



Wrocław, 15 września 2015

Dr. hab. Artur Krężel, prof. U. Wr.
Pracownia Chemii Biologicznej
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Katarzyny Macegoniuk
pt. „Ekspresja, izolacja i hamowanie aktywności ureaz bakteryjnych”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. inż. Katarzyny Macegoniuk dotyczy analizy właściwości inhibitorowych jonów metal ciężkich oraz niskocząsteczkowych związków organicznych wobec ureaz bakteryjnych. Jest ona kontynuacją prac prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Opiekunem pracy jest dr hab. prof. P.Wr. Łukasz Berlicki.

Patogeneza chorób wywołanych przez ureolityczne szczepy bakterii jest bezpośrednim efektem hydrolizy mocznika, której towarzyszy wzrost pH oraz toksyczności amoniaku i jego pochodnych. Już w pierwszej połowie XX wieku wskazywano, że to właśnie enzymatyczna hydroliza mocznika z udziałem ureazy odgrywa istotną rolę w powstawaniu kamicy nerkowej. Obecne w moczu jony Ca(II) i Mg(II) wytrącają się w postaci nierozpuszczalnego struwitu oraz apatytów. Jednym z mikroorganizmów zaangażowanych w powstawanie kamieni nerkowych u ludzi jest *Proteus mirabilis*, u którego ureaza indukowana jest obecnością mocznika. Inny mikroorganizm, *Helicobacter pylori* kolonizuje wyłącznie nabłonek żołądka niektórych ssaków, w tym ludzi. Produkowana przez niego ureaza zapewnia bakteriom neutralizację bardzo kwaśnego środowiska poprzez ciągłą produkcję amoniaku co prowadzi do sforsowania warstwy śluzu, dotarcia do nabłonka a w konsekwencji wywołania choroby wrzodowej żołądka oraz dwunastnicy. Kontrolowanie hydrolizy mocznika przez wykorzystanie specyficznych i wydajnych inhibitorów ureaz stanowi obecnie istotny przedmiot badań na pograniczu wielu dziedzin. Do najlepiej zbadanych inhibitorów ureaz należą między innymi kwasy hydroksamowe, amidy kwasu fosforowego i ich estry, kwas borowy, związki tiolowe, chinony, pochodne kwasów fosfonowych i fosfinowych, związki heterocykliczne i polihydroksylowe a także jony metali i ich kompleksy. Wobec potrzeby

poszukiwania nowych, wydajniejszych i mniej cytotoksycznych inhibitorów ureaz uzasadniona staje się synteza nowych związków chemicznych oraz i ich optymalizacja inhibicyjna względem szeregu ureaz pochodzących głównie z organizmów patogennych. Przedmiotem ocenianej pracy jest analiza właściwości inhibitorowych szeregu związków organicznych jak i jonów metali względem uraz z *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori* oraz *Sporosarcina pasteurii*.

Rozprawa doktorska Pani Katarzyny Macegoniuk jest obszerna, liczy bowiem 195 stron. Została ona przygotowana według klasycznego układu prac eksperymentalnych i obejmuje następujące rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja oraz podsumowanie. Literatura cytowana w rozprawie jest imponująca i obejmuje aż 309 pozycji. Większość cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dwudziestoleciu. Praca zaopatrzona jest również w wykaz stosowanych skrótów.

Wstęp do rozprawy obejmuje 47 stron. Jest on napisany bardzo przejrzysto i wprowadza czytelnika w najważniejsze aspekty związane z budową, mechanizmem działania, regulacji ekspresji oraz znaczenia ureaz. W związku z tematyką pracy, Doktorantka skupia się głównie na opisie ureaz bakteryjnych. Przedstawia również najważniej klasy otrzymanych i scharakteryzowanych ureaz bakteryjnych. W związku z tym, że część mikroorganizmów produkujących te enzymy, jest patogenami, Autorka nie omieszkła również wspomnieć o najważniejszych dolegliwościach i chorobach związanych niepożądanym działaniem patogennych organizmów.

Cel pracy zawarty w jednostronicowym rozdziale, w jasny sposób przedstawia zamierzenia Autorki dotyczące opracowania wysoce selektywnych inhibitorów ureaz o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu infekcji wywołanych przez patogenne mikroorganizmy *Helicobacter pylori* oraz *Proteus mirabilis*. Autorka skrótowo przedstawia tu kolejne zamierzenie obejmujące otrzymanie i oczyszczenie enzymów, analizę inhibicyjną szeregu nieprzebadanych dotąd, względem tych enzymów, potencjalnych inhibitorów, selekcję najwydajniejszych, selektywnych i najmniej cytotoksycznych związków i wreszcie krystalizację enzymów ze scharakteryzowanymi inhibitorami.

