



Prof. dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Biomedycznej UAM

Poznań, 7 stycznia 2025 r

OCENA

osiągnięć naukowych przedstawionych przez dr Pawła Krupę w związku z ubieganiem się o stopień naukowy doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki fizyczne w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

Recenzja osiągnięcia naukowego przedłożonego przez doktora Pawła Krupę i zatytułowanego „*Rozwój i wykorzystanie pól siłowych o różnych poziomach rozdzielczości do badania struktury i dynamiki wybranych białek*” przygotowana została w postępowaniu o nadanie mu stopnia naukowego doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki fizyczne w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych. Ocena ta wykonana została na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (pismo RN.432.3.2024 z dnia 7 listopada 2024 roku).

Doktor Paweł Krupa jest z wykształcenia chemikiem, ukończył dwustopniowe studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskując w 2009 roku tytuł zawodowy licencjata (specjalność chemia medyczna) oraz magistra nauk chemicznych w 2011 roku (specjalność chemioinformatyka). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych otrzymał w oparciu o dysertację doktorską zatytułowaną „*Rozszerzenie pola siłowego UNRES o potencjały lokalne i dane z metod porównawczych w celu lepszego przewidywania struktur białek*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Cezary Czaplewski. Stopień naukowy oraz wyróżnienie rozprawy zatwierdzone zostały uchwałą Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 8 lipca 2015 roku.

1. Ocena osiągnięcia naukowego zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 219 ust 1 pkt 2.

Doktor Krupa swoje osiągnięcie naukowe w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego oparł na cyklu 13 powiązanych tematycznie publikacji (współczynnik wpływu od 0 do 5,8) i zatytułował „*Rozwój i wykorzystanie pól siłowych o różnych poziomach rozdzielczości do badania struktury i dynamiki wybranych białek*”. Prace te ukazały się w recenzowanych czasopismach międzynarodowych, które zgodnie z wymogami ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267ust. 2 pkt 2 lit. B. W ośmiu artykułach z cyklu habilitacyjnego Kandydat jest pierwszym autorem, a w pięciu dr Krupa jest autorem korespondencyjnym. Jedna z publikacji [H9] jest autorstwa wyłącznie dr. Krupy i ukazała się w czasopiśmie *TASK Quarterly*, które w momencie publikacji artykułu znajdowało się na liście MNiSW część B (10 pkt). Kandydat przekazał też wymagane oświadczenia współautorów o ich wkładach własnych w powstanie danych publikacji, które pozwalają określić rolę Kandydata w sformułowanie koncepcji badań oraz ich realizacji. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (liczonego za rok 2023) dla serii prac przedłożonych jako osiągnięcie wyniosła 46,8 co jest bardzo dobrym wskaźnikiem bibliometrycznym je charakteryzującym.

W streszczeniu do omówienia wyników w autoreferacie dr Krupa przedstawia zakres i znaczenie badań, które definiują jego osiągnięcie naukowe:

W ramach prezentowanego cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych w pierwszym kroku skupiłem się na opracowaniu zunifikowanego protokołu przewidywania struktury białek w polu siłowym UNRES oraz wykorzystaniu go do określenia, jedynie na podstawie sekwencji, struktur wszystkich 55 białek wytypowanych do przewidywania struktury w 11 edycji eksperymentu CASP (H1). Otrzymane wyniki umożliwiły mi dokonanie rzetelnej oceny metody i zaplanowanie wykonania optymalizacji wag potencjałów wchodzących w skład funkcji energii w gruboziarnistym polu siłowym UNRES bazując na danych eksperymentalnych z magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) dla 7 wybranych białek treningowych w różnych temperaturach, zawierających zarówno konformacje zwinięte, jak i częściowo rozwinięte (H2) w celu poprawy zdolności predykcyjnych metody.

