

Data: Toruń, 7 stycznia, 2014

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak  
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej  
Instytut Fizyki  
Uniwersytet M.Kopernika w Toruniu  
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5

**RECENZJA rozprawy doktorskiej**

**Mgr Anny Starzyk**

**pt.**

**“Białka w pobliżu powierzchni naładowanych i w warunkach fłoku molekularnego”**

Biocząsteczki, intensywnie badane zarówno metodami eksperymentalnymi, teoretycznymi jak i symulacyjnymi, w naturze niezmiernie rzadko występują w izolowanej postaci indywidualnych molekuł. W warunkach komórki mają zwykle wielu sąsiadów – stężenie (np. białek w komórce *Escherischia Coli*) sięga 400 mg/ml. Mówi się nawet, że obszary komórek są silnie zatłoczone. Wpływ otoczenia na struktury czy dynamikę biopolimerów jest zatem bardzo ważny do zrozumienia podstawowych relacji w przyrodzie, np. łączących strukturę z funkcją białek. Zagadnienie to, na razie słabo poznane, jest obecnie modnym przedmiotem badań a liczba prac analizujących wpływ otoczenia na strukturę biopolimerów ostatnio mocno wzrasta. Dodatkowym, też stosunkowo słabo poznanym problemem, jest kwestia wpływu powierzchni, np. kryształu czy innego materiału, na białka znajdujące się w pobliżu takiej powierzchni. Można przypuszczać, że obecność powierzchni zmienia strukturę i właściwości bioukładu. Zagadnienie to staje się coraz ważniejsze w miarę rozwoju bionanotechnologii. Rozprawa doktorska pani mgr Anny Starzyk poświęcona badaniu białek w pobliżu powierzchni oraz białek znajdujących się w ograniczonej przestrzeni należy do aktualnego i ważnego nurtu badań biofizycznych. Zagadnienia jakie „atakuję” i procesy jakie modeluje doktorantka są bardzo ciekawe i ważne.

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę, napisaną w Instytucie Fizyki PAN W Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Cieplaka, przeczytałem z dużym zainteresowaniem, ale z mieszanymi uczuciami. Jednym z głównych problemów jest forma pracy. Rozprawa składa się ze zwięzłej części napisanej po polsku i Aneksu zawierającego kopie dwóch opublikowanych w dobrym czasopiśmie (*J. Chem. Phys.*) obszernych artykułów. Praca napisana została, jak rozumiem, w ramach nowej ustawy, jednak nie stanowi ona ani klasycznego jednolitego tekstu (choć takowy zawiera) ani prostego „spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych”, chociaż dwa takie artykuły są

zamieszczone w Aneksie. Artykuły te są "dwuautorskie", stanowią w moim rozumieniu pracę zbiorową, zatem odnoszę do nich następujące uregulowanie z obowiązującej ustawy z 2011 roku: „Rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, odpowiadający warunkom określonym w ust. 1.” Tutaj „indywidualny wkład kandydatki” nie jest wykazany „expressis verbis” więc ocena tego wkładu pozostawiona jest domyślności recenzenta. Takie rozwiązanie jest niestandardowe (i w moim mniemaniu nie jest w pełni zgodne z literą ustawy „USTAWA z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw”, Art. 13.1 ). Ponieważ tytuł sugeruje, że językiem rozprawy jest język polski, ocenie mojej poddana została tylko ta część dokumentu, zaś dodanie w Aneksie dwóch publikacji będę traktował jak ułatwienie lektury, gdyż do nich właśnie Autorka najczęściej się odwołuje.

Innym mankamentem jest brak jasno sformułowanego celu pracy. Na podstawie lektury mogę się jedynie domyślać, że celem było zbadanie przy pomocy metod symulacji komputerowej, w ramach modelu pełnoatomowego, wpływu modelowej powierzchni miki na dynamikę czterech wybranych niewielkich białek (tzw. klatki tryptofanowej, domeny białka G, hydrofobiny II; w publikacji z aneksu znajdują się też wyniki dla lizozymu). Drugim celem była zapewne ocena wpływu tzw. tłoku molekularnego na fluktuacje tych białek przy pomocy metod dynamiki gruboziarnistej. Rozprawa doktorska zawiera szereg oryginalnych i wartościowych wyników składających się na realizację tak sformułowanych celów.

Praca doktorska, należy do najkrótszych jakie miałem okazję recenzować – liczy 49 stron, jest też ponadto wspomniany Aneks, na który składają się kopie dwóch publikacji w języku ang. doktorantki (wraz z promotorem) z J. Chem. Phys. (10 str, i 9 str). Rozprawa nie ma spisu treści (nowość). Składa się z 1 stronicowego streszczenia w języku angielskim (*Summary* – zgodnie z wymogami nowej ustawy), sześciu rozdziałów, jednostronicowego Podsumowania, wykazu literatury obejmującego 56 pozycji.

