



UNIwersYTET  
WARszAWSKI



Warszawa, dnia 14.11.2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra Mateusza Chwastyka zatytułowanej „Dynamika białek z węzłami, wnękami oraz białek celulosomalnych”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pana magistra Mateusza Chwastyka prezentuje wyniki badań doktoranta wykonanych w ramach studiów doktoranckich Środowiskowego Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest profesor Marek Cieplak, kierownik Środowiskowego Laboratorium Fizyki Biologicznej, Instytutu Fizyki PAN. Tematyka rozprawy, poświęcona teoretycznym badaniom metodami modelowania molekularnego ciekawych białek, których trójwymiarowa struktura zawiera zapętlone czy nietypowo upakowane fragmenty łańcucha polipeptydowego. Sporą liczbę białek z tego typu węzłami odkryto w ostatnich latach i są one przedmiotem rosnącego zainteresowania biologów, biofizyków, ale także biomedyków czy biotechnologów. Rozprawa dotyczy więc ważnej i aktualnej problematyki, a opisane w niej prace były realizowane w grupie badawczej mającej już imponujący dorobek badawczy w tej dziedzinie biofizyki teoretycznej, wspartej badaniami doświadczalnymi. Jestem zatem przekonany, że doktorant miał doskonałe warunki pracy naukowej i że prezentowane w jego rozprawie badania powinny przyczynić się do lepszego zrozumienia organizacji przestrzennej, dynamiki i mechanizmów działania białek o nietypowych strukturach przestrzennych.

Tekst rozprawy, wraz z ilustracjami, tabelami i spisem cytowanej literatury zawiera się na 147 stronach maszynopisu. Układ treści rozprawy jest poprawny, w zasadzie zgodny z powszechnie akceptowanym sposobem prezentacji prac teoretycznych w naukach ścisłych. W odróżnieniu od większości recenzowanych przeze mnie rozpraw doktorskich niniejsza rozprawa, oprócz pierwszego rozdziału, nie ma ścisłego podziału na część literaturową i opis własnych badań. W ten sposób cała rozprawa ma charakter odpowiednio skonsolidowanego opisu wyników cząstkowych prezentowanych w szeregu publikacji naukowych, których współautorem jest doktorant. Taka struktura rozprawy ma szereg zalet, w szczególności jasne przedstawienie wzajemnego powiązania i głównych wyników wykonanych badań cząstkowych, publikowanych w czasopismach naukowych.

Rozprawę, po spisie treści, otwiera Przedmowa gdzie pokrótce przedstawiono zakres tematyczny sześciu pozostałych rozdziałów. Przedmowa zawiera też spis artykułów naukowych, będących podstawą rozprawy. Autor wymienia 11 tytułów swoich publikacji w dobrych czasopismach naukowych, takich jak *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *Journal of Chemical Physics*

**UW**<sup>18</sup>  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365



UNIwersytet  
Warszawski



czy FEBS Journal, z czego dwa artykuły nie zostały jeszcze opublikowane. W sumie to przynajmniej 9 publikacji w dobrych czasopismach. Dodatkowo autor wymienia tu trzy inne publikacje, chyba mniej ważne dla tematu rozprawy, ale prezentowane w równie znaczących czasopismach. To duży dorobek naukowy, szczególnie że główne publikacje mają dwóch albo trzech autorów, gdzie doktorant jest najczęściej pierwszym autorem. Oczywiście opublikowane wyniki i ich interpretacje były przedmiotem starannej oceny przez recenzentów poszczególnych artykułów i edytorów odpowiednich czasopism. Tak więc główne wyniki rozprawy zostały już zrecenzowane i pozytywnie ocenione przez specjalistów.

