



Profesor dr hab. Maciej Szaleniec

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera

Polskiej Akademii Nauk

email: maciej.szaleniec@ikifp.edu.pl

### Recenzja

#### Procedura habilitacyjna dr Małgorzaty Pająk

#### Tytuł osiągnięcia

#### **„Synteza znakowanej L-tyrozyny i jej pochodnych oraz badanie ich enzymatycznych przemian metodami kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych”**

#### Przebieg kariery zawodowej habilitanta

Habilitantka uzyskała tytuł magistra chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w roku 2004 broniąc pracę pt. „Synteza ureidowego mimetyku peptydu”. Następnie kontynuowała swoje studia pozostając na tym samym Wydziale i w 2008 roku obroniła rozprawę doktorską pt. „Badanie enzymatycznych reakcji L-DOPY i jej pochodnych metodami izotopowymi” pod kierownictwem pani prof. dr hab. Marianny Kańskiej, specjalistki w dziedzinie chemii organicznej związków znakowanych izotopowo oraz badań enzymatycznych przemian aminokwasów metodami izotopowymi. Wydaje się, że doktorat ten miał kluczowy wpływ na ukształtowanie zainteresowań habilitantki, gdyż przedstawiony do oceny cykl habilitacyjny do niego nawiązuje. Po doktoracie dr Pająk objęła posadę adiunkta w pracowni Chemii Biomolekuł Zakładu Chemii Organicznej na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie pracowała do marca 2017 a następnie do września 2018 w Pracowni Elektrochemicznych Źródeł Energii w Zakładzie Chemii Fizycznej i Radiochemii na tym samym Wydziale. W tym okresie była wykonawcą w projekcie Horyzont 2020, gdzie zajmowała się opracowywaniem kompozytowych elektrolitów na bazie rozpuszczalników organicznych do zastosowań w bateriach litowo-jonowych. W kolejnych latach, aż do stycznia 2021, pracowała w projekcie Techmatstrateg, poświęconym podobnym zagadnieniom, jednakże na stanowisku specjalisty badawczo-technicznego a nie adiunkta. Równolegle, od października 2020 podjęła pracę na stanowisku adiunkta w Pracowni Elektrochemicznych Źródeł Energii, Zakładu Chemii Fizycznej i Radiochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie pracuje do dziś.

Przedstawiony życiorys naukowy jasno wykazuje brak mobilności habilitantki w ciągu ostatnich 15 lat pracy badawczej. Całość kariery naukowej (poczynając od studiów magisterskich) odbyła się w ramach jednego Wydziału UW. Brak również jakiegokolwiek informacji na temat współpracy z grupami zagranicznymi, informacji o nawet krótkich wizytach studyjnych w innych ośrodkach zagranicznych (i to pomimo uczestnictwa w realizacji projektu H2020, w którym konsorcjum zawierało zespoły z



Wielkiej Brytanii, Francji, Niemiec i Austrii). Habilitantka odbyła w swojej karierze jedynie 10 dniowy staż w Instytucie Inżynierii Materiałów na Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Należy jednak zaznaczyć, że habilitantka nawiązała owocną współpracę z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym, w wyniku której to współpracy powstało 7 prac naukowych, z których 6 stanowi element cyklu habilitacyjnego. Jednakże reprezentantem grupy na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym wydaje się być prof. Marianna Kańska, była mistrzyni habilitantki. **Czy więc była to faktyczna nowa współpraca z inną jednostką czy tylko działalność w ramach grupy działającej na pograniczu UW i WUM pozostaje dla mnie jako recenzenta sprawą niejasną. W autoreferacie brak informacji co do personaliów osób współpracujących z habilitantką. Tymczasem współpraca ta jest niezwykle istotna w kontekście wypełnienia wymaganych kryteriów postępowania habilitacyjnego.**

### **Informacja o obowiązujących przepisach prawa na dzień wszczęcia ocenianego postępowania habilitacyjnego, w tym obowiązujących kryteriach oceny**

Na dzień wszczęcia postępowania habilitacyjnego (wniosek z dnia 22.01.2021) w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych obowiązującymi przepisami prawa w kwestii postępowania habilitacyjnego są zapisy ustawy z lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”) (Dz. U. 1668 z późn. zm), rozporządzenie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 7 listopada 2018 r. w sprawie sporządzania wykazów wydawnictw monografii naukowych oraz czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych (na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668 i 2024) oraz „Regulamin przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego” w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie.

