

Prof. dr hab. inż. Marta Szachniuk
Zakład Bioinformatyki Strukturalnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań, 19.01.2022

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: Identyfikacja potencjalnych inhibitorów fosfatazy białkowej typu 2C grupa A z *Arabidopsis* z wykorzystaniem metod bioinformatycznych i biochemicznych

Autor: mgr inż. Maciej Janicki

Promotor: dr hab. Agnieszka Ludwików, prof. UAM

Tematyka badawcza

Recenzowana praca doktorska przedstawia wyniki badań prowadzonych w zakresie biochemii i biologii molekularnej. Punktem wyjścia pracy jest defosforylacja białek – reakcja enzymatyczna polegająca na odcięciu od cząsteczki białka grupy fosforanowej, będąca jedną z ważniejszych strategii regulacyjnych metabolizmu. Defosforylacja jest reakcją przeciwstawną do fosforylacji, czyli przyłączenia reszty fosforanowej do związku chemicznego. Defosforylacja odbywa się w wyniku działania fosfataz białkowych, natomiast za fosforylację odpowiadają kinazy białkowe. Fosfatazy i kinazy to enzymy wytwarzane w organizmach roślinnych i zwierzęcych. Działają w celu modulowania aktywności białek w komórce, często w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Ze względu na duży potencjał tych związków chemicznych w naukach stosowanych, na przykład w diagnostyce klinicznej (choroby wątroby, kości, dróg żółciowych, etc.) czy biotechnologii (zastosowania w rolnictwie), są one częstym przedmiotem badań naukowych. Niniejsza praca skupia się na fosfatazie ABI1 i jej homologach, które w organizmach roślinnych kontrolują odpowiedź na stresy środowiskowe, a zatem mogą być narzędziem do manipulacji odpowiedzią na szkodliwe warunki, np. okresy suszy. Na fosfatazy białkowe można oddziaływać wyhamowując ich aktywność poprzez przyłączanie związków chemicznych będących inhibitorami fosfatazowymi. Znanych jest kilka cząsteczek spełniających funkcję inhibitora fosfataz PP2C w komórkach u ssaków (np. chlorek alkaloidu *sanguinarine*, *evans blue*). Jak dotąd jednak nie zidentyfikowano żadnego silnego chemicznego inhibitora fosfataz białkowych z rodziny PP2C u roślin. Autor niniejszej pracy podjął to

wyzwanie i przeprowadził obszerne badania interdyscyplinarne aby wyselekcjonować potencjalne inhibitory aktywności enzymatycznej ABI1.

Zakres pracy i wkład autora

W pracy doktorskiej, mgr inż. Maciej Janicki zajął się poszukiwaniem małowcząsteczkowych związków chemicznych pełniących funkcje inhibitorów fosfatazy białkowej ABI1, która jest negatywnym regulatorem sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA). W drodze do realizacji założonego celu, autor przeprowadził komplementarne badania *in silico* oraz *in vitro*. Przeszukał bazy danych związków chemicznych (bazę ZINC, archiwum Protein Data Bank oraz biblioteki ligandów pochodzące od trzech dostawców: ChemDiv, Assinex, Chembridge) aby wybrać potencjalne inhibitory. Dla wszystkich kandydatów przeprowadził eksperymenty obliczeniowe z użyciem modelowania molekularnego – w tym dokowania molekularnego, mechaniki molekularnej metodą pola powierzchni Borna, metodą fragmentarycznych orbitali molekularnych, symulacji dynamiki molekularnej – aby zbadać aktywność fosfatazową białka ABI1 w obecności wybranych związków chemicznych i zidentyfikować najlepiej rokujące ligandy. W tej części badań autor korzystał przede wszystkim z oprogramowania Surflex-Dock, Glide, Prime, Desmond, GAMESS oraz Facio. Na podstawie analizy aktywności enzymatycznej w obrębie rodziny PPP (PP1 i PP2A), mgr inż. Maciej Janicki wykazał występowanie niewielkiego efektu hamowania aktywności fosfatazowej dla dwóch związków chemicznych (ZINC05273880 oraz ZINC59151964) i postawił hipotezę o ich selektywności w obrębie fosfataz serynowo-treoninowych. Potwierdził również efekt inhibicji dla białek ABI1 i ABI2 (występujących na podobnym poziomie) oraz dla PPH1 (znacząco mniejszy). Przeprowadził eksperymenty *in vitro* w celu potwierdzenia hipotezy o skutecznym hamowaniu fosfatazy ABI1 przez związki małowcząsteczkowe. Wykonał szereg badań aby ustalić orientację wiązania wybranych związków chemicznych do fosfatazy ABI1. Udowodnił, że skuteczny inhibitor oddziałuje w miejscu wiązania receptora ABA do fosfatazy typu 2C z grupy A, jak również w miejscu aktywnym, które odpowiada za wiązanie substratu.

