



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Kamila Bojarskiego
pt.: *Computational approaches to study protein-glycosaminoglycan systems*

wykonanej pod opieką naukową dr hab. Sergeya Samsonova

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne z dnia 12 VII 2021 r

Glikozaminoglikany stanowią grupę naturalnych sacharydów znajdujących się w organizmach żywych i pełniących tam różnorodne funkcje, w tym pośredniczącą w aktywności enzymów białkowych, regulującą funkcjonalność macierzy zewnątrzkomórkowej, budulcową, i wiele innych. Z uwagi na ich heterogeniczność chemiczną, zmienną długość łańcucha, dużą labilność konformacyjną oraz niejednorodną funkcjonalizację precyzyjne określenie ich roli w procesach zachodzących z ich udziałem jest niezwykle trudne. W celu zidentyfikowania mechanizmów takich procesów, szczegółowego poznania dynamicznej struktury glikozaminoglikanów a także związku między taką strukturą a ich funkcjami w układach biologicznych stosować można zarówno metody eksperymentalne (np. krystalografia rentgenowska, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego), jak i teoretyczne (np. dokowanie ligand-białko, dynamika molekularna). Metody obliczeniowe służące do badania struktury i konformacji biomolekuł, jak również zajmujące się analizą odpowiednich oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych mają ugruntowaną pozycję w dziedzinie nauk chemicznych oraz biochemicznych, zarówno jako odgrywające rolę komplementarną w stosunku do badań eksperymentalnych, jak i niezależne narzędzie badawcze. Z uwagi na możliwość wglądu w badane procesy w rozdzielczości atomowej, metody modelowania molekularnego często oferują wyjaśnienie trudnych do interpretacji danych eksperymentalnych bądź też przewidują właściwości układów, jakie nie zostały zbadane na drodze doświadczalnej. Tego typu problematyce, skoncentrowanej na przypadku glikozaminoglikanów oraz wybranych procesów zachodzących z ich udziałem poświęcona jest recenzowana rozprawa doktorska, napisana przez mgr. Krzysztofa Kamila Bojarskiego.



Przedstawiona do oceny rozprawa skonstruowana jest w formie kompilacji artykułów opublikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na liście filadelfijskiej. Do zestawu artykułów dołączony jest wstęp, w którym autor przedstawił wybrane zagadnienia bezpośrednio związane z tematyką badań, a także skondensowany opis celów oraz rezultatów pracy, podzielony analogicznie do tematyki każdego z artykułów.

Podstawą recenzowanej pracy jest sześć artykułów naukowych, zawierających wyniki badań własnych. Są to artykuły opublikowane w: *Journal of Chemical Information and Modeling* (2 artykuły, IF = 4,956), *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* (1 artykuł, IF = 3,036), *Biopolymers* (1 artykuł, IF = 2,505), *Carbohydrate Polymers* (1 artykuł, IF = 9,381) oraz *Journal of Molecular Structure* (1 artykuł, IF = 3,196). Udział autora w realizacji badań będących podstawą tych prac jest możliwy do określenia dzięki załączonym oświadczeniom, w których w sposób opisowy oraz procentowy zdefiniowano wkład wszystkich współautorów. Z oświadczeń tych wynika, że rola doktoranta w realizacji wszystkich prac będących podstawą doktoratu była znacząca i dotyczyła większości zadań natury obliczeniowej, tj. przeprowadzania symulacji metodą dynamiki molekularnej i analizowania ich wyników, jak również wkładu w pisanie manuskryptów publikacji. Wyrażone procentowo wkłady wahają się od 20 do 70%, przy czym niższe wartości odpowiadają publikacjom wieloautorskim, łączącym badania eksperymentalne z teoretycznymi. Miejsce doktoranta na liście autorów w ww. artykułach, które jest pierwsze (4 artykuły, 1 artykuł z adnotacją o równych wkładach z drugim autorem) lub trzecie (2 artykuły, 1 artykuł z adnotacją o równych wkładach z drugim autorem) koresponduje z deklarowanym wkładem.

