

Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Gdańsk, dnia 16.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Vu Van Quyena pt. „Influence of the ribosome on protein ejection and folding”

Zwijanie białek oraz siły i mechanizmy rządzące tym procesem są przedmiotem intensywnych badań, zarówno eksperymentalnych jak i teoretycznych, od ponad pół wieku. Małe białka (do 100 reszt aminokwasowych) podlegają odwracalnej denaturacji i renaturacji po usunięciu czynnika denaturującego, o ile denaturacja nie odbywała się w drastycznych warunkach. Natomiast duże białka, w szczególności białka wielodomenowe, posiadają złożoną kinetykę zwijania. Często wymagają one białek opiekuńczych (chaperonów) aby osiągnąć strukturę natywną. Jednym z postulowanych mechanizmów zwijania białek jest mechanizm kotranslacyjny, według którego zsynchronizowana już część białka zaczyna się zwijać od razu, w tzw. przedpokoju (westybulu) rybosomu, który ogranicza dostępną przestrzeń. Ten proces był przedmiotem teoretycznych badań przeprowadzonych przez Pana mgra Vu Van Quyena a wynikiem tych badań jest przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Kandydata, wykonana pod kierunkiem znanego w Polsce i na świecie naukowca zajmującego się od lat teoretycznymi badaniami zwijania i agregacji białek, prof. dra hab. Maisuana Li.

Preambuła rozprawy składa się z oświadczenia Kandydata potwierdzającego, że przedstawiony materiał powstał w toku Jego badań prowadzonych w celu uzyskania stopnia naukowego doktora oraz spełnienie warunków rzetelności i uczciwości naukowej, streszczenia w języku angielskim, streszczenia w języku polskim, spisu publikacji będących podstawą rozprawy oraz innych publikacji Kandydata, spisu treści, spisu rysunków, spisu tabel, wykazu skrótów, podziękowań i dedykacji. Główna część rozprawy składa się z 13-stronicowego wstępu, stanowiącego rozdział 1, 17-stronicowego opisu stosowanych metod obliczeniowych, stanowiącego rozdział 2, reprintów trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy, każda z których poprzedzona jest krótkim wstępem, streszczeniem i oświadczeniami Kandydata oraz współautorów, określających ich wkład do danej publikacji (rozdziały 3 – 5), wniosków oraz kierunków przyszłych badań (rozdział 6) i spisu odnośników literaturowych. Główna część rozprawy zajmuje 112 stron, włączając reprinty publikacji. Cała rozprawa, z wyjątkiem polskojęzycznej wersji streszczenia, jest napisana w języku angielskim.

Publikacje będące podstawą recenzowanej rozprawy ukazały się w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych, odpowiednio *J. Am. Chem. Soc.*, *Chem. Sci.* oraz *J. Phys. Chem. B*. Zostały one pozytywnie ocenione pod względem merytorycznym przez niezależnych recenzentów. Wszystkie prace powstały we współpracy z grupą prof. O'Briena z Pennsylvania State University. Kandydat jest pierwszym autorem dwóch z trzech publikacji składających się na rozprawę. Według oświadczeń, wykonał i zinterpretował wyniki symulacji komputerowych do publikacji 2 i 3 oraz część (symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej) do publikacji 1. Samodzielność i wkład pracy Kandydata do rozprawy nie budzą żadnych wątpliwości. Kandydat jest ponadto współautorem jednej innej pracy opublikowanej w *Biochemistry*, jednej przyjętej do druku w *Nat. Commun.* oraz dwóch, które są obecnie na etapie preprintów zdeponowanych w *bioRxiv* (w tym pierwszym autorem jednej z nich).

