

Poznań, 25 sierpnia 2023 r.

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM
Zakład Krystalografii
Wydział Chemii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Śmietańskiej

zatytułowanej

„Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS”

Interdyscyplinarność jest jednym z motorów rozwoju krystalografii, a doskonałe metody badawcze są często poprzedzone „niewygodnymi” odkryciami i trudnymi przypadkami. Odkrycie Dana Shechtmana z 1982 roku, polegające na zaobserwowaniu osi dziesięciokrotnej na obrazie dyfrakcji elektronów dla ikozaedrycznego kwazikryształu, wstrząsnęło fundamentami krystalografii i doprowadziło do zmiany definicji kryształu. Z kolei struktury modulowane, które złamały translacyjną periodyczność, wymusiły opracowanie podstaw teoretycznych i nowe podejście w analizie strukturalnej. O ile problem związany ze zjawiskiem modulacji w kryształach pierwiastków i prostych związków chemicznych po latach pracy został rozwiązany, to w przypadku krystalografii białek stanowi bardzo poważne wyzwanie. Tego trudnego zadania podjęła się Pani mgr Joanna Śmietańska w ramach swego interdyscyplinarnego doktoratu z biofizyki. W badaniach wykorzystwała kryształy kompleksu białka Hyp-1 z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) z fluorescencyjnym ligandem ANS (8-anilinonaftaleno-1-sulfonianem).

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Katedrze Fizyki Materii Skondensowanej na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie pod kierunkiem dwóch promotorów, wybitnych specjalistów z zakresu małowymiarowych struktur modulowanych i krystalografii białek: Pana prof. dr hab. Janusza Wolnego i Pana prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego.

Rozprawę Pani mgr Joanny Śmietańskiej stanowi klasyczna, staranna, bogato ilustrowana (67 rysunków) i bardzo dobrze zredagowana 113-stronicowa praca w języku polskim, którą czyta się z prawdziwą przyjemnością. Tytuł pracy odpowiada omawianym zagadnieniom, a sposób podziału treści jest typowy dla nauk ścisłych i eksperymentalnych.

Rozprawa składa się z dziewięciu rozdziałów w następującej kolejności: 1. *Streszczenie*, 2. *Wstęp*, 3. *Cel pracy*, 4. *Materiały i metody*, 5. *Dane doświadczalne wykorzystane w rozprawie*, 6. *Wyniki*, 7. *Dyskusja*, 8. *Podsumowanie* i 9. *Bibliografia*. Na dodatkowych dwóch stronach w rozdziale dziesiątym został przedstawiony dorobek naukowy Doktorantki. Bibliografia obejmuje 137 właściwie cytowanych odnośników literaturowych w postaci oryginalnych publikacji naukowych w języku angielskim, podręczników i odniesień do programów komputerowych. Są też pozycje w języku polskim i niemieckim. Najstarsze, cytowane tutaj prace pochodzą z 1913 roku a najnowsze z 2021.

Streszczenie bardzo dobrze oddaje istotę pracy i wykonane zadania. *Wstęp* natomiast jest syntetycznym i interesującym opracowaniem zagadnień teoretycznych i historii krystalografii białek. Doktorantka w jasny sposób przedstawiła bardzo szeroki zakres zagadnień związanych z Jej rozprawą. Po zapoznaniu czytelnika z technikami krystalizacji białek omawia metody rozwiązywania problemu fazowego: podstawienie molekularne, wielokrotne podstawienie izomorficzne (MIR) oraz dostrojoną dyfrakcję anomalną (MAD), następnie przechodzi do map gęstości elektronowej białek, modelu struktury i jego udokładniania oraz walidacji struktury. W podrozdziale poświęconym strukturom modulowanym Autorka opisuje modulację przesunięciową, obsadzeniową, magnetyczną oraz strukturę poprzeczaną. Dalej zwraca uwagę na czynniki przemieszczenia atomowego (ADPs) w modelach białek a także na problem zbliźniaczenia. Nie mogło zabraknąć w tej pracy informacji o kwazikryształach, w tym o kwazikryształach 1D i ciągu Fibonacciego, parkietażu Penrose'a czy też o bardzo użytecznej metodzie średniej komórki elementarnej (AUC). W dalszej części przedstawiono to co łączy struktury modulowane z kwazikryształami oraz zastosowaną symulację metodą dynamiki molekularnej dla struktury białek. Ta część pracy odzwierciedla nie tylko szeroką wiedzę i bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, ale również duże umiejętności dydaktyczne Doktorantki.

