



Wrocław, 12.11.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Oźgi pt. „Foldamery peptydowe o aktywności aldolazowej”

Praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Oźgi została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Łukasza Berlickiego prof. uczelni z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Tematem pracy są badania mające na celu uzyskanie wydajnego sztucznego enzymu o aktywności aldolazowej. Oceniana praca łączy w ciekawy sposób zagadnienia z zakresu biochemii, biotechnologii, chemii peptydów i białek, a także syntezy organicznej i jest kontynuacją wieloletnich już zainteresowań dr hab. Łukasza Berlickiego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 175 stron i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wstęp, cel pracy, wyniki i dyskusję oraz część eksperymentalną. Rozprawa zawiera również streszczenie w j. polskim i angielskim, a także wykaz skrótów, a całość została przygotowana w estetycznej postaci książkowej. Bibliografia wieńcząca dysertację stanowi listę 106 prac opublikowanych głównie w ostatnim dwudziestoleciu.

Wstęp pracy liczący 41 stron, został napisany niezwykle przejrzysto i zawiera najważniejsze informacje poświęcone zarówno strukturom jak i mechanizmom działania aldolaz klasy I i II. Czyniąc wstęp do tematu rozprawy, Autorka opisała najistotniejsze foldamery peptydowe przyjmujące struktury drugorzędowe jak i wyższe formy organizacji. Następnie opisała najistotniejsze podejścia stosowane przy projektowaniu enzymów tj. ukierunkowaną ewolucję, katalityczne przeciwciała i polimery z odciskiem molekularnym, projektowanie racjonalne oraz podejście minimalne. Rozdział ten jest bardzo pouczający i przydatny czytelnikom recenzowanej rozprawy. Podrozdział 3.3.2. poświęcony polimerom z odciskiem molekularnym nie odnosi się praktycznie do literatury, co, domyślam się, zostało poczynione w tzw. „biegu”. W paragrafie

poświęconym projektowaniu racjonalnemu Doktorantka opisuje schematyczne podejście stosowane w optymalizacji teozymu. Nie jest dla mnie jasne dlaczego przy projektowaniu miejsca aktywnego bierze się pod uwagę dziewięć struktur krystalicznych. Domyślam się, że odnosi się to do konkretnego przypadku, o którym Doktorantka nie wspomniała, opisując typową strategię otrzymywania sztucznych enzymów. Ostatnia część wstępu to opis dotychczas otrzymanych sztucznych aldolaz oraz katalitycznych foldamerów. Z opisu tego jasno wynika, że w literaturze obecna jest znikoma liczba doniesień dotyczących katalitycznych foldamerów, a opisane przykłady posiadają aktywność katalityczną daleką od natywnych enzymów głównie z powodu konstruowania enzymów opartych o struktury drugorzędowe.

Nieczęsto zdarza się by recenzent mógł sam zgadnąć jaki jest cel pracy po przeczytaniu wstępu. To właśnie miało miejsce w tym wypadku, co świadczy o bardzo dobrze przygotowanym wprowadzeniu do pracy doktorskiej. Autorka jako nadrzędny cel swojej pracy określa potrzebę opracowania racjonalnej metody otrzymywania sztucznych enzymów z wykorzystaniem struktur wyższego rzędu – w tym wypadku foldamerów peptydowych - by uwzględnić wpływ drugiej sfery koordynacji, która moduluje i wpływa na aktywność oraz selektywność działania naturalnych enzymów. Realizację swojego celu Autorka podzieliła na dwie główne części. Pierwsza z nich opiera się na skonstruowaniu mimetyków aldolazy z użyciem α,β -peptydów tworzących struktury drugo- i trzeciorzędowe zaprojektowane *de novo* w oparciu o helisę 9/10/9/12. Druga natomiast to wykorzystanie mini-białka MvaT jako rusztowania do optymalizacji drugiej sfery koordynacji w celu skonstruowania jak najwydajniejszej sztucznej aldolazy.

