

*Poznań, 24 listopada 2025***Recenzja rozprawy doktorskiej****autorstwa Pani magister Joanny Słabońskiej, zatytułowanej****„Badanie możliwości selektywnego hamowania mikrobiologicznej
syntazy ATP z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego”****wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Jacka Czuba****na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi dojrzały i wartościowy rezultat szeroko zakrojonych badań obliczeniowych dotyczących molekularnego mechanizmu działania syntazy ATP. Autorka, mgr Joanna Słabońska, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jacka Czuba, wykorzystwała zaawansowane metody pełnoatomowej dynamiki molekularnej, symulacje hybrydowe QM/MM oraz narzędzia termodynamiki statystycznej do wnikliwego zbadania rotacyjnego mechanizmu kompleksu F_o syntazy ATP, obejmującego zależność między stanami protonacji reszty Glu65, rolę wysoce zakonserwowanej Arg176 oraz powstawaniem kierunkowości ruchu c-pierścienia sprzężonego z gradientem protonowym. W rozprawie przeanalizowano także molekularne podstawy inhibicji kompleksu przez bedakilinę i oligomycynę, ukazując odmiennosć ich interakcji – od silnego, krótkiego wiązania wodorowego (SSHB) po rozległe kontakty dyspersyjne – oraz wspólny efekt funkcjonalny polegający na zatrzymaniu rotacji c-pierścienia.

Manuskrypt liczy 144 strony i opiera się na bogatej literaturze obejmującej 190 pozycji, z czego znaczącą część aż 87 cytowań stanowią publikacje z ostatnich 10 lat. Tak obszerna i aktualna bibliografia podkreśla zarówno rzetelność naukową autorki, jak i znakomite osadzenie pracy w najnowszych badaniach z obszaru bioenergetyki, chemii obliczeniowej i strukturalnej biologii molekularnej.

Autorka, formułując szczegółowe cele badawcze rozprawy, jasno wyodrębniła kluczowe obszary analizy dotyczące strukturalnych i mechanistycznych aspektów funkcjonowania kompleksu Fo syntazy ATP oraz jego podatności na inhibicję. Po pierwsze, celem pracy było zrozumienie mechanizmu działania wolnego kompleksu Fo, obejmujące określenie energetyki rotacji c-pierścienia poprzez wyznaczenie profili energii swobodnej dla pojedynczych kroków rotacyjnych oraz analizę wpływu stanów protonacji reszt glutaminianowych w półkanałach wiążącym i uwalniającym.

Drugim celem było wyjaśnienie mechanizmu transferu protonów oraz sposobu, w jaki transport ładunku prowadzi do indukcji jednokierunkowej rotacji c-pierścienia i konwersji energii gradientu protonowego na pracę mechaniczną w obrębie kompleksu Fo. Kolejnym istotnym celem badawczym była analiza roli wysoce zakonserwowanej reszty Arg176 w podjednostce a, szczególnie w kontekście jej funkcji jako elektrostatycznej bariery separującej dwa półkanały protonowe i determinującej kierunkowość przepływu protonów oraz efektywność rotacji.

Następnie Autorka podjęła się przeanalizowania mechanizmu molekularnego wiązania bedakiliny do kompleksu Fo, obejmującego zbadanie, jak zmiany stanu protonacji Glu65 i inhibitora modulują stabilność oraz profil energetyczny kompleksu, jak i dekompozycję energii wiązania względem poszczególnych reszt aminokwasowych w celu identyfikacji kluczowych determinant interakcji białko-ligand. Analiza zjawiska silnego, nisko-barierowego wiązania wodorowego (SSHB) pomiędzy Glu65 a grupą dimetyloamoniową bedakiliny, z wykorzystaniem symulacji QM/MM oraz profili energii swobodnej.

Cele te, ujmowane razem, tworzą spójny i wielopoziomowy program badawczy obejmujący zarówno dynamikę molekularną, jak i aspekty kwantowochemiczne działania tego złożonego silnika biomolekularnego.

Udana realizacja tak szeroko zakrojonych celów badawczych doprowadziła Autorkę do szeregu niezwykle interesujących i oryginalnych odkryć, które znacząco poszerzają naszą wiedzę na temat działania kompleksu Fo syntazy ATP oraz mechanizmów jego inhibicji. W pracy doktorskiej po raz pierwszy tak szczegółowo zademonstrowano, w jaki sposób protonacja poszczególnych reszt glutaminianowych w półkanałach Fo kształtuje profil energetyczny obrotu c-pierścienia i określa wysokość barier towarzyszących pojedynczemu krokowi rotacyjnemu. Autorka wykazała, że zmiana stanu protonacji Glu w półkanałach wiążącym i uwalniającym prowadzi do istotnych różnic w stabilności konformacji pośrednich oraz w wartości barier energetycznych, co stanowi kluczowy element regulujący kierunkowość ruchu rotacyjnego kompleksu. Tym samym praca dostarcza przekonujących dowodów na to, że transport protonów nie tylko towarzyszy rotacji, ale jest jej bezpośrednim czynnikiem sprawczym, determinującym wydajność i kierunek pracy biomolekularnego silnika.

