



prof. dr hab. Michał Dadlez
Pracownia Spektrometrii Mas, IBB PAN
Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Warszawa 15.08.2023

Ocena osiągnięcia naukowego pt. "Zastosowanie nowych metod modelowania małowcząsteczkowych ligandów i ocena ich aktywności w układach biologicznych" i dorobku naukowego oraz działalności organizacyjnej i dydaktycznej p. dr-a Rafała Ślusarza w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

1. Sylwetka kandydata

Pan dr Rafał Ślusarz ukończył w 1999 r., rok przed czasem, studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskując z wyróżnieniem tytuł magistra chemii. Pracował na stanowisku technicznym na tym wydziale już podczas studiów doktoranckich, w latach 2001-2003, następnie na stanowisku asystenta w latach 2003-2004, a także administratora lokalnej sieci komputerowej w latach 2004-2006. To ostatnie stanowisko objął po obronie tez rozprawy doktorskiej pt.: „*Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G*” w roku 2004, również na macierzystym wydziale U. Gd. W toku doktoratu, uczestnicząc w pracach katedry macierzystej i Katedry Chemii Teoretycznej, nawiązał współpracę z prof. Haroldem Scheragą z Cornell University, i innymi zespołami zajmującymi się obliczeniowymi zagadnieniami struktur białek. W tym samym czasie był wykonawcą w dwóch krajowych i jednym międzynarodowym projekcie, zyskując wyróżnienie w raporcie jednego z nich (FIRCA, pozycja pa01 w p. II. 9. „Wykazu”). Od roku 2006 do dziś pracuje na stanowisku adiunkta na macierzystym Wydziale Chemii U. Gd., z którym związał całą swoją karierę zawodową. Pracując z początku nad układami białkowymi, z czasem Autor rozszerzył swoje zainteresowania o układy cukrowe i glikoproteiny współpracując z prof. Andrzejem Wiśniewskim, i stało się to później głównym nurtem jego zainteresowań.

O stażu podoktorskim dokumenty nie wspominają. Wspominają o licznych długotrwałych współpracach z zespołami zagranicznymi z różnych ośrodków: Department of Chemistry & Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, USA; Department of Computer Science, University of California, Davis, USA; Korean Institute for Advanced Study, Seul, Republika Korei; Department of Computer Science, Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Jakkur Bangalore, Indie. Autor współpracuje też z innymi zespołami krajowymi - prof. Bernarda Lammka - chemia peptydów *in silico*, prof. Jerzego Ciarkowskiego - struktury białek, prof. Adama Liwo - zastosowanie gruboziarnistych pól siłowych, prowadząc aktywne działania w więcej niż jednym ośrodku.

2. Ocena osiągnięcia naukowego.

Autor formułuje tytuł osiągnięcia naukowego następująco: „Zastosowanie nowych metod modelowania małowcząsteczkowych ligandów i ocena ich aktywności w układach biologicznych”. Lektura dokumentów rozwiewa wątpliwości do czego nowe metody są stosowane, wskazując, że chodzi o modelowanie struktur ligandów w ich kompleksach z cząsteczkami o różnej wielkości, w dążeniu do zaprojektowania lub zmodyfikowania struktury tych cząstek i uzyskania pożądanego efektu biologicznego, bo tego tytuł nie precyzuje. Nie precyzuje też, co Autor ma na myśli pisząc o ocenie aktywności ligandów, bo nie chodzi przecież o ocenę aktywności metod modelowania, co użyta składnia dopuszcza! Znowu, lektura dokumentów wskazuje raczej na to, że chodzi o próby oceny stabilności sieci oddziaływań w budowanych modelach, czego nie należy utożsamiać z oceną ich aktywności biologicznej, bo to wymagałoby eksperymentalnego potwierdzenia. Nie jest zatem jasne czy Autor zalicza też eksperymenty testowania aktywności biologicznej, obecne w niektórych pracach, jak np. 11 (choć tu korelacja struktura-funkcja nie została przeprowadzona), do swojego osiągnięcia? Tytuł nie oddaje adekwatnie treści osiągnięcia i powinien być bardziej jasno i precyzyjnie sformułowany.

