



Katedra Chemii Bioorganicznej
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
Prof. Paweł Kafarski
e-mail: pawel.kafarski@pwr.edu.pl
web: <http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl>



Wrocław 11.07.2022

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji WÓJCIK

“Bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe - struktura, mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu leków steroidowych”

Pani mgr Patrycja WÓJCIK swoją pracę doktorską wykonała w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Promotorami pracy są profesorowie: Maciej SZALENIEC z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni i Andrzej BOJARSKI z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN. Dwóch promotorów pracy doktorskiej to rzadki przypadek w Polsce, ale nie budzi on emocji, ponieważ zakres przeprowadzonych badań jest bardzo szeroki i różnorodny. Praca ta to pełny cykl badań jednej z tytułowych dehydrogenaz Δ^1 -3-ketosteroidowych - Δ^1 -dehydrogenazy-3-ketosteroidowej ze *Sterolibacterium debnitrificans* (AcmB). W tym aspekcie tytuł pracy doktorskiej jest być może nieco zbyt szeroki, ale jeśli traktować tę dehydrogenazę jako enzym modelowy oraz to, że enzym ten był porównywany z lepiej zbadanym enzymem z *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1) - jest on do przyjęcia. Praca ma układ klasyczny i stanowi szczegółowy opis oraz dyskusję przeprowadzonych eksperymentów poprzedzone wprowadzeniem literaturowym. Tu warto zaznaczyć, że wyniki badań opisanych w tej pracy zostały umieszczone również w pięciu publikacjach naukowych, a jedna część została objęta zgłoszeniem patentowym. Trochę szkoda, że nie zdecydowano się na prezentację pracy w postaci zestawu publikacji z koniecznym uzupełnieniami.

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Wójcik stanowi nieomal zamkniętą całość. Oba enzymy zostały wyprodukowane przez modyfikowane genetycznie *Escherichia coli* oraz wydzielone i oczyszczone klasycznymi technikami. Następnie Doktorantka skoncentrowała się na szczegółowym scharakteryzowaniu Acmb. W pierwszym etapie zbadała skłonność monomerów tego białka do agregacji w różnych warunkach. Ciekawym, choć nieco marginalnym fragmentem tych badań jest wykazanie obecności enzymu w formie monomerycznej za pomocą mikroskopii sił atomowych (niepisane w pracy, ale opisane w publikacji, której współautorką jest Doktorantka). Niewątpliwym sukcesem jest zdefiniowanie struktury krystalicznej Acmb ze związanymi z nią cząsteczkami kofaktora - FAD i substratu - androst-1,4-dien-3,17-dionu. Szczegółowa analiza tej struktury i jej porównanie ze znaną z literatury strukturą KSdT1 pozwoliło dobrze zrozumieć sposób wiązania kofaktora i substratów obu enzymów. Co oczywiste, pozwoliło też na bardziej szczegółową interpretację badań kinetycznych przeprowadzonych celem zbadania mechanizmu reakcji utlenienia pierścienia A steroidowych ketonów. Przedostatnim etapem badań podstawowych była biochemiczna charakteryzacja enzymu, poprzedzona klasycznymi badaniami optymalnych - temperatury i pH, oraz stabilności enzymu w różnych warunkach przechowywania. Tu należy pochwalić dociekliwość Doktorantki, widoczną między innymi w sposobie wyjaśnienia obecności dwóch optimumów pH w niektórych przypadkach. Następnie przeprowadzone zostały badania kinetyczne, których celem była nie tylko charakteryzacja enzymu, ale także lepsze zrozumienie mechanizmu katalizy. Badania te nie były proste, gdyż były prowadzone w niezbędnej obecności sztucznych akceptorów elektronowych, które w sposób nieoczywisty wpływają na przebieg reakcji. Badania te także miały na celu weryfikację hipotezy, że naturalnym receptorem elektronowym Acmb może być chinon. Szczegółowe badania kinetyczne przeprowadzone dla obu enzymów (Acmb i KSdT1) prowadzono używając dwóch substratów - cholest-4-en-3-onu i androst-4-en-3,17-dionu. Pokazały one, że reakcja jest dwusubstratową typu ping-pong, a badania kinetycznego efektu izotopowego (czy deuterowane steroidy były dostępne komercyjnie?; dobrze byłoby zaznaczyć ich pochodzenie) pozwoliły na stwierdzenie jaka jest kolejność wiązania reagentów i uwalniania produktów. W końcu, Doktorantka zaproponowała szczegółowy mechanizm reakcji co zamknęło część pracy, którą można by nazwać klasycznymi badaniami podstawowymi.

Uwieńczeniem pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Wójcik jest fragment poświęcony zastosowaniu AcMB w procesie biotransformacji wybranych substratów steroidowych. Doktorantka nie tylko pokazała potencjalną użyteczność tego enzymu, ale dokonała również powiększenia skali reakcji, uzyskując bardzo przyzwoite wydajności produktów redukcji. Bardzo rozsądnym było tu skorzystanie z doświadczenia zespołu badawczego Prof. Tomasza Janeczko w Wrocławskiego Uniwersytetu Przyrodniczego. Ta część badań opisana jest bardzo lakonicznie. Nie znalazłem informacji czy w reakcji tej powstają również produkty uboczne, a jeśli tak to czy zostały one zidentyfikowane. Dodatkowo mam pytanie czy warto byłoby sprawdzić możliwość zastosowania AcMB w reakcjach odwodornienia saponin zawierających cukry w pierścieniu D steroidu (powinny one być lepiej rozpuszczalne), a sposób wiązania substratów zdaje się wskazywać, że nie zakłóciłyby przebiegu reakcji.

