

Recenzja rozprawy doktorskiej „Peptydowe mimetyki hydrolaz” autorstwa Pawła Morawiaka

Praca doktorska powstała na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dr hab. Łukasza Berlickiego. Recenzowana praca doktorska dotyczy projektowania, syntezy i badania aktywności esterazowej peptydów, których długość sekwencji nie przekraczające 50 reszt aminokwasowych.

Praca napisana jest w języku polskim i zawiera jednostronicowe streszczenie (Abstract) w języku angielskim. Postępowanie się językiem polskim w opracowaniach naukowych być może nie należy do mocnych stron Autora, co przy obecnym trendzie na dominację języka angielskiego nie należy dziwić. Stosowane przez Autora słownictwo naukowe jest generalnie poprawne, to jednak formy gramatyczne jak też wydzierający się do pracy żargon laboratoryjny psuje odbiór całości. Treść pracy jedynie potwierdza generalny trend obserwowany w życiu codziennym jakim jest zanik podziału na rzeczowniki policzalne i niepoliczalne, co przy kwantyfikacji sprowadza się do stosowania form np. ilość reszt aminokwasowych (np. opis rysunku 29). Przykładem żargonu laboratoryjnego są stosowane w opisach rysunków zwroty „...przyrost pomiarów fluorescencji...” (przykładowo str. 76) co powinno być napisane jako „przyrost intensywności fluorescencji”. Bardzo niezręcznie brzmią nazwy podrozdziałów przykładowo „Podsumowanie mimetyków metaloenzymu MvaT” (str. 95), gdzie przy stosowanej przez Autora formule nazywania podrozdziałów zwykłe „Podsumowanie” byłoby całkowicie adekwatne. Czasami Autora nie opuszcza poczucie humoru i nadaje obiektom swoich badań cechy organizmów żywych „ Takie peptydy czerpią korzyści (s. 22), co może świadczyć o dużym zaangażowaniu autora i „życiem” się z obiektami swoich badań. Pomijając przedstawione powyżej uwagi, praca jest napisana językiem zrozumiałym dla recenzenta.

Praca ma typowy dla tego rodzaju opracowania układ z wydzielonym Wstępem (48 stron), jednostronicowym Celem pracy, rozdziałem Wyniki i dyskusja (62 strony), Podsumowaniem (2 strony). Rozdział pod tytułem Część eksperymentalna (8 stron) zawiera opis stosowanych metod badawczych, warunków eksperymentów i podstawowych danych analitycznych dotyczących syntezowanych i stosowanych w badaniach peptydów. Ostatnią częścią pracy jest spis literatury zawierającym 191 pozycji, pozycje literaturowe przywoływane są tekście w systemie vancouverkim. Cała praca łącznie z cytowaną literaturą mieści się na 178 stronach formatu najbardziej zbliżonego do C5.

Pierwsze merytoryczne zastrzeżenie budzi tytuł pracy „Peptydowe mimetyki hydrolaz”. Co do zasady tytuł opracowania powinien być krótki (i taki jest) i jednocześnie w miarę precyzyjny. Użycie w tytule pojęcia hydrolaza jest swego rodzaju nadużyciem ze strony Autora, owszem badana była aktywność hydrolityczna. Hydrolazy to jednak pojęcie bardzo rozległe i obejmujące enzymy katalizujące rozpad wielu typów wiązań chemicznych. Stosowane przez

Autora w pracy modelowe substraty wyraźnie wskazują, że autor badał jedynie aktywność esterazową, tak więc tytuł rozprawy powinien raczej brzmieć „Peptydowe mimetyki esteraz” aby dobrze oddawał treść rozprawy.