Warunkiem uzyskania stopnia doktora habilitowanego przez habilitanta jest posiadanie stopnia doktora oraz dorobku naukowego stanowiącego znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauk chemicznych oraz wykazanie się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

### **Przedstawienie informacji o osiągnięciu naukowym**

Przedstawione osiągnięcie habilitacyjne zatytułowane „**Synteza znakowanej L-tyrozyny i jej pochodnych oraz badanie ich enzymatycznych przemian metodami kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych**” jest cyklem 8 prac oryginalnych i 2 przeglądowych opublikowanych w latach 2014-2020. Cykl został opublikowany w czasopiśmie specjalistycznym o średnim lub niskim rankingu w dyscyplinie nauki chemiczne: H2 – Q4 (IF5: 1.5), H3, H7, H9 – Q4 (IF5: 1.28), H4 – Q3 (IF5:1.72), H5 – Q3 (IF5:1.5), H6 i H8 – Q3 (IF5: 3.17), H10 – Q4 (IF5:0.4). Pierwsza praca została opublikowana w czasopiśmie spoza listy JCR (H1 J Chem Chem Eng – 8 pkt ministerialnych),



zaś ostatnia przeglądownka została opublikowana po polsku w Przemysle Chemicznym. Osobiście mam wątpliwości czy publikacje po polsku lub w czasopiśmie spoza uznanego kanonu czasopism naukowych, są w stanie wywrzeć „znaczący wpływ” na dyscyplinę nauk chemicznych. W zbiorze tym wyróżniają się publikacje w J. Biochem., które na liście MEiN otrzymały 100 pkt oraz Appl. Radiat. Isotop., 70 pkt MEiN. Poza tym wszystkie pozostałe publikacje mają tylko 40 pkt MEiN. Rozumiem, że pracę H1 dołączono do cyklu ze względu na wstępny charakter opublikowanych tam syntez, ale niski ranking czasopisma oraz jego nieobecność, mimo upływu 7 lat, na liście JCR nie gwarantuje niestety, że proces oceny recenzenckiej został przeprowadzony na odpowiednim poziomie. **Z drugiej strony, na uwagę zasługuje fakt, że habilitantka cztery prace napisała sama a w połowie prac z cyklu jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, co podkreśla samodzielność naukową habilitantki.**

Analiza oświadczeń wykazuje, że współautorki, pani dr Elżbieta Winnicka i pani dr Katarzyna Pałka były zaangażowane w syntezę niektórych związków oraz opis ich syntezy, a prof. dr hab. Marianna Kańska jedynie w korektę językową manuskryptów oraz dyskusję uzyskanych wyników. Co ważne pani profesor podkreśla, że przedstawiony cykl, chociaż tematycznie podobny do badań prowadzonych przez jej grupę, powstał w wyniku realizacji autorskich badań habilitantki. Tak więc, mylne jest wrażenie, że cykl habilitacyjny nie jest odrębny w zakresie celów i tematyki od prac prowadzonych przez habilitantkę podczas pracy doktorskiej realizowanej pod kierownictwem prof. Kańskiej. **Habilitantka niewątpliwie kontynuuje badania swojej promotor korzystając z wypracowanej w grupie metodologii jednak w stosunku do własnej tematyki badawczej.**