W rozdziale trzecim jasno nakreślono ambitne cele rozprawy: (i) udokładnienie struktury kompleksu Hyp-1/ANS z dziewięciokrotną modulacją w ujęciu superkomórki i zbadanie mechanizmów modulacji, (ii) rozwój modelu struktury modulowanej kompleksów Hyp-1/ANS w oparciu o analizę wielowymiarową, (iii) udokładnianie struktury z wykorzystaniem korekty zaburzeń strukturalnych, efektów zbliźniaczenia i nieporządku fononowego, (iv) porównanie wyników symulacji metodami dynamiki molekularnej dla eksperymentalnej i zdeponowanej w bazie PDB struktury Hyp-1.

Na uznanie zasługuje również warsztat badawczy Doktorantki przedstawiony w rozdziale czwartym zatytułowanym *Materiały i metody*. Pani mgr Śmietańska zaprezentowała wiele programów komputerowych stosowanych w biokrystalografii: począwszy od tych przeznaczonych do rozwiązywania problemu fazowego (Phaser) i udokładniania modelu struktury (REFMAC5), poprzez narzędzia do wizualizacji makrocząsteczek (Coot, PyMol, USSF Chimera) aż po program TRUNCATE do przeprowadzenia testów zbliźniaczenia, dzięki któremu wygenerowano wykresy skumulowanego rozkładu natężeń $N(z)$ i $S(H)$. Z kolei symulacje białka Hyp-1 metodami dynamiki molekularnej przeprowadzono przy użyciu

pakietu GROMACS. W dalszej części pracy Autorka omawia optymalizację przy użyciu algorytmu metaheurystycznego MEIGO w celu określenia minimum i punktu zbieżności udokładnianego modelu z doświadczalnymi amplitudami czynników struktury. Następnie szczegółowo opisuje skrypty MATLAB służące przygotowaniu pliku wejściowego, np. w skrypcie `letter_to_number.m` funkcja zamienia litery w alfabecie na liczby, co skraca czas obliczeń. Przy okazji chciałabym dowiedzieć się jaki jest zysk czasowy? Bardzo ważnym krokiem w prowadzonych obliczeniach jest przekształcenie danych do nadprzestrzeni (3+1)D. Pomocne są tutaj kolejne dwa skrypty: `read_cif.m` oraz `reduce_data.m`. Do kontroli geometrii poszczególnych reszt aminokwasowych wykorzystano funkcje `find_bonds.m`, `find_angles.m` oraz `find_torsion.m`. W procesie udokładniania struktury drugą warstwę działania oprogramowania stanowią skrypty i funkcje do obliczenia wektorów bazowych (`calc_basevectors.m`) i falowych (`calc-wavevectors.m`), do wskazania udokładnianych parametrów (`generate_coefficients.m`), do przypisania każdemu atomowi odpowiednich atomowych czynników rozpraszania (`form_factors.m`) i do obliczania czynników struktury utworzonego modelu bez lub z atomami wodoru (`structure_factor-protein.m` oraz `calc_structure_factor_hydrogen.m`). Trzecią warstwę oprogramowania stanowią skrypty i funkcje do graficznej prezentacji modelu (`plot_structure.m`), analizy ADPs (`analyse_ADp.m`) oraz weryfikacji więzów stereochemicznych (`restrains-analysis.m`). Wysoko oceniam dokonania Doktorantki w zakresie opracowania nowatorskich i użytecznych w biokrytalografii rozwiązań. Jednocześnie stwierdzam Jej bardzo dobre przygotowanie metodyczne.

Czterostronicowy rozdział piąty pt. *Dane doświadczalne wykorzystane w rozprawie* został napisany w celu podania ważnych informacji dotyczących otrzymywania i rozwiązywania przez dr Joannę Śliwiak struktury kompleksu białkowego Hyp-1/ANS.

Rozdział szósty – *Wyniki*. Obrazy dyfrakcyjne kryształów 9Hyp/ANS i 7Hyp/ANS pokazują wyraźnie, że mamy do czynienia ze strukturami modulowanymi. Dodatkowo na histogramach rozkładu intensywności w warstwach o tym samym wskaźniku / Doktorantka zaobserwowała powtarzającą się modulację natężeń refleksów wzdłuż osi c^* . Oprócz modulacji kolejną „przypadłością” 9Hyp/ANS jest zbliżenie, co wykryto L-testem. Obliczone frakcje bliźniacze są nieco zawyżone (około 0,45 przy użyciu testu $S(H)$) w stosunku do wartości 0,25 dla idealnego bliźniaka tetartoedrycznego. Kolejny podrozdział poświęcony jest szczegółowemu omówieniu upakowania molekuł 9Hyp/ANS w komórce elementarnej, co zostało bardzo dobrze zilustrowane na Rysunku 29. Autorka zwraca m.in. uwagę na obecność dimerów Hyp-1 w strukturze, dostrzega wyraźne niedoskonałości składowej translacyjnej pseudośruby $2_{1/9}$ oraz zaburzenia uporządkowania translacyjnego nie tylko wzdłuż osi c , ale także a i b . W wyniku nałożenia na siebie modeli struktur 7Hyp/ANS i 9Hyp/ANS Pani mgr Śmietańska zauważyła podobieństwa (zygzakowaty łańcuch) i różnice (wydłużenie parametru c o 2 jednostki strukturalne, co stanowi 8 łańcuchów białka) w schemacie upakowania. Analizowane struktury różnią się również liczbą cząsteczek liganda, chociaż obsadzenie cząsteczek białka przez ligandy ANS nie wpływa znacząco na konformację łańcucha głównego.

