



OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Pawła Morawiaka

pt. „**Peptydowe mimetyki hydrolaz**”

Pan mgr Paweł Morawiak wykonał pracę doktorską zatytułowaną: „Peptydowe mimetyki hydrolaz” pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. inż. Łukasza Berlickiego na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Przedmiotem pracy jest projektowanie i synteza układów polipeptydowych, które mogą pełnić funkcje enzymatyczne. O tym, że podjęte zadanie badawcze jest ambitne i wpisuje się w tendencje rozwojowe chemii biologicznej świadczy tegoroczna Nagroda Nobla, przyznana między innymi za projektowanie białek o założonej strukturze i właściwościach. W swoich badaniach, jako podstawę do projektowania mimetyków hydrolaz Paweł Morawiak wykorzystał trzy układy: Helikalne peptydy zawierające cykliczny β -aminokwas, analogi palca cynkowego i analogi białka mini-białka MvaT. Niektóre z analogów tego białka zostały zmodyfikowane przez wprowadzenia do sekwencji reszt kwasu trans-(1S,2S)-aminocyklopentanokarboksylowego. Reszty te zostały wbudowane do helikalnych obszarów mini-białka. Pozwoliło to na otrzymanie polipeptydów o zwiększonej w stosunku do MvaT stabilności strukturalnej. Wszystkie te układy posłużyły jako rusztowania molekularne do projektowania esteraz zawierających w centrum aktywnym resztę cysteiny lub jon cynku. Badania polegały na zaprojektowaniu *ab initio* nowych, nie istniejących hydrolaz, przeprowadzeniu syntezy chemicznej i zbadania ich struktury przestrzennej a także określeniu aktywności enzymatycznej. Sekwencje wybrane jako rusztowania molekularne do zaprojektowania mimetyków enzymów były wystarczająco krótkie, aby umożliwić efektywną syntezę na nośniku stałym jednak wykazywały tendencję do spontanicznego przyjmowania stabilnych struktur przestrzennych. Przeprowadzenie zaplanowanych badań wymagało syntezy pochodnej fluorenylometoksykarbonylowej β -aminokwasu. Synteza ta została przeprowadzona zgodnie z procedurą, która była wcześniej opisana w literaturze naukowej. Substratem wykorzystanym w syntezie był kwas adypinowy. Kluczowym etapem tej syntezy jest utworzenie centrum chiralności. W tym celu zastosowano chiralną addycję aminy w pozycji β pierścienia cyklopentenowego. W zależności od konfiguracji zastosowanej aminy możliwe było otrzymanie dwóch możliwych enancjomerów. Synteza ta jest szczegółowo opisana w eksperymentalnej części pracy doktorskiej. Pewne zastrzeżenia może budzić charakterystyka otrzymanych związków. W kilku przypadkach (t-butyłowy ester 2-hydroksy-1-cyklopentanokarboksylowego i t-butyłowy ester kwasu 2-metylosulfono-1-pentanokarboksylowego) nie zostały podane dane analityczne produktów przejściowych wykorzystywanych w syntezie. Wprawdzie opisany eksperyment odtwarza syntezę opisaną w literaturze, a końcowy produkt jest analitycznie scharakteryzowany w sposób nie budzący wątpliwości, jednak podanie możliwie pełnych danych analitycznych byłoby w tym



przypadku wskazane. Warto byłoby też uwzględnić dane dotyczące stereoselektywności addycji aminy.

Ponieważ całkowita wydajność pochodnej aminokwasu jest relatywnie niska (ok1%) nasuwa się pytanie o alternatywne ścieżki syntezy tej substancji. Czy autor rozpatrywał inne metody otrzymywania kwasu trans-(1S,2S)-aminocyklopentanokarboksylowego i czy je przetestował?

