



Poznań, 18-12-2023

Prof. dr hab. Piotr Przybylski
Zakład Chemii Produktów Naturalnych

Recenzja osiągnięcia habilitacyjnego pt.
„Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych
narzędzi chemicznych”
oraz ogólnej aktywności naukowej dr. inż. Wioletty Rut

Charakterystyka dotychczasowej drogi naukowej Habilitantki
(obejmująca współpracę i odbyte staże)

Dr. inż. Wioletta Rut niemal całą swoją dotychczasową karierę naukową związała z prof. Marcinem Drągiem z Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Na początku 2012 roku (**30.01.2012 r. – inż. biotechnologii**) Habilitantka uzyskała z wyróżnieniem tytuł inżyniera na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej za pracę pt. „*Oligoeterole z roztworów melaminy w wyższych hydroksymetylowych pochodnych ketonu etylo-metylowego*”, gdzie promotorem pracy była dr. inż. Dorota Głowacz–Czerwonka. Prace **magisterską** (nadanie tytułu **mgr. biotechnologii 3.07.2013 r.** – praca pt. „*Określanie specyficzności substratowej legumainy przy użyciu substratów fluorogenicznych*”) jak i **doktorską** (nadanie stopnia **dr. nauk chemicznych 17.01.2018 r.** – dysertacja pt. „*Zastosowanie naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w otrzymywaniu aktywnych i specyficznych markerów dla proteaz cysteinowych i treoninowych*”), obie wyróżnione, dotyczące specyficzności substratowych peptydaz (proteaz) i wykorzystaniu tych informacji przy opracowywaniu ich markerów prowadziła już z nowym opiekunem naukowym, tj. we współpracy z prof. dr hab. Marcinem Drągiem z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Swoją pierwszą publikacją naukową w 2015 roku w *Biological Chemistry* (w 2 lata po pracy mgr.), właśnie z prof. Drągiem, jako pierwsza autorka (wiodąca autorka eksperymentalna) rozpoczęła swoją profesjonalną drogę naukową. Po obronie doktoratu Habilitantka w 2018 r. została zatrudniona na etacie asystentki naukowej (najpierw w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, później w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej) a następnie w tej samej jednostce od 1.10.2021 r. do chwili obecnej została zatrudniona na etacie adiunkta badawczo-dydaktycznego. Jednym z kryteriów pomyślnej procedury awansowej na stopień doktora habilitowanego w myśl zapisów Ustawy z dn. 20.08.2018 (art. 219 ust. 1 pkt. 3) jest wykazanie się „*istotną aktywnością naukową*”

albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej”, którą można zrealizować np. podczas badań w trakcie stażu podoktorskiego. **Habilitantka nie odbyła „sensu stricte” stażu zagranicznego (czego pośrednim dowodem może być brak „zamiejscowej” afiliacji) ale w badaniach, chociażby nad realizacją Osiągnięcia (prace H1-H5), jako autorka współkorespondencyjna współpracowała bardzo szeroko z naukowcami z zagranicznych ośrodków naukowych i naukowo-komercyjnych:** prof. Rolf Hilgenfeld i Xinyuanyuan Sun – Uniwersytet w Lubece-Niemcy; Linlin Zhang – Uniwersytet Oxford-UK; dr. Miklos Bekes – Arvinas Inc., New Heaven, USA; prof. Scott J. Snipas – Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute – San Diego, USA; prof. Tony Huang i dr. Stephanie Patchett – New York University School of Medicine, New York, USA; dr. Zongyang Lv – były pracownik University of Texas – San Antonio USA a obecnie doświadczony naukowiec pracujący w Takeda Therapeutics - San Diego, USA; dr. Digant Nayak i dr. Shaun K. Olsen - University of Texas – San Antonio, USA; dr. inż. Katarzyna Groborz – Genentech Inc, San Francisco, California, USA; dr. Farid El Oualid – UbiQ, Amsterdam, Holandia; prof. Johan Neyts, dr. Dirk Jochmans i Xinyu Wang (doktorant) – University of Leuven, Belgia, oraz z zamiejscowymi ośrodkami krajowymi takimi jak np. Uniwersytet Medyczny w Łodzi (prof. dr hab. med. Wojciech Młynarski, mgr. B. Pawlik). W materiałach przesłanych do oceny znajduje się informacja, że Habilitantka w lipcu 2022 r. odbyła krajowy staż naukowy w Pracowni Neurobiologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie (prof. Leszek Kaczmarek) gdzie przeprowadziła obrazowanie aktywności metaloproteinazy macierzowej 9 (MMP-9) *in vivo* za pomocą opracowanego markera chemicznego ale w materiałach przesłanych do oceny nie ma na ten temat wystarczających informacji, tj. nie jest podany czas trwania tego stażu ani jego rezultat (np. zdeponowane dane doświadczalne lub publikacja). **W myśl interpretacji przepisów Ustawy przez RDN recenzent nie powinien oceniać stażu ... ale jak stwierdzić czy w ogóle aktywność naukowa była realizowana w „więcej niż jednej uczelni” lub była „istotna” jeżeli nie odbywała się w ramach stypendium/wymiany/umowy (ta informacja byłaby w jakiś sposób weryfikowalna), habilitantka nie wskazała z tego pobytu publikacji/zdeponowanych danych np. w repozytoriach czy też nie posiada w żadnej ze swoich publikacji „zamiejscowej” afiliacji... Myślę, że w tym miejscu wymagana byłaby rozmowa z Habilitantką w celu wyjaśnienia sytuacji.** Habilitantka natomiast w ramach prowadzonych badań wykazała się szeroką i skuteczną współpracą naukową z naukowcami z kraju i zagranicy, czego dowodem są liczne publikacje, w których autorzy posiadają afiliacje z wielu różnych ośrodków. Można zatem antycypować, że ta umiejętność współpracy Habilitantki umożliwi i ułatwi Jej dalszy dynamiczny rozwój naukowy.

