

Załącznik 2. Autoreferat związany z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego

Spis treści

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego.....	2
5. Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)	3
5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	3
5.2 Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia	3
5.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego zastosowania	4
5.3.1 Konformacje i mechanizmy działania białek ESCRT (publikacje H1, H2, H3, H4)	7
5.3.2 Własności i funkcje nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych w białkach celulozomalnych (publikacje H5, H6, H7)	15
5.3.3 Stabilność mechaniczna i termiczna białek wielodomenowych (publikacje H8, H9)	21
5.3.4. Podsumowanie znaczenia prac H1-H9	22
5.3.5 Piśmiennictwo	23
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	25
6.1 Omówienie badań naukowych nie stanowiących wkładu do habilitacji	25
6.1.1 Badania naukowe prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora nauk fizycznych	25
6.1.2 Badania naukowe prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora nauk fizycznych.....	27
6.1.2.A Badania adhezji błon lipidowych i wieloskładnikowych	27
6.1.2.B Badania dotyczące rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami na białkach w środowisku wodnym.....	30
6.1.2.C Badania dotyczące białek błonowych i deformacji błon lipidowych.....	35
6.2 Publikacje w czasopismach spoza listy JCR.....	39
6.2.1 Rozdział książki	39
6.2.2 Artykuły przeglądowe i popularnonaukowe w języku polskim.....	39
6.3 Wykłady zaproszone na konferencjach, sympozjach i konwersatoriach.....	39
6.4 Referaty wygłoszone na seminariach	40
6.5 Aktywny udział w konferencjach i zjazdach.....	41
6.6 Współpraca krajowa i zagraniczna udokumentowana publikacjami naukowymi	42
6.7 Kierowanie projektami badawczymi	43
6.8 Stypendia i nagrody naukowe	43
7. Działalność na rzecz środowiska akademickiego.....	43
7.1 Działalność recenzencka	43
7.1.1 Recenzje projektów badawczych.....	43
7.1.2 Recenzje publikacji naukowych dla czasopism z listy JCR.....	44
7.2 Działalność dydaktyczna	44
7.2.1 Zajęcia dydaktyczne w Międzynarodowym Studium Doktoranckim IF PAN	44
7.2.2 Zajęcia dydaktyczne na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego	45
7.2.3 Opieka naukowa nad studentami odbywającymi praktyki letnie.....	45
7.3 Działalność w zakresie popularyzacji nauki	45

1. Imię i nazwisko

Bartosz Jan Różycki

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

- Stopień doktora nauk fizycznych w zakresie fizyki
Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, 20 listopada 2006 r.
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Stochastyczne modele adhezji błon komórkowych poza równowagą termodynamiczną*
Promotor: prof. Marek Napiórkowski
- Stopień magistra fizyki
Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, 14 czerwca 2002 r.
Tytuł pracy magisterskiej: *Ścisłe rozwiązanie dwuwymiarowego modelu zjawiska zwilżania*
Promotor: prof. Marek Napiórkowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- od października 2012: adiunkt. Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
- październik 2011 – październik 2012: staż podoktorski. Max Planck Institute of Colloids and Interfaces. Poczdam, Niemcy. Mentor: prof. Reinhard Lipowsky
- październik 2008 – październik 2011: staż podoktorski. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA. Mentor: prof. Gerhard Hummer
- listopad 2006 – wrzesień 2008: staż podoktorski. Max Planck Institute of Colloids and Interfaces. Poczdam, Niemcy. Mentor: dr hab. Thomas Weikl

4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego

Do mojego dorobku naukowego zaliczają się **33** artykuły naukowe (nie wliczając publikacji konferencyjnych) opublikowane w czasopismach znajdujących na liście *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny *Impact Factor* tych publikacji (wyliczony według listy JCR przy założeniu, że *Impact Factor* prac opublikowanych w roku 2017 jest taki sam jak w roku 2016) wynosi **206,1**.

Dane bibliometryczne według bazy danych *Web of Science* z dnia 11 I 2018 r.:

- Całkowita liczba cytowań: **805**
- Wskaźnik Hirscha: **16**
- Wskaźnik i-10: **20**
- ResearchID: B-7005-2009

Dane bibliometryczne według *Google Scholar* z dnia 11 I 2018 r.:

- Całkowita liczba cytowań: **1017**
- Wskaźnik Hirscha: **18**
- Wskaźnik i-10: **20**

Większość z moich artykułów naukowych została opublikowana w czasopismach poświęconych fizyce (dwie publikacje w *Physical Review Letters*, jedna publikacja w *Physical Review E*, jedna publikacja w *New Journal of Physics*, jedna publikacja w *Journal of Physics: Condensed Matter*, trzy publikacje w *Europhysics Letters* i jedna publikacja w *European Physics Journal E*), a w

szczegółności fizyce matematycznej (jedna publikacja w *Journal of Physics A: Mathematical and General*), fizyce statystycznej (jedna publikacja w *Journal of Statistical Mechanics*), fizyce chemicznej (trzy publikacje w *Journal of Chemical Physics* i jedna publikacja w *Physical Chemistry Chemical Physics*) i fizyce materii miękkiej (dwie publikacje w *Soft Matter*). Ponieważ tematyka moich prac leży na pograniczu fizyki, chemii i biologii, wyniki moich badań opublikowane zostały także w czasopismach poświęconych chemii (jedna publikacja w *Journal of American Chemical Society*), biologii chemicznej (jedna publikacja w *Nature Chemical Biology*), biologii molekularnej (jedna publikacja w *EMBO Reports*), biologii strukturalnej (trzy publikacje w *Structure* i dwie publikacje w *Journal of Structural Biology*), biologii obliczeniowej (jedna publikacja w *PLoS Computational Biology*) i biologii komórkowej (dwie publikacje w *Cell*). Kilka z moich prac zostało opublikowanych także w czasopismach poświęconych biofizyce i biochemii molekularnej (jedna publikacja w *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*, jedna publikacja w *Molecular BioSystems*) oraz ogólnie naukom przyrodniczym (jedna publikacja w *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, dwie publikacje w *PLoS ONE*). Różnorodność czasopism publikujących moje prace wynika z interdyscyplinarnego charakteru prowadzonych przeze mnie badań oraz z moich współprac naukowych nie tylko z fizykami lecz także z biochemikami i biologami.

5. Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji pod tytułem „Dynamika konformacyjna białek wielodomenowych w ramach modeli gruboziarnistych”

5.2 Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

- H1. Bartosz Różycki, Young C. Kim, Gerhard Hummer. *SAXS ensemble refinement of ESCRT-III CHMP3 conformational transitions*. *Structure* **19**: 109-116 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 6,347. Ponad 100 cytowań wg. bazy danych *Web of Science*.
- H2. Evzen Boura, Bartosz Różycki, Dawn Z. Herrick, Hoi Sung Chung, Jaroslav Vecer, William A. Eaton, David S. Cafiso, Gerhard Hummer, James H. Hurley. *Solution structure of the ESCRT-I complex by small angle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 9437-9442 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 9,681.
- H3. Evzen Boura*, Bartosz Różycki*, Hoi Sung Chung, Dawn Z. Herrick, Bertram Canagarajah, David S. Cafiso, William A. Eaton, Gerhard Hummer, James H. Hurley. *Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission*. *Structure* **20**: 874-886 (2012). *Impact Factor* w 2012 r.: 5,994.
- H4. Bartosz Różycki, Evzen Boura, James H. Hurley, Gerhard Hummer. *Membrane-elasticity model of coatless vesicle budding induced by ESCRT complexes*. *PLoS Comp. Biol.* **8**: e1002736 (2012). *Impact Factor* w 2012 r.: 4,867.
- H5. Bartosz Różycki***, Marek Cieplak, Mirjam Czjzek. *Large conformational fluctuations of the multi-domain xylanase Z of Clostridium thermocellum*. *J. Struct. Biol.* **191**: 68-75 (2015). *Impact Factor* w 2015 r.: 2,570.

* równy wkład do pracy

** autor korespondencyjny

- H6. Bartosz Różycki**, Marek Cieplak. *Stiffness of the C-terminal disordered linker affects the geometry of the active site in endoglucanase Cel8A*. Mol. BioSyst. **12**: 3589-3599 (2016). *Impact Factor* w 2016 r.: 2,781.
- H7. Bartosz Różycki, Pierre Andre Cazade, Shane O'Mahony, Damien Thompson, Marek Cieplak. *The length but not the sequence of peptide linker modules exerts the primary influence on the conformations of protein domains in cellulosome multi-enzyme complexes*. Phys. Chem. Chem. Phys. **19**: 21414-21425 (2017). *Impact Factor* w 2016 r.: 4,123.
- H8. Bartosz Różycki**, Lukasz Mioduszewski, Marek Cieplak. *Unbinding and unfolding of adhesion protein complexes through stretching: Interplay between shear and tensile mechanical clamps*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf. **82**: 3144-3153 (2014). *Impact Factor* w 2014 r.: 2,627.
- H9. Bartosz Różycki**, Marek Cieplak. *Citrate synthase proteins in extremophilic organisms: Studies within a structure-based model*. J. Chem. Phys. **141**: 235102 (2014). *Impact Factor* w 2014 r.: 2,952.

5.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego zastosowania

Białka stanowią ogromną rodzinę związków organicznych. Występują we wszystkich organizmach żywych oraz wirusach. Zaangażowane są bezpośrednio w praktycznie wszystkie funkcje komórek biologicznych. Powszechnie znane przykłady to replikacja, transkrypcja i translacja kodu genetycznego, metabolizm, sygnalizacja, transport i nadawanie kształtu komórkom [1]. Zdumiewający wydaje się fakt, że podstawą tej ogromnej różnorodności i złożoności funkcji pełnionych przez białka jest sekwencja aminokwasowa.

Niektóre białka pełnią funkcje metaboliczne. Są nimi enzymy wykorzystujące substancje odżywcze do pozyskiwania energii, która służy do podtrzymania procesów życiowych w komórkach. Inne białka pośredniczą w transdukcji sygnału, tzn. kontroli łańcuchów reakcji biochemicznych, które pozwalają komórce reagować na zmiany w swoim środowisku. Komórki używają białek także jako materiału budulcowego. Na przykład cytoszkielet – czyli molekularne „rusztowanie” nadające kształt komórkom eukariotycznym – zbudowany jest całkowicie z białek. Białka działają również jako pompy i kanały w błonach komórkowych. Można śmiało stwierdzić, iż cząsteczki białek organizują zdecydowaną większość działań każdej żywej komórki [2]. Dlatego zrozumienie podstaw życia wymaga dogłębnego poznania fizycznych i chemicznych własności cząsteczek białek.

Pionierskie prace Johna Kendrew i Maxa Perutza (Nagroda Nobla w dziedzinie chemii przyznana w roku 1962 za określenie pierwszej atomowej struktury białek za pomocą rentgenografii strukturalnej) doprowadziły do przełomowego odkrycia – dane białko wykonuje swoje funkcje biologiczne dzięki temu, iż posiada ściśle określoną, stabilną strukturę przestrzenną, która zwana jest strukturą natywną. Wyznaczenie struktury natywnej danego białka prowadzi zwykle do wyjaśnienia tego, w jaki sposób wykonuje ona swoje funkcje. Do najważniejszych przykładów ostatnich lat można zaliczyć struktury receptorów sprzężonych z białkiem G, które wyjaśniły w jaki sposób następuje transdukcja sygnału poprzez błonę komórkową oraz jak działają hormony i opioidy [3,4]. Innymi ważnymi przykładami są struktury całych wirusów, takich jak enterowirus 71, które pomogły wyjaśnić mechanizmy infekcji komórki i dały podstawę do racjonalnego projektowania leków [5]. Znakomitym przykładem racjonalnego projektowania leków są niedawne prace Balbasa [6]. Wykorzystano w nich rentgenografię strukturalną i symulacje dynamiki molekularnej do racjonalnego wyboru testów przesiewowych, w których zidentyfikowano

określone związki chemiczne hamujące wzrost komórek raka prostaty odpornych na leki. Wydaje się, że wykorzystanie metod badania struktur białek do racjonalnego projektowania leków będzie odgrywało coraz ważniejszą rolę w medycynie [7].

Badania struktur białek prowadzą do poznania podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym. Zrodziły się one w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku z rentgenografii strukturalnej. Współczesne badania struktur białek [8][S4] często wykorzystują także takie metody jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR od ang. *nuclear magnetic resonance*), kriogeniczna mikroskopia elektronowa (cryo-EM od ang. *cryo-electron microscopy*), Försterowski rezonansowy przekaz energii (FRET od ang. *Förster resonance energy transfer*), spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR od ang. *electron paramagnetic resonance*) oraz rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS od ang. *small angle X-ray scattering*). Metody te, podobnie jak rentgenografia strukturalna, wywodzą się z fizyki materii skondensowanej i zostały stopniowo zaadaptowane na potrzeby badań struktur białek i innych makromolekuł.

Cząsteczka nawet małego białka zbudowana jest z tysięcy atomów połączonych wzajemnie przez różnorodne wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne. Dlatego w opisie struktury przestrzennej białka pomocne jest wyróżnienie kilku poziomów organizacji [1]. Sekwencja aminokwasów (tzn. ich kolejność od końca N do C) w łańcuchu polipeptydowym to tzw. struktura pierwszorzędowa. Określenie odcinków łańcucha polipeptydowego tworzących helisy α i harmonijki β stanowi tzw. strukturę drugorzędową. Natomiast trójwymiarową konformację, którą przyjmuje pofałdowany łańcuch polipeptydowy, nazywa się strukturą trzeciorzędową.

W opisie struktury i funkcji białka pomocne może być także wyróżnienie jego domen. Domenę tworzy część łańcucha polipeptydowego (zwykle od 50 to 350 aminokwasów) zwinięta w upakowaną, stabilną i funkcjonalną strukturę przestrzenną. Domeny zawierają zwykle kilka helis α i/lub harmonijek β i stanowią element składowy wielu dużych białek. Zazwyczaj różne domeny danego białka wykonują różne jego funkcje.

Wiązania niekowalencyjne, które powodują fałdowanie białka do specyficznej konformacji, pozwalają również białkom wiązać się ze sobą, co prowadzi do powstania większych struktur białkowych, czyli tzw. kompleksów białkowych. Każdy łańcuch polipeptydowy w kompleksie białkowym zwany jest podjednostką. Jeśli cząsteczka białka jest kompleksem składającym się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego, to wyróżnia się jeszcze jeden poziom organizacji – tzw. strukturę czwartorzędową, czyli wzajemnie położenie przestrzenne jego podjednostek.

Do końca XX wieku funkcjonował paradygmat mówiący, że ściśle określona struktura trzeciorzędowa jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania białka w organizmie. Paradygmat ten został zakwestionowany w pierwszych latach XIX wieku przez odkrycie białek natywne pozbawionych struktury trzeciorzędowej, które pomimo braku stabilnej struktury w warunkach fizjologicznych pozostają w pełni funkcjonalne [9]. Stanem natywnym białka tego rodzaju jest zespół różnorodnych konformacji. Białka natywne pozbawione struktury trzeciorzędowej zwane są także białkami inherentnie nieuporządkowanymi lub białkami typu IDP (od ang. *intrinsically disordered protein*).

Ważną klasą białek pozbawionych struktury trzeciorzędowej są białka wielodomenowe, w których odrębne, ustrukturyzowane domeny połączone są nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego [10]. Chociaż są one powszechne i pełnią wiele istotnych funkcji w komórkach biologicznych, białka takie okazują się często bardzo trudne do zbadania za pomocą konwencjonalnych metod. Otóż, nie mogą być one zbadane całościowo metodami rentgenografii strukturalnej ze względu na obecność nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych

(mogą być wyznaczone tylko struktury poszczególnych, ustrukturyzowanych domen lub podjednostek). Nie mogą być także zbadane metodami magnetycznego rezonansu jądrowego ze względu na duże rozmiary (zwykle rzędu kilkuset kDa). Dlatego do badań molekularnych tego typu białek używa się coraz częściej tzw. metod hybrydowych, które korzystają z zaawansowanych technik obliczeniowych do łączenia i interpretacji danych z wielu różnorodnych, wzajemnie uzupełniających się doświadczeń [8]. Mój wkład do badań w tym zakresie polegał na opracowaniu i implementacji metody hybrydowej o nazwie EROS (od ang. *ensemble refinement of SAXS*) [H1], która łączy symulacje komputerowe gruboziarnistego modelu białek wielodomenowych z wynikami doświadczeń rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami na białkach w środowisku wodnym. Metodę tę stopniowo poszerzałem i modyfikowałem. Obecnie umożliwia modelowanie zespołów konformacyjnych białek na podstawie wyników doświadczeń SAXS, elektronowego rezonansu paramagnetycznego i Försterowskiego rezonansowego przekazu energii [H2,H3]. Zastosowałem ją między innymi do scharakteryzowania konformacji kompleksów białkowych ESCRT [H1,H2,H3], kinazy białkowej C [S1] oraz kinaz tworzących kompleksy z fosfatazami [S2,S3].

Kompleksy białkowe ESCRT (od ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) zaangażowane są w transport wewnątrzkomórkowy [11,12,13]. Ich zasadniczą funkcją jest kształtowanie i koordynacja działania endosomów. (Endosomy to organelle komórkowe odpowiadające za sortowanie materiału pobranego do wnętrza komórki w drodze endocytozy). Mój wkład w badania dotyczące charakterystyki konformacji [H1,H2,H3] i mechanizmów działania [H3,H4] kompleksów białkowych ESCRT przedstawiony jest w rozdziale 5.3.1. W rozdziale tym opisane są także zasadnicze elementy metody EROS, która opiera się na podstawach mechaniki statystycznej, takich jak metoda maksymalnej entropii, rozkład Boltzmanna i symulacje Monte Carlo.

Metoda EROS łączy symulacje Monte Carlo z wynikami doświadczeń SAXS. Analogicznego połączenia użyłem do analizy zespołu konformacyjnego wielodomenowego enzymu wchodzącego w skład celulozomu bakterii ciepłolubnej *Clostridium thermocellum* [H5]. Celulozomy to kompleksy enzymów rozkładających polisacharydy tworzące ściany komórek roślinnych – celulozę i hemicelulozę – na cukry proste [14,15]. Wspólną cechą celulozomów i kompleksów białkowych ESCRT jest ich „architektura molekularna” – wiele domen i podjednostek połączonych nieustrukturyzowanymi, elastycznymi odcinkami łańcucha polipeptydowego o różnych sekwencjach i długościach. Moje badania białek celulozomalnych dotyczyły głównie własności [H5,H7] i funkcji [H6,H7] łączników międzydomenowych. Symulacje modeli zarówno gruboziarnistych jak i pełnoatomowych wykazują, że nieustrukturyzowane odcinki łańcucha polipeptydowego pomiędzy domenami nie pełnią jedynie roli łączników lecz wywierają także wpływ na konformacje łączonych domen [H6,H7]. Jednak skala tego efektu mocno zależy od długości i sztywności łączników międzydomenowych [H7]. Wyniki te sugerują między innymi, że sekwencja aminokwasowa łączników międzydomenowych może w nietrywialny sposób modulować aktywność enzymatyczną celulozomów [H6]. Mój wkład do badań wielodomenowych białek celulozomalnych opisany jest w rozdziale 5.3.2.

Mój wkład do badań białek wielodomenowych i kompleksów białkowych polegał nie tylko na charakterystyce konformacji [H1,H2,H3,H5] i mechanizmów działania [H3,H4,H6,H7] lecz także na analizie ich stabilności mechanicznej [H8] i termicznej [H9]. Mój wkład w badania stabilności białek wielodomenowych i kompleksów białkowych opisany jest w rozdziale 5.3.3.

Co do stabilności mechanicznej, to należy na wstępie zaznaczyć, że pewne rodzaje białek poddawane są w warunkach fizjologicznych działaniom sił zewnętrznych. Przykładem są białka

adhezyjne, których domeny transbłonowe wbudowane są w błonę komórkową, a domeny zewnątrzkomórkowe wiążą się z białkami w błonie innej komórki [1,2]. Białka adhezyjne pośredniczą w oddziaływaniach międzykomórkowych, które zachodzą np. podczas tworzenia tkanek oraz w procesie rozpoznawania przez leukocyty otaczających je komórek. Aby pozostawały funkcjonalne, białka adhezyjne muszą zachowywać swoją strukturę, gdy na przylegające komórki działają siły zewnętrzne. Badania mechanostabilności kompleksów białek adhezyjnych prowadziłem przy użyciu metod dynamiki molekularnej w ramach modelu gruboziarnistego typu Go [H8], który oparty jest na mapie kontaktów występujących w strukturze natywnej. Wyniki tych symulacji podsumowane są w rozdziale 5.3.3.

Co do termicznej stabilności białek, to warto zwrócić uwagę na to, że organizmy żywe przystosowane są do różnych zakresów temperatur występujących na Ziemi. Przykładowo, zimnolubne bakterie *Planococcus halocryophilus* żyją w temperaturach tak niskich jak -15°C , a metabolizm podtrzymują nawet w temperaturze -25°C [16]. Natomiast ciepłolubne archeobakterie *Geogemma barossii*, które odkryto wokół komina hydrotermalnego na dnie oceanu, wzrastają i namnażają się w temperaturach do 120°C [17]. Białka organizmów ciepłolubnych pozostają więc funkcjonalne w temperaturach, w których białka innych organizmów ulegają denaturacji. Obserwacja ta prowokuje następujące pytania: jakie cechy strukturalne i topologiczne oraz jakie własności fizykochemiczne determinują stabilność struktury i funkcjonalność białek w różnych zakresach temperatur? Zagadnienie to badane jest od ponad trzech dekad. Mój wkład do tej tematyki badań [H9] dotyczył termostabilności wielodomenowego enzymu – który jest homodimerem, czyli kompleksem dwóch takich samych białek – występującego w organizmach zarówno ciepłolubnych jak i zimnolubnych. Badania te przeprowadziłem przy użyciu metod dynamiki molekularnej w ramach modelu gruboziarnistego typu Go. Wyniki tych badań opisane są w rozdziale 5.3.3.

