



Gdańsk, 30.07.2026 r.

dr hab. Marta Spodzieja
Katedra Chemii Biomedycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63
80-309 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej pt. „Projektowanie, synteza i aktywność minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązania węgiel-węgiel”

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej przygotowana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej prezentuje wyniki oryginalnych badań naukowych zrealizowanych pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Łukasza Berlickiego. Przedstawione w dysertacji badania dotyczą aktualnego i intensywnie rozwijanego obszaru, jakim jest projektowanie nowych katalizatorów białkowych. Obejmują one zarówno optymalizację struktury minibiałka opartego na znanej domenie MvaT, jak i projektowanie *de novo* cząsteczek zdolnych do katalizowania reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel.

Enzymy należą do najbardziej efektywnych i selektywnych katalizatorów chemicznych. Umożliwiają prowadzenie reakcji w łagodnych warunkach, często z wysoką chemo-, regio- i stereoselektywnością, dlatego znajdują coraz szersze zastosowanie w syntezie związków biologicznie czynnych, farmaceutyków oraz produktów przemysłu chemicznego. Wykorzystanie naturalnych enzymów jest jednak ograniczone przez ich wysoką specyficzność substratową, ograniczony zakres warunków, w których zachowują aktywność, oraz często niewystarczającą stabilność w obecności rozpuszczalników organicznych lub podwyższonej temperatury. Z tego względu projektowanie nowych katalizatorów białkowych zdolnych do przyspieszania reakcji, dla których nie istnieją naturalne enzymy lub które samorzutnie przebiegają bardzo wolno, stanowi jedno z ważniejszych wyzwań współczesnej chemii biologicznej.

Szczególne miejsce w tej dziedzinie zajmują minibiałka, które łączą stosunkowo niewielkie rozmiary typowe dla peptydów ze zdolnością do tworzenia dobrze zdefiniowanych

i stabilnych struktur trzeciorzędowych. Ich stosunkowo krótkie sekwencje umożliwiają syntezę chemiczną oraz kontrolowane wprowadzanie niekanonicznych reszt aminokwasowych i innych modyfikacji strukturalnych. Jednocześnie odpowiednio zaprojektowane minibiałka mogą tworzyć dobrze zdefiniowane miejsca aktywne, zapewniające właściwe wiązanie i orientację substratów oraz środowisko sprzyjające przebiegowi reakcji katalitycznej. Cechy te sprawiają, że minibiałka stanowią interesujące struktury wyjściowe do projektowania nowych katalizatorów, zachowujących część zalet enzymów przy znacznie mniejszych rozmiarach i prostszej budowie. Projektowanie katalizatorów białkowych na podstawie znanych struktur jest zadaniem trudnym, natomiast ich tworzenie *de novo* stanowi jeszcze większe wyzwanie. Skuteczna kataliza wymaga nie tylko obecności odpowiednich grup funkcyjnych, lecz także ich precyzyjnego rozmieszczenia, właściwego środowiska elektrostatycznego oraz zachowania odpowiedniej stabilności i dynamiki cząsteczki. Dlatego opracowywanie nowych katalizatorów białkowych wymaga połączenia metod obliczeniowych, syntezy chemicznej oraz badań strukturalnych i funkcjonalnych. Takie interdyscyplinarne podejście zastosowano w recenzowanej rozprawie, łącząc projektowanie komputerowe z syntezą chemiczną, charakterystyką strukturalną, badaniami stabilności termicznej oraz oceną aktywności katalitycznej minibiałek.

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Szczepańskiej liczy 191 stron i obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp literaturowy, cel pracy, rozdział przedstawiający wyniki badań wraz z ich dyskusją, podsumowanie, część eksperymentalną oraz bibliografię. Układ pracy jest logiczny i pozwala prześledzić kolejne etapy projektowania, syntezy, charakterystyki oraz optymalizacji badanych minibiałek.