Ocena strony merytorycznej

Rozprawa doktorska liczy 147 stron maszynopisu. Składa się z sześciu rozdziałów, suplementu i bibliografii zawierającej 163 pozycje literaturowe. Dodatkowo autor dołączył krótkie streszczenie w języku angielskim i polskim, listę publikacji, których jest współautorem oraz informacje o projektach badawczych i źródłach finansowania badań. Tekst opatrzony jest 52 ilustracjami,

zawiera 14 tabel z danymi numerycznymi. W pracy umieszczono również objaśnienia skrótów, spis ilustracji oraz wykaz tabel.

Rozdział 1 wprowadza czytelnika w tematykę pracy doktorskiej. Autor przedstawia budowę i funkcje enzymów, jakimi są fosfatazy białkowe. Pokazuje ich podział ze względu na specyficzność defosforylowanego substratu. Charakteryzuje fosfatazy typu PPP, które są odpowiedzialne za znakomitą większość (ok. 90%) defosforylacji białek w komórkach organizmów eukariotycznych. W oddzielnym podrozdziale autor skupia się na enzymach z rodziny PP2C, których dotyczy tematyka pracy doktorskiej. Rodzina PP2C u *Arabidopsis* liczy 76 reprezentantów, których na podstawie właściwości sekwencji i struktury subdomen podzielono na 10 grup. Fosfatazy z grupy A, będące w centrum zainteresowań badawczych autora pracy, regulują szlak sygnalizacyjny ABA (kwasu abscysynowego). Do tej grupy należy fosfataza białkowa ABI1 (ABA intensive 1), której struktura i funkcja zostały szczegółowo scharakteryzowane w dalszej części Rozdziału 1.1. Kwas abscysynowy jest przedmiotem podrozdziału 1.2. Autor omawia jego strukturę i znaczenie w procesach biologicznych. Szczegółowo przedstawia w jaki sposób działa mechanizm hamowania fosfatazy ABI1 za pomocą ABA. Opisuje analogi strukturalne oraz pochodne ABA, które mogą naśladować działanie tego fitohormonu i hamować aktywność fosfatazy (chemiczne związki agonistyczne) lub wykazywać działanie przeciwne (związki antagonistyczne). Na końcu Rozdziału 1 wymienione są i scharakteryzowane najbardziej znane inhibitory fosfataz PPP.

Podczas czytania Rozdziału 1 nasunęło mi się jedno pytanie. Omawiając strukturę ABI1 autor wspomina o jej podobieństwie do wybranych homologów – ludzkiej fosfatazy PP2C α oraz ABI2, HAB1 i PPH1 z *Arabidopsis*. Nie podano tu jednak explicite jaki program został wykorzystany do nałożenia struktur i wyznaczenia wartości RMSD. Byłoby właściwe, aby uzupełnić te informacje. W różnych programach komputerowych zaimplementowane są różne algorytmy do wyznaczania RMSD, które dla tych samych struktur zazwyczaj dają inne wartości.

W Rozdziale 2 zdefiniowano cel pracy doktorskiej, jakim jest identyfikacja chemicznych związków niskocząsteczkowych hamujących aktywność fosfatazy białkowej ABI1. Określono również sposób osiągnięcia celu - projektowanie inhibitorów w oparciu o strukturę enzymu ABI1, realizowane z wykorzystaniem metod obliczeniowych oraz laboratoryjnych.

