



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

15 września, 2021

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 683
<https://bionano.cent.uw.edu.pl>

Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Krzysztofa Bojarskiego

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Bojarskiego jest zatytułowana „*Computational approaches to study protein-glycosaminoglycan systems*” i została wykonana pod kierunkiem dra hab. Sergeya Samsonova oraz promotor pomocniczej dr Martyny Maszoty-Zieleniak w Zakładzie Chemii Teoretycznej, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego.

Temat badawczy poruszony w rozprawie dotyczy glikozaminoglikanów (w skrócie GAG) i zbadania metodami obliczeniowymi ich właściwości dynamicznych oraz oddziaływania z kilkoma białkami. GAG to długie liniowe polimery cukrowe pełniące różne funkcje w macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie poprzez oddziaływanie z białkami. Rola oddziaływań białko-GAG jest istotna biologicznie, zaburzenia tych oddziaływań są podstawą wielu chorób, jednak niewiele jest badań obliczeniowych takich układów. Wynika to z faktu, że grupy cukrowe w polimerach GAG mają dużą swobodę rotacyjną, więc próbkowanie przestrzeni konformacyjnej układów z GAG wymaga dłuższych symulacji niż standardowe symulacje typowych globularnych białek. Dodatkowo, ruchliwość wewnętrzna tych polimerów utrudnia przewidywanie struktur kompleksów GAG z białkami. Kolejną sprawą jest odpowiednie dobranie parametrów pola siłowego używanych w symulacjach dynamiki molekularnej. Cząsteczki te są ujemnie naładowane i polarne, więc istotne znaczenie ma ich oddziaływanie nie tylko z receptorami, ale także z cząsteczkami wody. Oznacza to, że sposób reprezentacji cząsteczek wody w symulacjach powinien być odpowiednio przemyślany i przetestowany, zwłaszcza w symulacjach dynamiki molekularnej.

Rozprawa doktorska mgra Bojarskiego została napisana w języku angielskim i jest napisana poprawnie językowo. Praca ma standardowy układ. Całość jest spójna i jasno napisana.

Pierwszy główny rozdział to Wstęp, w którym autor opisuje szczegółowo GAG, ich miejsce występowania, istotne białka z którymi GAG oddziałują, metody doświadczalne oraz obliczeniowe służące do badania GAG i oddziaływań GAG-białko. Autor skupił się na kilku białkach, z którymi GAG oddziałują i zaburzenie tego oddziaływania skutkuje różnymi chorobami. Białka oddziałujące z GAG to między innymi proteazy o nazwie katepsyny. GAG może bezpośrednio blokować miejsce wiązania substratu do katepsyn, dysocjację produktów, czy działać allosterycznie. Kolejne białka, które

są opisane w rozdziale wstępnym to czynniki wzrostu, zwłaszcza czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) oraz chemokiny. Podoba mi się, że cechy GAG lub białek z nimi oddziałujących zostały usystematyzowane w tabelach. Na przykład w pracy jest tabela pokazująca rolę katepsyn w rozwoju chorób. To podkreśla złożoność systemów i ułatwia zrozumienie aspektu biologicznego badań.

W jednym z podrozdziałów Wstępu mgr Bojarski opisuje też metody doświadczalne służące do uzyskania informacji strukturalnej na temat kompleksów białek z GAG, a także inne techniki, których używano do badań układów zawierających GAG – powierzchniowy rezonans plazmonowy, spektroskopię dichroizmu kołowego czy fluorescencyjną. Jedną z metod jest krystalografia roentgenowska, dzięki której zidentyfikowano miejsca wiązania krótkich GAG w różnych białkach. Struktury takie posłużyły jako struktury wstępne do symulacji przeprowadzonych przez autora rozprawy. Autor podkreśla fakt, że metody doświadczalne dla układów z GAG są kosztowne oraz obiekty te są trudnymi układami do symulacji.

Kolejny podrozdział Wstępu jest poświęcony metodom obliczeniowym. Tutaj też autor skupia się na wyzwaniach związanych z tym, że symuluje polisacharydy. Podrozdział ten zawiera krótki przegląd badań obliczeniowych dla układów zawierających GAG. Mgr Bojarski najpierw opisuje metody i oprogramowanie służące do przewidywania struktur kompleksów białko-GAG (tzw. dokowania GAG do białek) i dotychczasową literaturę na ten temat. Następnie skupia się na pełnoatomowej dynamice molekularnej oraz modelach gruboziarnistych. Dla tych ostatnich jest niewiele pól siłowych czy prac dotyczących badanych polimerów GAG. Opis metod jest bardziej przeglądem literatury i problemów związanych z symulacjami GAG niż samej teorii metod i jest napisany raczej ogólnikowo w formie publikacyjnej. Jedyna część, która została opisana bardziej szczegółowo to podrozdział 1.5.5, który dotyczy metod obliczeniowych wyznaczania czy raczej szacowania energii swobodnej wiązania.