Wstęp literaturowy został podzielony na sześć głównych podrozdziałów. Doktorantka przedstawia najważniejsze wyzwania związane z projektowaniem katalizatorów białkowych, a następnie omawia ukierunkowaną ewolucję, przeciwciała katalityczne oraz racjonalne projektowanie enzymów. Szczególną uwagę poświęca projektowaniu *de novo*, koncepcji teozymu oraz czynnikom wpływającym na skuteczność katalizy, takim jak preorganizacja miejsca aktywnego, energia reorganizacji, fluktuacje termiczne, pole elektryczne oraz właściwe rozmieszczenie reszt tworzących bliższe i dalsze otoczenie centrum katalitycznego. W dalszej części charakteryzuje retroaldolazy i katalizę enaminową z udziałem lizyny, które stanowiły podstawę projektowania miejsc aktywnych badanych minibiałek. Następnie omawia



właściwości minibiałek, sposoby ich stabilizacji oraz metody projektowania, w tym narzędzia pakietu Rosetta i rozwiązania oparte na uczeniu głębokim. Kończącą część poświęca minibiałkom katalitycznym, ze szczególnym uwzględnieniem struktur opartych na domenie MvaT. Układ tej części pracy jest logiczny i dobrze odpowiada tematyce rozprawy. Stopniowe przejście od ogólnych zagadnień dotyczących katalizy enzymatycznej do metod projektowania oraz przykładów minibiałek katalitycznych pozwala zrozumieć podstawy teoretyczne oraz założenia badań własnych.

- ✓ Doktorantka wskazuje, że w szerokim rozumieniu termin „minibiałko” może obejmować również foldamery peptydowe i peptydomimetyki, a badane przez Nią cząsteczki określa w pracy zarówno jako minibiałka, jak i peptydy. Czy mogłaby Pani wyjaśnić, jakie kryteria pozwalają rozróżnić minibiałko, peptyd, foldamer peptydowy i peptydomimetyk, zwłaszcza w przypadku cząsteczek zawierających niekanoniczne β -aminokwasy, takie jak trans-ACPC?
- ✓ Doktorantka omawia projektowanie miejsc aktywnych w istniejących strukturach białkowych oraz tworzenie katalizatorów całkowicie *de novo*. Jakie są najważniejsze zalety i ograniczenia obu strategii oraz od czego powinien zależeć wybór jednej z nich?

Rozdział 2 przedstawia cel pracy, którym było zaprojektowanie, synteza i scharakteryzowanie minibiałek katalizujących reakcję tworzenia wiązania węgiel-węgiel pomiędzy 4-nitrobenzaldehydem a fenyloacetaldehydem. Reakcję tę wybrano, ponieważ jej przebieg można było oprzeć na mechanizmie katalizy enaminowej znanym z retroaldolowego rozszczepienia metodolu, a jednocześnie nie opisano wcześniej enzymów katalizujących tę konkretną przemianę. Doktorantka zastosowała dwie strategie: modyfikację C-końcowej domeny białka MvaT oraz projektowanie *de novo* minibiałek o topologiach helisa-helisa- β -kartka (HHEEE) i helisa- β -kartka-helisa (HEEEH). Cel pracy został sformułowany jasno i odpowiada zakresowi przeprowadzonych badań.

Rozdział 3 obejmuje wyniki badań własnych wraz z ich dyskusją. Doktorantka przedstawia w nim założenia mechanistyczne projektu, kolejne etapy projektowania, otrzymywania i optymalizacji minibiałek opartych na domenie MvaT oraz struktur projektowanych *de novo*, a także ich charakterystykę strukturalną, stabilność termiczną i aktywność katalityczną.

Rozdział 3.1 rozpoczyna się od przedstawienia proponowanego mechanizmu reakcji aldolowej, opartego na analogii do retroaldolowego rozszczepienia metodolu przez RA95.5-8F.

- ✓ Na rysunku 24 przedstawiono geometrię miejsca aktywnego RA95.5-8F, ułożenie substratów oraz zaproponowany stan przejściowy badanej reakcji. Czy Doktorantka mogłaby doprecyzować, w jaki sposób przygotowano ten model i z jakiego źródła pochodzą odległości zaznaczone w panelu A? Czy przedstawiona geometria została dodatkowo zweryfikowana obliczeniowo przed wykorzystaniem jej jako punktu odniesienia w projektowaniu miejsc aktywnych minibiałek?

