

Gdańsk, 11.05.2026 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Magistra Mateusza Zalewskiego zatytułowanej: „*Metody wieloskalowego modelowania oddziaływań białko-białko i białko-peptyd*”

Biofizyka oraz biologia strukturalna należą obecnie do najdynamiczniej rozwijających się dziedzin współczesnej nauki. Zrozumienie mechanizmów działania biomolekuł, oddziaływań białko-białko oraz białko-ligand ma fundamentalne znaczenie dla rozwoju nowoczesnej medycyny. Szczególnie istotne jest poszukiwanie odpowiedzi na pytania, w jaki sposób działają leki, dlaczego wiążą się z określonymi celami molekularnymi oraz jakie mechanizmy odpowiadają za ich skuteczność lub brak aktywności. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy tego właśnie obszaru badań, który jest związany ściśle z nowoczesnymi założeniami modelowania teoretycznego oddziaływań białko-białko oraz białko-peptyd z wykorzystaniem narzędzi modelowania wieloskalowego oraz metod opartych na sztucznej inteligencji. Tematyka pracy jest aktualna, bardzo dobrze wpisuje się we współczesne trendy biologii strukturalnej i chemii obliczeniowej oraz posiada istotny potencjał aplikacyjny w projektowaniu leków i inżynierii białek.

Ocena strony redakcyjnej pracy

Niniejsza rozprawa opiera się na imponującej jak na ten etap kariery naukowej liczbie dziewięciu oryginalnych, recenzowanych artykułów badawczych opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych, z listy JCR (*J Chem Theory Comput*, *Nucleic Acids Res.*, *Prot. Sci.*, *Molecules*), w których otrzymane przez Doktoranta wyniki zostały szczegółowo przedyskutowane. Taka forma przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym, i nie budzi najmniejszej wątpliwości. Należy podkreślić, że w czterech w/w artykułach pierwszym autorem jest mgr Mateusz Zalewski i - jak wynika z deklaracji w rozdziale „1.3. Struktura pracy i wykaz publikacji” (str. 15) dysertacji – jego udział był dominujący.

Całość dysertacji ma charakter tzw. spinki w skład której poza kopiami artykułów wchodzi przejrzyste napisany komentarz. (Na samym początku pracy, jeszcze przed spisem treści, Doktorant umieścił listę skrótów i symboli, co znacząco ułatwia lekturę oraz orientację w stosowanej terminologii i oznaczeniach). Praca ma oryginalną budowę pod względem redakcyjnym — odbiega od standardowego układu tego typu opracowań. Autor przyjął autorską koncepcję prezentacji dorobku, w której kolejno omawia dziewięć prac, poprzedzając ich analizę przedstawieniem pełnych tekstów artykułów pogrupowanych tematycznie. I tak, część pierwsza zatytułowana „Wprowadzenie: cel i zakres pracy”, w sposób jasny dla czytelnika wprowadza w zakres oraz celowość opisywanych w dysertacji wyników badań. W kolejnym podrozdziale Doktorant przekonuje, że podjęty przez niego w badaniach problem, jest już wykorzystywany w diagnostyce oraz leczeniu chorób np. neurodegeneracyjnych czy autoimmunologicznych, lecz nie jest on

doskonały i stąd potrzeba dopracowania narzędzi, które nie tylko będą przewidywać oddziaływanie PPI ale również będą konkretnie określać rodzaj tego oddziaływania (geometrie systemów itp.). Rozdział 2 przedstawia teoretyczne podstawy klasycznych podejść do dokowania, modele gruboziarniste, dynamikę molekularną oraz nowoczesne metody oparte na sztucznej inteligencji, t.j.: AlphaFold i ESMFold. Rozdział ten może stanowić bardzo dobry materiał dydaktyczny dla początkujących badaczy rozpoczynających pracę w obszarze modelowania biomolekularnego, biologii strukturalnej czy bioinformatyki. Autor w sposób uporządkowany i bardzo przystępny przedstawia zarówno klasyczne, jak i nowoczesne metody stosowane w biologii strukturalnej i modelowaniu biomolekularnym, zwracając uwagę nie tylko na ich możliwości, ale również ograniczenia.

Następne cztery rozdziały (rozdziały 3-6) zostały poprzedzone krótkim wprowadzeniem, w którym Autor osadza publikacje w szerszym kontekście badawczym oraz podkreśla ich unikalny wkład w rozwój danej tematyki:

- rozdział 3 — rozwój i zastosowanie metod dokowania białek i peptydów,
- rozdział 4 — modelowanie elastyczności strukturalnej przy użyciu CABS-flex,
- rozdział 5 — analiza i projektowanie podatności białek na agregację (Aggrescan4D),
- rozdział 6 — dynamika molekularna i jej zastosowania w kontekście biologii strukturalnej.