W rozdziale 2 autor rozprawy przedstawia cele pracy. Celem pracy naukowej mgra Bojarskiego było zastosowanie i rozwój efektywnych metod symulacji do badania oddziaływania kilku istotnych biologicznie białek z glikozaminoglikanami. Cele szczegółowe to między innymi zbadanie i zrozumienie mechanizmów oddziaływania różnych katepsyn z GAG oraz zrozumienie jak te oddziaływania w przypadku katepsyny V wpływają na rozwój mukopolisacharydozy (dziedzicznej choroby, w której dochodzi do gromadzenia w tkankach mukopolisacharydów). Dodatkowo, autor rozprawy zbadał jak fosforylacja GAG wpływa na ich oddziaływanie z wybranymi białkami.

W rozdziale 3 podsumowane są główne wyniki zawarte w publikacjach, które są częścią rozprawy doktorskiej. Autor włączył do rozprawy sześć publikacji wydrukowanych w latach 2019-2021. Są to prace, które ukazały się w wysoko notowanych dla dyscypliny nauki chemiczne czasopismach z listy *Journal Citation Reports* o wskaźniku oddziaływania (tzw. *impact factor*, IF) między 2.5 a 9.4.

Praca D1, która ukazała się w *BBA – Proteins and Proteomics* w roku 2020 dotyczy wpływu polisacharydu o nazwie C4-S na aktywność enzymatyczną szczurzej i ludzkiej katepsyny K. Uważa się, że wiązanie C4-S do katepsyny ułatwia działanie enzymu ludzkiego, ale nie szczurzego. Dokowania, symulacje dynamiki molekularnej i porównanie elektrostatyki kompleksów obydwu katepsyn z GAG pozwoliły doktorantowi zaproponować wyjaśnienie tego efektu. Symulacje autora były w tej pracy istotnym dopełnieniem badań doświadczalnych przeprowadzonych przez grupy z Francji i Indii.

Praca D2 jest pracą czysto obliczeniową i została opublikowana w *Journal of Chemical Information and Modeling* w roku 2020. W tej pracy mgr Bojarski i współautorzy opisują oddziaływania między prokatepsyną B a różnymi glikozaminoglikanami (o różnej długości czy stopniu uprotonowania siarczanu). Stosowane techniki opierały się o wyznaczenie potencjału elektrostatycznego, dokowanie, pełnoatomową dynamikę molekularną, dynamikę gruboziarnistą z wymianą replik oraz polem siłowym UNRES, analizę trajektorii przy wykorzystaniu metody MM-GBSA, czy analizę głównych kierunków ruchu. Mgr Bojarski na podstawie symulacji stwierdził, że GAG stabilizuje taką konformację prokatepsyny B, w której miejsce aktywne jest łatwo dostępne dla substratu. GAG najprawdopodobniej wiąże się więc do aktywnej konformacji prokatepsyny B. Autor zaproponował więc mechanizm oddziaływania GAG z prokatepsyną B w kontekście działania tego enzymu.

Kolejna praca, D3, jest pracą doświadczalno-obliczeniową i została opublikowana w tym roku w wysoko notowanym czasopiśmie *Carbohydrate Polymers*. Projekt był realizowany we współpracy z grupami we Francji, Kanadzie i USA. Dotyczył zbadania, dlaczego siarczany heparanu akumulują się u pacjentów chorych na mukopolisacharydozę. Sugerowano, że wysokie stężenia siarczanu heparanu są spowodowane niepoprawnym działaniem katepsyny V. Autor przeprowadził więc dokowania i symulacje dynamiki molekularnej kompleksu katepsyny V z siarczanem heparanu. Stwierdził, że ta cząsteczka po związaniu w miejscu aktywnym katepsyny V może blokować aktywność katepsyny co jest istotne z punktu widzenia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tej choroby.

