



UNIwersYTET
WARSAWski

Wydział Chemii



Warszawa, dn. 25.02.2026

Prof. dr hab. Sławomir Filipek
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Ludwika Pasteura 1, 02-093 Warszawa
tel: 22-5526405
e-mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Joanny Słabońskiej, pt.

**Badanie możliwości selektywnego hamowania mikrobiologicznej
syntazy ATP z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego**

Syntaza ATP jest jednym z najważniejszych enzymów w biologii komórki, ponieważ odpowiada za syntezę ATP – uniwersalnego nośnika energii chemicznej. To właśnie dzięki niej energia zmagazynowana w gradiencie protonowym zostaje przekształcona w energię wiązań fosforanowych ATP. Enzym ten działa jak nanomolekularna maszyna rotacyjna – bez sprawnie działającej syntazy ATP komórka traci zdolność do utrzymania procesów wymagających energii, takich jak biosynteza, transport aktywny czy ruch. Zaburzenia jej funkcji prowadzą do ciężkich schorzeń metabolicznych, a w mikroorganizmach jej zahamowanie może być skuteczną strategią terapeutyczną. W związku z tym, badania prowadzone przez Doktorantkę, dotyczące poznania mechanizmu działania syntazy ATP, oprócz znacznych wartości poznawczych mogą mieć także duże znaczenie praktyczne.

Ocena rozprawy

Układ

Recenzowana rozprawa posiada formę klasyczną i zawiera: wykaz skrótów, streszczenie w jęz. polskim i angielskim, wstęp obejmujący 28 stron, cele i zakres prowadzonych badań (3 strony),

opis metod obliczeniowych (36 stron) i procedur symulacyjnych (11 stron), wyniki połączone z dyskusją (29 stron), wnioski (4 strony) oraz bibliografię (190 pozycji). Dobór cytowanych prac jest właściwy i, co ważne, duża ich liczba ukazała się w ostatnich latach. Wskazuje to na bardzo dobrą orientację Doktorantki w zagadnieniach dotyczących rozprawy.

Wstęp

Obszerny wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy. Jest napisany przejrzysto, poprawnym językiem naukowym, i omawia strukturę i działanie kompleksu F_0F_1 , czyli syntazy ATP. Chociaż w tytule rozprawy występuje nazwa syntaza ATP, to w słowach kluczowych zamiast tej nazwy jest nazwa ATPaza. Syntaza ATP jest również F-ATPazą, ale dobrze byłoby używać tej samej nazwy w całym tekście. Jeśli chodzi o nazewnictwo, to w literaturze naukowej spotyka się nazwy F_0 i F_o dla części błonowej syntazy ATP, jednak bardziej poprawne byłoby użycie symbolu F_0 zamiast F_o zwłaszcza, że część pozabłonowa oznaczana jest symbolem F_1 . We wstępie Doktorantka pokazuje wiele rycin przedstawiających struktury, ale nie zawsze legendy do rycin zawierają wszystkie informacje. Np. w opisie Ryc. 3 nie podano identyfikatora z bazy PDB dla struktury przedstawionej na tej rycinie. Brakuje też informacji dotyczącej źródła pochodzenia badanego białka, a ma to znaczenie, bo mimo podobnych struktur numery odpowiadających sobie aminokwasów w białku pochodzącym z różnych organizmów są inne. We wstępie zamieszczono także rycinę przedstawiającą struktury dwóch inhibitorów F_0 , tj. strukturę bedakiliny i oligomycyny (Ryc. 6). Dobrze byłoby jednak podpisać, który związek jest który. Ponadto, we wzorze bedakiliny brakuje drugiego atomu azotu, a pierścień w którym występuje ten azot powinien być aromatyczny. Na str. 22 jest napisane „bardziej atrakcyjny terapeutyk, w porównaniu do Bq”. Brakuje wyjaśnienia pod jakim względem jest on bardziej atrakcyjny: IC_{50} , mniejszych efektów ubocznych, ceny, czy czegoś innego? Na tej samej stronie Doktorantka odsyła czytelnika do Ryc. 31, a powinno być odniesienie do Ryc. 8 i/lub 9, gdzie rzeczywiście pokazane są pochodne bedakiliny. Ponadto, na Ryc. 8 i 9, podano różne jednostki IC_{50} : $[\mu M]$ na Ryc. 8 i $[\mu g/ml]$ na Ryc. 9, co utrudnia porównywanie tych wartości. Na Ryc. 10 (str. 24), na strukturze F_0 ze związaną oligomycyną reszty aminokwasowe są przenumerowane w stosunku do oryginalnej numeracji w strukturze 6CP5 z drożdży, np. Glu65 zamiast Glu59, a w tekście podany jest oryginalny numer tej reszty tj. Glu59. Z kolei, na Ryc. 11 (str. 27) zamienione są znaki większości i mniejszości przy opisie długości wiązań dla klasycznego oraz silnego wiązania wodorowego. Dla silnego, odległość ta jest $< 2.5 \text{ \AA}$.

