

Gdańsk, 28.10.2024

dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG
Katedra Chemii Biomedycznej
Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej
autorstwa mgr. inż. Pawła MORAWIAKA zatytułowanej:
„Peptydowe mimetyki hydrolaz”.

Niniejsza recenzja powstała w odpowiedzi na pismo dr. hab. inż. Roberta Góry, prof. uczelni Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 24.09.2024.

Przedstawiona mi do recenzji praca autorstwa mgr. inż. Pawła Morawiaka dotyczy projektowania, syntezy oraz oceny aktywności hydrolitycznej szeregu peptydów o zdefiniowanej strukturze przestrzennej zawierających w swej sekwencji reszty aminokwasowe stanowiące aparat katalityczny wybranych enzymów z grupy hydrolaz. Tematyka rozprawy wpisuje się w nurt badań dotyczących otrzymania cząstek lub cząsteczek zdolnych do katalizowania konkretnych reakcji, w tym hydrolizy wiązań estrowych lub amidowych (peptydowych). W tym celu stosowano peptydy lub peptydomimetyki o wymuszonej strukturze, modyfikowane nanocząstki, estry koronowe, cyklodekstryny oraz szereg innych cząsteczek. Pierwsze doniesienia o próbie otrzymania cząsteczek o właściwościach katalitycznych pochodzą z drugiej połowy XX wieku i dotyczą próby otrzymania

hydrolazy zawierającej klasyczną triadę proteinaz serynowych lub esteraz (Ser, His, Asp). Jednak mimo szeregu prowadzonych badań otrzymanie związku o efektywności katalitycznej zbliżonej do natywnego enzymu nie przyniosło spodziewanego efektu. Szybkość hydrolizy i parametry kinetyczne wyznaczone dla mimetyków odpowiednich enzymów różniły się w najlepszym razie o trzy rzędy wielkości.

Wobec powyższych faktów, stwierdzam że tematyka rozprawy jest niezwykle wymagająca, a jej podjęcie świadczy o dużej odwadze naukowej Doktoranta.

Ocena formalna

Praca napisana jest w formie klasycznej rozprawy choć sekwencja rozdziałów została w niej zaburzona - umieszczenie części eksperymentalnej przed rozdziałem opisującym wyniki w mojej opinii ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie treści opracowania. Rozprawa składa się ze 178 stron uporządkowanych w dziewięć rozdziałów. Taka struktura pracy nie budziłaby zastrzeżeń, gdyby nie dwukrotne pojawianie się rozdziałów: 3.1 (strony 10 i 42), 5.1 (strony 60 i 79) oraz 5.5 (strony 96 i 134).

Prawdopodobnie ze względu na znaczną objętość pracy Autor nie ustrzegł się licznych błędów stylistycznych i omyłek edytorskich, których listę zamieściłam w tekście rozprawy. Skrajnym przykładem nieprawidłowej składni, błędów literowych oraz braku właściwej edycji jest strona 57 i kolejna (podrozdział 3.3.2.). Zauważyłam dziesięć błędów na stronę mimo zamieszczonego na tej stronie rysunku 52. Kontynuacja tego podrozdziału zawarta na 30% strony A4 zawiera dziewięć omyłek. Trudno mi uwierzyć, że edytor tekstu nie zaznaczył przynajmniej części z nich.

Tabela 7 zacytowana na stronie 43 w istotny sposób odbiega od źródłowej wersji. Mniej istotny jest już fakt, że Doktorant konsekwentnie stosuje gwiazdkę (*) w miejsce symbolu mnożenia (\times).

Kluczowa dla rozprawy tabela 60 (strona 161), zawierająca dane jakościowe otrzymanych peptydów zawiera nieścisłości w nomenklaturze związków. Część związków nosi inne nazwy niż te umieszczone w tabelach cząstkowych (tabele: 19, 21, 25, 42 i 48). Prosiłabym Doktoranta o ujednoczenie nazewnictwa związków podczas publicznej obrony.

Podsumowując, część edytorska rozprawy pozostawia niedosyt, lecz jej lektura nie sprawia większych problemów za wyjątkiem wspomnianego już podrozdziału 3.3.2.

Osobną uwagę budzi fakt umieszczenia wiadomości podręcznikowych w rozdziale (wstęp) dotyczących właściwości, podziału i mechanizmu katalitycznego proteinaz. Z powodzeniem rozdział ten można by skondensować lub usunąć.

