

Warszawa, 7 listopada 2016

Dr hab. Joanna Trylska, prof. UW
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl

Rada Naukowa
Instytutu Fizyki
Polskiej Akademii Nauk
w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Chwastyka pt. "Dynamika białek z węzłami, wnękami oraz białek celulosomalnych"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Mateusza Chwastyka zatytułowana "Dynamika białek z węzłami, wnękami oraz białek celulosomalnych" została przedłożona Radzie Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk. Rozprawa doktorska została napisana pod kierunkiem prof. dra hab. Marka Cieplaka. Głównym celem pracy było określenie własności mechanicznych, stabilności i dynamiki wewnętrznej różnych klas białek: białek zawierających węzły, białek z wnękami oraz białek wchodzących w skład celulosomu. Autor zastosował technikę obliczeniową dynamiki molekularnej. Białka reprezentował zarówno w modelach zredukowanych jak i pełnoatomowych.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i składa się z przedmowy, sześciu rozdziałów oraz bibliografii. W przedmowie opisane są zawartości poszczególnych rozdziałów oraz znajduje się lista publikacji autora. Rozprawa doktorska zawiera 134 strony i 159 odnośników literaturowych.

W Rozdziale 1 opisana jest metoda dynamiki molekularnej, w szczególności w zastosowaniu do białek. Autor skupia się na opisie modeli gruboziarnistych, które stosował do większości obliczeń. Opisuje też sterowaną dynamikę molekularną, której używał do rozciągania białek.

W Rozdziale 2 autor opisuje już swoje badania, które dotyczą określania stabilności mechanicznej kilku białek połączonych ze sobą. Ma to na celu odniesienie się do wyników doświadczeń mikroskopii sił atomowych AFM (tzw. *atomic force microscopy*), w których nie rozciąga się jednego białka a wiele białek połączonych ze sobą. Kilka lat temu pojawiła się metoda doświadczeń AFM, w której jedno białko (gość) jest wbudowywane w ciąg znanych białek (gospodarz), po to by badać jego rozciąganie. W takim wypadku ważne jest jak zinterpretować pojawiające się piki na krzywej pokazującej wartość siły zależną od rozciągnięcia układu. Autor wykonał wiele symulacji rozciągania układów typu gospodarz -

gość, aby zrozumieć mechanizmy rozciągania połączonych ze sobą ale różnych białek. Jego symulacje miały pomóc w interpretacji eksperymentów AFM nowego typu.

W Rozdziale 3 autor opisuje białka z węzłami. Pierwsze białko z węzłem odkryto w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Od tamtej pory poznano już kilkaset białek, które są w jakiś sposób zawężone. Autor starał się opisać mechanizmy tworzenia takich węzłów w białkach. W tym celu symulował rozciąganie białek z węzłami przy użyciu modeli gruboziarnistych. Analizował dwa białka, jedno z węzłem płytkim, drugie z węzłem głębokim. Stosował sterowaną dynamikę do rozciągania białek połączonych, czyli białek występujących we wcześniej opisanych układach gospodarz - gość. Próbował także badać rozwijanie białka, nie tylko ciągnąc jego koniec ze stałą siłą, czyli mechanicznie, ale także poprzez symulacje dynamiki w wysokich temperaturach. Co ciekawe autor badał też jak zachowują się białka z węzłami na granicy woda - powietrze. Badania takie są ważne, ze względu na to, że przejście przez granicę woda - powietrze może powodować deformację białka, w szczególności rozplątanie węzła. Co ciekawe może też spowodować powstanie węzła.