We wstępie Kandydat omawia strukturę białek oraz problem zwijania białek, nawiązując przy tym do słynnego paradoksu Levinthala oraz rozwiązującej ten paradoks teorii "lejka" (*folding funnel*) która mówi, że hiperpowierzchnia energii białka ma strukturę hierarchiczną, co dramatycznie redukuje zakres przeszukiwanych konformacji. Następnie dyskutuje rolę oddziaływań hydrofobowych w procesie zwijania. W kolejnych podrozdziałach omawia strukturę rybosomu oraz kotranslacyjne zwijanie białek na rybosomie wskazując, że rybosom może spełniać zarówno rolę przyspieszającą jak i opóźniającą zwijanie. Część wstępu na temat rybosomu kończy porównanie ścieżek zwijania na rybosomie oraz poza nim. Wstęp kończy się podaniem celu pracy, którym było zbadanie wpływu rybosomu, w szczególności oddziaływań z jego tunelem, na zwijanie białek. Cel ten został rozbity na trzy cele szczegółowe: (i) zbadanie, w jaki sposób oddziaływania elektrostatyczne z kanałem rybosomu wpływają na szybkość opuszczania rybosomu przez białko, (ii) zbadanie modelowych oddziaływań hydrofobowych w kanale rybosomu i porównanie ich z oddziaływaniami w jego nieobecności oraz (iii) porównanie ścieżek i kinetyki zwijania kotranslacyjnego wybranych białek ze zwijaniem poza rybosomem.

Wstęp jest napisany dobrze i może służyć jako świetne kompendium wiedzy o zwijaniu białek na rybosomie (jakkolwiek nie ogólnie o mechanizmach zwijania białek). Tym niemniej mam do tej części rozprawy uwagi krytyczne. Po pierwsze, tytuł podrozdziału 1.1., "Protein and the folding problem", zawiera błąd gramatyczny; powinno być „Proteins”, ponieważ nie mówi się tutaj o jakimś jednym białku ale o białkach w ogóle. W pierwszym zdaniu tegoż podrozdziału jest stwierdzenie „proteins have emerged as the most complex structures known to science.” Nie jest to prawdą, ponieważ można łatwo wymienić struktury bardziej złożone, chociażby wirusy. Natomiast białka są zapewne naturalnymi makromolekułami o najbardziej złożonej strukturze przestrzennej. Na stronie 2, w liniach 14 i 15 jest stwierdzenie „many proteins must self-assemble into specific structures (known as native states)” – raczej „known as native structures”, ponieważ natywny stan białka obejmuje jego strukturę jako jeden z elementów.

W części metodologicznej Kandydat na wstępie (podrozdział 2.1) omawia metodę dynamiki molekularnej. Słusznie przytacza tutaj hipotezę ergodyczną, która jest podstawą obliczania wartości średnich z trajektorii dynamiki molekularnej, które można następnie porównać z odpowiadającymi im wielkościami eksperymentalnymi. Natomiast w rozdziale tym powinna znaleźć się informacja o tym, jakie zespoły statystyczne można symulować metodą dynamiki molekularnej a dalej, jak kontrolować temperaturę/ciśnienie i chociaż wspomnieć o algorytmach rozwiązywania równań ruchu, w szczególności tych z grupy algorytmów symplektycznych oraz o tym, dlaczego trzeba stosować krótki (femtosekundowy) krok czasowy w symulacjach dynamiki molekularnej. Powinna też pojawić się informacja o dynamice Langevina i Browna, które Kandydat wykorzystuje w symulacjach gruboziarnistych. W drugiej części podrozdziału Kandydat wymienia najczęściej stosowane pakiety programów dynamiki molekularnej oraz po-

daje definicję pól siłowych, z rozróżnieniem pól pełnoatomowych i gruboziarnistych oraz krótko dyskutuje zalety i wady każdego z tych trybów modelowania.

