



**Uniwersytet
Gdański**



**WYDZIAŁ CHEMII
UNIwersytet GDAŃSKI**

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-5235088
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

Gdańsk, 8 września 2023

**Ocena pracy doktorskiej mgr. Grzegorza Wołczańskiego
p.t. „Modele białek typu TASP. Selekcja stabilnych układów na drodze kowalencyjnej
dynamicznej chemii kombinatorycznej”**

Jednym z kamieni milowych w badaniach peptydów, a szczególnie peptydów biologicznie czynnych, było opracowanie syntetycznych metod ich otrzymywania. Początkowo syntezy prowadzono w roztworze, z czasem (od lat 80. ubiegłego wieku) zdecydowaną przewagę uzyskała, zaproponowana przez Bruce’a Merrifielda, synteza na nośniku stałym. Metoda ta, nie pozbawiona ograniczeń, umożliwiła znacznie szybszą syntezę popytów, dając nowy impuls badaniom nad peptydami biologicznie czynnymi. Te z kolei zwiększyły zapotrzebowanie na obiekty tych badań. Jednym ze sposobów otrzymywania w krótkim czasie wielu (nawet milionów) peptydów była opisana na przełomie lat 80. i 90. ubiegłego wieku, synteza peptydów metodą kombinatoryczną. Polega ona na syntezie mieszaniny (biblioteki) peptydów oraz identyfikacji (dekowolucji biblioteki) tych o pożądanych właściwościach biologicznych. Obecnie metody chemii kombinatorycznej stosowane są w badaniach także związków o charakterze niepeptydowym. W nurt tej problematyki wypisują się zadania badawcze realizowane przez mgr. Grzegorza Wołczańskiego. Temat rozprawy bez wątpienia leży w głównym nurcie współczesnej chemii bioorganicznej, o czym przekonują liczne prace opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, nawiązujące do przedstawionej powyżej problematyki.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 187 stron tekstu. Zasadnicze rozdziały pracy to: *Wprowadzenie w tematykę badawczą* (27 stron), *Cel pracy* (2 strony), *Metodyka badawcza* (27 stron), *Dyskusja wyników* (99 stron), *Podsumowanie oraz perspektywy dalszego rozwoju tematu* (4 strony), *Literatura* (253 pozycji), kopie 3 prac współautorstwa Kandydata referujące znaczną część wyników rozprawy. Opracowanie uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz wykaz dorobku naukowego Doktoranta (7 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz 7 prezentacji konferencyjnych). Zdecydowanie najobszerniejszy jest rozdział, w którym mgr Wołczański przedstawia uzyskane wyniki. Przyjęty przez Kandydata sposób redakcji rozprawy pozwala na jednoznaczną ocenę najważniejszych, wymaganych prawem, aspektów opracowania.

W pierwszym rozdziale Kandydat, wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem Jego zainteresowania; definiuje pojęcie dynamicznej biblioteki kombinatorycznej. Jest to mieszanina związków chemicznych tworzących się w wyniku ich odwracalnej transformacji, która może być skutkiem reorganizacji wiązań kowalencyjnych lub oddziaływań niekowalencyjnych, a na skład tworzącej się biblioteki wpływ mają warunki prowadzenia eksperymentu. Podkreślić należy, że koncepcja tworzenia bibliotek dynamicznych jest odległa od konstrukcji i analizy „klasycznych” bibliotek kombinatorycznych. Zasadnicza część tego rozdziału poświęcona jest opisowi odwracalnych reakcji tworzenia wiązań węgiel - węgiel, węgiel - heteroatom, heteroatom – heteroatom w kontekście ich wykorzystania w dynamicznej chemii kowalencyjnej. Z uwagi na problematykę rozprawy, szczególnie istotny jest tu ostatni wątek tworzenia wiązań kowalencyjnych przez atomy siarki. Kolejnym dyskutowanym zagadnieniem, bezpośrednio związanym z tematem rozprawy, jest zaproponowana przez Manfreda Muttera koncepcja tworzenia syntetycznych białek na matrycy (ang. *template-assembled synthetic proteins*, TASP). Polega ona na syntezie cząsteczek białek (peptydów) na matrycy cyklicznej. Ograniczenie swobody konformacyjnej matrycy zbliża do siebie łańcuchy białka (peptydu) ułatwiając ich właściwe fałdowanie i samoorganizację imitującą naturalne struktury przestrzenne. Kandydat prezentuje przykłady cyklicznych związków chemicznych wykorzystywanych jako matryce TASP, a także ich zastosowanie w tworzeniu dynamicznych bibliotek kombinatorycznych. Te utworzone przez makrocycle oligodisulfidowe stanowią punkt wyjścia badań własnych Kandydata. Rozdział kończy się opisem metod optymalizacji syntez tzw. trudnych sekwencji. Bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny tego rozdziału, opis jest syntetyczny, ale na potrzeby recenzowanej pracy zupełnie wystarczający. Doktorant odwołuje się do wyników najnowszych publikowanych prac. Lekturę rozprawy ułatwia poprawny język i styl, przejrzyste rysunki i tablice, dzięki temu tekst czyta się z dużym zainteresowaniem. Korekta pracy jest staranna, a