Rozdział 3 jest poświęcony metodom i materiałom wykorzystanym w pracy doktorskiej. Podzielono go na dwie części. W pierwszej, dotyczącej analizy bioinformatycznej, scharakteryzowano zasoby programowe i sprzętowe, które wykorzystano podczas tej analizy. Druga część zapoznaje czytelnika

z zasobami wykorzystanymi podczas analizy eksperymentalnej, tj. zestawami odczynników i markerów molekularnych, szczepami bakteryjnymi i materiałami użytymi do hodowli bakterii, konstruktami wektorowymi, itp. W tym podrozdziale autor opisuje również jak wykonywane były poszczególne analizy biochemiczne (m.in. transformacja bakterii *Escherichia coli*, nadekspresja i oczyszczanie białek, elektroforeza białek, badanie aktywności enzymatycznej fosfataz białkowych). W trakcie czytania Rozdziału 3 nasunęły mi się następujące pytania i komentarze:

- Na str. 39 autor napisał „W ramach projektu doktorskiego na dostępnej stacji roboczej w Pracowni Biotechnologii zostały zaimplementowane odpowiednie moduły obliczeniowe...”. Niestety nigdzie nie znalazłam opisu tych modułów. W pracy opisane są szczegółowo programy stworzone przez firmy czy osoby trzecie, które autor pracy wykorzystał w badaniach. Nie znalazłam jednak opisu własnych metod obliczeniowych zaimplementowanych przez autora. Czy w ramach doktoratu zaimplementowano jakieś algorytmy? Czy autor wykorzystywał wyłącznie istniejące programy pochodzące od dostawców zewnętrznych, które zainstalował (a nie zaimplementował) na swojej stacji roboczej?
- Czym jest „wirtualne przeszukiwanie bazy” (str. 43, 48)? Nie spotkałam się dotychczas z takim określeniem. Nie rozumiem również co oznacza „przeszukiwanie baz małowcząsteczkowych związków chemicznych za pomocą bazy ZINC12” – czy wzięto jakiś mechanizm z bazy ZINC12 i wykorzystano go do przeszukiwania innych baz danych?
- Co oznacza sformułowanie (str. 43), że próg podobieństwa został ustawiony na 70%? O jakie podobieństwo tu chodzi (sekwencyjne, strukturalne)?
- Co oznaczają dolne indeksy i, ij, k, l, jk, kl w zapisach w Tabeli 2 (str. 54)? Czy są to identyfikatory atomów? Co oznaczają te zapisy? Czym jest $Type_{ij}$ dla typu „Torsyjny”?
- „na podstawie wcześniej wybranej miary odległości (miary podobieństwa)” – miara podobieństwa jest czym innym niż miara odległości i w pracy naukowej powinno się je rozróżniać. Sądząc z kontekstu autor posługiwał się wyłącznie miarami odległości.
- W rozdziale brakuje informacji o tym jak przebiegał proces badań (na przykład analiz bioinformatycznych), jakie były jego kolejne kroki (co było pierwszym krokiem badań, co drugim, trzecim, itd.). Opisano szczegółowo wykorzystane narzędzia, jednak nie ma tutaj klarownego obrazu samego procesu badawczego. Bardzo pomocny byłby schemat wyszczególniający kolejne etapy badań umieszczony na początku rozdziału.

W Rozdziale 4 przedstawione są badania prowadzone podczas realizacji pracy doktorskiej oraz uzyskane wyniki. Założyłam, że kolejność, w jakiej opisano prace badawcze jest zgodna

