



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

27 marca, 2026

Prof. dr hab. Joanna Trylska

Dr hab. Piotr Masłowski, prof. UMK
Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Czach

Rozprawa doktorska mgr Sylwii Czach jest zatytułowana „Komputerowe modelowanie zmian strukturalnych w wybranych białkach i ligandach regulowanych optycznie” (ang. "*Computational Modeling of Structural Changes in Selected Optically Regulated Proteins and Ligands*"). Promotorem tej rozprawy jest prof. dr hab. Wiesław Nowak z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Instytutu Fizyki UMK, a promotorem pomocniczym dr inż. Jakub Rydzewski.

Tematyka rozprawy dotyczy dalekozasięgowych zmian strukturalnych zachodzących w białkach fotoaktywnych metodami obliczeniowymi, w szczególności metodami dynamiki molekularnej ze wzmocnionym próbkowaniem oraz opartymi na uczeniu maszynowym. Białka w roztworach są dynamiczne, ale w odpowiedzi na środowisko ta dynamika się zmienia i może zostać ukierunkowana funkcjonalnie. Jednym z elementów środowiska, który może takie zmiany wywołać, jest światło. Istnieją białka, które posiadają wewnątrz swojej struktury chromofory. Chromofory ulegają wzbudzeniu przy odpowiedniej długości fali, co skutkuje zmianą konformacyjną, na przykład typu *cis-trans*, czyli obrotem określonej grupy chemicznej wokół wiązania, co może wywołać dalekozasięgowe konsekwencje dla dynamiki białka. Z kolei zmiana konformacyjna może być związana z funkcją biologiczną białka. Co ważne, takie procesy są odwracalne i mogą zachodzić w sposób cykliczny.

Efektom badań doktorantki przedstawionych w rozprawie są trzy opublikowane oryginalne artykuły naukowe (w *Journal of Physical Chemistry B* w roku 2022, w *Cellular Signalling* w roku 2023 oraz w *Physical Biology* w roku 2025), jedna praca przeglądowa umieszczona jako preprint w serwisie arXiv i jeden artykuł w przygotowaniu.

Tematyka rozprawy jest spójna i dotyczy białek regulowanych optycznie, jednak format rozprawy nie jest standardowy. Autorka podzieliła rozprawę na opis układów, którymi się zajmowała, poprzedzając całość wstępem dotyczącym fotoaktywnych białek i metod obliczeniowych. Rozprawa jest napisana w języku angielskim, ale zawiera streszczenie w języku polskim. Całość zajmuje ponad 150 stron maszynopisu.

W podrozdziale 1.1 autorka przedstawia cel rozprawy, którym była charakterystyka trzech białek regulowanych optycznie z wykorzystaniem metod obliczeniowych oraz wyjaśnienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za ich działanie. Rozprawa jest podzielona na część przeglądową oraz trzy części poświęcone wybranym układom. W części wprowadzającej autorka omawia strukturę i mechanizmy działania białek fotoaktywnych, trudności związane z badaniem ich przemian konformacyjnych oraz metody obliczeniowe pozwalające analizować te procesy na poziomie atomowym.

Wstęp (Rozdział 1) rozprawy doktorskiej oparty jest na pracy przeglądowej, która według mojej wiedzy nie została jeszcze opublikowana przez wydawnictwo *Springer*, ale jest umieszczona jako preprint w repozytorium arXiv. W porównaniu z preprintem rozdział autorki w doktoracie został znacznie rozszerzony, zwłaszcza jeśli chodzi o metody. W prepryncie autorka występuje jako pierwsza z trzech autorów manuskryptu.

We wstępie autorka najpierw porządkuje wiedzę o głównych rodzinach fotoreceptorów według typu chromoforu i mechanizmu fotoaktywacji, podsumowując tę wiedzę w Tabeli 1.1. Omawiane rodziny białek to: ksantopsyny (ang. *xanthopsins*) z modelowym fotoaktywnym białkiem żółtym (ang. *photoactive yellow protein*, PYP) i kwasem *p*-kumarowym jako chromoforem; fitochromy (ang. *phytochromes*) z przykładem bakteryjnego fitochromu (BphP) i biliwerdyny; rodopsyny (ang. *rhodopsins*) obejmujące rodopsynę wzrokową oraz rodopsyny kanałowe (ChR1, ChR2); kryptochromy (ang. *cryptochromes*), fototropiny (ang. *phototropins*), białka BLUF (ang. *Blue Light Using Flavin*); oraz białka fluorescencyjne, przede wszystkim białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP). We wstępie autorka podkreśla, że możliwa jest optyczna regulacja białek niefotoaktywnych poprzez ich fuzję z fragmentami fotoaktywnymi. Po oświetleniu część fotoaktywna ulega zmianie konformacyjnej, która przenosi się na białko niefotoaktywne i moduluje jego konformację, oddziaływania, a w konsekwencji także aktywność.

