

## Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Joanny I. Sułkowskiej

### *Zwijanie i rozwijanie białek w modelach gruboziarnistych*

(promotor: prof. dr hab. Marek Cieplak)

Fizyka białek jest jednym z tych obszarów nauki, które leżąc na pograniczu kilku klasycznych jej dziedzin (a jest to możliwe, bo struktura nauki jest wielowymiarowa), budzi zainteresowanie biologów, chemików, fizyków, informatyków ... Problemy, jakie są tu badane w zespołach naukowców skupiających specjalistów z przynajmniej paru dziedzin, nie należą do prostych, bowiem same białka nie są prostymi obiektami. Wiemy już dziś wprawdzie, że wszystkie białka składają się z zaledwie 20 aminokwasów, ale prostota jest tu pozorna, bowiem z tych 20 cegiełek można ułożyć olbrzymią liczbę molekuł, których funkcji w żywym organizmie nie da się zrozumieć wyłącznie w oparciu o ich wzór chemiczny. Tym, co decyduje o biologicznej funkcji wielu elementów żywego organizmu, nie są wyłącznie własności chemiczne molekuł, z których elementy te się składają, ale i te fizyczne, nawet najprostsze, takie jak elastyczność. Podajmy spektakularny przykład. Czerwone ciała krwi (erytrocyty), produkowane bez ustanku przez szpik naszych kości, w tempie  $2 \cdot 10^6$  na sekundę, których biologiczną funkcję – transport tlenu do tkanek i usuwanie z nich dwutlenku węgla – dobrze znamy, pełnią swą funkcję nie tylko dzięki wypełniającym je molekułom hemoglobiny (około  $3 \cdot 10^6$  na jeden erytrocyt), ale i determinującym ich własności elastyczne molekułom białek zwanych spektrynami. Patrz np. B. T. Stokke et al. *Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanical properties*, Biophys. J. 49, 319 (1986). Problem polega na tym, iż podczas swej trwającej około 120 dni wędrówce po naszym ciele, każde czerwone ciało musi wielokrotnie przecisnąć się przez naczynia włosowate, tak cienkie, że by się przez nie przedostać, ciało musi ulec silnej deformacji, a tu właśnie jego własności mechaniczne grają decydującą rolę. Podobnych przykładów istotnej roli własności elastycznych białek w pełnieniu ich funkcji biologicznych można podać wiele, wśród nich, cytowany przez doktorantkę, przykład tytyny, białka biorącego udział w pracy mięśni. Patrz: H. P. Ericson, *Stretching single protein molecules: titin as a weird spring*, Science 276, 1090 (1997). Lektura wstępu do rozprawy doktorskiej dowodzi, iż doktorantka doskonale wie, w którym miejscu gwałtownie pędzącego i równie gwałtownie zmieniającego swój kształt frontu badań biofizycznych jej własne miejsce pracy jest ulokowane. Autorka wyjaśnia, jaki sens i jaki

kontekst mają prowadzone przez nią badania. Czytając ten wstęp miałem mocne poczucie, iż napisany on został przez kompetentnego, doświadczonego już naukowca.

