobrazować jakiego regionu dotyczą różnice. W drugiej części rozdziału 1.1. Autorka opisuje jak ważne jest monitorowanie aktywności glikozydaz oraz przedstawia substancje stosowane w metodach spektrofotometrycznych i fluorescencyjnych. Dla każdego znacznika fluorescencyjnego wymienione są ograniczenia, tak aby jeszcze bardziej przekonać czytelnika do zasadności podjętych badań. Drugi rozdział części literaturowej (rozdział 1.2) dotyczy chemii flawonoidów, ze szczególnym uwzględnieniem flawonoli i ich właściwości fluorescencyjnych. Opisane są flawonole i związany z nimi proces ESIPT, który był



przedmiotem badań eksperymentalnych i obliczeniowych. Tutaj mam pytanie do Autorki: czy jakiś naturalny glikozyd flawonoli został zastosowany do oznaczania aktywności glikozydaz?

Kolejnym rozdziałem rozprawy jest część doświadczalna, w której Doktorantka opisuje dokładnie wszystkie przeprowadzone syntezy, metodykę prowadzenia badań właściwości spektralnych fluoroforów i hydrolizy enzymatycznej glikozydów. Reakcje enzymatyczne są opisane tylko dla β -glukozydazy, pominięte zostały pozostałe dwa enzymy. Autorka podaje, że β -glukozydazę stosowano w stężeniu $5 \cdot 10^{-3}$ unitów/L. Niestety nie jest to pełna informacja, gdyż należy dodatkowo podać źródło enzymu.

W kolejnej części rozprawy Autorka omawia wyniki badań własnych. Z uwagi na to, że badania zostały już opisane w trzech publikacjach, a więc przeszły proces recenzji w czasopismach, rola recenzenta jest uproszczona. Niemniej jednak chciałabym przedstawić kilka komentarzy. W pierwszej kolejności opisana jest synteza fluoroforów wykazujących zjawisko ESIPT - siedmiu pochodnych 3-hydroksychromen-4-onu. Związki różniły się charakterem podstawnika przy atomie węgla 4'. Z uwagi na to, że intensywność fluorescencji ESIPT pochodnych 3-hydroksychromen-4-onu, jest w wodzie znacząco pomniejszona w porównaniu z rozpuszczalnikami aprotycznymi, Autorka opracowała warunki pomiarowe, w których uzyskała wzmocnienie fluorescencji ESIPT badanych fluoroforów poprzez dodatek BSA lub zastosowanie fluorescencji wzmocnionej metalem (MEF). Tak dopracowane warunki, zastosowane zostały w dalszym etapie do oznaczenia fluorescencji ESIPT po uwolnieniu fluorofora z glikozydów przy zastosowaniu enzymów hydrolitycznych w środowisku wodnym.

Kolejnym zadaniem, była synteza glikozydów, zawierających jako aglikony uprzednio zsyntezowane fluorofory. Do badań wytypowano trzy serie β -glikozydów: pochodne glukopiranozy, glukozaminy i kwasu glukuronowego. Synteza przebiegała w dwóch etapach: w pierwszym etapie sprzęgano odpowiednie fluorofory z peracetylowanymi bromkami lub chlorkami glikozydowymi, a w drugim etapie usuwano osłony O-acetylowe z otrzymanych glikozydów. Doktorantka opisała szczegółowo procedury syntetyczne oraz przedstawiła mechanizm reakcji, zgodnie z którym uzyskano selektywnie β -glikozydy. Struktury wszystkich związków zostały potwierdzone metodami spektroskopowymi (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS/HRMS, IR). Wyniki analiz zostały bardzo starannie opracowane i zestawione w tabelach. Nie mam żadnych wątpliwości, co do struktury syntezowanych połączeń.

Zaproponowana metodyka pozwoliła na otrzymanie selektywnie β -glikozydów, selektywność była tutaj bardzo istotna, gdyż w kolejnym, kluczowym etapie pracy przeprowadzano enzymatyczną hydrolizę z udziałem trzech enzymów: β -glukozydazy, β -glukuronidazy i N-acetylo- β -glukozaminozydazy. W wyniku takiej hydrolizy miało nastąpić uwolnienie fluoroforów ESIPT, dzięki czemu można było monitorować