W podrozdziale 2.2, Kandydat omawia w sposób ogólny pełnoatomowe pola siłowe oraz odpowiednie wkłady do energii. Znalazłem tutaj jedno niezręczne sformułowanie: w linii 3 pod równanie 2.2 na str. 17 pojawia się stwierdzenie „the third term represents the dihedral potential between four points”, co jest bardzo niejasnym sformułowaniem, bo nie wiadomo o jakie 4 punkty chodzi. W podrozdziale 2.3, Kandydat omawia używany w pracy model gruboziarnisty oparty o centra zakotwiczone w atomach węgla α , opracowany w grupie prof. O’Briena. Jest to zmodyfikowany model typu G \bar{o} , którego parametry są tak dobrane aby struktura natywna danego białka była globalnym minimum jego energii. Podrozdziały 2.4 i 2.5 są poświęcone opisowi modelowania odpowiednio pełnoatomowego i gruboziarnistego rybosomu 50S z *E. coli*, podrozdziały 2.6 i 2.7 odpowiednio sterowanej dynamice molekularnej i metodzie próbkowania „parasolowego” (*umbrella sampling*), wraz z analizą wyników metodą ważonych histogramów. Podrozdziały 2.8 – 2.11 są poświęcone metodom analizy wyników: dekompozycji potencjału średniej siły na wkład energetyczny i entropowy, określeniu tetraedryczności otoczenia cząsteczek wody, kontaktów natywnych, czasów zwijania i parametru postępu zwijania ζ , jak również parametrów zapętlenia kontaktów międzyresztowych. W tym zestawie brakuje bardzo ważnego opisu metodologii symulacji syntezy z kotranslacyjnym zwijaniem białka na rybosomie, opracowanej w grupie prof. O’Briena. Czytelnik musi sięgnąć do materiałów pomocniczych z odnośnika 11 (*Nat. Chem.*, **2023**, 15, 308–318) trzeciej pracy będącej podstawą rozprawy (*J. Phys. Chem. B*, **2023**, 127, 21, 4761–4774). Wspomniana praca z opisem metodologii jest co prawda również cytowana jako odnośnik o numerze 116 ale w zupełnie innym kontekście, w podrozdziale poświęconym używanemu w pracy modelowi gruboziarnistemu typu G \bar{o} . W podrozdziale 2.11 na stronach 26 i 27 jest mowa o nienatywnych stanach A i B, którym odpowiadają odpowiednio szybkie i wolne czasy zwijania. Czy stany te rzeczywiście wyodrębniono czy też ich wprowadzenie raczej służyło lepszemu dopasowaniu numerycznemu? W rozdziale 2 powinna się również pojawić definicja wielkości Q_{mod} i $Q_{normalize}$, które są używane w pracy 3. W szczególności, po definicję tej pierwszej trzeba sięgnąć do materiałów pomocniczych odnośnika 11 w pracy 3.

Jak wspomniałem, rozdziały 3 – 5 zawierają wyniki. Główną częścią każdego z wymienionych rozdziałów jest reprint odnośnej publikacji. Krótki wstęp, którym każdy reprint jest poprzedzony, pozwala z grubsza zorientować się w przedmiocie publikacji, jednak jej lektura jest wymagana, aby w pełni poznać treść zagadnienia. Oddzielnie jest również podany abstrakt każdej z publikacji niezależnie od tego, że pojawia się on w reprimie. Wyniki uzyskane w rozprawie opisane w wymienionych rozdziałach można podsumować następująco:

1. Pokazanie, że proces opuszczania przez białko kanału rybosomu charakteryzuje się bardzo dużą rozpiętością czasową i silnie zależy od rodzaju białka. Głównym czynnikiem określającym szybkość opuszczania rybosomu okazały się oddziaływania elektrostatyczne a białka naładowane ujemnie opuszczają rybosom (który ma głównie ładunek ujemny) szybciej. Również, wolne opuszczanie kanału przez część białek zapewne istotnie ogranicza szybkość translacji. W tej pracy było używane zarówno podejście gruboziarniste, jak i pełnoatomowe, przy czym obliczenia pełnoatomowe zostały wykonane przez Kandydata. Obliczenia pełnoatomowe stanowiły konieczne uzupełnienie i weryfikację wyników obliczeń w modelu gruboziarnistym.
2. Pokazanie, że asocjacja hydrofobowa dwóch cząsteczek metanu w kanale rybosomu charakteryzuje się mniejszą (o ok. 30 %) głębokością minimum kontaktowego niż asocjacja hy-

drofobowa poza kanałem. Wykonana przez Kandydata dekompozycja energii swobodnej asocjacji pokazała, że znaczącemu zmniejszeniu ulega wkład entropowy. Autor pokazał, że uporządkowania cząsteczek wody w kanale rybosomu jest znacząco większe niż poza nim i na tej podstawie wyprowadził wniosek, że zwiększone uporządkowanie cząsteczek wody zmniejsza zysk pojęgający na zwiększeniu entropii wody po usunięciu jej części ze sfery hydratacyjnej metanu (w której cząsteczki wody są bardziej uporządkowane niż poza nią) w wyniku asocjacji hydrofobowej.