W Rozdziale 3 przedstawione są nie tylko wyniki dotyczące denaturacji termicznej, mechanicznej czy na granicy faz białek węzłami ale także wyniki badań dotyczące zwijania się takich zapętłonych białek. Należy podkreślić, że zwijanie białek z węzłami nie jest łatwo osiągalne w dynamice molekularnej nawet przy użyciu modeli gruboziarnistych, tak więc autor przetestował różne parametry modelu takie jak potencjał kątowy i temperatura. Wiadomo też, że wiele białek zwija się tuż po wyjściu z tunelu rybosomu, gdzie jest syntezowany polipeptyd. Część struktur drugorzędowych polipeptydu może być już przyjmowana w tunelu rybosomu. Autor przeprowadził więc symulacje zwijania białek uwzględniające rybosom, na początku w sposób bardzo uproszczony - jako płaszczyznę. Wydłużał łańcuch białkowy skokowo tak jak jest on tworzony w rybosomie. Zawężenie przestrzeni konformacyjnej białka w powyższy sposób znacznie skróciło czasy symulacji, ale w przypadku węzłów głębokich model ten był jednak zbyt prosty. Dlatego w dalszym etapie badań autor stworzył bardziej szczegółowy model rybosomu, w którym uwzględnił też atomy tunelu (jako sztywne kule). Taka reprezentacja znacznie poprawiła symulacje i stwierdzono tworzenie się węzłów po wyjściu łańcucha białkowego z tunelu. Natomiast nie zaobserwowano utworzenia węzła w środku tunelu.

W Rozdziale 4 autor opisuje badania dotyczące białek roślinnych. Mgr Chwastyk badał białka, które wchodzi w skład klasy białek odpowiedzialnych za reakcję na czynniki stresu, na przykład patogeny, tzw. PR (ang. *pathogenesis related*). Zajmował się kilkunastoma białkami PR; na podstawie struktur pełnoatomowych porównywał ich globalne geometryczne deskryptory. Szczegółowa funkcja białek PR nie jest znana. Charakterystycznym elementem tych białek jest wnęka, ale nie wiadomo czy i jaki ligand wnęka taka wiąże. Ligandy znane są dla zaledwie kilku białek.

Aby porównać wnęki w kilkunastu białkach autor napisał własny program do wyznaczania objętości wnęk. Nie było to zadanie łatwe, gdyż trudno jest określić na podstawie struktury, który obszar zajmuje wnęka. Efektem tych badań jest serwer SPACEBALL. W kolejnym etapie badań mgr Chwastyk porównał własności mechaniczne tych białek, w szczególności rozciągał je i zbadał ich zwijanie. Badania te były prowadzone w

modelu gruboziarnistym. Podczas rozciągania białka te miały podobny profil maksimów siły w zależności od rozciągnięcia. Autor przypisał te piki określonym zdarzeniom; określił pękanie których kontaktów jest odpowiedzialne za pojawienie się określonych maksimów. Co ciekawe autor też ścisnął białka, umieszczając je pomiędzy dwiema odpychającymi ścianami i sprawdzając jak i kiedy w czasie symulacji pękają kontakty natywne. Analiza tej klasy białek była więc wszechstronna. Badanie dynamiki tyłu białek metodami pełnoatomowymi byłoby zbyt czasochłonne.

W Rozdziale 4 przedstawione są także wyniki badań dotyczące kapsydów wirusów, czyli otoczek białkowych, które osłaniają materiał genetyczny wirusa. Te duże i symetryczne układy służyły m. in. do testów programu SPACEBALL, gdyż w natywnej formie kapsyd jest dosyć dobrze upakowany, a w formie spuchniętej pojawiają się wolne przestrzenie pomiędzy białkami tworzącymi szkielet kapsydu. Na podstawie kilkuset kapsydów autor przetestował dobór parametrów algorytmu do wyznaczania objętości wnek w programie SPACEBALL. Ponadto sparametryzował ten serwer tak, aby można było obliczać objętość białek uwzględniając przekrywanie się atomowych czasz van der Waalsa.

