



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

dr hab. inż. Jacek Czub
Katedra Chemii Fizycznej
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
tel. +48 535970599
e-mail: jacek.czub@pg.edu.pl

Gdańsk, 09.03.2023

RECENZJA

osiągnięć naukowych oraz całokształtu dorobku pana doktora Łukasza Peplowskiego w związku z postępowaniem o nadanie mu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie fizyka

Niniejszą recenzję przygotowałem w odpowiedzi na pismo prof. dr. hab. Ireneusza Grabowskiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, informujące mnie o powołaniu przez tę Radę na recenzenta w postępowaniu o nadania stopnia doktora habilitowanego Panu doktorowi Łukaszowi Peplowskiemu. Recenzja została przygotowana zgodnie z ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 (z późniejszymi zmianami), na podstawie dołączonej do w/w pisma dokumentacji przedłożonej przez Habilitanta, spełniającej wedle mojej oceny wymogi formalne ustawy.

Pan dr Łukasz Peplowski ukończył studia na Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu, gdzie w 2004 r. uzyskał tytuł magistra fizyki. W roku 2009 na tym samym Wydziale doktoryzował się na podstawie rozprawy „Wykorzystanie metod dynamiki molekularnej i bioinformatyki do badania mechanizmów reakcji enzymatycznych, ze szczególnym uwzględnieniem hydratazy nitrylowej”, przygotowanej pod kierunkiem prof. Wiesława Nowaka, uzyskując stopień doktora nauk fizycznych.

W roku 2008 Habilitant zatrudnił się początkowo na stanowisku asystenta a następnie (od roku 2009) adiunkta na swoim macierzystym wydziale UMK, gdzie pracuje do dzisiaj. W roku 2011 pracował też krótko jako stażysta w dziale badawczo-rozwojowym firmy farmaceutyczno-biotechnologicznej Adamed w Pieńkowie k. Warszawy, zaś w latach 2016–2023 odbył kilka krótkoterminowych staży w zespole badawczym, z którym współpracuje (prof. Zhemina Zhou z Jiangnan University w Wuxi w Chinach). Wedle informacji, którymi dysponuję, Kandydat ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego po raz pierwszy.

Zainteresowania naukowe dra Peplowskiego mają przede wszystkim charakter aplikacyjny i koncentrują się na wykorzystaniu metod molekularnej biofizyki obliczeniowej w celu poprawy parametrów funkcjonalnych enzymów o znaczeniu biotechnologicznym.

Swoje badania z wykorzystaniem symulacji molekularnych oraz innych narzędzi obliczeniowych Habilitant prowadzi w ścisłej współpracy z zespołami specjalizującymi się w doświadczalnej biotechnologii – wspomnianą powyżej grupą prof. Zhou a ostatnio także grupą prof. Xianzhonga Chena z tego samego uniwersytetu. Należy podkreślić, że ta współpraca z doświadczalnikami okazała się być bardzo owocna a jej wynikiem jest cykl artykułów przedłożony jako osiągnięcie habilitacyjne. Wcześniej dr Peplowski zajmował się także zastosowaniem nierównowagowej dynamiki molekularnej (tzw. dynamika sterowana) do badania przyczyn zróżnicowanej stabilności strukturalnej białek posiadających węzły cysteinowe (współpraca z prof. Markiem Cieplakiem) oraz do badania procesu mechanicznego rozciągania podwójnej helisy DNA (badania pod kierunkiem prof. Wiesława Nowaka). Wykorzystywał także metody kwantowochemiczne w celu przewidywania widm oscylacyjnych cząsteczek organicznych.

Od czasu uzyskania stopnia doktora do momentu złożenia wniosku Habilitant opublikował 18 artykułów w czasopismach indeksowanych w JCR, z czego 8 stanowi osiągnięcie naukowe przedłożone jako podstawa wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Z uwagi na specyfikę zrealizowanych badań większość artykułów z tego cyklu została opublikowana w solidnych czasopismach z dziedziny biotechnologii i katalizy a jedna w prominentnym czasopiśmie adresowanym do szerszej społeczności chemików (*Chemical Science*). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) tego zbioru publikacji wynosi ok. 52 (zgodnie z danymi opublikowanymi w r. 2022). Habilitant publikował też wyniki swoich badań w specjalistycznych czasopismach z dziedziny fizyki chemicznej i biologicznej, chemii teoretycznej i spektroskopii.

