

WYDZIAŁ CHEMII

dr hab. Monika Kijewska, prof. UW.

Zespół Inżynierii Peptydów

ul. F. Joliot-Curie 14,
50-383 Wrocław

✉ monika.kijewska@uwr.edu.pl

☎ 71 375 7250

Wrocław, 13 lipca 2026 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Szczepańskiej pt.: „Projektowanie, synteza i aktywność minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązania węgiel-węgiel” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Berlickiego

Tematyka rozprawy wpisuje się w jeden z najbardziej dynamicznie rozwijających się kierunków współczesnej inżynierii białek, którego celem jest projektowanie nowych biokatalizatorów o pożądanych właściwościach. Projektowanie katalizatorów białkowych *de novo* należy obecnie do największych wyzwań współczesnej biologii strukturalnej, chemii obliczeniowej oraz inżynierii białek. Opracowanie skutecznych biokatalizatorów wymaga nie tylko zaprojektowania stabilnej struktury przestrzennej, ale przede wszystkim precyzyjnego ukształtowania miejsca aktywnego. Złożone zależności pomiędzy strukturą, dynamiką i funkcją białek sprawia, że uzyskanie wysoko aktywnych katalizatorów pozostaje zadaniem niezwykle wymagającym. W tym kontekście problem badawczy podjęty przez Autorkę należy uznać za niezwykle aktualny, ambitny i w pełni uzasadniony. W odpowiedzi na przedstawione wyzwania Pani mgr inż. Anna Szczepańska podjęła się realizacji ambitnego projektu badawczego, którego głównym celem było zaprojektowanie, synteza oraz kompleksowa charakterystyka minibiałek zdolnych do katalizowania reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel. Jako reakcję modelową wybrano reakcję aldolową pomiędzy 4-nitrobenzaldehydem a fenyloacetaldehydem, dla której dotychczas nie opisano skutecznych enzymatycznych katalizatorów. Badania oparto na dwóch komplementarnych strategiach projektowania katalizatorów. Pierwszy obejmował racjonalne projektowanie centrum aktywnego w obrębie naturalnego minibiałka MvaT poprzez wprowadzanie i optymalizację reszt katalitycznych. Drugi koncentrował się na projektowaniu minibiałek *de novo* o nowych topologiach przestrzennych z wykorzystaniem metod obliczeniowych oraz stabilizujących elementów strukturalnych.

Recenzowana rozprawa liczy 191 stron i ma klasyczny układ, obejmujący sześć głównych rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Wyniki i dyskusję, Podsumowanie, Część eksperymentalną oraz Bibliografię. Wstęp stanowi obszerne opracowanie literaturowe obejmujące zagadnienia związane z projektowaniem katalizy enzymatycznej, metodami ukierunkowanej ewolucji, przeciwciałami katalitycznymi, racjonalnym projektowaniem enzymów oraz projektowaniem



enzymów *de novo*. Rozprawa została przygotowana z wykorzystaniem 113 pozycji bibliograficznych, które dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w zakresie podejmowanej tematyki. Dobór literatury należy ocenić jako właściwy i adekwatny do realizowanych badań. Wykorzystane źródła świadczą o bardzo dobrej znajomości aktualnej literatury przedmiotu oraz stanowią solidną podstawę do realizacji przedstawionych badań.

Najważniejszą część rozprawy stanowi rozdział Wyniki i dyskusja, w którym przedstawiono kolejne etapy projektowania oraz optymalizacji katalitycznych minibiałek. Rozdział rozpoczyna omówienie mechanizmu badanej reakcji, po czym Autorka prezentuje wyniki dotyczące dwóch niezależnych strategii projektowania katalizatorów bazujących na domenie MvaT oraz minibiałek *de novo* o topologiach HHEEE i HEEEH. W obu zastosowanych strategiach projektowania Autorka przyjęła spójny i dobrze przemyślany schemat postępowania badawczego, który był konsekwentnie realizowany na kolejnych etapach pracy. Proces optymalizacji rozpoczynał się od komputerowego projektowania struktur białkowych i racjonalnego doboru mutacji, po czym następowała synteza, oczyszczanie oraz szczegółowa charakterystyka otrzymanych konstruktów. Dopiero stabilne minibiałka poddawano badaniom aktywności katalitycznej i analizie parametrów kinetycznych. Na szczególne uznanie zasługuje ścisła integracja metod obliczeniowych z badaniami eksperymentalnymi. Wyniki uzyskane na każdym etapie stanowiły podstawę do wprowadzania kolejnych modyfikacji, a ich eksperymentalna weryfikacja pozwalała na rzetelną ocenę wpływu zmian strukturalnych na aktywność katalityczną minibiałek. Takie iteracyjne podejście świadczy o dojrzałym warsztacie badawczym Autorki i znacząco podnosi wartość naukową przeprowadzonych badań.