Ocena merytoryczna

W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie mgr inż. Morawiak otrzymał ponad 80 peptydów metodą syntezy chemicznej. W mojej opinii, w tekście rozprawy brakuje, danych źródłowych (chromatogramy, widma MS) służących do stworzenia tabeli 60 pozwalających na prawidłową identyfikację otrzymanych związków. Proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tego zagadnienia podczas publicznej obrony.

Otrzymane związki zostały zaprojektowane tak, aby wykazywać określony mechanizm katalityczny: właściwy dla hydrolaz metalozależnych lub cysteinowych. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie czym kierowano się podczas wyboru takiego, a nie innego substrat/substratów służącego do monitorowania aktywności określonych związków. Fakt ten ma kluczowe znaczenie dla szeregu prowadzonych badań i zważywszy na znaczną hydrofobowość stosowanych substratów może w istotny sposób wpływać na otrzymane wyniki.

Obserwowany wielokrotnie wzrost sygnału fluorescencji bez dodatku peptydu może być spowodowany niską stabilnością związku w roztworze wodnym jak czytamy w pracy, lecz także wytrącaniem substratu w buforze pomiarowym. Stąd pytanie jak eksperymentalnie rozwiązać ten problem?

Badania nad strukturą i stabilnością otrzymanych peptydomimetyków wydają się potwierdzać, że ścieżka badawcza, którą obrał Doktorant nie należy do najłatwiejszych. Ponownie wykonał znaczą ilość eksperymentów, a jedynie część z nich należy uznać za sukces.

Zważywszy na ogrom pracy doświadczalnej uważam część eksperymentalną za wartościową, mimo pewnych niedoskonałości. Metody badawcze zostały odpowiednio dobrane i są adekwatne do planowanych badań. Pewne fragmenty badań budzą naturalną ciekawość naukową i jak rozumiem stanowią pole do dalszych badań.

Stąd moje pytania:

1. W jaki sposób Autor rozprawy kontrolował w serii peptydów oznaczonych MM możliwość powstawania mostków disulfidowych zarówno wewnątrz jak i międzycząsteczkowych?
2. Czy Doktorant stosował model liniowy przy wyznaczaniu parametrów kinetycznych? Krzywe Michealisa-Menten wydają się posiadać nieprawidłowy przebieg tzn. nie obserwujemy charakterystycznego nieliniowego wzrostu szybkości powstawania produktu przy dużych stężeniach substratu. Rozwiązaniem byłoby tutaj zastosowanie modelu liniowego Lineweavera-Burka.
3. W jaki sposób Autor przeliczył wartości szybkości hydrolizy RFU/s na $\mu\text{M/s}$?
4. Czy wartości k_{cat}/K_M zawarte w tabelach: 24, 27, 28, 31, 34-36, 38-41 oraz 43 są poprawne? Z czego wynika jednostka [1/s] dla wspomnianych wartości? Czy wartość E_0 we wszystkich eksperymentach wyznaczania parametrów kinetycznych wynosiła $10\mu\text{M}$, tak jak podano na stronie 160?
5. Czy próbowano użyć substratu zawierającego wiązanie amidowe/peptydowe zamiast estrowego?
6. Czy skala syntezy z wykorzystaniem 30 mg nośnika (Liberty Blue CEM) pozwalała na otrzymanie pożądanych ilości związków?
7. W mojej opinii czasy reakcji sprzęgania są ogólnie zbyt długie i prowadzone w zbyt niskiej temperaturze w wypadku reszt Cys/His.

8. Czy termin fala ekscytacji (strona 160) jest prawidłowy?
9. Czy stosowanie czarnych płytek dla jednego z substratów i białych dla drugiego było intencjonalne? Z czego wynika taki, a nie inny wybór płytek pomiarowych?

Podsumowanie całości

Mimo zgłoszonych uwag, które mają charakter dyskusji naukowej i w najmniejszym stopniu nie wpływają na ocenę rozprawy, uważam ją za interesującą i wartościową. Jednocześnie pragnę podkreślić fakt, że eksperyment naukowy nie zawsze kończy się sukcesem a porażka są wpisane w badania. Uważam, że wyniki otrzymane przez Doktoranta stanowią nowość naukową i przyczyniają się do poznania mechanizmu fałdowania peptydów stanowiących mimetyki hydrolaz. Niewątpliwie prace w tym obszarze należy kontynuować.

Wobec powyższych faktów stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Pawła Morawiaka spełnia ustawowe kryteria jakie powinna spełniać praca doktorska. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. inż. Pawła Morawiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Magdalena Wysocka