



Wrocław University of Technology

Wrocław 11.06.2019

**Dr hab. Rafał Latajka, prof. uczelni.**  
**Zakład Chemii Bioorganicznej**  
**Wydział Chemiczny**  
**Politechnika Wrocławska**  
**Wybrzeże Wyspiańskiego 27**  
**50-370 Wrocław**  
rafal.latajka@pwr.edu.pl  
<http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl>

#### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kubiak pt.**

**„Synteza oraz badania konformacyjne fragmentów peptydowych tworzących zwroty w wybranych białkach oraz ustalenie sposobu wiązania tych fragmentów białek z jonami Cu(II) i Zn(II)”**

Badanie drugo- i trzeciorzędowej struktury białek, oprócz podstawowego charakteru tych badań, jest kluczowe z punktu widzenia określenia jakiejkolwiek korelacji między strukturą, a aktywnością biologiczną tych układów. Otrzymane w ten sposób rezultaty są również istotne z punktu widzenia badań wchodzących w obszar chemii bionieorganicznej gdzie dodatkowym czynnikiem wpływającym na strukturę łańcucha peptydowego są jony metali. Aktywność naukowa w tym obszarze jest zatem wciąż atrakcyjnym wyzwaniem. Właśnie w ten nurt badań wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska, poświęcona syntezie, określeniu preferencji konformacyjnych oraz koordynacji z jonami metali krótkich fragmentów białkowych. Praca doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, pod kierunkiem dr hab. Joanny Makowskiej, prof. UG na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Recenzowana praca doktorska napisana została w języku polskim, liczy 163 strony i została podzielona na siedem głównych rozdziałów. Układ pracy jest typowy dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym. W bibliografii umieszczono 175 odnośników literaturowych. Ponadto integralną częścią rozprawy stanowią: wykaz stosowanych w pracy skrótów, streszczenie, spis rysunków i tabel. Dorobek naukowy Doktorantki to jedna z mocniejszych stron doktoratu – w latach 2012 – 2017 była współautorką 9 publikacji z Listy Filadelfijskiej. Aktywność konferencyjna pani Kubiak była również duża – świadczą o tym aż 43 wystąpienia konferencyjne, a fakt, że większość samodzielnych prezentacji Doktorantki miała miejsce na konferencjach studenckich i doktoranckich tego nie umniejsza.

Pierwszym rozdziałem recenzowanej rozprawy jest liczący 31 stron **Wstęp teoretyczny**. Przedstawiono w nim zagadnienia dotyczące struktury białek, znaczenia biologicznego jonów miedzi i cynku, związków koordynacyjnych tworzonych przez te jony, opisano model koordynacji peptydów z jonami metali, peptydy bogate w reszty argininowe, a także bufora biologiczne. Przyznam szczerze, że po lekturze tego rozdziału odczuwam pewien niedosyt – szczególnie paragrafy poświęcone jonom miedzi i cynku oraz ich związkom kompleksowym zostały potraktowane bardzo skrótowo, brakuje mi tutaj wielu ważnych pozycji literaturowych z badan realizowanych zespołach profesorów Kozłowskiego, Bala i Jeżowskiej-Bojczuk. Z kolei pewne zdziwienie budzi rozdział na temat buforów biologicznych który nie łączy się za bardzo z pozostaąa częścią wstępu i jest moim zdaniem zbyteczny.

W przedstawionym **Celu pracy** Doktorantka skupia się raczej na wyliczeniu badań, które złożyły się na recenzowaną rozprawę, a zatem opisuje raczej środki zastosowane do uzyskania celu. Jakiego? Moim zdaniem nie zostało to jasno określone, niejasny jest także dobór białek, których fragmenty były zsyntezoawne – odpowiednio: białko wiążące frominę, białko wiążące immunoglobulinę oraz białko hPin1. Co prawda w kolejnym rozdziale „Białka naturalne wykorzystane w badaniach” pojawia się informacja, że kryterium doboru białek był fakt, że wszystkie mają znaną strukturę ale Recenzenta ten argument nie przekonuje. Prosiłbym zatem aby Doktorantka w czasie publicznej obrony skupiła się na dokładnym przedstawieniu celu niniejszej pracy. Jak będzie wynikać z dalszej części mojej recenzji pomoże to w wyselekcjonowaniu najważniejszych uzyskanych w tym doktoracie wyników.