Pierwsze akapity rozdziału „Wyniki i dyskusja” to opis syntezy peptydów oraz substratów fluorogenicznych, stosowanych następnie do badania aktywności tychże peptydów. Większość pomiarów aktywności została przeprowadzona z użyciem metodolu, który jak podaje Doktorantka jest słabo rozpuszczalny w wodzie. Niestety nie mogłem znaleźć nigdzie informacji o wydajności kwantowej tego związku oraz minimalnego stężenia pozwalającego na badanie aktywności enzymatycznej. Zastosowanie związków fluorogenicznych o wysokiej wydajności kwantowej niweluje konieczność stosowania substratów jak i peptydów katalitycznych w wyższym stężeniu i tym samym obniża koszty badań. Doktorantka, co prawda otrzymała substrat (8-(1-hydroksy-3-oksobutylo)pireno-1,3,6,-trisulfonian) o lepszej rozpuszczalności, jednakże nie podała informacji o maksymalnym stężeniu i wydajności kwantowej. W tym wypadku było to zbędne ze względu na dekompozycję substratu w roztworze wodnym.

Pierwszy etap pracy nad otrzymaniem sztucznych aldolaz to projektowanie katalitycznych peptydów z użyciem struktury helisa-pętla-helisa. Do tego celu Autorka wybrała wcześniej zbadane eksperymentalnie i stabilne w wodzie helisy 9/10/9/12, które zostały połączone ruchomym trójglicylowym łącznikiem. Celem tej fazy badań było stworzenie modeli najprostszych aldolaz zawierających wyeksponowane reszty lizyny, a także zdefiniowane środowisko hydrofobowe otrzymane poprzez umieszczenie reszty tyrozyny i fenyloalaniny w wybranych pozycjach. Pomiar aktywności wykazały, że najlepszy z peptydów HLH2, zawierający po trzy lizyny na każdej z helis, przyspiesza reakcję modelową 500 razy. W tym miejscu nie jest dla mnie jasne dlaczego Autorka zatasowała pH 8 jako standard do swoich badań. Tu proszę o komentarz. Proszę również o odpowiedź na pytanie o wpływ składników buforu na aktywność enzymatyczną. Wyobrażam sobie, że przy tak prostych modelach skład buforu może mieć istotny wpływ na reaktywność peptydów. W kolejnych fazach badań Autorka w badanym układzie umieściła reszty aminokwasowe uznane za katalityczne i występujące w naturalnych aldolazach posiłkując się strukturami krystalicznymi, a także zastosowała nieco dłuższy linker (czteroglicylowy) celem zwiększenia odległości pomiędzy helisami. Podejścia te pozwoliły na uzyskanie peptydów HLH10 i HLH11, w których miejsce aktywne stanowiły dwie reszty lizyny i tyrozyny, które charakteryzowały się dwukrotnie wyższą aktywnością niż peptyd wyselekcjonowany w pierwszej fazie badań.

Przeprowadzone badania z użyciem szeregu peptydów helikalnych nie przyniosły Autorce bezpośrednich dowodów na to, że obie helisy są ułożone równolegle do siebie, a tym samym, że wszystkie reszty katalityczne znajdują się w pożądanym rozmieszczeniu przestrzennym. Z tego powodu podjęła się (Ona) zaprojektowaniu i otrzymaniu innych rusztowań typu helisa-zwrot-helisa, w których te same, co poprzednio helisy zostały połączone sztywnym łącznikiem zbudowanym z cyklicznych β -aminokwasów – powtórzeń izomerów *cis*-(*S,R*) albo izomereów *cis*-(*R,S*). Ilość możliwych konformacji zarówno łącznika jak i helis wynosiła blisko 200. Hipotetyczne struktury zostały przefiltrowane ze względu na położenie helis, co w rezultacie doprowadziło do wyłonienia czterech rusztowań. Choć wyobrażam sobie zastosowaną procedurę to prosiłbym Doktorantkę o zobrazowanie jej podczas obrony. Do oceny rzeczywistej struktury peptydów bardzo słusznie wybrano spektroskopię NMR. Z analizy widm ^1H - ^1H -ROSY przeprowadzonej dla zaprojektowanych peptydów wynika, że w zasadzie tylko w przypadku peptydu HTH5 zaobserwowano oddziaływanie pomiędzy helisami. Jednakże dla tego peptydu zaobserwowano najniższą aktywność

