



Prof. dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Biomedycznej UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 22 września 2022 r

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zięby zatytułowanej
„Badanie oddziaływań hydrofobowych i lokalnych w modelowych układach
oraz białkach”

Rozprawa doktorska zredagowana przez mgr Karolinę Ziębę pod tytułem „Badanie oddziaływań hydrofobowych i lokalnych w modelowych układach oraz białkach” przedłożona została mi do oceny w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 11 maja 2022 roku.

Rozwojowi metod eksperymentalnych stosowanych w biologii strukturalnej od niemal samego początku towarzyszy rozwój metod modelowania i predykcji struktury biomakromolekuł. Pomimo, że metody eksperymentalne, takie jak biokrytalografia czy kriomikroskopia elektronowa pojedynczych cząsteczek święcą tryumfy i pozwalają na szybkie zbadanie struktury białek i ich kompleksów, to niestety limitowane są dostępnością próbki i jej cechami charakterystycznymi (zdolność do krystalizacji, masa cząsteczkowa, obecność fragmentów elastycznych itp.). Przełomem w ostatnim okresie w biologii strukturalnej było wprowadzenie opartego na sztucznej inteligencji oprogramowania AlphaFold. Postępujący rozwój metod obliczeniowych pozwala z coraz lepszą precyzją przewidywać i modelować struktury białek. Metody są ciągle udoskonalane i możliwe jest już sięgnięcie po struktury molekuł, które do tej pory były trudno dostępne, jak białka membranowe czy duże kompleksy. Jednakże układy te nadal stanowią wyzwanie, przykładowo modelowanie struktury wspomnianych już białek membranowych w środowisku hydrofobowym, jakimi są matryce lipidowe jest nadal złożone. Dlatego wszystkie działania związane z rozbudową warsztatu do modelowania, pozwalające na rozwiązanie tych problemów są bardzo wartościowe i oczekiwane.

W ten istotny dla rozwoju biologii strukturalnej nurt badań doskonale wpisuje się praca doktorska mgr Karoliny Zięby. Dysertacja ta została przygotowana w Zakładzie w Pracowni Symulacji Polimerów, Katedry Chemii Teoretycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu

1

Gdańskiego pod opieką promotorską prof. dr. hab. Cezarego Czaplewskiego, wybitnego specjalisty z obszaru modelowania i predykcji struktur białkowych oraz dr Magdaleny Ślusarz, która również legitymuje się bogatym doświadczeniem w obszarze metod modelowania w biologii strukturalnej.

Rozprawa doktorska zredagowana została przez Panią mgr Karolinę Ziębę w postaci maszynopisu liczącego 126 stron i opatrzonego czterema załącznikami. Autorka podzieliła pracę na jedenaście części. Właściwą część pracy poprzedzają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów (rozdział 3) oraz wykaz użytego przez Autorkę oprogramowania i serwerów obliczeniowych.

W rozdziale czwartym Pani Karolina Zięba zdefiniowała główne cele pracy doktorskiej. Jako pierwszy cel, Doktorantka postawiła sobie zbadanie dwóch głównych typów oddziaływań (lokalnych i hydrofobowych) w białkach przy użyciu gruboziarnistego pola siłowego UNRES. Z racji tego, że pole to dedykowane do badań białek w roztworach wodnych, w badaniach zaplanowano rozszerzenie go na środowisko lipidowe.

Kolejnym celem badań było rozszerzenie zdolności predykcyjnych pola UNRES poprzez jego sparametryzowanie z udziałem podziału reszt aminokwasowych w białkach na 5 grup.

Następnie jako cel dalszych prac badawczych postawiła sobie zbadanie hydratacji i oddziaływań hydrofobowych na prostych modelach wykorzystując podejście pełnoatomowe.

Po zdefiniowaniu celu pracy mgr Zięba przybliżyła aspekty teoretyczne i metodyczne swojej pracy w rozdziale piątym, liczącym 46 stron i podzielonym na 9 podrozdziałów. Na wstępie skupiła się na zwięzłym omówieniu struktury hierarchicznej białek oraz zdefiniowała stosowane w badaniach strukturalnych miary podobieństwa białek. Przybliżyła także oddziaływania stabilizujące strukturę białek, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań hydrofobowych. Ten rodzaj oddziaływań wewnątrz i międzymolekularnych jest, obok oddziaływań lokalnych, jednym z kluczowych czynników wpływających na stabilizację struktury biomakrocząsteczek. W dalszej części tego rozdziału mgr Zięba omówiła główne metody obliczeniowe stosowane w symulacji struktury białek. Pomimo zwięzłej prezentacji warsztatu metodologicznego, został on zaprezentowany bardzo precyzyjnie. Na podkreślenie zasługuje zwarty i bardzo dobrze przygotowany opis gruboziarnistego pola siłowego UNRES. W rozdziale tym zawarła również omówienie metod obliczania energii swobodnej układu oraz metodologię teoretycznego przewidywania struktur białek, ze szczególnym uwzględnieniem modelowania homologicznego z wykorzystaniem pola siłowego UNRES.