z przebiegiem procesu badawczego (nie mam co do tego pewności, o czym wspomniałam już w komentarzu do Rozdziału 3). Autor zaczyna od przedstawienia procedury, której celem było zaproponowanie potencjalnego miejsca wiązania inhibitora ABI1. Przeprowadzono tu badania bioinformatyczne (przeszukanie baz danych, dokowanie molekularne, ocena powinowactwa do białka ABI1 i wybór pięciu kandydatów) oraz laboratoryjne (doświadczalna weryfikacja efektu inhibicji dla wybranych kandydatów), które nie dały zadowalających wyników (osiągnięto wyhamowanie aktywności fosfatazowej o 30-45%, co uznano za niezadowalające). W związku z tym podjęto próbę rozszerzenia modelu wiązania inhibitorów, uwzględniając w nim dodatkowe obszary oddziaływania substratów ABI1. Nowy model zweryfikowano wykorzystując wieloetapowe dokowanie molekularne i odfiltrowując gorzej rokujące ligandy. Dla 12 wytypowanych kandydatów przebadano ich wpływ na aktywność enzymatyczną białka ABI1. Zidentyfikowano dwa związki chemiczne o dużym potencjale hamującym, z czego jeden (obniżający aktywność fosfatazową o 71%) tworzy stabilny kompleks z białkiem ABI1, a drugi (obniżający aktywność o 95%) jest labilny i jego kompleks z ABI1 destabilizuje się w czasie – właściwości kompleksów badano metodą symulacji dynamiki molekularnej. Następnie ponownie przeszukano bazy ligandów, tym razem biorąc pod uwagę dwa miejsca wiązania w strukturze ABI1 wybrane w oparciu o analizę energii oddziaływań metodą FMO. Wyselekcjonowano 26 potencjalnych inhibitorów ABI1, z czego dla 13, które były dostępne komercyjnie, doświadczalnie zbadano ich faktyczny wpływ na aktywność fosfatazową białka ABI1. Wyniki eksperymentu pokazały spadek aktywności o 10% - 49%. Symulacja dynamiki molekularnej dla dwóch związków o najwyższym potencjale hamującym pokazała, że tworzą one stabilne kompleksy z białkiem ABI1. Na podstawie w/w badań autor wybrał dwóch najlepiej rokujących kandydatów (ZINC59151964 i ZINC05273880 - obydwa wyselekcjonowane w drugim badaniu przesiewowym) i z ich udziałem wykonał analizę mechanizmu inhibicji fosfatazy białkowej ABI1. W rezultacie zidentyfikował reszty aminokwasowe, które pełnią kluczową rolę w wiązaniu ligandów do białka ABI1. W ostatniej fazie badań autor sprawdził w jakim stopniu inhibitory ZINC59151964 i ZINC05273880 wpływają na aktywność enzymatyczną innych fosfataz białkowych z rodziny PP2C. Rozdział 4 dość wyczerpująco przedstawia wykonane prace badawcze. W trakcie czytania go nasunęły mi się tylko dwa pytania do autora:

- „użyto dwuetapowej strategii komputerowego przeszukiwania baz” (str. 77) – rozumiem, że to stwierdzenie odnosi się do podrozdziału 4.1, nie znalazłam jednak wyjaśnienia jaki był pierwszy a jaki drugi etap przeszukiwania. Dlaczego ta dwuetapowość jest istotna? Czy wyniki przeszukiwania w pierwszym etapie determinowały zapytania w etapie drugim?

- Nie jest dla mnie jasne z jakiego powodu wykonano trzecią analizę przesiewową (tę opartą o FMO). Co było motywacją dla przeprowadzenia tego badania?

Pracę podsumowuje dyskusja (Rozdział 5) oraz wnioski końcowe (Rozdział 6). W Rozdziale 5 autor przypomina tło tematyczne doktoratu oraz cel badań. Następnie streszcza przebieg prac badawczych i dyskutuje problemy, które pojawiły się w trakcie badań lub były motywacją do podjęcia takich czy innych kroków podczas realizacji doktoratu. Rozdział ten jest bardzo dobrym uzupełnieniem pracy, odpowiada na kilka pytań, na które nie znalazłam odpowiedzi w rozdziałach poprzednich. Był to dla mnie najciekawszy i najbardziej przystępnie napisany rozdział w pracy. W Rozdziale 6 wypunktowano najważniejsze wyniki otrzymane podczas realizacji niniejszej pracy. Moje pytania i komentarze odnośnie Rozdziału 5 i 6 są następujące:

- „Pierwszym z nich było komputerowe przeszukiwanie baz związków chemicznych z użyciem metod modelowania molekularnego...” – przeszukiwanie baz danych i modelowanie molekularne to dwa odrębne procesy. Samo przeszukiwanie danych może być podyktowane przeróżnymi potrzebami, niekoniecznie modelowaniem. W tym przypadku służyło ono znalezieniu potencjalnych kandydatów do dalszej analizy, w tym modelowania molekularnego. Inaczej mówiąc wynikiem przeszukiwania był początkowy zbiór związków chemicznych. Modelowanie molekularne miało na celu odfiltrowanie z tego zbioru słabo rokujących instancji.
- Na czym polegała trzyetapowa strategia dokowania molekularnego o zmiennej precyzji obliczeń (str. 114)? W szczególności interesuje mnie jak zmieniała się precyzja obliczeń.