W ostatnim rozdziale Doktorant dokonuje podsumowania całej swojej pracy, podkreśla najważniejsze osiągnięcia oraz wskazuje możliwe kierunki dalszych badań.

Poniżej przedstawiam wykaz publikacji składających się na rozprawę wraz z oznaczeniami przyjętymi w tekście:

[A1] Kurcinski M, Kmiecik S, **Zalewski M**, Kolinski A. Protein-Protein Docking with Large- Scale Backbone Flexibility Using Coarse-Grained Monte-Carlo Simulations. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7341.

[A2] **Zalewski M**, Badaczewska-Dawid AE, Kmiecik S. Flexible docking of cyclic peptides to proteins using CABS-dock. *J Chem Theory Comput*. 2025;21(17):8249-8254.

[A3] **Zalewski M**, Kmiecik S, Koliński M. Molecular Dynamics Scoring of Protein-Peptide Models Derived from Coarse-Grained Docking. *Molecules*. 2021;26(11):3293.

[A4] **Zalewski M**, Wallner B, Kmiecik S. Protein-peptide docking with ESMFold language model. *J Chem Theory Comput*. 2025;21(6):2817-2821.

[A5] Nithin C, Fornari RP, Pilla SP, Wroblewski K, **Zalewski M**, Madaj R, et al. Exploring protein functions from structural flexibility using CABS-flex modeling. *Protein Sci*. 2024;33(9):e5090.

[A6] Wróblewski K, **Zalewski M**, Kuriata A, Kmiecik S. CABS-flex 3.0: an online tool for simulating protein structural flexibility and peptide modeling. *Nucleic Acids Res*. 2024;gkaf412.

(K.W. i **M.Z.** - równorzędny wkład w pracę)

[A7] Bárcenas O, Kuriata A, **Zalewski M**, Iglesias V, Pintado-Grima C, Firlik G, et al. Aggrescan4D: structure-informed analysis of pH-dependent protein aggregation. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W170-W175.

[A8] **Zalewski M**, Iglesias V, Bárcenas O, Ventura S, Kmiecik S. Aggrescan4D: a comprehensive tool for pH-dependent analysis and engineering of protein aggregation propensity. *Protein Sci*. 2024;33(10):e5180.



[A9] Filipek K, Blanchet S, Molestak E, Zaciura M, Wu CCC, **Zalewski M**, et al. Phosphorylation of P-stalk proteins defines the ribosomal state for interaction with auxiliary protein factors. EMBO Rep. 2025;25(12):5478-5506.

Stwierdzam, że przedstawione do recenzji wyniki stanowią elementy nowości naukowej w biofizyce molekularnej.

Ocena wartości merytorycznej pracy

Magister Mateusz Zalewski wykonywał swoją pracę doktorską pod kierunkiem specjalisty w dziedzinie modelowania biomolekularnego prof. dr. hab. Sebastiana Kmiecika (Uniwersytet Warszawski, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Wydział Chemii, Laboratorium Biologii Obliczeniowej) oraz specjalisty w dziedzinie matematyki stosowanej, fizyki oraz biologii obliczeniowej prof. dr hab. Dimy Kozakova (Stony Brook University, Department of Applied Mathematics and Statistics). Jak zostało wcześniej wspomniane, dysertacja została przygotowana w formie spójnego zbioru dziewięciu artykułów naukowych, pogrupowanych tematycznie i poprzedzonych autorskim komentarzem oraz wprowadzeniem osadzającym poszczególne publikacje w szerszym kontekście badań z zakresu biologii strukturalnej i modelowania biomolekularnego. Prace te dotyczą kolejno: (i) rozwoju i zastosowania metod dokowania białek i peptydów, (ii) modelowania elastyczności strukturalnej przy użyciu CABS-flex, (iii) analizy i projektowania podatności białek na agregację (Aggrescan4D) oraz (iv) zastosowań dynamiki molekularnej w biologii strukturalnej.

