

Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa Anastasii Antonenko pt. "Zastosowanie ligacji enzymatycznej do selektywnej oraz funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek"

Badania będące podstawą przedstawionej rozprawy doktorskiej zostały wykonane przez doktorantkę podczas jej pracy w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, w grupie prof. dr hab. Artura Krężła.

Treść rozprawy jest przedstawiona w formie tzw. *przewodnika*, gdzie w pierwszej części zostało zamieszczone wprowadzenie. Wstęp do zagadnień związanych z badaniami został napisany w sposób bardzo przejrzysty i łatwy do zrozumienia dla osób, które na co dzień nie zajmują się chemią białek czy biotechnologią, ale tematyka nie jest im obca. Nie brakuje tu praktycznie żadnych elementów opisowych, może prócz ogólnego omówienia właściwości fotofizycznych barwników fluorescencyjnych, zwykle używanych w chemii peptydów. Brak też jest ogólnej charakterystyki technik fluorescencyjnych. Mimo tych braków wstęp w doskonały sposób nawiązuje on do celów jakie zostały postawione doktorantce podczas badań.

Praca jest wartościowa pod względem naukowym, przedstawiając, prócz wyników i ich dyskusji, możliwości jakimi posługują się biochemicy i chemicy, aby dostosować cząsteczki, często skomplikowane, do potrzeb narzuconych przez choćby przemysł farmaceutyczny lub wymagania związane z biotechnologią. Autorka doskonale zdaje sobie sprawę nie tylko z potrzeb i możliwości modyfikacji biocząsteczek, ale również wskazuje na fakt, że każda modyfikacja cząsteczki, choćby niewielkich rozmiarów fluoroforem, wpływa na jej właściwości. Zmiany te, z kolei, są bardzo ważne jeśli mowa jest o peptydach i białkach, ponieważ niewielka zmiana ich konformacji wpływa na aktywność. I tak, możliwości modyfikacji peptydów jest wiele, a przebadanie każdej z nich i jej wpływu na właściwości produktu jest bardzo żmudnym i czasochłonnym zajęciem.

Autorka opisała wyniki swoich badań w trzech publikacjach naukowych:

- *Bioconjugate Chem.* (2023), **34**, 719, w której doktorantka jest pierwsza na liście autorów
- *ACS Omega* (2024), **9**, 45127, w której doktorantka jest pierwsza na liście autorów
- *Microbial Cell Factories* (2024), **23**, 325, w której doktorantka jest druga na liście autorów, a jednocześnie udział w pracy jest taki sam jak pierwszego autora.

Wiodąca rola doktorantki w badaniach jest jasna i niepodważalna, zaś doskonale przygotowanie do badań potwierdza ilość zacytowanych prac (339), która jest dwa razy większa aniżeli prosta

suma liczby użytych w publikacjach referencji (165). Tekst rozprawy jest napisany zrozumiałym językiem, a wyniki są omówione w sposób ogólny jednocześnie odsyłając czytelnika do publikacji naukowych. Całość, treść przewodnika i publikacji, stanowi dobry opis działań doktorantki pod okiem promotora. Jednocześnie lektura pozostawia kilka miejsc, które warto skomentować oraz pytań, na które będą rad usłyszeć odpowiedzi. Dla ułatwienia moje główne komentarze i pytania zostały pogrupowane jak w rozprawie, tj. z podziałem na kolejne publikacje.

Publikacja *Bioconjugate Chem.* (2023), 34, 719

W pierwszej z prac doktorantka w ciekawy sposób dokonała analizy aktywności enzymu roślinnego (OaAEP1), zmutowanego w pozycji 247 używając do tego celu barwników organicznych połączonych odpowiedniej długości peptydem. Ten zawierał motyw rozpoznawany przez użyty enzym, działanie którego obserwowano za pomocą technik fluorescencyjnych. Udowodniono w ten sposób, że używany enzym jest aktywny. Drugim testem była ligacja dwóch peptydów dająca jako wynik trzeci, dłuższy, składający się z tych samych fragmentów po eliminacji glicyny i leucyny. Szkoda, że w drugim teście nie zastosowano odpowiednich barwników fluorescencyjnych pokazujących przebieg reakcji. Tak krótkie peptydy użyte do testów aż proszą się o taką modyfikację. Po przeprowadzeniu testów aktywności autorka otrzymała metalotioneinę **SmtA**, peptyd o wysokiej zawartości cystein. Czystość peptydu okazała się na bardzo dobrym poziomie, zaś wydajność reakcji oceniono na 70%. Właściwości otrzymanego peptydu zostały porównane z tym pochodzącym z *Escherichia coli* potwierdzając strukturę produktu. W tym miejscu pojawiają się pytania.

1. Czy możliwym jest otrzymanie metalotioneiny **SmtA** z tych samych peptydów co te opisane w pracy *Bioconjugate Chem.* (2023) 34, 719, lecz z przyłączonymi fluoroforami w taki sposób, aby po otrzymaniu docelowego białka między fluoroforami zaszło bezpromienne, rezonansowe przekazanie energii (FRET)? Czy potrafi Pani zaproponować taką strukturę?
2. Rysunek 3b pokazuje widmo fluorescencji przed i po zerwaniu wiązania między asparaginą i glicyną w motywie **NGL**. Czy pasmo emisji rosło w czasie od zera do wartości około 25 a.u. zachowując położenie maksimum, czy też dało się zaobserwować jakieś zmiany jego położenia lub kształtu? Czy pokazana na rysunku intensywność jest intensywnością w maksimum, czy intensywnością integrowaną w zakresie całego pasma?