Prace składające się na osiągnięcie habilitacyjne doktora Krupy, według jego deklaracji przedstawionych w autoreferacie obejmują:

- *Rozwój i optymalizację gruboziarnistego pola siłowego UNRES (prace H1, H2, H10, H12)*
- *Rozwój i określenie możliwości predykcyjnych pól pełnoatomowych (prace H3, H4, H11)*
- *Wykorzystanie metod na różnych poziomach rozdzielczości w celu otrzymania pełnego obrazu badanego zagadnienia (H3, H13)*
- *Określenie właściwości fizykochemicznych, struktur i dynamiki wybranych białek (H1-H13)*
 - *Białek nieustrukturyzowanych (H3-H7)*
 - *Białek z wiązaniami disulfidowymi (H9-H11)*
 - *Białek w otoczeniu błon lipidowych (H7-H8)*
 - *Kompleksów białek (H3, H5-H7, H12-H13)*

Przechodząc do oceny osiągnięcia, należałoby skupić się na jego genezie czyli polu siłowym UNRES (UNited RESidue), które opracowane zostało przez zespół prof. Harolda A. Scheragi z Uniwersytetu Cornella (Ithaka, NY, USA) oraz prof. Adama Liwo, Uniwersytet Gdański. UNRES bazuje na zredukowanym modelu łańcucha polipeptydowego (model gruboziarnisty) i wykorzystywany jest w celu predykcji struktury przestrzennej białek. Od wielu lat jest rozbudowywany, optymalizowany i wzbogacany w liczne nowe funkcjonalności. UNRES dobrze plasował się też w kolejnych testach przewidywania struktur w ciemno CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction). Pomimo powstania nowych platform obliczeniowych do przewidywania struktur białek, takich jak cieszący się ostatnio popularnością pakiet AlphaFold, UNRES jest ciągle rozwijany przez grupy z Uniwersytetu Gdańskiego oraz Uniwersytetu Cornella UNRES i nadal skutecznie wykorzystywany do badań złożonych układów i procesów biologicznych. W tym kontekście ocenić należy przedłożone przez doktora Krupę osiągnięcie.

Dwie pierwsze prace z cyklu habilitacyjnego [H1 i H2] Habilitant, poświęcone są więc rozwojowi i optymalizacji pola UNRES. Zaimplementowane przez niego poprawki

zuniifikowanego protokołu predykcji oraz optymalizacja pola siłowego pozwoliły osiągnąć wyraźnie lepsze parametry predykcji struktur. W obu pracach dr Krupa jest pierwszym autorem, natomiast rolę autorów korespondencyjnych pełnili twórcy UNRES. Habilitant jako swój wkład podkreślił wykonanie symulacji dla 55 różnych białek. Aby poprawić rozdzielczość wyników zoptymalizował funkcję energii w polu UNRES przy użyciu metody maksymalnej wiarygodności (*maximum likelihood method*). Warto podkreślić, że wymiernym efektem wprowadzonych optymalizacji była poprawa zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES, w szczególności dla białek o strukturze α + β oraz β , co w perspektywie dalszych zastosowań można uznać za znaczące osiągnięcie. Stworzenie skutecznego i efektywnego oprogramowania do predykcji struktury biomolekuł jak miało to miejsce w przypadku UNRES i pakietu go wykorzystującego wymaga działań zespołowych i potrafi trwać nawet kilka dekad, ale efekty tej pracy są później wykorzystywane przez liczne zespoły badaczy.

Kolejna praca z serii habilitacyjnej (H3-H7) dotyczy badań strukturalnych białek uczestniczących w procesach neurodegeneracyjnych (amyloid β , synukleina) i cechujących się równocześnie labilnością konformacyjną i strukturalną. Układy te są ważne z punktu widzenia mechanizmów indukcji chorób neurodegeneracyjnych (choroby Alzheimer), z drugiej strony z uwagi na wspomnianą elastyczność struktury i podatność na nieprawidłowe zwinięcie (*misfolding*), stanowią nadal wyzwanie w badaniach strukturalnych. Do tych badań dr Krupa wykorzystał zoptymalizowane pole siłowe UNRES oraz niezależnie przeprowadził badania z wykorzystaniem pełnoatomowych pól siłowych z rodziny Amber lub CHARMM. Interesującymi i ważnymi z punktu widzenia neurotoksyczności są struktury oligomerycznych form amyloidu β ($A\beta$). Habilitant badał strukturę, dynamikę oraz stabilność tetramerycznej formy $A\beta$ (H3) oraz nieustrukturyzowanej monomerycznej formy $A\beta$ (H4). W swoich badaniach podjął też ważny problem – inhibicji procesu agregacji $A\beta$ w obecności wyselekcjonowanych alkaloidów izochinolinowych, co pozwoliło uzupełnić obserwacje eksperymentalne (H5). Pozostając w tematyce badań molekularnych podstaw chorób neurodegeneracyjnych (szczególnie demencji z występowaniem ciałek Lewiego) skupił się na analizie mechanizmu agregacji monomerycznych form amyloidu β i α -synukleiny oraz porównaniu ich wybranych form oligomerycznych (H6). Zajął się też wpływem jonów miedzi oraz struktur błonowych na agregację peptydu amyloidu β oraz strukturę i dynamikę różnych form oligomerycznych (H7). Ten aspekt badań jest złożony, łączy bowiem charakterystykę