W rozdziale szóstym liczącym 51 stron, Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki badań. Rozdział ten podzielony został na pięć podrozdziałów, gdzie pierwszy dotyczą badań hydratacji hydrofobowej, a w szczególności obejmuje charakterystykę termodynamiki hydrofobowej modelowego układu - pojedynczego atomu Xe oraz procesu asocjacji dwóch

atomów Xe w temperaturach od 273 do 373 K. Przeanalizowana została struktura wody w pierwszej i drugiej strefie solwatacyjnej jednego lub dwóch atomów Xe dla trzech wykorzystanych w badaniach modeli wody. Wyniki te opublikowane zostały w pracy Zięba i inni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2020) **22**, 4758-4771 (załącznik nr 1). W kolejnej sekcji Autorka przedstawiła wyniki badań własnych – symulacji MD dla hydratacji niepolarnej rosnącej cząstki i obliczeń parametrów termodynamicznych procesu hydratacji oraz analizę zmian struktury wody w pierwszej strefie solwatacyjnej badanej cząstki. Kolejne badania mgr Zięby zaprezentowane w rozdziale szóstym dotyczyły rozszerzenia zakresu funkcjonalności gruboziarnistego pola siłowego UNRES do symulacji białek membranowych na środowisko dwuwarstwy lipidowej. W szczególności zakres badań Doktorantki obejmował analizę i interpretację wyników symulacji wybranych białek membranowych w środowisku wodnym, fazie lipidowej i dwuwarstwie symulowanych z wykorzystaniem pola UNRES. Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy Zięba i inni, *J. Phys. Chem. B* (2019), **123**, 7829-7839, stanowiącą załącznik nr 2. Kolejny zaprezentowany obszar badań (rozdział 6.4) obejmował rozbudowanie parametryzacji pola UNRES (wersja NEWCT-9P) do pięciu typów lokalnych reszt aminokwasowych. Ostatnia część prezentacji wyników obejmuje wyniki predykcji struktur białkowych przy użyciu pola UNRES w ramach 13-go eksperymentu predykcyjnego CASP prowadzonego przez grupę KIAS-Gdańsk. Wyniki tych badań, których współautorką jest również mgr Zięba opublikowane zostały w pracy Kaczyńska i inni, *J. Chem. Inf. Model.* (2020), **60**, 1844-1864 (załącznik nr 3). Warto dodać, że z punktu widzenia recenzenta, doceniam rzetelnie podane w tym rozdziale informacje dotyczące zaangażowania Doktorantki w poszczególnych obszarach badań w ramach projektów wieloautorskich, w których brała udział.

W rozdziale siódmym Autorka podsumowała wyniki swoich badań i wysunęła wnioski z nich wynikające. Kolejne dwa rozdziały zawierają listę publikacji stanowiących załączniki do pracy oraz listę pozostałych publikacji autorstwa mgr Zięby. Praca opatrzona została też wykazem rysunków zamieszczonych w dysertacji oraz liczącym 161 pozycji wykazem zacytowanej w pracy literatury.

Przechodząc do oceny ogólnej rozprawy doktorskiej, w mojej ocenie mgr Karolinie Ziębie z powodzeniem udało się zrealizować przedstawione na wstępie cele pracy. Za najważniejsze osiągnięcia pracy pozwalam sobie subiektywnie wytypować trzy obszary prezentowanych badań.

- Charakterystykę hydratacji w różnych modelach wody dla niepolarnych cząstek (Xe) Lenarda-Jonesa oraz pseudotwardych kul Mie-Xe.
- Rozbudowę pola siłowego UNRES na środowisko lipidowe, co rozszerzyło możliwości predykcyjne na białka membranowe. Pozwala ono na realistyczne odtwarzanie struktur białek zanurzonych w matrycy lipidowej.

- Rozszerzenie z trzech do pięciu lokalnych typów reszt w parametryzacji pola siłowego UNRES, co skutkuje polepszeniem zdolności predykcyjnych struktur białkowych w środowisku wodnym. Co prawda Autorka wspomina, że procedura ta nieco gorzej sprawdzała się w białkach o strukturze all-beta, nie umniejsza to jednak potencjalnych zastosowań tej modyfikacji.

