



Prof. Łukasz Berlicki  
Katedra Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wroclaw  
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Anastasii Antonenko pt.: "Zastosowanie ligacji enzymatycznej do selektywnej oraz funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek"**

Pani mgr Anastasiia Antonenko zrealizowała pracę doktorską pod opieką prof. Artura Krężela w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wroclawskiego. Nadrzędnym celem pracy było opracowanie i zwalidowanie nowych narzędzi do syntezy i funkcjonalizacji białek.

Od dekad otrzymywanie i modyfikacja białek stanowią poważne wyzwanie dla kolejnych pokoleń naukowców. Pomimo opracowania wielu skutecznych metodologii problem ten nie został dotychczas w pełni rozwiązany ze względu na rozbudowaną i zróżnicowaną strukturę białek. Najpowszechniej stosowana obecnie metoda nadekspresji białek w różnych układach biologicznych nie zawsze jest satysfakcjonująco skuteczna. W ostatnich latach dynamicznie rozwijają się metody syntezy białek wykorzystujących ligacje chemiczne i enzymatyczne, które umożliwiają wielokrotne łączenie krótkich fragmentów peptydowych. W tym obszarze badań także można napotkać na wiele nierozwiązanych problemów dotyczących selektywności, wydajności reakcji jak i kosztów ich wykonania. Niewątpliwie, rozwiązanie nawet niektórych problemów związanych z syntezą i modyfikacjami białek jest niezwykle ważne i otwiera nowe możliwości badań w tym obszarze. Dlatego tematyka podjęta przez Doktorantkę jest ambitna i ważna z poznawczego punktu widzenia. Dodatkowo,

zaprezentowane wyniki dostarczają nowych narzędzi, które mogą być szeroko wykorzystywane przez innych.

Praca doktorska Pani mgr Anastasii Antonenko bazuje na trzech publikacjach oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych: *Bioconjugate Chemistry*, *ACS Omega* i *Microbial Cell Factories*. We wszystkich publikacjach mgr Antonenko jest pierwszym współautorem a autorem korespondencyjnym jest Promotor Doktorantki – prof. Artur Krężel. W skład przedstawionej rozprawy wchodzi streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cele pracy, wyniki i dyskusja, podsumowanie, bibliografia oraz materiały dodatkowe. Część wyników i dyskusja jest połączeniem trzech wspomnianych artykułów oryginalnych opatrzonych krótkimi opisami w języku polskim. Co ważne, dla każdej publikacji Doktorantka ściśle definiuje swój zakres prac, co dodatkowo jest potwierdzone załączonymi oświadczeniami wszystkich współautorów. Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem polskim i angielskim (publikacje i streszczenie). Doktorantka przedstawia i dyskutuje problemy z odpowiednią starannością i szczegółowością należną pracom naukowym. Nie znalazłem błędów językowych, które warte byłyby wspomnienia z powodu utrudnienia odbioru pracy. Strona graficzna pracy jest także na dobrym poziomie. Przedstawione rysunki są informatywne i o odpowiedniej jakości.

Wstęp dyskutowanej pracy obejmuje 31 stron i dobrze wprowadza czytelnika w zakres jej tematyki. Warto zauważyć, że dodatkowo każda z publikacji zawiera wstęp, który w szczegółowym zakresie dotyczy odpowiedniego materiału. Z tego powodu wstęp pracy doktorskiej jest relatywnie krótki i mniej szczegółowy. W opinii Recenzenta niektóre fragmenty wstępu są niepotrzebne i opisują zbyt podstawowe zagadnienia, np. biosynteza białek (rozdział 1.1), modyfikacje białek (rozdział 4.2) czy klasy enzymów (rozdział 5.3.1). Z drugiej strony, należy jednakże podkreślić, że we wstępie wykorzystano bardzo dużą liczbę referencji do literatury (339 pozycji), które w większości dotyczyły badań z ostatnich lat.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej mgr Antonenko definiuje cele Jej pracy. Cele te są jasno sformułowane i przekonująco uzasadnione. Zdefiniowane trzy cele szczegółowe odpowiadające trzem prezentowanym publikacjom.