Mimo pewnych niedopowiedzeń, drobnych błędów i wskazanych wyżej niejasnych fragmentów pracy, pozytywnie oceniam recenzowaną rozprawę doktorską. Na uznanie zasługuje sprawność autora w łączeniu eksperymentu obliczeniowego i biochemicznego. Uważam, że bardzo istotnym osiągnięciem jest uzyskanie nowych modeli związków chemicznych działających jako inhibitory PP2C z grupy A, gotowych do dalszych badań metodami *in vitro*. Wyniki badawcze, jakie mgr inż. M. Janicki otrzymał podczas prac nad doktoratem znacząco przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmu inhibicji aktywności fosfataz białkowych.

Ocena strony redakcyjnej

Praca została napisana w języku polskim, posiada poprawną strukturę. Jest przygotowana bardzo estetycznie. Wysoko oceniam wybór i jakość ilustracji, które doskonale uzupełniają treść poszczególnych rozdziałów i zostały przygotowane z dużą starannością. Źródła informacji wybrano i zacytowano w sposób prawidłowy. W kilku miejscach zdania nie układają się w spójną i logiczną

całość (przykładem mogą być dwa pierwsze zdania streszczenia), co nieco utrudnia zrozumienie przekazu. Autor często stosuje zasady interpunkcji właściwe dla języka angielskiego i wstawia przecinki w miejscach, w których być ich nie powinno w tekście napisanym po polsku (lub pomija przecinki w miejscach, w których one być powinny). W pracy zauważyłam również liczne usterki oraz błędy gramatyczne i składniowe. Nie mają one znaczącego wpływu na czytelność i nie zmieniają mojej pozytywnej oceny recenzowanej dysertacji, ale wskazują na brak uważności autora podczas redagowania pracy. Z obowiązku recenzenta przytaczam część z nich (w wielu przypadkach dotyczą one brakujących lub nadmiarowych znaków diakrytycznych oraz interpunkcji):

1. Str. 11: „enzymy defosforulujące” – powinno być „enzymy defosforylujące”
2. Str. 11: „zerwanie wiązania (...) następuję z udziałem” – powinno być „... następuje z udziałem”
3. Str. 13: „katalityczna jednak w celu” – powinno być „katalityczna, jednak w celu”
4. Str. 13: „W zależności od tego z którym” – powinno być „W zależności od tego, z którym”
5. Str. 13: „wpływa to na jej funkcje biologiczną np. oddziaływanie” – powinno być „wpływa to na jej funkcję biologiczną, np. oddziaływanie”
6. Str. 13: „podczas gdy, oddziaływanie” – powinno być „podczas gdy oddziaływanie”
7. Str. 13: „to rodzina fosfataz składające się” – powinno być „to rodzina fosfataz składających się”
8. Str. 13: „odpowiedzialnej za lokalizacje komórkową” – powinno być „odpowiedzialnej za lokalizację komórkową”
9. Str. 13: „odgrywają kluczową rolę” – powinno być „... kluczową rolę” lub „... kluczowe role”
10. Str. 14: „i in., 2013” – powinno być „i in., 2013”
11. Str. 15: „W tej domenie znajdują się reszta” – powinno być „W tej domenie znajduje się reszta”
12. Str. 18: „w reprezentacji powierzchni”, „w reprezentacji „sticks”” – sugerowałabym konsekwencję w nazewnictwie: albo używanie nazw anglojęzycznych (reprezentacja w modelu surface, reprezentacja w modelu sticks) albo nazw polskich i tłumaczenia na angielskie (reprezentacja w modelu powierzchniowym (ang. *surface*), reprezentacja w modelu drutowym (ang. *sticks*))
13. Str. 19: „strukturę krystaliczna PPH1” – powinno być „strukturę krystaliczną PPH1”
14. Str. 19: „białek homologicznych” – powinno być „białek homologicznych”
15. Str. 20: „W reakcja tę są zaangażowane” – powinno być „W reakcję tę są zaangażowane”
16. Str. 24: „Reakcja defosforylacji powodują” – powinno być „Reakcja defosforylacji powoduje”
17. Str. 24: „Związanie ABA powodują” – „Związanie ABA powoduje”
18. Str. 26: „swoją pozycje zmieniają” – powinno być „swoją pozycję zmieniają”