Oprócz przedstawionego do oceny dorobku dr Pająk po doktoracie opublikowała 10 publikacji z listy JCR dotyczących zarówno badań izotopowo podstawionych związków jak i cieczy jonowych oraz układów elektrochemicznych. Osiągnięcia habilitantki były prezentowane również na bardzo nielicznych konferencjach – 5 wystąpień ustnych, w tym osobiste tylko na konferencjach krajowych. Wyniki prac były przedstawiane zazwyczaj w postaci posterów (2 razy na konferencjach zagranicznych i 13 na konferencjach krajowych jednak w spisie dorobku nie podano informacji bibliograficznych je potwierdzających). **W celu właściwej oceny dorobku istotne byłoby uzupełnienie informacji dotyczących aktywności konferencyjnej habilitantki i tematyki prezentowanych posterów.**

Analiza informacji dotyczących realizowanych grantów wykazała, że habilitantka była głównie wykonawcą szeregu projektów naukowych. Niestety nie kierowała żadnym własnym projektem grantowym finansowanym z zewnętrznej agencji grantowej. Swoje badania finansowała prawie wyłącznie za pomocą wewnętrznych grantów uczelnianych, których była kierownikiem. **Na plus należy zapisać jednak fakt uzyskania z NCN finansowania działania naukowego w ramach programu Miniatura, które to umożliwiło sfinansowanie część badań habilitacyjnych poświęconych metylowym pochodnym L-tyrozyny i oksydazie L-aminokwasowej (LAAO).** Obawiam się, że brak



doświadczenia w kierowaniu projektami będzie w przyszłości utrudniać pozyskanie kolejnych grantów z NCN czy NCBiR a przez to uzyskiwanie finansowania w dalszej pracy badawczej.

W dorobku habilitantki zawraca uwagę duża aktywność dydaktyczna, opieka nad pracami studenckimi (magisterskimi i licencjackim) oraz działalność popularyzatorska w ramach Pikników Naukowych, Forum Młodych Chemików, Uniwersytetu Młodego Chemika itp. Habilitantka stara się propagować wiedzę chemiczną wśród studentów i uczniów oraz szeroko rozumianego społeczeństwa, co zasługuje zdecydowanie na docenienie. Działalność ta jednak nie dotyczy popularyzacji wyników osiągnięcia naukowego (np. poprzez artykuły popularno-naukowe czy media społecznościowe).

### Ocena cyklu habilitacyjnego

Przedstawione w dysertacji habilitacyjnej osiągnięcie w całości ukierunkowane jest na poznanie konsekwencji metabolicznych wprowadzania metylowych i halogenowych podstawników L-tyrozyny w oparciu o reakcje z tyrozinazą, monoaminooksydazą A oraz oksydazą L-aminokwasową, ze względu na potrzebę oceny toksyczności radiofarmaceutycznych pochodnych L-tyrozyń. Dodatkowo celem dysertacji było dalsze zgłębianie mechanizmów reakcji katalizowanych przez te enzymy. Główną techniką badawczą, jaka została zastosowana w pracach wchodzących do cyklu, były pomiary kinetyczne aktywności enzymatycznej z zastosowaniem izotopowo-podstawionych substratów (wyznaczanie KIE) bądź izotopowo znakowanych rozpuszczalników (SIE) a także pomiary inhibicji badanych enzymów (mechanizm inhibicji). Nie należy też zapominać o ważnym aspekcie pracy jakim była synteza regioselektywnie a czasem enancjoselektywnie podstawionych deuterem lub trytem pochodnych L-tyrozyny. Część ta została w omówieniu uznana przez habilitantkę za szczególnie istotną i trudno się z tą tezą nie zgodzić, gdyż stanowi zarówno bazę do badań kinetycznych jak i osiągnięcie samo w sobie.

