

Data: Toruń, 25 marca, 2020

L. Dz.

Wpłynęło dnia 2020-04-20

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Katedra Biofizyki
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5
(wiesiek@fizyka.umk.pl)

**RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr. Krzysztofa Kuchty pt.**

**“Applications of homology modeling to study the function of proteins
and their interactions with ligands”**

Fizyka oparta jest na modelach. Modelowanie układów złożonych, w szczególności biopolimerów, jest trudne. Przyczyną jest wielka liczba stopni swobody, indukująca, m.in., bogactwo konformacji przestrzennych. Funkcje biologiczne białek w krytycznym stopniu zależą od ich struktury przestrzennej. Pewna wiedza o konformacjach pozwala zrozumieć zjawiska biologiczne. Byłoby pięknie znać struktury 3D form funkcjonalnych wszystkich rodzajów białek obecnych w organizmach żywych. Niestety, chociaż sekwencji białek poznano jak dotąd ponad 10^8 , to struktur przestrzennych 3D określonych doświadczalnie znamy ok. 100 000, tj. mniej niż 1 promil. Dlatego duże znaczenie w naukach biologicznych mają metody modelowania, które pozwalają z dobrym prawdopodobieństwem przewidywać nieznane struktury przestrzenne w oparciu o podobieństwo sekwencyjne (czyli kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym) do białek pokrewnych o znanych strukturach. Modelowanie to korzysta z aparatu formalnego chemii i fizyki oraz algorytmów komputerowych. Metody takiego właśnie modelowania homologicznego, wykorzystywane w recenzowanym doktoracie, są uprawiane i rozwijane w grupach biologii obliczeniowej, chemii obliczeniowej, bioinformatyki, a także biofizyki, ponieważ mają one charakter interdyscyplinarny. Przedłożona mi do recenzji rozprawa, złożona z 4 wieloautorskich publikacji opatrzonych wstępem, chociaż skupiająca się na badaniu właściwości kilku rodzin białek, ma wspólny mianownik biofizyczny. W każdej z prac zastosowano komputerowe modelowanie homologiczne do starannej analizy nieznanych struktur przestrzennych oraz szczegółowych oddziaływań fizycznych ligandów i pewnych krytycznych obszarów białek: czynników inicjacji translacji i pewnych polimeraz (poly-A). Rozprawa ta lokuje się zatem w szeroko rozumianym obszarze nauk fizycznych.

Zwykle w tym miejscu recenzji opisuję cel doktoratu i oceniam czy został on zrealizowany. Niestety, p. mgr Krzysztof Kuchta we wprowadzeniu do swego dzieła w zasadzie takiego celu nie sformułował, jedyne co znalazłem to zdanie: „*In my studies I used homology modeling to investigate the function of proteins and their interactions with ligands*”. Po uważnej lekturze publikacji mogę zaproponować słabo zwerbalizowaną, ale w praktyce udowodnioną tezę: metody modelowania homologicznego mogą być bardzo użytecznym narzędziem pomocniczym w interpretacji wyników doświadczeń biochemicznych, ulepszaniu specyficzności enzymów i ocenie prawdopodobnych funkcji biologicznych białek o znanej sekwencji, a nieznanej roli w organizmach żywych. W swoich publikacjach doktorant pokazał, że

umiejętnie zastosowane modelowanie homologiczne działa, więc uznaję, że cel doktoratu został osiągnięty. Podkreślam przy tym, że nowością nie jest rozwój nowych metod modelowania homologicznego, a raczej ich twórcze zastosowanie do badania nowych klas białek, nigdy wcześniej w ten sposób nie badanych. Drobne zastrzeżenie mam do tytułu rozprawy – jest on wg mnie zbyt ogólny: nie precyzuje ani o jakie białka chodzi, ani nawet o jakie typy ligandów.

Praca doktorska powstała na Wydziale Fizyki i w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem Panów dr hab. Krzysztofa Ginalskiego i prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza. Napisana jest w języku angielskim (poprawnym), składa się z Wprowadzenia (*Introduction* - 22 strony), czterech prac opublikowanych w renomowanych czasopismach międzynarodowych w latach 2015-2019:

