

## **Recenzja**

materiałów habilitacyjnych dr Łukasza Peplowskiego, na które składa się cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zawierających określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne, zatytułowanego:

### **Zastosowanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do ulepszania enzymów Biotechnologicznych,**

w języku angielskim:

### **Application of theoretical computational biophysics methods for improving biotechnological enzymes,**

jak również aktywności naukowej dr Peplowskiego i całości jego dorobku naukowego.

#### I. Uwagi o charakterze ogólnym.

W ciągu ostatnich dwóch dekad w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w szczególności w dyscyplinie nauk fizycznych, obserwuje się bardzo intensywny rozwój metod teoretycznych i obliczeniowych, w tym metod teoretycznej biofizyki i strukturalnej bioinformatyki, stosowanych do układów biomolekularnych, o istotnym znaczeniu z punktu widzenia potencjalnych biotechnologicznych lub biomedycznych zastosowań. Rozwijane w sposób ciągły i stosowane w/w metody pozwalają na racjonalne projektowanie układów (bio)molekularnych o oczekiwanych właściwościach fizycznych, biologicznych i biomedycznych.

#### II. Uwagi dotyczące metodologii i profilu badań dr Peplowskiego.

Istotniejsze obszary zainteresowań i prac dr Peplowskiego po uzyskaniu w roku 2009 doktoratu w dyscyplinie fizyki lokujące się w tym obszarze nauk to:

- rozwijanie i zastosowania metod mechaniki i dynamiki molekularnej (MM i MD), w tym m.in. metod sterowanej MD oraz procedur dokowania inhibitorów,
- analiza statystyczna i bioinformatyczna danych wynikających z symulacji MD,
- tworzenie udoskonalonych modeli struktur enzymów i optymalizacja procesów enzymatycznych, w szczególności projektowanie linkerów wprowadzających więzy o charakterze topologicznym oraz obiecujących wariantów mutacyjnych,

- wykorzystanie platformy ML AlphaFold do przewidywania struktury wybranych białek,
- analiza wybranych zagadnień z zakresu biomedycyny,
- badania z wykorzystaniem kwantowych metod funkcjonału gęstości elektronowej (DFT) wybranych układów w celu pełniejszej analizy ich fizykochemicznych właściwości, w szczególności ich właściwości spektroskopowych,
- badania mikroskopowych właściwości mechanicznych molekuł DNA,
- badania wpływu pól magnetycznych na organizmy żywe, jak również
- badania mechanizmów transportu leków przez komórkowe błony.

### III. Przedmiot badań dr Pełowskiego w jego rozprawie habilitacyjnej.

Przedmiotem badań w recenzowanej pracy habilitacyjnej są głównie dwa enzymy:

- hydratataz nitrylowa (NHaza) oraz
- fosforylaza sacharozy (SPaza).

Hydrataza nitrylowa jest jednym z metaloenzymów biorących udział w biotransformacji nitryli do amidów. Charakteryzuje się stosunkowo wysoką katalityczną specyficznością w produkcji amidów i przyjaznością dla środowiska. Niejasny wszakże mechanizm katalityczny, niska termostabilność i wąska specyficzność substratowa ograniczały szersze zastosowania tego enzymu. Ostatnie badania nad teoretycznymi i przemysłowymi aspektami NHazy przyspieszyły rozwój tego zielonego katalizatora. Prace Habilitanta przyczyniły się właśnie do dalszych zastosowań NHazy i ogólnie dla rozwoju dziedzin biokatalizy oraz biotransformacji. Enzym ma charakterystyczny fold kanapkowy  $\alpha\beta\alpha$  z „metalowym centrum” składającym się z jonów żelaza  $Fe^{+3}$  lub kobaltu  $Co^{+3}$ . Wykazuje duży potencjał w zielonej syntezie nikotynamidu.

Fosforylaza sacharozy to enzymy pozwalające na biokatalityczną konwersję zwykłego cukru stołowego w produkty o atrakcyjnych właściwościach. Należą do rodziny hydrolaz glikozydowych. W bakteriach enzymy te katalizują fosforolizę sacharozy z wytworzeniem  $\alpha$ -glukozy-1-fosforanu oraz fruktozy. Jednak fosforylaza sacharozy mogą być również stosowane jako wszechstronne transglukozyazy do syntezy cennych glikozydów i cukrów, ponieważ ich szeroka specyficzność pozwala również przenosić grupę glukozylową sacharozy do różnorodnego zbioru związków innych niż fosforan. Liczne ostatnie badania inżynierii procesów i enzymów znacząco rozszerzyły zakres możliwych zastosowań fosforylaz sacharozy.

Obydwa enzymy są już wykorzystywane w sposób powszechny w firmach biotechnologicznych i farmaceutycznych, dzięki czemu w sposób tani i produkcyjnie czysty uzyskuje się szereg związków chemicznych wykorzystywanych dalej w różnorodnych procesach produkcyjnych.