Zestawiono też wyniki udokładniania struktury 9Hyp/ANS za pomocą programu REFMAC5 i przedstawiono analizę poprawności modelu. Do weryfikacji rozkładu ADPs i konformacji łańcuchów bocznych wykorzystano wyniki symulacji białka z dziurawca zwyczajnego Hyp-1 (kod PDB: 3IES) metodami dynamiki molekularnej. Kolejne strony poświęcone są procesowi przekształcania superkomórki 7Hyp/ANS w jej reprezentację w przestrzeni wielowymiarowej (3+1)D oraz udokładnieniu modelu i jego weryfikacji pod kątem stereochemii. W dalszym kroku dzięki funkcji phonon.m wprowadzono poprawkę związaną z obecnością fononów w strukturze modulowanej. Uzyskane wyniki są unikatowe oraz zostały przedstawione rzetelnie i na wysokim poziomie naukowym.

Obszerną i wnikliwą dyskusję wyników Pani mgr Śmietańska rozpoczyna od omówienia wpływu warunków krystalizacji na modulację struktury. Stwierdza, że dodatek melatoniny podczas inkubacji roztworu krystalizacyjnego białka z ANS spowodował nowy typ modulacji badanego kompleksu. Zdaniem Autorki niniejszej rozprawy „9Hyp/ANS nie jest prostą kopią struktury 7Hyp/ANS wydłużoną o 2 jednostki strukturalne wzdłuż *c*, ale zupełnie odrębną strukturą modulowaną”. Jako dowód przedstawia różnice pomiędzy wartościami parametru sieciowego *c* dla spodziewanych i eksperymentalnych struktur. Kolejny podrozdział poświęca artefaktom po krystalizacji. W kwestii zbliźniaczenia Doktorantka dochodzi do wniosku, że obecność elementów pseudosymetrii spowodowała mniejsze zaburzenie rozkładu intensywności niż oczekiwany w przypadku idealnego zbliźniaczenia. Sporo miejsca w dyskusji zostało poświęcone wysyceniu struktury 9Hyp/ANS cząsteczkami liganda. Oprócz ANS rozpoznano aniony siarczanowe, aniony pochodzące od czynnika strącającego (cytrynianu sodu), cząsteczki HEPES (z roztworu buforowego) i molekuly sulfotlenku dimetylu (DMS). Pomocną w tej analizie jest Tabela 5, która zapewne wymagała dużo pracy. Kolejnym ważnym punktem dyskusji jest określenie wpływu konformacji cząsteczek ANS na formowanie nadstruktury. Białko Hyp-1 posiada hydrofobową wnękę, która może służyć jako miejsce dokowania i wiązania specyficznych ligandów o znaczeniu biologicznym, np. melatoniny (MEL), fitohormonu o właściwościach antyoksydacyjnych. Silną konkurencję o dostęp do miejsc wiążących najczęściej wygrywa ANS, co tłumaczy trudności ze znalezieniem cząsteczek melatoniny na mapach gęstości elektronowej dla 9Hyp/ANS. W dalszej części Doktorantka porównuje eksperymentalny i symulowany metodami MD model struktury Hyp-1, w tym uzyskane wartości ADPs czy ciekawe zmiany konformacyjne między $C\gamma - endo$ a $C\gamma - exo$ w prolinie. Analogiczne analizy wykonano oraz szczegółowo opisano i zilustrowano dla wielu wybranych łańcuchów bocznych różnych aminokwasów. Ostatni podrozdział *Dyskusji* Autorka poświęca wynikom udokładniania w nadprzestrzeni (3+1)D oraz korektom fononowych. Podkreśla zalety przekształcenia superkomórki 7Hyp/ANS do nadprzestrzeni w analizie modulacji. Niewątpliwie wprowadzenie zredukowanej komórki i zastosowanie odpowiedniego wektora modulacji ułatwia udokładnianie struktury. Nie ma potrzeby ręcznego sprawdzania łańcuchów białek, poprawiania zdeformowanych fragmentów głównego łańcucha polipeptydowego oraz ciągłego analizowania map gęstości elektronowej. Dzięki zautomatyzowanym skryptom MATLAB obliczenia przebiegają sprawniej. Z kolei poprawki fononowe stanowią niewątpliwie innowacyjne podejście do

skorelowanych drgań sieci krystalicznej w modelu struktury białek. Trafne i ciekawe wnioski w dyskusji, poparte odpowiednimi dowodami, świadczą o dojrzałości naukowej Kandydatki do stopnia naukowego doktora.