W ramach osiągnięcia w pracy H1 opracowano metodę wymiany izotopowej w pozycji 2 dla 3'-F- i 3'-Cl-L-Tyr z wykorzystaniem PLP zależnej tryptofanazy. W pracy H2 wykorzystano tę samą reakcję do zsyntezowania pochodnych  $\alpha$ -trytowych oraz odwrotną reakcję katalizowaną przez amoniakolizę L-feniloalaninową do otrzymania  $\beta$ -podstawionych pochodnych deuterowych i trytowych. W pracy H5 zsyntetyzowano szereg podstawionych deuterem i trytem halogenowanych pochodnych tyraminy w konfiguracji *R* wykorzystując zachowującą konfigurację przy węglu  $\alpha$  reakcję dekarboksylacji katalizowanej przez dekarboksylazę tyrozynową zaś izomery *S* poprzez dekarboksylację związków podstawionych uprzednią metodą tryptofanazową.

Inną grupą związków były pochodne 3'-halogenowe podstawione w pozycji 2' pierścienia aromatycznego. W tym celu habilitantka zastosowała w pracy H3 metody wymiany izotopowej



katalizowanej kwasem opracowaną wcześniej w zespole prof. Kańskiej przy udziale habilitantki. W pracy H7 rozwinęła tę metodę poprzez zastosowanie mikrofal. W ten sposób uzyskała regioselektywnie podstawione pochodne 3'-F,2'-D, 3'-Cl,2'-D oraz 3'-I,2',5'-D pochodne tyrozyny.

Na koniec należy wspomnieć o ostatniej klasie związków, czyli pochodnych  $\alpha$ - i N-metylo-L-Tyr znakowanych w pierścieniu w pozycji 2' i 5' (zsyntetyzowanych metodą termiczną – praca H4) oraz pochodną 3'-metoksy-L-tyrozyny podstawioną w pozycji  $\alpha$ -D zsyntetyzowaną metodą tryptofanazową (praca H8). **Należy podkreślić, że habilitantka jest ewidentnie biegła w klasycznej syntezie organicznej jak i reakcjach wykorzystujących biokatalizatory. Jest to wciąż bardzo rzadkie połączenie umiejętności, które zasługuje na szczególne docenienie.**

Z pewnością przedstawienie w dysertacji chemo- i enzymatycznych narzędzi do regio- i enancjoselektywnego znakowania izotopowego pochodnych tyrozyny jest istotnym osiągnięciem. Bazuje ono jednak na wcześniejszych dokonaniach grupy prof. Kańskiej. Dlatego trudno jest ocenić osobisty wkład habilitantki w rozwój dyscypliny nauk chemicznych w tym zakresie. Prace wskazujące na możliwość wykorzystania enzymów do wymiany izotopowej w aminokwasach przewijają się w literaturze do lat 80. Publikacji takich jednak nie jest zbyt wiele i zdecydowana większość literatury pojawiającej się w tym temacie w ostatnich kilkunastu latach wywodzi się z zespołu habilitantki lub jest jej współautorstwa. **Dlatego uznaję, że część dotycząca syntezy znakowanych pochodnych L-tyrozyny rozwija dyscyplinę nauk chemicznych, chociaż jest to wkład bardzo szczegółowy i wąsko wyspecjalizowany.**

Kolejna część dysertacji dotyczy znacznie ciekawszych, z mojego osobistego punktu widzenia, badań kinetycznych, których efektem są zarówno zmierzone wartości kinetycznych efektów izotopowych oraz rozpuszczalnikowych efektów izotopowych. Celem tych pomiarów była eksploracja mechanizmów reakcji katalizowanych przez wybrane enzymy szlaku metabolicznego L-tyrozyny w szczególności w przypadku reakcji pochodnych L-tyrozyny będących substancjami aktywnymi w lekach radiofarmaceutycznych. Zasadniczo instrumentarium metodologiczne tych badań ograniczało się do badań kinetycznych z wykorzystaniem metody bezpośredniej (tj. niekonkurencyjnej) z zastosowaniem detekcji spektrofotometrycznej czy to bezpośrednich reagentów reakcji czy produktów powstających w reakcji następczej z produktami reakcji katalizowanej przez enzym (tzw. coupled-assay). Tak więc wszystkie badania były prowadzone w stanie stacjonarnym, a do opisu przyjęto najprostszy model kinetyczny, czyli model Michaelisa-Menten (zwracam uwagę, że w dysertacji dr Leonora Menten została niezasłużenie obdarzona przez habilitantkę męskimi końcówkami). Efekty izotopowe dla  $^D V_{\max}$  i  $^D(V/K)$  każdorazowo były więc otrzymywane w oparciu o stałe z dopasowania modelu Michaelisa-Menten do danych eksperymentalnych. Niestety w tekście publikacji autorzy bardzo często nie podawali błędów wyznaczenia wartości stałych kinetycznych, więc trudno jest ocenić, czy błędy KIE zostały wyznaczone prawidłowo (zdarzają się wyjątki np. praca