Publikacja *ACS Omega* (2024), 9, 45127

W drugiej pracy doktorantka opisała łączenie cząsteczek dwóch struktur białkowych za pomocą odpowiednio zmodyfikowanego, opartego o szkielet fluoresceiny, barwnika fluorescencyjnego. Barwnik został zmodyfikowany fragmentem peptydu, który jest rozpoznawany przez sortazę.

3. W tekście rozprawy doktorantka stwierdziła, że przeprowadziła *początkowe etapy syntezy sondy SrtCrAsH-EDT₂*. Proszę o doprecyzowanie, do którego z pięciu etapów tyczy się to stwierdzenie.

4. Podczas połączenia sondy **SrtCrAsH-EDT₂** z motywem czterocysteinowym następują dwie reakcje. Jedna z nich zachodzi na centrach zawierających arsen, zaś druga jest reakcją otwarcia pięciocłonowego pierścienia laktonowego. Pod wpływem jakiego czynnika zachodzi druga z nich?
5. Czy została wyznaczona wydajność kwantowa fluorescencji barwnika **SrtCrAsH-EDT₂** przed związaniem z motywem czterocysteinowym? To samo pytanie dotyczy sondy po związaniu z peptydem **TC12**. Czy przeprowadzono pomiar czasu życia fluorescencji dla kompleksu **SrtCrAsH-TC12**?
6. Proszę o wyjaśnienie jaki cel miało rejestrowanie widm 3D pokazanych na rysunku S1 (Fig. S2) zamieszczonym w materiale dodatkowym do publikacji *ACS Omega* (2024), **9**, 45127?
7. Na rysunku **3b** pokazano sposób wiązania czterech cystein do cząsteczki sondy fluorescencyjnej. W opisanych warunkach wiązanie do pierwszego atomu arsenu tworzą cysteiny pierwsza i druga (kolejno na rysunku), zaś do drugiego atomu arsenu, trzecia i czwarta. Wiedziony ciekawością osadzoną w chemii strukturalnej proszę o odpowiedź na następujące pytania: *a)* Czy znane są przypadki, w których pierwszy atom arsenu wiąże się z cysteiną drugą i trzecią, zaś drugi atom arsenu z cysteinami pierwszą i czwartą? *b)* Czy znane są układy, gdzie każdy z atomów arsenu łączy się z innym peptydem?
8. Czym był podyktowany wybór fluoroforów? Czy inne, wykazujące wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku w stanie wzbudzonym, nie byłyby lepszymi kandydatami, a to ze względu na wysoką czułość na zmiany środowiska?

Publikacja *Microbial Cell Factories* (2024) ,23, 325

W pracy zamieszczono dane i dyskusję wyników dotyczące otrzymania nowej butelazy (wariant AY) i jej testów. Nie bez znaczenia jest fakt, że **butelaza AY** jest łatwiejsza do oczyszczenia aniżeli jej typ dziki. Ta właściwość jest bardzo atrakcyjna nie tylko ze względu na ewentualne koszty, ale również na czas od otrzymania cząsteczki do jej użycia. Dodatkowo **butelaza AY** nie wytrąca się podczas aktywacji w takiej ilości jak jej niemodyfikowana forma. Poza opisanymi w pracy reakcjami przeprowadzono inne testy związane z aktywnością otrzymanej **butelazy AY** oraz porównano wyniki z innymi endopeptydazami asparaginowymi. Stała szybkości katalitycznej dla otrzymanej **butelazy AY**, w porównaniu z innymi endopeptydazami, biorącymi udział w reakcji motywu NHV i nukleofila GL, jest najwyższa w badanej serii.

9. Skoro w przypadku butelaz używanych w badaniach doktorantka obserwowała otrzymywanie cyklicznych produktów, to czy obserwowane były cykliczne produkty dimeryzacji? Czy znane są jakiegokolwiek doniesienia na temat dimeryzacji peptydów do ich cyklicznych struktur? Jaka jest wewnętrzna średnica cyklicznego peptydu GLPVSTKPVATRNVH?
10. Czy **butelaza AY** została poddana testom przechowywania w różnych warunkach pod kątem zachowania jej właściwości?

Dodatkowe pytania i uwagi

11. Czy literatura zna przykłady na stabilizowanie wielosiarkowych cząsteczek za pomocą wiązań halogenowych?
12. Proszę dookreślić pojęcie *aktywowany tioester na C-końcu*. Chodzi mi o to w jaki sposób zachodzi aktywacja.
13. W przypadku niektórych procesów rysunki byłyby przydatne. Za przykład może służyć rozdział 5.2.2 i znajdujący się w nim opis reakcji.

Podsumowanie

Praca laboratoryjna nad enzymatyczną ligacją oraz towarzyszące badania aktywności jakie wykonała doktorantka jest godna pochwały, a w połączeniu z jasnym przedstawieniem wyników powoduje, że z pełnym przekonaniem i spokojnym sumieniem rekomenduję dopuszczenie do publicznej obrony pracy doktorskiej. Z całą pewnością rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (*Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zmianami*) prezentując ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Borys Ośmiałowski