3. Pokazanie, poprzez porównanie symulacji zwijania kontrslacyjnego oraz renaturacji poza rybosomem modelowych białek: DHFR, DDLB i CAT-III, że wpływ środowiska rybosomu na mechanizm oraz szybkość i krajobraz energii swobodnej zwijania zależy od złożoności struktury natywnej, przede wszystkim od zapętlenia kontaktów natywnych. Dobrą miarą wpływu oddziaływań z rybosomem na przyspieszenie zwijania okazał się parametr ζ , będący miarą współbrzmienia tworzenia kontaktów natywnych z postępem zwijania. W przypadku białka DHFR, gdzie oddziaływanie z rybosomem wyraźnie przyspieszało zwijanie, kontakty te tworzyły się już we wczesnym etapie, w przypadku obecności rybosomu. Natomiast dla dwóch pozostałych białek, dla których wpływ rybosomu na zwijanie był słabo zaznaczony, kontakty natywne pojawiały się dopiero na zaawansowanym etapie zwijania. Kapitalnym pomysłem była konstrukcja grafów obrazujących przejścia pomiędzy różnymi formami rozwiniętego, niewłaściwie zwiniętego i zwiniętego białka. DDLB i CAT-III, które posiadają dużo zapętlonych kontaktów natywnych, charakteryzowały się zwiększoną liczbą „ślepych zaułków” w procesie zwijania, zarówno w nieobecności jak i obecności rybosomu, natomiast te „ślepe zaułki” w większości zniknęły w obecności rybosomu w przypadku DHFR.

Streszczone powyżej osiągnięcia merytoryczne zawarte w rozprawie są nowością naukową i stanowią kamień milowy na drodze poznawania mechanizmów zwijania białek. Według mojej wiedzy rozprawa stanowi pierwsze kompleksowe badania zwijania białek na rybosomie, obejmujące zarówno analizę oddziaływań, jak i możliwych mechanizmów. Wartość naukowa rozprawy jest zatem bardzo duża.

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam drobne uwagi krytyczne do części wynikowej (uwagi krytyczne do wstępu i części metodologicznej podałem przy omówieniu tych elementów rozprawy). Część uwag krytycznych dotyczy tekstów publikacji ponieważ, jak wspominałem wyżej, ich lektura była konieczna do percepcji materiału rozprawy. Ponieważ publikacje uzyskały wcześniej pozytywną ocenę niezależnych recenzentów, być może te akurat uwagi lub ich część wynikają z mojego niezrozumienia.

Rozdział 4

Str. 53, linia 4: “two methanes (hydrophobic molecule)”, powinno być: hydrophobic molecules.

Str. 53, linie 8 i 9 od dołu: “contact minimum between two methane molecules is half as stable as in bulk solution”: powinno chyba być „is half as deep”: stabilność minimum należałoby wcześniej zdefiniować bo można ją rozumieć albo jako głębokość minimum albo jako rozmiar basenu zawierającego minimum.

Publikacja 2, str 11853 linia 7 po lewej: jest “methyl moiety” zamiast “methin moiety” (chodzi o grupę -CH- a nie -CH₃).

Str. 4766, linia 33 po prawej stronie: $Q_{normalized} \geq 1$ – powinno chyba być $Q_{normalized} \leq 1$, ponieważ podana relacja jest niezgodna z rys. 2, oraz rys. S2 w materiałach pomocniczych, na których $Q_{normalized}$ nie przekracza 1.

Rys. 2: należałoby pokazać powiększenie wykresu dla małych czasów albo użyć skali logarytmicznej na osi czasu, ponieważ najistotniejsza część rysunku odpowiadająca początkowi symulacji jest mało czytelna. Ponadto, na rysunku powinno być pokazane również Q a nie tylko $Q_{normalized}$. Rysunek kłóci się z tabelą 2 ponieważ wynika z niego, że rzekomo najwolniej zwija się DHFR odwrotnie niż z tabeli.

