



POLITECHNIKA ŁÓDZKA

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,
tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Wołczańskiego pt.
„Modele białek typu TASP. Selekcja stabilnych układów na drodze kowalencyjnej
dynamicznej chemii kombinatorycznej”

Magister Grzegorz Wołczański swoją pracę doktorską zatytułowaną „Modele białek typu TASP. Selekcja stabilnych układów na drodze kowalencyjnej dynamicznej chemii kombinatorycznej” wykonał na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zespole Inżynierii Peptydów pod opieką dr hab. Marka Lisowskiego.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy otrzymywania dynamicznych bibliotek kombinatorycznych (DCL, Dynamic Combinatorial Libraries) będących modelami białek typu TASP (ang. Template-Assembled Synthetic Proteins) z wykorzystaniem dynamicznej chemii kowalencyjnej tioli oraz disiarczków.

Podjęty temat badawczy wpisuje się we współczesne obszary badawcze dotyczące chemii peptydów, dynamicznej chemii kowalencyjnej (DCvC, Dynamic Covalent Chemistry), dynamicznej chemii kombinatorycznej (DCC, Dynamic Combinatorial Chemistry) oraz dynamicznej chemii konstytucyjnej (CDC, Constitutional Dynamic Chemistry). Wszystkie te obszary są powszechnie stosowane w chemii medycznej w poszukiwaniu nowych leków, chemii supramolekularnej (tworzenie nowych związków, materiałów) oraz chemii i inżynierii peptydów/białek, która znajduje zastosowanie w badaniach nad poszukiwaniem selektywnie działających leków poprzez precyzyjne oddziaływanie z celem terapeutycznym.

Konstruowanie nowych białek o dostosowanych do indywidualnych potrzeb właściwościach podobnych do białek naturalnych to jeden z najtrudniejszych celów chemii biomimetycznej. Wobec braku szczegółowej wiedzy na temat mechanizmu zwijania naturalnych białek, ogólna strategia projektowania sekwencji polipeptydowych o dużej skłonności do zwijania się w określoną trójwymiarową strukturę wydaje się nadal nieosiągalna. Ponieważ złożony mechanizm zwijania białek nie jest jeszcze poznany, zaproponowana została koncepcja polegająca na projektowaniu białek *de novo* z wykorzystaniem szablonu (TASP). Szablon topologiczny służy jako „wbudowane” urządzenie do indukowania i wzmacniania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych

kowalencyjnie przyłączonych bloków amfipatycznych peptydów, prowadząc do uzyskania dobrze zdefiniowanych topologii ułożenia fragmentów peptydowych o zdefiniowanej i trwałej strukturze drugorzędowej. Szablony topologiczne można ogólnie scharakteryzować jako syntetyczne urządzenia, które orientują grupy funkcjonalne lub jednostki strukturalne peptydów o określonych układach przestrzennych.

Praca posiada wielopoziomową strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w Zespole Inżynierii Peptydów.

Opracowanie nowej metody otrzymywania dynamicznych bibliotek kombinatorycznych modeli białek TASP, w których wymiana zachodziłaby na drodze odwracalnych reakcji chemicznych, było głównym celem pracy. Doktorant przyjął, że zastosuje koniugaty peptydowe zawierające ugrupowania 3,5-merkaptotylowe takie jak: N-[S-(3,5-dimerkaptofen-1-yl)merkaptotyl]peptydy (TMB-peptydy), N-[S-3,5-dimerkapto-1,3,5-triazyn-2-ylmerkaptotyl]peptydy (TMT-peptydy), N-(4,6-dimerkapto-1,3,5-triazyny-2-yl)peptydy (DMT-peptydy) oraz N-{S-[3,5-bis(dimerkaptoacetyl)fen-1-ylometyl]merkaptotyl}peptydy (TMMB-peptydy).

Tak ambitny i złożony cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych, obejmujących: 1) optymalizację syntezy koniugatów peptydowych z ugrupowaniami arylowymi zawierającymi dwie grupy sulfidowe w pozycji *meta*; 2) optymalizację manualnej syntezy długich peptydów na nośniku stałym z wykorzystaniem ultradźwięków; 3) opracowanie metody otrzymywania koniugatów peptydowych zawierających układ 3,5-dimerkaptoarylowy i 3,5-bis(merkaptometyl)arylowy; 4) otrzymanie dynamicznych bibliotek kombinatorycznych modeli białek typu TASP na drodze utleniania koniugatów 3,5-dimerkaptoarylo-peptydowych; 5) badania nad poszukiwaniem innych odwracalnych reakcji możliwych do wykorzystania w dynamicznej chemii kowalencyjnej modeli białek TASP o określonej ilości łańcuchów peptydowych przyłączonych do matrycy.

Recenzowana praca liczy 188 stron. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje wykaz publikacji Doktoranta wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykaz stosowanych skrótów, część literaturową, cel pracy, metodykę badawczą, dyskusję wyników, podsumowanie, literaturę cytowaną, streszczenie oraz kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy (część nienumerowana).

Przegląd literaturowy nazwany przez Doktoranta „Wprowadzenie w tematykę badawczą” obejmuje podrozdziały dotyczące: dynamicznej chemii kombinatorycznej, gdzie Doktorant omawia metody odwracalnego tworzenia wiązań węgiel-węgiel, węgiel-

heteroatom, heteroatom-heteroatom. Druga część dotyczy modeli białek typu TASP z uwzględnieniem metod ich tworzenia. Rozdział ten liczy 27 stron i zawiera aż 171 odnośniki literaturowe. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Doktorantowi niestety nie udało się uniknąć błędów językowych, edytorskich oraz żargonu. Przykładowo: „bazujących na przełączalnego w zależności od temperatury fluorescencji” (strona 15), „katalizowane kwasowo” (strona 19), folding białek, peptyd ściągano za pomocą 0.5-1% TFA, templatowanie.