5.3.1 Konformacje i mechanizmy działania białek ESCRT (publikacje H1, H2, H3, H4)

Endosomalne kompleksy sortujące wymagane do transportu (ESCRT od ang. *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) to grupa białek, do których zalicza się kompleksy oznaczone jako ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II i ESCRT-III [18,13]. Białka ESCRT obecne są w płynie wewnątrzkomórkowym i wiążą się ze swoistymi składnikami błon lipidowo-białkowych. Przykładowo, niektóre z białek tworzących kompleksy ESCRT-0 i ESCRT-II posiadają domeny wiążące 3-fosforan fosfatydyloinozytolu (PI3P), który jest fosfolipidem występującym w błonie cytoplazmatycznej oraz w błonie endosomów. Inne domeny białek tworzących ESCRT-0, ESCRT-I i ESCRT-II wiążą natomiast ubikwitynę. (Ubikwityna jest małym białkiem przyłączanym kowalencyjnie do tych białek na powierzchni endosomów, które przeznaczone są do degradacji w organellach zwanych lizosomami). Kształtowanie i dojrzewanie endosomów zachodzi na skutek wiązania do ich powierzchni kolejno kompleksów białkowych ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II i ESCRT-III [13].

Białka ESCRT zostały zidentyfikowane w rozmaitych organizmach – od drożdży po człowieka. Oprócz koordynacji działania endosomów, znane są też inne funkcje białek ESCRT [11]. Przykładowo, biorą one udział w końcowym etapie podziału komórek, gdy błona komórki macierzystej rozdzielana jest od błony komórki potomnej. Okazuje się także, że pewne wirusy (w tym HTLV oraz HIV-1) wykorzystują białka ESCRT do tego, by wydostać się z zainfekowanej komórki gospodarza.

Znamienną cechą białek ESCRT jest efekt ich działania na błony komórkowe. Wywołują one bowiem pęczkowanie błony cytoplazmatycznej w kierunku na zewnątrz komórki, a błony endosomalnej – w kierunku do wnętrza endosomu [13,19]. W procesach tych deformacja błon

zachodzi zatem w kierunku przeciwnym do kierunku, z którego białka ESCRT wiążą się z błoną (co zilustrowałem na rys. 1 w pracy [H4]). Jeszcze bardziej ciekawy wydaje się fakt, że białka ESCRT zostały zaobserwowane jedynie w szyjce łączącej nowo powstały pączek błony lipidowo-białkowej z błoną macierzystą (tzn. błoną cytoplazmatyczną lub endosomalną) [20,21]. Mimo intensywnych badań w tym zakresie, do tej pory nie udało się wyjaśnić mechanizmów molekularnych leżących u podstaw procesu deformacji błon przez białka ESCRT.

ESCRT-0, ESCRT-I i ESCRT-II tworzone są w płynie wewnątrzkomórkowym jako trzy oddzielne kompleksy białkowe [18]. Natomiast podjednostki kompleksu ESCRT-III nie wiążą się ze sobą w płynie wewnątrzkomórkowym lecz tylko na powierzchni błony. Przewiduje się, że podjednostki kompleksu ESCRT-III w płynie wewnątrzkomórkowym występują w stanie nieaktywnym lub „zamkniętym”, w którym nie mogą wiązać się wzajemnie [22]. Natomiast na powierzchni błony przechodzą w stan aktywny lub „otwarty” i dopiero wówczas tworzy się kompleks ESCRT-III [22]. Przejście z konformacji zamkniętej do otwartej jest prawdopodobnie spowodowane oddziaływaniami elektrostatycznymi podjednostek ESCRT-III z błoną. Przemawiają za tym między innymi doświadczenia SAXS na podjednostce CHMP3 w roztworach wodnych o różnych stężeniach soli [23]. Wyniki tych doświadczeń wykazują, że gdy stężenie soli w roztworze nie jest większe od stężenia fizjologicznego (150mM), to CHMP3 przyjmuje konformację zamkniętą. Natomiast gdy stężenie soli w roztworze znacznie przekracza stężenie fizjologiczne, a zatem gdy oddziaływania elektrostatyczne są efektywnie ekranowane na odległościach mniejszych od 1 nm, to białko CHMP3 przyjmuje konformację otwartą. Zatem ekranowanie oddziaływań elektrostatycznych ma znaczny wpływ na rozmieszczenie domen w podjednostce CHMP3.

Metoda SAXS jest obecnie standardowo używana do wyznaczania charakterystycznych rozmiarów i kształtów białek. Pomijając pewne aspekty techniczne, procedura jest następująca. Wynikiem pomiarów SAXS na makrocząsteczkach w środowisku wodnym jest tzw. krzywa rozproszeniowa, czyli zależność natężenia promieniowania rentgenowskiego w funkcji kąta rozproszenia. Odwrotna transformata Fouriera krzywej rozproszeniowej daje rozkład odległości pomiędzy parami atomów w badanym białku. Na podstawie tego rozkładu i sekwencji aminokwasowej białka (oraz przy upraszczającym założeniu równomiernego rozłożenia masy w cząsteczce białka) wyznacza się tzw. obwiednię molekularną, która reprezentuje przestrzeń zajmowaną przez cząsteczkę białka [24,25]. Obwiednie molekularne dostarczają informacji o charakterystycznych rozmiarach badanego białka i pozwalają zwizualizować jego kształt. Jednak nie pozwalają one określić atomowej struktury białka i dlatego SAXS jest powszechnie uznawana za metodę o niskiej rozdzielczości przestrzennej.

W pracy [23] wyznaczono obwiednie molekularne białka CHMP3 w roztworach o niskim i wysokim stężeniu soli. Obwiednie te wyraźnie wskazują na różnice między konformacją otwartą a zamkniętą, jednak nie pozwalają na ich szczegółowy opis. Aby wypełnić tę lukę poznawczą, wykonałem symulacje komputerowe białka CHMP3 [H1]. Ponieważ znaczne zmiany konformacyjne białek wielodomenowych są bardzo trudne do próbkowania w symulacjach dynamiki molekularnej z rozdzielczością atomową, więc na potrzeby badań białka CHMP3 użyłem modelu gruboziarnistego, który został wprowadzony przez Kima i Hummera [26]. Główne elementy tego modelu – który oznaczać będę jako model KM – podsumowane są w akapicie poniżej.

Model KM jest modelem gruboziarnistym, w których całe aminokwasy reprezentowane są przez pojedyncze „kulki” lub „ziarna”. Domeny białkowe o znanych strukturach (tzn. strukturach wyznaczonych przy użyciu metod krystalografii strukturalnej lub NMR) reprezentowane są przez bryły sztywne uformowane z owych „ziaren”. Bryły sztywne podlegają jedynie przesunięciom i

obrotom w trakcie symulacji. Natomiast nieustrukturyzowane pętle i łączniki międzydomenowe reprezentowane są przez łańcuchy „ziaren” odpowiednich aminokwasów. Energia potencjalna tych obiektów zawiera człony związane z lokalnym rozciąganiem, zgnaniem i skręcaniem łańcuchów. Oddziaływania fizyczne między „ziarnami”, które tworzą zarówno sztywne domeny jak i giętkie łączniki międzydomenowe, opisane są przez energię potencjalną zawierającą dwa komponenty (i) statystyki występowania kontaktów między aminokwasami oraz (ii) potencjał elektrostatyczny w przybliżeniu Debye’a-Hückela. Zmiany długości Debye’a, która opisuje zasięg oddziaływań elektrostatycznych w roztworach wodnych, umożliwiają symulacje białek w roztworach o różnych siłach jonowych. Jak zostało wykazane w serii symulacji Monte Carlo, dobrana w ten sposób energia potencjalna poprawnie przewiduje struktury i stałe równowagi wielu kompleksów białkowych [26]. Wynik ten wskazuje na to, że symulacje modelu KH prawidłowo próbują rzeczywiste konformacyjne kompleksów białkowych.

W ramach opisu KM, model białka CHMP3 zawiera trzy bryły sztywne: (i) rdzeń złożony z helis $\alpha 1-\alpha 4$, którego struktura została wyznaczona metodą rentgenografii strukturalnej (kod PDB: 3FRT), (ii) helisy $\alpha 5$ i (iii) helisy $\alpha 6$. Są one połączone dwoma nieustrukturyzowanymi łącznikami międzydomenowymi (jak zilustrowałem to na rys. 3 w pracy [H1]). Symulacje komputerowe białka CHMP3, które wykonałem w ramach modelu KH używając metody Monte Carlo, prowadzą do wyników jakościowo zgodnych z wynikami pomiarów SAXS na białku CHMP3 [H1]. Otóż, dla długości Debye’a większych od 1 nm, które odpowiadają niskim stężeniom soli w roztworze, zarówno helisa $\alpha 5$ jak i łączniki międzydomenowe tworzą częste kontakty z rdzeniem białka CHMP3, a helisa $\alpha 6$ pozostaje w bliskim otoczeniu rdzenia. Te konformacje odpowiadają stanowi zamkniętemu białka CHMP3. Natomiast dla długości Debye’a mniejszych od 1 nm, które odpowiadają wysokim stężeniom soli w roztworze, zarówno helisa $\alpha 5$ jak i helisa $\alpha 6$ są oddzielone od rdzenia białka CHMP3 i zwykle pozostają z dala niego. Te konformacje odpowiadają stanowi otwartemu białka CHMP3.

W celu ilościowego porównania opisanych powyżej wyników symulacji z wynikami doświadczeń SAXS, obliczyłem krzywe rozproszeniowe dla otrzymanych z symulacji zespołów konformacyjnych białka CHMP3 w roztworach o małych i dużych siłach jonowych. Obliczone krzywe rozproszeniowe zgadzają się z danymi uzyskanymi z doświadczeń SAXS, jednak istnieją między nimi pewne rozbieżności (przedstawiłem to na rys. 2 w pracy [H1]). Aby poprawić zgodność wysymulowanych zespołów konformacyjnych białka CHMP3 z wynikami doświadczeń SAXS, wprowadziłem i zaimplementowałem metodę nazwaną EROS (od ang. *ensemble refinement of SAXS*). Metoda ta opisana jest zwięźle poniżej.

Modelowanie konformacji białek metodą EROS przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie wykonywane są symulacje komputerowe danego białka lub kompleksu białkowego, w wyniku których wygenerowana zostaje pula modeli strukturalnych. W ten sposób otrzymywany jest „wstępny” zespół konformacyjny badanego białka lub kompleksu białkowego. W drugim etapie ów zespół konformacyjny zostaje poprawiony w taki sposób, aby osiągnąć zgodność z dostępnymi danymi doświadczalnymi i jednocześnie wprowadzić możliwie niewielkie modyfikacje w oryginalnym (wstępnym) zespole konformacyjnym, który otrzymany został z symulacji. Wykonuje się to w następujący sposób:

- Modele strukturalne wygenerowane w procesie symulacji są najpierw segregowane na podstawie wzajemnego podobieństwa i grupowane w zbiory. Dany zbiór składa się z modeli strukturalnych (zwykle od kilku do kilkudziesięciu modeli), które są wzajemnie podobne. W celu podziału puli modeli na rozłączne zbiory stosuje się standardowe algorytmy grupowania,

np. algorytm centroidów (ang. *k-means*) lub algorytm typu QT (od ang. *quality threshold*), natomiast jako miary podobieństwa modeli używa się DRMS (od ang. *distance root mean square*).

- Dla każdego ze zbiorów osobno oblicza się następnie krzywą rozproszeniową, gdyż zależność natężenia promieniowania rozproszonego w funkcji kąta rozproszenia mierzona jest w doświadczeniach SAXS. Obliczeń tych dokonuje się oczywiście na podstawie poszczególnych struktur przypisanych do zbiorów. Ważnym elementem obliczeń krzywych rozproszeniowych jest uwzględnienie otoczki hydratacyjnej na powierzchni białka.
- Następnie zbiorom modeli strukturalnych przypisuje się wagi statystyczne i przyjmuje się, że średnia ważona po zbiorach reprezentuje średnią po zespole statystycznym. Dlatego krzywa rozproszeniowa uśredniona po całym zespole statystycznym, która ma zostać porównana bezpośrednio z wynikami doświadczeń SAXS, zależy od wag statystycznych przypisanych zbiorom modeli strukturalnych. Wybierając zatem odpowiednie wagi statystyczne można zwykle osiągnąć zgodność wyników doświadczalnych z wynikami teoretycznymi (tzn. zgodność wielkości zmierzonych w doświadczeniach z wielkościami obliczonymi na podstawie symulowanych modeli strukturalnych po uśrednieniu z odpowiednimi wagami).
- Aby uniknąć nadmiernego dopasowania (ang. *overfitting*) oraz problemu niejednoznaczności wyboru odpowiednich wag statystycznych, dopasowanie wielkości teoretycznych do doświadczalnych opiera się na metodzie maksymalnej entropii. Metoda ta sprowadza się do numerycznej minimalizacji różnicy dwóch funkcji. Pierwsza z tych funkcji, χ^2 , opisuje stopień zgodności przewidywań teoretycznych z wynikami doświadczeń i zależy w skomplikowany sposób od wag statystycznych zbiorów symulowanych struktur. Druga z tych funkcji, S , ma postać analogiczną do entropii Shannona i rośnie wraz ze zmianami wag statystycznych zbiorów. W wyniku minimalizacji różnicy tych dwóch funkcji otrzymuje się zespół konformacyjny (tzn. zestaw zbiorów modeli strukturalnych wraz z przyporządkowanymi im wagami statystycznymi), który jest zgodny z wynikami doświadczeń, a jednocześnie jest możliwie podobny do zespołu konformacyjnego otrzymanego bezpośrednio z symulacji (tzn. puli modeli strukturalnych bez przypisanych wag statystycznych).

Procedura opisana powyżej może być uogólniona i zastosowana do modelowania konformacji białek na podstawie innych doświadczeń – nie tylko SAXS – w których mierzony sygnał uśredniony jest po zespole statystycznym.

Metody opisanej powyżej użyłem do wyznaczenia zespołów konformacyjnych białka CHPM3 w roztworach o różnych siłach jonowych [H1]. Natomiast do konstrukcji zespołów konformacyjnych kompleksów białkowych ESCRT-I [H2], ESCRT-II i ESCRT-I-II [H3] użyłem prostszego sposobu, który sprowadza się do wyboru najmniejszego możliwego zestawu zbiorów struktur, który daje zgodność teorii z doświadczeniem. Zaletą takiego podejścia jest niewątpliwie to, że otrzymany zespół konformacyjny jest zwykle reprezentowany tylko przez kilka struktur, które mogą być łatwo zwizualizowane i zinterpretowane. Jednak odrzucając znaczną część modeli strukturalnych otrzymanych z symulacji molekularnych, metoda „minimalnego zespołu” nie wykorzystuje w pełni prognostycznych możliwości symulacji komputerowych, które oparte są na zasadach fizyki i chemii.

Do wyznaczenia konformacji kompleksów białkowych ESCRT-I, ESCRT-II i ESCRT-I-II [H2,H3] użyte zostały nie tylko symulacje gruboziarniste i doświadczenia rozproszeniowe SAXS lecz także dwie znamienne techniki spektroskopowe oparte na ukierunkowanym znakowaniu, tj. Försterowski rezonansowy przekaz energii (FRET od ang. *Förster resonance energy transfer*) i

elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR od ang. *electron paramagnetic resonance*). Zjawiska fizyczne leżące u podstaw tych technik są zupełnie różne – przenoszenie energii między dwoma chromoforami na drodze innej niż promieniowanie (FRET) i elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR). Jednak ich podstawowe zastosowanie do strukturalnej charakteryzacji białek wykorzystuje ich wspólną cechę – obie metody mogą mianowicie dostarczać informacji o odległościach pomiędzy parami cząsteczek „znaczników”, które związane są kowalencyjnie do badanych białek. W jednym przypadku (FRET) są to odległości między dipolami elektrycznymi cząsteczek znaczników, a w drugim (EPR), odległości między niesparowanymi elektronami znaczników spinowych. Metoda spektroskopii EPR, która może dostarczyć informacji o odległościach między znacznikami spinowymi, to metoda podwójnego rezonansu elektronowego (DEER od ang. *Double Electron-Electron Resonance*).

Odległości między parami znaczników dostarczają fragmentarycznych informacji o strukturach znakowanych białek. Jednak w połączeniu z danymi z komplementarnych doświadczeń, takich jak SAXS, mogą być one bardzo przydatne do modelowania konformacji białek. Wyniki pomiarów FRET i DEER nakładają mianowicie „lokalne” ograniczenia na odległości między różnymi domenami białkowymi lub podjednostkami, a dane z doświadczeń SAXS dostarczają „globalnych” informacji o rozmiarze i kształcie badanego białka lub kompleksu białkowego. Dlatego połączenie doświadczeń SAXS, FRET i/lub DEER z symulacjami komputerowymi (dynamiki molekularnej lub Monte Carlo) jest efektywnym i rzetelnym sposobem badania konformacji białek wielodomenowych i kompleksów białkowych.

Współczesne badania struktur białek korzystają obficie z metod modelowania molekularnego. Wyznaczanie struktur na podstawie wyników doświadczeń krystalograficznych lub NMR wymaga modelowania wszystkich atomów tworzących daną cząsteczkę białka. Natomiast do interpretacji wyników doświadczeń SAXS wystarcza modelowanie typu gruboziarnistego, przybliżające grupy atomów przez pojedyncze „ziarna”, gdyż rozdzielczość przestrzenna metody SAXS jest mniejsza od rozmiarów aminokwasów (zazwyczaj pomiędzy 1 a 2 nm). Z kolei do analizy i interpretacji wyników doświadczeń FRET i DEER konieczne jest modelowanie znaczników fluorescencyjnych i paramagnetycznych z rozdzielczością atomową. Metoda EROS wykorzystuje symulacje gruboziarniste, gdyż została wprowadzona z myślą o badaniach dużych białek wielodomenowych, które mogą wykazywać znaczne zmiany konformacyjne. Natomiast atomowe struktury znaczników fluorescencyjnych i paramagnetycznych są wykorzystywane w odpowiednio zmodyfikowanej metodzie EROS [H2,H3] na etapie poprawiania zespołu konformacyjnego, gdy wyniki symulacji porównywane są z wynikami doświadczeń FRET i DEER.

Zespół konformacyjny może zostać wyznaczony na podstawie dopasowania wysymulowanych modeli strukturalnych albo do wyników pomiarów doświadczalnych (takich jak np. krzywa rozproszeniowa) albo do „przetworzonych” danych, które otrzymane zostały na podstawie danych doświadczalnych (takich jak np. rozkład odległości pomiędzy parami atomów w białku, który jest transformatą Fouriera krzywej rozproszeniowej). Aby jednak uniknąć potencjalnych błędów wynikających z wprowadzenia różnego rodzaju artefaktów przy przetwarzaniu danych, takich jak np. z regularyzacją danych, metoda EROS [H1] oraz jej modyfikacje [H2,H3] opierają się na dopasowaniu zespołu konformacyjnego bezpośrednio do danych eksperymentalnych. Bardzo ważna jest także walidacja przeprowadzonej procedury obliczeniowej, która polega na sprawdzeniu, że zaproponowany zespół konformacyjny jest zgodny z wynikami doświadczeń, które nie zostały wykorzystane do konstrukcji tego zespołu [H2,H3].

Prace [H2,H3] dostarczyły wielu ważnych informacji na temat konformacji i mechanizmów działania kompleksów białkowych ESCRT-I i ESCRT-II. Kompleks ESCRT-I składa się z czterech

podjednostek oznaczonych jako Vps28, Vps37, Vps23 i Mvb12 (rys. 1 w pracy [H2]). Rdzeń ESCRT-I zawiera fragmenty wszystkich czterech podjednostek. Do rdzenia przyłączone są – poprzez długie, nieustrukturyzowane fragmenty łańcuchów polipeptydowych – trzy domeny: (i) domena CTD białka Vps28, która wiąże się z jednym z białek z kompleksu ESCRT-II, (ii) domena UEV białka Vps23, która wiąże ubikwitynę, (iii) domena NTH białka Vps37, która wiąże się – prawdopodobnie na skutek oddziaływań elektrostatycznych – z błoną endosomalną lub cytoplazmatyczną. Struktury wszystkich tych domen są znane i zdeponowane w bazie PDB. Podjednostka Mvb12 posiada na N-końcu długi, nieustrukturyzowany fragment łańcucha polipeptydowego. Cały kompleks ESCRT-I zbudowany jest z prawie tysiąca aminokwasów, a jego masa wynosi około 108 kDa.

Wykonałem symulacje kompleksu ESCRT-I w ramach gruboziarnistego modelu KH [H2]. Okazuje się, że spośród kilkudziesięciu tysięcy modeli strukturalnych wygenerowanych w tych symulacjach, żaden z osobna nie daje krzywej rozproszeniowej zgodnej z danymi otrzymanymi z doświadczeń SAXS. Jednak dwa zbiory modeli strukturalnych, wzięte z równymi wagami statystycznymi, dają bardzo dobrą zgodność z wynikami pomiarów SAXS (rys. 2 w pracy [H2]). Jeden z tych zbiorów modeli strukturalnych odpowiada konformacji zamkniętej, w której domeny CTD i UEV znajdują się w pobliżu rdzenia ESCRT-I. Natomiast drugi zbiór modeli strukturalnych odpowiada konformacji otwartej, w której domeny CTD i UEV nie tworzą bezpośrednich kontaktów ze rdzeniem. Co ciekawe, minimalny zespół konformacyjny zgodny zarówno z danymi z doświadczeń SAXS jak i z wynikami pomiarów DEER (rys. 3 w pracy [H2]) składa się aż z sześciu zbiorów modeli strukturalnych (rys. 4 w pracy [H2]). Trzy z nich odpowiadają konformacji otwartej. Trzy pozostałe odpowiadają konformacjom zamkniętym, w których domeny CTD i UEV tworzą różne kontakty z rdzeniem ESCRT-I. Wyniki te wzięte razem pokazują, że ESCRT-I przyjmuje spektrum różnorodnych konformacji, a oddziaływania między domenami są słabe i krótkotrwałe.

