



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Tel: 42-636-25-42, 42- 631-31-40

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,

e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anastasii Antonenko

pt.: „Zastosowanie ligacji enzymatycznej do selektywnej oraz funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek”

Rozprawa mgr Anastasii Antonenko zatytułowana „Zastosowanie ligacji enzymatycznej do selektywnej oraz funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek” została wykonana w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką naukową Prof. dr. hab. Artura Krężła. Wykorzystanie ligacji do modyfikacji białek jest ważne, ponieważ umożliwia tworzenie nowych, unikalnych białek z precyzyjnie kontrolowanymi właściwościami. Jest to kluczowe dla inżynierii białek i ma szerokie zastosowanie w medycynie, biotechnologii i biologii syntetycznej. Ligacja enzymatyczna, w przeciwieństwie do tradycyjnych metod chemicznych, pozwala na łączenie fragmentów białek w sposób wysoce selektywny. Oznacza to, że można precyzyjnie kontrolować miejsce połączenia, co jest kluczowe dla zachowania funkcjonalności i aktywności docelowego białka. Można w ten sposób tworzyć chimeryczne białka, czyli białka hybrydowe, łączące cechy różnych białek, np. domenę wiążącą przeciwciała z domeną toksyny, w celu stworzenia leku przeciwnowotworowego. Technika ta umożliwia wprowadzanie do białek nienaturalnych aminokwasów w ściśle określonych miejscach. Te zmodyfikowane aminokwasy mogą nadawać białkom nowe właściwości, np. fluorescencyjne, fotoczułe czy zwiększające ich stabilność. Jest to kluczowe dla badań nad funkcjami białek i projektowania nowych narzędzi do obrazowania molekularnego. Metoda ta łączy syntezę chemiczną z syntezą biologiczną (w komórce). Małe fragmenty białek można syntetyzować chemicznie, co pozwala na wprowadzenie modyfikacji trudnych do osiągnięcia w komórce, a następnie łączyć je enzymatycznie z większymi, naturalnie produkowanymi fragmentami. Dzięki temu możliwe jest otrzymywanie dużych, skomplikowanych białek z unikalnymi modyfikacjami. Technologia ta ma ogromny potencjał w tworzeniu nowych leków białkowych. Pozwala również na produkcję białek do celów diagnostycznych oraz katalizatorów w procesach przemysłowych.

Bez żadnych wątpliwości można stwierdzić, że tematyka badawcza podjęta w rozprawie jest aktualna i stanowi wkład w bardzo intensywnie rozwijany „gorący” obszar badawczy.

Główny cel pracy dotyczył opracowania efektywnych, selektywnych i łagodnych strategii do tworzenia wiązań peptydowych z wykorzystaniem ligacji enzymatycznej. Opracowane protokoły biosyntetyczne miały charakteryzować się brakiem problemów takich jak: niska selektywność, wydajność, konieczność stosowania kosztownych i czasochłonnych procedur oraz denaturacją białek, które to często towarzyszą klasycznym metodom syntetycznym, w tym natywnej ligacji chemicznej.

Główny cel badawczy, Doktorantka zaplanowała osiągnąć poprzez realizację trzech celów szczegółowych, obejmujących:

- 1) opracowanie chemoenzymatycznej strategii semisyntezy białek o złożonej strukturze na przykładzie metalotioneiny SmtA. Białko to z uwagi na dużą liczbę reszt cysteiny stanowi duże wyzwanie w rekombinowanej metodzie otrzymywania. Dodatkowo obecność motywu -NGL w strukturze metalotioneiny SmtA sprawia, że białko to może być zastosowane w enzymatycznej ligacji z wykorzystaniem ulepszonego wariantu endopeptydazy asparaginowej OaAEP1_C247A;
- 2) opracowanie enzymatycznej strategii wprowadzania wybranych modyfikacji potranslacyjnych (ubikwitynacja/sumoilacja) do struktury modelowych białek. Doktorantka oczekiwała, że realizacja tego celu dostarczyłaby nowych narzędzi do analizy wpływu PTM. Jednak, aby było to możliwe konieczne było zaprojektowanie dwufunkcyjnej sondy fluorescencyjnej, SrtCrAsH-EDT2 zawierającej ugrupowanie CrAsH-EDT2 warunkujące specyficzne wiązanie z motywem czterocysteinowym w białkach Doktorantka zaplanowała również wbudowanie do sondy sekwencji rozpoznawanej przez sortazę A, co pozwoliłoby na selektywną integrację PTM (SUMO i Ub).
- 3) ocena funkcjonalności i efektywności wariantu butelazy 1 w reakcji cyklizacji peptydów oraz znakowaniu fluorescencyjnym białek modelowych.