Ogólny dorobek naukowy (dane scjentometryczne) i udział w grantach

Ogólny dorobek naukowy

Dr inż. Wioletta Rut posiada dorobek naukowy składający się ze współautorstwa 31 publikacji w bazie Scopus (stan 1.12.2023), w tym 28 oryginalnych prac badawczych (z bazy JCR), jednej pracy przeglądowej i dwóch rozdziałów w monografiach. Dorobek ten powstał na przestrzeni lat 2015-2023 a więc obejmuje 8 lat co daje ogólnie wynik ~ 4 prace/rok. Habilitantka nie posiada pracy samodzielnej, prawdopodobnie z powodu interdyscyplinarnego obszaru zainteresowań naukowych gdzie wymagana jest intensywna współpraca. Z analizy dorobku naukowego Habilitantki wynika również, że nie występowała Ona do tej pory w roli samodzielnej autorki korespondującej (poza współautorstwem rozdziału w książce – H6), co jest przejawem udziału wielu grup w powstaniu wszystkich publikacji (też tych z cyklu habilitacyjnego H1-H5). **Natomiast atutem ocenianego wniosku habilitacyjnego jest oparcie dorobku naukowego głównie na publikacjach w bardzo prestiżowych (topowych) i rozpoznawalnych czasopismach w obszarze chemia/biologia.** Całkowity dorobek naukowy Habilitantki zbudowany jest na publikacjach w czasopismach, które warto wymienić: *Biological Chemistry* (3 prace; *De Gruyter*, IF ~ 3,5; MEiN = 70 pkt), *Scientific Reports* (3 prace; *De Gruyter*, IF ~ 3,5; MEiN = 140 pkt), *Antiviral Research* (2 prace; *Elsevier*, IF ~ 7,5; MEiN = 140 pkt), *Biochemical Journal* (2 prace; *Portland Press*, IF ~ 3,7; MEiN = 100 pkt), *Biochemie* (2 prace; *Elsevier*, IF ~ 4; MEiN = 100 pkt), *Cell Reports* (2 prace; *Cell press*, IF ~ 9; MEiN = 200 pkt), *Chemical Science* (2 prace; *RSC*, IF ~ 9; MEiN = 200 pkt), *Journal of Medicinal Chemistry* (2 prace; *ACS*, IF ~ 8; MEiN = 200 pkt), *Chemical Reviews* (1 praca, *ACS*, IF ~ 62, MEiN = 200 pkt), *Cell Chemical Biology* (1 praca; *Cell press*, IF ~ 9, MEiN = 140 pkt), *Cell Death & Differentiation* (1 praca, *Nature*, IF ~ 10, MEiN = 140 pkt), *ACS Central Science* (1 praca, *ACS*, IF ~ 18, MEiN = 200 pkt), *Science Advances* (1 praca, *AAAS*, IF~15, MEiN = 200 pkt), *Nature Chemical Biology* (1 praca, *Nature*, IF~16, MEiN = 200 pkt), *J. Am. Chem. Soc.* (1 praca, *ACS*, IF~15, MEiN = 200 pkt), *Nanoscale* (1 praca, *RSC*, IF~7, MEiN = 140 pkt) etc.; dane z grudnia 2023. **Same dane scjentometryczne i bibliometryczne jako takie nie podlegają ocenie w/g wytycznych RDN ale dorobek naukowy Habilitantki nie jest „przypadkowy” a jego dogłębna analiza nie ujawnia „pójścia na łatwiznę” podczas jego gromadzenia.** Indeks Hirscha Habilitantki wynosi $h=16$ przy liczbie cytowań niezależnych (bez autocytowań) równej 794 co daje ~ 25 cytowań na pracę. Najbardziej cytowaną pracą Habilitantki (liczba cytowań = 246) nie jest praca przeglądowa ... a praca eksperymentalna zatytułowana: „Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design” opublikowana w *Science Advances* 2020, 6, art