Po rozdziale trzecim, gdzie jak wspomniałem wcześniej, Autorka opisuje białka wybrane jako modelowe w pracy, znajduje się liczący 26 stron rozdział dotyczący materiałów i metod. Rozdział ma charakter standardowego w tym wypadku opisu i napisany jest poprawnie, a Doktorantka relacjonuje syntezę oraz oczyszczanie peptydów, a także zastosowane w pracy



techniki badawcze takie jak: spektroskopia NMR, spektroskopia CD, skaningowa kalorymetria różnicowa DSC, obliczenia dynamiki molekularnej oraz potencjometria. Rozdział ten jest bardzo nierówny – np. metody obliczeniowe zostały opisane bardzo starannie czego niestety nie można powiedzieć o syntezie i oczyszczaniu peptydów. W tej właśnie części pojawiają się określenia nie tyle żargonowe co wręcz potoczne – co gorsza figurują one jako tytuły poszczególnych podrozdziałów – dla przykładu – „synteza na nośniku stałym, manualna, w naczynku”, „synteza na nośniku stałym w mikrofali” (to tytuły rozdziałów) czy sformułowanie „ściągnięcie z nośnika”, które jak się domyślam dotyczy odcięcia peptydu od żywicy. W rozdziale dotyczącym syntezy na podłożu stałym wspomaganej mikrofalowo Autorka z kolei odkrywa dość oczywisty i powszechnie znany fakt, że zastosowanie tej techniki skraca czas syntezy. Ostatnim ale chyba najpoważniejszym zarzutem do tej części są braki w dokumentacji przeprowadzonych syntez. Przedstawiono co prawda tabelaryczne zestawienia danych otrzymanych w wyniku pomiarów widm masowych ESI oraz dane nt HPLC ale wypadałoby podać również charakterystykę otrzymanych widm NMR (tym bardziej, że były one wykorzystywane w dalszych etapach badań), zaś w materiałach dodatkowych (dołączonych np na płycie CD do doktoratu należałoby zamieścić wszystkie widma masowe i chromatogramy – takie przedstawienie uzyskanych danych to obecnie standard. Kilka nieścisłości wkradło się również w opis spektroskopii NMR – już w tabeli dotyczącej skrótów zastosowanych w pracy technika NOESY została określona jako „homojądrowa technika wielowymiarowa”, z kolei w rozdziale czwartym, na stronie 59, Doktorantka twierdzi, że Ernst i Wuthrich byli prekursorami zastosowania spektroskopii NMR – oczywiście może się to odnosić jedynie do metod 2D NMR i ich zastosowań – obaj Panowie rozpoczęli swoją działalność w latach 70-tych czyli w czasie gdy spektroskopia NMR funkcjonowała jako metoda badawcza w Chemii od dobrych 20 lat. Chciałem również zapytać dlaczego do przypisania sygnałów na widmach badanych peptydów nie stosowano tak użytecznych dla krótkich łańcuchów technik jak HSQC oraz HMBC?