znalezione niedociągnięcia niewielkie. Czytając, miałem zastrzeżenia do składni kilku zdań, znalazłam też kilkanaście błędów w odmianie wyrazów (zaznaczyłem w tekście). Chciałbym natomiast zwrócić uwagę na odmianę nazwisk pochodzenia obcego. Autor konsekwentnie odmienia je z apostrofem. Ten stosuje się tylko do niektórych nazwisk (np. de Gaulle, Joyce, Kennedy). Lektura tego i kolejnych rozdziałów rozprawy przekonuje, że Doktorant potrafi redagować teksty naukowe.

Celem badań prowadzonych przez Kandydata w ramach rozprawy doktorskiej było opracowanie warunków tworzenia dynamicznych bibliotek peptydowych osadzonych na cyklicznych matrycach tworzonych w wyniku oksydatywnej oligomeryzacji (tworzenia wiązań disulfidowych) aromatycznych pochodnych ditioli. Realizując zadania badawcze Doktorant opracował ścieżki syntetyczne oraz przeprowadził chemiczną syntezę czterech serii peptydów zawierających na *N*-końcach ugrupowanie ditiolowe, które w kolejnych etapach wykorzystywał do tworzenia oligomerów, a następnie analizował pod kątem ich potencjału aplikacyjnego w konstrukcji dynamicznych bibliotek peptydowych. Związki te, nazwane przez Autora koniugatami peptydowymi otrzymane zostały (w roztworze lub osadzonych na nośniku) w wyniku reakcji *N*^α-bromoacetylowanych peptydów z 1,3,5-tribenzenotritiolem (TMB-peptydy), z kwasem tiocyjanurowym (TMT-peptydy) lub 1,3,5-tris(mekaptometylo)benzmem (TMMB-peptydy). Czwartą serię koniugatów (DMT-peptydy) mgr Wołczański otrzymał w kilkietapowej procedurze obejmującej reakcję *N*-końcowych grup aminowych peptydylo-żywicy z trichlorotriazyną, odszczepienie peptydu z jednoczesną deprotekcją grup ochronnych oraz wymianę atomów chloru na grupy tiolowe, lub w wyniku ligacji cysteamin do kwasu tiocyjanurowego. Cel rozprawy, a także realizowane zadania badawcze uważam za ambitne, a wybrane podejście stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Praca realizowana była w Zespole Inżynierii Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, a promotorem rozprawy był dr hab. Marek Lisowski. Pomoc merytoryczna Promotora, wieloletnie doświadczenie członków Zespołu w realizacji zadań problematyki rozprawy oraz harmonijna współpraca naukowa z koleżankami i kolegami z Zespołu bez wątpienia ułatwiło Doktorantowi rozpoczęcie badań. Bardzo pozytywnie oceniam też infrastrukturę badawczą jednostki, w której realizowana była rozprawa.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym *Metodyka badawcza*, znajduje się nie tylko opis stosowanych metod, ale też eksperymentów prowadzonych przez Kandydata oraz charakterystyka fizykochemiczna syntetyzowanych związków. Na podkreślenie zasługuje nie tylko zakres badań i objętość pracy wykonanej przez Doktoranta, ale też różnorodny charakter stosowanych metod, w tym: syntetyczne (innowacyjna synteza peptydów), analityczne (MS,

