

Prof.dr hab. Rafał Abdank-Kozubski
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opinia o pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Śmietańskiej, doktorantki w Katedrze Fizyki Materii Skondensowanej na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. St. Staszica w Krakowie pt. „Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS”

Przedstawiona do oceny praca doktorska p. mgr Joanny Śmietańskiej „Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS”, której promotorami w przewodzie doktorskim są p. prof.dr hab. Janusz Wolny oraz p. prof.dr hab. Mariusz Jaskólski wykonana została w Katedrze Fizyki Materii Skondensowanej na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. St. Staszica w Krakowie.

Praca napisana jest w języku polskim i składa się z dziesięciu rozdziałów poprzedzonych wymaganymi oświadczeniami autora oraz promotorów, podziękowaniami oraz spisem treści. Seria podziękowań zakończona jest informacją, że praca wykonana została w ramach grantu NCN PRELUDIUM nr 2020/37/N/ST3/01501 oraz Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej oraz, że część obliczeń powstała z wykorzystaniem infrastruktury PL-Grid.

Rozdział 1 rozprawy stanowi jej streszczenie sygnalizujące przede wszystkim strukturę zrealizowanego programu badawczego, który obejmował trzy części stanowiące logiczną sekwencję. Streszczenie zawiera m.in. informację, iż w ramach rozprawy doktorskiej Doktorantka porównywała dwie modulowane struktury krystaliczne kompleksu białkowego Hyp-1/ANS, z których pierwsza, oznaczona jako 7Hyp/ANS, została otrzymana, rozwiązana i opisana przez dr Joannę Śliwiak oraz grupę prof. Mariusza Jaskólskiego w 2015 roku.

Rozdział 2 ma tytuł „Wstęp” i składa się ze wstępnych uwag oraz 10 podrozdziałów wprowadzających w tematykę przeprowadzonych badań.

Otwierające rozdział wstępne uwagi zawierają zgrabnie zredagowaną chronologię rozwoju krystalografii opartej na eksperymentach dyfrakcyjnych. Fragment ten wraz z odnośnikami literaturowymi może być bardzo przydatny dla osób przygotowujących prace przeglądowe. Dziesięć numerowanych podrozdziałów rozdziału 2 zawiera encyklopedyczne kompendium wiedzy niezbędnej do realizacji projektu doktorskiego. Oto zestawiona przez Doktorantkę „galeria” problemów: (i) Krystalografia białek; (ii) Techniki krystalizacji białek; (iii) Metody rozwiązywania problemu fazowego; (iv) Mapy gęstości elektronowej białek; (v) Tworzenie modelu struktury i udokładnianie; (vi) Walidacja struktury; (vii) Struktury modulowane (podrozdział najobszerniejszy ze względu na bezpośredni związek z pracą doktorską); (viii) Zbliżniaczenie; (ix) Kwazikryształy; (x) Symulacje dynamiki molekularnej struktur białek.

Rozdział 3 rozprawy Autorka poświęciła przedstawieniu jej celu. Już w pierwszym zdaniu cel ten sformułowany jest jako „udokładnienie modelu struktury krystalicznej kompleksu białkowego Hyp-1/ANS z dziewięciokrotną modulacją wzdłuż kierunku c w podejściu superkomórki oraz przygotowanie oprogramowania pozwalającego przeprowadzić podobną procedurę w bardziej skomplikowanym opisie w przestrzeni wielowymiarowej (3+1)D”. W dalszej części następuje uszczegółowienie przedstawionego celu poprzez sformułowanie

pięciu stawianych przez niego pytań oraz wyszczególnienie czterech najważniejszych zadań badawczych mających dostarczyć odpowiedzi na te pytania.

Jak kilkakrotnie powtarza Pani mgr Joanna Śmietańska, podjęcie badań w pow. tematyce było uzasadnione przez fakt, iż „modulacja struktury krystalicznej jest spotykana w krystalografii małowcząsteczkowej, ale stanowi ewenement w krystalografii białek”. Tematyka jest zatem zarówno ważka, jak i perspektywiczna, co skłoniło Autorkę do stwierdzenia, że „długofalowym celem rozprawy doktorskiej ma być pogłębienie zrozumienia fundamentalnych mechanizmów w modulowanych systemach makromolekularnych oraz opracowanie oprogramowania, które umożliwi dalsze badania tych ciekawych struktur”.

Rozdział 4 rozprawy doktorskiej p. mgr Śmietańskiej składa się z 8 podrozdziałów i zawiera bardziej szczegółowe omówienie badanych układów (białek) oraz zastosowanych metod badawczych.

Badanym przez Doktorantkę układem był kompleks białkowy Hyp-1/ANS, którego właściwości oraz funkcje biologiczne opisane są podrozdziale 4.1. Kryształy białka Hyp-1 preparowane były w dwóch różnych warunkach, w wyniku czego otrzymano dwa typy struktur modulowanych oznaczanych jako 7Hyp/ANS oraz 9Hyp/ANS. Badania krystalograficzne obu wariantów struktur przeprowadzone zostały przy użyciu promieniowania synchrotronowego w USA i w Niemczech. W zależności od warunków krystalizacji kompleksu Hyp-1/ANS otrzymuje się kryształy reprezentujące dwie fazy wykazujące 7-krotne (7Hyp-1/ANS) lub 9-krotne (9Hyp-1/ANS) modulacje struktury wzdłuż wydłużonej osi c komórki elementarnej. Należy zaznaczyć, że Autorka rozprawy nie brała udziału ani w procesie preparatyki próbek, ani też w eksperymentach dyfrakcyjnych, których wyniki zostały jej przekazane z zewnątrz.

W tym miejscu recenzent pragnie zaznaczyć, iż informacje dotyczące właściwości białka Hyp-1 zawarte w podrozdziale 4.1 stałyby się znacznie bardziej użyteczne gdyby tekstowi towarzyszyły rysunki przedstawiające opisane w tekście elementy i cechy budowy omawianych makromolekuł.

W związku z tym, że badania prowadzone przez p. mgr Joannę Śmietańską polegały wyłącznie na analizie otrzymanych z zewnątrz danych doświadczalnych, w dalszej części rozdziału 4 omawia ona wyłącznie narzędzia informatyczne stosowane do rozwiązania struktury materiału, udokładniania modelu, wizualizacji danych, testów zbliżniaczenia oraz symulacji dynamiki molekularnej.

Ostatnim rozdziałem rozprawy doktorskiej p. mgr Joanny Śmietańskiej poprzedzającym szczegółowy opis uzyskanych przez Nią wyników badań jest rozdział 5 zawierający opis danych doświadczalnych wykorzystanych w rozprawie. Opis obejmuje proces preparatyki kompleksu białkowego Hyp-1/ANS wraz z krystalizacją (przeprowadzony w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu) oraz procedurę rozwiązania struktury wyhodowanych kryształów na podstawie wyników eksperymentów dyfrakcyjnych zrealizowanych na synchrotronach w USA i Niemczech bez udziału Doktorantki.

Centralną część rozprawy doktorskiej p. mgr Joanny Śmietańskiej stanowi składający się z 11 podrozdziałów rozdział 6 zawierający opis uzyskanych przez doktorantkę wyników badań. Zgodnie z informacją zawartą w streszczeniu rozprawy, program badań składał się z trzech części:

W pierwszej z nich dokonano udokładnienia modelu struktury kryształu 9Hyp/ANS w ujęciu superkomórki przy użyciu konwencjonalnego oprogramowania oraz związanej z nim analizy elementów strukturalnych kryształu. Analizę prowadzono w odniesieniu do poznanej uprzednio struktury 7Hyp/ANS.

W drugiej części dokonano szczegółowej analizy danych dyfrakcyjnych obu modulowanych kryształów Hyp-1/ANS oraz metodycznego opisu i udokładnienia struktury 7Hyp/ANS w przestrzeni wielowymiarowej przy użyciu autorskiego, specjalistycznego oprogramowania. Dokonano też rozbudowy opracowanego pakietu o kolejne moduły umożliwiające wizualizację danych oraz wprowadzanie poprawek związanych z drganiami termicznymi sieci krystalicznej (fononami).

Trzecia część programu dotyczyła zastosowania metod dynamiki molekularnej do badania ruchów termicznych i konformacji łańcuchów bocznych białka Hyp-1. Uzyskane informacje pozwoliły określić preferowane energetycznie konformacje w obrębie białka oraz ich porównanie z wariantami dobranymi w procesie udokładniania struktury krystalicznej.

Rozdział 6 rozpoczyna się od opisu udostępnionych Doktorantce dyfraktogramów i ich interpretacji pod kątem istnienia modulacji struktury. Autorka opisuje dyfraktogramy kryształu 9Hyp/ANS odnosząc się stale do znanych jej analogicznych wyników dotyczących kryształu 7Hyp/ANS i stwierdza istnienie dziewięciokrotnej niekrystalograficznej symetrii translacyjnej (podr.6.1), obecność bliźniaczych elementów symetrii (podr. 6.2), jak również specyficzne cechy pseudosymetrii wynikające ze sposobu upakowania molekuł Hyp-1 w strukturze krystalicznej (podr.6.3). Pomimo tego, że Doktorantka jasno stwierdza, iż nie brała udziału w eksperymentach dyfrakcyjnych, zdaniem recenzenta praca bardzo by zyskała na uzupełnieniu jej o przynajmniej krótki opis tych eksperymentów dotyczący np. ich geometrii (rodzaj goniometru) czy typu stosowanych detektorów. Bez tych informacji zamieszczone w pracy przykłady dyfraktogramów (rys. 24,25) wydają się nieco „zawieszony w próżni”. W dalszej części Autorka rozważa podobieństwo struktur krystalicznych kompleksów 9Hyp/ANS i 7Hyp/ANS i wskazuje na to, że różnica ujawnia się zwłaszcza w liczbie cząsteczek liganda ANS, która jest większa w przypadku kompleksu 9Hyp/ANS, gdzie każda cząsteczka Hyp-1 zawiera taki ligand (podr. 6.4).

„Kamieniem milowym” osiągniętym przez Doktorantkę w tej części badań było udokładnienie modelu 9Hyp/ANS na poziomie $R_{work} = 0.226$ i $R_{free} = 0,257$ (podr. 6.5). Na tej podstawie, znowu w odniesieniu do znanej struktury 7Hyp/ANS, dokonano szczegółowej analizy miejsc wiązań ligandów ANS w kompleksie 9Hyp/ANS (podr. 6.6).

Następny podrozdział rozprawy (podr. 6.7) poświęcony jest wynikom przeprowadzonych symulacji dynamiki molekularnej białka Hyp-1. Doktorantka opisuje najpierw model białka Hyp-1 użyty do symulacji (podr.6.7.1), a następnie podaje dość szczegółowy opis zastosowanego algorytmu symulacji (podr.6.7.2.). Ten fragment rozprawy budzi zdziwienie recenzenta z powodu faktycznego braku przedstawienia konkretnych wyników symulacji. Jediną informacją ilościową jest wykres RMSD (t) (Rys. 34), natomiast nigdzie nie zamieszczono anonowanych danych zgromadzonych dzięki osiągnięciu stabilności układu. Niezależnie od tego, sam opis symulacji nie pozwala recenzentowi zorientować się które z wartości wymienianych parametrów układu zostały obliczone przez Doktorantkę. Chodzi m.in. o ładunki cząstkowe atomów w obrębie cząsteczek glikolu: czy obliczenia metodą DFT były jej własnym dziełem ?

Pozostałe podrozdziały rozdziału 6 rozprawy dotyczą procesu przekształcania superkomórki 7Hyp/ANS w jej reprezentację w przestrzeni (3+1)D (podr. 6.8), udokładniania modelu 7Hyp/ANS w komórce (3+1)D (podr. 6.9), weryfikacji poprawności stereochemicznej struktury (podr. 6.10) oraz wprowadzenia poprawek związanych z obecnością fononów (podr. 6.11).

Nazwy tych podrozdziałów informują o charakterze procedury opracowanej przez Autorkę, która doprowadziła do udokładnienia modelu 7Hyp/ANS charakteryzującego się lepszą jakością ($R = 0,2165$) niż ta, którą osiągnięto stosując standardową metodę „superkomórki” ($R = 0,226$).

Następny, siódmy rozdział rozprawy doktorskiej p. mgr Śmietańska nazwała „Dyskusja”. Dopiero teraz, podczas lektury 13 podrozdziałów tego rozdziału czytelnik może zapoznać się z faktycznymi wynikami badań Doktorantki oraz dotyczącymi ich autorskimi komentarzami. Rozdział rozpoczyna się uwagami na temat wpływu warunków krystalizacji na modulację struktury krystalicznej kompleksów białka Hyp-1 oraz opisem artefaktów pozostałych po krystalizacji (podr. 7.1 i 7.2). Autorka zauważa, iż specyficzne cechy struktury kompleksu 9Hyp/ANS świadczą o tym, że różnica w stosunku do struktury 7Hyp/ANS nie wynika jedynie z wydłużenia modulacji. Komentując wyniki przeprowadzonych testów zbliźniaczenia wyhodowanych kryształów 9Hyp/ANS (podr. 7.3) Doktorantka zwraca uwagę na możliwość maskowania związanych ze zbliźniaczeniem efektów przez inne „patologie krystalograficzne”. Dwa kolejne podrozdziały rozprawy (podr. 7.4, 7.5) dotyczą obsadzania modelu struktury 9Hyp/ANS cząsteczkami ANS (8-anilinonaftaleno-1-sulfonianu) oraz konformacji tych cząsteczek. Autorka rozprawy konkluduje, że zaobserwowane konformacje ANS przemawiają na korzyść hipotezy, iż odgrywają one ważną rolę w formowaniu struktury przestrzennej kompleksu. Podrozdział 7.6 rozprawy poświęcony jest w całości omówieniu przeprowadzonych badań, które miały na celu rozstrzygnięcie czy krystalizacja białka Hyp-1 w obecności mieszaniny ANS i melatoniny (MEL) (prowadząca do powstania fazy 9Hyp/ANS) nie prowadzi do zastąpienia niektórych ligandów ANS przez MEL. Zdaniem Doktorantki, najbardziej prawdopodobną odpowiedzią na pow. pytanie jest odpowiedź negatywna. Wskazuje ona jednak, że konkurencja pomiędzy ANS i melatoniną dotycząca dostępu do miejsc wiążących z białkiem Hyp-1 mogła mieć wpływ na powstanie struktury modulowanej o zwiększonej krotności. Podrozdziały 7.7 – 7.12 zawierają opis oraz dyskusję wyników wniesionych do pracy przez przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej struktury białka Hyp-1 (bez liganda ANS). Odnalezienie tych wyników w tym miejscu wydatnie uspokaja recenzenta zdziwionego ich brakiem w podrozdziale 6.7. Doktorantka analizuje uzyskane metodą symulacji MD parametry tej struktury i porównuje je z parametrami modelu wyjściowego – tj. skonstruowanego na podstawie badań dyfrakcyjnych. Zastanawiające jest zamieszczone od razu na początku sformułowanie, iż jednym z celów było stwierdzenie czy „symulacja nie wprowadziła znaczących, *niepożądanych* zmian konformacyjnych w wyjściowym modelu struktury”. Interesujące byłoby usłyszeć dlaczego ewentualne zmiany miałyby być „niepożądane” – wskazywałoby to chyba np. na niepoprawność Hamiltonianu zastosowanego w symulacjach MD. W kolejnych podrozdziałach analizowane są generowane w symulacjach parametry przemieszczenia atomów (APD) oraz rozkłady prawdopodobieństw kątów poszczególnych łańcuchów bocznych makromolekuł Hyp-1. Na koniec w podrozdziale 7.13 p. mgr Śmietańska dyskutuje wyniki udokładniania struktury kompleksu 7Hyp/ANS w przestrzeni (3+1)D oraz korekt fononowych. Autorka podkreśla zalety metody w stosunku do tradycyjnego podejścia przy użyciu superkomórki. Wprowadzenie poprawek fononowych na obecnym poziomie doprowadziło do niewielkiego pogorszenia jakości udokładnienia struktury, jednak zdaniem Doktorantki, zastosowanie dokładniejszego formalizmu powinno prowadzić do poprawy zbieżności. Podrozdział 7.13 jest kolejnym przykładem wskazującym na wspomniane wcześniej usterki redakcyjne rozprawy. Tym razem zwykły błąd literowy polegający na zapewne pomyłkowym zapisie 9Hyp/ANS zamiast 7Hyp/ANS wprowadza nieco zamętu co do tego która faza kompleksu była faktycznie udokładniana metodą nadprzestrzeni (3+1)D. Rozprawę kończy Podsumowanie (Rozdział 8), w którym Autorka precyzuje pięć najważniejszych osiągnięć badawczych zawartych w pracy. Są to: (i) udokładnienie i dogłębna analiza strukturalna modelu białka 9Hyp/ANS z dziewięciokrotną modulacją struktury; (ii) opracowanie kompleksowego pakietu skryptów w środowisku Matlab służącego do rozwiązywania oraz udokładniania modelu białka Hyp-1/ANS w oparciu o metodę analizy