oddziaływań peptydu A β z jonami miedzi z oddziaływaniami tej molekuly z błoną fosfolipidową. Wyniki tych badań stanowią osiągnięcie, które w ocenie recenzenta może mieć duże znaczenie w pełnym określeniu roli tych dwóch czynników a co za tym idzie w poszukiwaniach skutecznych terapii chorób neurodegeneracyjnych.

W kolejnej pracy (H8) Habilitant kontynuował badania strukturalne oddziaływania układów lipidowych z wybranymi białkami skupiając się na opracowaniu modelu układu białka UL49.5 z herpeswirusa HSV-1 w heterogenicznym modelu błony lipidowej. W tym przypadku badania te wsparte zostały solidną podbudową eksperymentalną (spektroskopia dichroizmu kołowego, spektroskopia NMR). Pozwoliło to na odkrycie, że N-terminalna część białka UL49.5 przyjmuje elastyczną, nieuporządkowaną strukturę w części pozakomórkowej, a region transbłonowy UL49.5 tworzy pojedynczą długą transbłonową α -helisa, a nie dwie zorientowane prostopadle. Co za tym idzie, możliwe było poznanie przyczyn braku zdolności do hamowania zależnej od TAP ścieżki prezentacji antygeny. Wyniki tych badań niewątpliwie dają dobry punkt wyjścia w dalszych poszukiwaniach efektywnych inhibitorów, które mogą mieć zastosowania farmaceutyczne.

Czynniki warunkujące stabilność struktur białek i ich kompleksów wymagają właściwej parametryzacji w procedurach predykcji ich struktur przestrzennych. Niewątpliwie do tych czynników należą wiązania (mostki) dwusiarczkowe stabilizujące kowalencyjnie określone konformacje łańcuchów polipeptydowych. Dr Krupa w kolejnych pracach (H9 - H11) zajął się również tym istotnym dla biologii strukturalnej problemem poprzez implementację oraz udoskonalenie potencjału umożliwiającego dynamiczne tworzenie i zrywanie mostków dwusiarczkowych podczas symulacji w polu UNRES. Analogiczne podejście zastosował też opracowując potencjał do pełnoatomowego pola Amber (H11). Podejście to zweryfikowane zostało z wykorzystaniem struktury rybonukleazy A, stabilizowanej czterema mostkami dwusiarczkowymi, przy wykorzystaniu symulacji dynamiki molekularnej (zarówno klasycznych jak i z wymianą replik) w gruboziarnistym polu siłowym UNRES i pełnoatomowym polu Amber. Dało to wgląd zarówno w stabilność mechaniczną jak i termodynamiczną wiązań dwusiarczkowych rybonukleazy A oraz stabilność całej makromolekuly.

Ostatnie dwie prace (H12 i H13) wchodzące w zakres osiągnięcia habilitacyjnego doktora Krupy dotyczą efektywnego dokowania multimerycznych struktur białek. Problem ten jest niewątpliwie bardziej złożony niż typowa predykcja struktur pojedynczych makromolekuł, obejmuje bowiem poszukiwanie i optymalizację powierzchni oddziaływań oraz orientacji przestrzennej podjednostek w multimerze białka. Docenić tu należy stworzenie i przetestowanie nowej funkcjonalności pakietu UNRES jakim jest UNRES-Dock. Wykorzystany on został między innymi do określenia struktury ważnego immunologicznie kompleksu białek CD28-CD86, który dr Krupa zweryfikował dodatkowo za pomocą metody pełnoatomowej.

Podsumowując ten fragment opinii, chciałbym podkreślić, że osiągnięcie naukowe przedłożone przez doktora Krupę w mojej ocenie jest bardzo wartościowe. Wyniki badań wchodzące w jego skład zostały zauważone w środowisku naukowym i wykorzystane przez innych badaczy, dotyczy to choćby nowych lub poprawionych funkcjonalności UNRES. Dlatego niewątpliwie spełnione zostało ustawowe wymagania stawiane osiągnięciom przedstawianym w procedurze habilitacyjnej.