Do osiągnięcia włączono czternaście prac z lat 2006-2022. Kandydat jest w dziewięciu z tych prac pierwszym Autorem. W żadnej nie występuje na pozycji ostatniej, zazwyczaj zarezerwowanej dla autora korespondującego. Załącznik 7 prezentuje spójne oświadczenia Autora i współpracowników dobrze precyzujące wkład Kandydata zgodny z pozycją jego nazwiska na liście autorów. Dziwi tylko powtarzane oświadczenie pp. dr Samaszko i dr Dmochowskiej, że ich udział w publikacjach polegał wyłącznie na kwestiach redakcyjnych

tekstu (sic!). Prace publikowane były w czasopismach o zróżnicowanym od IF od 1-3 (7 prac) do 6-8 (3 prace), w tym w J. Med. Chem., J. Pept. Sci., Biopolymers, Prot. Pept. Lett., Carbohydr. Res., Molecules, Int. J. Mol. Sci., Front. Mol. Biosci.

Wspólnym mianownikiem tych prac jest stosowanie metod obliczeniowych do budowania modeli molekularnych kompleksów endo- i egzo-gennych ligandów z ich partnerami białkowymi, w pierwszych pracach cyklu, zaś w drugiej wankomycyny z peptydoglikanem.

We wstępie Autor bardzo pobieżnie wprowadza podział metod modelowania molekularnego, od czasochłonnych podejść kwantowomechanicznych dla małych cząstek, poprzez półempiryczne metody uproszczone, pozwalające na zwiększenie skali układu i skali czasu, kosztem rozdzielczości.

Pierwsza część cyklu prac poświęcona jest stworzeniu pełnoatomowych modeli receptorów hormonów neuroprzysadkowych wazopresyny (receptorów V1aR i V2R) oraz oksytocyny i określenie wpływu wybranych modyfikacji wprowadzonych w argininowej wazopresynie AVP na konformację samego hormonu, stabilność wiązania do receptorów oraz na jej potencjał wywołania pożądanych zmian konformacyjnych w tych receptorach, koniecznych do wywołania aktywności biologicznej. Rezultaty opisane w publikacji 1 są wynikiem pracy całego zespołu, prowadzone były pod kierunkiem prof. Ciarkowskiego, dr Ślusarz był częścią tego zespołu, więc precyzuje swój wkład, wskazując wykonane przez siebie etapy, tj. pełną parametryzację wszystkich niestandardowych reszt aminokwasowych, modyfikujących sekwencję hormonu, skonstruowanie modeli czterech analogów wazopresyny, zaplanowanie i przygotowanie protokołu wizualizacji rezultatów dokowania wariantów wazopresyny w kieszeniach receptorów oraz porównania ich konformacji przed i po dokowaniu. Interesująca byłaby informacja, czy uzyskane rezultaty były w jakiś sposób weryfikowane eksperymentalnie z użyciem zsyntetyzowanych wariantów AVP?

W konsekwencji uzyskania molekularnych modeli receptorów Autor podjął się skonstruowania modeli także ich form aktywowanych w oparciu o model aktywowanej rodopsyny, uzyskany w toku pracy doktorskiej Kandydata, a stanowiący dobry szkielet dla modelowania struktur różnych receptorów hormonów neuroprzysadkowych. Prace te zaowocowały dwiema publikacjami nr 2 i 3. Prace rozpoczęto od stworzenia modelu aktywnych form receptorów hormonów neuroprzysadkowych przez nałożenie ich łańcucha na szablon aktywnej formy rodopsyny. Wprowadzono dwa dodatkowe elementy, dodano fragment podjednostki α białka G ($G\alpha$), jako niezbędnego elementu procesu aktywacji oraz uwodnioną dwuwarstwę lipidową. Stworzono też pełnoatomowe modele dwu ligandów tych receptorów oksytocyny i AVP, uwzględniające wewnątrzcząsteczkowy mostek dwusiarczkowy. Wykonano dokowanie

ligandów do receptorów, wyselekcjonowano dwanaście wariantów i poddano je symulacjom metodami dynamiki molekularnej. Śledzono zmiany konformacyjne w czasie symulacji i zmapowano potencjalną sieć oddziaływań ligand receptor w kieszeni wiążącej.

