

Warszawa, 22.05.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Michała Glanowskiego
pt.: „Modelowanie mechanizmu reakcji bakteryjnych dehydrogenaz
ketosteroidowych – katalizatorów do modyfikacji leków steroidowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana Michała Glanowskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Macieja Szaleńca z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN oraz prof. dr. hab. Andrzeja J. Bojarskiego z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN. Praca ma formę zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech pozycji literaturowych opatrzonych odpowiednim wstępem i omówieniem celu pracy oraz najważniejszych wyników. W skład cyklu wchodzi następujące prace wieloautorskie:

- P1. Glanowski, M., Kachhap, S., Borowski, T., & Szaleniec, M. *Model Setup and Procedures for Prediction of Enzyme Reaction Kinetics with QM-Only and QM:MM Approaches*. In: Q. Vanhaelen (eds.) *Computational Methods for Estimating the Kinetic Parameters of Biological Systems. Methods in Molecular Biology* **2022**, 2385, 175–236; Humana, New York.
- P2. Wójcik, P., Glanowski, M., Wojtkiewicz, A. M., Rohman, A., & Szaleniec, M. *Universal capability of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases to catalyze Δ^1 -dehydrogenation of C17-substituted steroids*. *Microbial Cell Factories* **2021**, 20, 1–12;
- P3. Glanowski, M., Wojcik, P., Prochner, M., Borowski, T., Lupa, D., Mielczarek, P., Oszejca, M., Swiderek, K., Moliner, V., Bojarski, A. J., & Szaleniec, M. *Enzymatic Δ^1 -Dehydrogenation of 3-ketosteroids-reconciliation of kinetic isotope effects with the reaction mechanism*. *ACS Catalysis* **2021**, 11, 8211–8225;
- P4. Wójcik, P., Glanowski, M., Mrugała, B., Prochner, M., Zastawny, O., Flejszar, M., Kurpiewska, K., Niedziałkowska, E., Minor, W., Oszejca, M., Bojarski, A. J., Wojtkiewicz, A. M., & Szaleniec, M. *Structure, Mutagenesis, and QM:MM Modeling of 3-Ketosteroid Δ^1 -Dehydrogenase from *Sterolibacterium denitrificans*—The Role of a New Putative Membrane-Associated Domain and Proton-Relay System in Catalysis*. *Biochemistry* **2023**, 62, 808–823.

Integralną częścią pracy doktorskiej są suplementy towarzyszące publikacjom P2-P4.

Wkład doktoranta

W dwóch z wyżej wymienionych prac doktorant jest pierwszym autorem co podkreśla jego znaczącą rolę w powstaniu tych wieloautorskich publikacji. Praca P1 to rozdział w książce opisujący w szczegółach techniczne aspekty przygotowania i przeprowadzenia obliczeń

kwantowochemicznych związanych z kinetyką reakcji enzymatycznych. Zgodnie z oświadczeniem, doktorant napisał rozdziały kluczowe dla przedstawionej dysertacji, m.in. dotyczące obliczeń QMMM MD oraz przewidywania kinetycznego efektu izotopowego. Prace P2-P4 opisują sprzężone badania teoretyczne i eksperymentalne. Oświadczenia mgr. inż. Glanowskiego oraz współautorów dołączone do dysertacji nie budzą wątpliwości co do roli doktoranta w opisanych badaniach i powstaniu manuskryptów – w w/w pracach był odpowiedzialny za przeprowadzenie obliczeń, analizę wyników i współautorstwo tekstu. Oceniam zatem, że doktorant miał znaczący wkład we wszystkich pracach w cyklu.

Przedmiot badań i najważniejsze wyniki

Centralnym punktem przedstawionej dysertacji są badania mechanizmów reakcji dehydrogenacji wybranych ketosteroidów przez Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD). Reakcje te przebiegają selektywnie i prowadzą do powstania wiązania podwójnego pomiędzy węglami C1 i C2 szkieletu steroidowego. Biorąc pod uwagę powszechne stosowanie kuracji sterydowych, reakcja ta ma ważne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym. Zrozumienie jej mechanizmu oraz czynników które wpływają na selektywność procesu jest niezbędnym krokiem w kierunku kierowania reaktywnością enzymu i poszerzenia spektrum substratów do reakcji. Doktorant podjął się przebadania proponowanych literaturowo mechanizmów reakcji dehydrogenacji katalizowanych Δ^1 -KSTD z użyciem metod kwantowochemicznych. Wskazać należy jednak, że pełną informację o badanych reakcjach uzyskać można wyłącznie konfrontując wyniki obliczeń z wynikami eksperymentów. Lektura pracy doktorskiej mgr. inż. Glanowskiego jednoznacznie wskazuje, że rozumie on to ściśle powiązanie. W pracy umiejętnie skonfrontowano uzyskane wyniki z wynikami eksperymentów współpracowników jak również z danymi literaturowymi.