Rola recenzenta narzuca również krytyczne ustosunkowanie się do napotkanych podczas lektury pracy błędów i niedociągnięć. W pracy Pani Zięby nie znalazłem ich wiele, jednak kilka z nich chciałbym przytoczyć.

- Rysunek 3 (strona 12) podpisany został jako „przykładowe reprezentacje struktur białek o różnym stopniu rzędowości”. Bardziej zręczne byłoby raczej określenie struktura hierarchiczna białek. Na tym samym rysunku zamieszczone zostały między innymi ilustracje motywów strukturalnych (motywów struktury drugorzędowej). Jednym z nich jest motyw klucza greckiego, jednak w tym przypadku zilustrowany został strukturą β -baryłki (możliwe, że zawierającej też motyw klucza greckiego) co w przypadku motywów nie jest w pełni poprawne.
- Z kolei na stronie 13 w opisie struktury drugorzędowej wymieniając struktury helikalne pojawia się helisa 3_610 , co raczej należy uznać za pomyłkę edytorską, prawdopodobnie Autorce chodziło o helisę 3_{10} .
- Opisy osi na rysunkach 26-29 (strona 66) są zdecydowanie zbyt małe. Pomimo, że wydruk wydaje się dość wyraźny to małe litery i cyfry są trudne do odczytania dla czytelnika. Zwiększenie rozmiaru czcionki o 2 punkty zdecydowanie poprawiłoby czytelność tych diagramów.
- W rozdziale szóstym, strona 87 na rysunku 43 prezentującym zmiany wartości energii całkowitej układu dla współczynnika skalowania fazy lipidowej widoczny jest wyraźny skok energii dla współczynnika skalowania $s_L=2$ w funkcji czasu. Autorka krótko skomentowała tą zmianę jako efekt zmian konformacyjnych danego białka. Może warto byłoby nieco szerzej opisać jaki charakter miały te zmiany.
- W ramach omówienia kalibracji i walidacji pola UNRES przedstawione zostały w tabelach 1 i 2 na stronie 93 przypisania reszt aminokwasowych do uproszczonego alfabetu złożonego z trzech lub pięciu grup. Dla czytelnika pomocnym byłoby przedstawienie uzasadnienia sposobu podziału grupy drugiej z Tab. 1 na trzy niezależne grupy aminokwasów (grupy 2-4 z Tab. 2).
- Na stronie 100 w omówieniu wyników pojawia się informacja, że w przypadku badanych białek raczej niewielką poprawę zdolności predykcyjnych pola UNRES zaobserwowano dopiero w piątej iteracji. Nieco szerszy komentarz możliwych przyczyn obok tylko suchego omówienia wyników byłby interesujący dla czytelnika.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że rozprawa zredagowana została przez mgr Ziębę bardzo starannie. W tekście znalazłem jedynie nieliczne drobne błędy edytorskie (tzw. literówki). Podział pracy jest bardzo przejrzysty, szczególnie struktura rozdziału piątego, gdzie zaprezentowane są wyniki badań, co ułatwia lekturę manuskryptu. Zamieszczone w dysertacji rysunki świetnie ilustrują omawiane aspekty i są one niewątpliwie mocną stroną pracy. Drobna, aczkolwiek bardzo pomocną dla czytelnika rzeczą było zamieszczenie zarówno wykazu skrótów oraz użytego oprogramowania i infrastruktury na początku rozprawy. Reasumując, wysoko oceniam stronę edytorską rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zięby.

Podsumowanie

Reasumując, chciałbym stwierdzić, że mgr Karolina Zięba wypełniła cele badań sformułowane na wstępie do dysertacji. Aby je zrealizować dobrała właściwy zestaw narzędzi. Uzyskane przez nią wyniki zostały przejrzysto zaprezentowane i omówione. Bardzo wysoko oceniam wartość prezentowanych wyników. Przeprowadzona dyskusja nie budzi moich zastrzeżeń. Warto podkreślić, że wyniki uzyskane przez mgr Ziębę zostały opublikowane w uznanych periodykach naukowych. Docenić też należy pozostały dorobek naukowy Doktorantki nie ujęty w tematyce dysertacji.

Na zakończenie niniejszej opinii jednoznacznie stwierdzam, że przedłożona przez mgr Karolinę Ziębę rozprawa doktorska zatytułowana „Badanie oddziaływań hydrofobowych i lokalnych w modelowych układach oraz białkach” spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora. Przedkładam tedy wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Zięby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Maciej Kozak