Pierwsza część badań wykazała, że adaptacja istniejącego miejsca aktywnego retroaldolazy MvaT do katalizy nowej reakcji nie jest procesem łatwym ani w pełni przewidywalnym. Autorka zsyntetyzowała i scharakteryzowała 37 wariantów minibiałek, jednak do badań aktywności katalitycznej zakwalifikowano jedynie konstrukty wykazujące odpowiednią stabilność i zachowaną strukturę drugorzędową. Takie podejście pozwoliło oprzeć dalszą analizę na wiarygodnych modelach eksperymentalnych. Przeprowadzone badania wykazały, że samo przeprojektowanie centrum aktywnego nie gwarantuje uzyskania wysokiej aktywności katalitycznej, wskazując jednocześnie ograniczenia wykorzystania naturalnych rusztowań białkowych do projektowania nowych funkcji enzymatycznych. Jednocześnie zastosowana strategia pozwoliła wyłonić najbardziej obiecujący wariant, allR11YSQ1, dla którego uzyskano około 1850-krotny wzrost aktywności katalitycznej w porównaniu z reakcją niekatalizowaną. Uważam, że jest to bardzo wartościowy aspekt pracy, ponieważ równie istotne jak wskazanie skutecznych rozwiązań jest określenie ograniczeń stosowanej strategii projektowania.

Druga część pracy poświęcona została projektowaniu minibiałek *de novo* wykorzystujących dwie odmienne topologie – HHEEE oraz HEEEH. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że Autorka samodzielnie zaprojektowała nowe rusztowania białkowe z wykorzystaniem zaawansowanych metod obliczeniowych, łącząc projektowanie sekwencji z wykorzystaniem pakietu Rosetta z ich weryfikacją przy użyciu AlphaFold3. Przemyślany dobór

elementów strukturalnych, w tym zastosowanie reszt *trans*-ACPC stabilizujących helisy oraz odpowiednie rozmieszczenie reszt katalitycznych, świadczy o bardzo dobrym opanowaniu zasad projektowania białek *de novo*. Na szczególne podkreślenie zasługuje ogrom pracy eksperymentalnej wykonanej w tej części badań. Łącznie zaprojektowano, zsyntetyzowano, oczyszczono i scharakteryzowano 59 minibiałek, spośród których wyłoniono co najmniej 20 analogów o wysokiej stabilności termicznej, kwalifikujących się do dalszych badań aktywności katalitycznej. Dla jednego z wariantów o topologii HHEEE rozwiązano strukturę przestrzenną metodą NMR, potwierdzając zgodność struktury eksperymentalnej z modelem zaprojektowanym obliczeniowo. W obu seriach uzyskano minibiałka wykazujące wysoką aktywność katalityczną. Najwyższą aktywność wśród minibiałek o topologii HHEEE osiągnął wariant O3.1.10C, przyspieszający badaną reakcję około 3500-krotnie względem reakcji niekatalizowanej. Z kolei najbardziej aktywne minibiałka o topologii HEEEH (M3.10 oraz M3.7-YL) osiągnęły około 2500-3000-krotne przyspieszenie reakcji. Na uwagę zasługuje również wykazanie wpływu momentu dipolowego na aktywność katalityczną oraz synergistycznego działania wybranych mutacji, których efekt zależał od kontekstu strukturalnego. Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność przyjętej strategii projektowania i pokazują, że opracowane rusztowania stanowią wartościową podstawę do dalszego rozwoju minibiałek katalitycznych.

Omawiając przedstawione wyniki, należy docenić opracowanie graficzne pracy. Praca została przygotowana z dużą starannością pod względem edytorskim, a wszystkie schematy, modele strukturalne, wykresy i tabele cechują się wysoką estetyką, czytelnością i przejrzystością. Modele strukturalne minibiałek doskonale uzupełniają prowadzoną dyskusję i ułatwiają interpretację uzyskanych wyników, natomiast tabele porządkują dużą liczbę danych eksperymentalnych. Całość sprawia, że praca jest przejrzysta, logiczna i bardzo dobrze się ją czyta.