1. **BBRC:** *Five eIF4E isoforms from Arabidopsis thaliana are characterized by distinct features of cap analogs binding;*
A Kropiwnicka, **K. Kuchta**, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Jemielity, ...
Biochemical and biophysical research communications 456 (1), 47-52.
2. **BBA:** *Diverse cap-binding properties of Drosophila eIF4E isoforms;*
J. Zuberek, K. Kuchta, Greco Hernández, Nahum Sonenberg, K. Ginalski
Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1864(10), 1292-1303.
3. **RNA:** *Biochemical and structural bioinformatics studies of fungal CutA nucleotidyltransferases explain their unusual specificity toward CTP and increased tendency for cytidine incorporation at the 3'-terminal positions of synthesized tails;*
K. Kobylecki, **K. Kuchta**, A. Dziembowski, K. Ginalski, and R. Tomecki
RNA. 23(12) (2017) 1902–1926.
4. **NAR:** *FAM46 proteins are novel eukaryotic non-canonical poly(A) polymerases;*
K. Kuchta, A. Muszewska, L. Knizewski, K. Steczkiewicz, L. S. Wyrwicz, K. Pawlowski, L. Rychlewski, K. Ginalski;
Nucleic Acids Research, Volume 44, Issue 8, 5 May 2016, Pages 3534–3548,

Liczą one odpowiednio BBRC - 5 stron, BBA 11 stron, RNA – 24 strony, NAR- 14 stron drobnego druku. Każda publikacja ma suplement, niekiedy b. obszerny (np. RNA ok. 25 str.). Załączone są też wymagane prawem oświadczenia współautorów nt. ich udziału we wspólnych publikacjach. Nie budzą one moich zastrzeżeń. Pan K. Kuchta jest 3 razy drugim autorem i raz pierwszym (NAR), Jego wkład jest jasno opisany.

Introduction zawiera zwięzłe i bardzo technicznie opisane streszczenia poszczególnych publikacji oraz podkreśla rolę doktoranta w uzyskaniu poszczególnych wyników częściowych. Spełnia bardzo dobrze swoją rolę, chociaż dla niespecjalisty może to być trudna lektura.

Przedstawię kolejno poszczególne publikacje i ich omówienie w części związanej z tematyką rozprawy.

1. BBRC

W tej publikacji badanych było pięć postaci (izoform) białka eIF4E z rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). Białko to jest eukariotycznym czynnikiem inicjującym translację 4E, służy do rozpoznawania kapu (czapeczki) znajdującego się na końcu 5'-mRNA. Łączenie się tego białka z mRNA jest pierwszym etapem konstrukcji kompleksu służącego do produkcji nowych białek – rybosomu. W publikacji poszukiwano szczegółów molekularnych

wiązania się różnych form eIF4E do ok. 10 analogów czapeczki (kapu), np. do m⁷GpppG, gdzie pewne atomy tlenu grup fosforanowych zastąpiono siarką. Związki te mają zdolność hamowania translacji, co może mieć duże znaczenie w projektowaniu nowych leków. Doktorant wniósł tutaj wkład w postaci przeprowadzenia przeszukiwania (program Psi-BLAST) sekwencji białek podobnych do badanych izoform, określenia na czym te podobieństwa i różnice polegają (program PCMA) oraz skonstruował wiarygodne i dobrze uzasadnione modele 3D badanych białek. Wykorzystał program PsiPRED do przewidywania struktury drugorzędowej oraz serwer MODELLER do struktury 3D. Dysponując wiarygodnymi (w ramach dokładności metod homologicznych) modelami, autorzy publikacji, przy wiodącej roli K. Kuchty określili specyficzne oddziaływania analogów kapu z konkretnymi aminokwasami modelowanych białek. Znaczenie tej publikacji polega na uzyskaniu wglądu w molekularne szczegóły wiązania ważnej klasy białek do związków o dużym potencjale wykorzystania w sterowaniu syntezą białek. Analizowane białka w różnym stopniu wiążą się z analogami (są obszerne wyniki doświadczeń, obserwowano różnice na poziomie stałych wiązania do 10 razy). Doktorant sporządził też bardzo dobrej jakości rysunki przedstawiające modelowane struktury (Rys.1). Nie doszukałem się informacji jaki program graficzny był wykorzystany (?PYMOL). Podczas obrony byłbym ciekaw usłyszeć, jak kandydat do stopnia doktora wyjaśniłby precyzję podanych w Tabeli 2 tej publikacji zmian w energii swobodnej Gibbsa $\Delta\Delta G$ podanych niekiedy z dokładnością do 0.001 kcal/mol (M⁷GDP → m⁷GTP). Czy te wartości i ich oszacowania błędów mają wartość naukową i są "fizyczne", czy też jest to po prostu matematyczny wyraz ekstrapolacji pewnych stałych wiązania mierzonych spektroskopowo i poddanych standardowej obróbce biochemicznej?

W publikacji tej podobało mi się zgrabne wykorzystanie metod modelowania do wyjaśnienia pewnych ciekawych obserwacji nt. niby podobnych, a jednak mocno biochemicznie różnych białek pełniących nie do końca wyjaśnione funkcje w komórkach roślinnych. Z pewnością praca ta dowodzi biegłości doktoranta w metodyce badań modelowych oraz umiejętności współpracy z eksperymentatorami.