no. eabd4596 (praca H4), gdzie Habilitantka jest pierwszą i jednocześnie współkorespondującą autorką (!). W drugiej pod względem cytowalności prac z dorobku Habilitantki (liczba cytowań = 161), także eksperymentalnej (praca H5), opublikowanej w *Nature Chemical Biology*, 2021, 17, 222–228 również Habilitantka pełniła rolę pierwszej i współkorespondującej autorki (!). Należy zwrócić uwagę, że ~ 450 cytowań z całkowitej liczby 794 niezależnych zostało uzyskanych z cyklu prac H1-H6. Biorąc pod uwagę ilość publikacji Habilitantki z listy JCR widoczny jest również ich przyrost względem liczby prac opublikowanych do obrony doktoratu (10 prac do doktoratu /lata 2013-2017/ i 21 po obronie doktoratu /lata 2018-2023/. **Ogólny dorobek naukowy Habilitantki oraz jego przyrost po doktoracie a także rozpoznawalność prac w środowisku naukowym (cytowania) ukazują w mojej opinii właściwy „kurs” obrany przez Habilitantkę w drodze po kolejny stopień naukowy.**

Udział w grantach i patentach

Habilitantka zrealizowała swój projekt NCN **Preludium 9** (nr. 2015/17/N/ST5/03072; lata 2016-2018) i trzy granty wewnętrzne na WCh PWr (nr. 0402/0199/16 lata 2016-2017; nr. B50533/W-3 lata 2015-2016; i nr. B40037/W-3 lata 2014-2015) a aktualnie zaangażowana jest jako kierowniczka w dwa projekty NCN **Sonata 18** (2022/47/D/NZ6/02176, lata 2023-obecnie) i **Opus 21** (2021/41/B/ST4/02789, od 14.11.2022 – obecnie). Brała udział także w realizacji 3 innych projektów prof. Marcina Drąga (NCN, FNP). **A zatem dr inż. Wioletta Rut wykazała się aktywnością w samodzielnym pozyskiwaniu środków na badania i zaangażowaniem w realizację grantów – co jest w mojej opinii istotnym elementem oceny samodzielności pracowników naukowych.** Habilitantka jest współautorką 1 zgłoszenia patentowego pt. „Compounds for the treatment or diagnosis of COVID-19”, nr. WO 2021/246886 A1, PCT/PL2021/050037 a także w latach 2018-2020 była zaangażowana w wykonanie ekspertyzy dla firmy Genentech (San Francisco, CA, USA). Japońska firma *Peptide Institute Inc.* zainteresowała się kupnem sekwencji peptydowych substratów i inhibitora opracowanego m.in. przez Habilitantkę do badania proteazy SARS-CoV-2 M^{pro} (umowy pomiędzy firmą i PWr w 2020 i 2021) **co wskazuje na istotny wymiar praktyczny wyników otrzymanych przez Habilitantkę.**

Ocena osiągnięcia naukowego (cyklu prac H1-H6), opublikowanego w latach 2017-2023

Zgodnie z zapisem *Ustawy* z dnia 20 lipca 2018 (art. 219 ust. 1 pkt. 2) „...stopień doktora habilitowanego nadaje się osobie, która posiada w dorobku osiągnięcia naukowe albo artystyczne, stanowiące znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny, w tym co najmniej: b) **1 cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie**

naukowych lub w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b, ...". **Na wstępie należy zaznaczyć, że Habilitantka wybrała prace H1-H6, opublikowane w latach 2017-2023, które generalnie spełniają powyższe kryterium.** Jednak, zważywszy na datę uzyskania przez Habilitantkę stopnia doktora (17.01.2018r.) dyskusyjnym jest włączenie pracy H1 (**W. Rut**, L. Zhang, P. Kasperkiewicz, M. Poreba, R. Hilgenfeld, M. Drąg[☒] „Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease” *Antiviral Research*, 2017, 139, 88-94) do cyklu habilitacyjnego artykułów gdyż widnieją przy niej następujące informacje: „received 22 November 2016, revised 19 December 2016, accepted 21 December 2016, available online 26 December 2016, version of record 4 January 2017” – czyli biorąc pod uwagę dane z wydawnictwa można przypuszczać, że **wyniki do publikacji zostały zebrane na około 1,5-2 lat przed uzyskaniem stopnia doktora a więc publikacja należy do dorobku przed doktoratem a nie po doktoracie, nawet jeśli nie była bezpośrednio przedmiotem doktoratu...** Nie rozumiem dlaczego więc Habilitantka mając w dorobku tyle interesujących i wartościowych prac po doktoracie włączyła publikację H1 do cyklu. Gdybyśmy w ten sposób postępowali zwyczajowo to stworzyłoby to precedens np. wystarczyłoby opublikować w trakcie doktoratu jedną pracę spełniając wymóg ustawy a kolejne były by „kapitałem” gromadzonym na przyszłą habilitację, profesurę... już podczas trwania doktoratu... Pewnym wyjaśnieniem tej sytuacji może być fakt, że kolejna praca z cyklu - H2 (**W. Rut**[☒], K. Groborz, L. Zhang, S. Modrzycka, M. Poreba, R. Hilgenfeld, M. Drąg[☒] „Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate dengue from Zika and West Nile viruses”, *Antiviral Research*, 2020, 175, 104731) dotyczy również badania specyficzności substratowej proteaz wirusowych typu NS2B-NS3 a więc występuje tutaj pewna kontynuacja wątku tematycznego.