W Rozdziale 5 autor opisał swoje badania dotyczące celulosomu, czyli kompleksu składającego się z wielu białek i enzymów, które hydrolizują różne polisacharydy do cukrów prostych. Rozkład celulozy do cukrów prostych jest istotną reakcją enzymatyczną. Celulosom jest bardzo skomplikowaną i różnorodną strukturą, która zawiera między innymi białka strukturalne kohezyny. Autor podjął próbę zaprojektowania stabilnych mutantów tego białka, aby uzyskać bardziej stabilny celulosom. Aby poprawić stabilność kohezyny autor sprawdzał po kolei w łańcuchu jak mutacje punktowe mogą na tę stabilność wpływać. Przeprowadził tzw. *alanine scanning* próbując odpowiedzieć na pytanie, które mutacje dają efekt globalny, a które lokalny jeśli chodzi o ich wpływ na stabilność kohezyny. Jednak dostępne struktury kohezyny nie zawierały wszystkich aminokwasów czy ich łańcuchów bocznych. Autor chciał wykorzystać do badań model gruboziarnisty, a w takich modelach istotne są mapy kontaktów, więc początkowe struktury powinny być dokładne. Oprócz znanego sposobu rekonstrukcji łańcuchów białkowych w programie Modeller, mgr Chwastyk wykorzystał także opracowane przez siebie podejście statystyczne. Po rekonstrukcji białka przeprowadził krótkie symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej. Następnie badał jak zmienia się mapa kontaktów przeprowadzając symulacje dla różnych mutantów.

Co ciekawe autor rozprawy stwierdził, że stworzenie mostka cysteinowego, przez wprowadzenie jednej mutacji w pobliżu cysteiny, nie wpływa na stabilność termodynamiczną białka tylko na jego stabilność mechaniczną. Kilka mutantów zaprojektowanych przez autora rozprawy zostało przetestowanych doświadczalnie w ramach współpracy. Stabilność mechaniczną mutantu G142F potwierdzono w eksperymentach AFM. Stabilność termodynamiczna innych mutantów była badana za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego i także potwierdzona.

W ostatnim dwustronicowym Rozdziale 6 autor rozprawy podsumowuje najważniejsze wyniki swoich badań prowadzących do powstania rozprawy doktorskiej.

Poniżej mam kilka pytań i uwag dotyczących rozprawy. Stanowią one jednak punkty do dyskusji i nie umniejszają wagi przeprowadzonych symulacji.

strona 19: Dlaczego autor testował różne długości łącznika. Czy długość łącznika nie była w doświadczeniach AFM ustalona? Czy nie znane było z doświadczeń miejsce wbudowywania takiego łącznika, że autor musiał testować wiele możliwości w symulacjach? Czy może chodziło o przewidzenie jaki eksperyment AFM dałby najlepsze wyniki do opisu stabilności białka?

strona 21: Nie jest też dla mnie jasne po co były testowane dwa sposoby połączenia białek (szeregowo i równoległe). Jakie to miało odniesienie do eksperymentu? Czy na podstawie sygnału F(d) można twierdzić jak białka zostały połączone w doświadczeniu?

strona 49, Tabela 3.1: Istnieje wiele skal hydrofobowości. Ciekawa jestem dlaczego autor wybrał akurat skalę Kyte'a&Doolittle'a z lat osiemdziesiątych zeszłego wieku? Czy ta skala jest najlepiej dostosowana do modelu gruboziarnistego, którego autor używał?

Strona 92: Szkoda, że nie wspomniano co to są za ligandy (?), które wykryły z kilkoma białkami z grupy PR. We wstępie do tego rozdziału autor informował czytelnika, że nie jest znana funkcja tych białek, więc według mnie informacja jakie ligandy autor modelował jest niezwykle istotna.

strona 110, na dole: Różnice w położeniu grupy bocznej aminokwasu LYS9 w dynamice molekularnej między 0.2 ns a 0.5 ns nie potwierdzają ani nie wskazują, że któreś położenie jest faworyzowane. Czasy symulacji są zbyt krótkie, żeby o tym twierdzić. Analizą energetyczną też przy tak krótkim czasie symulacji nie można się sugerować.

Według mnie część teoretyczna i opis aplikacji serwera SPACEBALL powinny znajdować się w oddzielnym rozdziale wraz z przykładami zastosowań tego serwera do białek PR, kapsydów wirusów czy do wyznaczania promieni aminokwasów. Umieszczenie zastosowania serwera SPACEBALL do kapsydów czy wyznaczanie objętości innych białek w rozdziale opisującym białka PR nie pasuje i powoduje, że gubi się właściwy temat tego rozdziału.