19. Str. 26: „Reszta ta buduje pętle” – powinno być „Reszta ta buduje pętlę”
20. Str. 26: „między cząsteczka ABA” – powinno być „między cząsteczką ABA”
21. Str. 27: „w kompleksie z cząsteczka” – powinno być „w kompleksie z cząsteczką”
22. Str. 28: „Co więcej forma ABI1^{E142A}, wykazuję” – powinno być „Co więcej, forma ABI1^{E142A} wykazuje” (3 błędy w tak krótkiej frazie!)
23. Str. 29: „związanego z cząsteczka” – powinno być „związanego z cząsteczką”
24. Str. 29: „związanego z fosfataza białkową” – powinno być „związanego z fosfatazą białkową”
25. Str. 30: „S112 znajduję się” – powinno być „S112 znajduje się”
26. Str. 30: „Kluczowa interakcje” – powinno być „Kluczowe interakcje”
27. Uwaga ogólna: przenoszenie części podpisu pod rysunkiem na kolejną stronę utrudnia czytelnikowi zapoznanie się z objaśnieniem detali rysunku. W większości przypadków takiego rozbicia podpisu między strony można było uniknąć odpowiednio pozycjonując rysunek na stronie i związując z nim cały podpis. W każdym współczesnym edytorze tekstu są dostępne mechanizmy pozwalające na takie ustawienia.
28. Str. 31: „zmiany konformacyjne pętlach” – powinno być „zmiany konformacyjne w pętlach”
29. Str. 33: „Związek tak naśladuje” – powinno być „Związek ten naśladuje”
30. Str. 34: „w miejscu wiązanie do receptora” – powinno być „w miejscu wiązania do receptora”
31. Str. 34: „związki należący do grupy” – powinno być „związki należące do grupy”
32. Str. 36: „głownie” – powinno być „głównie”
33. Str. 42: „analiz konformacyjnych ci gęstości map” – „ci” jest chyba pozostałością jakiegoś słowa, które wycięto?
34. Str. 45: „udostępnione przez dostawcę drogą poczty elektroniczną” – raczej „udostępnione przez dostawcę przez pocztę elektroniczną” lub „przesłane przez dostawcę pocztą elektroniczną”
35. Str. 46: „Jest to zestaw parametrów opisujących funkcje energii potencjalnej danego układu niezbędnym, podczas symulacji” – powinno być „Jest to zestaw parametrów opisujących funkcje energii potencjalnej danego układu, niezbędny podczas symulacji”
36. Str. 46: „Pełno atomowe pola” – powinno być „Pełnoatomowe pola” lub „Pełno-atomowe pola”
37. Str. 46: „dla każdego atomów” – powinno być „dla każdego z atomów” lub „dla każdego atomu”
38. Str. 48: „pozwala na wygenerowania” – powinno być „pozwala na wygenerowanie”
39. Str. 50: „oddziaływania występujące między ligandem, a receptorem” – powinno być „oddziaływania występujące między ligandem a receptorem”
40. Str. 51: „Bierzę pod uwagę” – powinno być „Bierze pod uwagę”

