

Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdansk

Gdansk, dnia 10.01.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Magdaleny Ptak-Kaczor

**pt. „Charakter rozkładu oddziaływań niewiązących (elektrostatycznych, vdW)
wobec rozkładu oddziaływań hydrofobowych w strukturach białek.”**

Zrozumienie mechanizmów fałdowania białek jest jednym z najważniejszych zagadnień w biofizyce. Wyjaśnienie jego natury byłoby kluczowe zarówno dla fundamentalnej wiedzy w badaniach nad białkami, jak i dla racjonalnego projektowania i opracowywania *de novo* szerokiego funkcjonalnego spektrum białek o szczególnie pożądanych właściwościach. Zjawisko hydrofobowości, będące głównym zagadnieniem w dziedzinie fałdowania białek, jest często uważane za siłę napędową w tworzeniu struktury natywnej białka. Hydrofobowość i hydrofilowość to właściwości cząsteczek lub ich części dążące odpowiednio do unikania oddziaływań z polarnym rozpuszczalnikiem lub nawiązywania energetycznie korzystnych interakcji. Dlatego, gdy zachodzi proces fałdowania białka, części hydrofobowe, złożone głównie z niepolarnych aminokwasów, starają się zmniejszyć liczbę kontaktów z rozpuszczalnikiem i w związku z tym lokalizują się w wewnętrznej części białka, często określanej jako rdzeń hydrofobowy, podczas gdy części hydrofilowe białka, złożone głównie z polarnych aminokwasów, są dostępne dla rozpuszczalnika. Pomimo ogromnego znaczenia roli hydrofobowości oraz faktu, że w ostatnich dekadach wiele zespołów badawczych zajmowało się zjawiskiem hydrofobowości zarówno doświadczalnie jak i teoretycznie, wciąż wiele pytań pozostaje otwartych, co sprawia, że pełne zrozumienie tego zjawiska jest wciąż odległe.

Praca doktorska Pani mgr Ptak-Kaczor dotyczy obliczeniowej analizy oddziaływań niewiązących, elektrostatycznych i vdW, wobec profilu hydrofobowego w strukturach białek. Praca została wykonana pod nadzorem prof. dr hab. Ireny Roterman-Koniecznej, która jest wiodącym i uznanym

w świecie naukowcem w dziedzinie teorii hydrofobowości i fałdowania białek. Rozprawa powstała na podstawie 5 publikacji: w Acta Biochimica Polonica (IF 2.15, publikacja 1), dwóch w International Journal of Molecular Sciences (IF 5.54, publikacje 2 i 4), jednej w Biomolecules (IF 4.57, publikacja 4) oraz Symmetry (IF 3.11, publikacja 5). W trzech pierwszych publikacjach Kandydatka jest pierwszym autorem, co sugeruje jej dominujący wkład w ich utworzenie. Poza tym Kandydatka jest również autorem w 3 innych publikacjach, nie ujętych w rozprawie. Wszystkie czasopisma, w których są publikowane prace Kandydatki, mają znakomitą renomę w naukach przyrodniczych, szczególnie w dziedzinie biofizyki obliczeniowej. Według bazy SCOPUS (dane na dzień 10.01.2023) publikacje były już cytowane 23 razy w 20 dokumentach, co sugeruje ich wysoką jakość.

Manuskrypt rozprawy ma następującą strukturę: rozpoczyna się krótkim Wprowadzeniem (rozdział 1); następnie w części "Oddziaływania" zawiera w sobie opis oddziaływań molekularnych w procesie fałdowania białka oraz model teoretyczny zastosowany w badaniach (rozdział 2); w "Materiałach i metodach" opisuje metodologię i protokoły zastosowane w pracy (rozdział 3); krótko wymienia wyniki (rozdział 4); i podsumowuje je (rozdział 5). W tekście manuskryptu zamieszczono 11 rycin (4 oryginalne i 7 z publikacji 1) oraz dwie tabele. Po niej następuje część bibliograficzna zawierająca 86 pozycji i kończy się załączonymi oryginalnymi publikacjami, na których opiera się praca. Całość rozprawy została napisana w języku polskim.

W pierwszym rozdziale wprowadzono znaczenie hydrofobowości, krótko opisano samo zjawisko. Następnie zdefiniowano cel pracy: badania mają zamiar wyjaśnić, czy inne rodzaje oddziaływań mogą być również opisane przez model centrycznej koncentracji oddziaływań jak to jest w przypadku oddziaływania hydrofobowego. Następnie uściślono, jakie oddziaływania są przedmiotem rozprawy. Dalej przedstawiono model teoretyczny wraz z opisem, w jaki sposób przeprowadzono obliczenia i jakie układy wykorzystano. Na koniec zamieszczono krótkie podsumowanie. Moim zdaniem struktura tego rozdziału jest częściowo zbędna. Zagadnienie "Doskonała micela sferyczna", które pojawia się już w drugim akapicie nie jest dobrze wyjaśnione. Później, gdy po raz pierwszy wspomniano model rozmytej kropli oliwy (FOD), pojęcie to pojawia się ponownie. Podobnie już w czwartym akapicie podane są szczegóły dotyczące przeprowadzonych obliczeń, po czym dyskusja o znaczeniu porównania rozkładu powtarza się kilka akapitów później.