przebieg reakcji enzymatycznej. Doktorantka wykazała, że wszystkie β -glukozydy, poza jednym, w kontakcie z β -glukozydazą ulegały reakcji enzymatycznej, a postęp hydrolizy mógł być monitorowany poprzez pomiar fluorescencji ES IPT. Tym jednym wyjątkiem był glukozyd 4'-dimetyloaminoflawonolu (**7c**). Autorka tłumaczy wysoką stabilność glukozydu **7c** elektronodonorowym charakterem podstawnika dimetyloaminowego w pozycji 4' aglikonu. Udowadnia, że szereg szybkości hydrolizy enzymatycznej jest zgodny ze stałymi Hammetta, odpowiadającymi 4'-podstawnikom. Dodatkowo wnioski te zostały potwierdzone analizą rozkładu ładunku. Uważam, że taka argumentacja jest przekonująca, ale nie wyjaśnia dlaczego glukozyd **7c** w ogóle nie ulegał reakcji enzymatycznej. Uważam, że należało wziąć pod uwagę nie tylko ładunek cząstkowy, ale również objętość 4'-podstawników. To była reakcja enzymatyczna, a substraty nie były naturalnymi substratami dla β -glukozydazy. Być może **7c** nie wiązał się w miejscu aktywnym enzymu z uwagi na zawadę przestrzenną. Szkoda, że ten analog nie został uwzględniony w badaniach z dwoma pozostałymi enzymami, do których mógłby mieć większe powinowactwo i ulegać reakcji hydrolizy.

Pomiary fluorescencji w trakcie enzymatycznej hydrolizy glukozydów z udziałem BSA były przeprowadzone w fizjologicznym pH (7,4) oraz w kwaśnym pH (5,2). Proszę o wyjaśnienie dlaczego przyjęto takie środowisko dla każdego z enzymów? Dlaczego w eksperymencie z wykorzystaniem MEF zastosowano pH 7,4?

Autorka dowodzi, że w kwaśnym środowisku (pH 5,2) reakcje hydrolizy enzymatycznej przebiegają szybciej niż w środowisku pH 7,4. Prawdopodobnie takie zachowanie wynika z optymalnego pH dla stosowanych enzymów. Uważam, że praca zyskałaby, gdyby przytoczone zostały dane dotyczące optymalnych warunków dla wszystkich stosowanych enzymów.

Kilka dodatkowych uwag przedstawiam poniżej:

str. 9-11 – wiele z przedstawionych skrótów nie wymaga wyjaśnienia (np. D₂O, HPLC, IR, NMR, etc),

str. 18, 19, 27 – Rys. 3, 5 i 11 – na schematach reakcyjnych odszczepiany aglikon (ROH) powinien być narysowany pod strzałkami reakcyjnymi; sposób w jaki ROH jest narysowany świadczy o tym, że ponownie bierze udział w reakcji, a tak nie jest

str. 21 – nazwa handlowa leku przeciwwirusowego to zanamiwir , a nie zenamiwir

str. 43 – „Siłą napędową ES IPT jest redystrybucja gęstości elektronowej, która zmienia centra kwasowo-zasadowe w elektronicznie wzbudzonych cząsteczkach (N*) w porównaniu z cząsteczkami w stanie podstawowym (N)”,



- str. 63 – rozdział 3.11.2.3: „ilość β -glukozydazy mieściła się w zakresie od 2,5 mikrogramów do 50 nanounitów” – powinno być 2,5 mikrounitów; pomyłkowo opisano procedurę dla związku **7c**, powinien być związek **7e**
- str. 82, 87 – w związkach **6g** i **6h** oraz **7g** i **7h** lepiej oznaczać heteroatomy jako X=O dla furanu i X=S dla tiofuranu; oznaczenie R zwyczajowo dotyczy połączeń z atomem węgla,
- str. 86, Rys. 40 – produktem reakcji transestryfikacji jest wolny cukier i octan metylu, pomyłkowo przerysowany został jeszcze raz substrat reakcji

Powyższe uwagi polemiczne i krytyczne nie wpływają na końcową ocenę rozprawy. Cel pracy został zrealizowany pomyślnie. Autorka wykazała się niewątpliwie dobrym przygotowaniem merytorycznym, dużą starannością w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów. Przyjęta metodyka była poprawna. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są wartościowe, posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w trzech publikacjach naukowych z listy JCR oraz były zaprezentowane na trzynastu konferencjach o zakresie krajowym i międzynarodowym. Warto nadmienić, że badania prowadzone w niniejszej pracy były współfinansowane z kilku projektów, a na szczególną uwagę zasługuje pozyskanie przez Doktorantkę grantu Preludium.

Uważam, że rozprawa doktorska pt *Fluorescencyjne wskaźniki aktywności β -glikozydaz wykazujące zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym* spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Mileny Reszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. PŚ.