2. BBA

Publikacja ta ma pewne podobieństwo tematyczne w stosunku do pracy BBRC – dotyczy badania wiązania analogów kapu do izoform białka eIF4E – jest jednak bardziej rozbudowana. Badanych jest siedem spokrewnionych białek z tej rodziny pochodzących z *Drosophila melanogaster* (muszki owocówki). Znane były funkcje biologiczne tylko trzech z nich. Doktorant ponownie wykorzystał tę samą „linię produkcyjną” modelowania homologicznego podanego powyżej (nb. ½ opisu paragrafu metodologicznego 2.4 jest w relacji niemal 1:1 do opisu z pracy wcześniejszej). Zbudowano więcej modeli białek i mgr K. Kuchta przygotował też 12 rysunków modeli białkowych z analogami czapeczki. Fig. 2. z tej publikacji jest jasny i czytelnie ilustruje podobieństwo (i pewną istotną różnicę) modelu Dm eIF4E-1 i Hs eIF4E, ale dalsze rysunki, zwłaszcza Fig. 4 (gdzie jest magenta?) i Fig.5 są zdecydowanie mniej czytelne. Nie jest to wina doktoranta, tylko redakcji, w której pomniejszono, wg mnie zbyt mocno, istotne szczegóły by złożyć artykuł do druku. Również w tej pracy tylko dzięki modelowaniu molekularnemu, a więc żmudnej pracy doktoranta, było możliwe szczegółowe przedyskutowanie roli poszczególnych aminokwasów czy elementów struktury białek i wytłumaczenie nawet kilkunastokrotnej różnicy we wiązaniu jednych form w stosunku do innych. Wartość publikacji podnosi dość obszerna i szczegółowa analiza różnic pomiędzy białkami owada (Dm), a człowieka (Hs). W opisie metod jakoś nie zauważyłem jak lokowano

w strukturach poszczególnych białek pozycje analogów kapu – czy program MODELER „sam” to podawał, czy wymagało to „ręcznej” adjustacji, a może osobnego dokowania liganda? (N.B.W publikacji BBA bardzo poglądowy jest rysunek 6, zatem chętnie bym pochwalił tutaj doktoranta, jednak, jak wynika z dokumentacji, przygotowała go dr J. Zuberek.)

3. RNA

Publikacja ta jest znacznie obszerniejsza od omawianych wcześniej, wkład doktoranta w jej powstanie jest znaczny. Przedmiotem badań są białka enzymatyczne zmieniające mRNA. W szczególności badana jest jedna z nukleotydylotransferaz (NTazy) nazwana CutA, pochodząca z grzybów chorobotwórczych *Aspergillus nidulans*. CutA rozpoznaje końce 3' różnych transkryptów (mRNA) i dodaje szereg (1-7 nt) nowych nukleotydów bogatych w C lub U. Modyfikacje postranskrypcyjne służą do kontroli stężenia tych mRNA w komórkach. Celem badań było (m.in.) poznanie mechanizmów decydujących o specyficzności CutA. Krytycznie ważnym elementem było modelowanie struktury przestrzennej tego enzymu przeprowadzone przez doktoranta. Badana NTPaza jest niestandardowa, ale udało się uzyskać, na drodze przyrównania sekwencji, kilka struktur homologicznych, dla których struktury 3D określono wcześniej (CiD1, Trf4, TtCutA). Doktorant przeanalizował szczegółowo struktury miejsc wiążących nukleotydy (Fig.7) i wskazał jakie obszary odpowiadają za obserwowaną doświadczalnie specyficzność enzymu. Modelowanie było inspiracją do bardzo ciekawego badania mutantów (np. R557Q w PAP1, PAP2-4 oraz serii mutantów PUP, ale w białku tTCutA). Analizy mRNA wykonano nowatorską w tym kontekście techniką szybkiej amplifikacji końców cDNA 3'- RACE PCR (od ang. *rapid amplification of cDNA ends PCR*). Pan mgr K. Kuchta uczestniczył w analizie i interpretacji wyników wysokoprzepustowego 3'RACE dla badanych wariantów NTaz. Przebadano składy wielu nowo dodawanych końców do RNA. Analiza homologiczna pozwoliła wysunąć przypuszczenie, że sekwencja ExxNxxR w strukturze CutA (motyw NRM) jest odpowiedzialna za nietypową preferencję tego enzymu do dodawania cytozyny (lub cytydyny jeśli mówimy nie o zasadach a nukleotydach dołączanych do mRNA). Autorzy publikacji zauważają, moim zdaniem słusznie, że jest to ważny ślad pozwalający lepiej określać specyficzność innych znanych (lub jeszcze nie odkrytych) enzymów z klasy NTaz. Wyniki prezentowane w tej publikacji są bardzo specjalistyczne i obszerne, ale badania modelowania homologicznego były znów ważne dla uzyskania rozsądnej interpretacji wyników na poziomie molekularnym. Wartość poznawcza tych badań jest znaczna.