Cele rozprawy

Jako zasadniczy cel rozprawy Doktorantka wskazuje zbadanie mechanizmu funkcjonowania kompleksu błonowego F_0 syntazy ATP oraz inhibicji tego kompleksu za pomocą związków małowcząsteczkowych, z wykorzystaniem metod symulacji komputerowych. Doktorantka podaje również szereg celów szczegółowych, takich jak (1) określenie energetyki rotacji c-pierścienia, (2) wyjaśnienie mechanizmu transferu protonów i jednokierunkowej rotacji c-pierścienia, (3) wpływu argininy w podjednostce a i inhibitorów na tę rotację, czy (4) analizę silnego wiązania wodorowego w aspekcie inhibicji kompleksu F_0 . Zakres zaplanowanych badań robi wrażenie, szczególnie ze względu na zastosowanie metod kwantowych, które są bardzo wymagające jeśli chodzi o stopień trudności i czas potrzebny do wykonania obliczeń, zwłaszcza dla tak dużych układów jak syntaza ATP. Drobne uwagi do celów są następujące. W niektórych miejscach pojawiają się numery reszt aminokwasów bez podania nazwy organizmu z którego pochodzi syntaza ATP, np. Arg176 (numeracja z drożdży), czy Glu65 (numeracja z bakterii *Mycobacterium smegmatis*). Moim zdaniem, cele rozprawy opisane są zbyt obszernie i czasami znajdują się w nich zdania podsumowujące wyniki, np. „określiłam bariery energetyczne i moment, w którym obecność inhibitora prowadzi do zatrzymania rotacji pierścienia”, albo „wykazałam, że obecność Olg prowadzi do wprowadzenia bariery energetycznej ograniczającej ruch pierścienia.” Uważam, że cele powinny być oddzielone od podsumowania i wniosków.

Metody

Bezpośrednio po celach przedstawiony jest szczegółowy opis podstaw teoretycznych metod obliczeniowych, poczynając od przybliżenia Borna-Oppenheimera, twierdzenia Hellmanna-Feynmana, Teorię Funkcjonału Gęstości, a kończąc na metadynamice. Wszystko to zilustrowane jest licznymi wzorami, a nawet dowodami. Kilka nielicznych uwag do tego rozdziału to: na str. 46 w zdaniu „Dodanie i odjęcie stron równań 38 i 39” można usunąć zwrot „i odjęcie”; z kolei na str. 53 i 54 jest napisane „...aby symulacje były wykonalne, konieczne jest przestrzenne ograniczenie rozmiarów badanych układów. W tym celu stosuje się tzw. pudła symulacyjne ...”, co nie jest w pełni poprawne. W pudłach symulacyjnych jest więcej atomów niż w układzie złożonym z białka otoczonego np. warstwą wody. Pudła symulacyjne z okresowymi warunkami brzegowymi, mimo że mają więcej atomów i trzeba obliczać oddziaływania z obrazami atomów w sąsiednich pudłach, stosuje się głównie po to, aby badać nieskończone układy, zarówno w wodzie jak i błonie komórkowej, a przy okazji pozbyć się niekorzystnych efektów brzegowych takich jak parowanie, czy napięcie powierzchniowe. W