wielowymiarowej; (iii) wprowadzenie analizy wielowymiarowej w przestrzeni (3+1)D do opisu struktury krystalicznej 7Hyp/ANS oraz udokładnienia danych; (iv) przetestowanie pakietu skryptów na zestawie danych dyfrakcyjnych modulowanego kompleksu białka 7Hyp/ANS oraz (v) przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej modelu białka Hyp-1 (bez dodatku liganda ANS).

W ostatnim akapicie Autorka podkreśla unikalny i pionierski na tle aktualnego stanu wiedzy charakter uzyskanych wyników.

Rozdział 9 rozprawy to Bibliografia zawierająca 103 pozycje cytowane w pracy – w tym 3 publikacje Autorki. Ostatecznie rozprawę kończy rozdział 10 przedstawiający krótko dorobek naukowy p. mgr Joanny Śmietańskiej, który stanowią 4 publikacje w recenzowanych czasopismach, 13 komunikatów konferencyjnych, udział w realizacji 2 grantów NCN – w tym kierownictwo jednego z nich oraz staże i wyjazdy zagraniczne.

Przystępując do oceny rozprawy doktorskiej p. mgr Joanny Śmietańskiej pt.

„Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS” należy stwierdzić, że lektura rozprawy nie jest dla czytelnika, a w szczególności dla recenzenta, przedsięwzięciem łatwym. Właściwie od samego początku lektury pracy dużą trudność sprawia brak wyraźnego rozdziału pomiędzy własnymi dokonaniem Doktorantki i rezultatami innych autorów, z których korzystała. Podobna trudność dotyczy wyników badań obu faz kompleksu Hyp/ANS: trzeba nieraz wiele wysiłku oraz wielokrotnego odczytywania fragmentów rozprawy, by nawet pomimo jednoznacznego tytułu podrozdziału, zorientować się czy to, o czym pisze Autorka dotyczy kompleksu 9Hyp/ANS, czy też 7Hyp/ANS. Trzeba przyznać, że „deską ratunku” dla recenzenta był tu podany w streszczeniu rozprawy (rozdział 1) jasny podział całego projektu doktorskiego na trzy części.

