

Poznań, 23.07.2026 r.

dr hab. Monika Wałęsa-Chorab, Prof. UAM
Zakład Syntezy Nanostruktur Funkcjonalnych
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej

pt. „*Projektowanie, synteza i aktywność minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązań węgiel-węgiel*”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Anny Szczepańskiej zatytułowana „*Projektowanie, synteza i aktywność minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązań węgiel-węgiel*” została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Inż. Łukasza Berlickiego.

Rozprawa doktorska poświęcona jest projektowaniu, syntezie oraz charakterystyce minibiałek katalitycznych przeznaczonych do katalizy reakcji tworzenia wiązań węgiel-węgiel. Tematyka ta wpisuje się w dynamicznie rozwijający się nurt projektowania białek *de novo*, stanowiący obecnie jeden z najbardziej perspektywicznych kierunków współczesnej chemii i biologii strukturalnej. Łączy zagadnienia z zakresu chemii organicznej, biochemii, biologii strukturalnej oraz metod obliczeniowych, a jej rozwój został w ostatnich latach znacząco przyspieszony dzięki postępom w dziedzinie sztucznej inteligencji i projektowania białek.

Rozprawa podejmuje ambitny problem badawczy, polegający na opracowaniu niewielkich, stabilnych katalizatorów białkowych zdolnych do efektywnego katalizowania reakcji aldolowej. Jest to zagadnienie o istotnym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym, ponieważ projektowanie nowych enzymów pozostaje jednym z największych wyzwań

współczesnej biokatalizy.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma charakter monograficzny. Jej treść została uporządkowana w sposób logiczny i przejrzysty, a poszczególne zagadnienia przedstawiono w układzie zapewniającym czytelnikowi stopniowe wprowadzenie do problematyki badawczej oraz właściwą interpretację uzyskanych wyników. Przeprowadzone badania opisano szczegółowo – od przedstawienia przesłanek i założeń badawczych, poprzez omówienie zastosowanej metodyki, prezentację wyników, aż po ich analizę, dyskusję i sformułowanie wniosków.

Rozprawa liczy 191 stron. Pracę otwiera abstrakt w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów, po których zamieszczono obszerny wstęp stanowiący teoretyczne wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej. Jedyna moja drobna uwaga redakcyjna dotyczy wykazu skrótów. W mojej opinii jego uporządkowanie w kolejności alfabetycznej zwiększyłoby funkcjonalność tego elementu pracy i ułatwiło czytelnikowi odnajdywanie poszczególnych skrótów.

We wstępie Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący wyzwań związanych z projektowaniem katalizatorów enzymatycznych. Omówiła najważniejsze strategie stosowane we współczesnej inżynierii białek i enzymów, w tym ukierunkowaną ewolucję, otrzymywanie przeciwciał katalitycznych oraz racjonalne projektowanie enzymów. Szczególną uwagę poświęciła metodom projektowania enzymów *de novo*, przedstawiając ich założenia, możliwości oraz ograniczenia. Ponadto scharakteryzowała retroaldolazy jako modelową grupę projektowanych enzymów oraz omówiła właściwości minibiałek, które stanowią istotny element prowadzonych badań. Wstęp został opracowany w sposób spójny i stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej rozprawy. Podczas lektury tej części pracy nasunęły się następujące pytania:

- *Na stronie 17 Doktorantka wspomniała o grze internetowej FoldIt – proszę o doprecyzowanie, w jakim zakresie narzędzie to może wspomagać proces projektowania enzymów. Czy określenie „gra” jest w tym kontekście właściwe, biorąc pod uwagę jej zastosowanie w badaniach naukowych?*
- *Jak wygląda przełożenie wyników modelowania białek zawierających określone mutacje na możliwość ich rzeczywistej syntezy i otrzymania? Czy wszystkie zoptymalizowane komputerowo warianty białek mogą zostać uzyskane eksperymentalnie?*

Po nakreśleniu kontekstu badań Doktorantka przedstawiła cel pracy, a następnie przeszła do prezentacji wyników i ich dyskusji. Cel pracy został sformułowany jasno i precyzyjnie jako zaprojektowanie, syntezę oraz charakterystykę minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązań węgiel-węgiel. Autorka wyjaśniła, że celem badań było połączenie zalet małocząsteczkowych organokatalizatorów z właściwościami białek. Przedstawiła również uzasadnienie wyboru stosunkowo krótkich sekwencji aminokwasowych oraz przesłanki przemawiające za wyborem reakcji aldolowej jako modelowej transformacji katalitycznej. Jako substraty modelowej reakcji aldolowej wybrano 4-nitrobenzaldehyd oraz fenyloacetaldehyd. Doktorantka wskazała, że obecność grupy nitrowej zwiększa elektrofilowość atomu węgla karbonylowego, ułatwiając atak nukleofilowy. W tym kontekście nasuwa się pytanie, *czy zamiast grupy nitrowej możliwe byłoby zastosowanie innych podstawników zwiększających elektrofilowość atomu węgla grupy karbonylowej. Jakie grupy funkcyjne mogłyby pełnić podobną funkcję?*

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Autorka najpierw przedstawiła mechanizm reakcji aldolowej, a następnie omówiła przeprowadzone badania, które podzieliła na dwie główne części.