Wiedza o sieci oddziaływań odpowiedzialnych za wiązanie podsunęła następny temat, tj. badanie mechanizmu wiązania silnego i selektywnego agonisty receptora V₂R - desmopresyny we współpracy z Ferring Research Institute, San Diego, USA, właścicielem patentu na desmopresynę. Autor postawił sobie zadanie określenie zestawu reszt wiążących ten związek, jako potencjalnego zestawu reszt wiążących inne związki agonistyczne lub antagonistyczne. Analogicznie do poprzednich prac wykonano modele kompleksów receptorów z desmopresyną i poddano procedurom sterowanego wyzarczania ze schładzaniem i dynamiki molekularnej po umieszczeniu w dwuwarstwie lipidowej. Uzyskane dwie zminimalizowane struktury nie odtworzyły eksperymentalnie stwierdzonego oddziaływania D-Arg⁸-D¹⁰³. Spowodowało to konieczność „ręcznej” manipulacji położenia liganda, by wymusić sąsiedztwo dwu potencjalnie oddziałujących reszt. Autor stwierdza z satysfakcją „Zabieg ten w zupełności wystarczył, aby uzyskać oczekiwany efekt i poprawnie odtworzyć oznaczone eksperymentalnie oddziaływanie.” Warto by poznać zdanie Autora w kwestii, co byłoby, gdyby taka wspomagająca wiedza eksperymentalna nie była dostępna?

Cykl zamykają dwie następne prace obliczeniowe 05 – 06, oraz praca podsumowująca cykl nr 07. Do kolekcji ligandów skompleksowanych z modelowymi strukturami receptorów dodano serię analogów AVP, z dodatkową cyklizacją lub innymi podstawieniami: kwasem merkaptopropionowym, ornityną, kwasem diaminomasłowym, diaminopropionowym, kwasem 2-amino-2-indanokarboksylowym, Mpa lub D-Arg, z zachowaniem wypracowanej wcześniej strategii obliczeniowej, tym razem prowadząc procedurę dokowania wielokrotnie dla każdej pary ligand-receptor. Nie jest jasne w tym kontekście zdanie na str 13: „Przygotowałem także pełnoatomowe modele receptorów V_{1a}R, V₂R i OTR,” skoro zdawałoby się było to wykonane wcześniej. Wielokrotne dokowanie pozwoliło dokonać selekcji najlepszych kandydatów do dalszych obliczeń. Stopień złożoności tego zadania dobrze ilustruje nie do końca klarowne zdanie ze str. 14 „(celem)...wielokrotnego wyeliminowania wszystkich tych kompleksów, w których zadokowane ligandy były w jakikolwiek sposób przeplecione przez łańcuchy boczne reszt receptora lub nie były wystarczająco związane z receptorem, aby prosta minimalizacja energii takich kompleksów nie spowodowała ich oddzielenia od ustalonych dokowaniem pozycji w kieszeniach bez znalezienia korzystniejszych energetycznie położenia.” Obliczenia poszerzono o symulacje MD w wodzie, w modelu ciągłym rozpuszczalnika w czasie symulacji 3,5 ns, dla dwu ligandów reprezentujące dwie odmienne grupy konformacyjne i o symulacje dedykowane

zagadnieniu oddziaływań tworzonych za pośrednictwem cząsteczek wody. Autor w autoreferacie opisuje tu (str. 17) właściwie jedynie podjęte prace, nie podsumowuje uzyskanych wniosków. Przechodzi szybko do omówienia następnego cyklu prac związanych z symulacjami kompleksów peptydoglikanów i wankomycyny (Van), odchodząc zatem od złożonych układów białkowych. Przejście to wymagało stosowania hybrydowej parametryzacji obejmującej zarówno ugrupowania białkowe, jak i cukrowe. Prace zakończyły się zaproponowaniem obszarów i rodzajów modyfikacji Van, które mogłyby podnieść jej skuteczność w leczeniu infekcji wywołanych przez enterokoki odporne na leczenie wankomycyną, co należy uznać z testowalną hipotezę. Zgodnie ze stwierdzeniem Autora eksperymentalne potwierdzenie uzyskano dla postulowanego oddziaływania o tworzeniu wiązania pomiędzy Lys i karbonylowymi atomami tlenu C-końcowego fragmentu Van, trudno jednak przyjąć za dobrą monetę stwierdzenie, że wynik jednych obliczeń wystarczy potwierdzać innymi obliczeniami, zrównując je z niezbędnym jednak eksperymentem (str. 21). Autor przedstawia te dodatkowe obliczenia w pracy 9, jako swój następny wynik (str. 22), stosując dwa modele ściany komórkowej warstwowy i klatkowy oraz rozszerzając paletę różnych podstawień końca C Van (3 łańcuchowe i 2 cykliczne heksozy) i trzech nowych antybiotyków glikoproteinowych. Nie jest jasne dlaczego wśród tych trzech nowych antybiotyków: wankomycyny, orytawancyny i telawancyny umieszczono wankomycynę, skoro jej badaniom poświęcona jest cała poprzednia część tego cyklu badawczego. Na podstawie tych symulacji Autor opracował plan konstrukcji serii nowych analogów Van podstawianych na końcu C, które w opinii Autora powinny ułatwić tworzenie korzystnych oddziaływań z PG (praca 10). W obliczeniach jeden z tych wariantów z podstawieniem końca C cukrem cyklicznym połączonym z Van łącznikiem jednowęglowym wykazał się najlepszymi parametrami.

