

Praga, 30 września 2020

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Karoliny Mitusińskiej

zatytułowanej: „**Implications of loop reconstruction model on protein functionality / Analiza skutków wyboru modelu zrekonstruowanej pętli na funkcjonalność białka**”

Recenzja przygotowana została na zlecenie Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej, prof. dr. hab. inż. Doroty Neugebauer, z dnia 8 lipca 2020 r. Opiniowana praca doktorska powstała pod opieką naukową dra hab. Artura Góry.

1. Tematyka, cel i zakres rozprawy.

Recenzowana rozprawa obejmuje badania struktury przestrzennej białek z wykorzystaniem nowoczesnych metod teoretycznych i obliczeniowych. W szczególności, Doktorantka zajmowała się opracowaniem i testowaniem metod umożliwiających charakteryzację i klasyfikację różnego rodzaju pętli. Druga grupa zagadnień poruszanych w pracy związana jest z analizą przestrzeni, wnęk i kanałów obecnych w strukturze białek.

Pętle, obecne w znacznej liczbie białek, stanowią duże wyzwanie przy eksperymentalnym i teoretycznym określaniu struktury protein. Związane to jest z ich względnie niską stabilnością geometryczną. Dlatego też wiele rozwiązanych obecnie struktur białkowych charakteryzuje się niepełną informacją przestrzenną w obszarach zajmowanych przez pętle. Z drugiej strony, udowodnionym jest, że w wielu przypadkach pętle mają istotny wpływ na funkcję protein. W literaturze zapostulowano, że wpływ pętli na funkcję silnie zależy od dynamiki pętli. Z tego względu wyróżnia się dwie klasy pętli: statyczne i dynamiczne. W ramach swojej dysertacji, Doktorantka podjęła się opracowania metody charakteryzacji pętli białkowych

wykorzystującej informacje geometryczne, bez potrzeby użycia stosunkowo kosztownej metody symulacji dynamiki molekularnej.

Funkcja wielu białek uzależniona jest od obecności w ich strukturze przestrzennej różnego rodzaju wnęk i kanałów o specyficznej budowie, organizacji i dynamice. Mogą one kontrolować na przykład poziom solwatacji, transport reagentów do centrum aktywnego, czy też przebieg reakcji na centrach enzymatycznych. Z uwagi na ich dynamiczny charakter, obiekty te tylko do pewnego stopnia można scharakteryzować na podstawie statycznej informacji o strukturalnej budowie białka. Dodatkową komplikacją jest fakt, że wpływ kanałów czy wnęk na interakcje białek z innymi cząsteczkami zależy od własności tych cząsteczek, a nie tylko od własności samego białka. Biorąc powyższe pod uwagę, doktorantka zaangażowała się w rozwój metody analizy funkcjonalności białek polegającej na śledzeniu zachowania małych cząsteczek wewnątrz struktury białka. Cząsteczki te mogą mieć różny charakter (solwent – woda, ligandy, jony), a ich zachowanie analizowane jest na podstawie trajektorii symulacji dynamiki molekularnej. W ramach recenzowanej pracy, Doktorantka zastosowała rozwiniętą przez siebie metodę śledzenia ligandów do analizy funkcjonalności kilku istotnych enzymów z głęboko położonymi centrami aktywnymi.

Należy podkreślić, że w swoich badaniach Doktorantka z sukcesem opanowała i wykorzystywała szeroki wachlarz nowoczesnych metod obliczeniowych i symulacyjnych wykorzystywanych w dziedzinie chemii, biologii, biofizyki oraz bioinformatyki. Obejmują one przede wszystkim szereg metod przewidywania i modelowania struktury białek oraz metody symulacji komputerowych klasycznej dynamiki molekularnej. Uwadze recenzenta nie umknęło również, że w ramach swojej pracy Doktorantka z sukcesem wykorzystywała różnorakie narzędzia informatyczne, programistyczne i zaawansowane oprogramowanie do modelowania molekularnego.