H6 Tabela I gdzie błędy  $K_m$  są między 2-6% a  $V_{max}$  między 1-19%). Tymczasem na podstawie Tabeli 1 i 2 w dysertacji można wnioskować, że błędy były minimalne, bo nawet dla wartości  $^D(V/K)$ , gdzie błędy czterech wartości wyznaczonych niezależnie z modelu Michaelisa-Menten powinny się sumować, pozostają na takim samym poziomie jak dla  $^D V_{max}$  (np. odpowiednio  $1,65 \pm 0,10$  i  $1,34 \pm 0,10$ ) albo są czasem mniejsze niż dla  $^D V_{max}$  co po prostu jest statystycznie niemożliwe i stawia rzetelność całej analizy błędu pod znakiem zapytania. **Ponieważ większość mechanistycznych wniosków przedstawionych w pracy habilitacyjnej opiera się na analizie uzyskanych wartości KIE i SIE (a przede wszystkim różnic między  $^D V_{max}$  i  $^D(V/K)$ ), bardzo istotne jest wykazanie faktycznej istotności statystyczną obserwowanych różnic.**

Tak już zupełnie na marginesie należy zauważyć, że badane przez habilitantkę reakcje nie są jedno substratowe (wszystkie badanie oksydazy katalizują reakcje utlenienia przy użyciu ko-substratu,  $O_2$ ) a więc **obserwowane** parametry kinetyczne zostały uzyskane dla stężenia  $O_2$  wynikającego z ciśnienia parcjalnego tlenu. Co prawda  $K_m^{O_2}$  tyrozyazy wynosi  $25 \pm 4 \mu M$  co przy stężeniu tlenu w zakresie 6.5-8 mg/L ( $180-250 \mu M$ ) powinno gwarantować saturację enzymu i sprowadzać kinetykę reakcji dwusubstratowej do modelu Michaelisa-Menten, to jednak w literaturze zwraca się uwagę na wpływ stężenia tlenu na obserwowany SIE. Przykładem może być praca Washington *et al.* 10.1016/j.abb.2015.04.007, gdzie akurat dla wysokich zawartości stężenia  $O_2$  w reakcji utleniania 2-aminofenolu SIE osiąga wartości poniżej 1 a jedynie dla niskich wartości tlenu SIE ma wartości powyżej 1. Co więcej powinowactwo oksydazy monoaminowej do tlenu jest dość niskie, do tego stopnia, że pomiar jej aktywności w komórkach pozwala na oszacowanie stężenia tlenu w poszczególnych podstrukturach komórkowych. Tymczasem w publikacjach brak informacji, czy stężenie drugiego substratu było kontrolowane i w ogóle brane pod uwagę jako czynnik potencjalnie wpływający na wyniki kinetyczne. Tymczasem wpływ stężenia  $O_2$  na obserwowaną szybkość jest ważny również w celu odniesienia warunków, w których przeprowadzano pomiar, do warunków fizjologicznych, gdzie stężenie tlenu jest mniejsze (przykład pracy na temat MAO A, Katz *et al.*, J Biol Chem, 1984, 259, 7504-7509). Ponieważ celem pracy habilitacyjnej było zbadanie wpływu pochodnych L-tyrozyzny na metabolizm ludzki, zaniedbanie kontekstu fizjologicznego wydaje się pewnym przeoczeniem. Oczywiście w wielu aspektach modelowe pomiary kinetyczne i płynące z nich wnioski (np. wartości stałych inhibicji) mogą być bez trudu ekstrapolowane do warunków panujących np. na powierzchni membrany mitochondrium, gdzie zlokalizowane jest MAO A. **Tak więc w dyskusji i podsumowaniu cyklu trochę zabrakło odniesienia do kwestii korespondencji uzyskanych przez habilitantkę wyników do warunków fizjologicznych panujących w organizmie człowieka (np. 2-5% tlenu).**