Głównym celem, jaki autorka sobie postawiła, było opracowanie gruboziarnistego modelu (typu Go) białek umożliwiającego numeryczne badanie ich własności elastycznych zarówno w aspekcie statycznym, jak i kinetycznym. Najprostsze z możliwych doświadczeń myślowych, jakie można przeprowadzić w celu zbadania własności elastycznych pojedynczej molekuly białka, jest uchwycenie jej końców i wyznaczenie zależności modułu  $F=|F|$  przyłożonej do nich pary rozciągających sił od odległości  $L$  między nimi. Napisałem: „doświadczeń myślowych”, bowiem dla nie-specjalisty jest oczywiste, iż doświadczenia prowadzone na pojedynczych molekułach muszą być myślowe. Jak się jednak okazuje, tak już dziś nie jest, bowiem rozwój technik laboratoryjnych przeniósł doświadczenia nad pojedynczymi molekułami z domeny ludzkiej wyobraźni do rzeczywistości. Istnieje już kilka technik umożliwiających rozciąganie pojedynczych makro-molekuł i pomiar siły, jakiej rozciąganie to wymaga. Najważniejsze z nich to techniki stosowane w mikroskopach sił atomowych – AFM, oraz techniki tzw. szczypec optycznych – OT oraz szczypec magnetycznych -MT. Pierwszy rysunek w rozprawie doktorskiej przedstawia stanowiący dziś klasykę wykres zależności  $F(L)$  uzyskany przez M. Riefa i innych [patrz: M. Rief et al., *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*, Science **276**, 1109 (1997)] dla molekuly tytyny rozciąganej przy użyciu mikroskopu sił atomowych. Okazuje się, że to zwinięte w swe natywną strukturę białko poddane rozciąganiu zaczyna się rozwijać etapami. Kolejne etapy tego rozwijania zaznaczają się na wykresie  $F(L)$  jako gwałtowne spadki wartości siły działającej na oddalane od siebie końce molekuly, a ponieważ sam proces rozwijania zależy od struktury molekularnej badanego białka, wykresy  $F(L)$  można traktować jak jego identyfikator. Jak pisze doktorantka, z około 40 000 białek sklasyfikowanych w Protein Structure Data Bank zaledwie 56 poddano w laboratorium procedurze mechanicznego rozciągania określając parametr  $F_{\max}$ , a więc maksymalną wartość siły, jaką trzeba przyłożyć, by zachować stałe tempo rozciągania. Liczba przebadanych doświadczalnie białek jest niewielka ze względu na skomplikowane procedury doświadczalne, które trzeba przeprowadzić, by dokonać pomiaru. Jest oczywiste, iż wyjściem z tej sytuacji byłoby opracowanie dobrej metody numerycznej symulacji doświadczenia laboratoryjnego. Praca Pani mgr Sułkowskiej idzie w tym właśnie kierunku i, powiedzmy to od razu, wyniki, jakie przedstawiła w swej rozprawie doktorskiej, dowodzą, iż doktorantka ma tu osiągnięcia, które należy określić jako wybitne.

Przejdę do szczegółowej analizy naukowej zawartości kolejnych rozdziałów rozprawy. Rozdział 1 poświęcony jest omówieniu: (a) podstawowych faktów dotyczących samych białek, w szczególności ich składowi chemicznemu, budowy i klasyfikacji ; (b) ich własności mechanicznych. Omawiając własności mechaniczne białek, autorka przejrzyście wyjaśnia szczegóły technik doświadczalnych, w których własności te są mierzone, i ich zakresy pomiarowe, a następnie dokonuje krótkiego przeglądu publikacji, w których opisano pierwsze w historii pomiary i prezentuje w tabeli wartości  $F_{\max}$  uzyskane dla 56 białek w doświadczeniach, w których białka te były rozciągane ze stałą prędkością. Szkoda, że nie pojawiły się tu, omawiane zresztą przez autorkę słownie, wzięte z oryginalnych publikacji, wykresy mechanicznego śladu kilku wybranych białek. Omówieniu wyników doświadczalnych towarzyszy następujące po nim omówienie dotychczasowych wyników symulacji numerycznych prowadzonych w ramach tzw. modeli pełnoatomowych oraz gruboziarnistych. Szczegółowe omówienie jednego z modeli gruboziarnistych, zwanego od nazwiska jego twórcy, modelem Go, znajdziemy w dalszej części rozprawy. Rozdział kończy się krótkim podsumowaniem wyjaśniającym obecny stan wiedzy na temat tych cech i motywów, występujących w danym białku, które determinują jego opór mechaniczny pojawiający się podczas rozciągania.

Króciutki rozdział 2 poświęcony jest bardzo skrótowemu przedstawieniu teorii, na której opierają się techniki symulacyjne, w tym symulacje metodą dynamiki molekularnej. Autorka wyjaśnia przy okazji, jakiej techniki i jakich algorytmów używała w swych własnych symulacjach i na czym polega sama idea modeli gruboziarnistych, w szczególności modelu Go, do którego szczegółowego omówienia przystępuje w rozdziale 3.