Za kluczowe osiągnięcia naukowe doktoranta opisane w recenzowanej pracy uważam:

- (i) dostarczenie solidnych dowodów na zakładany przebieg reakcji dehydrogenacji ketosteroidów katalizowanych przez Δ^1 -KSTD z organizmów *R. erythropolis* (dehydrogenaza KSTD1) i *S. denitrificans* (dehydrogenaza Acmb) poprzez obliczenia profili energetycznych reakcji dla hipotetycznych mechanizmów, wskazanie najbardziej prawdopodobnego i porównanie obliczonych efektów izotopowych z



- wartościami eksperymentalnymi [prace P3 i P4];
- (ii) wskazanie, że enzym KSTD1 powinien wykazywać aktywność wobec dehydrogenacji cholest-4-en-3-onu, co zostało zweryfikowane w odpowiednio przygotowanym eksperymencie [praca P2];
 - (iii) wyjaśnienie roli unikatowego fragmentu „pętli” w enzymie AcmB – stabilizuje ona kompleks enzym-substrat w przypadku substratów o rozbudowanych podstawnikach przy węglu C17 [praca P4].

Praca P1 ma charakter opisu warsztatu badawczego i nie zaprezentowano tam oryginalnych wyników badawczych. Rola tej pracy w cyklu jest jednak szczególna – pozwala dokładnie przeanalizować sposób obliczeń prowadzonych przez doktoranta. Należy też wskazać, że jej wartość wykracza poza ramy „opisu metodologii” w pracy doktorskiej i będzie stanowić doskonały wstęp dla wszystkich chcących rozpocząć przygodę z modelowaniem procesów związanych z katalizą enzymatyczną. Zaprezentowane skrypty, komendy i pliki wejściowe do popularnych programów zdecydowanie obniżają „próg wejścia” w ten obszar badawczy.

Tematyka badawcza podjęta przez doktoranta jest skomplikowana i wymaga opanowania nie tylko warsztatu obliczeniowego, ale także dogłębnego zrozumienia biochemii procesów enzymatycznych. Prace stanowiące cykl, choć opublikowane w ostatnich dwóch latach, są już cytowane w literaturze (12 cytowań wg Google Scholar). Pokazuje to, że opisywana tematyka jest aktualna.

Uwagi szczegółowe

W poniższych akapitach odniosę się krótko do treści poszczególnych rozdziałów komentarza do cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Pogrubioną czcionką zaznaczyłem kluczowe zagadnienia, które chciałbym, aby doktorant poruszył odpowiadając na niniejszą recenzję podczas obrony.

W rozdziale zatytułowanym „Wstęp” autor podaje podstawowe informacje dot. Δ^1 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych oraz aktualny stan wiedzy związany z mechanizmem ich działania. Powyższe wprowadzenie pozwala poznać bezpośrednią przyczynę podejmowanych badań. **Zabrakło mi szerszego omówienia znaczenia badanych enzymów w przemyśle farmaceutycznym, w tym sposobu prowadzenia reakcji enzymatycznych czy skali w jakich uzyskiwane są odwodnione steroidy.** Rozdział kończy się wprowadzeniem do kinetycznego efektu izotopowego oraz izotopowego efektu wiązania, czyli dwóch wielkości, które można obliczyć z danych uzyskiwanych w symulacjach i porównać z wartościami eksperymentalnymi.

Kolejny rozdział to „Cel pracy”. Doktorant postawił sobie jasno sprecyzowane cele zbudowane wokół ogólnego tematu badań mechanizmu działania Δ^1 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych. Wyprzedzając odrobinę tekst komentarza, podkreślić należy, że cele pracy zostały osiągnięte.

Rozdział „Metody obliczeniowe” rozpoczyna się od skondensowanego wprowadzania w klasyczne metody chemii kwantowej, w tym w teorię funkcjonału gęstości (DFT). Dobór materiału podyktowany jest metodami obliczeniowymi stosowanymi w pracach z cyklu. Pewien niedosyt pozostawia jednak brak odniesienia do zbadanych literaturowo dokładności stosowanych metod. **Przykładowo, jaka jest oczekiwana dokładność obliczeń (energii, geometrie) prowadzonych z funkcjonałem B3LYP czy metodą AM1? Co przemawia za stosowaniem subtraktywnego lub addytywnego schematu QM/MM, jaka jest dokładność obu podejść?** Omówienie potencjału średniej siły zostało wg mnie zrobione dobrze i zrozumiale. Rozdział kończy się graficzną reprezentacją przyjętego schematu obliczeniowego co jasno pokazuje sekwencję kroków w symulacji. Zaznaczyć należy, że doktorant konsekwentnie stosował przyjętą metodologię do białek KSTD1 i Acmb a więc wyniki są porównywalne.

Omówienie pracy P1 stanowi integralną część wstępu co jest zrozumiałe ze względu na

charakter tego artykułu, który określiłbym z angielskiego jako *hands-on course*. Pojawia się tutaj dyskusja dwóch kluczowych dla pracy aspektów – parametryzacji niestandardowych cząsteczek na potrzeby symulacji oraz obliczeń związanych z efektami izotopowymi. Na pochwałę zasługuje wychwycenie przez doktoranta błędu w równaniu (3) w pracy P1 – we wstępie równanie Wignera jest podane prawidłowo. W rozdziale pojawiają się drobne usterki językowe lub określenia nieprecyzyjne, np. „cząsteczka nie cechuje się żadną symetrią” (a symetria C_1 ?) czy „fitowanie ładunków” (powinno być raczej „dopasowanie ładunków”).

W rozdziale „Wyniki” doktorant odnosi się zwięźle do wyników opisanych w pracach P2-P4. W publikacji P2 mgr inż. Glanowski zbadał wiązanie ośmiu steroidów do centrum aktywnego białka KSTD1. Wykazał on, że podstawniki w pozycji C17 nie wpływają znacząco na energię swobodną wiązania poszczególnych. Słusznie zauważył, że opisany w literaturze brak reaktywności cholest-4-en-3-onu jest niezrozumiały. Dodatkowe testy katalityczne zainspirowane powyższymi wynikami obliczeń wykazały, że brak reaktywności cholest-4-en-3-onu wynikał z jego słabej rozpuszczalności w użytym rozpuszczalniku a zastosowanie odpowiedniego solubilizatora pozwoliło tę aktywność zaobserwować. **Zastanawia mnie tylko liczba miejsc znaczących podanych dla energii w Tabeli 1. Jak obliczany jest błąd standardowy i jaki ma on związek z błędem samej metody obliczeniowej?** Publikacja P3 jest najważniejszą pracą w cyklu, gdyż w sposób dogłębny dyskutuje mechanizm aktywności enzymatycznej białka KSTD1. Po pierwsze, autor obliczył dwuwymiarowy przekrój przez powierzchnię energii potencjalnej w układzie tyrozyna-substrat-FAD związany z abstrakcją dwóch atomów wodoru z substratu. Obliczenia te wskazały, że pierwszy przeniesieniu podlega atom wodoru przyłączony do węgla C2 a następnie ten przyłączony do węgla C1. Obliczone struktury służyły jako punkt wyjściowy w symulacjach PMF. Wykazały one, że bariery energetyczne dla obu abstrakcji atomów wodoru są zbliżone (różnica ~ 2 kcal/mol). Dodatkowo, różnica barier dla dwóch badanych związków (oznaczonych jako 17MT i DHT) była również niewielka (~ 3 kcal/mol). **Czy są dane kinetyczne wskazujące na różnice w reaktywności obu tych związków?** Dalsza weryfikacja najbardziej prawdopodobnego mechanizmu polegała na obliczeniach związanych z efektami izotopowymi. Zgadzam się z doktorantem, że ze względu na porównywalne wysokości barier dla obu etapów badanego mechanizmu nie można ograniczyć analizy izotopowej wyłącznie do etapu z najwyższą barierą.