Prezentowane w pracy H3 wyniki KIE dla halogenowych pochodnych same w sobie nie wnoszą zbyt wiele do zrozumienia mechanizmu reakcji bez odniesienia do wcześniejszej pracy J. Radioanal. Nucl.



Chem. 3025, 305,371–378 gdzie wyznaczony KIE dla L-tyrozyny wykazywał się wyższą wartością. Obserwację tę habilitantka powiązała z elektronowym efektem wprowadzanym przez podstawniki halogenowe. Być może ta hipoteza jest słuszna. Niestety wobec bardzo wycinkowego obrazu, jaki dostarcza KIE stosowany dla reakcji wieloetapowej bez wsparcia innymi technikami badań enzymów, hipoteza ta jest do pewnego stopnia spekulatywna. Zwraca moją uwagę fakt, że w literaturze postuluje się często atak grupy OH na atom miedzi jako determinujący szybkość reakcji również w przypadku tyrozyny (np. praca Espin *et al.* 10.1046/j.1432-1327.2000.01013.x.), co zresztą znajdowałoby potwierdzenie w niezbyt wysokim obserwowanym efekcie izotopowym (z zakresu 1-2). Trudno jest wykluczyć udział efektów sterycznych podstawników halogenowych na samą kinetykę reakcji (np. poprzez modyfikację kluczowych odległości stanu przejściowego), co zresztą zdaje się być spójne z efektem inhibicyjnym obserwowanym dla pochodnej podstawionej jodem. Podejrzewam, że wysokości barier następczych procesów molekularnych są dość bliskie sobie i w efekcie trudno jest wyznaczyć jednoznaczny etap limitujący szybkość reakcji, zaś wprowadzenie podstawnika halogenowego zmienia delikatnie wysokość barier energetycznych lub stabilizuje któryś z etapów przejściowych. Dlatego nie mogę się zgodzić, że „wyniki te jednoznacznie wskazują, że reakcja z halogenopochodną przebiega według innego mechanizmu niż z naturalnym substratem” – zmiana wartości KIE przy zmianie struktury substratu nie implikuje zmiany mechanizmu reakcji. Aby taką tezę „jednoznacznie” wesprzeć (o ile możliwe jest jednoznaczne potwierdzenie jakiegokolwiek teorii naukowej), wymagane byłoby przeprowadzenie szerszych badań eksperymentalnych i teoretycznych analizujących wpływ podstawienia na przebieg reakcji. **Zastanowiło mnie też nieskorzystanie przez habilitantkę z substratów podstawionych trytem w jej badaniach nad KIE, w szczególności wobec opracowanych metod ich syntezy.**