Prace H1 i H2 dotyczą projektowania inhibitorów (markerów) proteaz NS2B-NS3 flawiwirusów: Zika (ZIKV), zachodniego Nilu (WNV) i Dengi (DENV2), gdzie w obu pracach Habilitantka korzystała z narzędzia HyCoSuL, opracowanego i opublikowanego wcześniej w grupie prof. Marcina Drąga w 2014 roku (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 2518-1523 i *Cell Death Differ* 2014, 21, 1482-1492). W pracach dotyczących opracowania narzędzia HyCoSuL pojawiła się idea wykorzystania biblioteki „nienaturalnych” aminokwasów aby zwiększyć czułość metody i selektywność substratową enzymów proteolitycznych w celu skonstruowania efektywniejszych markerów ich działania. Ze względu na to iż nie ma dostępnej szczepionki

przeciwko wirusowi Zika Habilitantka w pracy **H1** (jak i **H2**) zainteresowała się inhibicją działania peptydaz NS2B-NS3^{pro}, które są kluczowe w procesach replikacji wirusa i składania wirionów ZIKV. Na wstępie dzięki bibliotece HyCoSuL i zdefiniowanej biblioteki w miejscu P1 (Ac-A-R-L-P1-ACC/fluorofor/; P1 - naturalny i nienaturalny aminokwas) określiła sprawnie profil specyficzności substratowej w miejscach P4-P1. Należy zauważyć, że użyte przez Habilitantkę określenie „naturalne i nienaturalne aminokwasy”, w pracy **H1** i innych, odnosi się prawdopodobnie do szeregu *L*- i *D*- i że w takim ujęciu dotyczy aminokwasów naturalnych i nienaturalnych w stosunku do naszego organizmu... ale nie w stosunku do mikroorganizmów, które potrafią biosyntezywać peptydy z obu szeregów stereoizomerycznych aminokwasów... Analiza przeprowadzona przez Habilitantkę wykazała wąską specyficzność w NS2B-NS3^{pro} w kieszeniach rozpoznających substrat (S3-S1) natomiast na podstawie analizy struktury enzymu w kryształach zauważyła brak zdefiniowanej specyficzności w kieszeni wiążącej S4. Ta ostatnia informacja pozwoliła Habilitantce na wzięciu udziału w syntezie szeregu peptydowych substratów fluorogenicznych ze zmiennym aminokwasem w pozycji P4 i przetestowanie ich pod kątem wyznaczenia k_{kat}/K_M w celu wyłonienia selektywnej sekwencji peptydowej. Po wybraniu „najlepszego” substratu dla enzymu ZIKV NS2B-NS3^{pro} o sekwencji Ac-dR-K-Orn-R-ACC zawierającej D-aminokwas w miejscu P4, Habilitantka przekształciła go syntetycznie w marker chemiczny wprowadzając syntetycznie na końcu C odpowiedni fosfonian zamiast znacznika a na końcu N biotynę umożliwiającą detekcję kompleksu enzym-marker. W ten sposób skonstruowany marker WRPK3 z powodzeniem znakował proteazę już przy stężeniu 16 nM. Te interesujące i nowatorskie badania poszukiwania „perfekcyjnych” sekwencji peptydowych, dekorowanych znacznikiem fluorescencyjnym i „kotwicą”, mającą na celu trwałe (kowalencyjne) wiązanie z białkiem, zostały zrealizowane z udziałem Habilitantki jako pierwszej autorki ale nie korespondencyjnej (była jeszcze przed uzyskaniem doktoratu...). Oświadczenia współautorów wskazują na istotną rolę dr. inż. W. Rut w powstaniu tej interesującej pracy: zaprojektowanie i synteza zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych (dr. hab. M. Poręba), oczyszczenie i dostarczenie proteaz wirusowych (L. Zhang, prof. R. Hilgenfeld), analiza Western Blott (dr. inż. W. Rut + dr. P. Kasperkiewicz-Wasilewska, dr. hab. M. Poręba), synteza markera (dr. inż. W. Rut + dr. P. Kasperkiewicz-Wasilewska), edycja pracy (dr. inż. W. Rut + dr. hab. M. Poręba + prof. M. Drag), koncepcja pracy i zaplanowanie eksperymentów (dr. inż. W. Rut + prof. M. Drag), napisanie manuskryptu (dr. inż. W. Rut + prof. M. Drag). W pracy **H2** (wchodzącej formalnie w skład podoktorskiego dorobku), powiązanej ściśle tematycznie z pracą **H1**, wkład merytoryczny Habilitantki w powstanie pracy był jeszcze bardziej zauważalny, tj. była Ona pierwszą i współkorespondencyjną autorką kształtującą koncepcję pracy bardziej samodzielnie,

