



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej



Dr hab. inż. Agnieszka Dybała-Defratyka, prof. PŁ  
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Łódzka

Łódź, 8 listopada 2019

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Oźgi pt. **Foldamery peptydowe o aktywności aldolazowej**

Mgr Katarzyna Oźga wykonała swoją pracę doktorską na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej pod kierunkiem dr hab. inż. Łukasza Berlickiego. Rozprawa ma tradycyjną formę. Obejmuje 175 stron zwięźle napisanej dysertacji. Na pochwałę zasługuje fakt, że wydrukowana została obustronnie w formacie mniejszym niż B5. Pracę otwiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wstęp teoretyczny obejmujący 40 stron, w którym Doktorantka stopniowo wprowadza czytelnika w złożony świat katalizy enzymatycznej na przykładzie aldolaz oraz współczesnych narzędzi badawczych wykorzystywanych do projektowania enzymów *de novo*. Z racji, że w ramach jednego z tych narzędzi stosuje się rusztowania peptydowe Autorka również przedstawia w podstawowym acz wystarczającym zakresie foldamery peptydowe, które wykorzystywała w swoich badaniach. Następnie Doktorantka jasno formułuje cel swojej pracy badawczej, którym była próba wykorzystania właśnie foldamerów peptydowych do opracowania racjonalnej metody projektowania sztucznych enzymów na przykładzie mimetyków aldolazy klasy I. Cel pracy jest realizowany w dwóch częściach; w pierwszej Autorka projektuje mimetyki używając  $\alpha,\beta$ -peptydów przyjmujących struktury trzeciorzędowe zaprojektowane *de novo* z wykorzystaniem odpowiednich kombinacji struktur, w drugiej zaś wykorzystuje  $\alpha$ -peptydową strukturę mini-białka – C-końcowej domeny białka MvaT – przyjmującą stabilną konformację trzeciorzędową. Przedmiot dysertacji Pani mgr inż. Oźgi bardzo dobrze wpisuje się w ogólnoswiatowe poszukiwanie sztucznych materiałów, które naśladując złożone układy naturalne, takie jakimi są enzymy, mogą mieć wręcz nieprzewidywalny do końca efekt w chemii syntetycznej i biologii. Jedną z grup takich materiałów są

foldamery. Opisane już zostały w literaturze różne rodziny tych struktur molekularnych, ich właściwości i zachowanie można modyfikować dość precyzyjnie poprzez zmiany w układzie przestrzennych grup funkcyjnych. Z racji jednak, że foldamery mogą związać się inaczej niż naturalnie występujące cząsteczki mogą w ten sposób tworzyć inne struktury drugorzędowe o właściwościach niespotykanych w naturalnych związkach. To czyni je z jednej strony bardzo obiecującymi obiektami w poszukiwaniu mimetyków naturalnych enzymów, zaś z drugiej pokazuje jak wiele parametrów składa się na taką wydajność biokatalizatorów jaką znamy i jak trudno może być ją odwzorować projektując enzymy w laboratorium. Trudno nie znacząco jednak niemożliwie i Doktorantka ambitnie podeszła do postawionego sobie zadania testując niespotykane struktury foldamerów, skrupulatnie optymalizując, poprzez stosowanie różnych podejść, uzyskane miejsce aktywne wychodząc znacznie poza powszechnie do tej pory w literaturze podejścia, na przykład uwzględniając w procesie optymalizacji również drugą sferę koordynacyjną miejsca aktywnego.

Kolejno, w przedłożonej mi do recenzji pracy, omówione zostały wyniki badań oraz ich dyskusja. Taka kolejność jest często spotykana w czasopiśmie naukowych, pozwala od razu skupić uwagę na bezpośrednich efektach zaplanowanych prac badawczych. Ta część dysertacji obejmuje 89 stron. Najważniejsze wyniki Autorka przedstawia w formie wykresów (widma CD, eliptyczność), tabel (sekwencje, dane kinetyczne) oraz ilustruje je za pomocą wizualizacji struktur. Podobnie jak w przypadku części wstępnej ten rozdział pracy jest napisany klarownie, konkretnie, poprawnym językiem oraz co również ważne ciekawie.

Z racji, że nie specjalizuję się w syntezie organicznej, w tym również w syntezie peptydów, nie mogę szczegółowo skomentować przeprowadzonych badań w tym zakresie. Mogę jednak odnieść się do nich ogólnie, na podstawie wrażenia jakie wywołuje ich opis w przedłożonej pracy. W moim odczuciu badania zostały wykonane rzetelnie zgodnie z przyjętymi w tym zakresie standardami.

Odniosę się natomiast to pozostałych wyników w kolejności ich omawiania w dysertacji. W rozdziale 5.3 Autorka opisuje projektowanie sztucznych aldolaz przy użyciu struktury helisa-pętla-helisa. W pierwszym etapie badań zaplanowane struktury zostały również wymodelowane jednak opis tego procesu jest bardzo pobieżny, co nie pozwala w pełni ocenić czy zastosowane podejście było zasadne a otrzymana struktura nadawała się do dalszej oceny/interpretacji. Doktorantka wspomina, że do badań *in silico* zastosowała pakiet Discovery Studio, jednak nie sam program odgrywa kluczową rolę, a zastosowane metody czy techniki obliczeniowe, które w takim pakiecie są zaimplementowane. Co więcej opis modelowania molekularnego przedstawiony w części 6 pracy również nie zawiera podstawowych w takich opisach parametrów dotyczących zastosowanych protokołów. One może i są domyślne w programie jak wspomina Doktorantka, jednak pakiet

ten nie jest tak powszechny aby takie stwierdzenie było wystarczające. Poza tym w opisie eksperymentu komputerowego brakuje odnośników do zastosowanych metod, protokołów, technik, modeli i samego programu. To poważne uchybienie. W związku z tym niejasnym jest jak potwierdzano stabilność struktur i w związku z tym na jakie podstawie stwierdzono, że czas symulacji 5 czy 10 ns jest czasem wystarczającym. Autorka komentując również obserwowane zmiany w konformacji peptydu konkluduje, że nie zmieniała się ona znacząco w trakcie symulacji, ale nie wspomina co było punktem odniesienia.