Następny cykl prac poświęcony jest obliczeniom energetyki ścieżki reakcji chemicznych, choć jak Autor stwierdza metody dynamiki molekularnej nie przewidują zrywania i tworzenia wiązań. Wymagało to zatem użycia innych niż dotychczas narzędzi obliczeniowych. Choć, jak sam Autor stwierdza, wyniki nie były zgodne z oczekiwaniami, to Autor widzi w przyszłości zastosowanie dla opracowanych metod do oceny wydajności projektowanych reakcji chemicznych.

Zwieńczeniem całego cyklu prac przedstawianych w osiągnięciu jest praca 14, opisująca modyfikacje publicznie dostępnego serwera obliczeniowego UNRES, który Autor doposażył o możliwość wykonywania symulacji z wykorzystaniem danych eksperymentalnych: NMR, X-link, SAXS, i szereg innych funkcjonalności.

Podsumowując swoje osiągnięcia Autor omawia swój wkład w poszczególne prace na str. 31-34. Podkreśla pierwszeństwo w stworzeniu trójwymiarowych modeli strukturalnych trzech receptorów hormonów neuroprzysadkowych, w formie nieaktywnej i aktywnej, poprzedzające uzyskanie ich modeli eksperymentalnych. Ciekawe byłaby analiza porównawcza modeli obliczeniowych i eksperymentalnych. Autor jedna przemilcza ten narzucający się temat. Podkreśla dalej swoją rolę w udostępnieniu parametrów strukturalnych dużej serii nowych analogów AVP, łącznie z ich preferowanymi konformacjami w stanie niezwiązanym oraz w kompleksach z receptorami i proponowaniu nowych algorytmów oceny preferencji konformacyjnych budowanych modeli ligandów, czy opracowanie własnych narzędzi obliczeniowych do wyznaczania energii oddziaływania w układzie ligand-receptor-rozpuszczalnik. Podkreśla też uniwersalność tych narzędzi, możliwych do zastosowania w innych układach molekularnych, udostępnianych jako moduły programu Amber i opisuje swoje osiągnięcia w modyfikacji dostępnego on-line serwera obliczeniowego UNRES.

Podobnie, Autor podsumowuje swoje osiągnięcia w dziedzinie modelowania struktur błonowych bakteryjnych ścian komórkowych, wskazując szczególnie pełnoatomowe reprezentacje usieciowanego peptydoglikanu sparametryzowane dla klasycznego pola siłowego Amber, jako swoje istotne osiągnięcie naukowe. Korzystając z tego modelu Autor zaproponował też wyjaśnienie molekularnego podłoża różnic w aktywności trzech antybiotyków glikoproteinowych – wankomycyny, orytawancyny i telawancyny. Efektem tych prac było zaproponowanie nowych analogów Van, z przewidywaniem optymalizacji ich aktywności.

W podsumowanie Autor wskazuje głównie na osiągnięcia metodyczne, w postaci budowy autorskich modeli struktur białek i struktur błonowych oraz ich kompleksów z ligandami, asocjatów molekularnych o ważnej roli biologicznej, czy tworzenie procedur narzędziowych do prowadzenia symulacji i oceny ich jakości. W mniejszym stopniu omawia testowalne hipotezy wynikające z prowadzonych obliczeń, które jak by się zdawało powinny stanowić główny rezultat pracy. Nie informuje na przykład jaki był rezultat badań aktywności biologicznej zaproponowanych przez niego analogów wankomycyny uzyskanych drogą syntezy przez współpracowników z Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research (str. 33), więc zapewnienie Autora „umożliwiłem skuteczne przewidywanie aktywności biologicznej konkretnych analogów Van” brzmi tu gołosłownie. Wzmiankuje natomiast potwierdzenie eksperymentalne występowania zaproponowanego oddziaływania regionu C-końcowego wankomycyny z peptydoglikanem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Zbudowanie unikalnej ekspertyzy w dziedzinie symulacji struktur molekularnych układów