2. *Opinia o aktywności naukowej*

W tym fragmencie mojej opinii, biorąc pod uwagę szczegółowy zapis w art. 221 ust 8., który mówi, że: *Recenzenci, w terminie 8 tygodni od dnia doręczenia im wniosku, oceniają, czy osiągnięcia naukowe osoby ubiegającej się o stopień doktora habilitowanego odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2, i przygotowują recenzje*, chciałbym wyrazić moją subiektywną ocenę aktywności naukowej doktora Pawła Krupy, która jest uzupełnieniem wcześniej wyrażonej opinii o osiągnięciu naukowym w procedurze o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Fakty dotyczące współpracy naukowej, działalności badawczej w innych jednostkach oraz pozostały dorobek naukowy Kandydata wspierają wniosek doktora Krupy.

W okresie po doktoracie, czyli od 1 sierpnia 2015 do 31 lipca 2016 odbył zagraniczny staż podoktorski w zespole uznanego specjalisty z obszaru bioinformatyki - Profesora Harolda Scheragi w Baker Laboratory of Chemistry and Chemical Biology, w Uniwersytecie Cornell'a (Ithaca, NY, USA). Po powrocie ze stażu, od 1 września 2016 roku, rozpoczął pracę na

stanowisku adiunkta w Oddziale Fizyki Teoretycznej, Zespół Biofizyki Teoretycznej, Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wartym odnotowania jest też praca w charakterze asystenta naukowego w okresie doktoratu (11.2014-05.2015) w grupie Profesora Andrzeja Kłoczowskiego w Battelle Center for Mathematical Medicine, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital oraz Uniwersytecie Stanowym Ohio w Columbus (OH, USA). Habilitant współpracował więc z uznanymi zespołami zagranicznymi i realizował swoje badania w innych niż macierzysta jednostkach naukowych.

W przekazanej dokumentacji widnieje bogaty także wykaz prac doktora Krupy opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora i nie włączonych do osiągnięcia habilitacyjnego obejmujący łącznie dwadzieścia trzy artykuły naukowe indeksowane w bazie Web of Sciences, siedem rozdziałów książkowych i jedna praca w *Journal of Supercomputing Frontiers and Innovations*. Warto także odnotować, że w pięciu z tych publikacji dr Krupa widnieje jako autor korespondencyjny. Kolejnym ważnym aspektem wpływającym na bardzo pozytywny odbiór działalności naukowej Habilitanta jest fakt, że prace te w przeważającej mierze ukazały się w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ponad to, warto też pozytywnie odnotować aktywność konferencyjną doktora Krupy (w tym 8 wystąpień na zaproszenie) oraz grantową, na którą składają się dwa granty kierowane osobiście (NCN Sonata UMO-2019/35/D/ST4/03156 i NCN Preludium UMO-2015/17/N/ST4/03937) oraz jeden projekt konsorcyjny (zadanie badawcze z ramienia IF PAN w konsorcjum projektowym NCN Sonata 2022/47/D/NZ7/02399).

W oparciu o zawarte w autoreferacie informacje dotyczące staży, współpracy naukowej i aktywności badawczej oraz publikacyjnej z nich wynikającej z pełnym przekonaniem mogę więc wyrazić moją opinię, że doktor Krupa wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej jednostce naukowej.

3. Podsumowanie i wnioski końcowe

W podsumowaniu niniejszej opinii jednoznacznie stwierdzam, co następuje:

- Osiągnięcie naukowe przedłożone przez doktora Pawła Krupę zatytułowane „*Struktura kompleksów metali z bioaktywnymi ligandami organicznymi*”, które obejmuje serię

powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych spełnia wymagania ustawowe określone w art. 219 ust. 1 pkt 2;

- Przedstawiony przez dr Krupę cykl prac stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki fizyczne w rozumieniu ustawy, a w szczególności wnosi nową i ważną wiedzę z obszaru metod predykcji struktur białkowych oraz badań strukturalnych białek o istotnych właściwościach biologicznych i znaczeniu biomedycznym. Artykuły naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały dostrzeżone i spotkały się ze odzewem w środowisku naukowym.
- Aktywność naukowa doktora Krupy realizowana była w kilku jednostkach naukowych, w tym zagranicznych, skutecznie pozyskiwał fundusze na realizację swoich badań, a jego dorobek naukowy w odniesieniu do obecnego etapu kariery jest znaczący.

Reasumując, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o nadanie doktorowi Pawle Krupie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki fizyczne w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.



Prof. dr hab. Maciej Kozak