



ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. 58 523 5124, fax 58 523 5012, email: adam.liwo@ug.edu.pl

Gdańsk, 26 listopada 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana mgra Łukasza Mioduszewskiego
pt. „Dynamika molekularna białek strukturalnie nieuporządkowanych oraz
ich agregatów w ramach modeli gruboziarnistych”**

Białka strukturalnie nieuporządkowane lub „natywnie rozwinięte” czy też „białka plastyczne” stanowiąc bardzo ważną część proteomów organizmów żywych. Ich plastyczność umożliwia dopasowanie do różnorodnych receptorów i przez to pełnienie wielu funkcji a także umożliwia im spełnianiu roli „wypełniacza” lub „smaru” w czysto mechanicznych aspektach funkcjonowania organizmów żywych. Plastyczność glutenu i glutein jest również od początku istnienia cywilizacji rolniczych (a pewnie i wcześniej) wykorzystywana do przetwarzania żywności produkowanej z ziaren zbóż, niezależnie od tego czy jest to wypiek chleba i ciast czy też przyrządzanie gotowanego na parze ryżu, będącego podstawą większości kuchni dalekowschodnich. Tym dziwniejsze jest, że dopiero pod koniec 20 wieku Uversky’emu i jego kolegom udało się obalić obowiązujący długo paradygmat mówiący o tym, że warunkiem aby białko mogło pełnić funkcje biologiczne jest posiadanie przezeń jednoznacznie określonej struktury natywnej.

Praca doktorska pana mgr. Łukasza Mioduszewskiego dotyczy gruboziarnistego modelowania konformacji i agregacji poliglutaminy oraz białek glutenu, kukurydzy i ryżu. Kandydat wykonał pracę doktorską pod kierunkiem znakomitego naukowca zajmującego się od wielu lat badaniami symulacyjnymi białek przy użyciu modeli gruboziarnistych, prof. dra hab. Marka Cieplaka. Autor opracował, zaimplementował, sparametryzował i przetestował parę wariantów dwóch jednocentrowych modeli gruboziarnistych białek nieuporządkowanych oraz opracował schematy dynamiki molekularnej do przeprowadzenia symulacji. Już samo to krótkie podsumowanie wykazuje ogrom wykonanej przezeń pracy. Ponadto poszczególne etapy rozprawy zostały już poddane ostrej ocenie niezależnych recenzentów, jako że została ona napisana na podstawie już opublikowanych czterech prac oryginalnych, których Kandydat jest pierwszym autorem i dwóch rozdziałów w książkach, których Kandydat jest drugim autorem. Dwie dalsze prace oryginalne były w dniu złożenia rozprawy na etapie recenzji. Wszystkie 4 prace oryginalne, które już się ukazały, zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych: Phys. Chem. Chem. Phys. oraz J. Chem. Theory Comput.

Tekst rozprawy jest podzielony na 5 rozdziałów, poprzedzonych podziękowaniami, listą publikacji Kandydata związanych z tematyką rozprawy, oświadczeniem dotyczącym praw autorskich i spisem treści. Ostatnią częścią jest bibliografia, zawierająca 255 pozycji literaturowych. Do rozprawy jest dołączona płyta DVD, zawierająca tekst rozprawy i 8 wspomnianych wyżej publikacji Autora związanych z rozprawą. Realizacja poszczególnych

części badań jest przedstawiona w rozdziałach 2-5, z których każdy jest autonomiczną częścią zawierającą wstęp, opis badań, omówienie wyników i podsumowanie. Brak jest natomiast całościowego podsumowania wyników badań i wniosków z nich wynikających.

Rozdział 1, zatytułowany „Wstęp”, jest podzielony na dwa podrozdziały. W pierwszym z nich Autor przedstawia obecny stan wiedzy o białkach nieuporządkowanych oraz wprowadzenie do metod badania konformacji i dynamiki konformacyjnej białek. Stwierdza, że z uwagi na skalę czasu i wielkości, szczególnie w przypadku badań symulacyjnych białek nieuporządkowanych, w szczególności ich agregacji, konieczne jest użycie modeli gruboziarnistych. Ta część rozprawy byłaby pełniejsza, gdyby omówienie modeli gruboziarnistych nie ograniczyło się do dwóch akapitów na stronie 7 i podania pozycji literaturowych, wśród których co prawda są wymienione prace grupy Marrinka opisujące warianty popularnego gruboziarnistego modelu Martini oraz prace grupy Kolińskiego, brakuje natomiast prac grupy Votha lub grup jego uczniów, które stanowią bardzo istotny wkład do badań nad modelami gruboziarnistymi. Ponadto pionierska praca Levitta na temat pierwszego gruboziarnistego modelu białek (pozycja 25) jest błędnie wymieniona na stronie 6 (ostatni akapit) jako opisująca model pełnoatomowy lub model atomów zjednoczonych. W dalszej części pierwszego podrozdziału Autor streszcza dotychczas przedstawione badania teoretyczne, zarówno badania symulacyjne prowadzone z użyciem modeli pełnoatomowych i gruboziarnistych, jak i te z wykorzystaniem metod chemii kwantowej, białek bogatych w glutaminę, w tym białek glutenu. W drugiej części jest przedstawiony plan pracy, którego 4 punkty: „Budowa modelu gruboziarnistego”, „Wyniki symulacji pojedynczych łańcuchów”, „Symulacje wielu łańcuchów poliglutaminy i polialaniny” oraz „Symulacje białek glutenu, kukurydzy i ryżu” stanowią treść rozdziałów 2-6. Brak jest natomiast jasnego sformułowania celu pracy.