Najprostszy model Go białka, zwany modelem  $C^\alpha$ , to taki jego bardzo uproszczony obraz, w którym każdy z aminokwasów reprezentowany jest przez jeden, centralny atom węgla. Takie uproszczenie prowadzi do drastycznej, niezmiernie korzystnej z punktu widzenia czasu symulacji redukcji stopni swobody badanego białka. Współrzędne przestrzenne tych wybranych atomów węgla można odnaleźć w bazie danych PDB. Zastąpienie całych aminokwasów jednym tylko atomem, to jednak tylko pierwszy krok konstrukcji modelu, bowiem, by model ten mógł istotnie reprezentować całe białko w symulowanym doświadczeniu nad jego rozciąganiem, trzeba określić w nim oddziaływania i to w taki sposób, by struktura konformacji o globalnie minimalnej energii była zgodna z wyznaczoną w doświadczeniu strukturą natywną modelowanego białka. Oddziaływania, jakie należy tu wziąć pod uwagę, to nie tylko w miarę proste, bo w pierwszym przybliżeniu harmoniczne oddziaływanie pomiędzy kolejnymi atomami węgla, ale i oddziaływania

odpowiedzialne za lokalną sztywność łańcucha tych atomów, przy czym należy tu uwzględnić nie tylko energię zależną od kątów pomiędzy kolejnymi segmentami łańcucha, a ta silnie zmienia się przy jego zginaniu, ale i kąty dwuścienne odpowiedzialne za jego skręcanie podczas rozciągania. Do wymienionych wyżej oddziaływań trzeba jeszcze dołożyć oddziaływania pomiędzy atomami nie będącymi w łańcuchu swymi najbliższymi sąsiadami. Oddziaływania te zależą od wyboru tzw. mapy kontaktów, a ponieważ jej wybór nie jest jednoznaczny, prowadzący symulacje ma tu coś istotnego do zrobienia, szczególnie, że jego celem jest zbudowanie modelu, który zgodnie z wyjściowym założeniem ma w symulowanym doświadczeniu zachowywać się tak, jak modelowana molekula wybranego do symulacji białka. Kolejne podrozdziały zawierają szczegółowe wyjaśnienia, w jaki sposób poszczególne człony potencjału konstruowanego modelu są definiowane, a możliwości jest tu wiele, bowiem na przykład w definicji potencjału odzwierciedlającego tzw. oddziaływania natywne mamy do wyboru 6 ich form. Bardzo interesująca jest umieszczona w podrozdziale 3.1.2 konfrontacja potencjału kąтового z tzw. potencjałem chiralnościowym, bowiem z punktu widzenia algorytmów symulacyjnych potencjał chiralnościowy ma, ze względu na swą prostotę, olbrzymią przewagę nad potencjałem kątowym. W pod-podrozdziale 3.1.3 autorka omawia wybór wspomnianej wyżej mapy kontaktów. Wybór ten jest kluczowy, a technik jego dokonania jest kilka; autorka omawia 3. Podrozdział 3.1 poświęcony konstrukcjom modeli  $C^\alpha$  kończy się omówieniem różnych metod definiowania zbioru parametrów określających oddziaływania między parami aminokwasów białka; zbiór ten określany jest skrótowo jako *skala energii*. Muszę przyznać, iż czytanie tego fragmentu rozprawy sprawiło mi trudność, bowiem autorka posługuje się w nim skrótowym żargonem, jakiego dla wygody prawdopodobnie używała w dyskusjach z promotorem. Pisze na przykład, że „... każdy natywne kontakt oddziałuje z taką samą siłą,  $E_{ij}=\varepsilon$  i takim samym potencjałem. W tym przypadku energia w stanie natywnym ma wartość liczby natywnych kontaktów.” Nie mogłem zorientować się, o co tu chodzi. Siła jest pochodną (ze znakiem minus) energii potencjalnej po odległości między oddziaływującymi cząstkami, a nie energią. Coś tu nie gra w opisie, bo że rachunki były wykonywane poprawnie, nie ma wątpliwości. Będzie dobrze, jeśli autorka wyjaśni ten fragment podczas obrony.

Podrozdział 3.2 zawiera opis bardziej wyrafinowanego modelu gruboziarnistego zwanego modelem Go z grupami bocznymi i oznaczanego  $C^{\alpha-\beta}$ . Lektura rozdziału 3 przekonuje, iż konstrukcja dobrego modelu Go konkretnego białka nie jest zadaniem prostym, bowiem niemal na każdym jej kroku mamy do wyboru kilka możliwości, co powoduje, iż

sumaryczna liczba możliwych do skonstruowania modeli jest olbrzymia. Jak to pisze autorka we wstępie do kolejnego rozdziału, wariantów tych jest 504, z których 61, określonych przez autorkę jako najbardziej realistyczne, zostanie poddane ocenie w celu wyboru wariantu najlepszego.