Przy okazji analizy pracy H3 zwróciło moją uwagę **metodologicznie niepoprawne** uzyskiwanie stałych inhibicji w procedurze dopasowania modelu do zlinearyzowanych danych kinetycznych (metoda Linewavera-Burka). Prawidłowym sposobem dopasowania danych kinetycznych jest regresja nieliniowa z zastosowaniem odpowiedniego modelu inhibicji (dopasowanie jednoczesne do np. trzech przebiegów typu M-M dla różnych stężeń [I]) i wybór modelu na podstawie analizy parametrów dopasowania. Metoda Linewavera-Burka jest dobra do ilustracji mechanizmu inhibicji z czego habilitantka korzysta w swoich publikacjach, ale nie należy jej stosować do wyznaczania wartości stałych kinetycznych, bo o ich wartości decyduje głównie pomiar kinetyczny obdarzony największym błędem, a marginalizowane są wyniki zebrane w pobliżu  $V_{max}$  (vide Fig. 4 z H3). Niestety w późniejszych pracach również ta przestarzała metodologia wyznaczania stałych inhibicji była konsekwentnie stosowana, w wyniku czego wartości stałych inhibicji są obarczone systematycznym błędem związanym z jednakowymi (w dziedzinie [S] a nie  $1/[S]$ ) odstępami między 6 wybranymi stężeniami i przeważającym wpływem na wynik wartości aktywności zmierzonych dla najwyższej wartości  $1/[S]$ , a więc dla najniższych stężeń, przy jednoczesnej marginalizacji wyników najbardziej



pewnych, uzyskanych dla najwyższych stężeń substratu (patrz np. Fig. 4 praca [H8] dla najwyższych stężeń inhibitora) – patrz np. J. Chem. Educ. 1997, 74, 10, 1238.

Podobnie polemizowałbym z wnioskiem habilitantki dotyczącym reakcji katalizowanej przez oksydazę L-aminokwasową (praca H8). Habilitantka postuluje, że do „rozerwania podstawionego wiązania C-H dochodzi w etapie limitującym szybkość badanego procesu”. Jednak obserwowane efekty są niewielkie (1.2-1.7) a sam proces, badany za pomocą reakcji następczej uwalnianego w reakcji enzymatycznej nadtlenu wodoru, jest przecież wieloetapowy. W kontekście przyjętego układu pomiarowego rozerwanie wiązania C-H niewątpliwie ma wpływ na obserwowaną szybkość reakcji, ale o obserwowanej szybkości w stanie stacjonarnym decydują najwyraźniej również pozostałe etapy elementarne. Uzyskiwane niewielkie wartości KIE dobitnie wskazują na występowanie maskowania efektu izotopowego przez inne etapy elementarne, które zachodzą z porównywalną szybkością do aktywacji wiązania C-H. Aby przetestować postawioną hipotezę należałoby zastosować technikę stopped-flow z obserwacją zmian widma kofaktora flawinowego. Wtedy możliwe byłoby obserwowanie bezpośrednie pierwszego etapu postulowanej reakcji, wyznaczenie stałych kinetycznych związanych z tym procesem (co umożliwiłoby bezpośrednie porównanie jej wartości z zespoloną stałą  $k_{cat}$  z modelu M-M) jak i porównanie KIE dla tego etapu z KIE dla pomiaru w stanie stacjonarnym. Taka technika jest zresztą rutynowo stosowana do badania efektów izotopowych enzymów flawinowych (w tym więc konkretnym przypadku nie tylko dla LAAO ale również MAO A – patrz np. praca przeglądowa Ramsay *et al.*, J Neural Transm 125 (2018), 1659–1683).

Niewątpliwie ciekawym aspektem są badania rozpuszczalnikowego efektu izotopowego oraz badania udziału cząsteczek rozpuszczalnika w procesie reakcji enzymatycznej. O ile wnioski uzyskane w wyniku tych badań dla tyrozyminy są niekiedy dość oczywiste (tj. potwierdzony udział cząsteczki wody w procesie przeniesienia protonu) o tyle wyniki przedstawione dla MAO A są znacznie ciekawsze. W badaniach tych habilitantka uzyskała wysokie wartości SIE, co w połączeniu z badaniami krystalograficznymi umożliwiło poparcie przez habilitantkę hipotezy polarnego mechanizmu nukleofilowego. Przeprowadzanie jednak reakcji w deuterowanej wodzie niesie ze sobą nie tylko informacje na temat procesów zachodzących w centrum aktywnym. Deuterowane całego enzymu wpływa przecież na jego strukturę i stabilność wszystkich wiązań wodorowych w białku jak również  $pK_a$  wszystkich grup kwasowo-zasadowych. Aspekt ten i potencjalny wpływ na obserwowane zjawiska nie został poruszony w publikacjach cyklu ani w samej dysertacji a stanowi przecież podręcznikową komplikację solwentowego efektu izotopowego (D. L. Purich, Enzyme Kinetics, Catalysis & Control, Elsevier, sekcja 9.6.8, ISBN: 978-0-12-380924-7).