Szczególnie istotnym wkładem w rozwój chemii jest także pogłębiona analiza roli wysoce konserwowanej reszty Arg176. Autorka pokazała, że reszta ta pełni funkcję elektrostatycznej bariery oddzielającej półkanał wiążący od uwalniającego, co warunkuje jednokierunkowy przepływ protonów. Wykazane za pomocą symulacji zależności potwierdzają hipotezę, że Arg176 stabilizuje odpowiednie stany pośrednie i zapobiega niepożądanemu „cofaniu się” protonu, pełniąc zatem rolę swoistego zaworu molekularnego zasługuje na szczególną pochwałę. Te obserwacje mają istotne znaczenie dla zrozumienia uniwersalnych zasad działania rotorowych enzymów błonowych.

Niezwykłe wartościowym elementem pracy jest również molekularny opis mechanizmu wiązania bedakiliny, leku przeciwgruźliczego stosowanego w terapii zakażeń *Mycobacterium tuberculosis*. Autorka wykazała, że stabilność kompleksu inhibitora z c-pierścieniem Fo zależy w sposób wyraźny od stanu protonacji Glu65 oraz od protonowanego charakteru dimetyloamoniowej grupy bedakiliny, co umożliwia powstawanie krótkiego, silnego wiązania wodorowego SSHB. Analiza ta została dodatkowo rozszerzona o dekompozycję energii wiązania na poszczególne reszty aminokwasowe, co pozwoliło wskazać determinanty odpowiedzialne za

selektywność oddziaływania oraz różnice między gatunkami bakteryjnymi. W rozprawie pokazano, że interakcja bedakiliny z Glu65 jest wzmacniana przez resztę Asp32 obecną w syntazie ATP prądków gruźlicy, co rzuca nowe światło na molekularne podstawy działania tego ważnego leku przeciwgruźliczego. Autorka w rezultacie przeprowadzonych symulacji QM/MM potwierdziła możliwość dynamicznego współdzielenia protonu oraz wyjątkowo krótką odległość donor-akceptor, co stawia to wiązanie w jednym szeregu z najstabilniejszymi oddziaływaniami wodorowymi znanymi w środowisku białkowym. Fakt, że silne krótkie wiązanie wodorowe w tym systemie wpływa bezpośrednio na zahamowanie rotacji c-pierścienia, stanowi ważną obserwację, dotąd nieopisaną w literaturze dotyczącej syntazy ATP.

Na szczególną uwagę zasługuje także porównanie mechanizmów inhibicji bedakiliny i oligomycyny. Mimo odmiennych sposobów kotwiczenia w obrębie kompleksu Fo, obydwa związki stabilizują konformacje nieaktywne i blokują interfejs c-pierścienia z podjednostką a, uniemożliwiając dalszy obrót. Wyniki te tworzą spójny obraz molekularny wskazujący, że nawet różne chemicznie inhibitory mogą wykorzystywać wspólny mechanizm funkcjonalny – „zaklinowanie” rotora w pozycji uniemożliwiającej transport protonów.

Łącznie ustalenia przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani magister Joanny Słabońskiej dostarczają wielowymiarowego, pełno atomowego opisu sprzężenia chemiosmotycznego i podkreślają znaczenie zarówno klasycznych oddziaływań elektrostatycznych, jak i unikatowych wiązań SSHB w regulacji aktywności kompleksu Fo. Praca ta stanowi istotny wkład w zrozumienie działania jednego z najważniejszych enzymów bioenergetycznych oraz tworzy dobrą podstawę do projektowania nowych, selektywnych inhibitorów syntazy ATP.

Prosiłbym by Doktorantka w trakcie publicznej obrony odniosła się do następujących zagadnień:

- W jaki sposób Doktorantka oszacowała niepewności wynikające z wyboru konkretnych parametrów pola siłowego? Czy próbowała Pani przeprowadzić porównania pomiędzy wynikami uzyskiwanymi przy użyciu różnych pól

siłowych lub wariantów tego samego pola? Na ile wyniki są wrażliwe na wybór parametrów elektrostatycznych, potencjałów van der Waalsa czy typowych wartości odcięcia (cutoff)?