Podsumowując tę część rozprawy stwierdzam, iż autorka wykonała doskonałą robotę opisując cztery klasy wyborów, których należy dokonać, by w końcu zdefiniować konkretny wariant modelu Go. Wybory te, dla każdej z czterech ich klas, zostały precyzyjnie oznaczone. Tabela 3.1 zawiera wszystkie oznaczenia.

Rozdział 4 zawiera wyniki prowadzące do wyboru tego wariantu modelu Go, który jest optymalny z punktu widzenia zgodności wyników uzyskanych z symulacji doświadczenia nad rozciąganiem białka z wynikami, jakie uzyskuje się z doświadczeń laboratoryjnych.

- ) Autorka podkreśla, iż model optymalny z tego punktu widzenia powinien być lepszy od modelu, który można określić badając zwijanie białka, a ponadto ma on dobrze określony jeden parametr – opór maksymalny  $F_{\max}$ , którego wartość jest łatwa do weryfikacji doświadczalnej. Poszukiwanie optymalnego modelu autorka przeprowadziła badając 29 białek, które znajdujemy w tabeli 4.1. Białka te były rozciągane dokładnie w ten sam sposób, w jaki czyniono to w doświadczeniu, a więc poprzez przyłożenie siły do tych samych aminokwasów. By uwzględnić fakt, iż w realnych doświadczeniach rozciągane molekule są zanurzone w wodzie o określonej temperaturze, co prowadzi do ich ruchów termicznych, symulacje prowadzone były metodą dynamiki molekularnej z termostatem Langevina. Równania ruchu opisane w pod-podrozdziale 2.1.1 zawierały prócz oczywistego członu sił wynikających z przyjętego w modelu potencjału oddziaływań, siłę oporu lepkiego, proporcjonalną do prędkości cząstek. Współczynnik proporcjonalności (stała tłumienia  $\gamma$ ) w tym członie był tak dobrany, by oscylator harmoniczny, jaki każda z cząstek symulowanego łańcucha tworzy oddziałując z pozostałymi, był przetłumiony. W akapicie zatytułowanym *Symulacje rozciągania* na stronie 59 autorka podaje wartość stałej sprężystości symulowanych sprężyn, do których rozciągana molekule jest przymocowana oraz prędkość, z jaką jedna z nich jest ciągnięta. W terminach realnego doświadczenia prędkość ta wynosiła około  $10^5$  nm/s, a więc, jak pisze autorka, „zaledwie o rząd wielkości więcej niż maksymalna doświadczalna prędkość”.

Przejdźmy do omówienia wyników symulacji. Stosując wybrany wariant modelu Go autorka wykonała symulacje dla zbioru  $D$  białek wyznaczając dla każdego z nich maksymalną siłę oporu  $F_{\max, \lambda}^t$ , gdzie  $\lambda=1, 2, \dots, D$ , jaka pojawiła się podczas ich rozciągania. Starając się określić jakość wybranego modelu, autorka wyznaczała tzw. współczynnik korelacji Pearsona