LC-MS, NMR, CD, TEM, DLS), obliczenia teoretyczne oraz bioinformatyczne (analiza baz danych sekwencji białek). Jak wynika z opisu, prawie wszystkie eksperymenty Kandydat wykonał osobiście. Zwraca uwagę liczba technik badawczych, jakie biegle opanował Doktorant. Pierwszy etap badań to chemiczna synteza peptydów. Były to wcześniej opisane związki modelowe (zawierające po kilkanaście reszt aminokwasowych) o potwierdzonym charakterze amfipatycznym, tworzące wiązki oligohelikalne typu *coiled-coil*. Ich syntezy Doktorant prowadził manualnie na nośniku stałym opracowaną przez siebie techniką wspomagania ultradźwiękami. W pracy znajdują się przekonujące dowody doświadczalne (porównanie szybkości i wydajności syntez prowadzonych różnymi technikami) na jej efektywność. Potwierdza je pośrednio także liczba kilkunastu trudnych w syntezie peptydów, jaki otrzymał Kandydat. Również kolejny etap – przyłączenie tritioli do *N*-końców peptydów, o czym przekonuje dyskusja wyników, wymagał optymalizacji. W wyniku konsekwentnie zaplanowanych eksperymentów i wnikliwej analizie produktów reakcji, Kandydatowi udało się opracować efektywne metody syntezy w roztworze koniugatów peptydowych. Nie mam uwag do doboru metod eksperymentalnych. Bardzo skrupulatna charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych produktów przekonuje o poprawności struktur otrzymanych związków. Spektrometria mas to podstawowa metoda analityczna, jaką posługiwał się Kandydat. Stosując szereg technik MS, Doktorant przeprowadził analizy sekwencyjne każdego z syntetyzowanych koniugatów. W wypadku niektórych związków, do ich identyfikacji korzystał także z metody magnetycznego rezonansu jądrowego. Do tego, ale też i do pozostałych rozdziałów rozprawy mam uwagę o charakterze redakcyjnym – w języku polskim dziesiąte części oddziela się przecinkiem, a nie kropką.

Najobszerniejszy rozdział dysertacji to *Dyskusja wyników*, w którym Kandydat omawia wyniki eksperymentów weryfikujących hipotezy badawcze pracy. Oprócz aspektów syntetycznych (o czym powyżej) najważniejsze to wyniki oksydacyjnej oligomeryzacji syntetyzowanych koniugatów peptydowych. W wypadku TMB-peptydów utlenienie tlenem atmosferycznym prowadzi do cyklolimeryzacji z ustaleniem równowagi termodynamicznej z przewagą tri- i tetrameru, w których następuje organizacja łańcuchów peptydowych w postaci α -helis, przy czym tendencja ta jest silniejsza dla większego z oligomerów. Obserwowany wpływ pH środowiska na charakter helikalny peptydów skłonił Kandydata to postawienia hipotezy, że elementem stabilizującym fragmenty helikalne są oddziaływania łańcuchów bocznych reszt kwasu glutaminowego w pozycji i i $i+3$ lub $i+4$. Hipotezę tę mgr Wołczański pozytywnie zweryfikował poprzez eksperymenty z wykorzystaniem analogów peptydów modyfikowanych w tych pozycjach, modelowanie molekularne oraz analizę bioinformatyczną sekwencji białek pod kątem występowania takiego motywu. Już tylko ten fragment dyskusji

