

Łódź dnia 3.08.2022

Prof. dr hab. Tadeusz Antczak
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Wójcik pt. „Bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe – struktura, mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu leków steroidowych”. Praca została wykonana w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk Kraków i Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk Kraków, pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Szaleńca i prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego.

Zdrowie ludzkie zawsze było, jest i będzie przykuwało naszą uwagę. Wraz ze zwiększającymi się możliwościami poznawczymi, sięgając do komórki, szukamy coraz to innych, subtelniejszych metod otrzymywania aktywnych substancji. Pracujemy nad nowymi, *ulepszamy* znane substancje. Używając narzędzi zaczerpniętych z natury znajdujemy nowe sposoby ich otrzymywania i modyfikujemy, na poziomie molekularnym, te stare już stosowane poszukując metod ich wytwarzania w większej skali. Wykorzystując maszynę przyrody do zamierzonych celów poznawczych i wytwórczych delikatnymi muśnięciami wzbogacamy chemię i enzymologię.

W recenzowanej pracy te aktywne biologiczne substancje to steroidy, będące integralną częścią błon komórkowych, ale też cząsteczkami sygnałowymi w rozlicznych szlakach metabolicznych, mechanizmach przetrwania komórek, reprodukcji oraz stanach chorobowych. Jest to liczna grupa składników wielu postaci stosowanych leków, ciągle rozwijanych, o dużym potencjale leczniczym a także businessowym, gdyż zajmują drugie miejsce (zaraz po antybiotykach) na rynku substancji aktywnych.

Jedną z przemysłowo ważnych modyfikacji steroidów jest dehydrogenacja wiązań C–C katalizowana przez bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD), stanowiące przedmiot badań niniejszej rozprawy doktorskiej.

A oto krótkie streszczenie pracy, które ma za zadanie przybliżenie poruszonych przez Autorkę zagadnień w stopniu umożliwiającym, już z recenzji zamieszczonej w Internecie, poznanie nie tylko ogólnego kształtu pracy ale też interesujących, wartościowych wyników w niej zawartych. Może zachęci to kogoś do sięgnięcia po oryginał w bibliotece.

Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD) to grupa enzymów należących do klasy FAD-zależnych oksydoreduktaz (EC 1.3.99.4), katalizujących kluczowy etap mikrobiologicznego rozkładu steroidów, fitosteroli i cholesterolu. Białka te odpowiadają za regio- i stereoselektywną dehydrogenację 3-ketosteroidów, tj. wprowadzenie wiązania podwójnego pomiędzy węglami C1 i C2 pierścienia A steranu.

Głównym przedmiotem zainteresowania niniejszej rozprawy doktorskiej jest Δ^1 -KSTD wyizolowana z fakultatywnie anaerobowej bakterii *Sterolibacterium denitrificans* (AcmB). AcmB jest białkiem zasocjowanym z wewnętrzną błoną komórkową *S. denitrificans*, które in vitro tworzy masywne agregaty, o masie przekraczającej 600 kDa. Cechuje je ponadto nietypowo niskie optimum pH katalizowanej reakcji, równe 6,0 (optimum pH większości Δ^1 -KSTD mieści się w zakresie 7–10) oraz szerokie, w porównaniu do innych enzymów tej klasy, spektrum substratowe.

Praca Pani mgr inż. Patrycji Wójcik posiada typowy układ rozprawy doktorskiej wypełniając 149 stron maszynopisu.

W streszczeniu – na 2 stronach Pani Wójcik podała racjonalne powody rozpoczęcia badań, streściła swoje rozliczne działania naukowe oraz podała ważne uzyskane rezultaty.

We wstępie – Autorka wprowadza czytelnika w rozwiązywany problem naukowy oraz wskazuje jego ważne elementy. Na 28 stronach zostały omówione te zagadnienia, które Doktorantka uznała za ważne dla szerszego spojrzenia na rozwiązywane naukowe problemy.

Opisuje:

- Strukturę, mechanizm działania i właściwości Δ^1 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych,
- Znaczenie farmakologiczne i otrzymywanie Δ^1 -3-ketosteroidów,
- Wybrane metody badania mechanizmu reakcji enzymatycznych.

Rozdział ten, w formie skondensowanej, pokazuje szerokie ujęcie problemu - obficie tematycznie, bez zbędnych słów i ozdobników, pojęciowo klarowne i zrozumiałe. Jest to część napisana bardzo dobrze, a co do wyboru omawianych problemów nie mam zastrzeżeń.