W Część eksperymentalnej Autorka szczegółowo dokumentuje zastosowaną metodykę badawczą opisując metody projektowania komputerowego z wykorzystaniem pakietu Rosetta oraz programu AlphaFold, symulacje dynamiki molekularnej, procedury syntezy i oczyszczania peptydów, metody identyfikacji produktów oraz techniki analityczne wykorzystane do charakterystyki otrzymanych minibiałek, w tym spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), nanoDSF, spektroskopię NMR, spektrometrię mas (MS) oraz wysokosprawną chromatografię cieczowa (HPLC) wykorzystaną do pomiaru aktywności katalitycznej. Opis procedur syntezy minibiałek z wykorzystaniem trzech automatycznych syntezyatorów peptydowych skłania do zadania następującego pytania. Zwróciłam uwagę, że czasy sprzęgania przedstawiono w odmiennych skalach czasowych (minuty dla syntezyatora mikrofalowego i sekundy dla syntezyatora przepływowego). Proszę o komentarz, z czego wynika ta różnica oraz jakie kryteria decydowały o wyborze konkretnego syntezyatora do syntezy poszczególnych minibiałek. Czy określone warianty okazały się bardziej wymagające syntetycznie i czy zastosowana metoda miała wpływ na wydajność syntezy oraz ilość uzyskanego czystego produktu?

Podsumowując praca prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, a przedstawione wyniki zostały rzetelnie opracowane i przedyskutowane. Nie umniejszając jej wysokiej wartości naukowej, chciałabym zwrócić się do Autorki z kilkoma pytaniami i uwagami o charakterze dyskusyjnym:

1. W pracy dla części zaprojektowanych minibiałek, które poddano badaniom aktywności katalitycznej, nie udało się wyznaczyć parametrów kinetycznych z uwagi na brak możliwości dopasowania danych do modelu Michaelisa–Menten. Interesujące byłoby wyjaśnienie, jakie kryteria przyjęto przy ocenie jakości dopasowania oraz na jakiej podstawie podejmowano decyzję o wykluczeniu danego wariantu z dalszej analizy kinetycznej. Czy decyzja ta opierała się na określonych kryteriach statystycznych, czy też wynikała z analizy przebiegu krzywych kinetycznych?
2. W Tabeli 35 część wyznaczonych parametrów kinetycznych charakteryzuje się stosunkowo dużą niepewnością. Proszę o wyjaśnienie, jakie były główne źródła tej niepewności oraz czy miała ona wpływ na ocenę aktywności katalitycznej poszczególnych wariantów i wybór konstruktów do dalszych etapów optymalizacji.
3. W pracy szeroko wykorzystano metody projektowania wspomaganego obliczeniami oraz ich eksperymentalną weryfikację. Który z parametrów wykorzystywanych podczas projektowania minibiałek okazał się – z perspektywy uzyskanych wyników – najtrudniejszy do przewidzenia i w największym stopniu odbiegał od wyników eksperymentalnych?

Poza przedstawionymi pytaniami dyskusyjnymi w pracy można wskazać również kilka drobnych nieścisłości językowych i redakcyjnych, które nie mają wpływu na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy, jednak warto je uwzględnić podczas przygotowywania manuskryptu do publikacji. Poniżej przedstawiam kilka wybranych przykładów:

- strona 43 zdanie „Podczas gdy stosowanie małych cząsteczek często wymaga wieloetapowej syntezy oraz prowadzenia reakcji w agresywnych środowiskach (toksyczne rozpuszczalniki, skrajne wartości pH czy wysoka temperatura), wykorzystanie enzymów ograniczają ich złożona struktura oraz wrażliwość na czynniki zewnętrzne.” Określenie „agresywne środowiska” warto zastąpić częściej stosowanym terminem „agresywne warunki reakcji”, natomiast fragment „wykorzystanie enzymów ograniczają...” lepiej sformułować jako „zastosowanie enzymów jest ograniczone przez...”, co poprawi płynność i równoległość konstrukcji zdania.
- strona 54 zdanie „Analizę strukturalną przeprowadzono dla 6 minibiałek, opierając się na pomiarach dichroizmu kołowego (rysunek 27).” W zdaniu wskazano, że analizę strukturalną przeprowadzono dla 6 minibiałek, natomiast na rysunku 27 przedstawiono wyniki dla 9 minibiałek. Warto zweryfikować tę rozbieżność i ujednolicić opis z przedstawionymi danymi.
- strona 71 zdanie „Liniowa zależność szybkości reakcji od stężenia substratu wskazuje na znaczne obniżenie przyspieszenia reakcji po wprowadzeniu mutacji T19Y i pogorszenie powinowactwa enzymu do substratów”. Interpretacja liniowej zależności szybkości reakcji od