Podsumowanie zostało napisane wzorcowo. Wszystkie cele nakreślone przez Doktorantkę na początku rozprawy zostały w pełni zrealizowane.

W tej interesującej i wartościowej pracy również styl i język są bez zarzutu. Nie zauważyłam elementów żargonu laboratoryjnego. Znalazłam jedynie kilka tzw. literówek oraz zbędne wyrazy, które prawdopodobnie w trakcie końcowej korekty zostały zastąpione innymi, ale zapomniano je usunąć (str. 37, 8 wiersz od góry, Rys. 24). Z kolei podpis pod rysunkiem 48 wyraźnie „oczekuje” na uzupełnienie (Jaka mapa? Jaki kontur?). W odnośniku literaturowym [3] brakuje nazwy czasopisma. Zamiast określenia „bliźniaczość” użyłabym „zbliżniczenie”.

Pytania, które nasunęły się mi po lekturze tej dysertacji są następujące: 1) Czy rozkład $P(u)$ może być gęsty? 2) Czy próbowano otrzymać kompleks białka Hyp-1 z melatoniną bez konkurencyjnego ANS? 3) Od jakiej minimalnej rozdzielczości danych dyfrakcyjnych dla kryształu białka warto zajmować się strukturami modulowanymi? 4) Na stronie 105 użyto sformułowania „kąty zwykłe”. Czy mam rozumieć, że chodzi o kąty walencyjne? 5) Czy zastosowano poprawkę na absorpcję w trakcie procesowania danych dla kryształu 9Hyp/ANS?

Dorobek naukowy Pani Śmietańskiej obejmuje 4 publikacje o cyrkulacji międzynarodowej, w tym dwie z zakresu pracy doktorskiej. Jedna z nich opublikowana w *Acta Cryst. Section D*, a druga w *Crystals*. Doktorantka prezentowała 13 komunikatów posterowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Otrzymała dwie nagrody za najlepszy poster. Odebrała 3 staże krajowe i jeden zagraniczny. Brała udział w międzynarodowych warsztatach naukowych we Francji i Izraelu. Była wykonawcą w projekcie grantowym NCN OPUS.

Warto dodać, Pani mgr Joanna Śmietańska pracę doktorską realizowała w ramach dwóch projektów badawczych: grantu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM nr 2020/37/N/ST3/01501 (jako kierownik) oraz Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-1004/16 współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej. Z kolei część obliczeń wykonała dzięki infrastrukturze PL-Grid.

Ze względu na wagę podejmowanych problemów i efekty wykonanych badań rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Śmietańskiej zasługuje na **wyróżnienie**.

W **uzasadnieniu** chciałabym podkreślić następujące aspekty: (i) pionierskie badania w zakresie struktur modulowanych kryształów białek, (ii) nowatorskie rozwiązanie z wykorzystaniem analizy wielowymiarowej w przestrzeni (3+1)D i korekt fononowych (iii) przygotowanie i zastosowanie nowych skryptów do programu MATLAB, (iv) rozwiązanie

problemu zblizniaczenia struktury bialka, (v) rozwój metodyki krystalografii i fizyki ciala stalego, (vi) praca zostala napisana bardzo dobrym jezykiem i posiada bogata szate graficzna, (vii) dojrzała dyskusja wartosciowych i unikatowych na skale swiatowa wyników, (viii) dane strukturalne zostaly zdeponowane w ogólnodostepnej bazie *Protein Data Bank* i moga zostac wykorzystane do projektowania leków (ix) kompleks bialka Hyp-1 z ANS ma znaczenie aplikacyjne w medycynie z powodu biologicznej zdolności tego bialka do wiązania fitohormonów.

W konkluzji stwierdzam, że przedložona dysertacja spełnia wszystkie warunki przewidziane Ustawą dla prac doktorskich i składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne AGH o dopuszczenie Pani mgr Joanny Śmietańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie o **wyróżnienie** pracy.

E. Bartoszak-Adamska

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM