

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Śmietańskiej pt.:
„Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł
z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie
kompleksu Hyp-1/ANS”

Praca doktorska mgr Joanny Śmietańskiej pt. „Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS” wykonana została w Akademii Górniczo Hutniczej w Krakowie, na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej (Katedra Fizyki Materii Skondensowanej) pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Wolnego oraz prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego z UAM w Poznaniu.

W oświadczeniu załączonym do rozprawy Doktorantka stwierdza, że niniejszą pracę wykonała osobiście i samodzielnie, a także nie korzystała ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana 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.

Podstawowym celem rozprawy doktorskiej było udokładnienie modelu struktury krystalicznej kompleksu białkowego Hyp-1/ANS z dziewięciokrotną modulacją wzdłuż kierunku c w podejściu superkomórki oraz przygotowanie oprogramowania pozwalającego przeprowadzić obliczenia w przestrzeni wielowymiarowej (3+1)D. Oprogramowanie to wykorzystano do udokładnienia kompleksu białkowego Hyp-1/ANS z siedmiokrotną modulacją wzdłuż kierunku c . Doktorantka podjęła również próbę opracowania oryginalnego oprogramowania do szczegółowej analizy struktur białkowych o zaburzonej periodyczności komórki elementarnej oraz przeprowadzenia korekt fononowych.

Praca doktorska mgr Joanny Śmietańskiej liczy 115 stron i składa się z dziesięciu rozdziałów. Do pracy włączyła obszerną, liczącą 137 pozycji, literaturę dotyczącą omawianych zagadnień, 67 rysunków i 6 tabel. Wyniki pracy zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych oraz w dwóch publikacjach z listy filadelfijskiej, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Publikacje te ukazały się w renomowanych czasopismach: *Acta Crystallographica D* 76 (2020) 653-667 oraz *Crystals* 11 (2021) 1-22.

W pierwszym rozdziale pracy autorka streściła najważniejsze problemy związane z badaniem białek, a w szczególności białek o strukturze modulowanej. Nakreśliła trudności związane z brakiem odpowiednich narzędzi do analizy makromolekularnych struktur modulowanych, które prowadzą do poważnych problemów ze wskaźnikowaniem i przetwarzaniem danych dyfrakcyjnych oraz z otrzymaniem kompletnego modelu struktury.

W drugim rozdziale Doktorantka przedstawiła najważniejsze informacje z krytalografii białek, krytalografii struktur modulowanych, kwazikryształów oraz struktur zbliżniaczonych. Przedstawiła także najważniejsze informacje o symulacjach metodami dynamiki molekularnej (MD) w białkach, natomiast w rozdziale trzecim zaprezentowała najważniejsze cele swojej pracy.

W kolejnym, czwartym rozdziale, Doktorantka scharakteryzowała zastosowany w pracy warsztat badawczy. Pokróćce przedstawiła programy z pakietu CCP4, z których korzystała w pracy. Do rozwiązania nadstruktury białka 9Hyp/ANS w przestrzeni trójwymiarowej (3D) Doktorantka wykorzystwała program Phaser, natomiast do jej udokładnienia program REFMAC5. Do wizualizacji wyników wykorzystwała programy: Coot, PyMOL oraz UCSF Chimera. Testy zbliżniaczenia przeprowadziła przy pomocy programu TRUNCATE. Do przeprowadzenia symulacji dynamiki modelu białka Hyp-1/ANS wykorzystwała ogólnodostępny pakiet oprogramowania chemicznego do symulacji dynamiki molekuł biologicznych GROMACS 5.0.

W ramach swojej pracy Doktorantka napisała w środowisku MATLAB zestaw skryptów umożliwiających odczytywanie plików wejściowych i generujących tablice atomów nie tylko potrzebnych do dalszych obliczeń oraz wizualizacji modeli struktury, ale również do przygotowania danych do obliczeń w przestrzeni (3+1)D-wymiarowej.

Dane doświadczalne wykorzystane w rozprawie zostały opisane w rozdziale 5. Badane kompleksy zostały otrzymane i wykrystalizowane przez dr Joannę Śliwiak. Należą one do roślinnych białek typu Hyp-1 z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*). Ich

cechą charakterystyczną jest aktywność przeciwdrobnoustrojowa, związana m.in. z hydrolizą ściany komórkowej bakterii.

Do obliczeń wykorzystano pomiary dyfrakcyjne, które zostały wykonane na synchrotronie APS w USA (dla kryształów 7Hyp/ANS) oraz na synchrotronie BESSY II w Niemczech (dla kryształów 9Hyp/ANS). Struktury średnie, jak i nadstrukturę dla kompleksu z siedmiokrotną modulacją 7Hyp/ANS rozwiązała dr Joanna Śliwiak. Nieznaczne zmodyfikowanie warunków krystalizacji, tj. dodanie melatoniny podczas inkubacji roztworu krystalizacyjnego białka, prowadzi do dziewięciokrotnej modulacji struktury kompleksu białkowego (9Hyp/ANS). W przedstawionej pracy Doktorantka skupiła się na rozwiązaniu nadstruktury 9Hyp/ANS dla dziewięciokrotnej modulacji oraz struktury 7Hyp/ANS w (3+1)D-wymiarowej przestrzeni. Dużą trudność w określeniu symetrii przysporzyło zbliźniaczenie kryształów.

Opis uzyskanych przez autorkę wyników znajduje się w rozdziale 6 i składa się z trzech zasadniczych części.

W pierwszej części Doktorantka opisuje udokładnienie modelu struktury kryształu 9Hyp/ANS w ujęciu superkomórki przy użyciu konwencjonalnego oprogramowania do makromolekuł oraz porównuje go ze strukturą 7Hyp/ANS.

W drugiej części, dotyczącej szczegółowej analizy danych dyfrakcyjnych obu modulowanych kryształów Hyp-1/ANS, Doktorantka skupiła się na udokładnieniu i opisanu struktury 7Hyp/ANS w przestrzeni wielowymiarowej. W procesie udokładniania struktury 7Hyp/ANS w (3+1)D-przestrzeni Doktorantka użyła autorskie oprogramowanie stworzone w środowisku Matlab. Opracowany pakiet pozwolił również na wizualizację danych oraz wprowadzanie poprawek związanych z drganiami termicznymi sieci krystalicznej (fononami). Trzecia część dotyczy zastosowania metod dynamiki molekularnej do badania ruchów termicznych i konformacji łańcuchów bocznych białka Hyp-1 w oparciu o czysto fizyczne podejście, w oderwaniu od więzów narzucanych podczas udokładniania struktury krystalicznej. Tak uzyskane informacje pozwoliły Doktorantce określić preferowane energetycznie konformacje w obrębie białka oraz porównać je z modelem udokładnionej struktury krystalicznej.

W podsumowaniu autorka w sposób zwięzły streszcza uzyskane w pracy wyniki.

W przeciwieństwie do krystalografii struktur modulowanych małych cząsteczek, krystalografia struktur modulowanych dla białek boryka się z wieloma trudnościami. Jest to związane z dużą liczbą udokładnianych parametrów, jak i z brakiem odpowiedniego oprogramowania. Sytuacja jeszcze bardziej się komplikuje w przypadku zbliźniaczenia

kryształów białka. Dlatego wysoko oceniam wkład Doktorantki w tej dziedzinie oraz uzyskane przez nią wyniki. Doktorantka nie ustrzegła się jednak w swojej pracy błędów i niedociągnięć.

Przejrzystość pracy niepotrzebnie zakłóca brak zasady rozpoczynania głównych rozdziałów od nowej strony (rozdz. 1, 2, 6, 7, 8), jak i nieuzasadnione przerzucanie części tabel i opisów rysunków na kolejną stronę (Tab.2, Tab.4, Rys.31, Rys.33). Nie można to wytłumaczyć względami ekologicznymi, bo Doktorantka często na innych stronach zostawia puste miejsca.

Szkoda, że w pracy nie zawsze jest wyraźnie zaznaczone, czy podawane informacje dotyczą struktury modulowanej, czy struktury średniej. Problem ten można było rozwiązać wprowadzając na początku pracy odpowiednie oznaczenia dla tych struktur.

W Tab.1 brak jest informacji o błędach parametrów sieciowych (p.50). W tym miejscu należy podkreślić, że wykorzystanie informacji o parametrach sieciowych bez analizy ich błędów, do porównania struktur modulowanych 7Hyp/ANS oraz 9Hyp/ANS i wysuwanie na tej podstawie daleko idących wniosków jest mało przekonujące (p.80).

Szkoda, że najważniejszy w pracy rysunek (Rys.24a) obrazujący dane dyfrakcyjne w przestrzeni odwrotnej dla kryształu 9Hyp/ANS nie ma na Rys. 25 swojego odpowiednika, tj. rzutu wykonanego w programie CrysAlis^{Pro}, tak jak jest to przedstawione dla kryształu 7Hyp/ANS (na Rysunku 24b i 25).