Rozdział Wstęp jest obszerny i generalnie porusza większość aspektów niezbędnych do zrozumienia badań opisywanych w dalszych częściach pracy. Nie jest dla recenzenta zrozumiałe z jakiego powodu Autor poświęca w specjalistycznej pracy naukowej tyle miejsca (pierwsze strony rozdziału) na podawanie informacji podstawowych takich jak biosynteza białek na rybosomach, definicja sekwencji peptydowej i jej kierunku, chiralność tzw. „kodowanych aminokwasów”, pojęcie hierarchicznego opisu struktury przestrzennej białek itp. Praca skierowana jest do specjalistów, którzy powinni posiadać tę podstawową wiedzę biochemiczną niezbędną do zrozumienia zawartych wyników. Drugim zarzutem do zawartości i konstrukcji informacji zawartej we Wstępie jest brak rozdziału przybliżającego wyczerpująco strukturę i aktywność palca cynkowego czy białka MvaT. Brak jest tych informacji we Wstępie, ale w rozdziale Wyniki i dyskusja pojawiają się one ale w bardzo skrótowej formie. Podobnie wygląda sytuacja z niektórymi aspektami dotyczącymi mechanizmu działania wybranych typów enzymów. Autor poświęca temu tematowi sporo miejsca we Wstępie, jednak przy opisie otrzymanych wyników (rozdział Wyniki i dyskusja) wraca do tego tematu podając dodatkowe opisy i przedstawiając dodatkowe rysunki (Rysunki 92,102, 115). Podsumowując rozdział Wstęp zawiera większość niezbędnych informacji, jednak nie jest do końca przemyślna zarówno treść jaki i poziom merytoryczny prezentowanych tam informacji.

Najobszerniejszy rozdział pracy Wyniki i dyskusja obejmuje badania przeprowadzone dla ponad 80 peptydów (Autor podaje, że peptydów tych było 86, recenzentowi z rachunków własnych wychodziło 89 sekwencji) o różnej długości sekwencji i kompozycji aminokwasowej. Wszystkie peptydy zostały zsyntetyzowane chemicznie, oczyszczone a następnie przebadane za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) w celu estymacji ich prawdopodobnej struktury przestrzennej, jak też ustalenia ewentualnej temperatury strukturalnego przejścia fazowego. W przypadku kilkunastu peptydów wykonano pomiary temperatury przejścia fazowego za pomocą nieznaną dla recenzenta techniki i stosowanego urządzenia. Autor wzmiankuje (str. 141), że chciał wykonać pomiary za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), ale ze względu na brak dostępu do takiego aparatu wykonywał pomiary z zastosowaniem nie do końca opisanej techniki i aparatury. Opis eksperymentu jest bardzo skrótowy, brak jest nazwy aparatu (podany jest jedynie producent), a przedstawione surowe dane na rysunkach 138, 139 i 144 są opisane w sposób nie pozwalający określić, co te dane przedstawiają. Jeśli Autor zdecydował się przedstawić wyniki tych eksperymentów, to opis ich wykonania i wszelkie niezbędne informacje powinny być zawarte w rozdziale Część eksperymentalna, ale niestety tych informacji tam nie ma.

Dla większości badanych peptydów Autor wykonał pomiary aktywności enzymatycznej z zastosowaniem techniki fluorescencyjnej, stosując dwa modelowe substraty pochodną pirenu ATATS (kwas 8-acetoksy-1,3,6-trisulfono piren) i pochodną kumaryny UMB (4-metylo-7-acetoksy kumaryna). Autor wzmiankuje, że w przypadku kilku badanych peptydów podjęto próbę, czy też planowano badania strukturalne za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), czy w czasie publicznej obrony Autor mógłby podać informacje/skomentować dlaczego takie badania nie zostały wykonane, albo jakie problemy uniemożliwiły przeprowadzenie takich badań. Potwierdzenie struktury przestrzennej badanych peptydów za pomocą jakiegokolwiek wysokorozdzielczej metody strukturalnej (NMR,

krystalografia) byłoby merytorycznie bardzo zasadne, bo potwierdzałoby stawiane w pracy wnioski dotyczące wpływu struktury przestrzennej na aktywność enzymatyczną.

Rozdział Wyniki i dyskusja zawiera podrozdział 5.1.2. który opisuje syntezę APCP (kwasu 2-amino-1-cyklopentanokarboksylowego), zaś podrozdział 5.1.3 syntezę peptydów zawierających APCP. Treść podrozdziału 5.1.2. jest powtórzona w rozdziale Część eksperymentalna, a szczególne warunki syntezy peptydów zawierających APCP powinny się znaleźć również w tym rozdziale. Nie jest zrozumiałe dla recenzenta dlaczego Autor z jednej strony duplikuje opisy, albo umieszcza je niezgodnie z logiką konstrukcji pracy.