Mam wątpliwości również czy „wyższe wartości KIE dla  $V_{max}$  niż  $V_{max}/K_m$  wskazują na możliwość zachodzenia zmian konformacyjnych w centrum aktywnym enzymu” podczas wiązania substratu. W





mojej ocenie obserwowany fenomen świadczyć może o odmiennej tendencji stabilizacji podstawionych izotopowo substratów w centrum aktywnym niż w poprzednich analizach prowadzonych przez habilitantkę (tutaj  $\Delta G_B$  substratu deuterowanego jest niższe niż dla izotopologu protowego co skutkuje niższym  $K_m$  dla cięższego związku np. dla 3'-F-[(1R)-<sup>2</sup>H]-TA 45  $\mu$ M względem 60  $\mu$ M dla 3'-F-[(1R)-<sup>1</sup>H]-TA). Zresztą po wzięciu pod uwagę prawdziwych błędów wyznaczenia KIE (11% dla  $V_{max}$  i 32% dla  $V/K$ ) istotność różnicy dwóch tych wartości jest dyskusyjna. **Ponownie więc analiza samych efektów izotopowych wydaje się niewystarczająca dla zrozumienia obserwowanego zjawiska i wymagałaby podparcia innymi technikami badawczymi, w szczególności połączenia eksperymentu izotopowego oraz obliczeń teoretycznych testujących dany mechanizm i przewidujących efekt izotopowy.**

Ostatnia część dysertacji skupia się na określeniu mechanizmu oraz siły inhibicji oksydazy L-aminokwasowej oraz MAO A. Pomijając już omawiane wcześniej techniczne problemy analizy wyników kinetycznych to właśnie w tej części habilitantka formułuje wnioski mające bezpośrednie zastosowanie dla dyscypliny nauk farmaceutycznych. Habilitantka wskazała wolniejszą kinetykę utleniania halogenopochodnych tyraminy co może prowadzić do ich potencjalnej akumulacji w organizmie. Drugim wnioskiem było połączenie inhibicyjnego efektu  $\alpha$ -metylo-L-tyrozyny na LAO oraz potencjalnego zahamowania zdolności komórek systemu odpornościowego do produkcji nadtlenu wodoru. **Hipotezy te są niewątpliwie ciekawe i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań na układach modelowych (czy to komórkowych czy zwierzęcych).**

### Podsumowanie

Wniosek dr Małgorzaty Pająk w postępowaniu habilitacyjnym został złożony wraz z kompletem wymaganych dokumentów. W mojej ocenie dorobek habilitantki oraz przedstawiony przez niego cykl prac opisujący osiągnięcie w zakresie „**Syntezy znakowanej L-tyrozyny i jej pochodnych oraz badań ich enzymatycznych przemian metodami kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych**” spełnia w minimalnym stopniu wymagania stawiane habilitantom. Analiza osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego i zawodowego oraz materiałów zawartych w rozprawie, pozwala stwierdzić, że habilitantka spełnia formalne warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm., rozdział 3, art. 219.1) upoważniająca do starania się o stopień naukowy doktora habilitowanego. W związku z powyższym, pomimo zastrzeżeń przedstawionych w recenzji, **popieram** wniosek o nadanie stopnia doktora habilitowanego dla dr Małgorzacie Pająk w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych.

prof. dr hab. Maciej Szaleniec