Najważniejsze dokonania Kandydata w ramach rozprawy doktorskiej można podsumować następująco:

1. Stworzenie dwóch, opartych na fizyce oddziaływań, jednocentrowych modeli gruboziarnistych zdolnych do odtwarzania właściwości białek nieuporządkowanych, z których pierwszy zawiera hamiltonian dynamiczny, oparty na kontaktach międzyresztowych a drugi niezależny od przebiegu symulacji hamiltonian, zawierający wkłady wielociałowe. Model pierwszy, jako tańszy obliczeniowo, był w większości wykorzystywany w symulacjach. Oba typy modeli zostały sparametryzowane w oparciu o dane z baz danych białek i inne dane doświadczalne oraz rygorystycznie przetestowane pod względem odtwarzania właściwości białek nieuporządkowanych.
2. Użycie stworzonego modelu gruboziarnistego do zbadania przestrzeni konformacyjnej nieoddziałujących łańcuchów poliglutaminy oraz, dla porównania, polialaniny i wykazanie, że łańcuchy poliglutaminy tworzą nieuporządkowane struktury, które mogą się zawężać.
3. Zbadanie właściwości, a w szczególności przejść fazowych, układów złożonych z wielu łańcuchów poliglutaminy i wykazanie, że występuje tam przejście typu gaz-ciecz.
4. Wyjaśnienie giętkości i trwałości agregatów złożonych z białek glutenu, kukurydzy i ryżu poprzez zawężanie się różnych różnych łańcuchów białek, co np. powoduje usuwanie przestrzeni wolnych przy rozciąganiu. Uporządkowane części tych białek zostały wymodelowane przy pomocy programu iTASSER a następnie nałożono na nie więzy w symulacjach. Zasymulowano również odkształcenia przez ścinanie, które

zachodzą np. podczas wyrabiania ciasta. Wyniki okazały się w dużej części zgodne z dostępnymi danymi doświadczalnymi.

5. Opracowanie wielu użytecznych narzędzi do analizy wyników symulacji, w szczególności algorytmu analizy skupień, uwzględniającego nie tylko odległości między strukturami ale także ich kolejność występowania w trajektorii dynamiki molekularnej, co umożliwi badanie przejść konformacyjnych.

W toku lektury pracy nasunęły mi się wymienione niżej pytania oraz uwagi merytoryczne. Nie są to jednak uwagi w większości krytyczne a ich duża liczba wręcz świadczy bardzo na korzyść kandydata ponieważ dowodzi, że praca bardzo recenzenta zainteresowała i wnikliwie ją przeczytał.

1. Rozdział 1.1., strona 6. Autor pisze, że naprawdę dobra symulacja białek nieuporządkowanych powinna odtwarzać ich właściwości bez więzów z doświadczenia. Tymczasem ostatnio nabrały wielkiego znaczenia metody, w których więzy z eksperymentów małąkątowego rozpraszania elektronów (SAXS), magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), czy sieciowania chemicznego (X-links) używa się do określania zespołu statystycznego konformacji białek nieuporządkowanych lub częściowo uporządkowanych. Te dane mogą doskonale skompensować nieuniknioną niedokładność modeli teoretycznych, szczególnie gruboziarnistych. Czy Autor mógłby to skomentować?
2. Rozdział 2.2, strona 15:
 - a. Wydaje się, że sama postać potencjału Lennarda-Jonesa (ewentualnie zmodyfikowanego, żeby faworyzować studnię) zapobiegnie tworzeniu zbyt dużej liczby kontaktów. Dlaczego zatem było konieczne wprowadzenie włączania/wyłączania kontaktów, które niszczy odwracalność algorytmu całkowania równań ruchu?
 - b. Dlaczego do całkowania równań ruchu użyto niesymplektycznego algorytmu predyktor-korektor 5 rzędu a nie któregoś z algorytmów symplektycznych: Verleta, żabiego skoku lub prędkościowego algorytmu Verleta?
 - c. Czy sprawdzano na ile jest zachowywana całkowita energia poprzez przeprowadzenia testów w trybie mikrokanonicznym (bez sił tarcia i stochastycznych)? Na rysunku 2.1 jest przedstawiony wykres całkowitej energii; czy wykres ten odpowiada symulacji dynamiki Langevina czy mikrokanonicznej?
 - d. Czy w dynamice Langevina dodawano siły tarcia i stochastyczne bezpośrednio czy stosowano analityczne pre-całkowanie, jak w algorytmach Martyny/Ciccotiego?
3. Rozdział 2.5.1, strona 22: Czy przy wyznaczaniu głębokości studni potencjału (ϵ) z danych rozciągania uwzględniono fakt, że oddziaływania lokalne również wnoszą wkład do odpowiedzi na rozciąganie?
4. Rozdział 2.5.3, strona 28: W ostatnim akapicie Autor pisze, że zadbano o ciągłość potencjału, czy jednak zadbano również o ciągłość jego pierwszych pochodnych (sił)?
5. Rozdział 2.6, strony 48-48: Jaka jest przewaga wprowadzonego potencjału kąтового nad potencjałem Gaya-Berne'a lub pokrewnymi?
6. Rozdział 2.6.5, strona 58, równanie 2.13: Czy algebraiczne przybliżenie funkcji cosinus rzeczywiście skraca czas obliczeń? Tym bardziej, że aby obliczyć niewłaściwy kąt torsyjny należy najpierw obliczyć ze współrzędnych jego funkcje trygonometryczne, najczęściej jest to cosinus i znak sinusa. Dlaczego zatem nie użyto cosinusa kąta dwuściennego wyliczonego bezpośrednio ze współrzędnych?