W artykule [A1] przedstawiona została strategia dokowania białko-białko z wykorzystaniem narzędzia CABSdock (pierwotnie przeznaczonego do dokowania białko-peptyd), pozwalająca na pełną swobodę konformacyjną jednego z partnerów białkowych oraz ograniczoną elastyczność drugiego. Zaproponowane podejście wykazało niespotykane dotąd możliwości próbkowania, jednak dokładność w wyznaczaniu kompleksów okazała się nadal niższa niż w przypadku najbardziej zaawansowanych obecnie narzędzi do dokowania. W artykule [A2] zaprezentowany został protokół dokowania cyklicznych peptydów do białek, umożliwiający szerokie próbkowanie ich konformacji przy jednoczesnym zachowaniu cyklicznej struktury. Temat ten jest szczególnie interesujący ze względu na rosnące znaczenie peptydów cyklicznych, które stanowią odpowiedź na główne ograniczenia peptydów liniowych: czyli ruchliwość konformacyjną oraz małą odporność na degradację proteolityczną. Dane eksperymentalne wskazują, że plastyczność konformacyjna odgrywa kluczową rolę w funkcji peptydów cyklicznych, ich przepuszczalności oraz specyficzności wiązania. Jednocześnie predyktory takie jak AlphaFold często nadmiernie stabilizują uporządkowane struktury i nie uwzględniają alternatywnych lub przejściowych stanów obserwowanych metodami NMR czy dynamiki molekularnej. Dzięki bezpośredniemu próbkowaniu takich alternatywnych konformacji metoda CABS-dock ma potencjał do wypełnienia tej luki. W artykule [A3] zaproponowano alternatywne wykorzystanie dynamiki molekularnej do oceny interakcji białko-peptyd, które przetestowano jako metodę walidacji wyników CABS-dock. Zagadnienie to ma szczególne znaczenie, ponieważ etap oceny modeli jest zazwyczaj najsłabszym ogniwem programów do dokowania ruchliwych peptydów. W pracy [A4] zaproponowany został protokół wykorzystania ESMFold do dokowania peptydów do białek. Pokazano, że zdolność ESMFold do wykorzystywania reprezentacji sekwencyjnych (*sequence embeddings*)



oraz identyfikacji kluczowych motywów wiążących wykazuje duży potencjał w dokowaniu białko-peptyd generując zwykle modele o niezbyt dokładnej ale akceptowalnej jakości. Jednak możliwość bardzo szybkiego przetwarzania danych stanowi szczególną zaletę w zastosowaniach wymagających szybkiego uzyskania wyników, takich jak np. rozwój terapii opartych na peptydach. Artykuł [A5] stanowi przegląd poświęcony metodzie CABS-flex oraz jej zastosowaniom w modelowaniu elastyczności białek w kontekście ich funkcji biologicznych i stanowi wstęp do kolejnej publikacji z cyklu, t.j. A6. W nowej wersji CABS-flex (CABS-flex 3.0) wprowadzono szereg usprawnień, obejmujących m.in. zwiększoną jakość odwzorowania lokalnych struktur, nowy interfejs użytkownika umożliwiający łatwą analizę różnych aspektów dynamiki oraz bezpośrednio wykorzystanie danych eksperymentalnych (np. wprowadzenie ograniczeń na odległości). Autorzy udowadniają, że CABS-flex 3.0 umożliwia wydajne symulacje dynamiki białek i peptydów z wykorzystaniem modelu gruboziarnistego połączonego z rekonstrukcją pełnoatomową.

W artykule [A7] przedstawiona została nowa wersja narzędzia Aggrescan3D (A3D) - Aggrescan4D (A4D). Narzędzie A3D umożliwia przewidywanie skłonności białek do agregacji w oparciu o ich strukturę trójwymiarową oraz giętkość, natomiast A4D rozszerza tę koncepcję o możliwość analizy wpływu pH. Choć skłonność do agregacji jest przede wszystkim zakodowana w sekwencji i strukturze białka, inne czynniki — takie jak stężenie białka, temperatura czy pH — mogą w istotny sposób wpływać na agregację polipeptydów. Autorzy dostrzegając znaczenie pH w modulowaniu agregacji białek, poprawili istniejący algorytm A3D tak, aby modelował również ten efekt. Stanowi to jakościową zmianę — wykraczającą poza analizę samej sekwencji białkowej (Aggrescan) i struktury białka (Aggrescan3D) — w kierunku bardziej kompleksowego opisu agregacji białek. Artykuł [A8] stanowi publikację o szerszym zakresie, podsumowującą i integrującą rozwiązania opracowane w ramach powyżej wspomnianych narzędzi A3D i A4D. Artykuł [A9] dotyczy roli fosforylacji białek szypuły rybosomalnej. Najważniejszym osiągnięciem przedstawionej pracy było pokazanie, w jaki sposób wygląda i zachowuje się strukturalnie kompleks białek P-stalk po fosforylacji oraz jakie zmiany konformacyjne zachodzą w obrębie domen CTD. Autorzy wykazali, że fosforylacja prowadzi do przejścia od zwartej, „zapadniętej” struktury do bardziej rozwiniętej i elastycznej konformacji typu *coil*, co ma bezpośrednie znaczenie funkcjonalne dla oddziaływań rybosomu z czynnikami pomocniczymi. Szczególnie istotne jest to, że tak subtelnych i dynamicznych zmian strukturalnych nie udało się jednoznacznie wykazać metodami eksperymentalnymi. Dopiero zastosowanie zaawansowanych metod modelowania i symulacji molekularnych pozwoliło opisać mechanizm tych przejść konformacyjnych oraz zrozumieć ich biologiczne konsekwencje. Praca ta bardzo dobrze pokazuje, jak nowoczesne podejścia teoretyczne i obliczeniowe mogą dostarczać informacji niedostępnych klasycznym technikom eksperymentalnym i pozwalać na opis procesów zachodzących na poziomie molekularnym.

