

Gliwice, 31.05.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Glanowskiego

zatytułowanej: „**Modelowanie mechanizmu reakcji bakteryjnych dehydrogenaz ketosteroidowych – katalizatorów do modyfikacji leków steroidowych**” Recenzja przygotowana została na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk, z dnia 30 marca 2023 r. Opiniowana praca doktorska powstała pod opieką naukową prof. dr hab. Macieja Szaleńca (IKiFP PAN) i prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego (IF PAN).

1. Uwagi wstępne.

Recenzowana Rozprawa obejmuje badania teoretyczne możliwych mechanizmów reakcji 1,2-dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe z bakterii *Rhodococcus erythropolis* i *Sterolibacterium denitrificans*, poszerzonych o analizę funkcji unikalnej „pętli” w jednym z analizowanych enzymów. Badania teoretyczne zostały skonfrontowane z wynikami eksperymentalnymi, i co należy szczególnie podkreślić, pozwoliły na wyjaśnienie szeregu potencjalnie sprzecznych obserwacji eksperymentalnych, między innymi zmuszając zespoły badawcze do reinterpretacji wyników i poszukiwania nowej drogi eksperymentalnej analizy aktywności badanych enzymów względem niektórych substratów. Należy podkreślić, że w swoich badaniach Doktorant z sukcesem opanował i wykorzystywał szeroki wachlarz nowoczesnych metod obliczeniowych wykorzystywanych w dziedzinie chemii i biologii.

Praca skonstruowana jest w formie komentarza do cyklu 4 publikacji: rozdziału w recenzowanej książce, oraz 3 artykułach naukowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej. Artykuły te cytowane są już 12 razy (wg Google Scholar). Szczególnie mocną stroną dysertacji są publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych ze znaczącym wskaźnikiem cytowani (ACS Catalysis (CiteScore 20.8, 95% percentile w General Chemistry) Microbial Cell Factories (CityScore 8.9) oraz Biochemistry (CityScore 6.2), w których Doktorant jest pierwszym bądź drugim autorem. Manuskrypt, który liczy 62 strony uzupełniony jest o spis osiągnięć Doktoranta (warsztaty, szkolenia, konferencje, publikacje, itp.) oraz oświadczenia współautorów publikacji, wchodzących w cykl doktorski. Na uwagę zasługuje bogaty dorobek Doktoranta, poza wskazanym cyklem publikacji, jest on współautorem dalszych 4 artykułów, szeregu prezentacji konferencyjnych (w tym 4-rech ustnych, co biorąc pod uwagę okres pandemii, jest imponującym dorobkiem), jak również uczestniczył w zagranicznych stażach naukowych.

2. Omówienie i ocena zawartości rozprawy.

W części zasadniczej komentarz zawiera (i) wstęp, który wprowadza czytelnika w problematykę Rozprawy, (ii) cel pracy, (iii) opis metod obliczeniowych stosowanych przez Doktoranta, (iv) dyskusję wyników badań własnych oraz (v) spis literatury.

Tekst dysertacji otwiera rozdział z wprowadzeniem obejmujący krótki opis badanych enzymów, z szeroko rozwiniętym rozdziałem opisującym stan wiedzy o mechanizmie reakcji katalizowanej przez Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe poszerzonym o informację o specyficzności substratowej i analizę różnic strukturalnych pomiędzy dwoma poznanymi strukturami enzymów. Wprowadzenie zawiera również rozdziały opisujące kinetyczny efekt izotopowy oraz izotopowy efekt wiązania. Kolejny rozdział przedstawia jasno zdefiniowane cele pracy, co istotne wraz z krótkim ich omówieniem i argumentacją.

Kolejny rozdział to omówienie metod obliczeniowych, w rozdziale tym Doktorant opisuje w stosunkowo krótki i przejrzysty sposób metody QM/MM, metody półempiryczne, informacje o potencjale średniej siły i poprawkach interpolacyjnych. W ostatnim podrozdziale przedstawia także bardzo użyteczny schemat obliczeniowy zastosowany do modelowania badanych enzymów. Kolejny podrozdział przedstawia skrócone opis rozdziału, będącego jednocześnie pierwszym z artykułów stanowiących cykl publikacji, z informacją zarówno o wkładzie Doktoranta w pracę P1, jak i informacją, że artykuł ten stanowi opis metod stosowanych w pracy.