7. Rozdział 2.6.5, strona 59 równanie 2.12: Wygląda na to, że zaprojektowany potencjał ma nieciągłe pierwsze pochodne w punktach zszycia. Czy badano wpływ tej nieciągłości na dynamikę?
8. Rozdział 2.6.8.4, strona 68
 - a. Rysunek 2.40: Czy do porównania użyto jednej konformacji czy jest to uśredniony wynik? Zdanie nad rysunkiem zawiera błędne wskazanie kolorów: kolor czerwony odpowiada symulacjom a nie eksperymentowi.
 - b. Jest prawdą, że zakres niskich q zawiera większość informacji o kształcie i rozmiarze białka ale słabe dopasowanie w zakresie dużych q oznacza słabe dopasowanie dla małych odległości; może zatem oznaczać niewystarczający opis oddziaływań lokalnych. Czy Autor mógłby to skomentować?
9. Rozdział 2.7, strony 70-71: Potencjały kątowe są formalnie potencjałami wielociałowymi ale ich liczba skaluje się z n^2 (gdzie n jest liczbą reszt), jak dla potencjałów dwuciałowych. Zatem ponieważ potencjał PID zachowuje się jak potencjał dwuciałowy, jego zrównoleglenie nie powinno nastroczać trudności.
10. Rozdział 4.3.1.1
 - a. Strona 93, rysunek 4.8: Czy kąt α jest kątem między wektorami $C^\alpha \dots C^\alpha$ dwóch sąsiednich łańcuchów w miejscu gdzie są one w kontakcie? Tak jest napisane na stronie 94. Czy w takim razie bierze się wszystkie pary reszt łańcuchów będących w kontakcie?
 - b. Strona 94, rysunek 4.9: Dlaczego dla par będących w kontakcie (czerwona krzywa) występuje maksimum $P(C)$ dla $T=0.2$?

Język pracy jest poprawny, zrozumiały i precyzyjny. Napotkałem jedynie bardzo nieliczne potknięcia i pomyłki, które z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej.

1. Strona 39, rysunek 2.16: Błędy przedstawia się zwykle w postaci słupków błędów, jak to zresztą Autor robi w pozostałej części pracy.
2. Strona 53, rysunek 2.31: Rozkłady są zobrazowane jako mikroskopijne plamki. Lepiej byłoby zawęzić zakres zmiennych.
3. Strona 71, rysunek 2.42: W jakich jednostkach jest czas na osi pionowej?
4. Strona 74, rysunek 3.2. Opis rysunku jest niejasny; nie widać czerwonej i czarnej pionowej linii. Są dwie czarne przerywane linie pionowe.
5. Strona 100, drugi akapit: „obecność innych białek” chyba „sąsiedztwo innych cząsteczek białka”.
6. Strona 122: „...siła... dużo bardziej przypomina sinusoidę”; chyba „...profil czasowy siły...”

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska pana mgra Łukasza Mioduszeńskiego spełnia zawiązanie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez **Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki** (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych. Kandydat wykonał ogromną pracę nad zbudowaniem unikalnych, opartych na fizyce oddziaływań i, co najważniejsze, skutecznych modeli gruboziarnistych białek, ukierunkowanych na białka o nieuporządkowanej strukturze, starannie je sparametryzował i przetestował oraz z powodzeniem zastosował do badań układów złożonych z pojedynczych i wielu łańcuchów poliglutaminy oraz białek glutenu, kukurydzy i ryżu. Jego rozprawa należy do kilku najlepszych, które miałem przyjemność recenzować. Jej poziom merytoryczny zdecydowanie wykracza ponad przeciętność. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady

Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana mgra. Łukasza Mioduszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wagę uzyskanych wyników, ogrom wykonanej przez Kandydata pracy oraz ogólnie bardzo wysoki poziom przedstawionej dysertacji, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



prof. dr hab. Józef Adam Liwo