Pozostając jeszcze przy usterkach redakcyjnych pragnę zwrócić uwagę na bolesny wręcz brak pełnej listy skrótów i akronimów używanych przez Doktorantkę. Posługując się właściwie stale skrótami, Autorka niewątpliwie zredagowała tekst zgodnie z panującymi obecnie zwyczajami. Jednak brak pełnej listy skrótów sprawia, że – znowu – jedyną „deską ratunku” dla czytelnika jest dysponowanie elektroniczną wersją rozprawy i edytorem tekstu pozwalającym na szybkie odnajdywanie ich znaczeń.

Czytając rozprawę, można było natrafić również na drobne usterki redakcyjne – nieuniknione w przypadku przygotowywania dłuższych tekstów. Oto parę przykładów:

Str. 8 ... problem dyfrakcji na kryształach o *zaburzonej temperaturze*...?

Str. 37 ...*może być wywołana może być indukowana*...

Str. 38 – po co podrozdział 4.3.1. ? – dalszych już nie ma

Str. 53 - ...satelity dzielą odległości pomiędzy głównymi refleksami w *racjonalny sposób*... ?

Str. 54 - Rysunek 25. Fragment obrazu dyfrakcyjnego kryształu 7Hyp/ANS w kierunku c^* w programie *CrysAlis Pro* (co to znaczy ??) z zaznaczonymi refleksami głównymi (wzdłuż zielonych linii) oraz satelitami (różowe kropki). Rysunek jest nieczytelny – trudno odróżnić „różowe kropki”.

Str. 79 – podpis pod rys. 48 – ...*jaka mapa ?, jaki kontur ?* ... – chyba pozostałość z poprzedniej wersji tekstu

Str.83 – opisy kolumn w Tabeli 5 nie zostały przetłumaczone na j. polski, to samo dotyczy niektórych wykresów

Powyższe uwagi krytyczne mają charakter techniczny i pomimo, że recenzentowi nasuwają się w pierwszej kolejności, nie mogą wpłynąć na ocenę merytoryczną rozprawy p. mgr. Joanny Śmietańskiej. Pragnę wyraźnie stwierdzić, że rozprawa i zawarte w niej wyniki badań przedstawiają znaczącą wartość naukową. Mają też charakter pionierski w zakresie

dotyczącym modulacji struktury krystalicznej badanych kompleksów białkowych, a w szczególności w zakresie udokładniania tej struktury poprzez analizę wielowymiarową w przestrzeni (3+1)D. Wartość rozprawy wynika również z faktu, iż rozwiązywane w jej ramach problemy stworzyły okazję do swoistej syntezy wiedzy pochodzącej z różnych obszarów nie tylko krystalografii. Wyrazistym przykładem jest tu wykorzystanie doświadczeń z zakresu badania kwazikryształów, jak również zastosowanie techniki symulacji dynamiki molekularnej i uwzględnienie korekt związanych z fononami. Uzyskane rezultaty badawcze wskazują na niesłabnące znaczenie krystalograficznych badań struktury białek pomimo dynamicznego rozwoju metod pozwalających na obrazowanie struktury makromolekuł bez konieczności uciekania się do preparatyki kryształów.

Podsumowując, stwierdzam, że p. mgr Joanna Śmietańska wykazała się szeroką wiedzą i kompetencjami badawczymi w zakresie tematyki, której dotyczyła jej praca doktorska. Oświadczam, iż rozprawa doktorska p. mgr Joanny Śmietańskiej „Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS” spełnia wymagania określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce:

- rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki fizyczne;
- przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego;
- rozprawę stanowi praca pisemna;
- do złożonej dokumentacji Doktorantka dołączyła streszczenie rozprawy w języku angielskim.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Akademii Górniczo-Hutniczej im. St. Staszica w Krakowie o dopuszczenie p. mgr Joanny Śmietańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, Cieszyn 27 lipca 2023.