Kolejny rozdział to liczące a 74 strony **Wyniki badań i dyskusja**. W rozdziale tym Doktorantka pracowicie opisuje otrzymane przez siebie różnymi metodami badawczymi wyniki. Niestety, w moim odczuciu, pokutuje tutaj wspomniany przez mnie wcześniej problem braku spójności w proponowanym celu pracy. W konsekwencji Autorka zmuszona jest opisywać osobno i po kolei otrzymane wyniki dla trzech grup peptydów – nie widać tutaj aby cokolwiek się zająbiało, a lektura tej części, mimo, że jest napisana poprawnie, jest najzwyczajniej uciążliwa. Nie mam większych zastrzeżeń do przedstawionych wyników, być może wnioski wysnuwane z badań za pomocą spektroskopii CD są nieco oczywiste ale z kolei badania

konformacyjne przy użyciu spektroskopii NMR oraz obliczeń dynamiki molekularnej to bardzo solidny i w moim odczuciu najbardziej wartościowy fragment uzyskanych rezultatów. Niestety i w tym rozdziale Doktorantka nie ustrzegła się określeń żargonowych – mamy zatem stwierdzenie „peptydy o krótkiej sekwencji są zazwyczaj związkami bardzo ruchliwymi” (str 79), pojawiają się również „jednoprotone widma  $^1\text{H}$  NMR” (str 86) czy „stany sprzęgania” (str 98). Autorka powinna również wystrzegać się nazywania oddziaływan przez przestrzeń „połącznikami dalekiego zasięgu” bo jest to zwyczajnie niepoprawne.

W ostatnim rozdziale, którym jest **Podsumowanie** natrafiamy na ten sam problem co wcześniej – Autorka w skrócie opisuje najważniejsze rezultaty otrzymane dla trzech grup peptydów będących fragmentami trzech różnych białek. Zdecydowanie brakuje tutaj wniosków natury ogólnej „spinających” tematycznie całą pracę. Prosiłbym zatem aby Doktorantka w czasie obrony przedstawiła takie wnioski, prosiłbym również aby przedstawiono, które z uzyskanych przez siebie wyników Autorka uważa za najbardziej wartościowe naukowo.

Podsumowując swoją opinię o pracy chciałbym wyraźnie stwierdzić, że mimo kilku uwag krytycznych jest ona pozytywna. Rozprawa zawiera dużo oryginalnych wyników, a sama praca została napisana poprawnym językiem. Doktorantka nie ustrzegła się, wspomnianych przez mnie wcześniej niedociągnięć językowych i typograficznych jak również określeń żargonowych czy wręcz zaczerpniętych z języka potocznego. Oczywiście jest jednak, że takie mankamenty są nieuniknione i nie mają one dużego wpływu na stronę merytoryczną pracy. Z całą pewnością praca byłaby jeszcze ciekawsza gdyby została uzupełniona o następujące wątki badawcze:

- biorąc pod uwagę, że dla peptydów przeprowadzono badania preferencji konformacyjnych za pomocą spektroskopii NMR dobrym uzupełnieniem, dającym możliwość korelacji uzyskanych wyników, byłyby pomiary NMR dla kompleksów z jonami metali. W przypadku jonów cynku są to badania dość standardowe w sensie metodologicznym, dla jonów miedzi należałoby bazować na technikach opierających się na pomiarach zmiany czasu relaksacji,

- w przypadku badania struktury kompleksów tworzonych przez jony  $\text{Cu}^{2+}$  z pewnością wartościowych rezultatów dostarczyłyby pomiary wykonane za pomocą spektroskopii EPR.

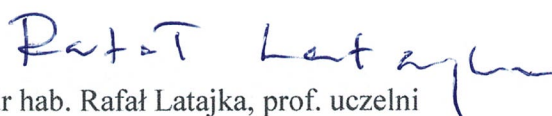
W moim odczuciu tak zrealizowany projekt byłby jeszcze bardziej kompletny i interesujący, a same wyniki warte byłyby opublikowania.

Przechodząc do końcowej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona wkład do studiów nad badaniem preferencji konformacyjnych i zdolnościami



koordynacyjnymi grupy krótkich peptydów w stosunku do jonów miedzi i cynku. Uzyskane wyniki są interesujące i poszerzają naszą wiedzę na temat tych zagadnień.

Oceniając pozytywnie poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej w konkluzji wyraźnie stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2014r poz. 1852). W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Doroty Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
dr hab. Rafał Latajka, prof. uczelni