Kompleks ESCRT-II (rys. 2 w pracy [H3]) składa się podjednostki Vps36, podjednostki Vps22 i dwóch podjednostek Vps25 (stechiometria tego kompleksu to 1:1:2). Rdzeń kompleksu ESCRT-II składa się z obu podjednostek Vps25, podjednostki Vps22 oraz fragmentu podjednostki Vps36. Białko Vps36 zawiera także domenę GLUE oraz dwie domeny (NZF1 i NZF2) wiążące jony cynku. Domena GLUE wiąże PI3P, który jest fosfolipidem występującym w błonie cytoplazmatycznej oraz w błonie endosomów. Domena NZF1 wiąże się do domeny CTD białka Vps28 należącego do kompleksu ESCRT-I. Domena NZF2 wiąże ubikwitynę. Domeny GLUE, NZF1 i NZF2 połączone są z rdzeniem ESCRT-II bardzo długim, nieustrukturyzowanym fragmentem białka Vps28. Struktury wszystkich tych czterech domen są znane i zdeponowane w bazie PDB.

Wykonałem symulacje kompleksu ESCRT-II w ramach modelu KH [H3]. Na podstawie wyników tych symulacji wyznaczyłem następnie minimalny zespół konformacyjny zgodny zarówno z krzywymi rozproszeniowymi otrzymanymi z doświadczeń SAXS (rys. 1 w pracy [H3]) jak i z histogramami wydajności przekazu energii wyznaczonymi na podstawie pomiarów FRET (rys. 3 w pracy [H3]). Otrzymany w ten sposób zespół konformacyjny reprezentowany jest przez 15 modeli strukturalnych (rys. 5 w pracy [H3]). Znakomita większość z nich odpowiada konformacjom zwartym o stosunkowo małym promieniu obrotowym jak na tak duży kompleks białkowy. W konformacjach tych domena GLUE tworzy bezpośrednie kontakty z rdzeniem ESCRT-II. Okazuje się jednak, że istnieje wiele sposobów, na które domena GLUE może tworzyć kontakty z rdzeniem. Prowadzi to do wniosku, że oddziaływania między domenami w kompleksie ESCRT-II są słabe i krótkotrwałe, podobnie jak w przypadku oddziaływań domen tworzących kompleks ESCRT-I.

W ramach modelu KH wykonałem także symulacje kompleksu ESCRT-I-II, który utworzony jest na skutek związania domeny CTD białka Vps28 z domeną NZF1 białka Vps36 (rys. 1 w pracy [H2] i rys. 2 w pracy [H3]). Na podstawie otrzymanych z symulacji modeli strukturalnych, wyznaczyłem minimalny zespół konformacyjny zgodny z wynikami doświadczeń SAXS, FRET i DEER łącznie. Reprezentowany jest on przez 18 modeli strukturalnych, które znacznie różnią się między sobą (rys. 6 w pracy [H3]). Wiele z nich charakteryzuje się zakrzywionym kształtem, a promień ich krzywizny jest zdumiewająco zbliżony do promienia krzywizny szyjki błony endosomu podczas pączkowania. Spostrzeżenie to doprowadziło do hipotezy dotyczącej sposobu ułożenia kompleksów ESCRT-I-II na błonie pączkującego endosomu (rys. 7 w pracy [H3]). Ponieważ w zaproponowanym modelu strukturalnym ESCRT-I-II są odpowiednio zakrzywione, ich domeny wiążące PI3P lub ubikwitynę skierowane są ku zakrzywionej błonie pączkującego endosomu. Wyniki te dobrze wpisują się w nurt badań dotyczących zależności strukturalno-funkcyjnych białek ESCRT.

Kontynuacją opisanych powyżej badań [H3] była praca [H4], w której zaproponowany został fizyczny model pączkowania błon pod wpływem kompleksów białkowych ESCRT-I-II. Założenia tego modelu opierają się na kilku opisanych w literaturze obserwacjach, których dokonano w doświadczeniach wykorzystujących nowatorskie techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Po pierwsze, białka kompleksów ESCRT-I i ESCRT-II wiążą się z błonami lipidowymi o składzie zbliżonym do składu lipidowego błon endosomalnych, które zawierają między innymi sfingomieliny, PI3P i cholesterol [20,21,27]. Błony o składzie lipidowym tego typu posiadają dwie fazy płynne – nieuporządkowaną (ang. *liquid disordered phase*) i uporządkowaną (ang. *liquid ordered phase*). Po drugie, związanie kompleksów ESCRT-I i ESCRT-II z błoną prowadzi do rozdzielenia faz lipidowych [27]. Obszary błony lipidowej pokryte przez kompleksy białek ESCRT-I-II są w fazie płynnej uporządkowanej. Po trzecie, związane białka ESCRT-I-II z błoną wywołuje jej pączkowanie [21]. Po czwarte, białka ESCRT-I-II lokalizują się w szyjce łączącej błonę pączka z błoną macierzystą [19,20,21].

Model fizyczny wprowadzony w pracy [H4] osadzony jest w ramach teorii elastyczności błon lipidowych. Model ten zadany jest poprzez funkcjonal energii, który zależy zarówno od kształtu błony lipidowej jak i od rozmieszczenia białek ESCRT-I-II na powierzchni błony. Uwzględnia on deformacje błony lipidowej oraz wymienione powyżej obserwacje doświadczalne. Rozwiązanie modelu, które sprowadza się do minimalizacji funkcjonału energii rozważanego układu, uzyskałem używając algorytmu symulowanego wyżarzania (ang. *Monte Carlo simulated annealing*). Znalazłem także analityczne rozwiązanie uproszczonego modelu, w ramach którego powierzchnia pączkującego fragmentu błony przybliżona jest czaszą sfery (ang. *spherical cap approximation*). Rozwiązanie to wyjaśnia, dlaczego białka ESCRT-I-II mogą generować zarówno pączki endosomalne o średnicy rzędu 50 nanometrów jak i pączki błony lipidowej o średnicy około dwóch mikrometrów, które zaobserwowane zostały w doświadczeniach mikroskopii fluorescencyjnej na pęcherzykach lipidowych typu GUV (ang. *giant unilamellar vesicles*). Rozwiązanie modelu wyjaśnia też inną ciekawą obserwację doświadczalną, a mianowicie bardzo wąski rozkład średnicy pączków w danym układzie doświadczalnym.

W pracy [H4] wyznaczyłem między innymi zakres parametrów wprowadzonego modelu, w którym białka ESCRT-I-II zlokalizowane są w szyjce pączków błon. Kształty pączkujących błon, które otrzymałem z obliczeń numerycznych, zgodne są w tym zakresie parametrów z obrazami zarejestrowanymi w doświadczeniach mikroskopii fluorescencyjnej. Na podstawie wyników obliczeń numerycznych i analitycznych zidentyfikowałem także trójstopniowy mechanizm spontanicznego pączkowania błon z udziałem białek ESCRT-I-II. Na odpowiadającej mu ścieżce w

przestrzeni konfiguracyjnej układu nie występują bariery energii. Wyniki te wzięte razem stanowią teoretyczny opis procesu pączkowania błon pod wpływem białek ESCRT-I-II.

Jedną z podstawowych funkcji białek ESCRT w komórkach biologicznych jest kształtowanie endosomów [13]. Procesem koniecznym do wypełniania tej funkcji jest pączkowanie błon endosomalnych [19]. Zatem moje badania dostarczyły nie tylko nowych informacji strukturalnych [H1,H2,H3] lecz także wyników mających wkład do zrozumienia funkcji białek ESCRT [H4]. Ponadto „produktem ubocznym” moich badań nad kompleksami białkowymi ESCRT jest metoda EROS [H1] i jej modyfikacje [H2,H3], które stanowią wkład do rozwoju tzw. hybrydowych metod biologii strukturalnej.

W pracach [H1-H4] użyłem wybranych metod fizyki statystycznej i obliczeniowej, takich jak symulacje Monte Carlo z wymianą replik [H1-H3], klasteryzacja [H1-H3], zasada entropii maksymalnej [H1], i metoda symulowanego wyżarzania [H4]. Ponadto w pracach [H1-H3] zastosowałem teorię rozpraszania promieniowania rentgenowskiego, a w pracy [H4] użyłem teorii elastyczności błon. Ta różnorodność zastosowanych metod fizyki teoretycznej wynika ze złożoności badanych zagadnień.

Mój wkład w powstanie pracy [H1] był zasadniczy i polegał na (i) współudziale w wyborze zagadnienia badawczego i sformułowaniu celów badawczych, (ii) wykonaniu symulacji Monte Carlo gruboziarnistego modelu białka CHMP3 dla kilku różnych długości Debye'a, (iii) opracowaniu metody – uwzględniającej między innymi otoczkę hydratacyjną białek – obliczania krzywych rozproszeniowych na podstawie struktur otrzymanych z symulacji gruboziarnistych, (iv) opracowaniu metody EROS, tzn. metody ulepszania wysymulowanego zespołu konformacyjnego na podstawie wyników doświadczeń SAXS, (v) implementacji metody EROS do wyników symulacji białka CHMP3 i uzyskaniu zespołów konformacyjnych białka CHMP3 w roztworach wodnych o różnych siłach jonowych, (vi) analizie i dyskusji zmian konformacyjnych białka CHMP3, (vii) przygotowaniu tekstu artykułu i wszystkich rysunków oraz (viii) udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu zgodnie z recenzjami.

Mój wkład w powstanie pracy [H2] był duży i polegał na (i) współudziale w wyborze celów i metod badawczych, (ii) wykonaniu – w ramach modelu KH używając metody Monte Carlo – symulacji kompleksu białkowego ESCRT-I, (iii) wyznaczeniu krzywych rozproszeniowych dla struktur otrzymanych z symulacji, (iv) wprowadzeniu metody modelowania znaczników paramagnetycznych (MTSL) i fluorescencyjnych (Alexa Fluor) w wybranych miejscach na powierzchni struktur otrzymanych z symulacji gruboziarnistych, (v) symulacji sygnału pulsowego EPR dla par znaczników paramagnetycznych na powierzchni struktur otrzymanych z symulacji, (vi) opracowaniu metody wyznaczania – na podstawie konformacji otrzymanych z symulacji – minimalnego zespołu konformacyjnego zgodnego z wynikami doświadczeń rozproszeniowych SAXS i pulsowego EPR, (vii) implementacji ww. metody i wyznaczeniu minimalnego zespołu konformacyjnego dla kompleksu białkowego ESCRT-I, (viii) wyznaczeniu histogramów wydajności przekazu energii między parami znaczników fluorescencyjnych (FRET) dla wyznaczonego zespołu konformacyjnego, (ix) weryfikacji wyznaczonego zespołu konformacyjnego na podstawie danych z doświadczeń FRET na kompleksie białkowym ESCRT-I oraz (x) współudziale w dyskusji wyników, pisaniu artykułu i przygotowaniu rysunków.

Mój wkład w powstanie pracy [H3] polegał na (i) współudziale w podjęciu zagadnienia badawczego i wyborze metod badawczych, (ii) wykonaniu – w ramach modelu KH używając metody Monte Carlo – symulacji kompleksów białkowych ESCRT-II oraz ESCRT-I-II, (iii) wyznaczeniu – na podstawie konformacji otrzymanych z symulacji – minimalnych zespołów konformacyjnych, które są zgodne z wynikami doświadczeń SAXS, EPR i FRET

przeprowadzonych na kompleksach białkowych ESCRT-II i ESCRT-I-II, (iv) współudziale w dyskusji wyników i pisaniu artykułu oraz (v) przygotowaniu większości rysunków.

Mój wkład w powstanie pracy [H4] był kluczowy i polegał na (i) współudziale w dyskusji literatury na temat działania białek ESCRT na błony lipidowe, (ii) zaproponowaniu teoretycznego modelu deformacji błony lipidowej pod wpływem kompleksu białkowego ESCRT-I-II, (iii) wykonaniu wszystkich obliczeń analitycznych i numerycznych w ramach zaproponowanego modelu, który opiera się na teorii elastyczności błon lipidowych, (iv) zasadniczym udziale w analizie i interpretacji otrzymanych wyników obliczeń, (v) przygotowaniu znacznej części tekstu artykułu i wszystkich rysunków oraz (vi) współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu.

5.3.2 Własności i funkcje nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych w białkach celulozomalnych (publikacje H5, H6, H7)

Celulozomy to wielobiałkowe enzymy, które rozkładają polisacharydy tworzące ścianki komórek roślinnych [14,15,28]. Katalizują one między innymi reakcje hydrolizy hemicelulozy na ksylozę i celulozy na glukozę. Są one wydzielane przez mikroorganizmy celulolityczne (pewne bakterie i grzyby), które wykorzystują produkty tych reakcji (glukozę i ksylozę, tj. cukry proste) jako źródła substancji odżywczych. Najlepiej scharakteryzowanym mikroorganizmem wytwarzającym celulozomy jest bakteria ciepłolubna *Clostridium thermocellum*.

Celulozomy charakteryzują się bardzo dużą masą molekularną – setki a nawet tysiące kDa – w zależności od produkującego je mikroorganizmu [29,30]. Kompleks białkowy stanowiący dany celulozom złożony jest z wielu podjednostek, które zawierają zwykle kilka odrębnych domen, które wzajemnie połączone są nieustrukturyzowanymi fragmentami łańcuchów polipeptydowych [29,30]. Tego typu „architektura molekularna” jest cechą wspólną celulozomów i kompleksów białkowych ESCRT.

Podstawowym elementem strukturalnym celulozomu jest białko o nazwie skafoldyna [28]. Zawiera ono wiele domen białkowych zwanych kohezynami. Poszczególne kohezyny połączone są szeregowo (tzn. jedna do drugiej) nieustrukturyzowanymi fragmentami łańcucha polipeptydowego skafoldyny. Zasadniczą funkcją kohezyn jest swoiste wiązanie do różnorodnych podjednostek katalitycznych – głównie celulaz, glukanaż i ksyłanaż różnych rodzajów. Każda z tych podjednostek katalitycznych zawiera domenę białkową zwaną dokeryną. To właśnie dokeryny wiążą się ściśle z komplementarnymi kohezynami tworzącymi skafoldynę [28]. Oprócz domen kohezyny, skafoldyny zwykle zawierają też domeny CBM (od ang. *carbohydrate binding module*). Domeny CBM występują także w podjednostkach katalitycznych.

Okazuje się, że dzięki tak złożonej architekturze molekularnej, celulozom jest katalitycznie znacznie bardziej wydajny od jego składowych podjednostek enzymatycznych działających osobno [15,28]. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw kooperatywnego działania podjednostek celulozomu są niewyjaśnione. Naturalną jednak wydaje się hipoteza, iż wkład do synergii mogą mieć łączniki międzydomenowe.

Nieustrukturyzowane łączniki międzydomenowe w białkach celulozomalnych bardzo różnią się między sobą [29,30]. Niektóre z nich są krótkie, zbudowane z zaledwie kilku aminokwasów. Inne są bardzo długie – zawierają kilkadziesiąt lub nawet kilkaset reszt aminokwasowych. W wielu z nich obficie występuje prolina i treonina. Sekwencje aminokwasowe innych wydają się zupełnie losowe. Własności i funkcje tych nieustrukturyzowanych fragmentów łańcuchów polipeptydowych pozostają w dużym stopniu niezbadane. Aby wypełnić tę lukę poznawczą, przeprowadziłem szereg badań teoretycznych [H5,H6,H7] używając modeli

gruboziarnistych i pełnoatomowych.

W pracy [H5] szczegółowo zbadałem zespół konformacyjny ksylanazy Z, która jest wielodomenowym enzymem i jednocześnie jednym ze składników celulozomu *CipA* bakterii *C. thermocellum*. Ksylanaza Z zawiera cztery domeny – CE1 (od ang. *carbohydrate esterase family 1*), CBM6 (od ang. *carbohydrate binding module family 6*), dokeryna typu I oraz GH10 (od ang. *glycoside hydrolase family 10*) – które są połączone szeregowo trzema nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego (rys. 1 w pracy [H5]). Domena katalityczna CE1 bierze udział w rozrywaniu wiązań chemicznych pomiędzy łańcuchami hemicelulozy. Domena CBM6 wiąże się z węglowodanami – celulozą i innymi β -glukanami – co umożliwia zakotwiczenie ksynamazy Z do polisacharydów tworzących ścianki komórek roślinnych. Funkcją dokeryny jest ścisłe wiązanie do komplementarnej domeny kohezyny, co umożliwia przyłączenie ksylanazy Z do białka skafoldyny i zintegrowanie jej w ten sposób z celulozomem. Domena katalityczna GH10 rozkłada liniowe ksylany na ksylozę, przez co bierze udział w rozkładzie hemicelulozy. Trzy nieustrukturyzowane łączniki między domenami CE1, CBM6, dokeryną i GH10 utworzone są przez 12, 6 i 24 aminokwasy.

W roku 2012 opublikowane zostały wyniki doświadczeń rozproszeniowych SAXS na ksylanazie Z oraz na ksylanazie Z w kompleksie z kohezyną [31]. Trzy lata później [H5] wykonałem symulacje ksylanazy Z w ramach modelu KH i obliczyłem teoretyczne krzywe rozproszeniowe dla otrzymanych z symulacji modeli strukturalnych. Okazuje się, że krzywa rozproszeniowa uśredniona po zespole konformacyjnym próbkowanym w tych symulacjach jest zgodna z krzywą rozproszeniową otrzymaną z doświadczeń SAXS na ksylanazie Z w roztworze wodnym (rys. 7A w pracy [H5]). Zgodność ta waliduje wyniki otrzymane z symulacji. Używając modelu KH wykonałem także symulacje ksylanazy Z w kompleksie z kohezyną. Zespół konformacyjny wygenerowany w tych symulacjach daje krzywą rozproszeniową, która jest w pełni zgodna z literaturową krzywą rozproszeniową otrzymaną z doświadczeń SAXS na kompleksie ksylanaza-kohezyna w roztworze wodnym (rys. 3A w pracy [H5]). Zgodność ta waliduje wyniki symulacji.

Analiza wyników ww. symulacji, którą szczegółowo opisałem w pracy [H5], prowadzi do następujących wniosków. Po pierwsze, ksylanaza Z wykazuje dużą giętkość w tym sensie, że przybiera zróżnicowane konformacje – od zwartych do rozciągniętych – zarówno w obecności domeny kohezyny jak i pod jej nieobecność (rys. 3, 4 i 7 w pracy [H5]). Po drugie, bezpośrednie kontakty pomiędzy poszczególnymi domenami są nieliczne i nietrwałe (rys. 5 w pracy [H5]). Ksylanaza Z jest utrzymywana w całości jako jeden enzym głównie dzięki nieustrukturyzowanym fragmentom łańcucha polipeptydowego, które łączą sąsiednie domeny ze sobą. Po trzecie, rozkłady odległości pomiędzy końcami nieustrukturyzowanych odcinków łańcucha polipeptydowego można wyjaśnić efektem wykluczonej objętości (rys. 6 i 8 w pracy [H5]). Wyniki te wzięte razem dostarczają szczegółowego obrazu zespołu konformacyjnego ksylanazy Z w środowisku wodnym.

Praca [H5] wykazuje, że ksylanaza Z przybiera bardzo zróżnicowane konformacje, co spowodowane jest słabymi oddziaływaniami pomiędzy poszczególnymi jej domenami oraz giętkością nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych. Giętkość ksylanazy Z jest istotna z punktu widzenia funkcji biologicznej pełnionej przez ten enzym. Otóż, poszczególne domeny ksylanazy Z muszą równocześnie tworzyć kontakty z różnymi fragmentami polisacharydów budujących ścianki komórek roślinnych. Byłoby to niemożliwe do osiągnięcia, gdyby enzym ten przybierał jedną, stabilną konformację. Zatem giętkość i różnorodność konformacyjna ksylanazy Z ma znaczenie biologiczne.

Mój wkład w powstanie pracy [H5] był zasadniczy i polegał na (i) współudziale w

podjęciu tematu badań, (ii) zaproponowaniu metod badawczych, (iii) wykonaniu – w ramach modelu KH używając metody Monte Carlo – symulacji ksylanazy Z, (iv) obliczeniu krzywych rozproszeniowych dla struktur otrzymanych z symulacji, (v) porównaniu wyznaczonych krzywych rozproszeniowych z literaturowymi wynikami doświadczeń SAXS na ksylanazie Z w roztworze wodnym (dane doświadczalne udostępniła współautorka – prof. Mirjam Czjzek), (vi) analizie wyników symulacji, (vii) przygotowaniu tekstu artykułu i wszystkich rysunków oraz (viii) przygotowaniu odpowiedzi na recenzje i poprawieniu artykułu zgodnie ze wskazówkami recenzentów.

W pracy [H6] zbadalem między innymi konformacje minicelulozomu złożonego z endoglukanazy Cel8A i skafoldyny oznaczonej jako ScafT. Oba te białka pochodzą z bakterii *C. thermocellum*. Endoglukanaza Cel8A zbudowana jest z domeny katalitycznej i dokeryny (rys. 1 w pracy [H6]). Pomiedzy tymi domenami znajduje się nieustrukturyzowany odcinek łańcucha polipeptydowego. Skafoldyna ScafT złożona jest z domeny CBM i kohezyny (rys. 1 w pracy [H6]). Domeny te połączone są długim, nieustrukturyzowanym fragmentem łańcucha polipeptydowego. Kompleks białkowy Cel8A-ScafT utworzony jest na skutek ścisłego, niekowalencyjnego związania dokeryny z kohezyną.

Do teoretycznego opisu konformacji minicelulozomu Cel8A-ScafT użyłem modelu KH. Na podstawie wyników symulacji Monte Carlo z wymianą replik wyznaczyłem rozkłady odległości między końcami łączników międzydomenowych (rys. S1 w pracy [H6]). Wyznaczyłem także prawdopodobieństwa występowania kontaktów aminokwasowych pomiedzy domenami białek Cel8A i ScafT (tabela SI w pracy [H6]). Wyniki te pokazują, że bezpośrednie oddziaływania pomiedzy poszczególnymi domenami białkowymi słabe i nietrwałe, a minicelulozom Cel8A-ScafT wykazuje dużą różnorodność konformacyjną.