wyników świadczy o wyjątkowej dociekliwości Kandydata. Lektura dalszej części rozprawy potwierdza tę Jego cechę. Główną metodą identyfikacji struktur α -helikalnych była metoda dichroizmu kołowego. W tym miejscu chciałbym postawić pytanie – na jakiej podstawie Doktorant wykluczył możliwość tworzenia się innych struktur helikalnych np. helisy typu 3_{10} ? Wydłużenie łańcucha łączącego grupy sulfidowe z pierścieniem aromatycznym o grupę metylenową (TMMB-peptydy) obniża szybkość procesu oligomeryzacji, jednocześnie faworyzuje tworzenie większych cząsteczek (heksa- i pentamerów), co zdaniem Autora wynika z większej swobody konformacyjnej matrycy. Znacznie mniej podatne na oksydacyjną oligomeryzację okazały się TMT-peptydy i DMT-peptydy zawierające ugrupowania triazynowe. Nie powiodły się próby ich utlenienia tlenem atmosferycznym. W tym wypadku brak reaktywności grup sulfidowych Doktorant tłumaczy występowaniem tautomerii tiolowo-tionowej. Doktorant podjął próby oligomeryzacji DMT-peptydów stosując inne metody: tlenem atmosferycznym w trifluoroetanolu, w środowisku DMSO oraz jonami miedzi (II). Utlenienie pierwszą z metod nie prowadziło do pożądanej cyklooligomeryzacji. Efekt ten obserwowany był w postaci powstającego trimeru w roztworze DMSO w TFE (ale nie w buforze) a także w środowisku wodnym w obecności jonów miedzi (II), gdzie dominującym produktem był tetrametr, aczkolwiek tri- i pentamerowe struktury były również identyfikowane. Jak podkreśla Kandydat, DMT-peptydy nie sprawdziły się jako bloki budulcowe dynamicznych bibliotek peptydowych. Nie zniechęciło to mgr. Wołczańskiego do pogłębionej analizy produktów ich utlenienia, w tym prawdopodobnej izomerii wokół wiązania C-N przy pierścieniu triazyny. To kolejny dowód wyjątkowej dociekliwości Doktoranta w wyjaśnianiu i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentów. Kandydat wykazał też możliwość tworzenia dynamicznych bibliotek kombinatorycznych (choć nie tytułowych typu TASP, ale jak dowodzą wyniki analiz TEM, struktur samoorganizujących) poprzez wymianę (transestryfikację) podstawników alkilosulfanylowych w tiocyjanuranach tris(alkilowych) a także metatezę tiocyjanuranów. Peptydy bogate w mostki disulfidowe były od wielu lat obiektami moich badań, z tego też powodu zainteresowała mnie przedstawiona przez Kandydata możliwość tworzenia bicyklicznych peptydów poprzez związanie trzech grup sulfhydrylowych peptydu z pierścieniem triazyny. Szkoda, że mgr Wołczański nie podjął próby syntezy takiego peptydu o aktywności biologicznej. O dużej inwencji badawczej Kandydata świadczy próba wykorzystania dwuwartościowych jonów cynku, kadmu i rtęci do wspomaganie międzycząsteczkowego oddziaływania DTM-peptydów. Większy helikalny charakter tworzących się dimerycznych kompleksów z jonami Hg (ale nie Zn i Cd) w porównaniu z monomerami sugeruje, że jony te stabilizują strukturę drugorzędową badanych związków. Ostatni z eksperymentów opisanych w rozprawie wskazuje, że jony rtęci(II) stymulują

wymianę ligandów (peptydów) w TMB-peptydach. Wyniki te choć ciekawe, z uwagi na toksyczne działanie związków rtęci na organizmy żywe, mają bardzo ograniczony potencjał aplikacyjny.

Bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przeprowadzonych przez Kandydata. Imponuje, u tak młodego Badacza, zarówno wiedza teoretyczna, biegłość w posługiwaniu się wieloma metodami eksperymentalnymi (syntetycznymi, analitycznymi, obliczeniami teoretycznymi i bioinformatycznymi), niezwykła skrupulatność w analizowaniu wyników badań, dociekliwość w ich interpretacji oraz poziom edytorski rozprawy. Niedosyt, jaki mam po lekturze rozprawy to brak próby praktycznego zastosowania uzyskanych wyników do konstrukcji biblioteki związków o potencjalnej aktywności biologicznej. Zdaję sobie sprawę, że takie badania nie stanowiły celu rozprawy, ale pozwoliłyby na weryfikację (próbę weryfikacji?) wyników ogromnej pracy, jaką wykonał Doktorant. Uważam, że mgr Grzegorz Wołczański przedłożył bardzo interesującą i oryginalną w treści rozprawę doktorską. Po lekturze dysertacji stwierdzam, że Kandydat jest znakomicie wykształconym chemikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej, tym samym przygotowanym do prowadzenia badań naukowych. Temat podjęty przez Doktoranta jest atrakcyjny z punktu widzenia badań podstawowych, a być może także aplikacyjnych, o czym świadczy między innymi fakt opublikowania części wyników rozprawy w trzech pracach oryginalnych w czasopiśmie z list JCR.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska: prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne, wykazuje umiejętność Kandydata samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr. Grzegorza Wołczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wysoki poziom merytoryczny rozprawy, objętość wykonanej pracy, biegłość Kandydata w posługiwaniu się wieloma metodami badawczymi, Jego dojrzałość naukowa (odważne formułowanie hipotez badawczych, dociekliwość w analizie i interpretacji uzyskanych wyników), skłaniają mnie go postawienia wniosku o wyróżnienie rozprawy.