W pracy doktorskiej brak jest odpowiednich tabel z istotnymi wielkościami i parametrami (tj.: liczbą refleksów, liczbą udokładnianych parametrów, czynnikami zgodności, itp.), które umożliwiłyby ocenę i porównanie uzyskanych wyników przy zastosowaniu opisu metodą struktury średniej, superstruktury i struktury niewspółmiernej oraz ocenę zalet, czy przydatności zastosowanych opisów.

W pracy trudno znaleźć też informację, czy autorce udało się wyznaczyć obsadzenia „częściowo zajętych miejsc” w udokładnianych modelach struktury (p.84).

Moje inne uwagi dotyczące pracy to:

- brak przejrzystego spisu treści, zamiast np. 4.3.1 Phaser, 4.5.2 PyMOL itp. (p.4), należało przynajmniej zasygnalizować, że chodzi o nazwy programów tym bardziej, że w pracy brak jest spisu używanych haseł i oznaczeń;
- brak konsekwencji w oznaczeniach np. dla oznaczenia nadprzestrzeni (3+1)-wymiarowej Doktorantka naprzemiennie używa oznaczeń: (3+1)D, (3 + 1)d (p.20), 3D+1 (p.106);
- autorka zbyt często w pracy posługuje się żargonem typu: „kryształ o zaburzonej temperaturze” (p.8), „zaobserwowano oznaki bliźniaczości” (p.41), „zaprzęgnięcie do pracy

komputerów” (p.9), „można ręcznie manipulować atomami” (p.15), „zbieżność do globalnego optimum” (p.41), „inne patologie krystalograficzne” (p.81), „znaczna zmienność” (p.84), „region został zamaskowany kilkoma cząsteczkami wody” (p.87), „słabo zdefiniowana cząsteczka” (p.87), „modulacja przebiega względem średniej struktury” (p.105), „regiony w krajobrazie energetycznym struktury” (p.104).

Zauważyłem również błędy w cytowaniach, np. pozycja [341] (p.55) oraz niewłaściwe przypisanie literatury na stronie 9: „Najnowszą metodą wyznaczania struktury jest technika charge flipping, zaproponowana po raz pierwszy w 2004 roku [8].” Metodę charge flipping zaproponowali Oszlányi i Sütő, natomiast L. Palatinus zaadaptował ją w swoim programie Superflip w 2007.

W rozprawie znalazłem również wiele innych drobnych błędów językowych i drukarskich.

Błędy te, jak i zawarte w powyższej recenzji uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny przedłożonej rozprawy.

Należy podkreślić, że praca porusza liczne trudne i nowe zagadnienia, związane z analizą struktury modulowanej w białkach. Wprowadzony przez autorkę opis metod obliczeniowych, a także zaprezentowane wyniki wskazują na dobrą znajomość i pełne zrozumienie poruszanych zagadnień.

Autorka ma również znaczący dorobek naukowy: oprócz dwóch publikacji dotyczących pracy doktorskiej, gdzie jest pierwszym autorem, jest również współautorką dwóch innych publikacji z listy filadelfijskiej. W dorobku Doktorantki jest 13 prezentacji i posterów na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Jest laureatką dwóch nagród: za najlepszy poster (Konwersatorium Krystalograficzne we Wrocławiu w 2018) i najlepszą prezentację (ECMetAC Days w 2021).

Odbyła dwumiesięczny staż na Wydziale Chemii UAM oraz pięć innych krótkich staży lub warsztatów naukowych.

Była kierownikiem grantu: Przesuwanie granic krystalografii: ku zrozumieniu modulacji struktury w układach makromolekularnych, grant NCN PRELUDIUM nr 2020/37/N/ST3/01501 oraz wykonawcą grantu: Badania strukturalne kwazikryształów dekalgonalnych i ikozaedrycznych - nieporządek atomowy, budowa klastrowa i własności fizyczne, grant NCN OPUS nr 2019/33/B/ST3/02063.

Wnioski końcowe.

Wyniki rozprawy doktorskiej Pani magister wnoszą istotny wkład w badania własności i struktury materiałów oraz zasługują na wysokie uznanie. Z nadmiarem spełniają warunki stawiane w ustawie o stopniach naukowych. Rozprawa doktorska wskazuje na dojrzałość naukową Autorki, dużą wiedzę teoretyczną, jak i dobre przygotowanie w zakresie metod obliczeniowych. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Śmietańskiej do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

Katowice 2023.08.10