Analogiczne obliczenia wykonałem dla skafoldyny ScafT związanej poprzez kompleks kohezyna-dokeryna z czteropunktowym mutantem endoglukanazy Cel8A, który wykazuje w doświadczeniach zwiększoną stabilność termiczną i wzmożoną aktywność enzymatyczną [32]. Mutant ten oznaczony został jako Cel8A*. Różni się on od enzymu natywnego, Cel8A, czterema resztami aminokwasowymi (K276R, G283P, S329G i S375T) w obrębie domeny katalitycznej [32]. Ponieważ struktura atomowa domeny katalitycznej zmutowanego enzymu nie jest znana, przyjąłem na potrzeby symulacji gruboziarnistych, że jest ona analogiczna do struktury domeny katalitycznej enzymu natywnego, tzn. że wzajemne położenie atomów łańcucha głównego jest takie samo w natywnej (Cel8A) i zmutowanej (Cel8A*) domenie katalitycznej.

Symulacje kompleksów białkowych Cel8A-ScafT i Cel8A*-ScafT w ramach modelu KH dają takie same wyniki w granicach błędu statystycznego (rys. S1 i tabela SI w pracy [H6]). Innymi słowy, zespoły konformacyjne kompleksów białkowych Cel8A-ScafT i Cel8A*-ScafT są w ramach modelu KH praktycznie nierozróżnialne. Wynika to z założenia, że łańcuchy główne domen katalitycznych Cel8A i Cel8A* mają takie same struktury oraz z uproszczonego w modelu KH opisu domen białkowych poprzez bryły sztywne. W rzeczywistości domena katalityczna badanej endoglukanazy może jednak nietrywialnie zmienić strukturę pod wpływem mutacji czterech aminokwasów, czego model KH nie uwzględnia.

Aby zbadać różnice strukturalne między natywną (Cel8A) a zmutowaną (Cel8A*) domeną katalityczną badanej endoglukanazy, użyłem symulacji dynamiki molekularnej. Symulacje te wykonałem przy użyciu pakietu NAMD [33] w ramach modelu pełnoatomowego opartego na polu siłowym CHARMM [34,35] z poprawką CMAP [36] i modelem wody TIP3P [37]. Symulowanym układem była domena katalityczna badanej endoglukanazy (natywnej Cel8A lub zmutowanej Cel8A*) związana z cząsteczką substratu (oligosacharydu składającego się z pięciu reszt

glukozowych i będącego produktem hydrolizy celulozy). Szczegółowy opis metod symulacji pełnoatomowych podany jest w rozdziale 3.3 w pracy [H6].

Zasadniczym wynikiem symulacji modelu pełnoatomowego było opisanie nielokalnego wpływu mutacji na strukturę enzymu. Mimo tego, że poddane mutacji aminokwasy znajdują się z dala od miejsca aktywnego enzymu, to bezpośrednie kontakty między domeną katalityczną a cząsteczką substratu są inne w Cel8A niż w Cel8A* (rys. 7 w pracy [H6]). Wynik ten jest zgodny z obserwacjami doświadczonymi odnośnie tego, że Cel8A i Cel8A* wykazują inną aktywność enzymatyczną.

W pracy [H7] użyłem modelu KH do zbadania grupy około 25 peptydów, które wchodziły w skład nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych w celulozomach z trzech organizmów – *C. thermocellum*, *A. cellulolyticus* i *B. cellulosolvens*. Wielkościami wyznaczonymi w symulacjach Monte Carlo z wymianą replik były rozkłady odległości $P(d)$ między końcami badanych peptydów. Ponieważ otrzymane z symulacji rozkłady $P(d)$ są jednomodalne, mogą one być w przybliżeniu opisane przez wartość średnią i wariancję, która jest odwrotnie proporcjonalna do modułu sprężystości, κ , charakteryzującego dany peptyd. Dla grupy zbadanych peptydów, które wchodziły w skład łączników międzydomenowych w kilku różnych celulozomach, κ zależy głównie od liczby aminokwasów tworzących dany peptyd, n , natomiast sekwencja aminokwasowa peptydu jest czynnikiem drugorzędym. Wyniki symulacji pokazują, że κ maleje wraz z liczbą aminokwasów n , a ponadto $\kappa \sim 1/n^2$ dla $n > 10$.

W pracy [H7] wykonano także symulacje dynamiki molekularnej pełnoatomowych modeli dwunastu peptydów złożonych z $n = 5, 10$ i 15 aminokwasów. Te same peptydy zostały zbadane w ramach modelu KH. Wyniki otrzymane na podstawie modelu KH są zgodne z wynikami otrzymanymi na podstawie modelu pełnoatomowego (rys. 2 i 3 w pracy [H7]). Porównanie to waliduje model KH dla krótkich peptydów.

W wielu z łączników międzydomenowych wchodzących w skład celulozomów obficie występuje prolina. Jednak peptydy zbadane w pracy [H7] są znacznie mniej sztywne od peptydów złożonych z samych prolin. Wyniki symulacji poliprolin (tzn. peptydów złożonych z $n = 15, 20, 25, 30$ i 35 prolin) w ramach modelu KH są w pełni zgodne z dostępnymi w literaturze wynikami doświadczeń FRET na poliprolinach [38]. Porównanie to (rys. 2 w pracy [H7]) dodatkowo waliduje model KH dla peptydów.

W pracy [H7] zbadalem także wpływ sztywności łączników międzydomenowych na konformacje poszczególnych domen tworzących minicelulozom Cel8A-ScaffT. Badania te wykonałem w ramach innego modelu gruboziarnistego, który – w przeciwieństwie do modelu KH – uwzględnia dynamikę konformacji domen białkowych. Model ten, który nazywać będę poniżej modelem typu Go, opiera się na mapie kontaktów zidentyfikowanych w strukturze atomowej badanego białka. Został on wprowadzony przez Cieplaka i współpracowników [39,40]. Główne elementy tego modelu podsumowane są w trzech poniższych akapitach.

Konstrukcja modelu typu Go wymaga struktury atomowej badanego białka, na podstawie której wyznacza się kontakty natywne między parami aminokwasów. Kontakty natywne identyfikowane są na podstawie przekrywania się kul przypisanych atomom aminokwasów w zadanej strukturze białka. W procedurze tej atomy reprezentowane są przez kule o promieniach van der Waalsa powiększonych o pewien czynnik będący poprawką na oddziaływania pomiędzy atomami.

W ramach gruboziarnistego modelu typu Go, każdy aminokwas reprezentowany jest przez jedno „ziarno”, którego środek pokrywa się z położeniem atomu węgla α . Ziarna sąsiadujące ze sobą wzdłuż łańcucha polipeptydowego są wzajemnie związane poprzez potencjał harmoniczny

posiadający minimum w stanie natywnym, tzn. dla odległości około 0.38 nm dla każdej pary ziaren. Ponadto na kolejne czwórki ziaren nałożony jest potencjał harmoniczny na chiralność łańcucha. Potencjał ten posiada minimum w stanie natywnym i wprowadza lokalną sztywność łańcucha polipeptydowego. Pozostałe oddziaływania pomiędzy ziarnami dzielą się na dwie grupy – natywne i nienatywne. Oddziaływania dla kontaktów natywnych są opisywane przez potencjał Lennarda-Jonesa, natomiast oddziaływania nienatywne są czysto odpychające i krótkozasięgowe (zanikają do zera na odległości 0.4 nm między ziarnami). Parametr odległościowy potencjału Lennarda-Jonesa dla każdej z oddziałujących par ziaren dobrany jest w taki sposób, by położenie minimum potencjału odpowiadało natywnej odległości między ziarnami. Natomiast głębokość studni potencjału Lennarda-Jonesa jest taka sama dla wszystkich kontaktów natywnych.

W ramach rozważanego modelu, wszystkie ziarna obdarzone są tą samą masą, a ich ruch zadany jest równaniem Langevina, które wprowadza termostat oraz imituje dynamiczne efekty wpływu środowiska wodnego na ruchy białka. Opis ten nie uwzględnia jednak długozasięgowych oddziaływań hydrodynamicznych. Otóż, w ramach dynamiki Langevina, siła działająca na każde z ziaren jest sumą trzech składowych: (i) siły bezpośrednich oddziaływań między ziarnami, która zadana jest przez opisaną w poprzednim akapicie energię potencjalną układu, (ii) siły tłumienia, która jest proporcjonalna do prędkości ziarna oraz (iii) siły losowej reprezentującej szum termiczny. Siła ta ma zerową wartość średnią, a jej dyspersja dobrana jest w taki sposób, aby spełniony był związek fluktuacyjno-dyssypacyjny. Równania Langevina rozwiązywane są przy użyciu algorytmu *predictor-corrector* piątego rzędu. Więcej informacji na temat konstrukcji i metod numerycznego rozwiązania modelu typu Go znajduje się w pracach [H6]-[H9] oraz cytowanej w nich literaturze.

W pracy [H7] użyłem odpowiednio zmodyfikowanego modelu Go do zbadania wpływu obecności łączników międzydomenowych na konformacje poszczególnych domen tworzących minicelulozom Cel8A-ScafT. Jednym z głównych problemów koncepcyjnych związanych z tymi badaniami był fakt, że mapa kontaktów natywnych minicelulozomu Cel8A-ScafT jest nieokreślona, gdyż zarówno Cel8A jak i ScafT są białkami pozbawionymi struktury trzeciorzędowej, a kompleks Cel8A-ScafT jako całość nie przybiera jednej, natywnej struktury czwartorzędowej. Znane są natomiast struktury atomowe poszczególnych domen białek Cel8A i ScafT (tj. domeny katalitycznej endoglukanazy Cel8A, domeny CBM białka ScafT oraz kompleksu kohezyna-dokeryna). Dlatego w pracy [H7] przyjęto, że mapa kontaktów przypisana pełnemu układowi Cel8A-ScafT zawiera tylko wewnątrzdomenowe kontakty natywne. Wykluczone są z niej natomiast wszystkie możliwe kontakty pomiędzy domenami białkowymi oraz wszystkie kontakty formowane przez aminokwasy tworzące łączniki międzydomenowe.

W ramach tak zmodyfikowanego modelu Go wykonałem symulacje dynamiki molekularnej minicelulozomu Cel8A-ScafT. W symulacjach tych wyznaczyłem średnie długości kontaktów natywnych, tzn. uśrednione po czasie odległości pomiędzy tymi parami ziaren, które utożsamione są z kontaktami natywnymi. Wykonałem także analogiczne symulacje poszczególnych domen białkowych osobno, tzn. symulacje samej domeny katalitycznej, samej domeny CBM oraz samego kompleksu kohezyna-dokeryna. Wyniki tych symulacji wykazują, że pewne kontakty natywne mają inną długość średnią w odosobnionych domenach niż w kompleksie Cel8A-ScafT (rys. 6 w pracy [H7]). Kontakty te zlokalizowane są w odległości do około 1.5 nm od miejsc zaczepienia łączników międzydomenowych. Zaobserwowane różnice średnich długości kontaktów natywnych są małe (rzędu 0.1 Angstroma), jednak ilość tych kontaktów jest znacząca (ponad 40 kontaktów w całym kompleksie Cel8A-ScafT). Oznacza to, iż obecność nieustrukturyzowanych odcinków łańcucha polipeptydowego pomiędzy domenami wywiera wpływ na konformacje łączonych domen. Wyniki symulacji minicelulozomu Cel8A-ScafT o skróconych łącznikach międzydomenowych wykazują,

że skala tego efektu silnie zależy od długości łączników (rys. 6 i 7 w pracy [H7]). Obserwacje te zostały potwierdzone w pełnoatomowych symulacjach dynamiki molekularnej białka składającego się z dwóch kohezyn połączonych nieustrukturyzowanym odcinkiem łańcucha polipeptydowego (rys. 8 w pracy [H7]).

W pracy [H6] zbadałem wpływ sztywności łącznika międzydomenowego na konformacje domeny katalitycznej endoglukanazy Cel8A związanej poprzez cząsteczkę substratu z łańcuchem celulozy. W badaniach tych użyłem metod dynamiki molekularnej w ramach gruboziarnistego modelu typu Go. Efekt związania endoglukanazy zarówno z łańcuchem celulozy jak i ze skafoldyną uwzględniłem w symulacjach w następujący sposób. Do ziarna reprezentującego pierwszy monomer cząsteczki substratu przyłożony został potencjał harmoniczny imitujący połączenie substratu z łańcuchem celulozy. Do ziarna reprezentującego C-końcowy aminokwas domeny katalitycznej przyłożony został potencjał harmoniczny symulujący łącznik pomiędzy badaną domeną a resztą celulozomu. Sztywność tego łącznika, κ , zadana jest przez stałą sprężystości wprowadzonego potencjału harmonicznego.

Symulacje opisanego powyżej układu przeprowadziłem dla różnych wartości parametru κ . Wyniki tych symulacji wykazują, że średnie długości pewnych kontaktów natywnych zmieniają się monotonicznie wraz ze wzrostem wartości parametru κ (rys. 3 w pracy [H6]). Kontakty te zlokalizowane są w pobliżu obu miejsc przyłożenia potencjałów harmonicznych (rys. 2 w pracy [H6]). Co ciekawe, zmianom parametru κ towarzyszą także zmiany średnich długości pewnych kontaktów pomiędzy domeną katalityczną a cząsteczką substratu. Na podstawie wyników symulacji zidentyfikowałem bowiem grupę kontaktów pomiędzy miejscem aktywnym enzymu a cząsteczką substratu, których średnia długość zmienia się monotonicznie wraz ze zwiększaniem sztywności łącznika międzydomenowego. Wynik ten sugeruje, że sztywność nieustrukturyzowanego łącznika międzydomenowego może mieć wpływ na aktywność enzymatyczną badanej endoglukanazy.

Podsumowując, wyniki prac [H6] i [H7] pokazują, że nieustrukturyzowane odcinki łańcucha polipeptydowego pomiędzy domenami wywierają wpływ na konformacje łączonych domen. Skalę tego efektu determinuje sztywność łączników międzydomenowych, κ , która zależy głównie od liczby aminokwasów tworzących dany łącznik, n , a w mniejszym stopniu od sekwencji aminokwasowej łącznika, szczególnie dla $n > 10$. Zatem długości nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych mogą mieć wpływ na aktywność enzymatyczną celulozomów.

Mój wkład w powstanie pracy [H6] był zasadniczy i polegał na (i) zaproponowaniu większości badań, (ii) rozwinięciu głównych koncepcji teoretycznych, (iii) wykonaniu (w ramach gruboziarnistego modelu KH) symulacji Monte Carlo kompleksu Cel8A-ScafT, (iv) wykonaniu (w ramach zarówno modelu pełnoatomowego jak i modelu gruboziarnistego typu Go) symulacji dynamiki molekularnej domeny katalitycznej endoglukanazy Cel8A oraz termicznie stabilniejszego mutantu Cel8A*, (v) analizie i dyskusji wyników symulacji gruboziarnistych i pełnoatomowych, (vi) przygotowaniu zasadniczej części tekstu artykułu i wszystkich rysunków oraz (vii) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój wkład w powstanie pracy [H7] był kluczowy i polegał na (i) współdziałaniu w podjęciu tematu badań, (ii) zasadniczym udziale w wyborze metod badawczych, (iii) wykonaniu (w ramach gruboziarnistego modelu KH) symulacji Monte Carlo grupy około 25 peptydów tworzących nieustrukturyzowane łącznik międzydomenowe w białkach celulozomalnych, (iv) wykonaniu (w ramach gruboziarnistego modelu typu Go) symulacji dynamiki molekularnej kompleksu Cel8A-ScafT, (v) analizie i interpretacji wyników symulacji modeli gruboziarnistych, (vi) pomocy w analizie wyników pełnoatomowych symulacji dynamiki molekularnej, które wykonał dr Pierre-Andre Cazade, (vii) zasadniczym udziale w pisaniu pracy, (viii) wykonaniu większości rysunków,

(ix) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu według ich wskazań oraz (x) kierowaniu projektem naukowym wspieranym przez Narodowe Centrum Nauki i obejmującym badania przedstawione w pracy.

5.3.3 Stabilność mechaniczna i termiczna białek wielodomenowych (publikacje H8, H9)

Białka adhezyjne to z reguły białka wielodomenowe. Ich domeny transbłonowe wbudowane są w błonę komórkową, a domeny zewnątrzkomórkowe wiążą się z białkami w błonie innej komórki [2]. Kompleksy białek adhezyjnych stanowią więc połączenia między przylegającymi komórkami. Aby białka adhezyjne spełniały swoje funkcje biologiczne, poszczególne ich domeny muszą wykazywać odpowiednią stabilność mechaniczną, tzn. zachowywać strukturę natywną, gdy na przylegające komórki działają siły zewnętrzne. Praca [H8] dotyczy stabilności mechanicznej kompleksu białek adhezyjnych CD48-2B4. Kompleks ten reguluje aktywność komórek NK i w ten sposób zaangażowany jest w odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom zainfekowanym przez wirusy oraz komórkom rakowym.

W pracy [H8] zbadałem reakcję międzykomórkowej części kompleksu białkowego CD48-2B4 (rys. 1 w pracy [H8]) na rozciąganie mikroskopem sił atomowych ze stałą prędkością (rys. 2 w pracy [H8]). W badaniach tych użyłem metod dynamiki molekularnej w ramach gruboziarnistego modelu typu Go. Najważniejsze wyniki tych symulacji są następujące. Po pierwsze, proces dysocjacji kompleksu białkowego CD48-2B4 silnie zależy od kierunku przyłożonych sił i może zachodzić na różne sposoby (rys. 3-5 w pracy [H8]). W niektórych przypadkach białka CD48 i 2B4 rozdzielają się bez zmian strukturalnych (rys. 3 w pracy [H8]); w innych – białko CD48 rozwija się częściowo przed odłączeniem od 2B4 (rys. 4 i 5 w pracy [H8]). Po drugie, kontakty natywne pomiędzy białkami CD48 a 2B4 można rozdzielić na trzy rozłączne grupy, z których każda działa jak jednostka przeciwdziałająca rozrywaniu kompleksu (rys. 1 pracy [H8]). Po trzecie, charakterystyczne siły mechanostabilności kompleksu CD48-2B4 (tabela na rys. 10 w pracy [H8]) nie koniecznie muszą odpowiadać siłom rozciągającym, które prowadzą do dysocjacji tego kompleksu, ponieważ wcześniejsze rozwijanie poszczególnych białek może wymagać sił ścinających o większych wartościach (rys. 7 w pracy [H8]).

Mój wkład w powstanie pracy [H8] był kluczowy i polegał na (i) zaproponowaniu badań kompleksu białkowego CD48-2B4, (ii) wykonaniu symulacji dynamiki molekularnej – w ramach gruboziarnistego modelu typu Go – procesu rozciągania kompleksu CD48-2B4 w geometrii mikroskopu sił atomowych, (iii) zasadniczym udziale w analizie i interpretacji wyników symulacji, (iv) sprawowaniu bezpośredniej opieki nad studentem (Łukaszem Mioduszeuskim) pracującym nad projektem w ramach praktyk studenckich, (v) przygotowaniu tekstu artykułu i wszystkich rysunków, (vi) przygotowaniu odpowiedzi na recenzje i poprawie artykułu według wskazań recenzentów oraz (vii) kierowaniu projektem naukowym wspieranym przez Narodowe Centrum Nauki i obejmującym badania przedstawione w pracy.

W pracy [H9] zbadałem własności termodynamiczne i kinetyczne syntazy cytrynianowej z różnych organizmów (ciepłolubnych, mezofilnych i zimnolubnych) i w różnych konformacjach (otwartych i zamkniętych). W badaniach tych użyłem metod dynamiki molekularnej w ramach gruboziarnistego modelu typu Go. Model ten został zmodyfikowany na potrzeby badanego w pracy [H9] enzymu – potencjał na chiralność wzdłuż łańcuchów polipeptydowych został zastąpiony przez potencjały na kąty płaskie i dwuścienne. Potencjały te przyjmują wartości minimalne w stanie natywnym badanych białek. Modyfikacja energii potencjalnej łańcuchów polipeptydowych w modelu typu Go [H9] została wprowadzona w taki sposób, by symulowane fluktuacje położeniowe aminokwasów (RMSF od ang. *root-mean-square fluctuations*) były zgodne z czynnikami

temperaturowymi wyznaczonymi metodami rentgenografii strukturalnej (rys. 4 w pracy [H9]).

Syntaza cytrynianowa jest enzymem obecnym w niemal wszystkich organizmach żywych [41]. Jest białkiem homodimerowym (co zilustrowałem na rys. 1 w pracy [H9]). Mimo tego, że struktury natywne syntazy cytrynianowej z różnych organizmów są niemal identyczne, model gruboziarnisty typu Go rozróżnia własności tych białek zgodnie z obserwacjami doświadczanymi. Okazuje się bowiem, że białka z organizmów ciepłolubnych wykazują w tym modelu większą stabilność termiczną od ich homologów z organizmów mezofilnych i zimnolubnych. Zaobserwowałem to zarówno w zależności prawdopodobieństwa stanu natywnego od temperatury (rys. 2 i 3 w pracy [H9]) jak i w kinetyce denaturacji termicznej (rys. 8 i 9 w pracy [H9]). Co ciekawe, poziom stabilności termicznej okazuje się być skorelowany ze średnią liczbą koordynacyjną kontaktów natywnych oraz ze stopniem zwartości strukturalnej białka. Rozkład fluktuacji położeniowych aminokwasów jest odmienny w konformacjach otwartej i zamkniętej, co dotyczy głównie miejsca aktywnego (rys. 4-6 w pracy [H9]). Ruchy kolektywne aminokwasów tworzących miejsce aktywne są zdecydowanie różne w konformacjach otwartej i zamkniętej (rys. 7 i rys. S1 w pracy [H9]). Podsumowując, otrzymane wyniki pokazują, że precyzyjne umiejscowienie kontaktów między aminokwasami w strukturze natywnej zdaje się być kluczowe dla wyjaśnienia różnic i podobieństw we własnościach termodynamicznych, w lokalnej elastyczności oraz w ruchach kolektywnych miejsca aktywnego pomiędzy różnymi formami syntazy cytrynianowej.