stężenia substratu wymaga doprecyzowania. Sama liniowość nie stanowi bezpośredniego dowodu na zmniejszenie aktywności katalitycznej ani powinowactwa enzymu do substratu, lecz wskazuje przede wszystkim, że w badanym zakresie stężeń nie osiągnięto nasycenia enzymu. Taki przebieg zależności może sugerować wysoką wartość stałej K_M , a tym samym mniejsze powinowactwo enzymu do substratu, jednak nie wynika to z samej liniowości, lecz z interpretacji parametrów kinetycznych. Określenia „obniżenie przyspieszenia reakcji” warto zastąpić bardziej precyzyjnymi sformułowaniami: „zmniejszenie przyspieszenia reakcji”. Proponowana wersja: „Liniowa zależność szybkości reakcji od stężenia substratu wskazuje, że w badanym zakresie stężeń nie osiągnięto wysycenia enzymu, co sugeruje zmniejszenie powinowactwa do substratów oraz znaczne zmniejszenie przyspieszenia reakcji po wprowadzeniu mutacji T19Y.”

- strona 81 zdanie „W szczególności podział minibiałka w sposób II (rysunek 47) prowadził do 4-krotnego zwiększenia przyspieszenia reakcji, z ok. 450 (wariant allR11YSQ) do ok. 1850 (wariant YSQ1).” To zdanie można poprawić zarówno stylistycznie, jak i pod względem precyzji. Największy problem dotyczy sformułowania „4-krotnego zwiększenia przyspieszenia reakcji”. W enzymologii lepiej mówić o 4-krotnym zwiększeniu szybkości reakcji albo 4-krotnym wzroście efektu katalitycznego, ponieważ „przyspieszenie” samo w sobie jest już wielkością względną. Proponowana wersja: „W szczególności podział minibiałka zgodnie ze sposobem II (rysunek 47) skutkował wzrostem przyspieszenia reakcji z około 450-krotnego dla wariantu allR11YSQ do około 1850-krotnego dla wariantu YSQ1.”
- strona 120 zdanie „Przyspieszenie reakcji wciąż jednak utrzymuje się na wysokim poziomie, wynoszącym około 1000-krotność reakcji niekatalizowanej. Zdanie jest zrozumiałe, ale „wynoszącym około 1000-krotność reakcji niekatalizowanej” nie jest poprawnym ani naturalnym sformulowaniem. Nie mówi się, że przyspieszenie wynosi krotność reakcji. Mówimy raczej o 1000-krotnym przyspieszeniu lub że reakcja przebiega 1000 razy szybciej.
- strona 133 zdanie „Porównanie wyników z obu metod sugeruje, że zaprojektowane minibiałka cechują się złożoną strukturą, która jest stabilna pod kątem struktury drugorzędowej, ale różnią się konformacją, na którą wpływają nawet pojedyncze mutacje w obrębie rdzenia i uczestniczące w stabilizujących sieciach oddziaływań.” Określenie „stabilna pod kątem struktury drugorzędowej” warto zastąpić sformulowaniem „stabilna pod względem struktury drugorzędowej” lub „o stabilnej strukturze drugorzędowej”. Ponadto końcowa część zdania wymaga doprecyzowania, ponieważ z obecnej konstrukcji wynika, że to mutacje uczestniczą w stabilizujących sieciach oddziaływań, podczas gdy w rzeczywistości w oddziaływaniach tych uczestniczą reszty aminokwasowe (lub ich łańcuchy boczne), w obrębie których zlokalizowane są mutacje.
- strona 140 zdanie „Wprowadzenie tyrozyny w pozycji 27 zaowocowało otrzymaniem mutantu o charakterystyce katalitycznej pomiędzy wariantami M3 a M7. Zaobserwowano przyspieszenie reakcji ok. 1081 oraz wartość K_M równą 2,7 mM (rysunek 95, tabela 47).” Zgodzę się, że „mutant” jest terminem poprawnym naukowo w biologii molekularnej