#### IV. Ocena osiągnięcia naukowego habilitanta

Podstawą oceny osiągnięcia naukowego dr Peplowskiego są materiały habilitacyjne zawierające m.in. autoreferat oraz 8 współautorskich publikacji.

1. Dong Ma, Zhongyi Cheng, Łukasz Peplowski, Laichuang Han, Yuanyuan Xia, Xiaodong, Hou, Junling Guo, Dejing Yin, Yijian Rao, Zhemin Zhou; *Insight into the broadened substrate scope of nitrile hydratase by static and dynamic structure analysis*. Chemical, Science **13**(28) 8417-8428 (2022); IF=9.97 (200 punktów, 0 cytowań)
2. Junling Guo, Julia Berdychowska, Qianpeng Lai, Yiwei Meng, Zhongyi Cheng, **Łukasz Peplowski**, Zhemin Zhou; *"Toolbox" construction of an extremophilic nitrile hydratase from Streptomyces thermoautotrophicus for the promising industrial production of various amides*. International Journal of Biological Macromolecules **221** 1103-1111 (2022); IF=8.02 (100 punktów, 0 cytowań)
3. Yuanyuan Xia, Łukasz Peplowski, Zhongyi Cheng, Tianyi Wang, Zhongmei Liu, Wenjing Cui, Michihiko Kobayashi, Zhemin Zhou; *Improving the thermostability and catalytic efficiency of the subunit-fused nitrile hydratase by semi-rational engineering*. Chem Cat Chem **10**(6) 1370-1375 (2018); IF=5.50 (100 punktów, 19 cytowań)
4. Zhongyi Cheng, Yao Lan, Junling Guo, Dong Ma, Shijin Jiang, Qianpeng Lai, Zhemin Zhou, **Łukasz Peplowski**; *Computational design of nitrile hydratase from Pseudonocardia thermophila JCM3095 for improved thermostability*. Molecules **25**(20) 1-18 (2020); IF=4.93 (IF=140, 12 cytowań)
5. Junling Guo, Zhongyi Cheng, Julia Berdychowska, Xiaonan Zhu, Lingling Wang, **Łukasz Peplowski**, Zhemin Zhou; *Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase*. International Journal of Biological Macromolecules **181** 444-451 (2021); IF=8.02 (100 punktów, 8 cytowań)
6. Yuanyuan Xia, Xiaoyu Li, Linli Yang, Xiaozhou Luo, Wei Shen, Yu Cao, **Łukasz Peplowski**, Xianzhong Chen; *Development of thermostable sucrose phosphorylase by semi-rational design for efficient biosynthesis of alpha-D-glucosylglycerol*. Applied Microbiology and Biotechnology **105**(19) 7309-7319 (2021); IF=5,56 (100 punktów, 6 cytowań)
7. Zhongyi Cheng, Łukasz Peplowski, Wenjing Cui, Yuanyuan Xia, Zhongmei Liu, Jialei Zhang, Michihiko Kobayashi, Zhemin Zhou; *Identification of key residues modulating the stereoselectivity of nitrile hydratase toward rac-mandelonitrile by semi-rational engineering*. Biotechnology and Bioengineering **115**(3) 524-535 (2018); IF=4.39, (100 punktów, 21 cytowań)
8. Zhongyi Cheng, Wenjing Cui, Yuanyuan Xia, Łukasz Peplowski, Michihiko Kobayashi, Zhemin Zhou; *Modulation of nitrile hydratase regioselectivity towards dinitriles by tailoring the substrate binding pocket residues*. Chem Cat Chem **10**(2) 449-458 (2018); IF=5.50 (100 punktów, 11 cytowań)

W pracach [2], [4,5,6] dr Peplowski jest jednym z korespondencyjnych autorów. Sumaryczny IF = 51.89, średni IF na publikację = 6.49, całkowita liczba cytowań w WoS wynosi około 70.

Generalnie, badania opublikowane są w czasopismach o bardzo wysokim IF. Liczba cytowań nie jest szczególnie wysoka, ale prace są stosunkowo nowe, więc nie można oczekiwać dużej liczby cytowań.

Istotną zaletą prac dr Peplowskiego jest to, że w sposób bardzo kompetentny wykorzystywał metody mechaniki i dynamiki molekularnej, fizyki statystycznej oraz analizę molekularnych pól. Badania teoretyczne były powiązane m.in. z badaniami eksperymentalnymi bardzo dobrego zespołu kierowanego przez prof. Zhemina Zhou ze *School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, China*. W związku z tym wyniki badań teoretycznych modelowania i projektowania molekularnego mogły być szybko wykorzystywane w badaniach eksperymentalnych, a przewidywania zmian aktywności biologicznej badanych enzymów mogły być sprawdzane w warunkach fizjologicznych lub w warunkach przygotowanych do przyszłych zastosowań technologicznych, m.in. w wyższych temperaturach.