Mój wkład w powstanie pracy [H9] był bardzo duży i polegał na (i) współudziale w sformułowaniu zagadnienia i celów badawczych, (ii) wykonaniu symulacji dynamiki molekularnej – w ramach gruboziarnistego modelu typu Go – syntaz cytrynianowych z kilku różnych organizmów, (iii) analizie i opracowaniu wyników symulacji, (iv) rozwinięciu – w ścisłej współpracy z prof. Cieplakiem – koncepcji teoretycznych umożliwiających interpretację wyników symulacji, (v) przygotowaniu obszernych części tekstu artykułu i wszystkich rysunków, (vi) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu według zaleceń recenzentów oraz (vii) kierowaniu projektem naukowym wspieranym przez Narodowe Centrum Nauki i obejmującym badania przedstawione w pracy.

Wyniki badań nad mechanostabilnością kompleksów białek adhezyjnych [H8] przyczyniają się do lepszego zrozumienia tego, w jaki sposób komórki biologiczne mogą znosić ogromne – w skali molekularnej – naprężenia mechaniczne. Będą także przydatne do właściwej interpretacji wyników przyszłych doświadczeń AFM na kompleksach białkowych. Wynik badań nad syntazą cytrynianową [H9] mają wkład do lepszego zrozumienia czynników determinujących stopień stabilności termicznej białek wielodomenowych. Mogą być zatem wykorzystane w przyszłości do przewidywania mutacji, które prowadziłyby do zwiększonej stabilności termicznej badanych białek, a w szczególności enzymów.

5.3.4. Podsumowanie znaczenia prac H1-H9

Prace [H1-H4] stanowią wkład do badań zależności strukturalno-funkcjonalnych białek ESCRT. Metoda EROS [H1] i jej modyfikacje [H2,H3], które wprowadziłem i zaimplementowałem w kontekście badań białek ESCRT, stanowią istotny wkład do rozwoju tzw. hybrydowych metod biologii strukturalnej. Wyniki prac [H5-H7] mają wkład do zrozumienia własności fizycznych i funkcji biologicznych nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych w celulozomach. Prace [H8,H9] wpisują się w nurt badań nad stabilnością termiczną i mechaniczną białek wielodomenowych i kompleksów białkowych.

W pracach [H1-H9] użyłem wielu różnych metod obliczeniowych, które mają swoje podstawy w fizyce statystycznej, a mianowicie metod dynamiki molekularnej (zarówno w ramach

modeli gruboziarnistych typu Go [H6-H9] jak i modeli pełnoatomowych [H6,H7]), metod Monte Carlo [H1-H7] (w tym także symulacji Monte Carlo z wymianą replik [H1,H2,H3,H5,H6]), metody entropii maksymalnej [H1] oraz klasteryzacji [H1-H3]. Ponadto w pracach [H1,H2,H3,H5] użyłem teorii rozpraszania promieniowania rentgenowskiego, a w pracy [H4] zastosowałem teorię przejść fazowych w płynach klasycznych oraz teorię elastyczności błon. Konieczność zastosowania różnorodnych metod obliczeniowych oraz teorii fizycznych wynika ze złożoności badanych problemów związanych z dynamiką konformacyjną białek wielodomenowych.

Moje prace dotyczące konformacji [H1,H2,H3] i mechanizmów działania [H3,H4] białek ESCRT zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych poświęconych biologii strukturalnej (dwie publikacje [H1,H3] w *Structure*) i obliczeniowej (publikacja [H4] w *PLoS Computational Biology*) oraz naukom przyrodniczym w ogólności (publikacja [H2] w *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*). O znaczeniu prac [H1-H4] może świadczyć to, zostały one zacytowane łącznie ponad 200 razy wg bazy *Web of Science*.

Moje badania łączników międzypoddomenowych w białkach celulozomalnych [H5,H6,H7] zostały opublikowane w czasopismach naukowych poświęconych biologii strukturalnej (publikacja [H5] w *Journal of Structural Biology*), biofizyce i biochemii molekularnej (publikacja [H6] w *Molecular BioSystems*) oraz chemii fizycznej i fizyce chemicznej (publikacja [H7] w *Physical Chemistry Chemical Physics*). Natomiast prace dotyczące stabilności białek wielodomenowych [H8,H9] zostały opublikowane w czasopismach poświęconych badaniom białek (publikacja [H8] w *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*) i fizyce chemicznej (publikacja [H9] w *Journal of Chemical Physics*). Ta różnorodność czasopism publikujących wyniki moich prac świadczy o interdyscyplinarnym charakterze moich badań, które leżą na pograniczu fizyki, chemii i biologii.

5.3.5 Piśmiennictwo

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition). New York: Garland Science.
- [2] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th edition). New York: W. H. Freeman.
- [3] Kruse, C. A., Ring, M. A., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., et al. (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 504 (7478), 101.
- [4] White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., et al. (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*, 490 (7421), 508.
- [5] Plevka, P., Perera, R., Cardosa, J., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. (2012). Crystal structure of human enterovirus 71. *Science*, 336 (6086), 1274-1274.
- [6] Balbas, M. D., Evans, M. J., Hosfield, D. J., Wongvipat, J., Arora, V. K., Watson, P. A., et al. (2013). Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *Elife*, 2, e00499.
- [7] Winter, A., Higuero, A. P., Marsh, M., Sigurdardottir, A., Pitt, W. R., Blundell, T. L. (2012). Biophysical and computational fragment-based approaches to targeting protein-protein interactions: applications in structure-guided drug discovery. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 45 (4), 383-426.
- [8] Sali, A., Berman, H. M., Schwede, T., Trewhella, J., Kleywegt, G., Burley, S. K., et al. (2015). Outcome of the first wwPDB hybrid/integrative methods task force workshop. *Structure*, 23 (7), 1156-1167.
- [9] Dyson, H. J., Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6 (3), 197.
- [10] Oldfield, C. J., Dunker, A. K. (2014). Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 553-584.
- [11] Hurley, J. H., Emr, S. D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35, 277-298.
- [12] Saksena, S., Sun, J., Chu, T., Emr, S. D. (2007). ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (12), 561-573.
- [13] Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, 20 (1), 4-11.
- [14] Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E. A. (1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology*, 7, 275-281.
- [15] Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004). The cellulosomes: multienzyme machines for

- degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 58, 521-554.
- [16] Mykytczuk, N. C., Foote, S. J., Omelon, C. R., Southam, G., Greer, C. W., Whyte, L. G. (2013). Bacterial growth at -15 C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *The ISME Journal*, 7 (6), 1211.
- [17] Kashefi, K., Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301 (5635), 934-934.
- [18] Williams, R. L., Urbe, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 355-368.
- [19] Hurley, J. H., Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11 (8), 556.
- [20] Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458 (7235), 172.
- [21] Wollert, T., Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464 (7290), 864.
- [22] Shim, S., Kimpler, L. A., Hanson, P. I. (2007). Structure-Function Analysis of Four Core ESCRT-III Proteins Reveals Common Regulatory Role for Extreme C-Terminal Domain. *Traffic*, 8 (8), 1068-1079.
- [23] Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Goettlinger, H. G., Svergun, D. I., et al. (2008). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *Journal of Molecular Biology*, 378 (4), 818-827.
- [24] Franke, D., Svergun, D. I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 42 (2), 342-346.
- [25] Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., et al. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 45 (2), 342-350.
- [26] Kim, Y. C., Hummer, G. (2008). Coarse-grained models for simulations of multiprotein complexes: application to ubiquitin binding. *Journal of Molecular Biology*, 375 (5), 1416-1433.
- [27] Boura, E., Ivanov, V., Carlson, L. A., Mizuuchi, K., Hurley, J. H. (2012). Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (33), 28144-28151.
- [28] Artzi, L., Bayer, E. A., Morais, S. (2017). Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nature Reviews. Microbiology*, 15, 83-95.
- [29] Bayer, E. A., Shimon, L. J., Shoham, Y., Lamed, R. (1998). Cellulosomes - Structure and Ultrastructure. *Journal of Structural Biology*, 124, 221-234.
- [30] Bayer, E. A., Smith, S. P., Noach, I., Alber, O., Adams, J. J., Lamed, R., et al. (2009). *Can We Crystallize a Cellulosome?* Tokyo: Ito Print Publishing Division.
- [31] Czjzek, M., Fierobe, H. P., Receveur-Brechot, V. (2012). Small angle X-ray scattering and crystallography: A winning combination for exploring the multimodular organization of cellulolytic macromolecular complexes. *Methods in Enzymology*, 510, 183-210.
- [32] Anbar, M., Gul, O., Lamed, R., Sezerman, U. O., Bayer, E. A. (2012). Improved thermostability of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel8A by using consensus-guided mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (9), 3458-3464.
- [33] Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., et al. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1781-1802.
- [34] MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., et al. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 3586-3616.
- [35] Guvench, O., Mallajosyula, S. S., Raman, E. P., Hatcher, E., Vanommeslaeghe, K., Foster, T. J., et al. (2011). CHARMM additive all-atom force field for carbohydrates derivatives and its utility in polysaccharides and carbohydrate-protein modeling. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7, 3162-3180.
- [36] MacKerell, A. D., Feig, M., Brooks, C. L. (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 1400-1415.
- [37] Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79, 926-935.
- [38] Schuler, B., Lipman, E. A., Steinbach, P. J., Kumke, M., Eaton, W. A. (2005). Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (8), 2754-2759.
- [39] Hoang, T. X., Cieplak, M. (2000). Molecular dynamics of folding of secondary structures in Go-like models of proteins. *Journal of Chemical Physics*, 112, 6851-6862.
- [40] Sikora, M., Sulkowska, J. I., Cieplak, M. (2009). Mechanical strength of 17134 model proteins and cysteine spliknots. *PLoS Computational Biology*, 5, e1000547.
- [41] Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th edition). New York: W.H. Freeman.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1 Omówienie badań naukowych nie stanowiących wkładu do habilitacji

6.1.1 Badania naukowe prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora nauk fizycznych

Podczas studiów magisterskich i doktoranckich na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego specjalizowałem się w fizyce statystycznej i fizyce materii miękkiej. Moja praca magisterska dotyczyła zjawiska zwilżania. Rozważanym zagadnieniem był wpływ skończonego rozmiaru układu na zwilżanie ścian układu. Używając metody macierzy przejścia uzyskałem – w ramach równowagowej mechaniki statystycznej – ścisłe rozwiązanie modelu jednowymiarowej powierzchni (linii) rozdziału faz zawartej pomiędzy dwiema równoległymi ścianami w przestrzeni dwuwymiarowej [D1]. Na początku studiów doktoranckich zmodyfikowałem ww. model na przypadek jednowymiarowej błony (linii) oddziałującej z dwiema równoległymi powierzchniami poprzez cząsteczki adhezyjne [D2].

Podczas studiów doktoranckich odbyłem trzy półroczne praktyki na Wydziale Teorii Instytutu Koloidów i Międzypowierzchni im. Maxa Plancka (Niemcy, semestry letnie w latach 2003, 2004 i 2005). Moimi opiekunami naukowymi byli dr hab. Thomas Weikl i prof. Reinhard Lipowsky, którzy wprowadzili mnie w tematykę badań nad adhezją błon lipidowych, lipidowo-białkowych i komórkowych.

Adhezja błon komórkowych jest wynikiem niekowalencyjnego wiązania cząsteczek zawartych w błonie jednej komórki (tzw. receptorów) ze swoistymi cząsteczkami zawartymi w przeciwległej błonie innej komórki (tzw. ligandami). Adhezja błon umożliwia oddziaływania między komórkami, co jest istotne w wielu procesach biologicznych – przykładowo – podczas tworzenia tkanek oraz w procesie odpowiedzi odpornościowej organizmów wielokomórkowych.

Moja rozprawa doktorska dotyczyła zastosowania teorii procesów stochastycznych do modelowania adhezji błon komórkowych poza równowagą termodynamiczną. Adhezja błon komórkowych zwykle opisywana jest teoretycznie w ramach równowagowej fizyki statystycznej. Błony komórkowe stanowią jednak układy dynamiczne, które utrzymywane są poza stanem równowagi termodynamicznej. W szczególności, pewne receptory adhezyjne (np. integryny) sprzężone są z procesami lub reakcjami – takimi jak hydroliza ATP – które utrzymywane są przez żywe komórki poza równowagą chemiczną. Tego typu sprzężenie układu oddziałujących błon z otoczeniem wyklucza możliwość ich opisu w ramach równowagowej fizyki statystycznej. To właśnie konieczność opisu stanów nierównowagowych stanowiła o oryginalności tematyki mojej rozprawy. Przedmiotem badań były stany stacjonarne ustalające się w układzie oddziałujących błon w wyniku aktywowanych zmian konformacyjnych cząsteczek adhezyjnych [D3,D4,D5]. Analizę tych stanów przeprowadziłem opisując dynamikę oddziałujących błon w ramach teorii procesów stochastycznych.

W czasie studiów doktoranckich współpracowałem także z dr. Mesfinem Asfawem (wówczas doktorantem na Wydziale Teorii Instytutu Koloidów i Międzypowierzchni im. Maxa Plancka) nad zastosowaniem metod równowagowej mechaniki statystycznej do teoretycznego opisu przylegania (adhezji) błon lipidowo-białkowych [D6]. Badanymi zjawiskami były, po pierwsze, przemiana rozłączenia (ang. *unbinding transition*) przylegających błon oraz, po drugie, rozdzielenie faz w układzie przylegających błon.

Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora nauk fizycznych lub publikacje związane bezpośrednio z moją rozprawą doktorską:

- D1. Bartosz Różycki, Marek Napiórkowski. *The RSOS model for a slit with different walls*. J. Phys. A: Math. Gen. **36**: 4551-4559 (2003). *Impact Factor* w 2003 r.: 1,357.
- D2. Bartosz Różycki, Marek Napiórkowski. *Phase transitions in multicomponent string model*. Europhys. Lett. **66**: 35-40 (2004). *Impact Factor* w 2004 r.: 2,120.
- D3. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Adhesion of membranes with active stickers*. Phys. Rev. Lett. **96**: 048101 (2006). *Impact Factor* w 2006 r.: 7,072.
- D4. Bartosz Różycki, Thomas R. Weikl, Reinhard Lipowsky. *Adhesion of membranes via switchable molecules*. Phys. Rev. E **73**: 061908 (2006). *Impact Factor* w 2006 r.: 2,438.
- D5. Bartosz Różycki, Thomas R. Weikl, Reinhard Lipowsky. *Stochastic resonance for adhesion of membranes with active stickers*. Eur. Phys. J. E **22**: 97-106 (2007). *Impact Factor* w 2007 r.: 2,025.
- D6. Mesfin Asfaw, Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Membrane adhesion via competing receptor/ligand bonds*. Europhys. Lett. **76**: 703-706 (2006). *Impact Factor* w 2006 r.: 2,229.

Zwięzły opis mojego wkładu do ww. prac:

- Mój wkład w powstanie pracy [D1] polegał na (i) sformułowaniu problemu teoretycznego i wskazaniu sposobu jego rozwiązania w oparciu o metodę macierzy przejścia, (ii) wykonaniu wszystkich obliczeń, (iii) analizie i dyskusji wyników obliczeń, (iv) opisanie użytej metody i otrzymanych wyników, (v) sporządzeniu wykresów i rysunków oraz (v) współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje i poprawie artykułu według sugestii recenzentów.
- Mój wkład w powstanie pracy [D2] polegał na (i) zaproponowaniu tematu badań, (ii) sformułowaniu problemu teoretycznego i wskazaniu jego rozwiązania, (iii) wykonaniu wszystkich obliczeń, (iv) analizie i dyskusji wyników obliczeń, (v) przygotowaniu tekstu artykułu i wszystkich rysunków oraz (vi) współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzje i poprawie artykułu według wskazań recenzentów.
- Mój wkład w powstanie pracy [D3] polegał na (i) współudziale w sformułowaniu zagadnienia badawczego, (ii) wykonaniu symulacji DMC (od ang. *Dynamic Monte Carlo*) sieciowego modelu błon oddziałujących poprzez aktywne cząsteczki adhezyjne, (iii) wykonaniu obliczeń analitycznych, które umożliwiły interpretację zaobserwowanego w symulacjach rezonansu stochastycznego, (iv) zbadaniu przemiany oddzielenia błon (ang. *unbinding transition*) w zależności od szybkości przełączania aktywnych cząsteczek adhezyjnych, (v) analizie i dyskusji wyników oraz (vi) współudziale w pisaniu artykułu i tworzeniu rysunków.
- Mój wkład w powstanie tej pracy [D4] polegał na (i) współudziale w sformułowaniu zagadnienia badawczego, (ii) wykonaniu symulacji typu DMC (od ang. *Dynamic Monte Carlo*) sieciowego modelu błon związanych przez aktywne cząsteczki pobudzone przez bodziec zewnętrzny, (iii) wykonaniu obliczeń analitycznych wykazujących w jaki sposób dynamika DMC zbiega do dynamiki Langevina, (iv) analitycznym rozwiązaniu równań Langevina w przybliżeniu harmonicznym i porównaniu tego rozwiązania z wynikami symulacji DMC, (v) analizie i dyskusji wyników symulacji oraz (vi) przygotowaniu zasadniczych części tekstu artykułu i wszystkich rysunków.
- Mój wkład w powstanie pracy [D5] polegał na (i) współudziale w sformułowaniu zagadnienia badawczego, (ii) wykonaniu numerycznych symulacji sieciowego modelu błon oddziałujących przez aktywne cząsteczki adhezyjne, (iii) wyprowadzeniu równania Fokkera-Plancka równoważnego stochastycznej dynamice ww. modelu błon, (iv) numerycznym rozwiązaniu ww.

równania Fokkera-Plancka w przybliżeniu pola średniego i porównaniu tego rozwiązania z wynikami symulacji modelu sieciowego, (v) analizie i dyskusji wyników oraz (vi) przygotowaniu zasadniczych części tekstu artykułu i wszystkich rysunków.

- Mój wkład w powstanie pracy [D6] polegał na (i) dyskusjach ze współautorami na temat przejść fazowych w przylegających błonach lipidowo-białkowych, (ii) wykonaniu – wspólnie z dr. Mesfinem Asfawem – obliczeń analitycznych oraz (iii) współudziale w wyprowadzeniu równań (10) i (12), które są głównymi wynikami teoretycznymi pracy [D6].

6.1.2 Badania naukowe prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora nauk fizycznych

6.1.2.A Badania adhezji błon lipidowych i wieloskładnikowych

Podczas mojego stażu podoktorskiego na Wydziale Teorii Instytutu Koloidów i Międzypowierzchni im. Maxa Plancka (Poczdám, Niemcy), który odbyłem w latach 2006-2008, prowadziłem badania dotyczące adhezji błon [A1-A7] oraz rozdzielania faz w błonach wieloskładnikowych [A1,A6,A7]. W badanych tych używałem zróżnicowanych metod klasycznej mechaniki statystycznej – w tym symulacji Monte Carlo – oraz teorii elastyczności błon. Moimi mentorami naukowymi byli dr hab. Thomas Weikl i prof. Reinhard Lipowsky. Prace na temat adhezji błon lipidowo-białkowych [A4-A7] były do pewnego stopnia kontynuacją i rozszerzeniem badań, które prowadziłem w czasie studiów doktoranckich we współpracy z dr. Mesfinem Asfawem [D6]. Natomiast prace [A1-A3] nie były związane z badaniami, które prowadziłem podczas doktoratu. Praca [A1] dotyczy bowiem zjawisk zachodzących w wieloskładnikowej błonie lipidowej przylegającej do pofałdowanej powierzchni podłoża. Prace [A2,A3] dotyczą natomiast adhezji błon na skutek adsorpcji nanocząstek z otoczenia.

Prace stanowiące mój wkład w badania nad adhezją błon lipidowych i lipidowo-białkowych oraz rozdzielaniem faz w układach przylegających błon:

- A1. Bartosz Różycki, Thomas R. Weikl, Reinhard Lipowsky. *Stable patterns of membrane domains at corrugated substrates*. Phys. Rev. Lett. **100**: 098103 (2008). *Impact Factor* w 2008 r.: 7,180.
- A2. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Effective surface interactions mediated by adhesive particles*. EPL **84**: 26004 (2008). *Impact Factor* w 2008 r.: 2,203.
- A3. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Adhesion of surfaces via particle adsorption: exact results for a lattice of fluid columns*. J. Stat. Mech. P11006 (2009). *Impact Factor* w 2009 r.: 2,670.
- A4. Heinrich Krobath, Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Binding cooperativity of membrane adhesion receptors*. Soft Matter **5**: 3354-3361 (2009). *Impact Factor* w 2009 r.: 4,869.
- A5. Thomas R. Weikl, Mesfin Asfaw, Heinrich Krobath, Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky. *Adhesion of membranes via receptor-ligand complexes: Domain formation, binding cooperativity, and active processes*. Soft Matter **5**: 3213-3224 (2009). *Impact Factor* w 2009 r.: 4,869.
- A6. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Segregation of receptor-ligand complexes in cell adhesion zones: phase diagrams and the role of thermal membrane roughness*. New J. Phys. **12**: 095003 (2010). *Impact Factor* w 2010 r.: 3,849.
- A7. Heinrich Krobath, Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, Thomas R. Weikl. *Line tension and stability of domains in cell-adhesion zones mediated by long and short receptor-ligand complexes*. PLoS ONE **6**: e23284 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 4,092.

Zwięzły opis ww. publikacji:

- Praca [A1] dotyczy zjawiska tworzenia domen fazy płynnej uporządkowanej (Lo od ang. *liquid ordered*) i płynnej nieuporządkowanej (Ld od ang. *liquid disordered*) w wieloskładnikowej błonie lipidowej przylegającej do pofałdowanej powierzchni. Zjawisko to zostało odkryte w doświadczeniach mikroskopii fluorescencyjnej, w których zaobserwowano, że w pewnych warunkach kształt domen faz Lo i Ld odzwierciedla topografię podłoża, do którego przylega błona. Praca [A1] wyjaśnia i ilościowo opisuje to zjawisko na gruncie termodynamiki i teorii elastyczności błon lipidowych. Wprowadzona teoria uwzględnia takie parametry jak napięcie liniowe między fazą Lo i Ld, różnicę modułów sztywności zginania błony w fazie Lo i Ld, energię przylegania błony do podłoża oraz kształt pofałdowanego podłoża. Zasadniczym wynikiem pracy [A1] są diagramy fazowe wskazujące zakresy parametrów układu, w których występują stabilne, rozłączne domeny fazy Lo i Ld w pofałdowanej błonie lipidowej.