i inżynierii białek, ale w tym zdaniu brzmi nieco niezręcznie. W pracach doktorskich częściej stosuje się określenia „wariant”, „wariant białka”, „enzym z mutacją” lub „konstrukt”, zwłaszcza gdy mówimy o celowo zaprojektowanych mutacjach. Zamiast „charakterystyce katalitycznej” lepiej brzmi „właściwościach katalitycznych” lub „parametrach kinetycznych” natomiast zapis „ok. 1081” jest niejednoznaczny. Jeśli chodzi o wzrost 1081 razy, lepiej napisać „około 1081-krotne przyspieszenie reakcji”. Poprawna wersja mogłaby brzmieć w sposób następujący: „Wprowadzenie tyrozyny w pozycji 27 doprowadziło do otrzymania wariantu o właściwościach katalitycznych pośrednich pomiędzy wariantami M3 i M7. Zaobserwowano około 1081-krotne przyspieszenie reakcji oraz wartość K_M wynoszącą 2,7 mM (rysunek 95, tabela 47).”

- strona 140 zdanie „Wyniki te sugerują, że histydyna nie jest głównym czynnikiem odpowiadającym za wysokie przyspieszenie reakcji osiągane przez M7 i M3x7; kluczową rolę może natomiast odgrywać Tyr-9 lub kombinacja Tyr- 9 z Trp-14 (tabela 48).” Określenie „wysokie przyspieszenie reakcji” brzmi nienaturalnie, a zapis „Tyr- 9” zawiera zbędną spację. Proponowana wersja: „Wyniki te sugerują, że histydyna nie jest głównym czynnikiem odpowiadającym za znaczne przyspieszenie reakcji obserwowane dla wariantów M7 i M3x7. Kluczową rolę może natomiast odgrywać Tyr-9 lub kombinacja reszt Tyr-9 i Trp-14 (tabela 48).”
- strona 165. Tytuł podrozdziału „Odcinanie peptydów z żywicy” proponowałabym zastąpić bardziej precyzyjnym określeniem „Uwalnianie peptydów z żywicy” lub „Uwalnianie peptydów z nośnika stałego”.

Dorobek naukowy Doktorantki należy ocenić bardzo wysoko. Jest on ponadprzeciętny na etapie przygotowywania rozprawy doktorskiej i świadczy o dużej aktywności naukowej Autorki. Obejmuje on trzy współautorskie publikacje naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach międzynarodowych (*Journal of Medicinal Chemistry*, *Journal of Materials Chemistry B* oraz *Journal of Molecular Structure*) o łącznym współczynniku wpływu *Impact Factor* równym 17,2. Ponadto kolejny manuskrypt został już złożony do publikacji. Prace bezpośrednio prezentujące wyniki stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej są obecnie w przygotowaniu. Wyniki badań były prezentowane na kilku konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym, gdzie spotkały się z bardzo dobrym odbiorem środowiska naukowego. Potwierdzeniem wysokiej jakości prowadzonych badań są wyróżnienia przyznane Doktorantce, w tym dwie nagrody za najlepszy poster (*27th Polish Peptide Symposium* oraz *Protein DICES*) oraz nagroda za najlepszą prezentację ustną podczas seminarium doktoranckiego *CHEMDay*. Całokształt dorobku naukowego świadczy o dużej aktywności badawczej Doktorantki, umiejętności prowadzenia badań na wysokim poziomie oraz skutecznego upowszechniania ich wyników.



Podsumowując, przedłożona rozprawa doktorska stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie poświęcone aktualnej i wymagającej problematyce projektowania minibiałek katalitycznych. Umiejętne połączenie metod obliczeniowych z szerokim zakresem badań eksperymentalnych pozwoliło na uzyskanie wartościowych wyników naukowych, potwierdzając wszechstronne przygotowanie Doktorantki do prowadzenia samodzielnej działalności badawczej.

W mojej ocenie rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Szczepańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, nowatorski charakter przeprowadzonych badań, imponujący zakres wykonanych prac eksperymentalnych i obliczeniowych oraz wyjątkową staranność przygotowania dysertacji, składam wniosek o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Monika Kijewska