Podstawę rozprawy doktorskiej mgr Anastasii Antonenko stanowią wyniki pracy badawczej zawarte w trzech spójnych publikacjach, czyli rozprawa doktorska ma formę tzw. zszywki.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zawarta jest na 126 stronach, obejmujących wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu, streszczenie w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów, cel pracy badawczej, wprowadzenie teoretyczne do

publikacji I, II i III, dyskusję i wnioski, przedruk publikacji stanowiących podstawę rozprawy wraz z informacjami uzupełniającymi, oświadczenia współautorów publikacji naukowych.

Rozdział wprowadzenie stanowi przegląd literaturowy (30 stron) opatrzone 321 odnośnikami literaturowymi, dotyczący głównego tematu rozprawy. W sposób syntetyczny omówione zostały zagadnienia związane z omówieniem biosyntezy białek, charakterystyką metalotionein, metodami semisyntezy białek, modyfikacjami białek. Wybór zagadnień oraz sposób ich przedstawienia świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. W części tej Doktorantce nie udało się uniknąć żargonowych terminów, przykładowo: instalacja reszt aminokwasowych, słaba wydajność. W moim przekonaniu, powszechnie stosowany przez Doktorantkę zapis reszty asparaginowe, serynowe i inne, powinien brzmieć: reszta kwasu asparaginowego, reszta seryny, i tak dalej dla pozostałych aminokwasów.

Kolejny rozdział stanowi opis trzech publikacji stanowiących podstawę recenzowanej pracy.

Pierwsza praca opublikowana w *Bioconjug. Chem.* 2023, 34, 719-727. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.3c00037, (IF = 3.9) dotyczyła opracowania chemoenzymatycznej strategii syntezy białek. Doktorantka oczekiwała, że opracowanie metody, która rozwiąże problemy związane z podatnością reszt cysteiny na utlenianie, umożliwi zastosowanie tej metody w badaniach biotechnologicznych. Podjęta została próba syntezy metalotioneiny SmtA (białko bogate w reszty cysteiny), ponadto białko to posiada motyw -NGL, dlatego jest substratem enzymu OaAEP1_C247A użytecznego w enzymatycznej ligacji. Proces obejmował chemiczną syntezę fragmentów peptydowych metodą SPPS i następnie ich łączenie. Kluczowym etapem było zoptymalizowanie warunków reakcji (czas oraz stosunek molowy substratów). Zoptymalizowana ligacja była prowadzona przez jedną godzinę w temperaturze 37°C i stosunku molowym fragmentów C- do N-końcowego 1:2. Pozwoliło to Doktorantce na uzyskanie 70% wydajności ligacji. Wykazano, że otrzymane chemoenzymatycznie białko SmtA zachowuje zdolność do specyficznego wiązania jonów metali przejściowych. W oparciu o badania CD stwierdzono, że otrzymane białko ma właściwą strukturę przestrzenną. To co najważniejsze, opracowane łagodne warunki reakcji (pH 5,6) pozwoliły uniknąć utleniania grup tiolowych cysteiny.

Praca druga, która została opublikowana z *ACS Omega*, 2024, 9, 45127–45137. DOI: 10.1021/acsomega.4c05828 (IF = 4.3) dotyczyła badań nad opracowaniem narzędzia, które umożliwiłoby selektywne i efektywne modyfikacje potranslacyjnych przy minimalnym wpływie na strukturę białek i zachowaniu funkcjonalności białek docelowych. Doktorantka podjęła próby opracowania sondy bisarsenowej umożliwiającej jednoczesne wprowadzenie