W pierwszej części badań Doktorantka skupiła się na modyfikacji domeny MvaT, która posłużyła jako rusztowanie dla projektowanego centrum aktywnego. Przeprowadziła szereg mutacji tego białka, otrzymując liczne warianty, dla których wykonała analizę strukturalną z wykorzystaniem dichroizmu kołowego, określiła stabilność poprzez wyznaczenie temperatur denaturacji oraz zbadała aktywność katalityczną. Na szczególną uwagę zasługują badania mające na celu określenie optymalnego rozkładu ładunków elektrostatycznych w obrębie minibiałka. Autorka wykazała, że modyfikacje momentu dipolowego minibiałka mogą istotnie wpływać na jego właściwości katalityczne.

W drugiej części badań Doktorantka zaprojektowała białka *de novo* o określonych topologiach, umożliwiających utworzenie kieszeni katalitycznej. Skupiła się na minibiałkach reprezentujących dwie topologie: HHEEE oraz HEEEEH. W pierwszym etapie zaprojektowała odpowiednie sekwencje białkowe, a następnie przeprowadziła ich syntezę oraz charakterystykę strukturalną z wykorzystaniem dichroizmu kołowego i różnicowej fluorymetrii skaningowej. Określiła również ich stabilność termiczną poprzez wyznaczenie krzywych denaturacji. Kolejnym etapem były modyfikacje sekwencji mające na celu zwiększenie stabilności termicznej minibiałek oraz optymalizację rozkładu ładunków elektrostatycznych w obrębie struktur. W każdym przypadku Autorka oceniała wpływ

wprowadzonych zmian na aktywność katalityczną otrzymanych minibiałek. Na zakończenie Doktorantka porównała aktywność katalityczną zaprojektowanych minibiałek z aktywnością L-proliny, stanowiącej przykład małowcząsteczkowego organokatalizatora stosowanego w bezpośredniej asymetrycznej reakcji aldolowej. Wykazała, że w wybranych, łagodnych warunkach otrzymane minibiałka charakteryzowały się wyższą efektywnością katalityczną niż zastosowany związek referencyjny. W tym kontekście nasuwa się również pytanie, *czy znane są przykłady katalizatorów metaloorganicznych lub kompleksów metali katalizujących klasyczną reakcję aldolową oraz czy tego typu układy mogłyby potencjalnie znaleźć zastosowanie jak katalizatory tej reakcji?*

Kolejną część rozprawy stanowi część eksperymentalna, w której Doktorantka szczegółowo przedstawiła metody stosowane w projektowaniu minibiałek, procedury syntezy i oczyszczania peptydów oraz techniki wykorzystywane do ich charakterystyki i oceny aktywności katalitycznej. Pracę zamyka spis literatury obejmujący 113 odpowiednio dobranych pozycji, które stanowią solidną podstawę merytoryczną rozprawy i potwierdzają szerokie wykorzystanie aktualnego dorobku naukowego w zakresie projektowania białek, inżynierii enzymów oraz katalizy biologicznej.

Rozprawa została przygotowana z dużą starannością zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim. W trakcie analizy pracy nie znalazłam błędów językowych, literówek ani uchybień redakcyjnych. Całość została opracowana w sposób przejrzysty i profesjonalny. Szczególnie pozytywnie oceniam przygotowanie materiału graficznego – rysunki i schematy są czytelne, estetyczne oraz dobrze zintegrowane z tekstem, dzięki czemu znacząco ułatwiają interpretację przedstawionych zagadnień i wyników badań.

Na koniec nasunęły mi się jeszcze dwa pytania dotyczące szerszego kontekstu prowadzonych badań:

- *Dlaczego natura praktycznie nie wykorzystuje minibiałek jako enzymów, skoro – jak pokazują wyniki przedstawione w rozprawie – odpowiednio zaprojektowane minibiałka mogą wykazywać aktywność katalityczną?*
- *Czy w świetle uzyskanych wyników można stwierdzić, że łatwiejsze jest projektowanie nowych enzymów de novo, czy też modyfikowanie istniejących rusztowań białkowych w celu nadania im nowych funkcji katalitycznych?*

Mankamentem rozprawy jest brak informacji dotyczących dorobku naukowego Doktorantki, który nie został zamieszczony w przedłożonej pracy. Z tego względu nie mam możliwości pełnej oceny jej aktywności naukowej oraz dotychczasowego zaangażowania w działalność badawczą. Na podstawie dostępnych baz danych mogę jednak stwierdzić, że Doktorantka jest współautorką trzech publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) oraz jednego artykułu pokonferencyjnego. Biorąc pod uwagę tematykę rozprawy oraz przedstawiony zakres przeprowadzonych badań, chciałabym podczas obrony uzyskać szersze informacje dotyczące dorobku naukowego Doktorantki oraz jej aktywności w m. in. realizacji projektów czy udziale w konferencjach naukowych.

Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Szczepańskiej spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Postawione cele pracy zostały bez wątpienia osiągnięte i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Szczepańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań, ich oryginalność, szeroki zakres zastosowanych metod oraz istotny wkład w rozwój projektowania funkcjonalnych białek katalitycznych, z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Na szczególne podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy, łączący elementy inżynierii białek, biologii strukturalnej oraz katalizy, a także konsekwentne i kompleksowe podejście do rozwiązania postawionego problemu badawczego. Uzyskane wyniki stanowią wartościowy wkład w rozwój metod projektowania sztucznych katalizatorów białkowych i wskazują na duży potencjał dalszego rozwoju tej strategii. Z przekonaniem przedkładałam do rozważenia Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Podpisano przez/ Signed by:
Monika Wałęsa-Chorab
Data/ Date: 23.07.2026 19:42
 mSzafir