Praca D4 została opublikowana w roku 2019 w czasopiśmie *Journal of Molecular Structure* i mgr Bojarski jest pierwszym autorem tej pracy. Projekt był we współpracy z grupami doświadczalnymi w Niemczech. Celem było scharakteryzowanie struktury i właściwości ufosforylowanych GAG. Sztuczna fosforylacja GAG mogłaby zablokować oddziaływania GAG z białkami, co może być przydatne w zapobieganiu niektórym chorobom. Dodatkowo, takie ufosforylowane GAG powinny być stabilne, gdyż nie powinny być rozpoznawane przez odpowiednie glikozydazy. W pracy scharakteryzowano wolne ufosforylowane GAG oraz w kompleksie z czynnikami wzrostu FGF-1, FGF-2 i katepsyną K. Stwierdzono, że ufosforylowane GAG są sztywniejsze (mniej dynamiczne wewnętrznie), niż GAG z resztą siarczanową, ale tworzą stabilne kompleksy z białkami. Autor zbadał też jak stopień uprotonowania grupy fosforanowej wpływa na tworzenie kompleksów i ruchliwość GAG.

Następna praca, D5, która jest częścią rozprawy doktorskiej to praca obliczeniowa opublikowana w 2019 roku w *Biopolymers*, w której mgr Bojarski też jest pierwszym autorem. Tematyka pracy dotyczy badań nad heparyną, znanym lekiem przeciwzakrzepowym i jej kompleksem z czynnikiem wzrostu fibroblastów FGF-1. W tych badaniach autor przeprowadził znacznie dłuższe, mikrosekundowe symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej, aby sprawdzić jak długość symulacji wpływa na ruchliwość i konformacje pierścieni heparyny. Przeanalizował dogłębnie dynamikę konformacyjną i energetykę wiązania heparyny do FGF-1. Autor zaproponował także, że mechanizm wiązania heparyny do czynnika wzrostu może być opisany jako mechanizm selekcji konformacyjnej.

Ostatnia praca z cyklu, D6, to praca dwuautorowa, w której mgr Bojarski jest pierwszym autorem i która została opublikowana w roku 2021 w *Journal of Chemical Theory and Information*. Autor rozprawy stosując symulacje dynamiki molekularnej, zbadał wpływ ułożenia grup siarczanowych glikozaminoglikanu oraz długości polimeru na jego oddziaływanie z białkiem. Okazało się, że orientacja GAG może mieć wpływ na jego wiązalność do białka. Stabilność kompleksu wzrastała wraz

ze wzrostem łańcucha GAG, co jest zgodne z wynikami doświadczalnymi. Stwierdził również, że jest możliwa zmiana ułożenia heparyny w miejscu wiązania, co wskazuje na możliwość dwukierunkowego wiązania heparyny do białka.

Kolejny czwarty rozdział stanowi krótkie podsumowanie i perspektywy.

Następna sekcja rozprawy to Literatura. W tej bibliograficznej części autor odwołuje czytelnika do 263 pozycji literaturowych, głównie z listy *Journal Citation Reports*. W załączniku znajdują się kopie 6 prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów i pozwolenia od wydawców na umieszczenie prac w rozprawie doktorskiej autora.

Po przeczytaniu rozprawy ciekawa jestem zdania autora dotyczącego kilku kwestii przedstawionych poniżej.

str. 29 Autor przedstawia wyzwania związane z przeprowadzeniem symulacji dla układów z GAG. Interesuje mnie, dlaczego ograniczeniem czy trudnością jest to, że oddziaływania GAG z białkami są napędzane elektrostatyką oraz fakt, że GAG oddziałuje z wodą. We wszystkich układach biologicznych ligandy oddziałują z wodą i są też często naładowane? Skoro metoda PBSA jest w stanie dobrze przewidzieć miejsca wiązania w modelu ciągłym wody to chyba akurat te dwa punkty na str. 29 nie mogą być potraktowane jako wyzwania, czy się mylę?

Dodatkowo, co oznacza sformułowanie „there is a lack of computational tools”. Jakie narzędzia do symulacji GAG, czy ich kompleksów, nie były dostępne dla autora?

Jeśli GAG mają pojedyncze wiązania między pierścieniami powodujące dużą swobodę rotacyjną i naładowane podjednostki cukrowe to czy ma sens stosowanie modeli gruboziarnistych do ich symulacji? Jeśli tak to jakie te modele mają ograniczenia?

W przypadku szacowania energii wiązania GAG z białkami autor używał metody MM-PBSA albo MM-GBSA. Skąd wynikała różnica i czy metoda MM-PBSA sprawdziła się dla tak naładowanych ligandów jak GAG?

Autor nie uniknął pewnych przejęzyczeń językowych oraz błędów edytorskich. Niektóre z racji roli recenzenta pracy wypisuję poniżej. Nie wpływają one jednak na ocenę merytoryczną rozprawy i nie utrudniają czytania, czy zrozumienia jej głównych aspektów.