W rozdziale 3.2 punktem wyjścia była C-końcowa domena białka MvaT, wcześniej wykorzystana do otrzymania minibiałkowej retroaldolazy. Doktorantka najpierw oceniła aktywność wariantu MvaT48 w badanej reakcji aldolowej, a następnie przygotowała analogi z wybranymi zamianami lizyny na argininę, aby wskazać reszty mogące uczestniczyć w katalizie. Ze względu na niską stabilność części wariantów oraz trudności z jednoznacznym zlokalizowaniem miejsca aktywnego powróciła do natywnej sekwencji domeny MvaT. Zastąpienie wszystkich lizyn argininami pozwoliło otrzymać wariant allR, który zachowywał zbliżony ładunek i wykazywał jedynie niewielką aktywność katalityczną. Następnie wykorzystano go jako punkt wyjścia do zaprojektowania nowego centrum katalitycznego. Spośród analogów różniących się położeniem reszt lizyny i tyrozyny wybrano allR11. Jego dalsza optymalizacja, obejmująca zmiany w otoczeniu miejsca aktywnego oraz rozmieszczeniu ładunków na powierzchni minibiałka, doprowadziła do otrzymania wariantu YSQ1, wykazującego najwyższe przyspieszenie reakcji w tej serii związków. Łącznie w tej części badań zsyntetyzowano, oczyszczono i scharakteryzowano 37 wariantów minibiałek.

- ✓ Wariant allR, pomimo zastąpienia wszystkich lizyn argininami, wykazywał niewielki sygnał w pomiarach aktywności. Czy N-końiec tego minibiałka był zablokowany? Jeżeli nie, czy wolna grupa α -aminowa mogła uczestniczyć w reakcji z aldehydem i wpływać na obserwowany wynik?
- ✓ Domena MvaT została wybrana jako rusztowanie ze względu na niewielki rozmiar, stabilność i obecność wnęki. Czy Doktorantka rozważała wykorzystanie innych opisanych w literaturze minibiałek lub małych domen białkowych jako alternatywnych rusztowań? Jakie cechy strukturalne decydowałyby o ich przydatności do katalizy badanej reakcji aldolowej?

W rozdziale 3.3 Doktorantka przedstawia projektowanie *de novo* minibiałek o topologii HHEEE, których fragmenty helikalne stabilizowano za pomocą reszt trans-ACPC. Spośród początkowo otrzymanych związków O1–O3 wybrano wariant O3, który poddano kolejnym iteracjom optymalizacji, uzyskując O3.1, a następnie O3.1.10. Dalsza optymalizacja, obejmująca zmianę położenia tyrozyny, dobór reszty w pozycji 41 oraz modyfikację rozmieszczenia ładunków, doprowadziła do otrzymania minibiałka O3.1.10C, wykazującego najlepsze parametry katalityczne w tej serii. W kolejnych etapach analizowano znaczenie Lys-38 oraz modyfikowano pętlę i β -kartkę w celu poprawy jakości widm NMR. Na podstawie danych 2D NMR częściowo wyznaczono strukturę przestrzenną nieaktywnego wariantu O3.1.10-G1.1. Łącznie zaprojektowano, otrzymano i scharakteryzowano 35 minibiałek, w tym 14 o wysokiej stabilności termicznej i 4 wyróżniające się aktywnością katalityczną.

W rozdziale 3.4 Doktorantka przedstawia projektowanie *de novo* minibiałek o topologii HEEEH, zawierających reszty trans-ACPC, stabilizujące fragmenty helikalne. Spośród pierwszych wariantów wybrano M3 i M7, różniące się charakterystyką katalityczną, które wykorzystano w kolejnych etapach optymalizacji. Dalsze modyfikacje obejmowały łączenie korzystnych cech obu wariantów, zmianę rozmieszczenia ładunków oraz modyfikację otoczenia miejsca aktywnego. Doprowadziły one do otrzymania minibiałka M3.7-YL, łączącego korzystne parametry katalityczne z wysoką stabilnością termiczną. Łącznie zsyntetyzowano i scharakteryzowano 24 minibiałka, wykazujące zróżnicowany poziom aktywności katalitycznej.

W rozdziale 3.5 Doktorantka porównuje aktywność wybranych minibiałek z L-proliną, znanym katalizatorem reakcji aldolowej. W zastosowanych warunkach początkowa szybkość badanej reakcji była większa w obecności wszystkich analizowanych minibiałek niż w obecności L-proliny – około 7-krotnie w przypadku YSQ1 i 17-krotnie w przypadku M3.7-YL. Porównanie to wskazuje, że zaprojektowane minibiałka, zwłaszcza M3.7-YL, są w zastosowanych warunkach skuteczniejszymi katalizatorami badanej reakcji niż L-prolina.

- ✓ W rozdziale 3.5 porównano z L-proliną wybrane minibiałka reprezentujące trzy analizowane serie. Dlaczego do porównania z L-proliną w przypadku serii HHEEE wybrano warianty O3.1.10 i O3.1.10-Y41, a nie O3.1.10C, który wykazywał najlepsze parametry katalityczne w tej serii?