Peptydy otrzymano z wykorzystaniem automatycznego syntezyzatora. Synteza została przeprowadzona wykorzystaniem klasycznej strategii Fmoc zaś jako aktywator w reakcjach sprzęgania został wykorzystany układ diizopropylodabodiiimid-oxyma. Ta metoda sprzęgania daje bardzo dobre wydajności produktów i jest obecnie powszechnie stosowana. Niektóre z otrzymanych peptydów zawierały ponad 40 reszt aminokwasowych. Otrzymanie tak dużych układów stanowi poważne wyzwanie, zwłaszcza, że autor zsyntezował blisko 100 takich peptydów. Wszystkie te związki zostały scharakteryzowane analitycznie i są dla nich podane czasy retencji oraz wartości *m/z*. Wartości te zostały wyznaczone z dużą dokładnością wynikającą z zastosowania wysokorozdzielczego spektrometru mas Q-TOF (Tabela 60), jednak sposób prezentacji danych odbiega od powszechnie stosowanego. W tabeli brakuje ładunków jonów i wzorów sumarycznych zastosowanych do obliczenia teoretycznych wartości *m/z* dla zsyntezowanych związków. Wzorcowy sposób przedstawiania takiej serii danych dla bardzo podobnych układów można znaleźć w pracy (Miniprotein-Based Artificial Retroaldolase, Ozga K, Berlicki K. *ACSc Catalysis* 12 (24) , pp.15424-15430), pochodzącej z zespołu, w którym powstała oceniana praca doktorska. Uważam też, że interesujące byłoby przedstawienie chromatogramów surowych produktów reakcji.

Otrzymane peptydy zostały poddane badaniom, których celem było określenie ich własności konformacyjnych, stabilności strukturalnej i aktywności enzymatycznej. Badania konformacyjne przeprowadzono głównie techniką CD natomiast stabilność struktur oceniano metodą kalorymetryczną lub badając zmiany widm CD w funkcji temperatury. Eksperymenty te pozwoliły wykazać, że wiele z spośród badanych peptydów tworzy termodynamicznie stabilne struktury przestrzenne, które ulegają rozfałdowaniu w temperaturach powyżej 60°C. Bardzo interesującym wątkiem tych badań jest otrzymanie i zbadanie serii analogów białka MvaT, w których do obszarów heliakalnych wprowadzone zostały reszty kwasu trans-(1S,2S)-aminocyklopentanokarboksylowego. Pozwoliło to na otrzymanie układów wywodzących się z naturalnego mini-białka stabilizowanych jednak przez niebiałkowy β-aminokwas indukujący helisę. Pomimo, że układ okazał się trudny w badaniach eksperymentalnych, i wyniki nie zawsze były jednoznaczne, udało się wykazać że w wielu badanych układach następuje wyraźna stabilizacja struktury. Najstabilniejsze białka z tej serii ulegały denaturacji w temperaturach ok. 70°C.

Pośród otrzymanych które mini-białek znaleziono układy, które wykazywała właściwości katalityczne. Wprowadzenie do sekwencji reszt His i Cys, pozwoliło na uzyskanie modeli hydrolaz będących analogami metaloenzymów oraz enzymów zawierających w centrum aktywnym reszty cysteiny (hydrolaz cysteinowych). Bardzo interesującym aspektem badań, jest zaobserwowanie specyficzności substratowej w badanych układach. Wprawdzie ograniczona liczba modeli nie pozwoliła na pełne zbadanie tego zjawiska, jest to problem niewątpliwie wart dalszych badań, które mogłyby prowadzić do optymalizacji regionu mini-białka odpowiedzialnego za wiązanie substratu. W dyskusji wyników zabrakło mi odniesienia



do innych mimetyków enzymów zbudowanych na rusztowaniu molekularnym tego samego mini-białka MvaT. Niedawna opublikowana przez zespół profesora Berlickiego praca dotycząca pokazuje, że cząsteczka MvaT może być przekształcona w mimetyk retroaldolazy. Uzyskanie syntetycznych enzymów o różnych aktywnościach, zachowujących jednak taką samą strukturę trzeciorzędową jest bardzo interesującym wynikiem. W podobny sposób dzieje się w naturze. Białka o tym samym foldzie mają często całkowicie odmienne aktywności. Dlaczego ta praca nie jest zacytowana – mogłaby wnieść interesujący aspekt do prowadzonej dyskusji?