Tabela 2: Dlaczego w tabeli 2 występuje tylko jedna wartość τ podczas, gdy równanie 2 wyraźnie wskazuje, że wyliczono dwie? Ta uwaga ma związek z moją uwagą do rozdziału 2 (metodologii) odnośnie dwóch stanów rozwiniętych A i B.

Równanie 4: Wielkość ζ powinna mieć indeks ij , ponieważ zależy od pary reszt.

W toku lektury rozprawy nasunęły mi się ponadto następujące pytania do Kandydata:

1. Kandydat słusznie zauważył, że użycie zmodyfikowanego modelu Gō mogło wpłynąć na uzyskane wyniki. Jaki, według Kandydata, wpływ mógłby tu mieć użyty potencjał oddziaływań pomiędzy resztami niepozostającymi w kontakcie w strukturze natywnej który, w modelu Gō, efektywnie generuje wyłącznie odpychanie między tymi resztami?
2. W rozdziale 6.2 na temat kierunków dalszych badań Kandydat sugeruje symulacje pełnoatomowe do badania procesów zwijania. Takie podejście wiąże się jednak z dwoma problemami: bardzo długich symulacji i problemów z ich zbieżnością, nawet przy wspomaganium różnymi wariantami metadynamiki (z których dwa: metodę dynamiki sterowanej oraz próbkowania „parasolowego” Kandydat stosował w pracy) oraz niewystarczającej jakości pól siłowych, która jest, z uwagi na poniższy problem z kompletnością symulacji, znacznie trudniejsza do zweryfikowania, niż w przypadku pól gruboziarnistych. Czy Kandydat mógłby odnieść się do tych problemów?

Rozprawę doktorską Pana mgra Vu Van Quyena oceniam bardzo wysoko. Założone cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. Wymienione uwagi krytyczne, z których przynajmniej część ma charakter dyskusyjny, nie umniejszają w znaczącym stopniu jej wartości. Kandydat wykonał ogromną pracę, wymagającą bardzo dużej wiedzy w zakresie fizyki, chemii oraz metod symulacyjnych oraz biegłości i profesjonalizmu w posługiwaniu się metodami symulacji molekularnej i interpretacji ich wyników. Rozprawa spełnia z dużą nawiązką wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgra Vu Van Quyena do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na bardzo dużą wartość naukową, w szczególności duży ładunek nowości naukowej rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie. Uzasadnienie wyróżnienia załączam.

prof. dr hab. Józef Adam Liwo

Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Gdańsk, dnia 16.08.2023

**Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej
Pana mgra Vu Van Quyena
pt. „Influence of the ribosome on protein ejection and folding”**

Rozprawa doktorska pana mgra Vu Van Quyena dotyczy teoretycznego modelowania zwijania białek w środowisku rybosomu na etapie syntezy (zwijanie kotranslacyjne) oraz określenia czynników określających różnice zwijania kotranslacyjnego u renaturacji białek bez udziału rybosomu. Kandydat uzyskał bardzo ważne naukowo wyniki: (i) udowodnił, że szybkość opuszczania kanału rybosomowego przez białko jest silnie zależna od rodzaju białka, przede wszystkim od jego ładunku, (ii) udowodnił, że oddziaływania hydrofobowe są o ok. 30 % słabsze w kanale rybosomowym w stosunku do środowiska poza nim i podał termodynamiczne wyjaśnienie tego faktu oraz (iii) udowodnił, że wpływ środowiska rybosomu na szybkość zwijania bardzo silnie zależy od rodzaju białka i jest mały, jeżeli jego natywna struktura zawiera wiele „zapętionych” kontaktów. Wszystkie uzyskane wyniki stanowią nowość naukową i stanowią kamień milowy na drodze do zrozumienia mechanizmu zwijania białek. O ich bardzo dużym znaczeniu świadczy wysoka ranga czasopism, w których ukazały się publikacje będące podstawą rozprawy. Kandydat jest pierwszym autorem dwóch a drugim autorem trzeciej z tych publikacji. W mojej opinii jego rozprawa w pełni zasługuje na wyróżnienie.



prof. dr hab. Józef Adam Liwo