Ten pobieżny opis badań wykonanych przez Panią mgr Patrycję Wójcik pozakazuje nie tylko ogrom wykonanej pracy, ale także podkreśla fakt, że Doktorantka musiała użyć całej gamy różnorodnych technik badawczych - od tych stosowanych w inżynierii białka po te stosowane w klasycznej biochemii i chemii organicznej. Jestem pod wrażeniem jakości tych badań.

Pozwolę sobie zatrzymać się jeszcze na chwilę przy badaniach kinetyki enzymu. To bardzo ciekawy i trudny do interpretacji problem. Ponieważ substraty nie są rozpuszczalne w wodzie zastosowano tu różne środki solubilizujące - najlepsze wyniki dało zastosowanie cyklodekstryny. To znakomicie komplikuje analizę wyników, szczególnie wtedy, gdy użyć 2,6-dichloroindofenolu jako reaktywatora kofaktora reakcji. Konkuruje on bowiem z substratem o wiązanie z cyklodekstryną. W związku z tym mam pytanie czy znane są stałe kompleksowania i sposób wiązania substratów przez zastosowaną cyklodekstrynę. Czy można wykluczyć, że nie mają tu także miejsca wymiany ligandów, a nawet wiązanie kompleksu z cyklodekstryną przez enzym? Że tak być może świadczy fakt, że w przypadku "odnośnikowego enzymu" - KSTD1, wiązany jest tylko pierścień steranu substratów (str. 11 tekstu rozprawy) zaś ich łańcuchy boczne mogą pozostać skompleksowane z tym oligocukrem.

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Wójcik napisana jest dobrze i ładną polszczyzną. Mimo tego jest ona trudna do przeczytania, co wynika to ze skomplikowanego i

zróżnicowanego charakteru, niełatwych do opisania, badań. Mam także wrażenie, że Autorka starała się, aby praca nie była zbyt obszerną, co przełożyło się w niektórych przypadkach na lakoniczność opisu. Pracę otwiera wstęp, który dobrze wprowadza czytelnika w zakres wykonanych badań i na dodatek pokazuje jak wiele barier trzeba pokonać, aby uzyskać dobry i efektywny sposób odwodorowania 3-ketosteroidów. Druga część wstępu poświęcona jest technikom kinetycznym stosowanym w badaniach mechanizmów reakcji enzymatycznych. Wstęp stanowi około 30% objętości pracy co jest standardem w przypadku prac doktorskich. Szczególnie chciałbym pochwalić opis metodyki przeprowadzonych badań, który jest bardzo szczegółowy i dokładny. W pracy znalazłem minimalną liczbę błędów edytorskich - na stronach 13, 18, 90, 103 i 108. Ciekaw jestem czy Doktorantka je znajdzie.

Jak przystało na recenzenta mam też kilka uwag szczegółowych:

- * Wyjaśnienie braku specyficzności KSTD z *Bacillus sphaericus* (str. 19) jest niejasne - co to jest "wodór ze środowiska"?
- * Jeśli porównujemy masę izotopów to występuje różnica masy, a nie zmiana masy (str.40);
- * Wydaje mi się, że pokazanie sposobu produkcji i oczyszczania enzymu (podrozdział 4.1.) w postaci graficznego schematu znacznie ułatwiłoby ich śledzenie;
- * Podany na str. 77 odnośnik [121] jest zły. Co więcej nie znalazłem tej pracy w spisie literatury (szukałem po nazwisku podanego autora);
- * W przypadku staży dobrze byłoby podać nazwiska osób, które kierowały wizytowanymi laboratoriami. Naukę tworzą głównie ludzie nie instytucje.

Reasumując, przyszło mi recenzować bardzo ciekawą, dobrze zaplanowaną, w pełni zrealizowaną i porządnie napisaną pracę doktorską. Co więcej fragmenty tej pracy zostały już opisane w postaci pięciu publikacji naukowych oraz w postaci zgłoszenia patentowego. Praca ta spełnia ze znacznym nadstatkiem zarówno ustawowe jak i zwyczajowe standardy wymagane od dysertacji doktorskich i dlatego rekomenduję Radzie Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie kontynuację postępowania w sprawie nadania Pani mgr Patrycji Wójcik stopnia naukowego doktora.

Biorąc pod uwagę jakość wykonanych badań, ich kompletność i solidne opisanie, a także fakt, że część wyników została opublikowana w czasopiśmie o wysokim standardzie międzynarodowym stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy Pani mgr Patrycji Wójcik stosowną nagrodą. Prace tę oceniam bowiem wysoko a otrzymane wyniki stanowią znaczącą cegiełkę w poznaniu i zrozumieniu działania nietypowych enzymów bakteryjnych.