samodzielnie redagującą pierwszą wersję manuskryptu i przeprowadzającą docelowe eksperymenty z markerem chemicznym i trzema proteazami różnych wirusów. W pracy H2 Habilitantka, użyła podobnej metodyki jak w pracy H1 ale dzięki swojemu wcześniejszemu doświadczeniu, postawiła sobie wyżej wyzwanie naukowe w postaci skonstruowania markera, który jest w stanie rozróżnić poziom aktywności proteaz wirusowych NS2B-NS3^{pro} różnych wirusów ZIKV, WNV, DENV). Wykorzystanie biblioteki HyCoSuL umożliwiło wstępne ustalenia odnośnie pokrywającej się specyficzności NS2B-NS3^{pro} ZIKV i WNV i szerszego profilu tolerancji substratów w miejscach P3 i P4 dla wirusowej NS2B-NS3^{pro} DENV. Z kolei badania kinetyczne, oprócz ustalenia podobnej specyficzności substratowej, pozwoliły wywnioskować, że w miejscach P2 i P4 proteaza DENV2 wyróżnia się nieco inną specyficznością od proteaz ZIKV i WNV. Habilitantka osiągnęła cel pośredni z powodzeniem ustalając sekwencję hydrolizowaną przez proteazę DENV2 (S15D) oraz dwie inne sekwencje, słabo hydrolizowane przez proteazę DENV2, ale rozpoznawane przez proteazy ZIKV i WNV. W kolejnym kroku konstruowania markerów wyłonione sekwencje peptydowe zostały udekorowane biotyną oraz „kotwicą” fosfonianową i przetestowane techniką Western Blot w kierunku reaktywności/selektywności wobec trzech proteaz wirusowych. **Wybrane markery po testach selektywności były zastosowane wobec koktajlu proteaz, gdzie np. marker ABP_S15D wykazał stosunkowo dużą selektywność wobec NS2B-NS3^{pro} DENV2.** Wyniki osiągnięte w obu pracach wnoszą istotny nowatorski wkład w naukę światową w kontekście projektowania i zastosowania selektywnych markerów kluczowych białek patogenów wirusowych.

Prace H4 (Rut W.[✉], Lv Z., Zmudzinski M., Patchett S., Nayak D., Snipas S., Oualid F.E., Huang T.T.[✉], Bekes M.[✉], Drag M.[✉], Olsen S.K.[✉] *Science Advances*, 2020, 6(42), 1-13) i H5 (Rut W.[✉], Groborz K., Zhang L., Sun X., Zmudzinski M., Pawlik B., Wang X., Jochmans D., Neyts J., Mlynarski W., Hilgenfeld R., Drag M.[✉] *Nature Chemical Biology*, 2021, 17, 222-228.), w których Habilitantka była pierwszą autorką i jednocześnie współkorespondującą, dotyczyły również wirusowych proteaz ale, że powstały one w czasach pandemii i niejako w „odpowiedzi” na Covid-19, skupiły się na zaprojektowaniu inhibitorów peptydowych jako sond wskazujących poziom aktywności proteaz SARS-CoV M^{pro} i SARS-CoV-2 M^{pro} (główna proteaza) czy SARS-CoV-2 PL^{pro} (proteaza cysteinowa papainopodobna). Być może inspiracją do tych badań były wcześniejsze publikacje odnośnie atrakcyjności tych proteaz jako „*molecular targets*” w opracowywaniu nowych środków przeciwwirusowych (*J. Med. Chem.* 2016, 59, 6595, *FEBS J.* 2014, 281, 4085, etc.) i uznanie w lutym 2020 roku proteaz: SARS-CoV M^{pro} (PDB 1Q2W), SARS-CoV PL^{pro} (PDB 4OW0) i SARS-CoV-2 M^{pro} (2019-nCoV; PDB 6LU7) w strukturach kompleksów z inhibitorem