W podrozdziałach 5.3.1 oraz 5.3.2 Doktorantka komentuje odmienne zachowanie niektórych sekwencji zbyt silnymi oddziaływaniami pomiędzy atomami tlenu grup hydroksylowych np. tyrozyn a grupą ε-aminową lizyn. Czy podjęta została próba oszacowania populacji wiązań wodorowych? Jest to przydatne narzędzie, dość standardowe w analizie trajektorii powstałej w wyniku symulacji danego układu w czasie, pozwalające poznać zasięg tego typu oddziaływań z danej strukturze i jego zmiany w czasie.

Interesującym wynikiem jest porównanie kluczowych odległości w miejscu aktywnym pomiędzy ludzką aldolazą a wymodelowanymi strukturami peptydów HLH5 i HLH6 pokazane na Rys. 31. Szkoda jedynie, że te niewielkie różnice nie są w żaden sposób skomentowane jedynie pokazane. Innym sposobem na wizualizowanie różnic jest nałożenie porównywanych struktur lub ich fragmentów na siebie i/lub obliczenie średniego odchylenia kwadratowego odchylenia pozycji atomowych (z ang. RMSD).

W podrozdziale 5.6.5 gdzie dyskutowany jest wpływ zwiększenia hydrofobowości środowiska reakcji na miejsce aktywne Autorka zauważa odbiegające od pozostałych peptydów testowanych w tej części badań zachowanie. Jest ono na tyle inne, że można by pokusić się o próbę odtworzenia go za pomocą symulacji komputerowych używając nawet konwencjonalnych technik próbkowania przestrzeni fazowej.

W podrozdziale 5.6.8, w którym Doktorantka szczegółowo dyskutuje wyniki otrzymane dla odtworzenia miejsca aktywnego ze sztucznej aldolazy z użyciem rusztowania C-MvaT kilkakrotnie zabrakło mi odwołań do tabel, w których zebrane zostały wcześniejsze wyniki. Na przykład, podczas dyskusji wyników otrzymanych dla peptydów MvaT26-MvaT33, które są porównywane z peptydami MvaT7 oraz MvaT15 czy 16 przydałoby się przypomnienie, w których tabelach znajdują się wyniki dla tych właśnie peptydów. Być może nawet lepiej byłoby je dla wygody uwzględnić w kolejnych tabelach tak aby czytelnik miał je zgromadzone w jednym miejscu. Podobną uwagę mam do prezentacji wyników w kolejnych podrozdziałach 5.6.9 i 5.6.10. Natomiast w końcowej Tabeli 35 zamykającej podsumowanie zabrakło odnośników do danych literaturowych.

W podrozdziale 5.6.9 gdzie rozważano wpływ drugiej sfery koordynacyjnej na aktywność projektowanych peptydów na podstawie obliczonego pola katalitycznego dla reakcji katalizowanej przez peptyd MvaT15 Autorka wspomina również o aktywności peptydu MvaT25, ale ten oprócz przygotowania nie był dalej analizowany ze względu na bardzo niską rozpuszczalność w wodzie i w całej pracy nie ma żadnych wyników dla tego peptydu. Stąd też jego przywołanie w tej części jest zastanawiające.

Biorąc pod uwagę, że w literaturze w ostatnich latach podnosi się kwestie wpływu dynamiki konformacyjnej na reaktywność i selektywność enzymów chciałabym przy okazji publicznej obrony przedyskutować z Doktorantką następujące kwestie: (i) czy allosteryczność odgrywa rolę w aldolazie? Czy miałyby sens rozważanie jej w przedstawionych w rozprawie układach? (ii) Jak można by połączyć informacje pochodzące z widm CD z informacjami uzyskanymi na drodze symulacji komputerowych?

Doktorantce nie udało się ustrzec pewnych wpadek edytorskich, jednak muszę stanowczo stwierdzić, że praca jest bardzo uboga pod tym względem. Z recenzenckiego obowiązku wspominam je w swojej recenzji, jednak nie zasługują one na żaden komentarz w trakcie obrony. Wkradło się kilka literówek, pomyłonej numeracji tabel czy rysunków. Jednak w niczym nie zakłóciły one ogólnego odbioru pracy.

Mimo uwag krytycznych, które traktuję jako zagajenie do dyskusji, uważam, że praca Pani mgr inż. Ożgi z nawiązką spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, Doktorantka włożyła ogrom pracy w badania i przedstawiła uzyskane wyniki w ciekawy i dojrzały naukowo sposób.

Zdziwienie budzi tylko jedna publikacja współautorstwa Doktorantki donosząca o podobnych jak w niniejszej dysertacji zagadnieniach na liście cytowanych prac. Materiału na kolejne wydaje się być aż nadto.

Biorąc pod uwagę nowatorską problematykę badawczą, wysoki poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej a także ogrom pracy włożonej w przeprowadzone badania w konkluzji wyraźnie stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz naukowych stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. nr 65 z 14.03.2003 r., poz. 595, oraz Dz.U. nr 164 z 27.07.2005 r., poz.1365 wraz z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Ożgi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Dybała-Defratyka