Generalnie praca Autora skupiała się głównie na wykorzystaniu bazowych sekwencji peptydowych (nazywanych przez Autora rusztowaniami) i modyfikowanie ich w taki sposób, aby utworzyć analogi centrów aktywnych enzymów np. proteazy cysteinowych, metaloproteaz, nukleaz. Przeprowadzone przez autora próby prowadziły do różnych efektów jednak znaczna część prób zakończyła się powodzeniem prowadząc do sekwencji peptydowych wykazujących (przynajmniej na bazie pomiarów temperaturowych CD) stabilną strukturę przestrzenną i aktywność katalityczną. Autorowi udało się otrzymać aktywne katalitycznie preparaty praktycznie jedynie w przypadku peptydów zawierających analogi centrum aktywnego proteaz cysteinowych (proteazy cysteinowe wykazują wysoką aktywność esterazową: uwaga Recenzenta). Próba wykorzystania centrów aktywnych zawierających jony cynku, prowadziła do stabilnych struktur przestrzennych badanych peptydów lecz konstrukty te nie wykazywały zazwyczaj aktywności katalitycznej. W treści pracy zabrakło mi dyskusji, albo komentarza dlaczego peptydy zawierające miejsca wiązania jonu cynku nie wykazywały aktywności katalitycznej. Substraty hydrolaz (np. nukleazy, karboksypeptydazy) zawierających jony metali w centrum aktywnym zawsze niosą ładunek w bezpośrednim sąsiedztwie hydrolizowanego przez enzym wiązania. Stosowane przez Autora modelowe substraty niestety nie spełniały tego warunku tak więc trudno było oczekiwać, że opracowane przez autora konstrukty będą aktywne. Oczekiwałem aby w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej Autor zaproponował modelowy substrat, który mógłby zostać zastosowany do wykazania aktywności katalitycznych konstruktów zawierających jon metalu w analogu centrum aktywnego.

Jak to napisano powyżej konstrukty zawierające analog centrum aktywnego proteaz cysteinowych okazały się najbardziej obiecujące pod względem aktywności katalitycznej. Autor rozwinął badania nad tymi obiecującymi konstruktami, starając się po przez modulację ładunku całkowitego cząsteczki peptydu, czy zmianę hydrofobowości zwiększyć powinowactwo peptydu (obserwacja zmiany stałej K_m) do stosowanych substratów. Jak to pokazano w rozdziałach 5.5.6 i 5.5.7 zabiegi te przyniosły oczekiwane efekty prowadzące do wytworzenia konstruktów wykazujących relatywnie małe wartości stałej K_m (wysokie powinowactwo) do substratu ATATS i związana z tym selektywnością do tego konkretnego substratu. W tym miejscu brakuje mi jednak trochę szerszej dyskusji i krytycznego spojrzenia na otrzymane wyniki. Autor wykonuje ciekawy eksperymenty np. patrz dane zawarte w Tabeli 34 czy 35. Gdzie bada charakterystykę kinetyczną reakcji w 20 minutach po jej zapoczątkowaniu i w przedziale czasowym 20-60 minut. Dane pokazane w odpowiednich tabelach niezależnie od użytego substratu lub katalitycznego peptydu wyraźnie pokazują, że w początkowym okresie reakcji (pierwsze 20 minut) stałe k_{cat} i K_m mają wartości większe niż te wartości obliczone dla danych z drugiego przedziału czasowego (20-60 minut). Tego rodzaju zależność wskazuje, że prawdopodobnie mamy do czynienia z procesem inhibicji reakcji przez produkt. Trzeba pamiętać, że równanie Michaelis-Menten (stosowane w pracy do opisu

kinetyki reakcji) zostało wyprowadzone przy założeniu, że powinowactwo produktu do enzymu jest zanedbywalnie niskie. Niestety w tekście pracy trudno jest znaleźć analizy, czy dywagacje dotyczące wpływu takiego procesu (inhibicja przez produkt) na otrzymywane wartości parametrów kinetycznych badanych reakcji. Co więcej, brakuje odpowiedniego eksperymentu (oczywiście dla wybranych peptydów) pokazującego, że taki proces ma miejsce i ma wpływ na wyznaczone parametry kinetyczne. Na marginesie, jeśli parametry kinetyczne miałyby być wyznaczone dość precyzyjnie, a produkt reakcji wykazywałby znaczne powinowactwo do katalizującego peptydu, to należałoby sprawdzić na ile tworzenie kompleksu peptyd-produkt wpływa na wydajność fluorescencji produktu. Szczególnie dotyczy to tych peptydów które niosą znaczny ładunek wypadkowy.