$R$  mający określić średnią zgodność znalezionych w symulacjach wartości  $F_{\max,\lambda}^t$  z wartościami  $F_{\max,\lambda}^c$  wyznaczonych w doświadczeniach laboratoryjnych. Patrz równanie (4.1), w którym zdefiniowano wartość  $R^2$ . Autorka pisze, że „... im bliżej wartość  $R^2$  znajduje się jedynki, tym bardziej dwa zbiory danych są podobne, natomiast wartość  $R^2$  równa zero oznacza brak jakichkolwiek korelacji.” O ile prawdziwość pierwszej części tego stwierdzenia jest oczywista, to trudno zgodzić mi się z drugą jego częścią. Będę wdzięczny, jeśli autorka podczas obrony swej rozprawy przedstawi rozumowanie, które doprowadziło ją do takiej konkluzji. Ponieważ współczynnik korelacji Pearsona może przeszacowywać wady badanego modelu w sytuacji, gdy model ten zdecydowanie źle funkcjonuje dla paru białek, podczas gdy dla pozostałych działa doskonale, autorka zdecydowała się wykorzystać w ocenie jeszcze jeden parametr: tzw. współczynnik Thiela  $U$ , który ocenia wybrany model sprawdzając różnice w poprawności jego przewidywań dla białek uporządkowany zgodnie z wartościami ich eksperymentalnie wyznaczonej wartości oporu maksymalnego. Tym razem, im lepszy model, tym mniejsza wartość współczynnika  $U$ . Zastosowanie do oceny obu współczynników daje regułę: model tym lepszy, im większe  $R$  i im mniejsze  $U$ . Przyznaję, że czytając ten fragment rozprawy miałem trudności w zrozumieniu szczegółów procedury, jaką autorka stosowała wyznaczając wartości współczynników  $R$  i  $U$ . Będę wdzięczny, jeśli podczas obrony autorka nieco szerzej wyjaśni stosowany przez siebie algorytm.

Ciekawym problemem, przed jakim stanęła autorka rozprawy, był wybór temperatury, w której prowadzono symulacje procesu rozciągania białek, a że jest to problem istotny widać na przykład na rysunku 4.6, gdzie przedstawiono zależność sił oporu, jaki stawia rozciągana tytyna modelowana wariantem Go z  $V^A$ , od rozsunęcia symulowanego imadła, w które uchwyciono rozciąganą molekułę. Jak jasno widać, moment pojawienia się charakterystycznego zaniku siły oporu silnie zależy od temperatury, w której prowadzone jest symulowane doświadczenie; jednocześnie, w naturalny sposób zmienia się też wartość  $F_{\max}$ . (Oś pionowa rysunku jest tu wadliwie oznakowana.) Z trzech możliwości, których nie będę tu omawiał, autorka w większości przypadków wybrała temperaturę, w której proces zwijania białka przebiega najszybciej. Uzasadnienie tego wyboru zaprezentowane przez autorkę jest bardzo przekonujące.

Dalsze części rozdziału przedstawiają wyniki wyteżonej pracy autorki, której celem było znalezienie optymalnego wariantu modelu Go, tzn. tego z 61 przebadanych wariantów, który najlepiej przewiduje wartość mierzonego w doświadczeniu oporu maksymalnego. Korelacje pomiędzy wartościami oporu maksymalnego  $F_{\max}$  przewidywanymi przez wybrany wariant modelu dla 29 wybranych białek, a jego wartościami eksperymentalnymi

przedstawiono w tabelach od 4.2 do 4.9 oraz na rysunkach 4.8 i 4.9. Duża liczba porównywanych ze sobą wyników powoduje, że dla nie-specjalisty ich analiza jest dość trudna. Na szczęście autorka dokonuje sama tej analizy i wskazuje, który z wariantów modelu daje najwyższy wskaźnik korelacji  $R^2$ . Okazuje się, że jest to model oznaczony jako  $\{6-12, C, M3, E^0\}$ . Doskonale widać to na rysunku 4.7, na którym autorka zestawiała ze sobą wartości współczynników Pearsona i Theila, i na którym model  $\{6-12, C, M3, E^0\}$  znajduje się w prawym dolnym rogu zbioru punktów reprezentujących wyniki uzyskane dla całego, olbrzymiego zbioru przebadanych modeli. Ten syntetyczny wykres jest wynikiem dziesiątków godzin pracy, jaką autorka musiała wykonać, by zaznaczyć na nim każdy punkt.