W rozdziale Materiały i metody Autorka w sposób szczegółowy przedstawia liczne procedury oraz techniki związane z realizacją poszczególnych celów pracy. Spora część tego rozdziału poświęcona jest zatem licznym metodom biologii molekularnej, wieloetapowego oczyszczania białek

oraz badaniom enzymatycznym czy wreszcie krystalizacji. Autorka zaopatrzyła ten rozdział licznymi równaniami stosowanymi przy wyznaczaniu szeregow parametrów kinetycznych związanych z różnym typem inhibicji ureaz.

W kolejnej części pracy znajduje się opis uzyskanych wyników połączony wraz z ich dyskusją. Doktorantka przedstawia tu wyniki dotyczące optymalizacji warunków nadprodukcji rekombinowanej ureazy z *Helicobacter pylori* oraz podsumowanie licznych etapów oczyszczania natywnych ureaz ze *Sporosarcina pasteurii* oraz *Proteus mirabilis*. Wszystkie z wyżej wymienionych enzymów zostały oczyszczone do wysokiego stopnia czystości wymaganego w badaniach inhibicji i krystalizacji. Dla wszystkich enzymów zostały wyznaczone parametry K_m , V_{max} , k_{cat} oraz k_{cat}/K_m dla reakcji z mocznikiem. Doktorantka wskazuje tu na przyczyny, dla których powinowactwo mocznika do ureazu HPU jest największe argumentując niskim stężeniem substratu w żołądku. Właściwe byłoby tu również określenie wspomnianego powinowactwa w nieco zakwaszonym środowisku (np. pH pomiędzy 6-7), które jak wiemy ma wpływ na stałe wiązania enzym-substrat. Byłbym tu więc ostrożny w wyciąganiu dalekoidących wniosków.

W kolejnym rozdziale Autorka porusza bardzo ciekawą i zasadniczo trudną w charakterystyce inhibicyjnej kwestię hamowania aktywności enzymatycznej ureaz z udziałem jonów metali takich jak Cu(II), Pb(II), Cd(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Mn(II) oraz Fe(III). Bazując na dużej homologii w budowie ureaz bakteryjnych i ureaz roślinnych Doktorantka słusznie stawia tezę o ich podobnym działaniu. Wstęp do tego rozdziału jest zbyt długi i powinien zostać przesunięty do Wstępu pracy, w którym Autorka systematyzuje wiedzę dotyczącą znanych inhibitorów ureaz. Na duże uznanie zasługuje tu jednak dojrzała naukowo dyskusja dotycząca różnic w inhibicji Cu(II), Zn(II) i Cd(II) w stosunku do pozostałych jonów metali. Nie podoba mi się często pojawiające się tu określenie „kowalencyjna modyfikacja enzymu” w kontekście (oczywiście) jonów metali. Wiązania akceptorowo-donorowe są wiązaniami kowalencyjnymi i nie należy mieszać tego faktu z odmiennym powinowactwem do poszczególnych ligandów czy nawet białek. Znany jest powszechnie fakt wzrastającego powinowactwa jonów metali zgodnie z szeregiem Irvinga-Williamsa i nie wiąże się on z odmiennymi rodzajami wiązań chemicznych. Oczywiście w szczególnych wypadkach możemy mieć do czynienia z tworzeniem się adduktów metaloorganicznych ale nie powstają one w przypadku wiązania samych jonów metali a raczej ich kompleksów.

Inhibicja wywołana przez jony metali jest z natury odmienna od inhibicji spowodowanej przez asocjację związków organicznych. Jest to związane choćby z faktem, że jon metalu wiążąc się do

centrum aktywnego, lub w jego okolicach, musi zostać pozbawiony otoczki hydratacyjnej. Dysocjując z białka ulega on ponownej hydratacji czy kompleksowaniu. Powoduje to bardziej złożony charakter kinetyczny reakcji inhibicji. Rozcieńczenie roztworu kompleksu białko-inhibitor w celu określenia tego, czy reakcji jest odwracalna czy nie musi zaskutkować wyraźnym wzrostem dysocjacji kompleksu w przypadku jonów metali. Doktorantka powinna zastosować tu szczegółową analizę z udziałem selektywnych względem poszczególnych jonów chelatorów i to właśnie ona powinna być wytyczną w stosunku do określania rodzaju inhibicji metal-białko. Należy tu jednak pamiętać, że stała k_{off} jonu metalu jest ściśle zależna od stałej dysocjacji kompleksu metal-białko. W szczególnych przypadkach może ona wynosić kilkadziesiąt godzin czy dni i nawet spore rozcieńczenie kompleksu może nie zaskutkować jego dysocjacją.