PTM i monitorowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym na podstawie sygnału fluorescencyjnego. Aby uzyskać założone rozwiązanie Doktorantka połączyła dwie komplementarne techniki: enzymatyczną ligację z udziałem sortazy A oraz fluorescencyjne znakowanie białek za pomocą bisarsenowej sondy SrtCrAsH-EDT2. Pozwoliło to na selektywne wprowadzenie modyfikacji potranslacyjnych, takich jak ubikwitynacja i sumoilacja, do S-transferazy glutationowej i fosfatazy tyrozynowej. Ubikwityna i SUMO zostały odpowiednio zmodyfikowane poprzez wprowadzenie motywu rozpoznawanego przez SaSrtA co umożliwiło przyłączenie sondy SrtCrAsH-EDT2. Należy dodać, że sondy bisarsenowe były wielokrotnie testowane w układach komórkowych, i nie obserwowano negatywnego wpływu na żywotność komórek przy zastosowaniu stężenia poniżej 1 μM oraz krótkiego czasu inkubacji. Reakcje przebiegały sekwencyjnie w jednym naczyniu („one-pot”) bez izolowania lub oczyszczania produktów pośrednich. Struktury otrzymanych produktów zostały potwierdzone metodą elektroforetyczną i MS.

Ostatnia publikacja stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej została opublikowana w *Microb. Cell Factories*, 2024, 23: 325. DOI: 10.1186/s12934-024-02598-5. (IF = 4.9). Praca ta obejmowała kompleksową charakterystykę nowoopracowanego wariantu butelazy 1, w której wprowadzono mutację punktową w regionie odpowiedzialnym za aktywność ligazy (LAD-1, *ang. ligase-activity determinant-1*), polegającą na zamianie Val237 na Ala oraz Thr238 na Tyr. Butelaza AY charakteryzuje się podwyższoną stabilnością, rozpuszczalnością i zachowaną aktywnością katalityczną. Wyniki badań wykazały, że butelaza AY jest cennym uzupełnieniem zestawu endopeptydaz asparaginowych. Produkcja i oczyszczanie butelazy AY, jest znacznie łatwiejsze w porównaniu do szczepu dzikiego. Butelaza AY charakteryzuje się on wyższą stabilnością i brakiem agregacji w obniżonym pH. Umożliwiło to na uzyskanie aktywnego enzymu z wydajnością około 45 mg z 1 l hodowli i czystości powyżej 95%. W oparciu o parametry $K_m = 0,75 \text{ mM}$ oraz $k_{cat} = 10 \text{ s}^{-1}$ Doktorantka wykazała zdolność butelazy AY do szybkiej i wydajnej ligacji modelowych substratów. Stosując butelazę AY przeprowadzono ligację substratów zawierających naturalne i nienaturalne reszty aminokwasowe oraz znakowanie białka GFP, fragmentu α -synukleiny.

Lekturę tekstu rozprawy uznaję za wielce stymulującą do głębszych przemyśleń. Po przeczytaniu rozprawy nasunęły mi się jednak pytania, na które chciałabym uzyskać odpowiedzi:

1) Jakie są zalety oraz wady/ograniczenia enzymatycznej modyfikacji białek w porównaniu do klasycznych (chemicznych) bioortogonalnych metod?

2) Jakie są zalety oraz wady/ograniczenia natywnej ligacji chemicznej (NCL) oraz ligacji białek z wykorzystaniem produkcji białkowej (EPL)?

Proszę o wyjaśnienie różnic pomiędzy strukturą: MetAla, metyloalanina (*ang. 2-methylalanine*) oraz Aib, kwas 2-aminoizomasłowy (*ang. 2-aminoisobutyric acid*).

Ponadto chciałabym prosić o bardziej szczegółowe wskazanie różnic w długości fragmentów -CCRECC- oraz -CCPG-CC- (strona 37).

Chciałabym również, aby Doktorantka dokładniej omówiła izomerazy (EC 5) oraz różnicę pomiędzy konformerami a stereoizomerami (enancjomery/diastereoizomery).

Praca napisana jest poprawnie, zwięźle i przejrzysto. Z przedstawionego przeglądu literaturowego i omówienia wyników badań wyraźnie widać dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia zaplanowanych badań. W opisie wyników widoczna jest także umiejętność interpretacji i krytycznego spojrzenia na otrzymane wyniki. Wszystkie umiejętności nabyte przez Doktorantkę podczas wykonywania pracy świadczą o tym, że jest doskonale wyszkoloną specjalistką w zakresie szeroko pojętej chemii organicznej, w szczególności fotochemii.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór tematu badań w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami badań.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa mgr Anastasii Antonenko pt.: „Zastosowanie ligacji enzymatycznej do selektywnej oraz funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek” spełnia warunki określone z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.) w związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Anastasii Antonenko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy i istotny wkład w rozwój dyscypliny, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Beata Kolesińska

Łódź, 31 08 2025 r