Od 2009 r. Habilitant wygłosił 4 referaty na zaproszenie na lokalnych konferencjach oraz zaprezentował 15 doniesień w formie plakatów na konferencjach w kraju i za granicą, co wskazuje na dosyć ograniczoną aktywność konferencyjną. Wygłosił także 4 referaty na zaproszenie oraz przeprowadził szereg wykładów szkoleniowych z zakresu biofizyki obliczeniowej w zaprzyjaźnionym Jiangnan University.

Publikacje pana dra Peplowskiego były do momentu złożenia wniosku cytowane 152 razy (nie wliczając autocytowań; dane z Web of Science), zaś jego indeks Hirscha wynosi 9. W mojej opinii wskaźniki cytowań sytuują Habilitanta poniżej średniej na tym etapie kariery. Należy jednak zauważyć, że z racji na specjalistyczny i aplikacyjny charakter jego badań ich potencjał cytowalności jest z konieczności ograniczony. Dodatkowo wiele spośród jego najważniejszych artykułów ukazało się stosunkowo niedawno (dla przykładu, cykl habilitacyjny powstał w latach 2018–2022), stąd mogły jeszcze nie zostać w pełni dostrzeżone. Z deklaracji dotyczących wkładu pracy, z którymi w pełni współbrzmia oświadczenia współautorów, wynika jednoznacznie, że Habilitant miał wiodący udział w powstaniu dużej części swoich artykułów, odpowiadając za część predykcijną i obliczeniową interdyscyplinarnych badań. Adekwatnie do tego udziału, w czterech

publikacjach przedłożonego cyklu był on autorem korespondencyjnym, w jednej zaś (*Chemical Science*) zajmuje pierwsze miejsce na liście autorów (wraz z dwoma innymi osobami). Biorąc pod uwagę wiodący i dobrze zdefiniowany udział dra Peplowskiego w jego współautorskich pracach, uważam, że przytoczone powyżej dane naukometyczne są wystarczające do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Jako osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego pan dr Łukasz Peplowski przedłożył cykl ośmiu artykułów naukowych opatrzonego tytułem „*Zastosowanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do ulepszania enzymów biotechnologicznych*”. Cykl ten spełnia wymóg jednotematyczności i poświęcony jest projektowaniu modyfikacji dwóch enzymów wykorzystywanych w przemysłowej biotechnologii, hydratazy nitrylowej oraz fosforylasy sacharozy, w celu zmiany ich spektrum substratowego oraz zwiększenia aktywności katalitycznej i termostabilności. Opracowanie ulepszonych wariantów tych enzymów jest ważne przez wzgląd na to, że umożliwiają one przemysłową produkcję odczynników chemicznych w sposób energooszczędny i mniej uciążliwy dla środowiska naturalnego niż ma to miejsce w tradycyjnej syntezie chemicznej. Jak słusznie zauważa Habilitant, stanowiąc podejście komplementarne do eksperymentu, metody obliczeniowej biofizyki powinny pozwalać na precyzyjne i niskokosztowe projektowanie mutacji punktowych oraz innych modyfikacji enzymów mających na celu usprawnienie ich funkcji. Przedstawiony cykl dowodzi jednoznacznie, że taki program badawczy rzeczywiście może przynieść pożądane rezultaty. Co równie istotne, dzięki umocowaniu w formalizmie mechaniki statystycznej, metody obliczeniowe pozwoliły także na powiązanie mikroskopowej dynamiki enzymów z ich parametrami mierzonymi w skali makro a co za tym idzie, umożliwiły zaproponowanie w jaki sposób konkretne mutacje wpłynęły na poprawę własności funkcjonalnych. Tak jak wspomniałem powyżej, wypada założyć, że relatywnie niewielka liczba cytowań cyklu habilitacyjnego w literaturze przedmiotowej wynika raczej z niszowego charakteru badań niż z braku pozytywnego odzewu środowiska naukowego.