Wstęp dotyczący białek fotoaktywnych jest usystematyzowany i dobrze się go czyta, choć ma cechy pracy przeglądowej. Na uwagę zasługują rysunki struktur reprezentantów rodzin i chromoforów, przedstawione na rysunku 1.2, które są utrzymane w jednolitym stylu i kolorystyce.

Po opisie grup białek fotoaktywnych, pani Sylwia Czach opisuje metody obliczeniowe stosowane do ich badania. Metody i ich skale czasowe są podsumowane w Tabeli 1.2. Autorka wyróżnia pięć głównych klas metod obliczeniowych, a dodatkowo wskazuje uczenie maszynowe jako kierunek dalszego rozwoju. Pierwsza z opisanych metod stosowanych do analizy tych układów to bioinformatyka (rozumiana jako narzędzia do analizy sekwencji, przewidywania struktury, adnotacji funkcjonalnej i analizy ewolucyjnej). Autorka podkreśla jednak, że narzędzia do przewidywania struktury są pomocne w określaniu struktury stanu podstawowego i nie przewidują zmian wywołanych światłem.

Kolejna opisana metoda to klasyczna dynamika molekularna, wraz z funkcją energii potencjalnej oraz podstawowym algorytmem Verleta do całkowania równań ruchu. Pani Sylwia Czach podkreśla, że dla białek fotoaktywnych szczególnym problemem w symulacjach dynamiki molekularnej jest obecność niestandardowych reszt wchodzących w skład chromoforów, które wymagają dodatkowej

parametryzacji opartej na obliczeniach kwantowo-chemicznych. Podoba mi się zwłaszcza sposób, w jaki autorka zobrazowała pojęcie pola siłowego na rysunku 1.8.

Następna podsekcja dotyczy metod wzmocnionego próbkowania w dynamice molekularnej. W tej części autorka wymienia podstawowe techniki, takie jak *umbrella sampling* czy dynamika molekularna z wymianą replik (ang. *replica-exchange molecular dynamics*, REMD). Przedstawia też pojęcie zmiennych kolektywnych (ang. *collective variables*).

Kolejna krótko opisana grupa metod to obliczenia kwantowe, które służą do opisu struktury elektronowej chromoforów, stanów wzbudzonych i procesów fotochemicznych. Autorka wymienia przede wszystkim metodę TD-DFT (ang. *time-dependent density functional theory*) do opisu absorpcji światła, widm i własności stanów wzbudzonych oraz metody wielokonfiguracyjne, zwłaszcza CASSCF, do modelowania procesów fotochemicznych wymagających jawnego potraktowania korelacji elektronowej. Autorka opisuje też metody hybrydowe (ang. *quantum mechanics/molecular mechanics* QM/MM), które pozwalają połączyć dokładny opis kwantowy fragmentu układu z opisem klasycznym reszty białka i rozpuszczalnika. Region QM obejmuje zwykle chromofor i jego najbliższe otoczenie, a region opisywany mechaniką molekularną pozostałą część białka i środowisko.

Następna grupa metod to metody dynamiki nieadiabaticznej (ang. *nonadiabatic molecular dynamics*, NAMD) służące do badania procesów wywołanych światłem, takich jak dynamika stanów wzbudzonych, konwersja wewnętrzna i reakcje fotochemiczne. W białkach fotoaktywnych pochłonięcie fotonu przez chromofor prowadzi do przejścia ze stanu podstawowego do stanów wzbudzonych, a następnie do relaksacji poprzez przejścia nieadiabaticzne między stanami elektronowymi. Klasyczna dynamika w przybliżeniu Borna–Oppenheimera w ogólności nie wystarcza do symulacji tego typu procesów, gdyż zakłada natychmiastowe dostosowanie elektronów do ruchu jąder. Natomiast w NAMD jednocześnie śledzone są zmiany położenia jąder i obsadzeń stanów elektronowych.

Metody oparte na uczeniu maszynowym (ang. *machine learning*, ML) są również wymienione w rozprawie jako rozwijające się metody, które będą wspierać symulacje fotoaktywnych układów. Autorka wskazuje, że metody ML mogą być przydatne między innymi do wyznaczenia współrzędnych reakcji z trajektorii dynamiki molekularnej czy do parametryzacji pól siłowych.

Metody są opisane właściwie, w większości w formie zbliżonej do publikacyjnej, ale w stopniu wystarczającym do zrozumienia dalszej części rozprawy. Rozdział 1 oceniam jako istotny, dobrze napisany i ładnie wkomponowany w całość rozprawy.