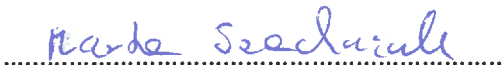
41. Str. 55: „Symulacja dynamiki molekularnej, poprzedzono” – powinno być „Symulację dynamiki molekularnej poprzedzono”
42. Str. 55: „między ligandem, a białkiem” – powinno być „między ligandem a białkiem”
43. Str. 56: „po nałożenie na pozycje” – powinno być „po nałożeniu na pozycje”
44. Str. 59: „uwzględniających korelacje elektronową” – powinno być „uwzględniających korelację elektronową”
45. Str. 59: „odgrywają kluczowa role” – powinno być „odgrywają kluczową rolę” lub „odgrywają kluczowe role”
46. Str. 59: „posługując się modelem rozpuszczalnika jako ośrodek ciągły” – powinno być „posługując się modelem rozpuszczalnika jako ośrodkiem ciągłym”
47. Str. 65: „przedstawiano listę” – powinno być „przedstawiono listę”
48. Str. 75: „Reakcje enzymatyczną prowadzono” – powinno być „Reakcję enzymatyczną prowadzono”
49. Str. 75: „Reakcja defosforylacji prowadzono” – powinno być „Reakcję defosforylacji prowadzono”
50. Str. 76: „W celu wyznaczenie wartości” – powinno być „W celu wyznaczenia wartości”
51. Str. 89: „funkcji oceny oraz wolnej energii wiązania” – „wolnej” ???
52. Str. 99: „szereg różnych związków” – powinno być „szereg różnych związków”
53. Str. 114: „Weryfikacja (...) potwierdziło to założenie” – powinno być „Weryfikacja (...) potwierdziła to założenie”
54. Str. 114: „wiązanie znajduję się” – powinno być „wiązanie znajduje się”
55. Str. 117: „zaangażowanych we wiązanie” – powinno być „zaangażowanych w wiązanie”
56. Str. 122: „potwierdziły założoną hipotezę, zakładającą, że” – powinno być „potwierdziły hipotezę zakładającą, że”
57. Str. 124: „obejmował walidacje modelu” – powinno być „obejmował walidację modelu”
58. Str. 125: „wykazują najwyższe wartość” – powinno być „wykazują najwyższą wartość” lub „wykazują najwyższe wartości”
59. Str. 126: „Opracowane własne” – powinno być „Opracowanie własne”
60. Str. 127: „dla wiązanie danego inhibitora” – powinno być „dla wiązania danego inhibitora”
61. Str. 127: „po optymalizacji u użyciem” – powinno być „po optymalizacji z użyciem”
62. Str. 130: „w celu sprawdzenie poziomu” – powinno być „w celu sprawdzenia poziomu”
63. W spisie skrótów brakuje rozwinięcia skrótu FMO

Wnioski końcowe

Autor recenzowanej pracy doktorskiej wykonał szereg bardzo pracochłonnych i szeroko zakrojonych analiz biochemicznych oraz bioinformatycznych. Wykazał się umiejętnością łączenia eksperymentu laboratoryjnego z obliczeniowym. Wyciąga trafne wnioski na podstawie danych uzyskiwanych z przeprowadzonych doświadczeń. Umiejętnie wyszukuje i wykorzystuje dostępne zasoby danych i narzędzi. Poprawnie podsumowuje i prezentuje wyniki badań. Dowiódł znajomości dotychczasowego stanu wiedzy w tematyce związanej ze swoją pracą badawczą, przedstawionego w przedmiotowej literaturze krajowej i zagranicznej. Posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dziedzinie nauk biologicznych, w szczególności w zakresie biochemii oraz biologii molekularnej i obliczeniowej. Wykazuje się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i praktycznego zastosowania posiadanej wiedzy.

Recenzowana praca zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w tematyce regulacji procesów komórkowych. Część uzyskanych wyników badań została opublikowana w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*. Doktorant ma w dorobku 3 artykuły naukowe, w tym jeden pierwszoautorski, co jest przyzwoitym osiągnięciem jak na młodego adepta nauki. Sumaryczny współczynnik wpływu opublikowanych prac wynosi 18,106, sumaryczna liczba cytowań (na dzień 19.01.2022) to 25 według Google Scholar a 20 według Web of Science.

Stwierdzam, że praca pana mgr inż. Macieja Janickiego pt. „Identyfikacja potencjalnych inhibitorów fosfatazy białkowej typu 2C grupa A z Arabidopsis z wykorzystaniem metod bioinformatycznych i biochemicznych” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) oraz stanowi oryginalne rozwiązanie przez autora zagadnienia naukowego. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Macieja Janickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Marta Szachniuk