Przy okazji mam generalną uwagę dotyczącą całego tego rozdziału, Autor bardzo mocno skupia się na wynikach, a poświęca bardzo mało miejsca na dyskusję wyników, odniesienia do literatury itp. można skonkludować, że opisywany rozdział powinien raczej nazywać się Wyniki, komponent dotyczący dyskusji jest bardzo skromny.

Inna uwaga techniczna, dotyczy tego, że przy przedstawianiu wyników badań nad aktywnością katalityczną badanych części peptydów, Autor nie pokazuje (albo nie wykonywał tych badań w taki sposób) wyników dla substratu bez obecności badanego peptydu (patrz rysunki 72,73,76,91,93,94,95). Ponadto brak jest informacji dotyczącej tego jakie było stężenie początkowe substratu i peptydu w badanych próbkach. Tego rodzaju informacja (stężenia substratu i peptydu) jest podana jedynie w przypadku rysunku 66.

Pominę omawianie Podsumowania pracy, gdzie autor syntetycznie podsumowuje najważniejsze wyniki osiągnięte w trakcie prowadzenia badań.

Rozdział Część eksperymentalna jest napisany w sposób dość zwarty, ale na tyle czytelny, że nie byłoby problemów z odtworzeniem wykonywanych eksperymentów. W opisach wcześniejszych rozdziałów pracy zawarłem szereg uwag czego brakuje w tym rozdziale, albo co powinno zostać przeniesione z innych części pracy. Opisy wyników, a szczególnie opisy projektowania nowych sekwencji są wzbogacone o liczne rysunki jak też modele strukturalne (np. rysunki 103, 110), mapy rozkładu ładunku elektrostatycznego (np. rysunek 103). Jednak brak jest jakichkolwiek wzmianek dotyczących stosowanych programów, metod do stworzenia tych modeli i obrazów.

Na zakończenie ostatnia uwaga ogólna. Praca zawiera olbrzymi materiał eksperymentalny, sama praca jest obszerna więc siłą rzeczy jest pewna liczba jakiś niedociągnięć technicznych i redakcyjnych, o których pisałem powyżej. Jednak im liczba wykonanych eksperymentów jest większa, tym większa rola Autora aby tę ogromną liczbę wyników zaprezentował w sposób jak najbardziej czytelny i przejrzysty dla czytelnika (recenzenta). Przyjęty model przedstawienia wyników w formie dość obszernego swego rodzaju „strumienia świadomości” nie jest najlepszym rozwiązaniem. Przyjęty obecnie w publikacjach naukowych model eksponowania najistotniejszych rezultatów z głęboką dyskusją w tekście głównym pracy, a przesunięcie ważnych ale mających znacznie pomocnicze lub weryfikacyjne wyników do załączników, jest słusznym rozwiązaniem i możliwym do zastosowania przy pisaniu rozpraw doktorskich.

Podsumowując, najważniejsze osiągnięcia zawarte w pracy, autor: i) zaprojektował i przebadał kilkanaście sekwencji peptydowych zawierających analog centrum aktywnego proteaz cysteinowych, które to sekwencje peptydowe, które prawdopodobnie posiadały zdefiniowaną strukturę przestrzenną i zdolność do katalizowania reakcji hydrolizy

modelowych substratów ii) zmieniając polarność i hydrofobowość (po przez substytucje wybranych reszt aminokwasowych) wybranych peptydów potrafił kontrolować efektywność katalizy jak również wpływać na selektywność substratową; iii) wykazał, że peptydy wykazujące aktywność katalityczną zawierające jedynie naturalne kodowane aminokwasy mogą być efektywnie modyfikowane syntetycznymi aminokwasami i ewentualnie prowadzić do wytworzenia organicznych cząsteczek katalitycznych odpornych na degradację enzymatyczną. Wyniki zawarte w pracy spełniają w pełni warunki nowości naukowej określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742 z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuje do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pana Pawła Morawiaka do dalszych etapów postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

St. Oty