W kolejnych rozdziałach autorka przechodzi do opisu wyników badań oryginalnych. Wszystkie rozdziały zawierają krótki wstęp dotyczący charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej opisywanego układu wraz z celem badawczym, sekcję Materiały i metody, Wyniki oraz Podsumowanie.

Rozdział 2 dotyczy badań nad systemem bakteryjnego fitochromu (BphP) i biliwerdyny i jest oparty na publikacji w *Journal of Physical Chemistry B*, 126 (14), 2647-2657, 2022, w której pani Sylwia Czach jest trzecią z pięciu autorów. Autorka skupiła się na termodynamice tego układu, stosując metodę wzmocnionego próbkowania (ang. *variationally enhanced sampling*, VES). Tak dobrana metoda

symulacji pozwoliła pokonać bariery energii swobodnej związane z fotoizomeryzacją. Autorka wykazała, że dwa konformery biliwerdyny (o nazwach Pr i Pfr) charakteryzuje odmienny krajobraz energii swobodnej oraz różne stany metastabilne. Wyzaczyła także bariery pomiędzy tymi metastanami. Najważniejszym odkryciem było zaobserwowanie nieznanego wcześniej stanu pośredniego formy Pfr biliwerdyny, który w ciemności może być odwracalnie przekształcony do stanu Pr. Autorka określiła też rolę białka jako czynnego i dynamicznego środowiska w tym procesie. Wykazała na przykład, że w formie Pr liczba wiązań wodorowych chromoforu z resztami białka jest dwukrotnie większa niż w formie Pfr, co ogranicza ruchliwość. Taka szczegółowa analiza dynamiki konformacyjnej chromofora w białku pokazała złożoność procesu na poziomie atomowym i możliwość zmian konformacyjnych również w stanie niewzbudzonym. Obserwacje z takim poziomem szczegółowości nie byłyby możliwe do uzyskania metodami doświadczalnymi.

Rozdział 3 jest oparty na wynikach badań, które mają zostać opublikowane w formie pracy dwuautorskiej (pani Sylwia Czach będzie pierwszą i wiodącą autorką). Rozdział ten dotyczy małego, globularnego fotoaktywnego białka żółtego (PYP), posiadającego jako chromofor kwas *p*-kumarowy. PYP jest fotoreceptorem światła niebieskiego, który przechodzi przez fotocykl obejmujący szereg indukowanych światłem zmian konformacyjnych i chemicznych chromoforu i struktury białka. Ten odwracalny proces rozpoczyna się w stanie podstawowym i obejmuje szereg stanów pośrednich o odmiennych właściwościach spektroskopowych i strukturalnych, prowadząc ostatecznie do powstania długo żyjącego stanu.

Ten dobrze poznany układ fotoreceptorowy został zbadany przy użyciu metod opartych na uczeniu maszynowym, a mianowicie metody spektralnej mapy (ang. *spectral map*, SM) opracowanej i opublikowanej przez dra hab. Jakuba Rydzewskiego, prof. UMK. Po parametryzacji pola siłowego i przeprowadzeniu symulacji dynamiki molekularnej dane pochodzące z trajektorii zostały wykorzystane do trenowania sieci neuronowych, wyznaczenia zmiennych kolektywnych (ang. *collective variables*, CV) oraz określenia, w jaki sposób lokalne zmiany w otoczeniu chromoforu wpływają na większe zmiany strukturalne w białku. Autorka zdefiniowała deskryptory pozwalające zredukować przestrzeń opisu dynamiki białka, a następnie przedstawiła w tak wyznaczonych zmiennych kolektywnych powierzchnie energii swobodnej i zanalizowała stany metastabilne.

Rozdział 4 jest oparty na publikacji w czasopiśmie *Cellular Signalling*, 106, 110641, 2023, w której pani Sylwia Czach występuje jako trzecia z pięciu autorów. Jest to praca doświadczalno-obliczeniowa, w której pani Sylwia Czach przeprowadziła i przeanalizowała wyniki symulacji oraz była odpowiedzialna za przedstawienie tych wyników w publikacji w kontekście biologicznym.