Przedstawiona w tym kontekście analiza jest dość przekonująca jednak pewną wątpliwość budzi przyjęcie wartości 1 kcal/mol jako błąd metody obliczeniowej. Skąd takie założenie? Za ważną część pracy uważam też zbadanie mechanizmu w obecności sprotonowanej reszty Tyr318 i wykluczenie tej możliwości. W pracy P4 doktorant zbadał mechanizm aktywności enzymu Acmb takimi samymi metodami jak mechanizm enzymu KSTD1 w pracy P3. Przebieg reakcji okazał się w zasadzie taki sam jak w przypadku KSTD1. Pojawia się tutaj także (czasochłonne!) obliczenia dla mutantów, w których tyrozyny w bezpośrednim otoczeniu substratu były kolejno zamieniane na fenyloalaniny. Jednym z najważniejszych wyników obliczeniowych w tej pracy jest określenie roli jaką pełni domena związana z błoną w stabilizacji kompleksu enzym-substrat dla białka Acmb. Domena ta jest nieobecna w badanym w pracy P3 białku KSTD1. Okazało się, że jej obecność zdecydowanie zwiększa entalpię swobodną wiązania substratów z rozbudowanymi podstawnikami na atomie węgla C17 tj. cholest-4-en-3-on. Natura chemiczna tych podstawników wydaje się jednak być istotna, szczególnie jeśli porównać np. wiązanie cholest-4-en-3-on (-10 kcal/mol) i diosgenonu (-3 kcal/mol) do Acmb. **Czy doktorant rozważał jaki typ oddziaływań jest odpowiedzialny jest za obserwowaną stabilizację? Na ile istotna jest swoboda konformacyjna podstawnika na atomie węgla C17?**

Szerzej w kontekście prac P2-P4 – w jaki sposób obliczany był stan standardowy steroidów w roztworze? Będzie to miało wpływ na końcową wartość entalpii swobodnej wiązania substratu chociaż nie zmieni to obserwowanych trendów.

Komentarz kończy się konkluzjami zawartymi w podsumowaniu. Opisują one dobrze najważniejsze osiągnięcia opisane w cyklu prac. Całości dopełnia lista 44 cytowanych pozycji literaturowych.

Od strony technicznej praca napisana jest poprawnym językiem, w sposób przejrzysty i logiczny. Nawigację i odbiór pracy poprawiłoby jedynie wprowadzenie numeracji równań oraz rozdziałów/podrozdziałów. Przydałby się również spis skrótów wraz z ich rozwinięciem.

Podsumowanie

Przygotowanie pracy doktorskiej w formie cyklu publikacji w mojej ocenie jest bardzo wymagające. Promotor wraz z doktorantem muszą szczegółowo zaplanować badania i strategię publikacyjną już na początku doktoratu. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. inż.



Glanowskiego w moim odczuciu została przygotowana właśnie w taki sposób. Zawiera pracę opisującą warsztat badawczy (P1) oraz dobrze przemyślane i ściśle powiązane prace oryginalne (P2-P4). Te ostatnie dotyczą termodynamiki i kinetyki procesów enzymatycznych. Przedstawiony mechanizm aktywności badanych dehydrogenaz był poddany analizie teoretycznej po raz pierwszy w literaturze przedmiotu (pomimo iż struktura krystalograficzna KSTD1 znana jest od 2013 roku). Doktorant skonfrontował swoje wyniki z badaniami eksperymentalnymi (efekty izotopowe i reaktywność enzymów względem różnych substratów) i był w stanie w sposób przekonujący wskazać najbardziej prawdopodobny mechanizm dehydrogenacji wybranych steroidów. Co więcej, uzyskane wyniki teoretyczne były inspiracją dla nowych badań eksperymentalnych, które potwierdziły wyniki obliczeniowe. Niewątpliwym wpływem na mgr. inż. Glanowskiego miały interdyscyplinarne badania prowadzone przez promotorów, gdyż dzięki temu mógł pracować w bardzo stymulującym otoczeniu. Jest on współautorem łącznie siedmiu publikacji naukowych, z czego pięć jest związanych z tematyką doktoratu. W cykl prac włączył on jednak wyłącznie cztery pozycje ze względu na ich spójność tematyczną i skoncentrowanie na hipotezie mechanistycznej reakcji dehydrogenacji. Odbił trzy krótkie staże naukowe poza granicami Polski a wyniki swoich badań prezentował na konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Całokształt jego dorobku świadczy o dużej dojrzałości naukowej. Pytania i uwagi przedstawione w poprzedniej sekcji w żadnym stopniu nie umniejszają wagi pionierskich badań mgr. inż. Glanowskiego przedstawionych w jego rozprawie doktorskiej. W mojej ocenie otwierają one teraz drogę do modyfikacji reaktywności badanych dehydrogenaz z użyciem metod inżynierii białkowej w celu osiągnięcia nowych celów syntetycznych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Glanowskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. **Wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Michała Glanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wspomniane wcześniej argumenty potwierdzające wysoki poziom naukowy opisanych w rozprawie wyników jak również ich wagę dla zrozumienia procesów enzymatycznych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Glanowskiego.**