biologicznych stanowi niewątpliwie istotne osiągnięcie. Metody obliczeniowe są ważnym narzędziem wspomagającym badania naukowe, z racji szybkiego rozwoju palety metod ich stosowanie wymaga wyspecjalizowanego profesjonalizmu. Ich wartość jednak znacznie wzrasta w konfrontacji z danymi eksperymentalnymi, dążenie Autora do takiej konfrontacji wydaje się niewystarczające.

3. Inne osiągnięcia naukowe kandydata.

Zamieszczony na str. 2-39 obszerny rozdział IV „Osiągnięcia” nie zawiera wydzielonego opisu innych, niż zawarte w 14 publikacjach stanowiących podstawę „osiągnięcia”, prac Kandydata. Trudno zatem obszerniej się do nich odnieść poza odnotowaniem ponad 30 publikacji z współautorstwem Kandydata opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, towarzyszące 14-tu publikacjom włączonym do „osiągnięcia”. W 4 z tych 30 prac kandydat jest Autorem pierwszym w dwu ostatnim, co wskazuje że „inna” działalność jest w przeważającej mierze wspomagająca inne zespoły. Niemniej, bibliometrycznie dorobek publikacyjny Autora, przy prawie 60 publikacjach i dwu rozdziałach w monografiach naukowych, jest ponadstandardowy, choć sumaryczny czynnik wpływu rzędu 120 i liczba cytowań rzędu 600 prowadzi do indeksu Hirscha 14-15, który mieści się w standardach dla tego etapu kariery naukowej. Publikacjom tym towarzyszy duża liczba doniesień konferencyjnych w formie plakatu – 66 i niewielka liczba wystąpień ustnych (1 wykład w roku 2013 i 1 komunikat ustny w roku 2014). Nie odbył też długotrwałego stażu podoktorskiego w zewnętrznym ośrodku. Brak dbałości o popularyzację własnego dorobku w środowisku i brak stażu stanowią słabe strony wniosku.

Kandydat aktywnie natomiast uczestniczy w projektach grantowych i je zdobywa. Jako wykonawca uczestniczył w 11 projektach, w tym w jednym finansowanym przez National Institute of Health (NIH), USA, prowadził jako kierownik 6 innych, w tym jeden bieżący.

Kandydat brał udział w organizacji pięciu konferencji naukowych oraz jednej w przygotowaniu. Tylko dwukrotnie recenzował prace w czasopismach, w tym jedną w PNAS, co nie wskazywałoby na szerszą międzynarodową rozpoznawalność Kandydata. Jednak zaproszenie do współorganizowania konkursu CASP w edycjach 11-13 oraz konferencji „Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches” organizowanych naprzemiennie w Polsce i w Korei od roku 2015 wskazuje że jest w środowisku międzynarodowym rozpoznawalny. O rozpoznawalności na poziomie krajowym świadczą nagrody i wyróżnienia.

4. Aktywność dydaktyczna i popularyzatorska.

Działalność dydaktyczna Kandydata jest wyróżniająca, ponadstandardowa, uczestniczy on bardzo aktywnie w wypełnianiu misji edukacyjnej i jej kształtowaniu w macierzystej uczelni. Od roku 2000 prowadził 26 przedmiotów na studiach dziennych stacjonarnych, na wszystkich trzech stopniach edukacji wyższej. Aktywnie uczestniczy w procesach informatyzacji procesu edukacyjnego, głównie na uczelni macierzystej. Aktywność dr Ślusarza spełnia wymogi w zakresie działalności edukacyjnej, popularyzatorskiej i organizacyjnej.

5. Wniosek końcowy

W podsumowaniu, zdaniem recenzenta dorobek przedstawiony jako osiągnięcie naukowe p. dr Rafała Ślusarza wypełnia spełnia wymagania stawiane w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, określone w art. 219 ust. 1 pkt 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Recenzent wnioskuje zatem o nadanie p. dr Rafałowi Ślusarzowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

prof. dr hab. Michał Dadlez