dalszej części opisu metod, na Ryc. 15 (str. 65) dla próbkowania parasolowego (umbrella sampling), każdy z narysowanych potencjałów jest oddzielony od pozostałych, bo jest w kształcie litery U zamiast klasycznej paraboli dla potencjału harmonicznego. Takie przedstawienie jest w sprzeczności z podanym w rozprawie opisem „...wartości współrzędnej ξ w różnych oknach powinny się częściowo pokrywać, co umożliwia połączenie wyników z różnych okien”. Kolejna uwaga dotyczy opisu metadynamiki. Pomimo, że metoda ta była stosowana przez Doktorantkę, w opisie brakuje wprowadzenia pojęcia zmiennych kolektywnych (CV, collective variables), które wychodzą poza zdefiniowaną współrzedną reakcji, w porównaniu do metody „umbrella sampling”. Poza tym, opis metadynamiki jest zrozumiały nawet dla laika. Brakuje natomiast opisu metody GaMD (Gaussian Accelerated Molecular Dynamics), która to metoda jest rozszerzeniem metadynamiki i nie wymaga wyboru zmiennych kolektywnych.

Następnie, Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo sposób budowania, wykonania symulacji i analizy badanych układów, co jest bardzo pomocne w zrozumieniu kolejnej części rozprawy poświęconej wynikom. Drobne poprawki do tego rozdziału są następujące. Przy opisie lipidów POPE zamiast „plamitylo-oleoilo-fosfatydyloamina” – powinno być „plamitylo-oleoilo-fosfatydyloetanolamina”. Ponadto, wymiary stosowanych pudeł periodycznych są podane raz w Å, a gdzie indziej w nm. Na str. 70 jest napisane, że użyto funkcjonału MN12SX/6-31G, ale brakuje jego omówienia w poprzednim rozdziale. Brakuje także objaśnienia symboli w przypadku bazy funkcyjnej 6-31G. Poza tym, baza 6-31G (w wersji podstawowej, bez funkcji polaryzacyjnych) nie jest zalecana do stosowania z funkcjonałem MN12SX, ponieważ jest zbyt mała, aby w pełni wykorzystać potencjał nowoczesnych funkcjonałów rodziny Minnesota. Prosiłbym zatem Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas obrony. Funkcje polaryzacyjne były użyte, ale w innym miejscu – na str. 78 czytamy „W celu określenia podatności energii wiązania na parametry obliczeń wykorzystano trzy różne funkcjonały korelacyjno-wymienne ... oraz dwa różne zespoły funkcji bazowych, tj. 6-311++g(d,p) i 6-31g(d)”. Dalej jest jeszcze mowa o użyciu korekty dyspersji D3 oraz korekty Basis Set Superposition Error. Wszystko to wskazuje na stosowanie bardzo rozbudowanego i dokładnego zestawu metod obliczeniowych, a w związku z tym przydałby się też bardziej rozbudowany opis funkcji bazowych w poprzednim rozdziale. Pozostałe kwestie do wyjaśnienia: na str. 73 znajduje się stwierdzenie „za pomocą ruchomego potencjału harmonicznego”, jednak brakuje wyjaśnienia, co to jest ruchomy potencjał harmoniczny; podobnie na str. 76 zawarte w zdaniu pojęcie "wiszących wiązań" nie jest dostatecznie wytłumaczone.