Mój wkład w powstanie tej pracy był kluczowy i polegał na (i) udziale w rozwinięciu teorii wyjaśniającej wyniki doświadczeń mikroskopii fluorescencyjnej, (ii) wykonaniu wszystkich obliczeń analitycznych i symulacji numerycznych, (iii) sporządzeniu diagramów fazowych oraz (iv) przygotowaniu zasadniczych części tekstu artykułu i wszystkich rysunków.

- Praca [A2] dotyczy adhezji błon na skutek adsorpcji nanocząstek z otoczenia. Rozważany układ składa się z dwóch przeciwległych błon oraz nanocząstek dyfundujących w roztworze wodnym stanowiącym otoczenie błon. Nanocząstki wiążą się z błonami niekowalencyjne, co prowadzi do efektywnego oddziaływania pomiędzy błonami. W pracy [A2] wprowadzony został model sieciowy opisujący oddziaływania nanocząstek z powierzchniami przeciwległych błon. Model ten rozwiązałem analitycznie na gruncie klasycznej mechaniki statystycznej w granicy małych stężeń nanocząstek. Głównym wynikiem pracy jest zależność energii efektywnego oddziaływania błon od stężenia nanocząstek w roztworze. Zależność ta jest niemonotoniczna. Maksymalna energia efektywnego oddziaływania błon występuje dla stężeń, dla których pokrycie pojedynczej, odosobnionej błony przez nanocząstki stanowi około połowę jej powierzchni. Zależy ona poprzez czynnik Boltzmanna od energii wiązania nanocząstki do powierzchni błony.

Mój wkład w powstanie tej pracy był znaczący i polegał na (i) współudziale w sformułowaniu teoretycznego modelu rozważanego układu, (ii) wykonaniu wszystkich przedstawionych w pracy obliczeń, (iii) analizie i interpretacji wyników obliczeń oraz (iv) współudziale w pisaniu artykułu i wykonaniu rysunków 2-4.

- Praca [A3] jest kontynuacją pracy [A2]. Zawiera ona ściśle rozwiązanie modelu sieciowego wprowadzonego w pracy [A2]. Rozwiązanie to sprowadza się w granicy małych stężeń nanocząstek do wyniku pracy [A2]. Mój wkład w powstanie tej pracy był wiodący i polegał na (i) rozwinięciu badań teoretycznych nad wpływem adsorpcji nanocząstek na efektywne oddziaływania między błonami, (ii) wykonaniu i przedstawieniu wszystkich obliczeń, (iii) analizie i dyskusji wyników obliczeń, (iv) napisaniu zasadniczych części tekstu artykułu i przygotowaniu wszystkich wykresów (tzn. rysunków 2-6) oraz (v) aktywnym współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu zgodnie z recenzjami.
- Praca [A4] dotyczy wpływu fluktuacji termicznych na wiązanie błonowych cząsteczek adhezyjnych. Rozważany układ składa się z dwóch przeciwległych błon lipidowo-białkowych. Jedna z nich zawiera cząsteczki adhezyjne (receptory). Druga z błon zawiera komplementarne cząsteczki adhezyjne (ligandy), które wiążą się niekowalencyjnie z receptorami w przeciwległej

błonie, co prowadzi do adhezji błon. Cząsteczki receptorów i ligandów dyfundują w obrębie błon, w których są zakotwiczone. Kształty błon podlegają zmianom na skutek wzbudzeń termicznych. Wiązanie cząsteczki receptora z ligandem zależy nie tylko od energii ich bezpośredniego oddziaływania lecz także od lokalnej odległości między błonami, a więc także od położenia utworzonych już kompleksów receptor-ligand. Jest to źródłem kooperatywnego wiązania cząsteczek receptorów z ligandami w przeciwległej błonie.

Rozważany układ osadzony jest w ramach modelu sieciowego. Energia deformacji błon opisywana jest poprzez Hamiltonian Helfricha. Energia oddziaływania receptorów z ligandami zależy od lokalnej odległości między błonami. Układ jako całość opisywany jest w zespole wielkim kanonicznym, co umożliwia wycalkowanie z sumy statystycznej stopni swobody związanych z położeniem receptorów i ligandów oraz wprowadzenie następnie efektywnego potencjału oddziaływania jednorodnych błon.

Wprowadzony model sieciowy został rozwiązany na gruncie mechaniki statystycznej stanów równowagi. Wykonane obliczenia analityczne zostały poparte i uzupełnione przez symulacje Monte Carlo. Głównym wynikiem pracy jest równanie (3), które ilościowo opisuje kooperatywność wiązania receptorów adhezyjnych z ligandami.

Mój wkład w powstanie tej pracy był duży i polegał na (i) zasadniczym współdziałaniu w rozwinięciu teorii kooperatywnego wiązania cząsteczek adhezyjnych, (ii) wykonaniu części obliczeń analitycznych i wyprowadzeniu równania (3), które jest zasadniczym wynikiem pracy, (iii) udziale w analizie wyników symulacji numerycznych wykonanych przez dr. Heinricha Krobatha oraz (iv) udziale w pisaniu pracy.

- Artykuł [A5] jest przeglądem prac teoretycznych na temat adhezji błon lipidowo-białkowych oraz komórkowych. Moją wkład sprowadzał się do streszczenia prac dotyczących dwóch zagadnień: a) adhezji błon oddziałujących poprzez aktywne cząsteczki adhezyjne oraz b) kooperatywnego wiązania receptorów adhezyjnych.
- Praca [A6] jest związana tematycznie z pracą [A4] i dotyczy wpływu fluktuacji termicznych na segregację kompleksów białek adhezyjnych w obszarze przylegania błon. Rozważany układ składa się z dwóch przeciwległych błon lipidowo-białkowych. Jedną z nich jest fragmentem pęcherzyka lipidowo-białkowego lub komórki i zawiera cząsteczki adhezyjne (receptory). Drugą z błon przylega do płaskiego podłoża i zawiera dwa typy komplementarnych cząsteczek adhezyjnych (ligandy L1 i L2), które różnią się rozmiarem (ligandy jednego typu są dłuższe od ligandów drugiego typu) oraz oddziaływaniem z receptorami w przeciwległej błonie. Układ ten zilustrowany jest na rys. 1 w pracy [A6].

Niekowalencyjne wiązanie receptorów z ligandami prowadzi do adhezji przeciwległych błon. Ponieważ ligandy typów L1 i L2 różnią się długością, kompleksy receptor-ligand pośredniczące w adhezji błon także mają różne długości. Występowanie „długich” i „krótkich” kompleksów receptor-ligand w obszarze przylegania błon powoduje deformacje błony zawierającej cząsteczki receptorów. Jeśli średnia energia deformacji błony jest odpowiednio duża, zachodzi przestrzenne rozdzielanie kompleksów receptor-ligand. Można wówczas rozróżnić fazę wzbogaconą o „długie” kompleksy receptor-ligand i fazę wzbogaconą o „krótkie” kompleksy receptor-ligand. Praca [A6] zawiera teoretyczny opis tego zjawiska na gruncie klasycznej fizyki statystycznej. Podobnie jak w pracy [A4], rozważany układ osadzony jest w ramach modelu sieciowego, który uwzględnia energię deformacji błon lipidowych oraz energie oddziaływań receptorów z ligandami. Jednak obliczenia wykonane zostały nie w zespole wielkim kanonicznym lecz w zespole kanonicznym, gdyż liczba receptorów

adhezyjnych na powierzchni pęcherzyka lipidowo-białkowego jest ustalona.

Główny wynik pracy [A6] ilustrują diagramy razowe przedstawione na rys. 5. Uwzględniają one fluktuacje termiczne w układzie oddziałujących błon. Rys. 5a odnosi się do sytuacji, w której ligandy L1 i L2 wiążą się z receptorami R tego samego typu. Rys. 5b odnosi się do sytuacji, w której ligandy L1 wiążą się z receptorami R1, a ligandy L2 wiążą się z receptorami R2. W zależności od wartości parametrów modelu, w obszarze przylegania błon może występować faza wzbogacona o „długie” kompleksy receptor-ligand lub faza wzbogacona o „krótkie” kompleksy receptor-ligand. Fazy te mogą współistnieć w pewnym zakresie parametrów modelu. Na diagramach fazowych można także wyróżnić punkt krytyczny, powyżej którego fazy te stają się nierozróżnialne. Wyrażenia analityczne zadające linie współistnienia faz wyprowadzone są w rozdziałach 4.3 i 5.2 pracy [A6].

Mój wkład w powstanie pracy [A6] był zasadniczy i polegał na (i) udziale w sformułowaniu teoretycznego podejścia do problemu i rozwinięciu odpowiednich metod obliczeniowych, (ii) wykonaniu wszystkich obliczeń analitycznych i symulacji numerycznych, (iii) konstrukcji diagramów fazowych przedstawionych na rys. 5 oraz (iv) współudziale w pisaniu artykułu i przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- Praca [A7] jest ściśle związana tematycznie z pracą [A6] i dotyczy stabilności domen utworzonych z kompleksów cząsteczek adhezyjnych w obszarze przylegania błon. Rozważany układ fizyczny jest analogiczny do układu zbadanego teoretycznie w pracy [A6]. Występować w nim może faza wzbogacona o „długie” kompleksy receptor-ligand lub faza wzbogacona o „krótkie” kompleksy receptor-ligand. Fazy te mogą w pewnych warunkach współistnieć. Energia swobodna na jednostkę długości linii rozdzielającej współistniejące fazy nazywa się napięciem liniowym. W pracy [A7] zostało wyznaczone napięcie liniowe w funkcji parametrów modelu: modułu sztywności zginania błon, energii wiązania receptorów R1 z ligandami L1, energii wiązania receptorów R2 z ligandami L2 oraz długości i stężeń receptorów i ligandów. Otrzymane wyniki dostarczają wielu informacji np. na temat procesu nukleacji domeny jednej fazy w drugiej.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na (i) wykonaniu analizy wymiarowej (dodatek S1 do artykułu), która ułatwiła rozwiązanie postawionego problemu teoretycznego, (ii) zaproponowaniu nowatorskiej metody symulacji Monte Carlo, która umożliwiła wyznaczenie napięcia liniowego na gruncie klasycznej teorii nukleacji, (iii) współudziale w analizie i dyskusji wyników oraz (iv) współudziale w przygotowaniu tekstu artykułu.

6.1.2.B Badania dotyczące rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami na białkach w środowisku wodnym

Podczas stażu podoktorskiego w Laboratorium Fizyki Chemicznej Narodowego Instytutu Cukrzycy, Chorób Układu Pokarmowego i Nerek (Bethesda, Maryland, USA), który odbyłem w latach 2008-2011, zostałem wdrożony w nurt badań dotyczących struktur, dynamiki i funkcji białek. Moim mentorem naukowym był prof. Gerhard Hummer – obecnie dyrektor Instytutu Biofizyki im. Maxa Plancka we Frankfurcie – który jest światowej klasy ekspertem w zakresie fizyki biologicznej i chemicznej (wskaźnik Hirsha = 75, ponad 19 tysięcy cytowań, wg bazy danych Web of Science).

Badania strukturalne białek motywowane są chęcią poznania podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym. Wyznaczenie struktury przestrzennej danego białka może doprowadzić bowiem do wyjaśnienia, w jaki sposób wykonuje ono swoje funkcje biologiczne. Wśród białek najtrudniejszych do scharakteryzowania strukturalnego są obecnie te, które

zbudowane są z wielu domen połączonych nieustrukturyzowanymi fragmentami łańcucha polipeptydowego. Mimo tego, iż białka tego rodzaju często występują w komórkach biologicznych i pełnią w nich wiele ważnych funkcji – przykładem mogą być opisane w rozdziale 5.3.1 białka ESCRT – to stanowią one białą plamę w dziedzinie biologii strukturalnej. Otóż, nie mogą być one zbadane całościowo metodami rentgenografii strukturalnej ze względu na obecność nieustrukturyzowanych łączników międzydomenowych (mogą być wyznaczone tylko struktury poszczególnych domen). Nie mogą być także zbadane metodami magnetycznego rezonansu jądrowego ze względu na duże rozmiary (zwykle rzędu kilkuset kDa). Dlatego do badań tego typu białek używa się coraz częściej metod komplementarnych, a w szczególności rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS).

Rentgenografia strukturalna i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR od ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) uważane są obecnie za główne siły napędowe biologii strukturalnej. Jednak metody te mają oczywiście swoje ograniczenia. Rentgenografia strukturalna optymalnie nadaje się do badania takich białek, które w warunkach zbliżonych do fizjologicznych przyjmują jedną, stabilną, dobrze określoną strukturę przestrzenną – strukturę natywną – co umożliwia wyhodowanie monokryształów tych białek. Natomiast obecne metody NMR stosowalne są do badań strukturalnych białek o masach nie przekraczających ~50 kDa. Metoda SAXS nie podlega tym ograniczeniom i daje dodatkową możliwość charakterystyki strukturalnej białek w środowisku wodnym. Po pierwsze, w przeciwieństwie do rentgenografii strukturalnej, metoda SAXS nie wymaga hodowli kryształów białek. Dlatego może być ona stosowana np. do badania białek pozbawionych struktury trzeciorzędowej. Po drugie, w przeciwieństwie do NMR, metoda SAXS nie jest ograniczona przez rozmiar badanych makromolekuł. Może być ona stosowana zarówno do badania dużych kompleksów białkowych jak i małych białek lub peptydów. Jakość krzywych rozproszeniowych otrzymywanych z doświadczeń SAXS nie zależy bezpośrednio ani od rozmiaru ani od „giętkości” badanych makromolekuł w środowisku wodnym. Co więcej, metoda SAXS może być stosowana do badania ciekłych roztworów makrocząsteczek w szerokim zakresie stężeń, temperatur, pH, sił jonowych, itd.

Zdecydowanie słabą stroną metody SAXS jest niska rozdzielczości przestrzenna – zwykle w zakresie od 1 do 2 nm. Można też obrazowo powiedzieć, że skomplikowana, trójwymiarowa struktura cząsteczki białka zostaje w doświadczeniach SAXS zredukowana do jednowymiarowej krzywej rozproszeniowej. Jednak mimo związanej z tym utraty informacji strukturalnej, analiza i interpretacja krzywych rozproszeniowych z doświadczeń SAXS może dostarczyć ważnych informacji na temat relacji strukturalno-funkcjonalnych badanych białek.

Rentgenografia strukturalna jest coraz częściej uzupełniana przez SAXS w celu określenia struktur białek wielodomenowych oraz kompleksów białkowych [S4]. Natomiast metody łączące NMR i SAXS pozwalają wyznaczać atomowe struktury białek w środowisku wodnym [S4]. Takie połączenie wydaje się szczególnie skuteczne, ponieważ NMR i SAXS dostarczają komplementarnych informacji strukturalnych. Mianowicie, pomiary NMR nakładają „lokalne” ograniczenia na odległości między atomami lub na kąty dwuścienne między płaszczyznami wiązań chemicznych w badanym białku, natomiast dane z doświadczeń SAXS dostarczają „globalnych” informacji o rozmiarze i kształcie tego białka.

Dane z doświadczeń SAXS wykorzystywane są zwykle do wyznaczania tzw. obwiedni molekularnych, które przedstawiają kształty i rozmiary badanych białek [S4]. Jednak jeśli białko w warunkach fizjologicznych nie jest ustrukturyzowane – tzn. nie posiada jednej, stabilnej struktury trzeciorzędowej – to pojedyncza obwiednia molekularna nie można oczywiście przedstawić jego kształtu. Dlatego modelowanie tego typu białek wymaga innej strategii, która daje możliwość opisu

zespołu konformacyjnego, a nie pojedynczej struktury [H1,H2,H3,H5]. W podejściu tym stan natywny białka reprezentowany jest przez grupę modeli strukturalnych, która jako całość musi być zgodna z wynikami doświadczeń. Mój wkład do badań białek pozbawionych struktury trzeciorzędowej polega na opracowaniu metody EROS, która łączy symulacje molekularne z doświadczeniami SAXS w celu wyznaczania zespołów konformacyjnych białek [H1]. Metodę typu EROS zastosowałem między innymi do scharakteryzowania konformacji kinazy białkowej C [S1] oraz kinaz tworzących dynamiczne kompleksy z fosfatazami [S2,S3]. Otrzymane wyniki dostarczyły ważnych informacji o mechanizmach działania tych enzymów i zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach biologicznych (*Cell*) [S1], chemicznych (*Journal of the American Chemical Society*) [S2] i biochemicznych (*Nature Chemical Biology*) [S3].

Prace dotyczące interpretacji wyników doświadczeń SAXS kontynuowałem po zakończeniu stażu podoktorskiego w grupie prof. Gerharda Hummera. Otóż, w pracy [H5] użyłem symulacji gruboziarnistych i dostępnych w literaturze danych z doświadczeń SAXS do scharakteryzowania konformacji enzymu będącego komponentem celulozomu bakterii *C. thermocellum*. W pracy [S4] dokonałem przeglądu tzw. „hybrydowych” metod biologii strukturalnej, które opracowane zostały w celu wyznaczania zespołów konformacyjnych białek wielodomenowych i częściowo nieustrukturyzowanych. Istotnym elementem owych metod hybrydowych jest rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami. W pracy [S5] pomogłem opracować metodę poprawiania przewidywanych struktur peptydów i małych białek na podstawie wyników doświadczeń SAXS. W pracy [S6] użyłem symulacji gruboziarnistych i danych z doświadczeń SAXS do wyznaczenia konformacji kompleksu PI4KB-14-3-3, tzn. kinazy 4-fosfatydyloinozytolu typu III β (PI4KB) związanej niekowalencyjnie z białkiem oznaczanym jako 14-3-3. Na podstawie zaproponowanego przeze mnie modelu strukturalnego kompleksu PI4KB-14-3-3 wysunięte zostały trzy hipotezy co do wpływu białka 14-3-3 na enzym PI4KB oraz mechanizmów działania kompleksu PI4KB-14-3-3. Hipotezy te zostały kolejno zweryfikowane w doświadczeniach biochemicznych.

Prace stanowiące mój wkład w badania strukturalne białek przy użyciu symulacji komputerowych i danych z doświadczeń rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami:

- S1. Thomas A. Leonard, Bartosz Różycki, Layla F. Saidi, Gerhard Hummer, James H. Hurley. *Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C β -II*. *Cell* **144**: 55-66 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 32,403. Ponad 100 cytowań wg. bazy danych *Web of Science*.
- S2. Dana M. Francis*, Bartosz Różycki*, Antoni Tortajada, Gerhard Hummer, Wolfgang Peti, Rebecca Page. *Resting and active states of the ERK2:HePTP complex*. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 17138-17141 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 9,907.
- S3. Dana M. Francis, Bartosz Różycki, Dorothy Koveal, Gerhard Hummer, Wolfgang Peti, Rebecca Page. *Structural basis of p38- α regulation and specificity by hematopoietic tyrosine phosphatase*. *Nature Chem. Biol.* **7**: 916-924 (2011). *Impact Factor* w 2011 r.: 14,690.
- S4. Bartosz Różycki, Evzen Boura. *Large, dynamic, multi-protein complexes: A challenge for structural biology*. *J. Phys.: Condens. Matter* **26**: 463103 (2014). *Impact Factor* w 2014 r.: 2,346.
- S5. Kecheng Yang, Bartosz Różycki, Fengchao Cui, Ce Shi, Wenduo Chen, Yunqi Li. *Sampling enrichment toward target structures using hybrid Molecular Dynamics-Monte Carlo simulations*. *PLoS ONE* **11**: e0156043 (2016). *Impact Factor* w 2016 r.: 2,806.

* równy wkład do pracy

S6. Dominika Chalupska, Andrea Eisenreichova, Bartosz Różycki, Lenka Rezabkova, Jana Humpolickova, Martin Klima, Evzen Boura. *Structural analysis of phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KB) – 14-3-3 protein complex reveals internal flexibility and explains 14-3-3 mediated protection from degradation in vitro*. J. Struct. Biol. **200**: 36-44 (2017). Impact Factor w 2016 r.: 2,767

Zwięzły opis ww. publikacji:

- Praca [S1] stanowi charakterystykę strukturalno-funkcjonalną kinazy białkowej C (PKC od ang. *protein kinase C*) typu β II. Struktura znacznej części wielodomenowego enzymu PKC β II została wyznaczona metodą krystalografii strukturalnej. Struktura ta uchwyciła nieoczekiwany wcześniej stan przejściowy na ścieżce aktywacji tego enzymu. Wyniki doświadczeń SAXS na wielodomenowym białku PKC β II w środowisku wodnym umożliwiły wyznaczenie modelu strukturalnego tego białka w konformacji zamkniętej. Badania strukturalne wzięte razem pokazują, jak enzym PKC β II jest allosterycznie regulowany w dwóch etapach (rys. 6 w pracy [S1]), przy czym drugi etap stanowi odkryty w pracy [S1] mechanizm regulacji aktywności kinazy białkowej C.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na (i) wykonaniu – w ramach modelu KH używając metody Monte Carlo – wielodomenowego białka PKC β II, (ii) wyznaczeniu krzywych rozproszeniowych dla struktur otrzymanych z symulacji, (iii) wyborze reprezentatywnych modeli strukturalnych zgodnych z wynikami doświadczeń SAXS na białku PKC β II w środowisku wodnym oraz (iv) współdziałanie w dyskusji wyników i przygotowaniu rys. 5.