W pierwszej prezentowanej pracy opisano syntezę mataloteiny SmtA z zastosowaniem ligazy OaAEP1. Dwa fragmenty białka otrzymano z zastosowaniem syntezy na podłożu stałym i następnie sprzęgnięto enzymatycznie. Doktorantka otrzymała odpowiedni enzym, substraty peptydowe, zoptymalizowała warunki reakcji a następnie oczyściła produkt. Co ważne, otrzymywanie tego białka innymi metodami jest utrudnione ze względu na dużą liczbę reszt

cysteiny. Właściwości syntetycznego białka były identyczne z właściwościami białka rekombinowanego. Czy możliwa byłaby synteza metaloteiny SmtA bez użycia ligacji (tj. w jednym procesie SPPS)? Jakie są zalety/wady syntezy z zastosowaniem enzymatycznej ligacji w porównaniu do syntezy liniowej?

Drugi podrozdział wyników i dyskusji dotyczył opracowania bifunkcyjnego linkera białek. Bisarsenowa pochodna fluoresceiny była funkcjonalizowana fragmentem peptydowym, który zawierał motyw rozpoznawany przez sortazę A. W dwuetapowym procesie możliwe jest połączenia dwóch białek poprzez ligację z linkerem z zastosowaniem sortazy A oraz następnie reakcję układu bisarsenowego z motywem CCPGCC w drugim białku. Doktorantka uczestniczyła w syntezie opracowanego linkera, oraz zoptymalizowała jego reakcję z białkami. Do jakich problemów badawczych można by zastosować opracowaną metodę modyfikacji białek z linkerem biarsenowym?

Trzecia część wyników dotyczyła opracowania nowego mutantu butelazy o znacząco lepszych parametrach od wariantu oryginalnego. Otrzymany enzym można efektywnie ekspresjonować, wykazuje się wysoką stabilnością i aktywnością katalityczną. Doktorantka przetestowała możliwości ligacji wielu peptydów oraz wykazała możliwość cyklizacji peptydów. Co ciekawe, wykazała także aktywność względem peptydów zawierających niekanoniczne aminokwasy. Niestety wzór kwasu aminoizomasłowego jest narysowany niepoprawnie (strona 9 publikacji). Czy porównanie struktury miejsca aktywnego butelazy i ligazy OaAEP1 pozwoliłoby na zaprojektowanie mutacji w którymś z enzymów, pozwalającej na zmniejszenie selektywności substratowej?

W czasie obrony pracy doktorskiej dodatkowo proszę Doktorantkę o przedyskutowanie jakie są zalety i wady chemicznej (np. NCL) i enzymatycznej ligacji w przypadku syntezy białek o długościach sekwencji rzędu kilkuset reszt aminokwasowych.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Anastasii Antonenko oceniam bardzo dobrze. Doktorantka z sukcesem zrealizowała trzy ambitne projekty z obszaru inżynierii białek. Wykazała się znaczącymi umiejętnościami eksperymentalnymi obejmującymi syntezę i charakterystykę peptydów oraz ich wykorzystanie do otrzymywania i modyfikacji białek. Praca mgr Antonenko dostarczyła nowych narzędzi do ligacji oraz selektywnej modyfikacji peptydów i białek, które są bardzo wartościowe dla szerokiej społeczności naukowej. Co ważne, opracowane metodologie zostały przekonująco przetestowane na nietrywialnych przykładach. Wyniki mgr Antonenko pozwoliły na lepsze zrozumienie analizowanych układów, w szczególności właściwości metalotein, reaktywności układów bisarsenowych czy specyficzności substratowej wybranych enzymów.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anastasii Antonenko spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r., z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Wrocławskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Anastasii Antonenko do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Wnoszę także o wyróżnienie pracy stosowaną nagrodą.

*J. Bertold.*