Tematem wiążącym wszystkie prace jest teoretyczne badanie glikozaminoglikanów głównie w kontekście ich oddziaływań z białkami, będącymi ich naturalnymi celami molekularnymi. Cele zdefiniowane we wstępie przez Autora rozprawy dotyczą kilku głównych aspektów. Pierwszy obejmuje wpływ glikozaminoglikanów na aktywność enzymatyczną białek z rodziny katepsyn. Drugi dotyczy konformacji fosforylowanych pochodnych glikozaminoglikanów oraz mechanizmów ich oddziaływania z białkami. Trzeci jest związany z problematyką długości symulacji układów zawierających glikozaminoglikany i jej wpływem na otrzymane wyniki. W końcu czwartym zagadnieniem jest analiza orientacji związanego łańcucha glikozaminoglikanu jako czynnika wpływającego na charakter jego oddziaływania z białkami.

Dołączony do zestawu publikacji wstęp jest dość krótki, lecz wystarczający do pokazania, że Autor rozprawy dobrze porusza się w tematyce prowadzonych przez siebie badań oraz pokrewnych zagadnień blisko związanych z tematyką glikozaminoglikanów. Treść wstępu



podzielono na kilka sekcji, dotyczących m.in. charakterystyki glikozaminoglikanów, ich roli w układach biologicznych, w szczególności w tych zawierających białka z rodziny katepsyn, metod eksperymentalnych oraz teoretycznych, jakie mogą zostać użyte do badania struktury glikozaminoglikanów, oraz natury ich oddziaływań z innymi biomolekułami. Całość każdej z tych sekcji stanowi spójny ciąg, w którym Autor wprowadza czytelnika w zagadnienia istotne dla opisanych później badań. Należy tu zaznaczyć, że wstęp w dużej części oparty jest na informacjach zawartych w najnowszych pracach z dziedziny glikozaminoglikanów, co potwierdza dobrą orientację doktoranta w tej dziedzinie. Następnie precyzowane są cele badawcze, a na końcu prezentowane (w sposób skondensowany w porównaniu do oryginalnych artykułów naukowych) wybrane wyniki uzyskane w toku badań. Prezentację wyników podzielono w analogii do artykułów, w których się one oryginalnie ukazały.

Poniżej omawiam badania i ich wyniki, zawarte w pracach będących podstawą rozprawy. Omówienie to jest bardzo pobieżnie z uwagi m.in. na to, że prace wchodzące w skład rozprawy były już recenzowane. Co więcej, z racji faktu, iż niektóre prace dotyczą badań multidyscyplinarnych, skupiam się na elementach dotyczących bezpośrednio recenzowanej rozprawy.

- Praca D1 dotyczy wpływu sulfonowanej chondroityny na aktywność enzymatyczną ludzkiej i szczurzej katepsyny K. Różnice w obserwowanych aktywnościach dość podobnych strukturalnie i sekwencyjnie białek została zinterpretowana przy użyciu metod modelowania molekularnego (dokowanie i dynamika molekularna) jako skutek odmiennego sposobu wiązania łańcucha sulfonowanej chondroityny.
- Praca D2 skupia się na mechanizmach oddziaływania łańcuchów różnych glikozaminoglikanów z cząsteczką prokatepsyny B i ich skutkach. Wykazano m.in., że różne glikozaminoglikany wykazują znaczące powinowactwo do prokatepsyny B oraz zaproponowano mechanizm wyjaśniający w jaki sposób glikozaminoglikany mogą wpływać na transformację protokatepsyny do katepsyny (stabilizacja wybranych orientacji cząsteczki propeptydu).
- W pracy D3 badano w jaki sposób sulfonowany heparan wpływa na funkcję katepsyny V. Pokazano, że wiązanie heparanu do cząsteczki katepsyny V może wpływać na inhibicję zdolności enzymatycznych tego białka. Ponadto, wskazano kluczowy aminokwas (Leu20), wpływający na ten efekt.