za „*molecules of the month*” przez portal PDB. Analiza oświadczeń współautorów prac H4 i H5, pomimo obecności wielu autorów współkorespondencyjnych jak w pracy H4, wskazuje na „większościowy” i wiodący wkład dr. inż. Wioletty Rut w zaplanowanie i zrealizowanie badań. Niespójne wydaje się jedynie oświadczenie załączone przez Z. Lv do pracy H4, ponieważ w publikacji z Habilitantką oboje są zaznaczeni jako „**These Authors contributed equally to this work*” podczas gdy w oświadczeniu współpracownik deklaruje „... *I would like to confirm the major contribution of Dr. Wioletta Rut to our shared manuscript.*”... W pracy H5 Habilitantka, dzięki wirusowym proteazom dostarczonym przez prof. Hilgenfelda oraz narzędziu HyCoSuL określiła szczegółowo specyficzność substratową proteaz SARS-CoV M^{pro} i SARS-CoV-2 M^{pro} i zauważyła, że jest ona bardzo podobna w obu przypadkach. Optymalną sekwencją okazała się Abu-DY-L-Q a analiza aktywności inhibitorów proteaz na bazie tej sekwencji, z wykorzystaniem rekombinowanych enzymów i lizatów komórkowych (HeLa i HEK-293-T), umożliwiła konstrukcję kilku efektywnych markerów. Jeden z nich, tj. biotylna-PEG(4)-Abu-Tle-L-Q-VS, zawierający znacznik biotylny, „kotwicę” winylosulfonową oraz w sekwencji dwa nieproteinogenne aminokwasy (homoalaninę /Abu/ i *tert*-Bu glicynę /Tle/, został wykryształizowany z proteazą wirusową i określona została struktura tego kompleksu przez grupę prof. Hilgenfelda (PDB 6Z2E). Kluczowe badania na zakażonych wirusem SARS-CoV-2 ludzkich komórkach wątroby ujawniły, że jeden z inhibitorów **Ac-QS5-VS (Ac-Abu-DY-L-Q-VS) wykazał porównywalną siłę hamowania replikacji wirusa EC₅₀ = 3.7 μM przy CC₅₀ > 100 μM z ramdesivirem (EC₅₀ ~1.2 μM przy CC₅₀ = 87 μM) przy jednocześnie niższej toksyczności.** Habilitantka, we współpracy z grupą prof. Młynarskiego (Uniwersytet Medyczny w Łodzi)-badania z udziałem mikroskopu konfokalnego, ustaliła, że skonstruowany marker może być użyty analitycznie do określania występowania infekcji Covid-19 i jej stopnia zaawansowania w próbkach pacjentów szpitalnych pobranych z nosogardzieli. Zarówno ustalona struktura w kryształach inhibitora z proteazą jak i badania aktywności przeciwwirusowej rzucają nowe światło na projektowanie przyszłych potencjalnych środków przeciwwirusowych a przetestowanie praktyczne wyłonionego markera jest bardzo ważnym osiągnięciem na polu analityki biomedycznej co przełożyło się na liczne cytowania pracy H5. W pracy H4 natomiast Habilitantka wraz ze współautorami scharakteryzowała po raz pierwszy na świecie odpowiednik znanej proteazy cysteinowej papainopodobnej wirusa SARS-CoV (SARS-CoV PL^{pro} – nadmienionej wcześniej) dla wirusa SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 PL^{pro}). Mając na uwadze podobieństwa w mechanizmach działania koronawirusów i wykorzystując wiedzę z badań nad SARS-CoV PL^{pro}, Habilitantka określiła opisaną już powyżej metodyką z użyciem narzędzia HyCoSuL specyficzność substratową i wykazała, zakresy wąskiej specyficzności w pozycji P2 i P4 (w P2 tylko G) oraz szerokiej

specyficzności w pozycji P3. Wykorzystując już znaną metodykę zaproponowała i zsyntezowała dwa kowalencyjne inhibitory (VIR250 i VIR251), charakteryzujące się wysoką selektywnością względem wirusowych proteaz PL^{pro}, oraz zostały określone struktury kompleksów tych obu inhibitorów z proteazą PL^{pro} SARS-CoV-2 przez Lv i prof. Olsena (PDB 6WUU, PDB 6WX4). **Otrzymane wyniki są dobrą podstawą przyszłych, bardziej rozszerzonych badań w kierunku projektowania silniejszych inhibitorów tej proteazy a wykazane podobieństwa strukturalne z proteazą SARS-CoV PL^{pro} ułatwią wykorzystanie znanych już inhibitorów do inhibicji proteazy SARS-CoV-2 PL^{pro} oraz mogą ułatwić zwalczanie przyszłych wariantów koronawirusów.**