enzymatyczną interpretowaną przez Autorkę jako konsekwencja niewłaściwego ułożenia grup katalitycznych. Mimo jasności sytuacji Doktorantka zakończyła badania na tej grupie peptydów. Pytanie dlaczego? Kontrola nad ułożeniem helis prosi się o gruntowniejszą optymalizację celem selekcji najbardziej aktywnego wariantu. Odpowiadając po części na to pytanie, Autorka w kolejnym etapie badań dodała trzecią helisę do peptydu HTH5 uzyskując trzy nowe warianty. Przeprowadzona analiza widm CD i NMR dla tych układów wskazuje na to, że trzecia helisa stwarza *de facto* zawadę sferyczną i zmienia ułożenie dwóch pierwszych helis w ten sposób, że na widmach NMR brak jest widocznych kontaktów międzyhelikalnych. Mimo braku zdefiniowanych oddziaływań badania pokazują, że dodanie trzeciej helisy podnosi dwukrotnie aktywność katalityczną względem peptydu HTH5 ale jest ona dwukrotnie niższa niż w przypadku najbardziej aktywnych peptydów uzyskanych przez Autorkę.

Najbardziej wartościową według mnie częścią pracy mgr inż. Katarzyny Ożgi jest zastosowanie mini-białka C-MvaT jako sztywnego rusztowania dla rozmieszczenia reszt aminokwasowych tworzących miejsce katalityczne. Spośród 47 reszt tworzących C-końcowy fold białka MvaT Autorka w swoich badaniach ograniczyła się do 43, odrzucając po dwie skrajne reszty aminokwasowe nietworzące struktury trzeciorzędowej. Następnie przeprowadziła syntezę i wstępną charakterystykę stabilnościową otrzymanego mini-białka. Zarówno widmo CD jak i przebieg topnienia białka wskazuje na trwałą i stabilną strukturę otrzymanego rusztowania. Doktorantka zaobserwowała brak aktywności katalitycznej samego białka w pH 7,5 i pojawienie się jej w pH 8. Jako wyjaśnienie tego zjawiska podaje fakt, że grupy aminowe lizyny mogą być zdeprotonowane w pH 8 jednocześnie wskazując na to, że pK_a takich reszt wynosi 10. Gdyby pK_a reszt aminowych lizyny wynosiło faktycznie 10, to w pH 8.0 byłyby one zdeprotonowane w 1% co można uznać za brak deprotonacji. Bardziej prawdopodobne jest to, że ze względu na trwałą strukturę trzeciorzędową i bliską obecność dodatnio naładowanych reszt aminowych lizyny ich pK_a jest mocno zdywersyfikowane. Pokazano bowiem na przykładach innych białek, że w takim wypadku pK_a niektórych reszt lizyny może się obniżyć do $pK_a = 8$ czy nawet 7 i to to zjawisko jest najbardziej prawdopodobne w tym przypadku. Aby pozbawić białko katalizy w tych warunkach Autorka usunęła z sekwencji białka wszystkie reszty lizynowe pozostawiając jedynie Lys83 jako niekatalityczną. Dopiero na tak zdezaktywowanym rusztowaniu umieszczała ona katalityczną resztę lizyny. Przy wyborze poszczególnych wariantów Doktorantka sugerowała się nie tylko aktywnością katalityczną, ale również stabilnością białka badaną poprzez pomiar

widm CD i topnienia białka. Jako punkt wyjścia do dalszej optymalizacji wybrała konstrukt zawierający resztę lizyny i tyrozyny odpowiednio w pozycjach 108 i 105 (MvaT7). Autorka w swoim postępowaniu zwiększała hydrofobowość środowiska poprzez wprowadzanie reszty Tyr i Phe uzyskując wariant MvaT15 przyspieszający reakcję 500 razy. Próba ustabilizowania tego wariantu poprzez elektrostatyczną stabilizację rusztowania nie powiodła się, a otrzymane konstrukty nie wykazywały zwiększonej aktywności enzymatycznej. Podobna sytuacja miała miejsce przy optymalizacji peptydu MvT15 poprzez usztywnienie struktury bazującej na wprowadzeniu β -aminokwasów.