Trzystronicowy rozdział pierwszy, zatytułowany „Oddziaływanie białek z powierzchnią oraz z polem elektrycznym” ma charakter rozdziału wstępnego. Rozdział drugi (1 strona) opisuje problem białek w warunkach tłoku molekularnego. Rozdział 3, „Dynamika molekularna” miał w założeniu prezentować stosowane metody i modele białek oraz powierzchni, obszerny rozdział

4 (16 stron) poświęcony jest opisowi wyników modelowania oddziaływania białek w powierzchni naładowanej miki. W rozdziale 5 Autorka dyskutuje białka w polu elektrycznym (9 stron), zaś ostatni rozdział 9 (9 stron) prezentuje nie opublikowane wyniki symulacji białek w warunkach tłoku molekularnego. W rozprawie znajduje się 31, na ogół wysokiej jakości, rysunków oraz jedna tabela.

Układ pracy jest logiczny, podział treści wydaje się prawidłowy, strona edytorska zaledwie poprawna, zaś zawartość poszczególnych rozdziałów budzi moje pewne zastrzeżenia. Przedstawię kolejno ocenę rozdziałów i uwagi merytoryczne na ich temat. Uwagi formalne podam w dalszej części recenzji.

Rozdział wstępny (1) ma charakter wprowadzeniowo-przeglądowy, zawiera ogólną prezentację tematyki i dość specyficznie profilowany przegląd dotychczasowych publikacji wykorzystujących modele symulacyjne do badania dynamiki białek w pobliżu powierzchni. Omawiane publikacje stanowią pewien autorski wybór z literatury tematu, uzyskane wcześniej wyniki innych badaczy zaprezentowane są w sposób zwięzły, ale wystarczająco rysujący tło stan badań na tym polu. Styl omawiania wcześniejszych prac nie jest zbyt jasny, np. padają taki terminy jak „wewnętrzna stabilność białka” (str. 4), bliżej nieokreślona „częstość adsorpcji lizozymu” (str. 5). Nie ma dyskusji jaki może być mechanizm adsorpcji dodatnio naładowanego białka na dodatnio naładowanej powierzchni. Pojawia się dziwny termin „odczuwalne pole” (str. 6). Rozdział wskazuje na to, że Autorka zdobyła orientację w literaturze związanej w przedmiotem rozprawy.

Rozdział 2. „Białka w tłoku molekularnym” składa się z jednego paragrafu (16 linijek). Nie ma w nim nawet próby definicji tego czym ów „tłok molekularny” jest i czym się różni od „normalnego luzu”. Czy każde otoczenie fizjologiczne białka występującego w komórce oznacza zaraz sytuację tłoku? Jakie mamy standardowe stężenia białek, np. w cytoplazmie, zmierzone doświadczalnie. Nie są cytowane podstawowe przeglądy z tej dziedziny (np. Ellis, R. J. *Macromolecular crowding: obvious but under appreciated*. Trends Biochem. Sci. 26, 597–604 (2001) czy Annu Rev Biophys 2008;37:375-97. *Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences*. Zhou HX, Rivas G, Minton AP - gdzie mamy paragrafy poświęcone symulacjom tłoku molekularnego). Nie ma też np. informacji kto pierwszy zajął się tym ważnym w końcu zagadnieniem (i zawartym w tytule rozprawy !) stosując modelowanie komputerowe? Mam wrażenie, że paragraf został napisany tylko po to, by dać pretekst do zacytowania trzech pozycji [24-26] opisujących wpływ tłoku na

stabilność i proces zwijania białek”. Ten fragment rozprawy jest niedopracowany, został potraktowany „po macoszemu” i pozostawia niedosyt.

Rozdział 3 zatytułowany jest „Dynamika Molekularna”. Jest to podstawowa metoda symulacyjna stosowana w rozprawie, opisano ją ogólnikowo na 1.5 strony. W wielu pracach magisterskich widziałem starannie sporządzone opisy tej metody. Można argumentować, że skoro to jest taki standard to nie warto marnować na opis papieru, czytelnik doktoratu i tak pewnie wie o co chodzi. Zgoda, czytelnik może wie, ale z tak skrótowego autorskiego opisu nie wynika na 100%, że Autorka też wie. Na przykład, nieco dziwi mnie dobór prac jakie przywoływane są w tym rozdziale, nie ma np. żadnej publikacji nawet jednego w trzech noblistów z 2013 – pionierów symulacji komputerowych białek. Na pewno nie zaszkodziłoby przytoczenie wyrażań analitycznych na funkcje energii stosowane w przypadku pola siłowego GROMOS (53A5). Moim zdaniem człon  $V_{\zeta}$  we wzorze (1) nie służy utrzymywaniu „prawidłowych kątów torsyjnych”, a raczej utrzymywaniu planarności wybranych grup atomów. Jednozdaniowy opis algorytmu całkowania równań ruchu to też moim zdaniem „pójście na wielkie skróty”. To i tak więcej niż dyskusja sposobu generowania trajektorii w ramach modelu Go, opisywanego w rozdziale 6.1, gdzie takiego opisu nie ma wcale. Reasumując - i ten rozdział ma raczej charakter „kadłubowy”.