Szczególnie mocną stroną dysertacji jest fakt, że oparta jest ona o 8 artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych ze znaczącym wskaźnikiem cytowań. W czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Jedna z prac jest artykułem przeglądowym, ściśle związanym z tematem rozprawy. Na uwagę zasługuje również opublikowany zaledwie przed 5 miesiącami artykuł dotyczący głównej proteazy wirusa SARS-CoV-2, który od daty publikacji cytowany był już 17 razy (wg Google Scholar), w większości w znaczących periodykach.

2. Omówienie i ocena zawartości rozprawy.

Tekst dysertacji otwiera rozdział z wprowadzeniem obejmujący krótki opis pętli i ich roli w strukturach protein. Zawiera on też zwięzłe podsumowanie metod doświadczalnych używanych w strukturalnych badaniach białek. Co istotne, Autorka zwięzłe, lecz celnie opisuje tutaj słabe strony modelowania homologicznego w stosunku do przewidywania struktur pętli. Związane jest to z faktem, że w opublikowanych modelach występuje nadreprezentacja pętli stabilnych w stosunku do pętli mniej stabilnych, co z kolei wpływać może negatywnie na interpretację funkcji pełnionej przez nie w białkach.

Nowa metody klasyfikacji pętli, będąca jednym z osiągnięć doktoratu, dostarcza skutecznego narzędzia do rozwiązania tego problemu.

Kolejny, stosunkowo obszerny, podrozdział pracy szczegółowo opisuje różne metody przewidywania struktury białek. Obejmuje on zarówno metody modelowania homologicznego i modelowania de novo, jak i metody dynamiki molekularnej. Opisane zostały w nim teoretyczne podstawy poszczególnych technik wraz z podaniem praktycznych metod ich implementacji w poszczególnych pakietach oprogramowania. W kolejnej części wprowadzenia, Doktorantka przechodzi do opisu struktury i funkcji hydrolaz epoksydowych. W jasny i przejrzysty sposób zostały opisane historyczne informacje dotyczące odkrycia i badania hydrolaz oraz zaprezentowane są podstawowe informacje o strukturze tych enzymów. Informacje te uszczegółowione są w kolejnym podrozdziale, dotyczącym strukturalnej analizy hydrolaz epoksydowych. Rozdział z wprowadzeniem zamyka część dotycząca modelowania homologicznego hydrolaz. Jak słusznie zauważa Doktorantka, hydrolazy stanowią świetny przykład enzymów, w których istotne znaczenie dla funkcjonalności mają zarówno pętle, jak i obecność wnęk i kanałów. Stad też, słusznie, hydrolazy stanowiły jedną z grup enzymów badanych w ramach rozprawy.

Kolejny rozdział pracy przedstawia główne cele Doktorantki, zwięźle i przejrzysto łącząc je z poszczególnymi publikacjami, które stanowiły podstawę rozprawy. Następuje po nim obszerny rozdział zawierający opis wyników badań i ich dyskusję. Opis ten oparty jest na poszczególnych publikacjach Doktorantki. Otwierają go wyniki dotyczące charakteryzacji pętli. Opisany został zarys metody identyfikacji pętli oraz przykład zastosowania opracowanego przez Autorkę oprogramowania do hydrolazy epoksydowej u *Aspergillus niger*. Kolejna część rozdziału z wynikami zajmuje opis wykorzystania opracowanej przez Doktorantkę metody analizy wnęk i kanałów białkowych do badania funkcjonalności czterech enzymów: świńskiej i ludzkiej oksydazy D-aminokwasów, izomerazy fosfoglukozy *Pyrococcus furiosus*, hydrolazy epoksydowej ziemniaka i głównej proteazy wirusa SARS-CoV-2. Wyniki i dyskusja zaprezentowane zostały w bardzo przejrzystej i jasnej dla czytelnika formie i, co uważam za zaletę, bez zbędnych szczegółów. We wszystkich przypadkach, wprowadzone przez Doktorantkę metody analizy struktury dostarczyły nowych i wartościowych informacji dotyczących działania badanych enzymów. Co istotne, Doktorantka pokazała, że jej metody mają również zdolność predykcji, na przykład w kwestii wpływu mutacji na dostępność centrum aktywnego dla cząsteczek wody, czy też wpływu struktury niektórych badanych pętli na hydratację w ich najbliższym otoczeniu.