Kolejny wątek tematyczny w ramach cyklu publikacji Habilitantki związany jest z proteazami deubikwytynującymi (prace H3: **Rut W**[☒], Żmudziński M., Snipas S.J., Bekes M., Huang T.T., Drąg M.[☒] *Chemical Science*, 2020, 11(23), 6058-6069 i rozdział w książce H6: **Rut W**[☒], Żmudziński M., Drąg M., "Design and Synthesis of Ubiquitin-Based Chemical Tools with Unnatural Amino Acids for Selective Detection of Deubiquitinases" *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2591, 59-78. Cykl ubikwytynacji białek, czyli wielokrotna ubikwytynacja białek z wytworzeniem „warkoczy” oligo-Ub poprzez wiązanie izopeptydowe jest kluczowy z perspektywy likwidacji nieprawidłowych białek w organizmie. Jakikolwiek zaburzenia kaskadowego transferu ubikwityny-Ubq (funkcjonowanie enzymów: aktywującego, sprzęgającego i ligazy ubikwytynowej) na białko przeznaczone do degradacji w proteasomie bądź w samym cyklu ubikwytynacji związane są z pojawieniem się np. infekcji wirusowych, chorób neurodegeneracyjnych czy też nowotworowych. Za odkrycie cyklu ubikwytynacji białek A. Ciechanover, A. Herszko i I. Rose otrzymali w 2004 r. Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii, natomiast Habilitantkę interesowała kwestia nie tyle ubikwytynacji co deubikwytynacji białek z udziałem deubikwytynaz (DUbq), które w większości są proteazami cysteinowymi (z wyjątkiem nielicznych metaloproteaz). Habilitantka zmierzyła się z wyzwaniem otrzymania selektywnych markerów aktywności deubikwytynaz takich jak ludzkiej karboksy-terminalnej hydrolazy ubikwytynowej (UCH-L3) i wirusowej papaino-podobnej proteazy koronawirusa środkowowschodniego syndromu oddechowego (MERS-CoV PL^{pro}). Te dwa enzymy są „wrażliwe” na sekwencję przy końcu C Ubq: LRGG, która to odpowiednio znakowana fluoroforem (UbACC), nie dawała selektywności w rozróżnianiu poziomu aktywności tych proteaz. Habilitantka, z będącym pod opieką na studium doktoranckim mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim, wyznaczyła pełen profil preferencji substratowych i wyłoniła 3 sekwencje terapeptydowe dla tych enzymów deubikwytynujących za pomocą narzędzi kombinatorycznych HyCoSuL i zdefiniowanej biblioteki P2, zawierającej nieproteinogenne aminokwasy. W kolejnym

kroku Habilitantka wraz z M. Żmudzińskim zsyntezowała w sposób dobrze przemyślany pochodne Ub w trzech fragmentach z użyciem metody SPPS (z Fmoc), co umożliwiło uzyskanie pożądanej czystości, włączenie nienaturalnych aminokwasów od końca C i „uzbrojenie” końca N w linkery i znaczniki. Natywna chemiczna ligacja trzech przygotowanych fragmentów metodą NCL, dzięki wprowadzonym resztą Cys - dalej przekształconym w Ala, i dodanie znacznika dało odpowiednie modyfikacje Ubq. Uzyskane w ten sposób markery Ubq, posiadające biotynę w testach kinetycznych i w testach w lizatach komórkowych oraz z użyciem przeciwciał okazały się bardziej selektywne niż Ub-ACC, B-Ubq-VME względem badanych UCH-L3 i MERS-CoV PL^{pro}. Ta nowatorska i efektywna strategia konstruowania selektywnych markerów deubikwitynaz opracowana przez Habilitantkę, przy jej wkładzie wiodącym w realizację badań jak wskazują oświadczenia współautorów, **daje pewne obiecujące perspektywy w kontekście inspiracji do tworzenia kolejnych narzędzi do analizowania poziomu aktywności tego typu enzymów rozpoznających nie tylko Ubq ale też małe białka z rodziny modyfikujących takie jak SUMO czy małego białka sekrecyjnego ISG15.** Ostatni element cyklu – praca H6, będący rozdziałem w opracowaniu książkowym wyd. Springer i bazujący bezpośrednio na osiągnięciach metodycznych pracy H3, **jest dobrym uzupełnieniem tematu projektowania markerów DUBq od strony praktycznej.** W tym rozdziale Habilitantka opisuje niejako 'guide' krok po kroku zwracając uwagę na problemy, które można napotkać przy stosowaniu metodyki opisanej w pracy H3. **Ważnym jest, że w tym opracowaniu książkowym, Habilitantka jest wyłączną autorką korespondencyjną co potwierdza Jej istotną rolę w powstanie pracy H3 ... zadanie niełatwe w świetle kompetencji prof. M. Drąga (autora współkorespondencyjnego w pracach H1-H5).**

Habilitantka wskazuje w autoreferacie także szereg innych prac uzupełniających cykl prac H1-H6 (prace S1-S15), które powstały po doktoracie, często bardzo powiązanych tematycznie z ocenianym Osiągnięciem i ukazujące znacznie szerszy obszar Jej zainteresowań (kaspazy, katepsyny, proteazy FSAP /Factor-VII-activating protease/czy proteasom/ etc.), w których też niejednokrotnie wniosła znaczny a nawet wiodący wkład w powstanie prac, np. prace oznaczone jako S11 i S14.

Podsumowanie oceny monotematycznego cyklu H1-H6

Prace zawarte w cyklu H1-H6 niosą ze sobą duży ładunek merytoryczny, zmieniający stan aktualnej wiedzy i posiadają duży wymiar praktyczny w projektowaniu narzędzi diagnostycznych (markerów) w formie inhibitorów, rozróżniających działanie kluczowych biologicznie proteaz (przy czym praca H1 nie powinna zostać włączona formalnie w cykl). We wszystkich pracach na wstępnym etapie projektowania było używane narzędzie, wcześniej opracowane przez grupę prof.