Przyjemna lektura zaczyna się w rozdziale 4. („Oddziaływania białek z powierzchnią naładowanej miki”). Rozdział oparty jest na jednej z publikacji z Aneksu. Model układu i metoda obliczeniowa przedstawione są dość starannie, wprowadzone są parametry umożliwiające śledzenie zmian strukturalnych badanych białek. Jeden z parametrów ( $w$ ) jest stosunkowo niedawno wprowadzony, a pozwala łatwo uchwycić zmiany kształtu cząsteczki. Startowe konformacje pokazane są na przejrzystych rysunkach, szkoda tylko, że jednak nie podano przy rysunku opisów kierunków osi, można się tylko domyślać, że oś  $x$  skierowana jest poziomo w prawo. Rozdział 4 zawiera dużo wyników, są one w większości nowe (dla 3 białek) i dla mnie ciekawe. Autorka poznała co może stać się z ważnymi białkami przy powierzchni modelowej miki, szerzej – modelowej powierzchni obdarzonej ładunkiem ujemnym. Przeprowadziła też symulacje kontrolne dla tej samej powierzchni z ładunkiem wypadkowym zero oraz dla białek zawartych w czystej wodzie. Wyniki wyraźnie pokazują, że są możliwe różne scenariusze wpływu powierzchni na te białka. Możliwe jest zdeformowanie struktury, rozplecenie, albo bardzo nieznaczna modyfikacja. Zgodnie z oczekiwaniami mostki disiarczkowe obecne w jednym z badanych układów silnie stabilizują tę strukturę. Prześledzono też fluktuacje struktury dla wybranych atomów czy par atomów, określono jakie konkretnie aminokwasy pierwsze

„przyklejają się” do powierzchni i uzyskano tym samym wgląd w proces adsorpcji na poziomie atomowym. To są ważne w bionanotechnologii dane, trudne do otrzymania na drodze eksperymentalnej. Wyniki dla poszczególnych białek są krytycznie dyskutowane, Za cenę uważam podjęcie próby symulacji dynamiki tych samych układów w roztworach o różnej mocy jonowej (stężeniach soli). Dyskusyjna może być kwestia, czy w tego typu badaniach słusznym było odrzucenie możliwości ścisłego uwzględnienia oddziaływań elektrostatycznych długozasięgowych poprzez zastosowanie sumowania Ewalda, jednak argumenty „ekonomiczne” autorki (konieczność stosowania b. dużego „pudelka”) są częściowo przekonywujące. Moim skromnym zdaniem, przyjęcie dużego promienia obciążenia w miejsce sumowania Ewalda jest uzasadnione, zaś spełnienie warunku elektoneutralności „primary box” przy zastosowanej powierzchni naładowanej ujemnie miki raczej niemożliwe.

W rozdziale tym zabrakło mi informacji o tym jak są przeliczane liczby jonów stosowane w modelu na podawane potem w opisie stężenia roztworów soli. Nie jest też jasne jak liczono błędy dla prezentowanych np. na Rys 12. wartości fluktuacji położeń. Wspomina się kilkakrotnie określenie kontaktów natywnych wg modelu Go, jednak nie znalazłem informacji jak się te kontakty natywne konkretnie definiuje. W rozdziale 4 zawarte są, moim zdaniem, ważne i oryginalne wyniki, tak szczegółowe opisy mogą się przyczynić do lepszego rozumienia procesów adsorpcji białek na micy.