- Praca [S2] dotyczy aktywowanej mitogenem kinazy ERK2 w kompleksie z fosfatazą tyrozynową HePTP. Użyłem w niej metody typu EROS do wyznaczenia konformacji kompleksu białkowego ERK2-HePTP w stanie spoczynkowym i aktywnym. Otrzymane wyniki wykazują, że ERK2-HePTP w stanie spoczynkowym przybiera zróżnicowane konformacje o wydłużonym kształcie; natomiast w stanie aktywnym ERK2 jest ściśle związany z HePTP, tak że kompleks ERK2-HePTP przybiera kształt znacznie bardziej zwarty niż w stanie spoczynkowym. Zatem fosforylacja i defosforylacja ERK2 skutkują w bardzo dużych zmianach konformacyjnych kompleksu ERK2-HePTP. Wyniki te wpisują się w nurt badań dotyczących mechanizmów regulacji aktywności kinaz białkowych.

Mój wkład w powstanie pracy [S2] polegał na (i) wykonaniu symulacji kompleksu ERK2-HePTP w ramach modelu KH, (ii) wyznaczeniu – na podstawie konformacji otrzymanych z symulacji – minimalnych zespołów konformacyjnych zgodnych z wynikami doświadczeń SAXS na kompleksie ERK2-HePTP w stanie spoczynkowym i aktywnym, (iii) opisanu użytych metod obliczeniowych i otrzymanych wyników oraz (iv) współdziałanie w sporządzeniu wszystkich rysunków.

- Praca [S3] dotyczy fizykochemicznej i strukturalnej charakterystyki oddziaływania pomiędzy aktywowaną mitogenem kinazą p38 α a fosfatazą tyrozynową HePTP. W pracy [S3] użyłem zmodyfikowanej odpowiednio metody EROS do zintegrowania wyników doświadczeń SAXS, NMR i krystalografii strukturalnej w celu określenia konformacji kompleksu białkowego p38 α -HePTP. Krystalografia została użyta do wyznaczenia struktur poszczególnych domen białkowych wchodzących w skład badanego kompleksu; zmiany przesunięć chemicznych (wyznaczone w doświadczeniach NMR) dostarczyły informacji o aminokwasach tworzących kontakty międzypomenowe; natomiast dane z doświadczeń SAXS umożliwiły umiejscowienie

składowych domen białkowych względem siebie.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na (i) wprowadzeniu metody ukierunkowania symulacji Monte Carlo gruboziarnistego modelu kompleksu p38 α -HePTP przez dane z doświadczeń NMR (tj. zmiany przesunięć chemicznych), (ii) analizie wyników tych symulacji i wyznaczeniu minimalnego zespołu konformacyjnego zgodnego z wynikami doświadczeń SAXS, (iii) opisaniu użytych metod obliczeniowych i otrzymanych wyników oraz (iv) współudziale sporządzeniu rysunku 5.

- Praca [S4] to artykuł przeglądowy na temat hybrydowych metod biologii strukturalnej. Jednym z głównych zagadnień tej pracy jest zastosowanie symulacji komputerowych i metod obliczeniowych od interpretacji danych z doświadczeń SAXS na białkach wielodomenowych i częściowo nieustrukturyzowanych. Mój wkład w powstanie pracy [S4] polegał na (i) udziale w opracowaniu przeglądu tematyki omówionej w artykule, (ii) przygotowaniu obszernych części tekstu artykułu i większości rysunków, (iii) zredagowaniu artykułu oraz (iv) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i poprawie artykułu zgodnie z uwagami recenzentów.
- W pracy [S5] wprowadzono i przetestowano metodę poprawiania przewidywanych struktur białek na podstawie danych z doświadczeń SAXS. Wprowadzona metoda opiera się na symulacjach dynamiki molekularnej, które ukierunkowane są przez dane doświadczalne przy użyciu schematu Monte Carlo. Metoda ta daje lepsze przewidywania struktur białek i peptydów dzięki połączeniu symulacji dynamiki molekularnej z doświadczeniami SAXS. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na konsultacjach dotyczących rozpraszania promieniowania rentgenowskiego na białkach w środowisku wodnym oraz udziale w interpretacji wyników symulacji i pisaniu artykułu.
- Praca [S6] stanowi analizę struktury i funkcji kompleksu kinazy 4-fosfatydyloinozytoli typu III β (PI4KB) z białkiem oznaczanym jako 14-3-3. Enzym PI4KB zaangażowany jest w syntezę 4-fosforanu fosfatydyloinozytoli (PI4P), który jest fosfolipidem pełniącym ważne funkcje sygnalizacyjne w komórkach eukariotycznych. Działanie PI4KB jest ściśle regulowane przez wiele innych białek. Wiadomo w szczególności, że po fosforylacji przez kinazę białkową D, białko 14-3-3 wiąże się z enzymem PI4KB. Jednak mechanizmy molekularne leżące u podstaw rozpoznawania enzymu PI4KB przez białko 14-3-3 były nieznane.

W pracy [S6] wykazano – używając ultrawirowania analitycznego – że białka 14-3-3 i PI4KB tworzą kompleks w stechiometrii 2:2. Wykonano także doświadczenia SAXS na kompleksie PI4KB-14-3-3 w środowisku wodnym. Wyniki tych doświadczeń zostały zinterpretowane na podstawie symulacji kompleksu PI4KB-14-3-3 wykonanych w ramach modelu KH. Wyniki te wzięte razem doprowadziły do zaproponowania trójwymiarowego modelu kompleksu PI4KB-14-3-3 w stechiometrii 2:2. Model ten przewiduje, że zarówno miejsce aktywne enzymu PI4KB jak i miejsce wiązania PI4KB przez białko ACBD3 (od ang. *acyl-CoA-binding domain-containing protein-3*) znajdują się z dala od białka 14-3-3. Na podstawie zaproponowanego modelu strukturalnego kompleksu PI4KB-14-3-3 wysunięto zatem następujące hipotezy: po pierwsze, białko 14-3-3 nie wpływa bezpośrednio na aktywność enzymatyczną PI4KB; po drugie, wiązanie białka 14-3-3 nie wpływa na rekrutację PI4KB do błon wewnątrzkomórkowych przez białko ACBD3; po trzecie, funkcją białka 14-3-3 jest ochrona nieustrukturyzowanych fragmentów enzymu PI4KB przed proteolizą. Hipotezy te zostały kolejno sprawdzone i potwierdzone w doświadczeniach biochemicznych.

Mój wkład w powstanie pracy [S6] polegał na (i) wykonaniu symulacji kompleksu białkowego PI4KB-14-3-3 w ramach gruboziarnistego modelu KH, (ii) obliczeniu krzywych

rozproszeniowych dla modeli strukturalnych otrzymanych z symulacji, (iii) analizie danych z doświadczeń SAXS na kompleksie PI4KB-14-3-3 w roztworze wodnym, (iv) wyznaczeniu modeli strukturalnych zgodnych z danymi otrzymanymi z doświadczeń SAXS, (v) analizie i wzajemnym porównaniu wyznaczonych modeli strukturalnych, (vi) udziale w zaproponowaniu funkcji pełnionych przez białko 14-3-3 w kompleksie z enzymem PI4KB oraz (vii) udziale w pisaniu artykułu i wykonaniu rys. 3.

6.1.2.C Badania dotyczące białek błonowych i deformacji błon lipidowych

Obecnie zatrudniony jestem na stanowisku adiunkta w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki PAN w Warszawie. Zasadniczym tematem moich badań są białka wielodomenowe i kompleksy białkowe [H5-H9], w szczególności białka cellulozomalne [H5-H7]. W zakresie tych badań prowadzę ścisłą współpracę z prof. Markiem Cieplakiem. Pobocznymi tematami moich badań są, po pierwsze, mechanizmy działania białek błonowych [M1-M3] oraz, po drugie, mechanizmy deformacji błon lipidowych [M3-M5]. Prace dotyczące białek błonowych [M1,M2] prowadzę we współpracy z dr. Evzenem Bourą z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii Czeskiej Akademii Nauk. Natomiast prace na temat deformacji dwuwarstw lipidowych [M4,M5] prowadzę we współpracy z prof. Reinhardem Lipowskim z Instytutu Koloidów i Międzypowierzchni im. Maxa Plancka. Wspólnym mianownikiem tych prac są fizykochemiczne własności błon lipidowych. Badania zarówno białek błonowych jak i samych błon lipidowych motywowane są chęcią zrozumienia – na poziomie molekularnym – mechanizmów funkcjonowania błon komórkowych.

Błony komórkowe rozdzielają wnętrze komórek biologicznych od ich otoczenia. Są one zbudowane z dwuwarstwy lipidowej oraz rozmaitych białek. Pewne rodzaje białek są tylko luźno związane z błoną lipidową, natomiast inne przesywają dwuwarstwę lub są w niej stabilnie zakotwiczone. Błony lipidowo-białkowe otaczają też organelle wewnątrzkomórkowe. Skład chemiczny i kształt tych błon muszą być aktywnie modyfikowane i kontrolowane przez wyspecjalizowane grupy białek. Jest to konieczne do utrzymania różnorodnych procesów życiowych. Dlatego błony komórkowe są bardzo dynamicznymi układami supramolekularnymi.

Skład chemiczny błon komórkowych jest modyfikowany między innymi na skutek działania odpowiednich enzymów. Pewne z nich działają na białka błonowe, a inne – na lipidy. Przykładem enzymów modyfikujących cząsteczki lipidów są kinazy 4-fosfatydyloinozytolu (PI4K), których dotyczy praca [M1]. Niektóre z typów kinaz PI4K wiążą się z wielodomenowym białkiem ACBD3 (od ang. *acyl-CoA-binding domain-containing protein-3*), które jest niezbędne dla właściwego działania aparatu Golgiego. Białko ACBD3 jest także wykorzystywane przez pewne wirusy do replikacji w komórce gospodarza, co jest tematem przewodnim pracy [M2].

Nie tylko skład lipidowy lecz także kształt błon komórkowych jest modyfikowany przez różnorodne białka. Przykładem są omówione w rozdziale 5.3.1 białka ESCRT, które powodują pączkowanie błon endosomalnych w kierunku do wnętrza endosomów [H3,H4,M3]. Praca [M3] jest przeglądem literatury na temat pączkowania błon komórkowych. Dyskutowanym zagadnieniem jest porównanie udziału białek i lipidów w różnych procesach komórkowych, w których zachodzi pączkowanie błon.

Kształt błon lipidowych może podlegać zmianom nie tylko na skutek działania białek lecz także pod wpływem małych cząsteczek lub jonów. Istotą tego zjawiska są oczywiście fizyczne oddziaływania lipidów tworzących błonę z małymi cząsteczkami lub jonami w środowisku wodnym otaczającym błonę. Przykładowo, adsorpcja małych cząsteczek lub jonów na jednej z dwóch warstw lipidowych błony powoduje nierównomierne rozłożenie naprężeń w poprzek

dwuwarstwy lipidowej, co może prowadzić do zakrzywienia błony [M4]. Analogicznego efektu można się spodziewać, jeśli oddziaływania między lipidami tworzącymi błonę a cząsteczkami lub jonami w ich otoczeniu są odpychające [M5]. Celem prac [M4,M5] jest wyjaśnienie – na gruncie fizyki statystycznej, mechaniki płynów i mechaniki molekularnej – w jaki sposób błony lipidowe ulegają deformacji pod wpływem małych cząsteczek lub jonów.

Prace stanowiące mój wkład w badania dotyczące białek błonowych [M1-M3] i deformacji błon lipidowych [M3-M5]:

- M1. Adriana Baumlova, Dominika Chalupska, Bartosz Różycki, Marko Jovic, Eva Wisniewski, Martin Klima, Anna Dubankova, Daniel P Kloer, Radim Nencka, Tamas Balla, Evzen Boura. *The crystal structure of the phosphatidylinositol 4-kinase II- α* . EMBO Reports **15**: 1085-1092 (2014). *Impact Factor* w 2014 r.: 9,055.
- M2. Martin Klima, Dominika Chalupska, Bartosz Różycki, Jana Humpolickova, Lenka Rezaczkova, Jan Silhan, Adriana Baumlova, Anna Dubankova, Evzen Boura. *Kobuviral non-structural 3A proteins act as molecular harnesses to hijack the host ACBD3 protein*. Structure **25**: 219-230 (2017). *Impact Factor* w 2016 r.: 4,945.
- M3. James H. Hurley, Evzen Boura, Lars-Anders Carlson, Bartosz Różycki. *Membrane budding*. Cell **143**: 875-887 (2010). *Impact Factor* w 2010 r.: 32,406. Ponad 100 cytowań wg. bazy danych *Web of Science*.
- M4. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky. *Spontaneous curvature of bilayer membranes from molecular simulations: Asymmetric lipid densities and asymmetric adsorption*. J. Chem. Phys. **142**: 054101 (2015). *Impact Factor* w 2015 r.: 2,894.
- M5. Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky. *Membrane curvature generated by asymmetric depletion layers of ions, small molecules, and nanoparticles*. J. Chem. Phys. **145**: 074117 (2016). *Impact Factor* w 2016 r.: 2,965.

Zwięzły opis ww. publikacji:

- W pracy [M1] zbadane zostało oddziaływanie kinazy 4-fosfatydyloinozytolu (PI4K) typu II- α z błoną lipidową. Enzymy PI4K zaangażowane są w syntezę 4-fosforanu fosfatydyloinozytolu (PI4P), który jest fosfolipidem pełniącym istotne funkcje sygnalizacyjne w komórkach eukariotycznych. Struktura enzymu PI4K II- α w kompleksie z dwiema cząsteczkami ATP została odkryta przez współpracowników z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii Czeskiej Akademii Nauk. W kinazie PI4K II- α można wyróżnić dwa płaty, N i C, a bruzda pomiędzy nimi jest miejscem wiążącym jedną cząsteczkę ATP. Co ciekawe, drugie miejsce wiążące cząsteczkę ATP znajduje się w „bocznej kieszeni” w płacie C. Wyznaczenie struktury atomowej PI4K II- α umożliwiło wykonanie symulacji zakotwiczenia tego enzymu na błonie lipidowej. Wykonane przeze mnie symulacje komputerowe w połączeniu z doświadczeniami mutagenetyki zobrazowały sposób wiązania białka PI4K II- α z błoną i wskazały domniemaną funkcję kieszeni bocznej w płacie C. Wyniki te wzięte razem sugerują mechanizmy rekrutacji, regulacji i działania kinazy PI4K II- α na błonie lipidowej. Dostarczają przez to istotnych informacji o tym, jak w błonach aparatu Goliego syntetyzowane są lipidy PI4P.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu symulacji gruboziarnistego modelu enzymu PI4K II- α zakotwiczonego w błonie lipidowej poprzez reszty kwasu palmitynowego. Na podstawie analizy wyników tych symulacji opisałem przestrzenne ułożenie enzymu na błonie lipidowej i zaproponowałem grupę aminokwasów tworzących miejsca wiązania enzymu

PI4K II- α z błoną.

- Praca [M2] jest powiązana z pracą [M1] w tym sensie, że także dotyczy białek oddziałujących z błonami aparatu Golgiego. Praca [M2] wpisuje się jednocześnie w nurt badań nad molekularnymi podstawami replikacji pikornawirusów. Pikornawirusy to rodzina wirusów wywołujących u ludzi szereg chorób – od zwykłego przeziębienia po zapalenie wątroby typu A i chorobę Heinego-Medina. Jedną z kilku wspólnych cech wirusów należących do tej rodziny jest to, że replikują w komórce gospodarza na specyficznych platformach błonowych zwanych organellami replikacji. Aby utworzyć organelle replikacji, pikornawirusy wykorzystują kilka typów białek komórki gospodarza, w tym białko ACBD3 (od ang. *acyl-CoA-binding domain-containing protein-3*), z którym oddziałuje wirusowe białko 3A. Białko to jest pozbawione struktury trzeciorzędowej i zawiera helisę transbłonową, która kotwiczy kompleks białkowy 3A-ACBD3 w błonie organelli replikacji. Struktura domeny GOLD (od ang. *Golgi dynamics domain*) białka ACBD3 w kompleksie z pozabłonową częścią wirusowego białka 3A została odkryta przez współpracowników z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii Czeskiej Akademii Nauk. Wykonane przeze mnie symulacje dynamiki molekularnej wskazały, w jaki sposób kompleks 3A-GOLD wiąże się z błoną i które aminokwasy na powierzchni domeny GOLD mają istotny wkład do tego wiązania. Analiza mutagenezy ukierunkowanej potwierdziła wyniki przeprowadzonych przeze mnie symulacji dynamiki molekularnej. Praca [M2] dostarcza informacji strukturalnych koniecznych do zrozumienia, w jaki sposób kompleks białek wirusa i gospodarza (3A-GOLD) organizuje się na organellach replikacji. Otrzymane wyniki mogą posłużyć także do identyfikacji nowych potencjalnych celów terapii przeciwwirusowej.

Mój wkład w powstanie pracy [M2] polegał na wykonaniu pełnoatomowych symulacji dynamiki molekularnej transbłonowego białka 3A związanego z zakotwiczoną w błonie lipidowej (poprzez resztę mirystylową) domeną GOLD białka ACBD3. Moim wkładem było także przeprowadzenie analizy wyników symulacji, na podstawie której zidentyfikowałem grupę aminokwasów tworzących miejsce wiązania domeny GOLD z błoną lipidową.

- Praca [M3] jest artykułem przeglądowym na temat pączkowania błon komórkowych. W literaturze biologicznej i biofizycznej znaleźć można coraz więcej prac, w których różnorodne procesy komórkowe z udziałem pączkowania błon zostały zrekonstruowane *in vitro*, dostarczając rzetelnych podstaw do wyjaśnienia tychże procesów na poziomie molekularnym. Prace te wykazują, że pączkowanie błon komórkowych jest z reguły spowodowane ścisłym pokryciem lub „opłaszczeniem” fragmentu błony przez odpowiednie białka. Płaszcz utworzony z białek działa w tych przypadkach jak temblak nadając błonie swój kształt. Dobrze zbadanym przykładem jest białko o nazwie klatryna, która opłaszcza pęcherzyki wewnątrzkomórkowe powstałe z błony cytoplazmatycznej w procesie endocytozy. Cząsteczki klatryny wiążą się poprzez kompleksy białek adaptorowych do fragmentu błony, który ma zostać zdeformowany i przekształcony w pęcherzyk. Po dotarciu na miejsce docelowe, pęcherzyki pozbawiane są płaszcza klatrynowego, w następstwie czego mogą zostać połączone z błoną docelową [M3].

Odstępstwem od wyżej wspomnianej reguły są kompleksy białkowe ESCRT, które prawdopodobnie nie opłaszczają pączkujących błon. Zostały one bowiem zlokalizowane jedynie w szyjkach łączących powstające pęcherzyki z błoną macierzystą. Białka ESCRT wykorzystują więc inne mechanizmy działania – które pozostają w dużej mierze niewyjaśnione – niż kształtowanie błon poprzez ich opłaszczanie [H3,H4,M3].

W pracy [M3] omówione jest także pączkowanie wieloskładnikowych błon lipidowych, które w pewnych warunkach zachodzi spontanicznie – bez udziału żadnych białek – jak

wykazano to w doświadczeniach mikroskopii fluorescencyjnej na pęcherzykach lipidowych o rozmiarach rzędu 10 μm (GUV). Efekt ten łatwo wyjaśnić na podstawie termodynamiki i mechaniki błon lipidowych. Otóż, rozdzielanie faz lipidowych w wieloskładnikowej błonie prowadzi do powstania napięcia liniowego między fazą płynną uporządkowaną i płynną nieuporządkowaną. Jeśli siły napięcia liniowego są większe od sił elastyczności koniecznych do odkształcenia błony lipidowej, proces pączkowania zachodzi spontanicznie [M3].

Porównanie trzech ww. czynników – płaszcz klatrynowy, kompleksy białek ESCRT, napięcie liniowe – prowokuje następujące pytanie: jaki wkład do procesów pączkowania mają lipidy tworzące błony, a jakie białka działające na błony? Próbą odpowiedzi na to pytanie jest praca [M3], która skupia się na porównaniu roli białek i lipidów w różnych procesach komórkowych, podczas których zachodzi pączkowanie błon. Mój wkład do pracy [M3] dotyczył głównie fragmentów na temat mechaniki i termodynamiki płynnych błon lipidowych.

- Prace [M4,M5] dotyczą deformacji błon lipidowych spowodowanych oddziaływaniami małych cząsteczek lub jonów z błonami. Kluczową wielkością badaną w pracach [M4,M5] jest krzywizna spontaniczna, która jest jednym z mezoskopowych parametrów teorii elastyczności błon lipidowych. Parametr ten ilościowo opisuje asymetrię pomiędzy dwiema warstwami danej błony i związaną z tym tendencją błony do spontanicznego tworzenia zakrzywionych struktur przestrzennych. Mimo tego, że koncept krzywizny spontanicznej dyskutowany był od dawna w kontekście ciągłych modeli błon, to był on zasadniczo ignorowany w symulacjach dynamiki molekularnej błon lipidowych i lipidowo-białkowych – głównie ze względu na problem warunków brzegowych. W pracach [M4,M5] przeprowadziłem pierwsze – na gruncie dynamiki molekularnej – systematyczne badania krzywizny spontanicznej generowanej, po pierwsze, asymetrią gęstości upakowania lipidów w przeciwległych warstwach błony [M4], po drugie, asymetrią pokrycia przeciwległych warstw błony przez cząsteczki zaadsorbowane z otoczenia wodnego [M4] oraz, po trzecie, różnicą stężeń cząsteczek w roztworach wodnych po przeciwległych warstwach błony [M5]. Symulacje dynamiki molekularnej wykonałem w ramach gruboziarnistego modelu typu DPD. Wyniki wykonanych przeze mnie symulacji dostarczyły dogłębnego zrozumienia ww. układów i ułatwiły przez to ich analizę teoretyczną na gruncie fizyki statystycznej i mechaniki płynów. Wprowadziłem dzięki temu – w ścisłej współpracy z prof. Reinhardem Lipowskim z Instytutu Koloidów i Międzypowierzchni im. Maxa Plancka – proste i ogólne zależności pomiędzy a) krzywizną spontaniczną, b) asymetrią pokrycia przeciwległych warstw błony przez cząsteczki lub jony oraz c) napięciem powierzchniowym tychże warstw błony.