Pierwsza praca cyklu [H1] poświęcona jest poszerzeniu spektrum substratowego hydratazy nitrylowej (NHaza), która katalizuje konwersję nitryli do amidów. W pracy tej, wykorzystując narzędzia bioinformatyczne, Habilitant w pierwszej kolejności wytypował 5 niezakonserwowanych reszt aminokwasowych w centrum aktywnym, które mogły zostać zmutowane bez utraty funkcji katalitycznej enzymu. Charakteryzując eksperymentalnie 100 możliwych mutacji punktowych w wytypowanych pozycjach współpracownicy Habilitanta zidentyfikowali następnie dwa warianty o zwiększonej aktywności katalitycznej oraz poszerzonym spektrum substratowym. Dla mutantów tych otrzymano dalej struktury krystaliczne, za których walidację i analizę odpowiedzialny był Habilitant. Przeprowadził on także porównawcze symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej (MD) obu mutantów

oraz szczepu dzikiego białka. Na podstawie analizy wygenerowanych trajektorii dynamicznych postawił szereg hipotez wyjaśniających molekularne podłoże obserwowanej poprawy właściwości NHazy.

Eksploatacją przyczyn zwiększonej aktywności enzymatycznej p. dr Peplowski zajmował się także w kolejnej pracy cyklu [H2], której celem było udoskonalenie termostabilnego wariantu hydratazy nitrylowej. Podobnie jak w pracy [H1] zastosował w tym celu pełnoatomową dynamikę molekularną. Z uwagi na brak wysokorozdzielczych danych strukturalnych dla badanego wariantu NHazy, Habilitant otrzymał a następnie poddał symulacji model homologiczny enzymu. Analiza pod kątem właściwości strukturalnych centrum aktywnego pozwoliła na zaproponowanie, w jaki sposób zidentyfikowane mutacje warunkują podwyższoną aktywność NHazy.

W trzech zbliżonych tematycznie pracach [H3], [H4] i [H5] Habilitant zajmował się projektowaniem wariantów sekwencyjnych hydratazy nitrylowej z dwóch różnych mikroorganizmów, które charakteryzowałyby się podwyższoną termostabilnością. W pracach [H3] i [H4], wykorzystując programy predykcyjne Rosetta (moduł ddg) [H3] i FireProt [H4] oraz dynamikę molekularną [H3], zaproponował szereg mutacji punktowych NHazy mających na celu zwiększenie jej stabilności termicznej. Zwiększona termostabilność wielu spośród tych wariantów sekwencyjnych została następnie potwierdzona eksperymentalnie przez jego współpracowników na podstawie pomiarów zmian aktywności katalitycznej w czasie. Dla trzech najlepszych mutantów punktowych [H3] oraz mutantu zawierającego 10 mutacji (tzw. wariant M10) [H4], Habilitant przeprowadził następnie produkcyjne symulacje dynamiki molekularnej, w celu wyjaśnienia podłoża zwiększonej termostabilności. Wariant M10 okazał się także bardziej wydajny katalitycznie, czego przyczyny badał Habilitant, dokując substrat (nikotynonitryl) do zrelaksowanej struktury białka i analizując strukturę uzyskanego kompleksu.

Praca [H5] dotyczyła innego sposobu zwiększania termostabilności białek, polegającego na łączeniu podjednostek protomerycznych przy pomocy linkerów peptydowych. Stosując linkery o różnej długości i sekwencji, współpracownicy p. dra Peplowskiego połączyli łańcuch α i β NHazy, uzyskując jej bardziej termostabilne warianty. Następnie poprzez umiejętne wykorzystanie kilku narzędzi bioinformatyki strukturalnej Habilitant uzyskał pełnoatomowe modele tych wariantów i poddał je symulacjom dynamiki molekularnej w dwóch temperaturach (300 i 335 K). Analiza fluktuacji reszt oraz kontaktów międzyresztowych wskazała na możliwe przyczyny zwiększonej stabilności termicznej.

W pracy [H6] Habilitant wykorzystał procedurę badawczą przetestowaną wcześniej dla NHazy, w celu zwiększenia termostabilności fosforylasy sacharozy – enzymu katalizującego reakcję konwersji sacharozy do fruktozy i glukozo-1-fosforanu. Podobnie jak poprzednio badania doświadczalne potwierdziły wyższą stabilność szeregu zaprojektowanych

wariantów sekwencyjnych a symulacje MD posłużyły wyjaśnieniu podłoża tego efektu dla najbardziej obiecującego spośród nich.