Rozdział 5 rozprawy poświęcony jest zbadaniu zdefiniowanych uprzednio wariantów modelu Go pod kątem ich przydatności w symulacjach procesu zwijania białek. Symulacje te startują z przypadkowej, rozwiniętej konformacji molekuly białka i badają proces jej ewolucji do konformacji zwiniętej, która powinna być jego konformacją natywną. Istotnym parametrem jest tu czas potrzebny na dotarcie do tej konformacji nazwany przez autorkę *czasem zwinięcia* i oznaczonym jako  $t_{\text{fold}}$ . Czas ten zależy od temperatury, w której białko zwija się, i jak to już pokazano w poprzednim rozdziale na rysunkach 4.2 i 4.3 zależność ta ma kształt litery U, a więc istnieje temperatura  $T_{\text{min}}$ , w której zwijanie przebiega najszybciej. Problem jest jednak bardziej skomplikowany, bowiem czas zwijania to tylko jeden z parametrów. Chcąc określić przydatność danego modelu do symulowania procesu zwijania trzeba sprawdzić, jaką drogą zwijanie to przebiega, a droga ta jest dobrze określona przez tzw. diagram scenariuszowy, na którym zaznacza się w jakim momencie procesu ustalają się kontakty pomiędzy odpowiednimi cząstkami modelu. Zauważmy, iż podobną technikę autorka stosowała badając proces rozciągania białek zaznaczając na diagramie scenariuszowym dla jakiego przesunięcia  $d$  dany kontakt jest zrywany jako ostatni. Rysunki 5.1, 5.2 i 5.3 przedstawiają diagramy scenariuszowe dla różnych wariantów modelu Go tytyny, którą wybrano z tego względu, że należy ona do tzw. *trudnych zwijaczy*. Widać wyraźnie, jak w rozkładzie scenariuszy pojawiają się charakterystyczne ścieżki. W podsumowaniu autorka stwierdza, iż można by spróbować, który z modeli dawałby najlepszą zgodność z doświadczeniem. Oczywiście wykonanie takiej pracy, to zadanie niezmiernie ambitne, godne habilitacji.

Rozdział 6 rozprawy zawiera wyniki przeglądu własności mechanicznych białek wziętych z bazy PDB i zbadanych przy pomocy optymalnego modelu Go zdefiniowanego w rozdziale 4. Autorka wybrała 7520 białek złożonych z mniej niż 40 i nie więcej niż 150 aminokwasów oraz 230 białek, których długość jest większa od 150. Dla zbiorów tych

autorka wykonała symulacje rozciągania wyznaczając maksymalny opór  $F_{\max}$  znajdując 134 z nich, dla których opór ten jest największy, a następnie zidentyfikowała sześć występujących w nich motywów odpowiedzialnych za ten rekordowy opór.

Olbrzymia liczba przebadanych białek pozwoliła autorce przyrzeć się pewnym regularnościom statystycznym. Na rysunku 6.1 widzimy histogram określający prawdopodobieństwo pojawienia się danej wartości  $F_{\max}$ . Rozkład ten mający asymetryczny kształt posiada wyraźne maksimum w okolicy  $1.5 \text{ } \epsilon/\text{A}$ . Zaznaczono na nim miejsce, w którym pojawia się intensywnie badana w poprzednim rozdziale tytyna. Autorka podkreśla, że tytyna należy wprawdzie do białek o dużym  $F_{\max}$ , ale istnieją białka o  $F_{\max}$  dwukrotnie większym. Inny punkt widzenia na uzyskane wyniki przedstawia rysunek 6.2, na którym po prostu wykreślono wartość  $F_{\max}$  w funkcji długości  $N$  białka. Wykres ten jest bardzo rozmyty, bowiem dla danego  $N$  istnieją białka o  $F_{\max}$  o bardzo różnych wartościach, jednak uśrednienie, którego dokonała autorka, ujawnia, że średnie wartości  $F_{\max}$  obliczone dla kolejnych  $N$  całkiem dobrze układają się na niemal liniowym wykresie. W podobny sposób autorka zbadała opór maksymalny w zbiorze 239 białek o długości większej od 150 (i mniejszej od 851). Wyznaczenie  $F_{\max}$  dla tych białek jest znacznie trudniejsze, bowiem czas obliczeń dla białek o  $N > 500$  jest bardzo długi. Co gorsza, dla tak długich białek na wykresach  $F(d)$  pojawia się wiele maksimumów, i które z nich będzie maksimum globalnym trudno powiedzieć przed ujrzeniem całego wykresu. Autorka szczegółowo analizuje uzyskane wyniki. Nie będę ich jednak omawiał, ponieważ nie będąc specjalistą w tej dziedzinie, trudno mi ocenić wagę sformułowanych konkluzji. Wyniki te są z pewnością bardzo interesujące dla biologów, dla których struktury różnych białek są równie przejrzyste, jak dla zawodowych muzyków struktury wszystkich utworów stworzonych przez Jana Sebastiana. Pozwolę sobie jednak skomentować parę odkryć dokonanych przez autorkę. W pod-podrozdziale 6.2.4 analizuje ona wpływ temperatury na kształt zależności  $F(d)$ . Można oczekiwać, iż rosnąca temperatura ułatwia rozwijanie rozciąganego białka. Naturalnym więc wynikiem porównania wykresów  $F(d)$  uzyskanych w niskiej (zerowej) temperaturze z wykresami uzyskanymi w wysokiej temperaturze wysokiej (pokojowej) powinno być jedynie zmniejszenie amplitudy widocznych pików. Okazało się jednak, że w zbiorze badanych białek znajdują się i takie, dla których wykres  $F(d)$  zmienia swój kształt. Problem ten jest interesujący z czysto fizycznego punktu widzenia. Ciekawy jest też pod-podrozdział 6.2.6, w którym autorka identyfikuje te fragmenty struktury białek, które są odpowiedzialne za pojawienie się dużego oporu. Fragmenty te nazywane są przez autorkę *imadłami*. Rysunek 6.11 przedstawia 6 typów takich imadeł, zaś rysunek 6.15 nowe ich typy odkryte przez autorkę.