Największego postępu w swoich badaniach Autorka dokonała poprzez wprowadzenie ładunków w drugiej sferze koordynacji. Postępowanie to jednak nie odbyło się z zastosowaniem jednej rundy. Doktorantka krok po kroku badała wpływ dodatnich ładunków wprowadzając je w różne pozycje mini-białka całkowicie przemodelowując pierwotne rozłożenie reszt lizynowych. Koniec końców żmudna, ale jak się okazuje owocna optymalizacja ładunków zarówno dodatnich jak i ujemnych szczegółowo opisana w części rezultatu pracy doprowadziła Autorkę do uzyskania konstruktów MvaT47 i MvaT49 wykazujących siedmiokrotnie wyższą aktywność niż najlepszy uzyskany dotąd wariant mini-białka. Przyznam się, że czytając kolejne rozdziały rozprawy miałem przez chwilę wrażenie, że uzyskanie wyraźnie różniącego się aktywnością wariantu nie będzie w ogóle możliwe. Mimo, że każdy krok optymalizacji jest szczegółowo opisany i jasny to proszę Doktorantkę aby podczas swojej prezentacji mogła bardziej przyczynowo-skutkowo podejść do kolejnych kroków poszukiwania optymalnych wariantów. Jestem przekonany, że wiedza na temat właściwości kwasowo-zasadowych reszt lizyny w poszczególnych pozycjach mogłaby skrócić proces optymalizacji lub doprowadzić do wyłonienia bardziej aktywnego enzymu. Sugeruję zatem, by w przyszłości przy zastosowaniu rusztowań trójwymiarowych poświęcić więcej czasu by zgłębić wiedzę w tym obszarze.

Nie mam zasadniczych zastrzeżeń do recenzowanej rozprawy. Pracę czyta się z wielką przyjemnością mimo, że opisuje ona niełatwe w realizacji i prezentacji badania optymalizacji aktywności enzymatycznej bazującej na foldamerach i strukturach peptydowych wyższego rzędu. Praca, mimo, że naukowa, posiada narastające napięcie, którego kulminacją jest uzyskanie najbardziej optymalnego wariantu katalitycznego. Badania przedstawione w pracy pokazują siłę racjonalnej optymalizacji aktywności katalitycznej. Dzięki temu nie jest konieczne przesiewanie ogromnej ilości sekwencji, których projektowanie odbywa się poprzez

wprowadzenie mieszanin aminokwasów. Ważnym etapem badań zawartych w rozprawie jest zastosowanie modelowania. Choć nie zawsze wyniki modelowania idą w parze z wynikami eksperymentalnymi to przydają się one przy wyborze kolejnych strategii badawczych. Praca doktorska pani mgr inż. Oźgi pokazuje w zasadzie po raz pierwszy na przykładzie aktywności aldolazowej jaki istotny wpływ ma druga sfera koordynacji w projektowanych modelach katalitycznych wskazując tym samym, że od doboru rusztowania zależy zasadniczo sukces poszukiwania i optymalizacji sztucznych enzymów.

Większość swoich pytań już zadałem. Chciałbym jednak poprosić Doktorantkę by mogła przedyskutować wady i zalety różnych podejść stosowanych w poszukiwaniu sztucznych enzymów w ujęciu aktywności aldolazowej oraz by przedyskutowała kolejne, warte zastosowania strategie. Autorka w swojej pracy borykała się z niestabilnością niektórych wariantów białkowych. Jaki wpływ mogłoby nieść „spięcie” obu końców białka? Zabieg ten wydaje się osiągalny, gdyż mini-białko otrzymywano syntetycznie.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Katarzyny Oźgi spełnia wymogi ustawy, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki, jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Oźgi do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę fakt, że praca Doktorantki stanowi istotny wkład w projektowanie sztucznych enzymów do celów chemicznych i biotechnologicznych oraz poznanie mechanizmów katalitycznych enzymów wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