Streszczenie, str. 9 – powinno być polisacharydy

str. 9 razi mnie słowo „studiów” i jest kalką z angielskiego „studies”. Po polsku napisałabym przeprowadzono wiele badań lub prościej zbadano, a nie „przeprowadzono wiele studiów” czy „przeprowadzone studia”. Streszczenie pracy w języku polskim wygląda na tłumaczone przez automat typu google translator czy deepl niż napisane przez autora.

str. 9 podobnie nie znam polskiego słowa fleksybilnych, raczej ruchliwych

rys 2. słaba jakość CO₂ czy SO₂ na wydruku

str. 16 powinno być „reaction of”

str. 23 powinno być „Chemokines bind”

str. 25 powinno być "biological role of protein-GAG"

information jest rzeczownikiem niepoliczalnym w tym użyciu, które pojawia się w pracy, np. str. 26 czy 28.

w zdaniach złożonych pojawia się which zamiast whose, autor powinien zastosować inną konstrukcję zdania. Np. str. 31, ... with various programs, which performance..., czy str. 36 ...free energy calculations, which results might..., str. 42 ... subsection focuses on a specific study, which detailed results are included...,

brakuje przedimków np. str. 32 przed słowem ligand lub są niepoprawne np. str. 32 „a large ligands”, str. 31 „a increasing size”

str. 34 powinno być "investigated experimentally" (with powinno być wykreślone)

str. 38 "as a results" jest niepoprawne

str. 37 nie wszystkie skróty są wyjaśnione, np. SASA w równaniu (4)

str. 43 powinno być „crystallographic structure”

str. 48 „there was a data” nie jest poprawne

str. 48 powinno być „The differences were”

str. 48 powinno być "for the other”

str. 55 powinno być "involvement of cathepsins”

Zgodnie z wymaganiami autor umieścił w rozprawie także oświadczenia swoje i współautorów dotyczące udziału w pracach zawartych w rozprawie doktorskiej. Z oświadczeń wynika, że w pracach, w których autor jest pierwszym autorem jego udział był dominujący. W innych pracach, które łączą badania doświadczalne i obliczeniowe udział także jest jasny, gdyż mgr Bojarski wykonywał i opisywał część symulacyjną i obliczeniową. W pracy D2 mgr Bojarski jest wymieniony także jako autor korespondencyjny (oprócz ostatniego autora jako szefa laboratorium).

Chciałabym podkreślić, że dorobek naukowy pana Krzysztofa Bojarskiego jak na osobę z krótkim stażem naukowym i kończącą doktorat jest wyróżniający. Pan Bojarski jest współautorem dziewięciu prac z listy *Journal Citation Reports* oraz jednej pracy do polskiego Wydawnictwa Młodzi Naukowcy. Prace są wieloautorowe ale w pięciu z tych prac pan Bojarski występuje jako pierwszy autor. Prace były już cytowane po kilka razy, mimo, że zostały opublikowane niedawno. Pan Bojarski realizował także grant Preludium Narodowego Centrum Nauki, którego był kierownikiem. Brał też udział w dwóch innych projektach NCN jako wykonawca. Otrzymał też dwa razy wewnętrzne finansowanie z Uniwersytetu Gdańskiego w ramach konkursów na badania dla młodych naukowców. Odbił też dwa krótkie staże za granicą. Miał też sześć wystąpień ustnych na różnych konferencjach oraz zaprezentował kilka plakatów. Dorobek ten wykracza poza standardowy dorobek doktoranta i zdecydowanie się wyróżnia.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgra stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza jego wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk chemicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Kamila Bojarskiego spełnia więc warunki ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Krzysztofa Bojarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, że dorobek mgra Bojarskiego zdecydowanie wykracza poza standardowe wymagania stawiane doktorantom. Wyniki przedstawione w rozprawie dotyczą trudnego problemu zbadania oddziaływania glikozaminoglikanów z różnymi białkami i oceny roli biologiczno-medycznej

takiego oddziaływania. Biorąc pod uwagę wnikliwe podejście autora do symulacji i ich analiz, ogromny nakład pracy, użyteczność badań dotyczących sprawdzenia pola siłowego glikozaminoglikanów i protokołów symulacji dynamiki molekularnej i energetyki oddziaływania tych związków, dominujący wkład autora w publikacje wyników badań uważam, że praca doktorska mgra Krzysztofa Bojarskiego zasługuje na wyróżnienie. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Krzysztofa Kamila Bojarskiego.


