

Prof. dr hab. Piotr Zielenkiewicz

Warszawa, 19 marca 2020 r.

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Wydział Biologii UW

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Kuchty

Application of homology modeling to study the function of proteins and their interactions with ligands

dla Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego

Rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Kuchty składa się z kopii czterech opublikowanych, wieloautorskich prac, w których jest on jednym z autorów. Publikacje te opatrzone są w rozprawie ogólnym jednostronicowym wstępem, po którym następuje równie krótkie omówienie poszczególnych publikacji. Niestety, całość wstępu i omówienia napisana jest językiem całkowicie hermetycznym dla niespecjalisty, zdaniem w rodzaju „I also compared obtained 3D model of *Thelavia terrestris* CutA (TtCutA) to selected structures of non-canonical nucleotidyltransferases (NTases) to investigate protein substrate specificity and design rational mutagenesis converting CutA, acting towards CTP, into PAP or PUP, and analogously Cid1 PUP into C/U-adding enzyme.”

W pracy pierwszej, wieloautorski zespół koordynowany przez dr Joannę Żuberek (autor korespondencyjny) analizuje struktury występujących w *Arabidopsis thaliana* izoform eukariotycznego czynnika inicjującego translację 4E (eIF4E) i siłę ich oddziaływań ze strukturą znajdującą się na 5' końcu mRNA czapeczki. Wkładem doktoranta do tej publikacji jest budowa modeli trzeciorzędowej struktury izoform na podstawie znanych struktur homologów. Dokładna procedura tego modelowania nie jest opisana ani we wstępie ani w oryginalnej publikacji. Chętnie dowiem się od doktoranta w czasie obrony po co używał przewidywania struktur drugorzędowych (PSIPRED) mając dobre wzorce strukturalne dla wszystkich izoform. Mgr Kuchta przeanalizował także różnice strukturalne pomiędzy izoformami w kontekście uzyskanych w tej samej pracy, przez współautorów, wyników miareczkowania

fluorescencyjnego, umożliwiających określenie powinowactwa poszczególnych izoform do analogów czapeczki.

Druuga z prac, opublikowana w BBActa, jest także pracą wieloautorską, w której doktorant jest „równorzędnym pierwszym” autorem z J. Żuberek, która jest autorem korespondencyjnym. Metody zastosowane w tej pracy są tożsame z metodologią używaną w pracy #1, a zastosowano ją, jak poprzednio, do białek eIF4E i ich oddziaływań z analogami czapeczki, tym razem u *Drosophila melanogaster*. Wkładem doktoranta było stworzenie trójwymiarowych modeli homologicznych białek i bardzo szczegółowa analiza oddziaływań tak uzyskanych struktur z analogami czapeczki.

Trzecia praca umieszczona przez doktoranta w rozprawie, opublikowana w 2017 roku w RNA, to wspólny wysiłek 3 grup pod kierunkiem Andrzeja Dziembowskiego, Krzysztofa Ginalskiego i Rafała Tomeckiego. Miała ona na celu wyjaśnienie podstaw molekularnych specyficzności grzybowych nukleotydylotransferaz CutA, a zwłaszcza ich zdolności dodawania cytydyn i urydyn na 3' końcu RNA. W tym celu uzyskane *in vitro* produkty analizy 3'-RACE enzymów z *Aspergillus nidulans* i *Thielavia terrestris* sekwencjonowano metodami nowej generacji. Analiza sekwencyjno-strukturalna umożliwiła Autorom wyjaśnienie molekularnych podstaw specyficzności tych enzymów, spektakularnie potwierdzone skutecznym zaplanowaniem mutacji zmieniających tę specyficzność. Wkładem doktoranta do tej pracy jest stworzenie homologicznego modelu Tt CutA, analiza danych z sekwencjonowania 3'-RACE i analiza sekwencyjno-strukturalna.

W odróżnieniu od trzech poprzednich, czwarta praca, wykonana przez ósmioosobowy zespół, w większości z laboratorium Krzysztofa Ginalskiego, jest w całości pracą bioinformatyczną, bez wspomagających eksperymentów. W pracy tej, opublikowanej w Nucleic Acid Research w 2016 roku, Autorzy używając bardzo szerokiego wachlarza metod bioinformatycznych analizy sekwencji i struktur pokazują, że białka FAM46, obecne w genomach zwierzęcych, są niekanonicznymi polimerazami poli(A) modyfikującymi 3' końce RNA. Wniosek ten został następnie potwierdzony eksperymentalnie w 2017 roku przez grupę A. Dziembowskiego. Wkładem mgr K. Kuchty, jednego z dwojga równorzędnych pierwszych autorów, do tej publikacji jest próba wymodelowania jednego z ludzkich homologów (FAM464C) i udział w innych analizach bioinformatycznych NTaz.

W podsumowaniu, rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Kuchty składa się z czterech dobrze opublikowanych prac naukowych, do których wkład doktoranta to budowa homologicznych

modeli enzymów i analiza oddziaływań wymodelowanych białek, w większości z substratami. Dodany przez doktoranta wstęp nie dotyczy jego wkładu do opisanych badań, a stanowi oddzielne streszczenie zawartości publikacji. Krótkie teksty pod nazwami „introduction” oraz „conclusions” są pochwałą metod modelowania porównawczego i w żaden sposób nie zastępują słabo opisanych w każdej z prac używanych przez doktoranta procedur modelowania. Ponieważ rozprawa składa się z fragmentów, dotyczących modelowania struktur w czterech pracach, których doktorant jest współautorem, można byłoby oczekiwać, że pochwali się metodami, których użył w swojej pracy, zwłaszcza biorąc pod uwagę doskonałość Jego promotora dr hab. K. Ginalskiego w tej kwestii. Tymczasem prawie jednobrzmiący opis modelowania w pracach sygnowanych przez doktoranta zawiera enigmatyczne stwierdzenia w rodzaju:

- „multiple sequence alignment was derived using PCMA program followed by some manual adjustments” – jakie korekty i z jakiego powodu?

- „secondary structures were predicted with PSIPRED” - po co?

i inne uniemożliwiające odtworzenie wyników pracy. O ile jest to dopuszczalne w publikacji, w której modelowanie stanowi zaledwie fragment, w rozprawie doktorskiej powinno to, choćby z powodów edukacyjnych, zostać wyjaśnione.

Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę, że dwa z oświadczeń dotyczących wkładu poszczególnych osób do publikacji tj. p. Anny Kropiwnickiej (publ. 1) i Lucjana Wyrwicza (publ. 4) zostały napisane i podpisane przez doktoranta. Wyrażam jednocześnie nadzieję, że jest to zgodne z procedurami ustalonymi przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Fizyczne UW (zgodnie z delegacją ustawową).

Powyższe uwagi dotyczą konstrukcji rozprawy i nie zmieniają mojej pozytywnej oceny uzyskanych i przedstawionych przez doktoranta wyników. Biorąc to pod uwagę w ogólnej ocenie pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Kuchty wyrażam pogląd, że Jego rozprawa doktorska spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania i stawiam wniosek o dopuszczeniu doktoranta do dalszych etapów przewodu.