Celem ogólnym pracy było, cytuję „poznanie struktury krystalicznej Acmb, weryfikacja hipotezy mechanistycznej dotyczącej reakcji katalizowanej przez bakteryjne Δ^1 -KSTD oraz zastosowanie Acmb do syntezy Δ^1 -odwodornionych steroidów”.

Wymieniono też szczegółowe cele pracy do których Autorka zaliczyła:

- Charakterystykę strukturalną i biochemiczną Acmb.
- Charakterystykę katalityczną Acmb oraz enzymów grupy KSTD1.
- Weryfikację postulowanego w literaturze, hipotetycznego mechanizmu reakcji prowadzonej przez Δ^1 -KSTD .
- Opracowanie wydajnego procesu syntezy Δ^1 -3-ketosteroidów z użyciem Acmb jako katalizatora.

Postawiony cel pracy jest niezwykle ambitny, zakłada bowiem rozpracowanie problemów z zakresu badań podstawowych i rozwiązanie wyzwań praktycznych służących do wytworzenia w większej skali. Zakres planowanej realizacji... imponujący.

Metodyka badań - na 27 stronach ujęte zostały konieczne działania potrzebne do ogarnięcia problemu, m.in. produkcja i oczyszczanie rekombinowanych enzymów, krystalizacja, pomiary aktywności i ich charakterystyka oraz badanie mechanizmu dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD z zastosowaniem pomiarów kinetycznego efektu izotopowego i lepkości rozpuszczalnika. Rozdział podparty klarownie opisanymi działaniami wskazuje na wysoką jakość *pracy na stole* i poziom Laboratorium. Jest napisany szczegółowo, kompetentnie, dostosowany do bogactwa natury i potrzeb pracy. Nie będę wymieniał innych szczegółów metod i działań naukowych realizowanych w Laboratorium. Zainteresowanych odsyłam do oryginału.

W wynikach i dyskusji, zajmującej w pracy 53 strony, Autorka przedstawiła starannie żniwo swoich dociekań w sposób logiczny, uporządkowany i dla recenzenta bardzo interesujący.

A oto w formie telegraficznej zawartość merytoryczna pracy: wytwarzanie i oczyszczanie Δ^1 -KSTD; charakterystyka strukturalna Acmb, w tym: określenie

czwartorzędowej struktury oraz struktury krystalicznej; charakterystyka biochemiczna Acmb, obejmująca: optimum temperaturowe i stabilność termiczną, optimum pH i stabilność zależną od pH przechowywania; charakterystyka katalityczna Δ^1 -KSTD ujmująca: naturalny i sztuczne akceptory elektronowe Acmb oraz spektrum substratowe Δ^1 -KSTD; mechanizm reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD opisujący: rolę aminokwasów w centrum aktywnym Acmb, kolejność wiązania reagentów, etap limitujący szybkość reakcji dehydrogenacji, proponowany mechanizm reakcji i wreszcie synteza Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów z wykorzystaniem Δ^1 -KSTD w tym: optymalizacja warunków Δ^1 -dehydrogenacji i zwiększanie skali syntezy.

Ocena merytoryczna pracy.

Nie zamierzam omawiać szczegółowo rezultatów pracy, bo trwałoby to długo, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na te elementy, które w moim przekonaniu, zgodnie z moimi kompetencjami, stanowią istotną wartość naukową pracy.

W pracy optymalizowano procesy ekspresji rekombinowanej Acmb w komórkach *Escherichia coli* oraz opracowano proces oczyszczania i deagregacji białka z wykorzystaniem niejonowych detergentów.

Wykonano charakterystykę Acmb, która obejmowała określenie struktury czwartorzędowej oraz krystalicznej tego katalitycznego białka.

Wyznaczono optymalne warunki reakcji redox stosowanych do syntezy Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów, określono optimum temperaturowe i optimum pH dla Acmb, termostabilność tego enzymu i stabilność zależną od pH przechowywania oraz parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla Acmb i wybranych sztucznych akceptorów elektronowych.

Aby sprawdzić czy efektywność katalityczna akceptorów elektronowych wyznaczona przez pomiar kinetyki w stanie stacjonarnym przełoży się na warunki reaktorowe, oraz by ocenić możliwości katalityczne PMS, przeprowadzono Δ^1 -dehydrogenacje katalizowaną przez Acmb w reaktorach okresowych, mierząc stopień konwersji progesteronu.

Przeprowadzono, w warunkach reaktorowych, wstępne testy selekcyjne akceptory elektronowe, które mogłyby pełnić rolę naturalnego akceptora elektronowego Acmb.