Praca doktorska jest przygotowana w klasycznej formie. Liczy 178 stron i napisana jest jasno i zwięźle. Obejmuje wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, podsumowanie i część eksperymentalną. Wstęp (57stron) w krótki sposób omawia strukturę białek, podstawy działania enzymów oraz mimetyki enzymów. Odpowiada on aktualnemu stanowi wiedzy i przyczynia się do lepszego zrozumienia prowadzonych przez doktoranta badań. Część eksperymentalna zawiera dane wystarczające do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Bibliografia (191 pozycji) jest aktualna i zgodna z bieżącym stanem wiedzy. Uwzględnione zostały w niej najnowsze publikacje do roku 2024. Większość uwzględnionych w bibliografii publikacji powstała po roku 2000. Spis literatury zachowuje jednolity format odnośników i został starannie zredagowany. Również układ pracy nie budzi żadnych zastrzeżeń a proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są właściwe. Praca jest napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały jednak zdarzają się w niej określenia żargonowe, błędy gramatyczne, literowe i terminologiczne. Poniżej kilka przykładów:

- *W celu potwierdzenia struktur drugorzędowych peptydy badano przy pomocy dichroizmu kołowego. Peptydy z niniejszej serii wykazywały **maksimum absorancji** przy fali o długości około 202 nm (str 67)*
- *Tak więc **mieszanina ściągająca** zawierała standardowo: TFA:woda:TIPS:EDT (87.5:5:5:2.5) (str. 62)*
- *opublikowanej już wcześniej **procedury**¹⁵⁶ (str. 62)*
- *Natomiast **spektroskop** masowy pochodził z firmy Waters: LCT Premier XE Micromass® MS TECHNOLOGIES. (str.155)*
- *Ze względu na niewiele zsyntezowanych przykładów, **ciężko wywnioskować podobnych zależności** jak w przypadku mimetyków hydrolazy MvaT (str. 152)*
- *Dla potwierdzenia podobnej charakterystyki peptydów, przedstawiono **powyżej wyciąg z pracy** doktorskiej Magdy Drewniak-Świtalskiej, gdzie również badano **trzeciorzędowe mini-białka** (str. 140)*
- *Po pierwsze, **nie posiadano referencji w formie potwierdzonej struktury ortogonalnym badaniem** (str. 138)*
- *Z widm dichroizmu kołowego, w przypadku tych nienaturalnych foldamerowych mini-białek, można wywnioskować o istnieniu **pewnej struktury drugorzędowej, ponieważ minima oscylują** w granicach 202-205 nm. (str. 139)*

Wspomniane uchybienia formalne nie występują jednak w liczbie, która utrudniałaby lekturę i zrozumienie pracy. Graficzna forma pracy jest bardzo staranna, występują w niej liczne ilustracje. Są one użyte w uzasadniony sposób i ułatwiają zrozumienie tekstu. Dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta to jedna praca opublikowana w dobrym czasopiśmie. Dodatkowo doktorant jest współautorem wystąpienia konferencyjnego. Z formalnego punktu widzenia jest to dorobek wystarczający do nadania stopnia doktora.



Ponadto duża część badań opisanych w rozprawie stanowi materiał który po niewielkich uzupełnieniach nadaje się do opublikowania w prestiżowych czasopismach.

Podsumowując, stwierdzam, że badania przeprowadzone przez Doktoranta odpowiadają na pytania postawione w celu pracy zaś eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Praca ma też niewątpliwy element nowości naukowej i wnosi istotny wkład do chemii biologicznej. Cytowana literatura jest aktualna. Wykonana przez pana mgr Pawła Morawiaka i przedłożona mi do recenzji praca pt. „Peptydowe mimetyki hydrolaz” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie autora do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Piotr Stefanowicz