Prace zamyka zwięzły rozdział zawierający podsumowanie i opis planów naukowych Doktorantki. Wydaje się, że tematy naukowe podjęte w ramach studiów doktoranckich Autorka będzie kontynuować w przyszłości, dowodzą tego uzyskane przez nią granty badawcze oraz nawiązana współpraca naukowa.

Dodać należy, że przedstawiona dysertacja ma bardzo bogatą (270 pozycji) i dobrze dobraną część literaturową. Dowodzi to dobrej orientacji Doktorantki w jej dziedzinie badań oraz w dziedzinach pokrewnych. W szczególności dotyczy to rozdziałów o przewidywaniu struktury białek.

3. Ocena redakcji pracy.

Dysertacja, co cenne, napisana została w języku angielskim. Pod względem edytorskim pracę oceniam bardzo wysoko. Napisana jest w sposób jasny, bez znaczących błędów, odpowiednio do poziomu wymaganego od rozprawy doktorskiej. Rysunki bardzo dobrze ilustrują treść. Poprawnie zostały podane informacje dotyczące ich źródeł. Osobiście nie znalazłem błędów typograficznych. W zaledwie trzech miejscach napotkałem problem ze składnią czy stylistyką zdania. Jedynym drobnym problemem jest fakt braku numeracji rozdziałów i podrozdziałów oraz braku numeracji przed poszczególnymi dołączonymi na końcu pracy publikacjami.

4. Dyskusja usterek rozprawy.

Chciałbym zauważyć, że praca nie zawiera żadnych znaczących błędów. Wymienione poniżej, dla porządku, drobne mankamenty nie umniejszają jej wartości.

1. W obszernej części dotyczącej modelowania strukturalnego białek, ułatwieniem dla czytelnika byłoby umieszczenie na przykład blokowego schematu obrazującego sposób postępowania i powiązanie pomiędzy poszczególnymi metodami i etapami rozwiązywania struktury.
2. Pomimo wzmiankowania przez Doktorantkę użycia symulacji metodą dynamiki molekularnej, rozdział dotyczący metod nie zawiera opisu tej, bliskiej sercu recenzenta, techniki.
3. Znaczna część pracy Autorki związana była z tworzeniem, udoskonalaniem i optymalizacją oprogramowania do analizy przestrzennej białek. W związku z tym warto byłoby dodać choćby zwięzły opis zagadnień związanych z zastosowanymi tutaj technikami informatycznym.

5. Tematy do dyskusji

Wymieniam poniżej kilka tematów i uwag, do których Doktorantka może ustosunkować się podczas obrony pracy:

1. Na stronie 13 pada stwierdzenie, że struktura natywna białka odpowiada minimum energii swobodnej, czy zawsze?
2. W tym samym zdaniu Doktorantka podaje, że największa populacja struktur uzyskanych w dynamice molekularnej po ekwilibracji odpowiada minimum energii swobodnej. Kiedy jest to prawdą? Czy zależy to od wybranego w symulacji zespołu statystycznego?
3. Jakie są różnice pomiędzy nierównowagowymi i równowagowymi symulacjami MD? Czy i jak różnice te zostały wykorzystane przez Doktorantkę w jej badaniach?

6. Wniosek końcowy.

W mojej opinii, przedstawiona przez mgr Karolinę Mitusinską dysertacja zatytułowana „Implications of loop reconstruction model on protein functionality / Analiza skutków wyboru modelu zrekonstruowanej pętli na funkcjonalność białka” oparta jest o oryginalny, bogaty i wartościowy dorobek naukowy w dziedzinie nauk chemicznych. Potwierdza to fakt opublikowania 8 artykułów naukowych. Poziom ocenianej rozprawy odpowiada zarówno ustawowym, jak i zwyczajowym, wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk chemicznych. Dysertacja spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku. Dlatego też wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Karoliny Mitusińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wyjątkowo wysoki poziom naukowy poparty dużą liczbą opublikowanych przez Doktorantkę recenzowanych artykułów, wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej rozprawy.



prof. dr hab. Łukasz Ćwiklik