W podsumowaniu Doktorantka przedstawia najważniejsze osiągnięcia pracy, podkreślając potencjał otrzymanych minibiałek jako rusztowań do dalszego projektowania cząsteczek o nowych funkcjach.

✓ Które z otrzymanych minibiałek Doktorantka uznaje za najbardziej udany projekt, biorąc pod uwagę jego aktywność katalityczną, stabilność, charakterystykę strukturalną oraz zgodność z założeniami projektowymi? Który wariant wybrałaby Pani jako punkt wyjścia do dalszej optymalizacji i jakie jego właściwości należałoby poprawić w pierwszej kolejności?

Rozdział 5 zawiera opis metod komputerowego projektowania minibiałek, syntezy peptydów na podłożu stałym, ich oczyszczania i identyfikacji oraz badań strukturalnych i stabilności termicznej z wykorzystaniem CD, nanoDSF i NMR. Przedstawiono również warunki pomiarów aktywności katalitycznej oraz charakterystykę otrzymanych związków za pomocą HPLC i spektrometrii mas. Układ tej części jest logiczny i odzwierciedla kolejne etapy realizacji badań.

- ✓ Ze względu na różnice w składzie aminokwasowym analizowane minibiałka mogą wykazywać odmienną podatność na protonowanie i generować różne profile jonów w ESI-MS. Dlaczego dla wszystkich związków w tabeli analizowano jon $[M+6H]^{+6}$? Czy dla każdego minibiałka należał on do dominujących sygnałów, czy wybór ten miał wyłącznie na celu ujednolicenie prezentacji wyników?
- ✓ Jakie wydajności syntezy i izolacji uzyskiwano dla badanych minibiałek? Czy podczas otrzymywania długich i potencjalnie trudnych syntetycznie minibiałek występowały szczególne problemy, a jeśli tak, to z czym były one związane?
- ✓ W rozprawie nie znalazłam informacji o liczbie niezależnych powtórzeń pomiarów aktywności katalitycznej. Czy punkty przedstawione na wykresach są wynikami pojedynczych oznaczeń, czy wartościami średnimi? Ile niezależnych reakcji wykonano dla każdego stężenia substratu i co oznaczają wartości błędów podane przy wyznaczonych parametrach kinetycznych?
- ✓ W pomiarach kinetycznych stosowano 0,1 mM minibiałka, stałe stężenie 4-nitrobenzaldehydu wynoszące 2 mM oraz zmienne stężenie fenyloacetaldehydu. W rozprawie uzasadniono wybór fenyloacetaldehydu jako substratu o zmiennym stężeniu oraz zakres zastosowanych stężeń, nie znalazłam natomiast informacji, na jakiej



podstawie przyjęto stężenie 2 mM 4-nitrobenzaldehydu i 0,1 mM minibiałka. Czy wartości te ustalono na podstawie doświadczeń wstępnych?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej stanowi wynik ambitnego, wieloetapowego i pracochłonnego projektu, którego realizacja wymagała połączenia metod komputerowych, syntezy chemicznej, oczyszczania i identyfikacji otrzymanych związków, badań strukturalnych i stabilności termicznej oraz analiz kinetycznych. Wykorzystując domenę białka MvaT oraz projektując de novo minibiałka o dwóch różnych topologiach, Doktorantka uzyskała cząsteczki zdolne do katalizowania reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel. Na szczególne uznanie zasługuje konsekwentna, iteracyjna optymalizacja otrzymanych wariantów. Brak prostej addytywności efektów mutacji znacznie utrudniał przewidywanie wpływu kolejnych zmian, jednak uzyskiwane wyniki były umiejętnie wykorzystywane do planowania dalszych modyfikacji. Świadczy to o dużej dociekliwości, wytrwałości oraz umiejętności prowadzenia badań w warunkach, w których zależności między sekwencją, strukturą, stabilnością i funkcją nie są jednoznaczne. Rozprawa potwierdza bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnego prowadzenia interdyscyplinarnych badań oraz Jej umiejętność krytycznej interpretacji złożonych wyników. Przedstawione uwagi i pytania dotyczą głównie kwestii wymagających doprecyzowania lub dalszej weryfikacji i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej pt. *„Projektowanie, synteza i aktywność minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązania węgiel-węgiel”* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej do publicznej obrony.