W drugim rozdziale znajdują się trzy podrozdziały opisujące oddziaływania niewiążące (podrozdział 2.1), oddziaływania hydrofobowe (podrozdział 2.2) oraz oddziaływania

przedstawiające model teoretyczny FOD użyty w pracy (podrozdział 2.3). Pierwsze dwa akapity w podrozdziale 2.1 powinny należeć do rozdziału "Materiały i metody", ponieważ zawierają szczegóły techniczne, a nie odpowiadają tematowi podrozdziału. Ponadto, czasami autorka używa kolejności "elektrostatyka i vdW" (jak również generalnie najpierw przedstawia na rysunkach dane związane z elektrostatyką, a następnie dane związane z vdW), a czasami ta kolejność jest zamieniana. Powoduje to, że tekst jest częściowo niespójny i nieuporządkowany. "Mostki disulfidowe" nie są oddziaływaniami "niewiązującymi" i dlatego nieodpowiednio zostały włączone do tego podrozdziału. W podrozdziale 2.2 zdefiniowane są oddziaływania hydrofobowe. Ponownie, szczegóły techniczne, w których wspomniany jest Gromacs, powinny raczej należeć do sekcji "Materiały i metody". Definicje rozpuszczalnika w modelach jawnym i niejawnym są podane niejasno. Model FOD jest już wspomniany w tym podrozdziale, podczas gdy logicznie pasuje do następnego. W podrozdziale 2.3, pojęcie FOD jest zdefiniowane i wyjaśnione. Ta część jest kluczowa dla zrozumienia całego pomysłu rozprawy. W tym miejscu opisany jest główny parametr wykorzystywany w całym manuskrypcie: jest to RD, który charakteryzuje, jak daleki jest rozkład parametrów oddziaływania obserwowany w danym białku (O) od rozkładów odpowiadających idealnemu rozkładowi Gaussa3D (T) i rozkładowi jednolitemu (R).

Rozdział trzeci poświęcony jest metodom zastosowanym w badaniach zawartych w rozprawie i podzielony jest na dwa podrozdziały oraz poprzedzony tabelą zawierającą białka użyte jako obiekty badań opisanych w rozprawie. Pierwszy z nich (podrozdział 3.1) przedstawia lakonicznie pakiet Gromacs, opisuje oddziaływania elektrostatyczne oraz vdW w polu siłowym Gromacs. Protokół obliczeń opisany jest dalej w podrozdziale 3.2. Nie jest jasne, które "brakujące elementy" są wymienione w kroku 1 protokołu, i który model wody został użyty.

W czwartym rozdziale opisane są wyniki. Wymienienie pakietu Gromacs we wstępie jest raczej zbyt techniczne jak na potrzeby struktury manuskryptu i czyni wypowiedź bardziej protokołową niż ogólną i fundamentalną, a więc devaluje przedstawione wyniki. Podrozdziały tej sekcji poświęcone są konkretnym przykładom białek, dla których przeprowadzono analizę. Racjonalnym powodem takiego doboru białek jest to, że titina (podrozdział 4.1) jest bardzo reprezentatywnym przykładem pasującym do hydrofobowego wzoru idealnej miceli, podczas gdy białka amyloidogenne (podrozdział 4.2) przeciwnie, wykazują wzór niezgadający się z idealną micelą. Wreszcie transferytyna (podrozdział 4.3) jest przypadkiem pomiędzy. Dla wszystkich przeanalizowanych białek niezależnie od ich hydrofobowego wzorca centrycznej koncentracji nie znaleziono podobnych wzorców w zakresie oddziaływań elektrostatycznych czy vdW. Wyniki są jasne i znaczące. Pierwsze stwierdzenie w ostatnim akapicie "Przeprowadzona analiza podkreśla

różnicę między białkami kulistymi a amyloidami" jednak jest użyte w kontekście, który nie jest do końca odpowiedni. Rzeczywiście, białka te różnią się pod względem właściwości hydrofobowych, ale celem badania była odpowiedź na pytanie o oddziaływania niewiążące. Dlatego stwierdzenie to w obecnej formie jest mylące i intuicyjnie kontrowersyjne z głównym wnioskiem rozprawy. Choć oczywiste jest, że wszystkie szczegóły dotyczące prac podsumowanych w punkcie 4 są dostępne w załączonych oryginalnych publikacjach, to nie jest do końca uzasadnione, dlaczego Kandydatka poświęciła dużo miejsca na dane literaturowe dotyczące funkcji biologicznych badanych białek, natomiast przedstawiła stosunkowo mało szczegółów obliczeniowych analizy.