Rozdział 5, też wywiedziony z publikacji z J Chem Phys., poświęcony jest badaniu białek w polu elektrycznym. Autorka wyznaczyła rozkład pola elektrycznego w pobliżu modelowej powierzchni miki (Rys. 2). Wykresy są informatywne i pokazują jak szybko to pole spada i jak zależy od stężenia jonów. Pola te, przyłożone „z zewnątrz” wydają się duże (do 10 V/nm), byłoby ciekawym porównać je z jakimiś wartościami występującymi w przyrodzie. Wartości w takich nanomodelach trzeba traktować ostrożnie, ale prowadzenie badań zachowania w takich polach uważam za uzasadnione. Pokazane są wyniki dla małego (20 AA) białka - klatki tryptofanowej. Autorka opisuje zachowanie tego układu w różnych polach i zmiennych stężeniach jonów, bada też jakim procesom podlega TrpCage w przypadku startu symulacji ze struktury rozwiniętej. Pomysłowe jest zastosowanie histogramów parametrów  $R_g$  i  $w$  do ilustracji wpływu pola na globalny kształt badanego białka (Rys. 22 i 23). Rozdział ten także zawiera nowe i trudne do uzyskania wyniki. Brakuje w nim pogłębionej dyskusji zauważanych efektów i wyraźnie sprecyzowanych wniosków.

Rozdział 6 poświęcony jest badaniu dynamiki białek w warunkach tłoku molekularnego. Cenny jest sam pomysł – czyli podejście wykorzystujące tanie i efektywne modele gruboziarniste typu modele Go. Tłok tworzyły kule obecne w środowisku o zmiennej masie i promieniu. Śledzono zachowanie 3 białek: krabiny, chymotrypsyny i lizozymu. Obliczono fluktuacje ziaren odpowiadających aminokwasom białek w zależności od zastosowanego poziomu ograniczonej dostępnej objętości (tj. „tłoku”). Stwierdzono, że w każdym białku efekt tłoku na rejony z wyraźną strukturą drugorzędową jest mały, zaś fluktuacje w obszarach bez tej struktury – znaczny, zwłaszcza dla małych modelowych kul o promieniu 4 Å. Wyniki te też uważam za wartościowe. Wyniki doktorantki nie są jednak w żaden sposób skonfrontowane z wynikami innych autorów (są opublikowane różne symulacje, chociaż nie typu CG i dla tych białek) ani skomentowane w kontekście zachowania białek w warunkach komórki. Autorka w tym rozdziale ograniczyła się do przedstawienia faktów: wyników z przeprowadzonych symulacji. Trochę szkoda.

### Uwagi redakcyjne

Rozdziały powinny się zaczynać od nowych stron, ułatwiłoby to czytanie.

W języku polskim tylko pierwszy wyraz zdania zaczynamy wielką literą, wszelkie tytuły, włącznie z tytułem rozprawy są niepoprawnie ortograficznie.

Literówki : ---

Str. 5 jest: „wrostem” powinno być „wzrostem”

Str. 5 „Możemy modulować procesem adsorpcji” – styl

Str. 5 „wyznaczono stężenie zaadsorbowanego lizozymu” - co to jest? Czy chodzi o gęstość powierzchniową??

Str. 6 „ odczuwane pole” – co to jest ?

Str. 6 „ dipole .. tworzone przez geometrie wiązania ...” – sens?

Str. 6 „Literatura wskazuje na to, że zatłoczenie środowiska zewnętrznego nie jest dla białka obojętne..” – niezręczne sformułowanie.

Str. 7 – czy nie ma lepszego polskiego zwrotu na „promień zyracji”?

Str. 7 „ Jedynie wyższe wartości .. etc” – zdanie niezrozumiałe

Str. 7 „ Symulacje stały się szeroko wykorzystywane...” - styl

Str. 7 „przeprowadzanie dynamik” – żargon

Str. 8 „hamitonian” – Hamiltonian

Str. 8 „wyliczamy” – „obliczamy”

Str. 9 „ Rozbudowano wpływ danego modelu powierzchni na dodatkowe białka” – styl

Str. 9 „Dynamika przebiegała w zespole kanonicznym” – żargon

Str. 14 „Białko trzyma się powierzchni” – żargon

Str. 20 „struktury” – struktury

Str. 23 „dwusiarczkowe” – obcenię chemiczna nomenklatura to „disiarczkowe”

Str. 4.3 tytuł podrozdziału „Dynamiki..” - żargon

Str. 35 – brak zdefiniowanej jednostki masy kul tworzących tło

Str. 45 – [21] „Amylod” - Amyloid

Str. 46 – [28] „symulations” – simulations

## **KONKLUZJA**

Przedłożona mi od recenzji rozprawa zawiera wartościowe pomysły i szereg nowych i cennych wyników. Sposób prezentacji zagadnienia i wyników jest w dolnych granicach akceptowalnych standardów - przy pewnym wysiłku ze strony Autorki moja ocena byłaby tutaj na pewno wyższa.

Resumując, stwierdzam, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje w dostatecznym stopniu ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dziedzinie modelowania komputerowego i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Starzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*W. Nowak*