W rozdziale 6 autorka zajęła się białkami, w których natywnej strukturze pojawiają się węzły. W chwili obecnej znanych jest około 300 białek, w których strukturze zidentyfikowano węzły  $3_1$ ,  $4_1$  oraz  $5_2$ . Oczywiście, ze względu na to, że molekuły, na których węzły te zostały zawiązane nie są cykliczne, mamy tu do czynienia z węzłami otwartymi. Ciekawym problemem jest tu osobliwy proces, w którym podczas zwijania białka zostaje ono zawężone, ale to nie on był głównym obiektem badań autorki, bowiem skoncentrowała się ona bowiem na rozciąganiu zawężonych białek prowadząc symulacje dla 18 białek z węzłem  $3_1$  oraz dwóch białek z węzłem  $5_2$ . Symulacje prowadzono przy kilku prędkościach rozciągania. Można by oczekiwać, iż rozciąganie białka, w którego strukturze zlokalizowany jest węzeł, prowadzi nieuchronnie do jego zaciśnięcia, tak jednak nie musi być w sytuacji, gdy warunki brzegowe pozwalają na jego ześlizgnięcia się z białkowego łańcucha. Problem polega na tym, iż zanurzona w termostacie molekula białka nieustannie fluktuuje, co może prowadzić do dyfuzyjnego przemieszczania się węzła w stronę jednego z końców białka i w efekcie do jego rozplątania. Jeśli jednak węzeł nie zostanie rozplątany, zaciśnie się, a miejsce jego lokalizacji zostanie ustalone. Rysunek 7.7 pokazuje te miejsca w jednym z badanych białek, w których zatrzymują się końce węzła podczas jego zaciskania. Interesujący problem został przez autorkę zasygnalizowany w pod-podrozdziale 7.2.3. Autorka opisuje w nim symulowane doświadczenia, w których węzeł zawiązany na białku zostaje zaciśnięty, a następnie końce białka zostają uwolnione. Powstaje pytanie, czy po uwolnieniu białko zawsze powróci do swej konformacji natywnej. Jak pisze autorka, tak nie jest, bowiem istnieją takie miejsca lokalizacji zaciśniętego węzła, powrót do konformacji natywnej okazuje się niemożliwy. Autorka przekonująco diagnozuje przyczyny takiej sytuacji.

Rozdział 8 prezentuje zainstalowaną na serwerze IFPAN bazę danych BSDB (Biomolecule Stretching Data Base), w której autorka złożyła wyniki swych symulacji. Autorka opisując to osiągnięcie używa liczby mnogiej, co jest naturalne, bowiem stworzenie takiej bazy będącej danej wymaga konsultacji zawodowego informatyka. Jak to stwierdziłem zaglądając do BSDB, autorka współpracowała tu z Panem Bartłomiejem Witkowskim, którego nazwisko tu przytaczam, by oddać mu honor.