Składające się na rozprawę dokorską w/w publikacje zostały już poddane bardzo rygorystycznej ocenie anonimowych recenzentów, będących specjalistami w dziedzinie rozprawy. Dołączone opracowanie do publikacji zaprezentowane przez Doktoranta jest rzetelne. Nie doszukałam się w rozprawie błędów



merytorycznych. Zrecenzowanie przedstawionego przez Mgr. Zalewskiego materiału budzi we mnie tylko kilka kwestii natury poznawczej:

- (i) Znane SolupHred (2020) oraz CamSol 3.0 (2023) są obecnie dostępnymi narzędziami systematycznie modelującymi wpływ pH na rozpuszczalność i agregację struktur białkowych. Czy Doktorant próbował porównać wyniki jakie daje A4D z w/w podejściami?
- (ii) W metodach typu coarse-grained zawsze pojawia się kompromis pomiędzy szybkością obliczeń a dokładnością opisu fizycznego układu. Gdzie znajduje się obecnie największe ograniczenie modeli CABS-dock lub CABS-flex i co należałoby poprawić w pierwszej kolejności?
- (iii) W pracy wielokrotnie podkreśla Pan ograniczenia metod opartych na AI, takich jak AlphaFold czy ESMFold, szczególnie w kontekście dynamiki i stanów pośrednich. Jak, Pana zdaniem, będzie wyglądała przyszłość integracji metod AI z klasyczną dynamiką molekularną? Czy uważa Pan, że modele AI będą w stanie całkowicie zastąpić podejścia fizykochemiczne?

Do najważniejszych mocnych stron rozprawy należy zaliczyć: (i) aktualną i interdyscyplinarną tematykę, (ii) dużą liczbę publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy, (iii) umiejętne połączenie metod klasycznych i nowoczesnych metod AI, (iv) znaczący wkład autora w rozwój oprogramowania i implementację nowych narzędzi, (v) wysoki potencjał aplikacyjny opracowanych metod. Na szczególne podkreślenie zasługuje również fakt, że autor nie ogranicza się wyłącznie do wykorzystania istniejących metod, ale aktywnie uczestniczy w ich rozwoju i wdrażaniu nowych rozwiązań obliczeniowych. Do słabszych stron pracy można zaliczyć momentami bardzo rozbudowane fragmenty teoretyczne, które miejscami mają charakter bardziej przeglądowy niż syntetyczny. W niektórych częściach rozprawy widoczna jest również bardzo duża koncentracja na aspektach metodologicznych i obliczeniowych kosztem szerszej dyskusji biologicznej uzyskanych wyników. Ponadto część opisów dotyczących metod AI mogłaby zostać bardziej krytycznie zestawiona z ograniczeniami praktycznego wykorzystania tych modeli w biologii eksperymentalnej. Pewien niedosyt budzi także brak szerszych informacji dotyczących pozostałej aktywności naukowej Doktoranta, jego całkowitego dorobku publikacyjnego, udziału w konferencjach krajowych i międzynarodowych czy zaangażowania w realizację projektów grantowych. Tego typu informacje są zwykle bardzo pomocne dla recenzenta, ponieważ pozwalają lepiej ocenić całokształt aktywności naukowej kandydata, jego samodzielność badawczą oraz miejsce, jakie zajmuje na obecnym etapie kariery naukowej.

Pomimo wskazanych uwag rozprawę oceniam bardzo wysoko. Przedstawiona praca stanowi wartościowe i nowoczesne opracowanie z zakresu biofizyki i modelowania molekularnego. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością zarówno podstaw teoretycznych, jak i praktycznych aspektów modelowania struktur.



Uniwersytet
Gdański



Podsumowanie

Podsumowując, moja opinia o rozprawie jest zdecydowanie pozytywna. Przedłożona mi do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu i spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z tym, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Mateusza Zalewskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie mu stopnia doktora nauk fizycznych w dyscyplinie fizyka.

Joanna Makowska

KIEROWNIK

Pracownia Biologicznej Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

dr hab. Joanna Makowska, prof. UG