W ostatnim rozdziale następuje podsumowanie wyników. Niestety, ta sekcja moim zdaniem jest najslabsza, ponieważ powtarza dosłownie merytoryczną część tekstu z "Wprowadzenia". Jednocześnie referencje 9 i 10 są wymienione w zupełnie innym kontekście we "Wnioskach" i we "Wprowadzeniu". Czy referencje te zostały użyte odpowiednio?

Głównym osiągnięciem rozprawy jest to, że w ramach tej pracy udało się systematycznie i rygorystycznie wykazać, że optymalizacja ukierunkowana powinna być wdrażana do oddziaływań hydrofobowych, natomiast nieukierunkowana do oddziaływań elektrostatycznych i vdW. Wniosek ten stanowi kolejny krok w rozszyfrowaniu procesu fałdowania. Bez wątplenia dane składające się na rozprawę są cenne ze względu na wkład do fundamentalnej wiedzy w zakresie fałdowania białek i głębszego zrozumienia różnorodnych oddziaływań leżących u podstaw tego procesu.

W czasie lektury rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi merytoryczne:

1. Dlaczego w tekście manuskryptu są przedyskutowane tylko i wyłącznie wyniki publikacji 1?
2. Czy były podjęte próby nie tylko minimizacji struktur, ale też przeprowadzenia dynamiki molekularnej? Wiadomo, że mmpbsa dla tylko jednej konformacji może produkować statystycznie niereprezentacyjne wyniki.
3. Czy spodziewa się Pani mgr różnicy w wynikach, jeżeliby obliczenia zostały przeprowadzone w innym modelu jawnego rozpuszczalnika albo w rozpuszczalniku niejawnym?
4. Jak można zinterpretować brak antykorelacji pomiędzy wynikami dla elektrostatyki i hydrofobowości? Intuicyjnie, oddziaływania elektrostatyczne odpowiadają większej polarności, natomiast hydrofobowość bezpośrednio antykoreluje z polarnością.

Z obowiązku recenzenta muszę również zwrócić uwagę na niektóre drobne błędy i nieścisłości formatu, które zauważyłem w rozprawie. Ogólnie tekst rozprawy wymaga wielu poprawek edytorskich.

- **Rozdział 2.1:** “w których dochodzi do dopasowania”. W tym kontekście to nie jest jasne, co oznacza „dopasowanie”. Użyte dalej słowo „sytuacja” jest raczej słowem potocznym.
- Określenie **wiązania wodorowego** jako “rodzaj oddziaływania elektrostatycznego” nie jest do końca fizycznie poprawne.
- **Rysunek 1:** opisanie rysunku jest niepełne.
- **Rozdział 2.1:** “Zidentyfikowano białka.” używane jako pełne zdanie.
- **Tytuł 2.2** ma inny rozmiar czcionki, niż inne równoznaczne tytuły.
- **Rozdział 2.3:** “I” zamiast “i” w tłumaczeniu wykresu oraz brak kropki na końcu tego zdania.
- **Tabela 1.** Inny sposób podania odnośników niż w tekście. Drugi odnośnik ma inny format niż reszta odnośników w tabeli.
- **Rozdział 3.1:** jednoczesne użycie “Gromacs” i “GROMACS”.
- Brakuje numeru grantu na PLGRID.
- **Rozdział 3.2:** “OPLS-AA/L all atom force field” nie jest zacytowane odpowiednio.
- **Rozdział 3.2** na samym końcu: nie jest wytłumaczone, jak zostały wykonane “Obliczenia średniej energii wiązania”.
- **Rozdział 4:** “obliczone przez Gromacs” jest bardzo potocznym wyrażeniem.
- **Rozdział 4.3:** odnośniki lepiej byłoby podać jako “[70-80]”.
- **Rozdział 5:** “... ewolucyjnie,”. Zdanie zostało zakończone przecinkiem, a nie kropką.
- W **odnośniku 86** brakuje pełnej informacji bibliograficznej, która jest obecnie dostępna.

W manuskrypcie brakuje numeracji stron. Ponadto, moim zdaniem, spis rysunków i tabel na końcu manuskryptu, jak również lista oryginalnych, recenzowanych publikacji, na których opiera się ta rozprawa, mogłyby pomóc czytelnikowi. Również, ponieważ oddziaływania elektrostatyczne i vdW zawsze są porównane z oddziaływaniami hydrofobowymi, uważam, że rozmieszczenie obrazków w kolejności “elektrostatyka”, “hydrofobowość”, “vdW” nie jest logiczne.

Mimo wszystkich wyżej wymienionych krytycznych uwag rozprawę doktorską p. mgr Magdaleny Ptak-Kaczor oceniam bardzo wysoko. Rozprawa zdecydowanie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych. Wszystkie cele naukowe rozprawy zostały zrealizowane. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie p. mgr Magdaleny Ptak-Kaczor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.