M. Drąga (HyCoSuL), oraz analogiczny schemat działania (metodyka), jednak od zaplanowania badań po ich uwieńczenie (otrzymanie markera dla poszczególnych proteaz) Habilitantka jest niewątpliwie wiodącą autorką eksperymentalną, wpływającą w sposób istotny na kreowanie koncepcji badań. Kluczowa rola Habilitantki odzwierciedla się jednoznacznie w roli pierwszej Autorki we wszystkich pracach z cyklu H1-H6.

Dorobek organizacyjny w zakresie nauki (w tym promotorstwo pomocnicze) i dydaktyki, udział w komisjach eksperckich, prezentacja wyników na konferencjach i uzyskane nagrody

Dorobek organizacyjny w zakresie nauki (w tym promotorstwo pomocnicze)

Aktualnie Habilitantka też jest **promotorką pomocniczą** w przewodzie doktorskim mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego, gdzie prof. M. Drąg pełni funkcję promotora (zaplanowana obrona na wrzesień 2024). Dr inż. Wioletta Rut prowadzi zajęcia dydaktyczne dla WCh PWr od 2021 roku w zakresie chemii organicznej, chemii produktów naturalnych i analityki w biotechnologii. Habilitantka od roku 2019 wykonywała recenzje dla 13 różnych czasopism naukowych (w sumie 24 recenzje), w tym prestiżowych takich jak: *Angewandte Chemie*, *Chemical Sciences*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *BBA-Reviews of Cancer*, *ACS Infectious Diseases*, *Molecular Aspects of Medicine*, *Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry*, co można zinterpretować jako wyraz uznania Jej kompetencji na polu naukowym. Jej wartość jako ekspertki doceniła *Graduate Women in Science* i *Agency for Health Quality and Assessment of Catalonia* powierzając Jej ocenę wniosków grantowych.

Prezentacja wyników na konferencjach i uzyskane nagrody

Habilitantka po uzyskaniu stopnia doktora prezentowała wyniki swoich prac naukowych dotyczących głównie proteaz, funkcji proteasomów i deubikwitynacji białek w formie **3 wykładów na zaproszenie /2 w Polsce (Topacz Ślęza, Wrocław)** a trzeci nie został sprecyzowany gdzie był prezentowany... (patrz zał. nr. 4 wniosku)/, **3 komunikatów ustnych /Warszawa, Barga (Włochy) i Tiers am Rosengarten (Włochy)/ i 2 posterów /Włochy, Czechy/**. Biorąc pod uwagę zestawienie prezentacji przed (12 prezentacji) i po doktoracie (8 prezentacji) **widoczny jest spadek ilości wystąpień na konferencjach** co można częściowo wytłumaczyć czasem pandemii covid-19. Niezrozumiałym jest jednak fakt, iż posiadając tak prestiżowy i ciekawy naukowo dorobek, Habilitantka po doktoracie (od 2018 r.) **zdecydowała się wystąpić tylko z dwoma zagranicznymi komunikatami ustnymi „reklamującymi” wyniki.**

Mając na uwadze z powodzeniem uprawianą tematykę naukową przez Habilitantkę, dotyczącą m.in. wirusowych proteaz deubikwitujących (MERS-CoV), SARS i SARS-Cov-2, a zatem obejmującą tak aktualny „hot topic” dla bezpieczeństwa zdrowia publicznego, oczekiwanym było, że osiągnięcia w tym zakresie będą adekwatnie dostrzeżone i nagrodzone. Zgodnie z powyższym **Habilitantka jest laureatką wielu nagród i wyróżnień za działalność naukową i popularyzatorską**, m.in: Nagrody im. prof. Binieckiego (2022), Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców (2021), nagrody Super Diament Wrocławia (2021), Stypendium Start 2019 FNP (2019), wielokrotnych nagród Rektora PWr (2020, 2019, 2017, 2016), Stypendium 17 edycji programu L'Oréal Polska Dla Kobiet i Nauki (2017), nagród konferencyjnych (za prezentację we Włoszech, granty na wyjazdy) i otrzymała Srebrny Krzyż Zasługi od Prezydenta RP za zasługi w działalności na rzecz zwalczania zagrożeń biologicznych oraz w działalności naukowo-badawczej (2020).

Konkluzja

Zważywszy na to, że **Osiągnięcia H1-H6** jak i cały dorobek dr. inż. Wioletty Rut, opublikowane w większości w uznanych międzynarodowo czasopismach z listy JCR oraz listy ministerialnej, stanowią oryginalny i istotny wkład w uprawianą dyscyplinę naukową, kierując się kryteriami obowiązującymi względem ocenianego wniosku w ramach Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20.07.2018 r., w tym w szczególności art. 219 ust. 1 pkt. 2, **przedkładam Komisji habilitacyjnej oraz Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek popierający dopuszczenie dr. inż. Wioletty Rut do dalszych etapów postępowania awansowego mającego na celu nadanie stopnia dr hab. w dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w dyscyplinie Nauki Chemiczne.**

Wnioskuje także o przeprowadzenie kolokwium habilitacyjnego w celu przeprowadzenia obiektywnej oceny wniosku.