- o Praca D4 obejmuje badanie właściwości fosforylowanych analogów naturalnych glikozaminoglikanów w kontekście zarówno ich konformacji, jak i oddziaływania z typowymi celami molekularnymi glikozaminoglikanów (katepsyna K, czynniki wzrostu fibroblastów 1 i 2). Stwierdzono znaczące powinowactwo takich związków do badanych białek, co czyni je obiecującymi kandydatami w perspektywie dalszych badań farmakologicznych lub farmaceutycznych.
- o Praca D5 dotyczy wpływu skali czasowej symulacji układu glikozaminoglikan-białko (na przykładzie kompleksu heparyna-FGF-1) na otrzymane wyniki. Badając konformacje zarówno kompleksu, jak i glikozaminoglikanu, stwierdzono znaczący wpływ długości symulacji na finalne wartości średnie wybranych parametrów strukturalnych oraz energetycznych. Uzyskano również szereg wyników charakteryzujących dynamikę kompleksu heparyna-FGF-1.
- o Praca D6 obejmuje badania wpływu alternatywnych orientacji łańcucha glikozaminoglikanu w miejscu wiążącym białka (tu: FGF-1 i FGF-2) na stabilność takiego kompleksu oraz charakterystykę towarzyszących mu oddziaływań. Oprócz potwierdzenia znaczących stabilności takich kompleksów określono również możliwe ścieżki reorientacji glikozaminoglikanu w miejscu wiążącym.

Wyniki zawarte w ww. pracach oceniam jako wartościowe i wnoszące istotny wkład w dziedzinę modelowania glikozaminoglikanów oraz układów biologicznych je zawierających. Prace D1-D3 skupiające się na problematyce związanej z istotnymi biologicznie układami katepsyn, interpretują w skali molekularnej mechanizmy zachodzących z ich udziałem procesów. Praca D4 dostarcza szeregu informacji dot. zachowania się nowej klasy związków (funkcjonalizowanych analogów glikozaminoglikanów), mogących odgrywać istotną rolę zarówno jako terapeutyki, jak i narzędzia do lepszego poznania funkcji glikozaminoglikanów i ich celów molekularnych. W końcu, prace D5 i D6 mają potencjał do wyznaczenia nowych trendów w symulowaniu kompleksów glikozaminoglikan-białko, ilustrując wyraźnie złożoność procesów wpływających na funkcję takich układów oraz dużą skalę czasową, konieczną do zauważenia kluczowych aspektów odpowiednich oddziaływań. Porównując otrzymane wyniki z założonymi zamysłami, uważam, że cele badawcze deklarowane przez Doktoranta we wstępie zostały w pełni zrealizowane.

Chociaż prace składające się na rozprawę doktorską oraz wyniki w nich zawarte były już uprzednio recenzowane, szczegółowa analiza rozprawy, wliczając w to dołączony wstęp, ujawniła kilka niewielkich niedociągnięć, które przedstawiam poniżej:



- Zarówno we wstępie, jak i w pracach wchodzących w skład rozprawy nie znalazło się miejsce dla szerszego i krytycznego spojrzenia na ograniczenia związane ze stosowaniem danej klasy modeli, leżących u podstawy większości uzyskanych wyników. Konkretnie, chodzi tu o potencjalne niedokładności pól siłowych używanych w symulacjach. O ile wybór pola siłowego GLYCAM/AMBER oraz towarzyszącą symulacjom metodologię oceniam jako w pełni poprawne, należy wyraźnie zaznaczyć, że każde pole siłowe ma granice swojej stosowalności, które czasami pozostają dość słabo określone. W kontekście zarówno równowagi konformacyjnej pierścieni piranozowych, jak i oddziaływania węglowodan-białko brak jest konsensusu, jeśli chodzi o przewidywania najnowszych edycji biomolekularnych pól siłowych (CHARMM, GROMOS, GLYCAM/AMBER). Oba te zagadnienia są szeroko reprezentowane w pracy, stąd też krytyczne uwagi nt. możliwych niedokładności wynikających z parametrów samego pola siłowego, tudzież porównanie z przewidywaniami innych pól siłowych byłyby mile widziane.
- Zastanawia także znikoma ilość metod symulacyjnych wykraczających poza standardowe próbkowanie. Metody *enhanced-sampling* są stosowane w szerszym zakresie jedynie w przypadku prac D5 i D6. Choć skala symulacji (zazwyczaj mikrosekundy) i problematyczny wybór współrzędnych w większości przypadków dobrze uzasadnia rezygnację z tego typu podejścia, niektóre analizowane problemy (w szczególności wpływ długości symulacji na zbieżność wyników; praca D5) wydają się naturalnie związane z odniesieniem do wyników symulacji o wiele szybciej zbieżnych (tj. *enhanced-sampling*).
- W odniesieniu do poprzedniego punktu, jako przykład można podać zbieżność wyników dot. konformacji pierścienia IdoA i IdoA2S (Tab. 5 w pracy D5), gdzie otrzymane populacje konformerów zależą ilościowo od konformacji startowej.
- Choć wstęp do zestawu prac został napisany starannie, Autor nie ustrzegł się niewielkich błędów natury gramatycznej, typograficznej czy edytorskiej lub też niejasnych sformułowań. Przykładowo:
 - w Rys. 2: nieprawidłowo przypisany typ wiązania dla dermatanu (β zamiast α);
 - nieprawidłowy ładunek dla dimeru hialuronianu (Tab. 1) a ładunki dla DS i KS oparte są na tylko jednym typie funkcjonalizacji;
 - błędny wzór nr (2) we wstępie, a dotyczący obliczeń energii swobodnej metodą perturbacyjną;



- część celów badawczych zamieszczonych na stronie 41 jest sformułowana w sposób dość nieprecyzyjny (np.: pkt. 1: skala czasowa symulacji nie wpływa na przestrzeń konformacyjną jako taką, lecz co najwyżej na jej próbkowanie, natomiast w pkt. 2 nie zaznaczono, że chodzi o orientację już związanego glikozaminoglikanu) i stają się w pełni zrozumiałe dopiero po przeczytaniu odpowiednich prac.

Z drugiej strony, liczba takich błędów i/lub niejasności jest niewielka i nie stanowi większej przeszkody w zrozumieniu treści wyводу.

- o Dodatkowo, niezależnie od powyższych uwag nasuwa się ogólne pytanie w odniesieniu do możliwości zastosowania potencjałów typu *coarse-grained* do badania analogicznych układów typu glikozaminoglikan-białko na drodze symulacji metodą dynamiki molekularnej. Takie podejście wydawałoby się właściwe z uwagi na bardzo dużą skalę czasową obserwowanych procesów i, być może, perspektywiczne w identyfikacji alternatywnych miejsc wiążących.

Oprócz dyskutowanej powyżej rozprawy doktorskiej oraz wyników w niej zawartych należy także docenić dużą aktywność Doktoranta na innych polach związanych z nauką. W szczególności chodzi tu o ponadprzeciętną aktywność konferencyjną (12 prezentacji konferencyjnych, w tym 7 wystąpień ustnych) oraz udział w dwóch krótkich stażach w zagranicznych jednostkach naukowych. Autor rozprawy wykazuje również duże zaangażowanie w realizowaniu projektów badawczych (udział w 5 projektach, z czego w 3 jako kierownik). W końcu warto zaznaczyć, że pełny dorobek naukowy oprócz 6 prac wchodzących w skład rozprawy obejmuje 4 dalsze artykuły, opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej oraz 1 artykuł o zasięgu krajowym.

Oceniając wysoko poziom badań naukowych będących podstawą recenzowanej rozprawy, w podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona przez doktoranta praca doktorska spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r (wraz z późniejszymi zmianami). Dlatego też wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Krzysztofa Kamila Bojarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod szereg czynników pozytywnie wyróżniających pracę naukową oraz aktywność Doktoranta, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Uzasadniam to przede wszystkim ponadprzeciętnym dorobkiem naukowym (współautorstwo 11 artykułów naukowych) wnoszącym istotny wkład do tematyki modelowania glikozaminoglikanów oraz dużą aktywnością naukową (funkcje kierownika w projektach badawczych oraz udział w stażach zagranicznych).



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Z poważaniem,

prof. dr hab. Wojciech Płaziński

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351