W symulacjach dynamiki molekularnej w ramach modelu DPD [M4,M5] zastosowałem dwie odmienne metody do wyznaczania krzywizny spontanicznej. Pierwsza z nich – oparta na pracach Helfricha z 1981 roku – wymaga wyznaczenia rozkładu lokalnych naprężeń w stanie zerowego napięcia powierzchniowego błony. Druga metoda, wprowadzona w pracy [M4], opiera się na przedstawieniu błony jako dwóch równoległych powierzchni rozdziału płynów (woda-lipidy) i wyznaczaniu napięcia powierzchniowego tychże warstw. Metody te dostarczyły równoważnych wyników we wszystkich zbadanych układach.

Mój wkład w powstanie prac [M4,M5] był zasadniczy i polegał na (i) współdziałaniu w wyborze tematyki badań, sformułowaniu problemu fizycznego i rozwinięciu odpowiedniego podejścia teoretycznego, (ii) wykonaniu symulacji dynamiki molekularnej oraz części obliczeń analitycznych, (iii) analizie i interpretacji wyników symulacji oraz (iv) przygotowaniu obszernych fragmentów artykułów i znacznej większości rysunków.

6.2 Publikacje w czasopismach spoza listy JCR

6.2.1 Rozdział książki

- Wolfgang Peti, Rebecca Page, Evzen Boura, Bartosz Różycki. „Structures of dynamic protein complexes: Hybrid techniques to study MAP kinase complexes and the ESCRT system”. Rozdział XVII w „Protein NMR: Methods and Protocols”, Ranajeet Ghose (ed). Humana Press, New York, NY. *Methods in Molecular Biology* **1688**: 375-389 (2018).

Rozdział ten jest przeglądem hybrydowych metod współczesnej biologii strukturalnej. Mój wkład w jego powstanie polegał na przygotowaniu całego rozdziału 3.3, sporządzeniu rysunku 1 ilustrującego metodę EROS opisaną w rozdziale 3.3, udziale w pisaniu wstępu i udziale w opracowaniu rozdziału 3.2.

6.2.2 Artykuły przeglądowe i popularnonaukowe w języku polskim

- Bartosz Różycki. „Konformacje białek wielodomenowych i częściowo nieustrukturyzowanych – symulacje i eksperymenty”. *Postępy Biochemii* **63**: 132-136 (2017).

Artykuł ten jest zwięzłym przeglądem współczesnych badań nad białkami wielodomenowymi i pozbawionymi struktury trzeciorzędowej. Dotyczy on przede wszystkim hybrydowych metod biologii strukturalnej.

- Bartosz Różycki. „Postęp w pomiarach białek nieustrukturyzowanych”. *Wszechświat* **117**: 295-304 (2016).

Praca ta jest artykułem popularnonaukowym o białkach pozbawionych struktury trzeciorzędowej.

6.3 Wykłady zaproszone na konferencjach, sympoziach i konwersatoriach

Wykłady zaproszone na konferencjach międzynarodowych

- Biomolecules and Nanostructures 6. Polska, Podlesice, 11.05.2017. Tytuł wykładu: „Assembling cellulosomes by molecular simulations and SAXS experiments”.
- Biomembrane Days 2014. Niemcy, Berlin, 01.09.2014. Tytuł wykładu: „Spontaneous curvature of bilayer membranes from asymmetric lipid and adsorbate densities”.
- 9th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology. Szwecja, Göteborg, 16.06.2014. Tytuł wykładu: „Adhesion of membranes via receptor-ligand complexes: Binding cooperativity, domain formation and line tension effects”.
- International Conference on Computational Science and Technology. Polska, Warszawa, 16.05.2014. Tytuł wykładu: „Ensembles of multi-protein complexes in simulation and experiment”.

Wykłady zaproszone na sympoziach

- Sympozjum „Physics Under Extreme Conditions” w ramach Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Instytutu Fizyki PAN. Warszawa, 03.11.2016. Tytuł wykładu: „Life at extreme temperatures”.
- ASBMB Symposium on Biochemistry and Cell Biology of ESCRTs in Health and Disease. Snowbird, Utah, USA, 15.10.2010. Tytuł wykładu: „Coatless vesicle budding by ESCRTs”.

Wykład zaproszony na konwersatorium

- Colloquium of the International Graduate Research Training Group 1524. Konwersatorium politechniki berlińskiej. Niemcy, Berlin, 10.02.2015. Tytuł referatu: „Assembling multi-protein complexes by SAXS, FRET, EPR and molecular simulations”.

6.4 Referaty wygłoszone na seminariach

- Seminarium Fizyki Materii Skondensowanej, Instytut Fizyki PAN, Warszawa, 17.01.2017. Tytuł referatu: „Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami jako metoda badania białek wielodomenowych”.
- Skype Seminar on Life Science, Institute for Computational Science and Technology in Vietnam, Warszawa, 26.06.2015. Tytuł referatu: „Spontaneous curvature of bilayer membranes from molecular simulations: Asymmetric lipid densities and asymmetric adsorbate concentrations”.
- Seminar of the State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chiny, Changchun, 17.06.2015. Tytuł referatu: „Spontaneous curvature of bilayer membranes from molecular simulations”.
- Polymer Science Lecture Series, State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chiny, Changchun, 15.06.2015. Tytuł referatu: „Assembling protein complexes with intrinsic disorder by simulation and experiment”.
- Seminarium z Fizyki Biologicznej i Bioinformatyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Instytutu Fizyki PAN i Zakładu Biofizyki UW, Warszawa, 22.10.2014. Tytuł referatu: „Spontaneous curvature of bilayer membranes: Asymmetric lipid densities and asymmetric adsorption”.
- Skype Seminar on Life Science, Institute for Computational Science and Technology in Vietnam, Warszawa, 28.02.2014. Tytuł referatu: „Assembling the multi-protein ESCRT complexes by simulation and experiment”.
- Seminarium z Fizyki Biologicznej i Bioinformatyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Instytutu Fizyki PAN i Zakładu Biofizyki UW, Warszawa, 23.10.2013. Tytuł referatu: „Adhezja błon komórkowych - efekty kooperatywnego wiązania receptorów adhezyjnych i tworzenia domen w synapsie immunologicznej”.
- Seminar of the Biochemistry Department, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Praga, Czechy, 04.10.2013. Tytuł referatu: „Assembling multi-protein complexes by simulation and experiment”.
- Seminar on Modern Concepts in Structural Biology, Max F. Perutz Laboratories, Department of Structural and Computational Biology, Wiedeń, Austria, 31.01.2013, Tytuł referatu: „Assembling multi-protein complexes with intrinsic disorder by simulation and experiment: application to the ESCRT system”.
- Seminarium z Fizyki Biologicznej i Bioinformatyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Instytutu Fizyki PAN i Zakładu Biofizyki UW, Warszawa, 12.12.2012. Tytuł referatu: „Konformacje białek wielodomenowych i kompleksów białkowych badane przy użyciu połączenia symulacji molekularnych z doświadczeniami SAXS, EPR, FRET i NMR”.
- Department Workshops, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Theory and Bio-systems, Ringberg, Niemcy, 12.03.2012. Tytuł referatu: „The ESCRT machinery”.
- Theory and Bio-systems Department Seminar, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Poczdam, Niemcy, 12.12.2011. Tytuł referatu: „Ensemble refinement of multi-domain proteins with disordered segments”.
- LCP Seminar, National Institutes of Health, NIDDK, Laboratory of Chemical Physics, Bethesda, MD, USA, 01.12.2009. Tytuł referatu: „Binding cooperativity of membrane adhesion receptors”.

- LCP Seminar, National Institutes of Health, NIDDK, Laboratory of Chemical Physics, Bethesda, MD, USA, 17.12.2008. Tytuł referatu: „Stable Patterns of Membrane Domains at Corrugated Substrates”.
- Department Workshops, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Theory and Bio-systems, Semlin, Niemcy, 11.03.2008. Tytuł referatu: „Stable Patterns of Membrane Domains at Corrugated Substrates”.
- Department Workshops, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Theory and Bio-systems, Malta, 16.03.2007. Tytuł referatu: „Lipid membranes: adhesion via soluble stickers and curvature-modulated phase separation”.
- Seminarium Fizyki Statystycznej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Teoretycznej, Warszawa, 09.06.2006. Tytuł referatu: „Stochastyczne modele adhezji błon komórkowych poza równowagą termodynamiczną”.
- Seminarium z Fizyki Biologicznej i Bioinformatyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Instytutu Fizyki PAN i Zakładu Biofizyki UW, Warszawa, 24.04.2006. Tytuł referatu: „Adhezja błon z aktywnymi składnikami”.
- Seminarium Fizyki Statystycznej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Teoretycznej, Warszawa, 07.10.2005. Tytuł referatu: „Motory Brownowskie”.
- „Theory of Soft and Biomatter: Irreversible and Active Processes” Seminar, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, International Max Planck Research School on Biomimetic Systems, Poczdam, Niemcy, 13.06.2005. Tytuł referatu: „Brownian ratchets”.
- Department Workshops, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Theory, Ringberg, Niemcy, 16.03.2005. Tytuł referatu: „Adhesion control of membranes by active stickers”.
- „Theory of Soft and Biomatter” Seminar, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, International Max Planck Research School on Biomimetic Systems, Poczdam, Niemcy, 10.05.2004. Tytuł referatu: „Unfolding and Jarzynski’s equality”.
- Seminarium Fizyki Statystycznej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Teoretycznej, Warszawa, 07.11.2003. Tytuł referatu: „Stochastyczny model aktywnych składników membran biologicznych”.
- Seminarium Fizyki Statystycznej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Teoretycznej, Warszawa, 25.10.2002. Tytuł referatu: „Wpływ skończonych rozmiarów układu na zjawisko zwilżania”.
- Theory Department Seminar, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Poczdam, Niemcy, 22.07.2002. Tytuł referatu: „Finite-size effects on wetting transitions”.

6.5 Aktywny udział w konferencjach i zjazdach

- Prezentacja plakatu na konferencji „Gordon Research Conference on Cellulases and Other Carbohydrate-Active Enzymes”, Proctor Academy, Andover, NH, USA, 23-28.07.2017. Tytuł prezentacji: „Assembling cellulosomes by molecular simulations and SAXS experiments”.
- Prezentacja plakatu na konferencji „Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations”, Biophysical Society Thematic Meeting, Berlin, Niemcy, 25-29.08.2017. Tytuł prezentacji: „Large, dynamic, multi-protein complexes - molecular simulations and SAXS experiments”.
- Prezentacja plakatu na konferencji „Biomembrane Days 2016”, Berlin, Niemcy, 05-07.09.2016. Tytuł prezentacji: „Spontaneous curvature of biomembranes from molecular simulations”.

- Referat na Zjeździe Fizyków Polskich, Sesja 7: Biofizyka, Kielce, 07.09.2015. Tytuł referatu: „Różnorodność konformacyjna wielodomenowej ksylanazy Z”.
- Prezentacja plakatu na konferencji „Biomolecules and Nanostructures 5”, Jaroszwice, 15.05.2015. Tytuł prezentacji: „Conformational ensemble of the multi-domain Xylanase Z of *Clostridium thermocellum*”.
- Prowadzenie sesji „Networks” na konferencji „From Soft Matter to Bio-Systems”, Poczdam, Niemcy, 21.11.2013.
- Prezentacja plakatu na konferencji „Biomolecules and Nanostructures 4”, Pułtusk, 15-19.05.2013. Tytuł prezentacji: „Protein adsorption and deformations on solid surfaces”.
- Referat (contributed talk) na konferencji „Multi-Pole Approach to Structural Biology”, Warszawa, 18.11.2011. Tytuł referatu: „Ensembles of proteins with disordered segments”.
- Referat (invited talk) na zjeździe „Alumni Meeting of the Max Planck Institute of Colloids and Interfaces”, Poczdam, Niemcy, 03.06.2010. Tytuł referatu: „Conformations of ESCRT CHMP3: insights from simulations and SAXS experiments”.
- Referat (contributed talk) na Zjeździe Niemieckiego Towarzystwa Fizycznego (DPG), Berlin, Niemcy, 25-29.02.2008. Tytuł referatu: „Phase separation in membranes supported on corrugated substrates”.
- Prezentacja plakatu na zjeździe „Alumni Meeting of the Max Planck Institute of Colloids and Interfaces”, Poczdam, Niemcy, 08.06.2007. Tytuł prezentacji: „Adhesion via soluble crosslinkers”.
- Referat (contributed talk) na Zjeździe Niemieckiego Towarzystwa Fizycznego (DPG), Regensburg, Niemcy, 26.03.2007. Tytuł referatu: „Adhesion of membranes with active stickers”.
- Prezentacja plakatu na zjeździe „Alumni Meeting of the Max Planck Institute of Colloids and Interfaces”, Poczdam, Niemcy, 27.05.2005. Tytuł prezentacji: „Adhesion of membranes with active stickers”.
- Prezentacja plakatu na Zjeździe Niemieckiego Towarzystwa Fizycznego (DPG), Berlin, 04.03.2005. Tytuł prezentacji: „Adhesion control of membranes by active stickers”.
- Prezentacja plakatu na konferencji „15th Marian Smoluchowski Symposium on Statistical Physics: Fundamentals and Applications”, Zakopane, 07-12.09.2002, Tytuł prezentacji: „Exact solution of the two-dimensional RSOS model for the wetting transition”.

6.6 Współpraca krajowa i zagraniczna udokumentowana publikacjami naukowymi

- Prof. Marek Cieplak, Instytut Fizyki PAN. Współpraca dotycząca dynamiki konformacyjnej białek wielodomenowych i częściowo nieustrukturyzowanych (publikacje H5-H9), w tym białek celulozomalnych (publikacje H5, H6, H7).
- Prof. Reinhard Lipowsky, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Niemcy. Współpraca dotycząca deformacji błon lipidowych (publikacje M4, M5) i adhezji błon lipidowych, lipidowo-białkowych i komórkowych (publikacje D3-D6 oraz A1-A7).
- Dr hab. Thomas Weikl, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Niemcy. Współpraca dotycząca adhezji błon (publikacje D3-D6, A1-A7) oraz białek adhezyjnych – w ramach projektu „Białka wielodomenowe i częściowo nieustrukturyzowane w procesach rozkładu celulozy i adhezji komórek” wspieranego przez Narodowe Centrum Nauki (program OPUS 11).
- Prof. Gerhard Hummer, Max Planck Institute of Biophysics, Niemcy. Współpraca dotycząca białek wielodomenowych i częściowo nieustrukturyzowanych, w szczególności białek ESCRT

(publikacje H1-H4), kinaz białkowych (publikacja S1) oraz kinaz tworzących kompleksy z fosfatazami (publikacje S2, S3).

- Dr Evzen Boura, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechy. Współpraca dotycząca struktur i funkcji białek błonowych (publikacje M1,M2,M3), deformacji błon lipidowo-białkowych (publikacje H4,M3) oraz konformacji białek w roztworach wodnych badanych przy użyciu metody SAXS (publikacje H2,H3,S4,S6).
- Prof. James H. Hurley, University of California, Berkeley, USA. Współpraca dotycząca białek ESCRT (publikacje H2,H3,H4), błon lipidowo-białkowych (publikacja M3) oraz kinazy białkowej C (publikacja S1).
- Prof. Wolfgang Peti, University of Arizona, USA. Współpraca dotycząca fosfataz i kinaz białkowych (publikacje S2,S3).
- Dr Yunqi Li, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Chiny. Współpraca dotycząca wykorzystania danych z doświadczeń rozproszeniowych SAXS do ukierunkowania symulacji dynamiki molekularnej (publikacja S5).
- Prof. Mirjam Czjzek, Station Biologique de Roscoff, CNRS, Francja. Współpraca dotycząca białek celulozomalnych (publikacja H5).
- Dr Pierre-Andre Cazade, University of Limerick, Irlandia. Współpraca dotycząca własności i funkcji łączników międzydomenowych w białkach celulozomalnych (publikacja H7).

6.7 Kierowanie projektami badawczymi

- „Białka wielodomenowe i częściowo nieustrukturyzowane w procesach rozkładu celulozy i adhezji komórek”. Projekt w ramach programu *Opus 11* zorganizowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Wynik oceny wniosku: drugie miejsce na liście rankingowej w panelu NZ1. Środki przyznane na wykonanie projektu: 278 400 PLN. Data rozpoczęcia: 12.01.2017. Planowana data zakończenia: 11.01.2020.
- „Białka wielodomenowe i multimerowe: zgłębianie ich struktur i mechaniki”. Projekt w ramach programu *Opus 3* zorganizowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Wynik oceny wniosku: pierwsze miejsce na liście rankingowej w panelu NZ1. Przyznane środki: 287 056 PLN. Data rozpoczęcia: 06.03.2013. Data zakończenia: 05.06.2015.
- „Białka z domeną F-BAR w procesach endocytozy i tubulacji błon lipidowych”. Projekt w ramach programu *Iuventus Plus* zorganizowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa wyższego. Wynik oceny wniosku: 68/70 punktów. Przyznane środki: 169 000 PLN. Data rozpoczęcia: 08.07.2013. Data zakończenia: 07.07.2015.

6.8 Stypendia i nagrody naukowe

- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Młodych Wybitnych Naukowców (01.11.2013 – 31.10.2016)
- Międzynarodowe Stypendium Wyjazdowe im. Marii Skłodowskiej-Curie w ramach 7-go Programu Ramowego Wspólnoty Europejskiej (15.10.2009 – 14.10.2012)

7. Działalność na rzecz środowiska akademickiego

7.1 Działalność recenzencka

7.1.1 Recenzje projektów badawczych

- Praca w Zespole Ekspertów Narodowego Centrum Nauki w panelu tematycznym NZ1 w roku

2017:

- recenzje 16 wniosków złożonych od Narodowego Centrum Nauki w 23. edycji konkursów Opus, Preludium i Sonata,
- udział w dwóch spotkaniach panelowych: 13-14 lutego i 10 kwietnia 2017 r.

- Recenzja jednego wniosku dla *National Research, Development and Innovation Office of Hungary (NKFIH)* w roku 2016.

7.1.2 Recenzje publikacji naukowych dla czasopism z listy JCR

- *Physical Review E*, 2008-2017, 22 recenzje
- *Physical Review Letters*, 2009-2016, 20 recenzji
- *Biophysical Journal*, 2008-2017, 18 recenzji
- *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2014-2017, 9 recenzji
- *Soft Matter*, 2012-2017, 7 recenzji
- *Scientific Reports*, 2015-2017, 4 recenzje
- *Journal of Biomechanics*, 2014-2016, 4 recenzje
- *Physical Biology*, 2015-2016, 4 recenzje
- *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2017, 3 recenzje
- *EPL (Europhysics Letters)*, 2012-2017, 3 recenzje
- *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2015-2016, 3 recenzje
- *Science Advances*, 2017, 2 recenzje
- *Chemical Physics Letters*, 2017, 2 recenzje
- *Biomedical Materials*, 2017, 2 recenzje
- *BBA Biomembranes*, 2016, 2 recenzje
- *Journal of Biological Systems*, 2015-2016, 2 recenzje
- *Biophysical Reviews and Letters*, 2008-2012, 2 recenzje
- *Journal of Chemical Physics*, 2016, 1 recenzja
- *Structure*, 2015, 1 recenzja
- *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2015, 1 recenzja
- *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, 1 recenzja
- *Biopolymers*, 2014, 1 recenzja
- *BMC Biophysics*, 2014, 1 recenzja
- *Cell*, 2012, 1 recenzja
- *New Journal of Physics*, 2010, 1 recenzja
- *Journal of Theoretical Biology*, 2007, 1 recenzja
- *Langmuir*, 2007, 1 recenzja

7.2 Działalność dydaktyczna

7.2.1 Zajęcia dydaktyczne w Międzynarodowym Studium Doktoranckim IF PAN

- współprowadzenie semestralnego wykładu „Wstęp do Biofizyki” (cztery dwugodzinne wykłady w semestrze letnim 2014/2015)
- współprowadzenie semestralnego wykładu „Statistical thermodynamics in soft matter and biological physics” (sześć dwugodzinnych wykładów w semestrze letnim 2015/2016)

7.2.2 Zajęcia dydaktyczne na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Marka Napiórkowskiego „Termodynamika fenomenologiczna” (30 godz. w semestrze zimowym 2002/2003)
- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Jerzego Kamińskiego „Matematyka IIIA” (60 godz. w semestrze zimowym 2002/2003)
- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Marka Napiórkowskiego „Mechanika statystyczna” (45 godz. w semestrze zimowym 2003/2004)
- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Ernesta Bartnika „Matematyka IIIA” (60 godz. w semestrze zimowym 2003/2004)
- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Marka Napiórkowskiego „Fizyka statystyczna” (45 godz. w semestrze zimowym 2004/2005)
- prowadzenie ćwiczeń do wykładu prof. Wojciecha Kopczyńskiego „Mechanika klasyczna” (30 godz. w semestrze zimowym 2004/2005)

7.2.3 Opieka naukowa nad studentami odbywającymi praktyki letnie

- Instytut Fizyki PAN, Warszawa, lipiec-wrzesień 2013, dwóch praktykantów
- Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Poczdam, Niemcy, lipiec-sierpień 2007, jeden praktykant

7.3 Działalność w zakresie popularyzacji nauki

- Artykuł popularnonaukowy pt. „Postęp w pomiarach białek nieustrukturyzowanych” opublikowany w czasopiśmie *Wszehświat*, które poświęcone jest upowszechnianiu nauk przyrodniczych (*Wszehświat*, tom 117, nr 10-12/2016, strony 295-304).
- Wykład popularnonaukowy na sympozjum „Physics Under Extreme Conditions” zorganizowanym w ramach Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Instytutu Fizyki PAN. Warszawa, 03.11.2016. Tytuł wykładu: „Life at extreme temperatures”.
- Wywiad dla magazynu *Projects* rozpowszechniającego informacje o europejskich projektach w zakresie badań i rozwoju: Joshua Howgego, artykuł pt. „Spaghetti-like protein structures untangled”, *Projects* **29**: 90-91 (2012).

Bartosz Różycki