Rozdział czwarty przedstawia cel pracy, który został przedstawiony precyzyjnie. Wprowadzenie struktur zaplanowanych do otrzymania koniugatów peptydowych ułatwia śledzenie tekstu.

Rozdział piąty zawiera opisy metod badawczych. Część ta opisana jest dokładnie, co pozwala na odtworzenie uzyskanych wyników. Na pochwałę zasługuje bardzo dokładna charakterystyka otrzymanych związków. Jedyne moje zastrzeżenie do tej części dotyczy opisu metody sonicznej syntezy peptydów. Brak jest parametrów stosowanych w łaźni ultradźwiękowej, więc ta część może być problematyczna z punktu widzenia powtarzalności. Również w tym rozdziale są uchybienia językowe.

Najbardziej rozbudowaną częścią pracy jest rozdział szósty „Dyskusja wyników” Rozdział liczy 98 stron. Doktorant w ramach przeprowadzonych prac badawczych opracował dwie metody syntezy peptydów zawierających na N-końcu resztę 4,6-dimerkapto-1,3,5-triazyn-2-yłowe. Jedna z opracowanych metod oparta była o ligację cysteinylo-peptydów do monoestrów tiocyjanurowych, zaś druga na reakcji chlorku cyjanuru z grupą aminową peptydu przyłączonego do żywicy i następczej tiolizie pochodnych dichlorotriazynowych. Dodatkowo Doktorant opracował wydajną metodę łączenia bromoacetylowanych pochodnych peptydów z tritiolami aromatycznymi, co pozwoliło mu otrzymać TMB- i TMT-peptydy. Pula koniugatów peptydowych rozszerzona została o TMMB-peptydy, co było możliwe dzięki opracowaniu metody syntezy N-{S-[3,5-bis(dimerkaptometylo)fen-1-ylometylo]merkaptocetylo}peptydów. Synteza wymienionych pochodnych peptydowych możliwa była dzięki zoptymalizowaniu syntezy peptydów o właściwościach agregujących. Na docenienie zasługuje etap prac badawczych nad opracowaniem syntezy peptydów w fazie stałej wspomaganej ultradźwiękami. Wykazał bowiem nie tylko efektywność syntezy, ale również możliwość uzyskiwania produktów bez epimeryzacji. Z dużym zainteresowaniem

czytałam fragment dotyczący pokonywania problemów z opublikowaniem wyników tej części prac eksperymentalnych. Finalnie Doktorant zsyntezował 18 koniugatów peptydowych z ugrupowaniami ditiolowymi (strona 68).

Doktorant opracował również metody otrzymywania bibliotek kombinatorycznych modeli białek TASP na drodze oksydacyjnego tworzenia matrycy oligodisiarczkowej z wykorzystaniem koniugatów TMB-, TMT- i TMMB-peptydów. Do utleniania zastosowane zostały metody z DMSO i CuCl_2 w wodzie i TFE.

Również w tym rozdziale Doktorantowi nie udało się uniknąć błędów edytorskich i stylistycznych. W moim przekonaniu, czytanie pracy ułatwiłoby wprowadzenie na rysunki/chromatogramy struktur opisywanych/analizowanych związków.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne w żaden sposób nie obniżają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy. Lektura pracy nasunęła mi kilka pytań/uwag, które chciałabym aby Doktorant przedyskutował w trakcie publicznej obrony pracy:

- 1) Czy znany jest skład ilościowy substratów oraz oligomerycznych pochodnych TMB-AD (rysunek 29, strona 82) oraz czy jest możliwe uzyskanie wyłącznie jednego z produktów bądź wzbogacenie mieszaniny w jeden z oligomerów. Jakie warunki sprzyjałyby selektywnemu procesowi?
- 2) Proszę o podanie możliwych przyczyn reakcji odszczepiania peptydów zawierających ugrupowanie 1,3,5-triazyny (rysunek 23, strona 76)
- 3) Proszę o dokładniejsze omówienie sposobów niwelowania agregacji/asocjacji trudnych peptydów na etapie syntezy w fazie stałej (opis na stronie 38).
- 4) Czy napisany przez Doktoranta w MATLABI-ie program do przewidywania struktury drugorzędowej całego białka jest dostępny dla innych użytkowników? Czy Doktorant planuje go udostępnić, gdyż w moim przekonaniu mógłby on być wykorzystany przez szersze grono osób pracujących w podobnym obszarze.

Rozdziały Podsumowanie oraz perspektywy dalszego rozwoju tematu oraz streszczenie przygotowane są poprawnie. Na docenienie zasługuje dogłębna analiza i wskazanie dalszych kierunków badań w obszarze dotyczącym rozprawy doktorskiej.

Imponujący jest również zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmujący 253 pozycje. Niestety w tej części pracy Doktorant nie dołożył wystarczających starań aby zachować jednakowy sposób zapisu odnośników literaturowych.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale

aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorant potrafił zaimplementować w badaniach. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktoranta.

Na dorobek publikacyjny mgr Grzegorza Wołczańskiego składa się 7 publikacji z listy JCR. Trzy publikacje bezpośrednio związane są z rozprawą doktorską. Doktorant jest pierwszym współautorem w trzech publikacjach stanowiących podstawę recenzowanej pracy doktorskiej. Dodatkowo Doktorant jest również współautorem siedmiu komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorant odbył również staż naukowy w zespole prof. T. J. Jorgensena na Uniwersytecie Południowej Dani.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Grzegorza Wołczańskiego. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Grzegorza Wołczańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo biorąc pod uwagę zakres zrealizowanych badań oraz wartość, jaką wnoszą one do nauki, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Wołczańskiego.

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 15. 11. 2023