Głównym przedmiotem badań przedstawionych w rozdziale 4 był receptor P2X7 jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu glejaka. Autorka oceniła też możliwość indukowanej światłem regulacji ludzkiego receptora P2X7 przez fotoaktywne ligandy. Zastosowane metody obliczeniowe obejmowały zbudowanie modelu struktury ludzkiego receptora hP2X7 oraz dokowanie molekularne różnych ligandów do kieszeni wiążącej. Autorka szczegółowo opisała weryfikację modelu struktury receptora, który przygotowała z wykorzystaniem programów SWISS-MODEL i AlphaFold2. Opisała także przygotowanie fotoaktywnych ligandów, które były dokowane do receptora, wraz z oceną powinowactwa tych związków do kieszeni wiążącej ATP. Ligandy dokowała zarówno w konformacji *cis*, jak i *trans*, czyli przed i po fotoaktywacji lub po zajęciu innego mechanizmu prowadzącego do

zmiany konformacji. Autorka po raz pierwszy scharakteryzowała miejsce wiązania proleku temozolomidu (TMZ) w strukturze ludzkiego receptora P2X7. Obiecujące wyniki dokowania sugerują, że zastosowanie ligandów fotoaktywnych może stanowić perspektywiczny kierunek dalszych badań nad opracowaniem nowych związków terapeutycznych. Badania obliczeniowe, wspólnie z danymi doświadczalnymi, pozwoliły zaproponować model, w którym przy wystarczającym stężeniu ATP, skuteczne mogą być niskie dawki TMZ, co zwiększa jego biodostępność wewnątrzkomórkową i może nasilać apoptozę.

Rozdział 5 to podsumowanie rozprawy. W rozprawie cytowano 556 artykułów naukowych, co stanowi imponującą liczbę.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i znalazłam kilka drobnych błędów edytorskich, które nie wpływają na jakość rozprawy.

Zadokowano ponad 40 ligandów do P2X7. Na stronie 86 autorka skrótowo opisała ich wybór. Nie było dla mnie jasne, jak dobrano ligandy fotoaktywne, gdyż prawdopodobnie kierowano się nie tylko kryteriami dostępności komercyjnej. Czy mogłabym prosić o bardziej szczegółowe wyjaśnienie tej kwestii? Zrozumiałam, że tego typu ligandy fotoaktywne nie były dotychczas testowane doświadczalnie w kontekście receptora P2X7, ale chciałabym to potwierdzić.

Znalazłam kilka drobnych błędów edytorskich, ale nie wpływają one w żadnym stopniu na jakość rozprawy, na przykład:

strona xii, powinno być: discussing

podrozdział 1.1, powinno być: The text outlines the challenges associated with studying such systems and reviews computational methods

rysunek 2.3, powinno być: Close-up view

strona 109, "The results of the commercial docking of compounds...." Najpewniej nie chodziło o "komercyjne dokowanie", lecz o dokowanie związków dostępnych komercyjnie.

W rozdziale 4, w tabelach 4.4 i kolejnych nie podano jednostek wyników dokowania. Podpisy tabel sprawiają wrażenie niedokończonych. Podano wartości średnie, ale czy w takim razie nie należałoby podać też błędów? Czy liczba cyfr znaczących w tych tabelach nie jest zbyt duża?

Uważam, że wyniki pani Sylwii Czach są niezwykle wartościowe, a badane układy stanowią duże wyzwanie dla metod dynamiki molekularnej, ponieważ zmian konformacyjnych nie można w tych symulacjach w prosty sposób indukować światłem. Autorka musiała więc dostosować metody i zastosować różne zabiegi metodyczne, aby odtworzyć ten proces w symulacjach. Zarówno obiekty badań, jak i zastosowane metody są w tej rozprawie niestandardowe i nowatorsko połączone. Rozprawę cechują starannie przygotowane rysunki.

Ponadto cele rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Czach zostały dobrze sformułowane, w pełni zrealizowane oraz są zgodne z wynikami badań autorki. Autorka podjęła się badań bardzo trudnych układów białkowych, które reagują na wzbudzenie światłem i propagują w ten sposób dynamikę układu związaną z funkcją. Ogrom wykonanej pracy, trudne analizy i właściwy dobór metod spowodowały, że udało się odpowiedzieć na pytania badawcze dotyczące krajobrazu energetycznego w stanach podstawowych i wzbudzonych. Autorka nie musiała stosować szczegółowego opisu kwantowo-mechanicznego połączonego z dynamiką, gdyż właściwie dobrała metody badawcze.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Sylwii Czach przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną mgr Sylwii Czach w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne, oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Sylwii Czach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na liczbę i jakość opublikowanych artykułów oraz nowatorskie podejście do symulacji białek regulowanych optycznie wnoszę o wyróżnienie rozprawy. Autorka pokazała, że metody obliczeniowe mogą być użyte do opisu mechanizmów działania białek fotoaktywnych, do projektowania ich ligandów oraz nowych układów regulowanych światłem. Część metod badawczych nie była dotąd stosowana do białek fotoaktywnych. Wyniki przedstawione w rozprawie są oryginalne i w większości opublikowane w czasopismach z listy JCR.