Kolejna moja uwaga na temat inhibicji enzymów jonami metali dotyczy samego sposobu prowadzenia tego typu eksperymentów. Dane literaturowe na temat stałych inhibicji ureaz jonami metali jaki i rezultaty przedstawione przez Doktorantkę wskazują na ich nanomolowe wartości w przypadku niektórych jonów metali. Tak niska stała inhibicji nasuwa pytanie dotyczące wpływu jonów metali pochodzących z wody (nawet Milli-Q) mocznika (choćby cz.d.a) czy składników buforów na uzyskane wyniki. Istnieje bowiem duża szansa, że enzym (zwłaszcza w niskim stężeniu) jest częściowo wyhamowany przez zanieczyszczenia w momencie dodawania inhibitora organicznego czy to jonu metalu. Rozwiązaniem tego typu problemu w przypadku związków organicznych jest równoległe zastosowanie silnych chelatorów jonów metali przejściowych. W przypadku silnej inhibicji jonami metali trudno uniknąć jednak błędów. Zastosowanie chelatującej żywicy typu Chelex do wszelkich buforowanych roztworów czy to inhibitorów (z m pominięciem jonów metali) czy substratu może wyeliminować zagrożenia związane z niekontrolowaną inhibicją zanieczyszczeniami nieorganicznymi. W związku z powyższymi uwagami chciałbym prosić Doktorantkę o krytyczne ustosunkowanie się do własnych rezultatów w kontekście inhibicji ureaz jonami metali.

Stanowcza większość wyników rozprawy doktorskiej dotyczyła jednak inhibicji otrzymanych ureaz przez szereg klas związków organicznych, wśród których znalazły się m. in. pochodne kwasu bis(aminometylo)fosfinowego. Doktorantka scharakteryzowała właściwości inhibicyjne 18 związków względem trzech uzyskanych ureaz. Spośród nich, pochodna zawierająca sześciowęglowy łańcuch węgla charakteryzowała się największymi zdolnościami hamującymi. Wyniki tej części pracy zostały opublikowane niedawno w *ACS Medicinal Chemical Letters*. Kolejną grupą potencjalnych

inhibitorów były związki selenoorganiczne charakteryzujące się wysoką reaktywnością względem ugrupowań tiolowych. To właśnie zredukowana reszta cysteiny występująca w luźnej pętli przy centrum aktywnym jest jednym z celów badawczych przy projektowaniu nowych inhibitorów ureaz. Wszystkie użyte przez Doktorantkę związki charakteryzowały się słabszą inhibicją w porównaniu do ebselenu będącego punktem wyjścia w syntezie dalszych pochodnych.

Do kolejnych grup związków badanych pod względem właściwości hamujących aktywność ureaz należały akceptory Michaela w tym związki oparte na strukturze kwasu fumarowego, pochodne cyklopentenonu i cykloheksenonu, kwasu cynamonowego oraz niektóre związki fosfoorganiczne. Związki te były jak dotąd słabo poznaną grupą inhibitorów ureaz roślinnych i bakteryjnych a badania Autorki przyczyniły się do lepszego poznania mechanizmu inaktywacji badanych enzymów oraz odkrycia odwracalnych inhibitorów hamujących aktywność ureaz w mikro- i nanomolowym zakresie. Doktorantka w tej części pracy porównuje i dyskutuje szczegółowo różnice wynikające z aktywności inhibitorowej związków względem poszczególnych ureaz.

Bardzo ciekawym etapem badań były pomiary inhibitorowe wykonane wobec całych komórek *Escherichia coli*. Doktorantka w swojej pracy skupiła się jedynie na testowaniu dwóch grup związków, pochodnych kwasu bis(aminometylo)fosfinowego oraz związków selenoorganicznych i to właśnie te ostatnie wykazały się najlepszymi właściwościami hamującymi. Ostatnim etapem badań Pani Katarzyny Macegoniuk była krystalizacja natywnej urazy ze *Sporosarcina pasteurii* oraz rekombinowanej ureazy z *Helicobacter pylori* z wybranymi i przebadanymi przez Autorkę inhibitorami. Proces krystalizacji przeprowadzono zarówno przez nasączenie kryształów ureazy poszczególnymi związkami jak i poprzez współkrystalizację enzymu i inhibitora. Mimo sukcesów związanych z otrzymaniem kryształów, które dawały odpowiednią dyfrakcję nie udało się uzyskać wiarygodnych danych strukturalnych.