W rozdziale 9 autorka przedstawia bardzo interesujące wyniki swych prac nad przewidywaniem kolejności rozrywania kontaktów w rozciągany białku poprzez analizę drgań własnych tzw. sieci gaussowskiej, którą można zdefiniować dla każdej z konformacji, przez które rozciągany model Go przechodzi podczas rozciągania. Pomysł polega na tym, że pary węgli  $C^\alpha$ , stanowiących szkielet modelu Go, znajdujące się w odległości mniejszej niż pewna konkretna wartość, można połączyć identycznymi sprężynami tworząc elastyczną,

trójwymiarową sieć, której drgania własne określają amplitudę ruchów fluktuacyjnych poszczególnych jej węzłów. Przykład takiej sieci zdefiniowanej dla tytyny przedstawiona jest na rysunku 9.1. Największy wkład w amplitudę tych ruchów mają oczywiście drgania własne o najniższej częstotliwości. Odpowiednie obliczenia pozwalają wyznaczyć wartość średniego kwadratowego wychylenia każdego z atomów węgla, a to pozwala przewidzieć, w którym miejscu nastąpi zerwanie kontaktu. Problem jest jednak bardzo złożony i autorka poświęciła mu dużo uwagi. Niestety, rozumowania, które prowadzi są zbyt złożone, by je tu omawiać.

Ostatni rozdział rozprawy poświęcony jest problemowi termicznego rozwijania białek. W rozdziałach poprzednich autorka badała przydatność modeli Go do symulowania procesów ich mechanicznego rozwijania i termicznego zwijania. W pierwszym przypadku białko jest rozwijane ze swej konformacji natywnej przez ciągnięcie ze stałą prędkością jednego z jego końców, podczas gdy drugi koniec pozostaje zaczepiony. W drugim wypadku symulacja wychodzi z przypadkowej konformacji rozwiniętej i ponieważ końce białka są swobodne, białko zwija się minimalizując swą energię swobodną. Tak dzieje się, gdy temperatura jest odpowiednio dobrana bowiem, jak to pokazała autorka, znaczne zwiększenie albo znaczne zmniejszenie temperatury zwalnia proces zwijania. Jednak wydłużenie czasu zwijania wywołane wzrostem temperatury jest istotnie różne w swej naturze od jego wydłużenia wywołanego jej zmniejszeniem, bowiem jeśli temperatura będzie zbyt wysoka, białko w ogóle nie będzie się zwijało, a wręcz przeciwnie, zwinięte w stanie początkowym rozwinię się spontanicznie. Autorka bada ten proces ilościowo starając się wyznaczyć temperaturę charakterystyczną dla procesu termicznego rozwijania białka. Rysunek 10.3 przedstawia histogramy czasów rozwijania znalezione dla tytyny w trzech różnych temperaturach. Widać wyraźnie, że istotnie istnieje temperatura powyżej której proces rozwijania jest niemal natychmiastowy. W kolejnych dwóch podrozdziałach autorka porównuje procesy termicznego rozwijania i zwijania białek oraz ich termiczne i mechaniczne rozwijanie.

Podsumowując swą recenzję stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Sułkowskiej jest wyjątkowa. Po pierwsze, zawiera olbrzymią ilość bardzo szczegółowo przedyskutowanych wyników, z których, jak to kilkakrotnie autorka wskazuje w tekście rozprawy, wiele zostało już opublikowanych. Po drugie, widać wyraźnie, iż prace przez nią wykonane prowadzone były z jasno określoną myślą przewodnią. Jest w tym z pewnością wiele zasługi promotora, ale lektura rozprawy przekonuje, iż doktorantka doskonale zrozumiała, jaki cel ma jej praca i systematycznie do tego celu dążyła. Czytając rozprawę miałem wrażenie, iż została ona napisana przez w pełni ukształtowanego, samodzielnego naukowca. Wnoszę o przyjęcie rozprawy i przejście do kolejnych etapów przewodu

doktorskiego. Proponuję też, by Rada Naukowa rozważyła możliwość wyróżnienia rozprawy i wysunięcie jej autorki do jednej z nagród przyznawanych młodym naukowcom.

Tekst rozprawy zawiera pewną (rozsądną z punktu widzenia entropii tak obszernego dzieła) liczbę błędów literowych i interpunkcyjnych, co w niczym nie obniża jej wartości.

Piotr Pirański

Poznań, 8 listopada 2007 r.