- W jaki sposób Doktorantka przeprowadziła przypisanie ładunków do poszczególnych reszt aminokwasowych, szczególnie w obrębie aktywnego środowiska Fo? Jakimi kryteriami kierowała się Pani, określając stany protonacyjne Glu65 i innych reszt? Czy stosowano dodatkowe narzędzia do przewidywania pKa w środowisku błonowym?
- W strukturach białkowych układy kwas karboksylowy-karboksylian mogą ulegać stabilizacji przez otoczenie elektrostatyczne, co nie zawsze sprzyja występowaniu formy zjonizowanej obu reszt aminokwasowych. Czy analizowała Pani stabilność alternatywnych form protonacyjnych reszt kwasowych Glu, Asp w różnych położeniach c-pierścienia?
- Jak Doktorantka ocenia wpływ jonów sodu, potasu, chlorkowych czy wodorowęglanowych na wynik symulacji? Czy ich obecność mogłaby modulować energię bariery rotacji lub stabilność SSHB? Jak bardzo wyniki zależą od zastosowanego modelu wody?
- Mechanizm dziury protonowej zakłada przepływ protonu poprzez sekwencję stanów protonowanych. Czy Doktorantka analizowała, w jakim stopniu jest to mechanizm dominujący w różnych gatunkach organizmów? Czy alternatywne mechanizmy mogłyby być równie prawdopodobne?
- W pracy wskazano, że Arg176 pełni funkcję elektrostatycznej bariery. Czy w trakcie publicznej obrony mogłaby Pani rozwinąć, w jaki sposób zmiana jej orientacji lub mutacja na resztę neutralną mogłaby wpłynąć na wydajność rotacji?
- Wyniki sugerują, że reszta Asp32 specyficzna dla *Mycobacterium tuberculosis* wzmacnia oddziaływanie SSHB. Czy mogłaby Pani wskazać, czy analogiczne reszty występują w innych patogenach i czy przewidywałyby Pani podobny efekt?
- Czy dostrzega Pani potencjał wykorzystania poznanych determinant wiązania bedakiliny do projektowania nowych leków, bardziej selektywnych względem syntazy ATP bakterii, a mniej toksycznych dla syntazy mitochondrialnej?

- Na stronie 30 rozprawy czytamy: „Szczególną uwagę poświęciłam mechanizmowi silnego, skróconego wiązania wodorowego typu SSHB między grupą karboksylową Glu65 a dimetyloaminową grupą Bq.” Prosiłbym by w trakcie publicznej obrony Doktorantka dokonała krytycznego porównania grypy dimetyloaminowej i dimetyloamoniowej i możliwości każdej z nich do tworzenia oddziaływań z grupą karboksylową. (Czy w tym przypadku raczej karboksylanową).

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Doktorantkę została napisana w sposób klarowny, spójny i świadczy o bardzo dobrym zrozumieniu zarówno postawionych celów badawczych, jak i złożonej natury analizowanego układu biomolekularnego. Autorka wykazała się znakomitą znajomością współczesnych metod obliczeniowych, obejmujących zarówno pełnoatomową dynamikę molekularną, jak i zaawansowane techniki hybrydowe QM/MM, które zastosowała w sposób w pełni świadomy i uzasadniony. Doktorantka odważnie formułuje hipotezy dotyczące mechanizmu rotacji kompleksu Fo oraz sposobów jego inhibicji, a następnie poddaje je rygorystycznej weryfikacji, prezentując wyniki o wysokim stopniu wiarygodności i spójności. Przedstawiona dysertacja jasno unaocznia, że Doktorantka posiada bardzo szeroką i dobrze ugruntowaną wiedzę teoretyczną z zakresu chemii obliczeniowej, biofizyki molekularnej i chemii kwantowej, tak więc ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie nauk chemicznych należy ocenić bardzo wysoko.

Ocena końcowa

W podsumowaniu mojej oceny rozprawy doktorskiej Pani magister Joanny Słabońskiej pragnę podkreślić, że prezentowany dorobek naukowy rozprawy oceniam bardzo wysoko. Praca stanowi dojrzałe, oryginalne i przekonujące opracowanie złożonego problemu naukowego, jakim jest mechanizm działania kompleksu Fo syntazy ATP oraz molekularna natura jego inhibicji przez związki małowcząsteczkowe. Autorka w znakomity sposób połączyła zaawansowane metody dynamiki molekularnej i obliczeń hybrydowych QM/MM, stosując je z pełną świadomością ich możliwości i ograniczeń, a uzyskane wyniki wzbogacają naszą wiedzę zarówno z zakresu bioenergetyki, jak i chemii obliczeniowej. Biorąc pod uwagę niewątpliwe

walory rozprawy doktorskiej, udane połączenie użycia różnorodnych technik obliczeniowych oraz walory aplikacyjne oceniam rozprawę doktorską jako ważny wkład w rozwój naszej wiedzy o chemii. Oceniam, że rozprawa ta spełnia zwyczajowe i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, unaocznia ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie chemii, a także potwierdza jej umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej. Otrzymane rezultaty pogłębiają nasze zrozumienie mechanizmów działania kluczowych inhibitorów syntazy ATP, co stanowi inspirację dla projektowania nowych leków.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Pani magister Joanny Słabońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie – mając na uwadze wyjątkowo wysoki poziom naukowy przedstawionej dysertacji – wnoszę o przyznanie jej wyróżnienia.

prof. dr hab. Marcin Hoffmann