Nie mam większych zastrzeżeń do recenzowanej rozprawy. Rozprawę czyta się płynnie i widać, że Autorka poświęciła wiele czasu na jej pisanie. Fragmenty pracy mogłyby być częściowo skrócone co wpłynęłoby jeszcze bardziej na jej pozytywny odbiór. Rozprawa napisana jest w całości poprawnym językiem choć znalazłem w niej nieliczne błędy interpunkcyjne, powtórzenia a także jeden błąd ortograficzny (strona 102). Sama „ekspresja ureaz” jest skrótem myślowym, a właściwie kalką językową. Poprawnym określeniem na produkcję białek w systemie bakteryjnym jest ich „nadprodukcja” a sama ekspresja odnosi się rzecz jasna do ekspresji genu. Praca zaopatrzona jest w szereg bardzo starannie przygotowanych ilustracji, schematów i tabel. Ich estetyka oraz przejrzystość

należy bez wątplenia do atutów rozprawy. Szczególne przydatne w czytaniu pracy są krótkie podsumowania znajdujące się na końcu każdego rozdziału Wyniki i dyskusja. Pozwalają one dość swobodnie przejść przez obszerny tekst rozprawy. Niewątpliwie na wyróżnienie zasługuje multidyscyplinarny charakter pracy pani Katarzyny Macegoniuk. Posługuje się one swobodnie metodami zarówno biologii molekularnej, preparatyki białka i enzymologii. Mimo, że Doktorantka nie przeprowadzała osobiście syntezy testowanych związków to bardzo swobodnie odnajduje się w ich właściwościach chemicznych i różnicach strukturalnych. Szczególnie jest to zauważalne przy korelacji różnic właściwości inhibicyjnych poszczególnych związków z ich budową i właściwościami chemicznymi.

Poza wymienioną wcześniej prośbą w stosunku do Doktorantki chciałbym poprosić by przedyskutowała podczas obrony pracy doktorskiej następujące kwestie:

- Pisze Pani we wstępie, że ureazy pochodzenia glebowego są istotne dla rozkładu mocznika powstającego z degradacji katabolicznej białek i odgrywają ważną rolę w obiegu azotu. Z drugiej strony powodują zbytnią alkalizację gleby i konieczności stosowania inhibitorów. Moja prośba dotyczy przedyskutowania optymalnych warunków, w których są one najbardziej korzystne i najmniej szkodliwe.

- Badania inhibicji ureaz zostały przeprowadzone w buforze HEPES bez dodatku substancji redukujących. Jak wiadomo, ureazy posiadają wolne reszty cysteiny. Czy według Pani dodatek takich substancji zmienia aktywność białka a tym samym odpowiedź względem poszczególnych inhibitorów?

- Enzymy otrzymane przez Panią były wielokrotnie oczyszczane przez Panią w buforach zawierających EDTA. Czy jego dodatek ma wpływ na spadek aktywności enzymu w wyniku oddysocjowania jonów metali i czy kontrolowała Pani jego zawartość metodami analitycznym, takimi choćby jak ICP?

- Dwie ureazy będące celem Pani pracy były pozyskiwane jako tzw. natywne białka i wieloetapowy proces oczyszczania jest to całkowicie uzasadniony. Ureaz z *Helicobacter pylori* to białko rekombinowane. Dlaczego nie wykorzystwała Pani żadnej etykiety („tagu”) powinowactwa, której użycie ułatwiło by znacznie proces oczyszczania i miało wpływ na wydajność nadprodukcji?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Katarzyny Macegoniuk spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, potwierdzające wiedzę teoretyczną Autorki jak i umiejętności prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Macegoniuk do dalszych etapów postępowania doktorskiego. W związku z tym, że rozprawa ma charakter multidyscyplinarny, została przygotowana i zrealizowana w wyróżniający się sposób a przede wszystkim z tym, że spora część wyników pracy została już opublikowana wnioskuje do Rady Wydziału Chemii P.Wr. o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