Wyniki z dyskusją

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w dwóch bardzo dobrych czasopismach: *Journal of Physical Chemistry Letters* (2022), oraz *ACS Medicinal Chemistry Letters* (2024). Do tej części mam tylko kilka drobnych uwag. Odnośnie stwierdzenia „...przewidywać wartości pKa kluczowych reszt kwasu glutaminowego” (str. 80), chciałbym się dowiedzieć jaką metodą było wykonane przewidywanie. Na str. 82 znajduje się zwrot „Foscherichia coli ??”, który nie jest dla mnie zrozumiały. Przedstawiony na Ryc. 23B (str. 84) wykres znajduje się częściowo poza wartościami -1 i 1, a chyba nie powinien. Czy zatem skala na osi jest właściwa? Rycina 29 na str. 97 (położenia punktów krytycznych) jest zbyt mała – szczegóły nie są możliwe do odczytania. W legendzie Ryc. 35 na str. 107 zdanie „Profile energii rotacji mitochondrialnego kompleksu Fo ze związaną Olg (niebieski) oraz bez (żółty)” nie odzwierciedla tego co przedstawia rycina, bowiem na rycinie widoczna jest tylko jedna linia i w dodatku zielona. Czy może jest tak, że linie te pokrywają się?

Po wynikach z dyskusji przedstawione są wnioski. W zasadzie rozdział ten zawiera podsumowanie wyników połączone z wnioskami. Jest to dość obszerny rozdział, być może dlatego, że Doktorantka badała wiele różnych aspektów działania i blokowania syntazy ATP.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska dotyczy trudnego lecz bardzo istotnego problemu naukowego o dużym znaczeniu praktycznym. Wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy oraz bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Doktorantki. Uzyskanie przedstawionych w rozprawie wyników wymagało dużego nakładu pracy. Doktorantka właściwie zaprojektowała i wykonała wiele żmudnych symulacji dynamiki molekularnej i symulacji QM/MM, a następnie poprawnie je przeanalizowała. Ogólny cel pracy jakim było zrozumienie wybranych aspektów mechanizmu funkcjonowania błonowej części syntazy ATP, oraz wyjaśnienie sposobu inhibicji tego białka przez dwa związki małowcząsteczkowe, oligomycynę i bedakilinę, został zrealizowany. Ponadto, realizacja celów szczegółowych jak np. „określenie mechanizmu transferu protonów i indukcji jednokierunkowej rotacji c-pierścienia” czy „analiza silnego wiązania wodorowego” pozwoliły na uzyskanie szeregu wartościowych wyników, którymi można by obdzielić kilka prac doktorskich. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do zaprojektowania nowych inhibitorów syntazy ATP, co może być szczególnie ważne przy leczeniu gruźlicy wielolekoopornej i innych zakażeń bakteryjnych, chorób pasożytniczych np. malarii, czy chorób nowotworowych.

Zatem, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie mgr. Joanny Słabońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora i wyróżnienie rozprawy.

Argumentacja popierająca wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Rozprawa opisuje nowe i dobrze udokumentowane wyniki, uzyskane m.in. dzięki szeroko zakrojonym symulacjom dynamiki molekularnej z wykorzystaniem metod mechaniki kwantowej. Przeprowadzone przez Doktorantkę analizy wykazały, że: (1) transfer protonu w syntazie ATP zachodzi zgodnie z mechanizmem tzw. „dziury protonowej” i, że kluczową rolę w utrzymaniu kierunkowości rotacji c-pierścienia odgrywa zachowana ewolucyjnie reszta Arg176 (numeracja w drożdżach) w podjednostce a, separująca dwa półkanały protonowe – wiążący i uwalniający; (2) zdolność wiązania bedakiliny z kompleksem F_0 jest wynikiem obecności krótkiego, silnego wiązania wodorowego z Glu65 (numeracja z bakterii), odpowiedzialnego za transfer protonów, a co więcej, protonacja Glu65 w półkanale wiążącym jest kluczowym etapem mechanizmu rotacyjnego c-pierścienia w kompleksie F_0 i może stanowić etap limitujący szybkość całego procesu; (3) nowe pochodne bedakiliny mogą blokować syntazę ATP także w innych gatunkach bakterii w obecności mutacji znoszących wiązanie tego inhibitora. Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów działania syntazy ATP i mogą stanowić podstawę do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Z wyrazami szacunku,

Prof. dr hab. Sławomir Filipek