W dwóch ostatnich pracach cyklu [H7] i [H8], p. dr Peplowski zajmował się projektowaniem wariantów enzymów o zmienionej selektywności względem substratów. Konkretnie, w celu uzyskania stereospecyficznej NHazy wykorzystał dokowanie molekularne oraz sterowane symulacje MD do wytypowania czterech reszt mogących mieć znaczenie dla rozróżniania obu enancjomerów substratu (mandelonitryl) [H7]. Wszystkie możliwe mutanty punktowe w wytypowanych pozycjach zostały następnie wyeksprymowane i poddane doświadczalnej ewaluacji pod kątem aktywności katalitycznej. Okazało się, że jeden z tych mutantów wykazywał bardzo wysoką enancjoselektywność, katalizując hydratację niemal wyłącznie S-mandelonitrylu. Habilitant zbadał możliwe przyczyny tej preferencji ponownie wykorzystując dokowanie i symulacje MD. Ustalił, że mutacja prowadzi do istotnych rearanżacji struktury centrum aktywnego NHazy, znacznie utrudniających katalizę substratu o konfiguracji R.

Praca [H8] poświęcona była otrzymaniu wariantu NHazy, który charakteryzowałby się regioselektywnością, konwertując do funkcji amidowej tylko jedną z dwóch grup nitrylowych obecnych w cząsteczce substratu. Dokując do zrelaksowanego modelu homologicznego NHazy cztery różne dinitryle, Habilitant zidentyfikował szereg reszt aminokwasowych, które potencjalnie mogłyby wpływać na regioselektywność enzymu. Podobnie jak w poprzednich pracach, wszystkie możliwe mutacje wytypowanych reszt zostały przetestowane eksperymentalnie, włączając tym razem także podwójne mutanty w obiecujących pozycjach. Jeden z tych podwójnie zmutowanych wariantów okazał się być niemal w 100 % regioselektywny dla czterech badanych dinitryli. Molekularny mechanizm wyjaśniający te obserwacje Habilitant zaproponował na podstawie dokowania substratów do zmutowanych wariantów NHazy.

Reasumując, uważam, że przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe pana dra Peplowskiego stanowi solidny i spójny tematycznie cykl artykułów, dowodzący, że metody obliczeniowej biofizyki molekularnej mogą z powodzeniem wspomagać otrzymywanie zmodyfikowanych enzymów o poprawionych parametrach funkcjonalnych. Symulacje molekularne oraz pozostałe obliczenia zrealizowane przez Habilitanta w ramach podejścia zintegrowanego z eksperymentem były użyteczne zarówno na etapie projektowania bądź zawężania zakresu testowanych mutacji, jak i przy stawianiu hipotez dotyczących mikroskopowych determinantów obserwowanych zmian aktywności i stabilności. Moje zastrzeżenia wzbudziły natomiast niektóre zbyt daleko idące wnioski z przeprowadzonych klasycznych symulacji MD, znajdujące wyraz w takich sformułowania, jak np. „Kolejnym czynnikiem zwiększającym aktywność katalityczną względem dużych aminokwasów [zapewne chodziło o nitryle] jest zmiana w korelacji wzajemnej ruchów dużych fragmentów podjednostki β ” czy „Odległość kobalt-azot (...) wynosiła w przypadku białka natywnego 5,9

Å, a w wariancie M10 5,4 Å (...) co spowodowało łatwiejszą aktywację reakcji enzymatycznej”. W rzeczywistości Habilitant nie badał bezpośrednio aktywności katalitycznej enzymów, stąd w mojej opinii twierdzenia oparte wyłącznie na korelacji z danymi doświadczalnymi nie powinny być tak kategoryczne. Jest tak, tym bardziej że symulacje były na ogół dosyć krótkie a Habilitant stosunkowo mało uwagi poświęca kluczowej w dziedzinie symulacji makrocząsteczek kwestii próbkowania przestrzeni konfiguracyjnej i ocenie uzbieźniania wyników. W tym miejscu rodzi się także pytanie, czy Habilitant rozważał rozszerzenie swoich badań o dynamikę molekularną ab initio w wariancie QM/MM, która w połączeniu z metodami wzmocnionego próbkowania umożliwiłaby mu bezpośrednią ocenę wpływu mutacji na sam proces katalizy? Trudno mi się także zgodzić z twierdzeniem, że model homologiczny przygotowany z użyciem SwissModel „zachowuje się podobnie jak zbliżona struktura krystalograficzna”, nawet jeśli parametry RMSD i RMSF nie wskazują na brak stabilności w ciągu 200 ns symulacji.