Jeżeli chodzi o najistotniejsze osiągnięcia dr Łukasza Peplowskiego są one następujące:

W publikacjach [1,2] oraz [4], stosując w/w teoretyczne i obliczeniowe metody zaprojektował bardziej aktywne formy hydratazy nitrylowej, które to formy z wykorzystaniem eksperymentalnej biotechnologii zostały wyizolowane i szczegółowo scharakteryzowane. W sposób racjonalny, z wykorzystaniem metod analizy strukturalnej, zinterpretował mechanizm ich działania.

W pracach [3-5], które dotyczą hydratazy nitrylowej oraz w pracy [6], która dotyczy fosforylasy sacharozy dr Peplowski zaprojektował bardziej termostabilne formy tych enzymów, co ma istotne znaczenie dla przemysłu o charakterze biotechnologicznym i/lub spożywczym.

W pracach [7-8] Habilitant skoncentrował się z sukcesem na zaprojektowaniu modyfikacji hydratazy nitrylowej w celu kontrolowanego polepszenia jej specyficzności.

W podsumowaniu, wszystkie elementy badań naukowych związanych z modelowaniem i projektowaniem molekularnym różnorodnych wariantów hydratazy nitrylowej oraz fosforylasy sacharozy charakteryzują się wysokim profesjonalizmem a uzyskane wyniki znajdują, lub mogą znaleźć, konkretne praktyczne zastosowania.

Mam dwie uwagi o charakterze krytycznym:

1. Szkoda, że Habilitant nie jest autorem lub współautorem jakiegoś patentu związanego z modyfikacjami enzymów, będących przedmiotem badań. Wydaje mi się, że niektóre zaprojektowane modyfikacje struktur badanych wariantów enzymów dobrze nadawałyby się do opatentowania.

2. Moją uwagę zwrócił ogólnie w literaturze, w tym w habilitacji, brak porównawczych badań mechanizmów enzymatycznych hydratazy nitylowej z jonami żelaza  $Fe^{3+}$  oraz z jonami kobaltu  $Co^{3+}$  w centrum aktywnym, z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych metod teoretycznej i obliczeniowej fizyki - m.in. molekularnej mechaniki kwantowej i/lub kwantowo-klasycznej dynamiki molekularnej. Wydaje mi się, że szczególnie w Instytucie Fizyki UMK, o ustalonej tradycji prowadzenia zaawansowanych kwantowych badań, byłoby to dość naturalnym wyborem.

W literaturze istnieją prace na ten temat, np.

- M. Prejanò et al., *Reaction Mechanism of Low-Spin Iron(III)- and Cobalt(III)-Containing Nitrile Hydratases: A Quantum Mechanics Investigation*. *Inorganic Chemistry*. (2017) 56. [10.1021/acs.inorgchem.7b02121](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02121). DOI:10.1021/acs.inorgchem.7b02121, lub:
- B. Gril, et al., *Functional Expression and Characterization of a Panel of Cobalt and Iron-Dependent Nitrile Hydratases*, *Molecules* (2020) May 28;25(11):2521. doi: 10.3390/molecules25112521,

ale jeżeli chodzi o mikroskopowy opis różnic katalitycznych mechanizmów nie są one szczególnie zadawalające.

#### V. Ocena aktywności naukowej oraz całości dorobku naukowego i dydaktycznego Habilitanta

Dr Peplowski od czasu uzyskania stopnia magistra fizyki w roku (2004) i doktora nauk fizycznych w roku 2009 cały czas aktywnie pracował naukowo. Obszary realizowanych przez niego badań wymienione są w punkcie II. Po doktoracie jest współautorem 18 prac naukowych opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych. Poza Instytutem Fizyki UMK, współpracował m.in. z zespołami profesorów:

- Zhemin Zhou, Jiangnan University, Wuxi, China,
- Xianzhong Chen, Jiangnan University, Wuxi, China,
- Michihiko Kobayashi, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan oraz
- Markiem Cieplakiem, Instytut Fizyki PAN, Warszawa.

Dr Peplowski był opiekunem 7-miu prac magisterskich, 4 prac inżynierskich oraz 1 pracy licencjackiej, jak również promotorem pomocniczym 3 prac doktorskich.

Prowadził różnorodnie zajęcia dydaktyczne z podstaw fizyki, metod molekularnego modelowania i bioinformatyki oraz nauk obliczeniowych, jak również zajęcia dla doktorantów w języku angielskim.

Pełnił też szereg bardzo wartościowych organizacyjnych funkcji związanych z pracą na UMK w Toruniu.

W związku z tym bardzo wysoko oceniam aktywność organizacyjną, dydaktyczną oraz całość dorobku naukowego Habilitanta.

VI. Wniosek końcowy.

Konkludując uważam, że przedstawione osiągnięcie naukowe dr Łukasza Peplowskiego zatytułowane „Zastosowanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do ulepszania enzymów biotechnologicznych” w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, jak i cały jego dorobek naukowy oraz wysoka aktywność naukowa, edukacyjna i organizacyjna na rzecz środowiska akademickiego w pełni spełniają wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) jak również zwyczajowe stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego – w tym przypadku w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk fizycznych.

Wnoszę o dopuszczenie dr Łukasza Peplowskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Prof. dr hab. Bogdan Lesyng