W drugim paragrafie Rozdziału 6 (Podsumowanie) autor jako konkluzję swoich badań przedstawia, że metody gruboziarniste dają szybsze wyniki niż pełnoatomowe, co po pierwsze jest oczywiste i nie nowe, a po drugie, biorąc pod uwagę wszystkie ciekawe wyniki autora wydaje się zupełnie niepotrzebne.

Mam jeszcze kilka uwag dotyczących formatowania rozprawy i stylu:

Wstępy do poszczególnych Rozdziałów powinny zawierać więcej informacji dlaczego badania są ważne i być ułożone w jakiś logiczny ciąg paragrafów. Na przykład na stronie 104

(pierwszy paragraf) pojawia się nagle zdanie o produkcji biopaliw w kontekście celulozomu a przy opisie układu nie było o tym ani słowa. Nie ma przejść pomiędzy paragrafami i czasem pojawiają się zdania wyrwane z kontekstu.

W Rozdziale 1 są odwołania do rysunków z dużo dalszych rozdziałów na przykład Rozdziałów 4 (rys. 4.5) czy 5. Taki układ utrudnia czytanie pracy. Dodatkowo część rysunków mogłaby być staranniej zrobiona.

Tabele 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 i wiele innych trudno jest śledzić. Powinny być lepiej sformatowane. Generalnie latex pozwala na lepsze formatowanie zarówno czcionki jak i samego tekstu. Do publikacji nie jest to oczywiście konieczne bo zrobi to za autora czasopismo, ale do rozprawy według mnie autor powinien się lepiej przyłożyć jeśli chodzi o formę prezentacji.

Autor rozprawy nie uniknął drobnych błędów i niejasnych sformułowań. Nie obniżają one w żadnym stopniu wartości wyników przeprowadzonych badań ale wyszczególnienie ich wynika z roli recenzenta. Na przykład:

- strona 8, ostatnie zdanie: stwierdzenie, że parametry w polu siłowym są dla cząsteczki każdego typu nie jest prawdziwe.
- strona 10, "cały układ został zneutralizowany jonami NaCl" jeśli zneutralizowany to sądzę, że były to jony jednego rodzaju, choć autor nie napisał jaki był ładunek układu wynikający z ładunków całkowitych aminokwasów
- strona 14, ostatnie zdanie pierwszego paragrafu: występuje dwa razy "jest"
- strona 14, podpis pod rysunkiem 1.3, F-d i nie jest wyjaśnione co to jest d
- strona 26 i 27: Tabele na tej stronie raczej powinny się znaleźć jako Appendix.
- strona 93, powinno być "pusta kwazisferyczna" oraz "wirusów kwazisferycznych"
- strona 99, drugi paragraf, powinno być "wyznaczyć"

Podsumowując uważam, że Mgr Mateusz Chwastyk ma już imponujący dorobek publikacyjny jak na doktoranta. W momencie przedłożenia rozprawy wyniki badań opisanych w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w języku angielskim aż w 9 artykułach z listy filadelfijskiej. Jedna praca była w tym czasie wysłana do czasopisma, a druga była w formie manuskryptu. W ośmiu pracach mgr Chwastyk jest pierwszym autorem, a w trzech pracach drugim autorem. Trzy prace są jedynie dwuautorowe, w których drugim autorem jest promotor rozprawy. Wyniki badań mgra Chwastyka zostały więc ocenione przez niezależnych recenzentów. Dodatkowo, mimo tego, że publikacje mgra Chwastyka ukazały się niedawno, wiele z nich zostało już kilka razy zacytowanych, a tzw. indeks Hirscha doktoranta wynosi 4, co jest rzadko spotykane jeszcze przed obroną.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magistra Mateusza Chwastyka stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego pracy naukowej. Tym samym rozprawa doktorska mgra Chwastyka spełnia wszystkie warunki

ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Mateusza Chwastyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na ogrom przeprowadzonych badań, duży dorobek publikacyjny (w tym jako pierwszego autora), zastosowanie metod teoretycznych do wielu różnych klas białek, opracowanie własnego algorytmu do obliczania wnęk w biomolekułach, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

A handwritten signature in black ink, reading "J. Trzaska". The signature is written in a cursive style with a large, looped initial "J".