4. NAR

Szpiczak mnogi w Europie pojawia się z częstością 40 nowych przypadków na 1 mln mieszkańców na rok. Można powiedzieć, że to nic w stosunku do koronawirusa, ale choroby nowotworowe w normalnych warunkach są jedną z głównych plag trapiących ludzkość. Białko kodowane przez geny FAM46 mogą mieć mutacje skutkujące większą ekspresją tych białek w szpiczaku i innych nowotworach. Funkcje biologiczne białek z rodziny FAM46 do niedawna były nieznane. W omawianej publikacji autorzy postulują, w oparciu o obszerne analizy bioinformatyczne i studia literaturowe, iż FAM46 są (niekanonicznymi) poli(A) polimerazami. Analizy sekwencji obejmują różne organizmy eukariotyczne. Dyskutowane są możliwe domeny białkowe w tych układach. Doktorant zbudował w oparciu o modelowanie

homologiczne trochę niepełny, ale wartościowy model ludzkiego białka FAM46C. Za proponował położenia nowych motywów (są to trzy wcześniej nieznane aminokwasy, np. Ser₂₃₈ w FAM46C) ważnych dla wiązania nukleotydów i oddziaływań z innymi białkami. Cenny może być dla innych badaczy rysunek „Fig. 5”, gdzie dzięki żmudnej pracy doktoranta zaznaczono położenia na strukturze 3D mutacji punktowych łączonych z różnymi nowotworami. Podziwiam nakład pracy, jaki był potrzebny do przygotowania rysunku S3 z domenami białek z rodziny FAM46 oraz Tabeli S3, gdzie mgr K. Kuchta zebrał informacje o innych białkach oddziałujących z białkami z rodziny FAM46. Są to dane referencyjne jakich nie było w literaturze i sądzę, że praca ta będzie jeszcze wielokrotnie cytowana przez inne grupy, zwłaszcza, że ukazała się w chyba najlepszym czasopiśmie specjalistycznym poświęconym kawasom nukleinowym.

Błędów formalnych, poza brakiem streszczenia w języku polskim (wymaganym w poprzedniej ustawie i zwyczajowo), czy edytorskich w recenzowanych publikacjach nie zauważyłem.

KONKLUZJA

Pan mgr Krzysztof Kuchta, w okresie ostatnich kilku lat wykonał bardzo poważną pracę obliczeniową. Działając w bardzo dobrych i kompetentnych zespołach twórczo i pomysłowo zastosował istniejące metody modelowania homologicznego struktury białek i serwery światowe, krytycznie ocenił uzyskiwane wyniki, wniósł istotny wkład albo w zrozumienie działania ważnych klas białek albo wręcz przyczynił się do identyfikacji nieznanej wcześniej roli szeregu białek o znanych sekwencjach. Pokazał, że biofizyk może być kluczową postacią w interdyscyplinarnych zespołach badawczych realizujących projekty o dużym potencjale poznawczym i komercyjnym. Wyniki zespołów opublikowano w najlepszych dostępnych czasopismach specjalistycznych, niekiedy o wysokim IF.

Stwierdzam, zatem, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Krzysztof Kuchty stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Demonstruje ona wiedzę i umiejętności doktoranta w pewnym dziale nauk fizycznych (biofizyka i modelowanie białek). Dowodzi, że doktorant posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Rozprawa spełnia wymagania ustawowe oraz zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie Pana magistra Krzysztofa Kuchty do dalszych etapów postępowania związanego z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.**

W. Nowak

Wniosek o wyróżnienie

Ze względu na wielki nakład pracy obliczeniowej i analitycznej nad doktoratem, oryginalność wyników pozwalających na zrozumienie nieznanej wcześniej roli białek z rodziny FAM46, wzorowy przykład badań o charakterze aplikacyjnym i interdyscyplinarnym, opublikowanie wyników rozprawy w światowych czasopismach naukowych (w tym NAR) wnioskuję o przedstawienie rozprawy do wyróżnienia, zgodnie z panującymi na Wydziale zasadami. Wniosek mój byłby pewnie znacznie silniej sformułowany, gdyby nie współautorski charakter wszystkich publikacji. O celowości postawienia tego wniosku przekonała mnie analiza publikacji NAR. Sądzę, że Rada Naukowa Dyscypliny Nauki Fizyczne UW lub jej odpowiednie komisje znają lepiej sylwetkę doktoranta i właściwie odnoszą się do mojej wyróżniającej opinii.



Wiesław Nowak, prof. zw.