Aby określić specyficzność substratową Acmb, przeprowadzono badania kinetyczne w stanie stacjonarnym dla AD i cholest-4-en-3-onu jako substratów. Jako sztuczny akceptor elektronowy posłużył DCPIP. Są one istotne dla zrozumienia fizjologicznej roli Acmb.

Weryfikowano hipotezę zakładającą, iż zdolność do odwodornienia C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów posiadają tylko nieliczne Δ^1 -KSTD. Wyznaczono parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla KSTD1 i steroidów (AD, Cholest-4-en-3-on) potwierdzając zdolność KSTD1 do katalizowania Δ^1 -odwodornienia steroidów z łańcuchem alifatycznym w pozycji C17.

Wykazano także, że KSTD1 jest w stanie katalizować reakcję z 6-pięścieniowymi steroidami. Testy w mini-reaktorze dowiodły, diosgenon może zostać przekształcone przez KSTD1 z doskonałą konwersją $97,3 \pm 0,8\%$ w czasie 20 min. Potwierdzono w ten sposób teoretyczne symulacje przeprowadzone, w innym laboratorium, metodą dynamiki molekularnej (MD). Otrzymane rezultaty dyskutowano z analogicznymi, zaczerpniętymi z literatury.

Weryfikowano, postulowaną w literaturze, hipotezę mechanizmu reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD. W tym celu przeprowadzono ukierunkowaną mutagenizację aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym Acmb, w bliskim otoczeniu pierścienia A substratu. Wykonano kompleksowe badania kinetyczne (dla 7 mutantów), które pozwoliły wyjaśnić zależność aktywności enzymu od typu wprowadzonej zmiany, struktury substratów, wpływ podstawienia izotopowego, pH czy lepkości medium reakcyjnego.

Zaproponowano następujący mechanizm reakcji Δ^1 . Odwodornienie katalizowane przez Δ^1 -KSTD postępuje zgodnie z dwuetapowym mechanizmem Ping Pong bi bi, gdzie pierwszy etap stanowi utlenienie steroidowego substratu i redukcja kofaktora FAD, a drugi reutlenienie kofaktora pod wpływem akceptora elektronowego. Uwzględniając silną zależność optimum pH reakcji zmierzonego w stanie stacjonarnym od zastosowanego akceptora elektronowego wnioskowano, że reutlenianie enzymu zachodzi znacznie wolniej niż redukcja steroidu. Problem ten i jego niuanse poddano wnikliwej dyskusji.

Wytworzono, z udziałem oczyszczonej Acmb szereg Δ^1 -3-ketosteroidów z wydajnością dochodzącą do $3,8 \text{ g L}^{-1}$. Wśród produktów Δ^1 -dehydrogenacji znalazł się Δ^1 -diosegnon – steroidowa pochodna saponiny o właściwościach biobójczych,

przeciwwzapalnych i przeciwnowotworowych, której enzymatyczne odwodornienie zostało przeprowadzone po raz pierwszy. Nasuwa się pytanie jak - w tym względzie - wygląda porównanie z rezultatami prac innych badaczy.

Nie znalazłem w tekście znaczących uchybień lingwistycznych. Pracy nie ma dłużyzn, jest zwarta, logicznie podana. Podoba mi się klarowność koncepcji.

Zastosowano rozliczne działania naukowe prowadzące do rozwiązania problemu oparte o wiedzę, doświadczenie i determinację w doborze i wykonaniu badań. Szeroki zakres pracy i zawieszistość zdarzeń naukowych w laboratorium, rzetelność planowania i wykonania wiarygodnych doświadczeń, i wreszcie opis zwarty i treściwy jest imponujący.

Złożoność materii w wielu momentach, zapewne, wymagała pomocy i to nie tylko merytorycznej. Ale czasy samodzielnego wykonywania wszystkiego już dawno minęły. W omawianym przypadku, pozwoliło to opisać problem oraz proponowane metody jego rozwiązania w jednolitym opracowaniu. Wskazuje to na złożoność, pojęciową i doświadczalną pracy. Do badań zastosowano nowoczesne narzędzia potrzebne do realizacji zamierzeń zawartych w celu oraz wykonano z sukcesem próby powiększenia skali biotransformacji tego procesu.