Szczegółowo określone wkłady pracy nie pozostawiają wątpliwości, że p. dr Pełowski miał wiodący udział w zrealizowaniu badań wchodzących w skład jego osiągnięcia habilitacyjnego. Był on wyłącznym autorem koncepcji części obliczeniowej wszystkich prac, zaplanował i wykonał większość obliczeń i analiz numerycznych, w tym w szczególności zrealizował lub nadzorował realizację symulacji molekularnych i analizę ich wyników, przygotował modele homologiczne enzymów, a także badał ich struktury z użyciem narzędzi biologii strukturalnej. Był także odpowiedzialny za napisanie tych fragmentów artykułów, które dotyczą wyników obliczeniowych. Biorąc pod uwagę zawartość merytoryczną i wiodącą rolę, uważam, że badania Habilitanta wniosły istotny wkład w rozwój biofizyki a jego wnioski o przyznanie stopnia doktora habilitowanego jest z tej perspektywy uzasadniony.

Z wykazu dorobku wynika, że p. dr Pełowski wykazywał się dotąd raczej ograniczoną skutecznością w pozyskiwaniu środków na realizację swoich badań. Przez ponad 13 lat od uzyskania stopnia doktora kierował tylko jednym małym projektem badawczym (Miniatura z Narodowego Centrum Nauki), 4 razy zaś był wykonawcą w projektach finansowanych przez zewnętrzne instytucje (Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, NCN oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Brał także udział w realizacji projektów finansowanych w ramach wewnętrznych grantów UMK w programie Inicjatywa Doskonałości Uczelnia Badawcza.

Bardzo wysoko ocenić należy z kolei zaangażowanie p. dra Pełowskiego w międzynarodową współpracę naukową. Jak już wspominałem, cały jego cykl habilitacyjny powstał w ścisłej współpracy z dwoma zespołami biotechnologów z Jiangnan University w Wuxi w Chinach. W wyniku starań Habilitanta, współpraca ta została sformalizowana w ramach bilateralnej umowy między Uniwersytetami. Odbył on kilka krótkoterminowych

wizyt w Jiangnan University (łącznie ok. 3 miesiące), w trakcie których wygłosił cztery referaty a kilka razy poprowadził także warsztaty dla studentów i doktorantów. Pomagał również w realizacji jednej pracy magisterskiej w Jiangnan University. Warto podkreślić, że aż 11 z 18 artykułów opublikowanych przez Hamilitanta po uzyskaniu stopnia doktora powstało we współpracy z zagranicznymi naukowcami. Uważam zatem, że mimo braku odbycia pełnowymiarowego stażu podoktorskiego, p. dr Pełowski spełnia ustawowy wymóg „wykazywania się istotną aktywnością naukową” realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej.

Wysoko oceniam także działalność dydaktyczną, organizacyjną i popularyzatorską p. dra Pełowskiego. Prowadził on liczne zajęcia ćwiczeniowe i laboratoryjne dla studentów I i II stopnia z zakresu fizyki, metod numerycznych, programowania i symulacji molekularnych. Jako promotor pomocniczy sprawował opiekę merytoryczną nad trojgiem doktorantów (jeden nadany stopień, dr Rafał Jakubowski). Był także promotorem siedmiu prac magisterskich, jednej licencjackiej i czterech inżynierskich obronionych na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UMK. Od 2006 roku jest członkiem komitetu organizacyjnego corocznej, międzynarodowej konferencji BIT (BioInformatics in Toruń). W 2019 pozyskał dla UMK środki z Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej w ramach programu PROM – Międzynarodowej wymiany stypendialnej doktorantów i kadry akademickiej (finansowanie), będąc koordynatorem tego programu. Był także zaangażowany w organizację oraz brał udział jako wykładowca i instruktor w szeregu szkoleń, warsztatów oraz konferencji o charakterze popularyzatorskim.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożone przez pana dra Łukasza Pełowskiego osiągnięcie naukowe, jakim jest monotematyczny cykl publikacji, stanowi znaczny wkład Autora w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie fizyka. Uważam, że uzyskał on kwalifikacje do prowadzenia samodzielnej działalności badawczej i nauczania na poziomie akademickim, a istotną część swoich badań zrealizował w ramach owocnej współpracy międzynarodowej. Wobec spełnienia wymogów określonych w art. 219. ust 1 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), popieram wniosek pana dra Łukasza Pełowskiego o nadanie mu stopnia doktora habilitowanego i wnoszę o dopuszczenie go do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.



Jacek Czub