Następny rozdział omawia główne wyniki pracy i podzielony jest na 3 podrozdziały odpowiadające pracom P2-P4. Każdy z rozdziałów zaczyna się od omówienia wkładu Doktoranta w powstawanie pracy, związłym przedstawieniem i omówieniem otrzymanych wyników, oraz krótkim podsumowaniem pozwalającym w bardzo jasny i przejrzysty sposób ocenić wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. W opisie pracy P2 moją szczególną uwagę zwróciła rzadko spotykana sytuacja, w której badania teoretyczne zmusiły zespół badaczy eksperymentalnych do powtórnej weryfikacji wyników analiz i poszukiwania nowych sposobów analizy aktywności KSTD1 wobec substratów o niskiej rozpuszczalności w wodzie. Praca P3, słusznie została określona przez Doktoranta jako najważniejsza z całego cyklu. Jest ona bardzo obszernie opisana i w przekonujący sposób dokumentuje biegłość Doktoranta w wykorzystaniu narzędzi chemii obliczeniowej do analizy złożonych układów biologicznych, interpretacji otrzymanych wyników i ich konfrontacji z wynikami badań eksperymentalnych. Na szczególną uwagę zasługują zarówno eleganckie podejście do analizy profilu energetycznego reakcji i wybór najbardziej prawdopodobnego mechanizmu reakcji jak i przeprowadzone szczegółowe analizy kinetycznego efektu izotopowego oraz izotopowego efektu wiązania. Z kolei w pracy P4, Doktorant przeprowadził szerokie badania teoretyczne struktury nowo otrzymanej struktury enzymu AcMB, poszerzonej o analizę wpływu wybranych mutacji na profile energetyczne katalizowanej reakcji. Dodatkowo, zaproponowano funkcję domeny związanej z błoną w stabilizacji kompleksu E:S dla substratów o rozbudowanych podstawnikach przy C17. Rozprawę kończy spis literatury obejmujący 44 pozycje.

3. Ocena redakcji pracy.

Rozprawa napisana została w języku polskim. Pod względem edytorskim praca jest niespójna, zaskakujący jest w szczególności jej układ w którym, moim zdaniem, czasami bardzo trudno odnaleźć się jest czytelnikowi. Różne fragmenty rozprawy prezentują także dość szerokie spektrum szczegółowości, część poruszanych tematów została opisana niezwykle szczegółowo, niektóre bardzo skromnie, wreszcie inne, potencjalnie istotne, zostały pominięte. Dodatkowym problemem jest fakt braku numeracji rozdziałów i podrozdziałów, które ułatwiłyby poruszanie się po Rozprawie. Chciałbym zauważyć, że praca nie zawiera żadnych znaczących błędów merytorycznych, jednak jej forma i układ utrudniają odbiór wprowadzając często chaos i zmuszając czytelnika do częstego poszukiwania informacji we wcześniejszych lub dalszych

rozdziałach. Wymienione poniżej, dla porządku, mankamenty nie umniejszają jednak wartości recenzowanej Rozprawy:

1. Jak wspomniałem powyżej, zastrzeżenie moje budzi układ pracy, jej struktura, przykładowo, na równym poziomie traktowany jest podmiot badań, to jest badany enzym i katalizowana przez niego reakcja, jak i ogólne informacje o bardzo szczegółowych analizowanych problemach (efektach izotopowych). Taki układ powoduje, że w mojej opinii czytelnik nie ma jasnego obrazu obszaru badawczego analizowanego przez Doktoranta.
2. Wspomniany brak numeracji utrudnia w szczególności poruszanie się po opisanych metodach, z jednej strony część metod opisana jest w podrozdziałach, z drugiej strony Doktorant wprowadza schemat blokowy zastosowany do modelowania enzymów, a w kolejnym podrozdziale ponownie informuje czytelnika, że sam artykuł P1 stanowi opis metod stosowanych w pracy.
3. Dodatkowo wspomniany brak numeracji, najprawdopodobniej utrudnił samemu autorowi organizację Rozprawy. Treść „Podsumowania” (str. 58) świadczy, że podrozdział ten powinien być oddzielnym rozdziałem przedstawiającym w skondensowany sposób osiągnięcia całej rozprawy, tym czasem jego układ sugeruje, że jest to podsumowanie publikacji P4.
4. Doktorant mocno zawęził definicję metod obliczeniowych, tylko do metod służących rozwiązaniu równania Schrödingera (str. 25). Jednocześnie sam w swoich badaniach stosował metody dynamiki molekularnej oraz bardziej zaawansowane protokoły jak choćby MMPBSA (wyniki praca P2, str. 38, praca P4, str. 53-54). Mimo ich wykorzystania w prowadzonych przez siebie badaniach, brak w Rozprawie choćby krótkiego ich opisu, czytelnik zmuszony jest sięgać do publikacji źródłowej.
5. Nie znalazłem nigdzie informacji, że Doktorant wybiórczo zamieszcza materiały dodatkowe do artykułów, przykładowo w publikacji P4, brakuje szeregu rycin, domyślam się, że kluczem do ich wyboru, był bezpośredni udział Doktoranta w danego typu badaniach?
6. W Rozprawie znajduje się szereg wtrąconych zdań, które bez rozwinięcia nie wnoszą dodatkowej treści i trudno określić, jakiemu celowi miały służyć, lub też, zostawiają czytelnika bez wskazówki, wyjaśnienia, przykładowo:
 - a. str. 15 – „*Znane sekwencje Δ^1 -KSTD są względnie zróżnicowane, w pracy Rohmana i Dijkstry z 2019 roku wyróżniono 4 klasy enzymów*” – co Doktorant rozumie jako klasę enzymów, czy analizowane enzymy należą do tej samej czy różnych klas?
 - b. str. 17 – „*W niniejszej pracy zdecydowana większość uwagi jest poświęcona etapowi RHR*” – dlaczego?
 - c. str. 22 – „*Warto zauważyć, że do wyznaczenia różnic (...) nie ma potrzeby, aby wyznaczać je osobno. Do tego celu wystarczy znajomość poprawek wibracyjnych dla obydwu układów.*” – dlaczego? Czytelnik dowiaduje się na stronie 35.
7. Moje zastrzeżenie budzi wysuwanie zbyt daleko idących wniosków, lub niespójność w argumentacji, przykładowo:
 - a. str. 17 – „*po pierwsze Δ^1 -KSTD katalizują 1,2-odwodornienie w warunkach beztlenowych, podczas gdy wiele enzymów katalizujących dehydratację wymagają tlenu cząsteczkowego w celu przeprowadzenia hydroksylacji*” – wiele nie oznacza wszystkie, każdy wyjątek obalałby wskazany argument,
 - b. str. 18 – „*Te przesłanki doprowadziły jeszcze w latach 60-tych do sformułowania hipotezy ...*” – wśród przesłanek znajdują się odniesienia do pracy z lat 90-tych (zacytowana pozycja 11),
 - c. str. 19 – „*Co ciekawe, mutacja Y119F okazała się jeszcze bardziej znacząca, skutkując spadkiem aktywności do około 0,5%.*” – mutacja Y119F zgodnie z przedstawionymi danymi nie jest bardziej znacząca od wcześniej wymienionej mutacji Y318F, która doprowadziła do całkowitej utraty aktywności,
 - d. str. 20 – „*Eksperymenty z innymi grupami funkcyjnymi w tej pozycji wykazały brak aktywności związków w reakcji 1,2-odwodornienia*” – niezbyt fortunne sformułowanie.

4. Tematy do dyskusji

Wymieniam poniżej kilka tematów i uwag, do których Doktorant może ustosunkować się podczas obrony pracy:

1. Jaki wpływ na szacowaną barierę reakcji mogą mieć czynniki entropowe oraz energia solwatacji/desolvatacji?

2. W ramach pracy P4 dokonana została analiza ewolucyjna badanych enzymów. Które z aminokwasów poza aminokwasami centrum aktywnego charakteryzuje największa konserwatywność, czy jest ona związana z aktywnością, selektywnością, czy zachowaniem prawidłowego sfałdowania białka?

5. Wniosek końcowy.

Jak wspomniałem w punkcie 3, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w sposób utrudniający czytelnikowi poruszanie się zarówno w jej obrębie, jak i w obrębie prac, które same w sobie stanowią spójny cykl. Zastrzeżenia budzi przede wszystkim wybiórcze podejście do wykorzystanej w pracach metodologii, jak również szereg niedopowiedzeń, które zmuszają czytelnika do sięgania do dodatkowych źródeł literaturowych. Doktorant nie uniknął również pewnych niespójności i uogólnień. Jak podkreślono jednak w recenzji, poziom badań naukowych nie budzi zastrzeżeń, czego dowodem jest między innymi opublikowanie wyników badań w czasopismach o ugruntowanej renomie.

Oceniając wysoko poziom badań naukowych będących podstawą recenzowanej Rozprawy, w podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Michała Głanowskiego „Modelowanie mechanizmu reakcji bakteryjnych dehydrogenaz ketosteroidowych – katalizatorów do modyfikacji leków steroidowych” oparta jest o oryginalny, bogaty i wartościowy dorobek naukowy i spełnia z nadatkiem wszelkie wymagania określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Michała Głanowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.