Stwierdzam, że w tej nowatorskiej pracy wykorzystano nowoczesne techniki, adekwatny sprzęt badawczy i doskonałą analitykę bez których wykonanie badań, w tym zakresie, nie byłoby możliwe. A próby wytworzenia w większej skali szeregu Δ^1 -3-ketosteroidów, w tym Δ^1 -diosegonu (pochodnej saponiny o dużym znaczeniu farmakologicznym) stanowi dla mnie, przemysłowego biotechnologa, ważny i innowacyjny element badań.

Praca Doktorska Pani mgr inż. Patrycji Wójcik dowodzi, że jest to dojrzała, dociekliwa, pracowita i skuteczna młoda uczona. Zakres doświadczeń i sposób ich przeprowadzenia oraz opis i interpretacja wyników wskazują na dobre przygotowanie merytoryczne i kreatywność tej młodej Badaczki otwartej na nauki podstawowe i aplikacyjne wartościowe innowacje. Wyróżniające są: publikacyjny dorobek naukowy, staże, szkolenia, udział w konferencjach naukowych, pokazujące Autorkę jako ukształtowanego pracownika naukowego, o dużych zasobach intelektualnych i możliwościach dalszego rozwoju.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Patrycji Wójcik pt. „Bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe – struktura, mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu leków steroidowych” wykonana w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk Kraków i Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk Kraków spełnia wszystkie ustawowe wymagania określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Wnioskuje, zatem o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadanie stopnia naukowego doktora.

Wnioskuje także o wyróżnienie pracy. Do recenzji dołączam stosowny wniosek.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Wójcik pt. „Bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe – struktura, mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu leków steroidowych”.

Wnioskuje o wyróżnienie powyższej rozprawy. Przemawiają za tym wnioskiem następujące elementy merytoryczne: wartościowe wyniki podkreślone próbami aplikacyjnymi, przyjęta strategia i sposób badań.

A oto niektóre z oryginalnych aspektów pracy doktorskiej Pani Patrycji Wójcik:

- ✓ Określenie struktury czwartorzędowej oraz krystalicznej Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowej wyizolowanej z fakultatywnie z anaerobowej bakterii *Sterolibacterium denitrificans*. *(Jeszcze niedawno znalezienie struktury krystalicznej białka było uważane jako rodzaj sztuki w świecie nauki. Obecnie kiedy struktury wielu tysięcy białek są w bazach w dalszym ciągu określenie struktury każdego nowego białka jest przyjmowane w świecie nauki z estymą. Obecnie podczas opracowywania nowych technologii jest to punkt wyjścia badań właściwości białka.*
- ✓ Wyznaczenie parametrów kinetycznych w stanie stacjonarnym dla KSTD1 i steroidów (AD, Cholest-4-en-3-on) potwierdzających właściwość KSTD1 katalizowania Δ^1 -odwodornienia steroidów z łańcuchem alifatycznym w pozycji C17.
- ✓ Przeprowadzenie ukierunkowanej mutagenizacji aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym Acmb, w bliskim otoczeniu pierścienia A substratu i wykonanie kompleksowych badań kinetycznych (dla 7 mutantów), które pozwoliły wyjaśnić zależność aktywności enzymu od typu wprowadzonej zmiany, struktury substratów, wpływ podstawienia izotopowego, pH czy lepkości medium reakcyjnego. *(Testy w mini-reaktorze dowiodły, że diosgenon może zostać przekształcone przez KSTD1 z doskonałą konwersją 97,3 % w czasie 20 min. Czym potwierdzono teoretyczne symulacje przeprowadzone, w innym laboratorium, metodą dynamiki molekularnej (MD)).*
- ✓ Zaproponowanie mechanizm reakcji Δ^1 . *(Odwodornienie katalizowane przez Δ^1 -KSTD postępuje zgodnie z dwuetapowym mechanizmem Ping Pong bi bi, gdzie pierwszy etap stanowi utlenienie steroidowego substratu i redukcja kofaktora FAD, a drugi reutlenienie kofaktora pod wpływem akceptora elektronowego. Uwzględniając silną zależność optimum pH reakcji zmierzonego w stanie stacjonarnym od zastosowanego akceptora*

elektronowego wnioskowano, że reutlenianie enzymu zachodzi znacznie wolniej niż redukcja steroidu).

- ✓ Wytworzenie, z udziałem oczyszczonej AcmbB szereg Δ^1 -3-ketosteroidów z wydajnością dochodzącą do 3,8 g L⁻¹. (*Wśród produktów Δ^1 -dehydrogenacji znalazł się Δ^1 -diosegnon – steroidowa pochodna saponiny o właściwościach biobójczych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych, której enzymatyczne odwodornienie zostało przeprowadzone po raz pierwszy).*