Pierwszy rozdział rozprawy ma charakter wstępu teoretycznego, w którym na kilku stronach zaprezentowano podstawowe założenia dynamiki molekularnej białek. To nieco słabsza część tej rozprawy, szczególnie jeżeli wziąć pod uwagę, że modelowanie molekularne dynamiki białek jest podstawowym narzędziem prezentowanych badań. Co za tym idzie, znajomość założeń, wariantów i ograniczeń technik modelowania może mieć zasadnicze znaczenie. W pierwszym podrozdziale zaprezentowano najbardziej podstawowe założenia klasycznej atomowej dynamiki molekularnej, informując, że obliczenia wykonano za pomocą pakietu NAMD z użyciem sterowanej dynamiki molekularnej. Zabrakło mi szerszego komentarza na temat ograniczeń (z wyjątkiem czasowych) i założeń różnych wariantów klasycznej dynamiki molekularnej, nie wspominając nawet związku z mechaniką kwantową.

Opis modeli gruboziarnistych ograniczony jest do bardzo specyficznego modelu Go. Model Go (od nazwiska jednego z pierwszych badaczy takiego modelu) zakłada, że badanie dynamiki struktur białek można uprościć poprzez zastąpienie oddziaływań atomowych ograniczonym zestawem oddziaływań bliskiego zasięgu, charakterystycznych tylko dla wybranej struktury przestrzennej całego układu. Na ogół są to oddziaływania lokalne stabilizujące stan natywny białek. Stąd inną nazwą modeli Go jest „structure based models”. Takie przybliżenie ma oczywiste, bardzo poważne, konsekwencje. Na przykład, co nie zawsze odpowiada rzeczywistości, proces zwijania struktury przestrzennej białek może przebiegać tylko poprzez sukcesywne tworzenie się fragmentów struktury końcowej. Podobne uproszczenie nakładane jest na proces rozwijania (rozciągania) struktury. W rozprawie, a także w publikacjach będących jej podstawą, zabrakło mi starannej dyskusji i testów obliczeniowych tego ograniczenia. Model Go wykorzystany w badaniach autora opiera się na zredukowanej reprezentacji struktury białek, sprowadzającej się do zastąpienia całych reszt aminokwasowych pojedynczym centrum oddziaływania, centrowanym na węglu alpha. To wielokrotnie przyspiesza czas obliczeń, dzięki znacznie mniejszej liczbie stopni swobody traktowanych w jawny sposób. Oddziaływania, oparte na mapach kontaktów reszt, wyprowadzone są na podstawie analizy eksperymentalnych struktur pełnoatomowych. To pozornie elegancki sposób, ale ma też istotne ograniczenie. Nawet

**UW**<sup>3</sup>  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365



UNIwersytet  
WARSAWski



małe oscylacje struktury białka zmieniają kontakty grup bocznych – co w tego typu modelu jest pominięte. Ten problem też nie jest jasno komentowany w rozprawie i publikacjach doktoranta.

Może warto było we wstępie do tej rozprawy wspomnieć, że istnieje wiele innych podejść do wydajnego modelowania białek z wykorzystaniem modeli zredukowanych, niewymagających przybliżenia Go. W rozprawie brak cytowania prac na ten temat, mimo ich olbrzymiej (i szybko rosnącej) liczby. Dostępne są obszerne artykuły przeglądowe, na przykład Tozzini, Feig, Kmieciak i kilka innych. W rozprawie nie wspomniana jest nawet nagroda Nobla z 2013 roku (Michael Levitt, Ariel Warshel and Martin Karplus; “for the development of multiscale models for complex chemical systems”). Laureaci tej nagrody (w szczególności Levitt i Warshel) do dziś w dużym stopniu ustalają podstawowe zasady efektywnego wykorzystywania modeli gruboziarnistych w badaniach biomakromolekul, głównie tych najbardziej skomplikowanych, czyli białek. Co do modelowania wielkoskalowego, to trochę zabrakło mi głębszej dyskusji o możliwościach łączenia różnych modeli (w szczególności dynamiki pełno-atomowej z wykorzystywanym modelem gruboziarnistym) w odpowiednie schematy symulacji wielkoskalowych.

Szczegółowe omówienie prac doktoranta zawiera się w rozdziałach 2-5 (w sumie około 110 stron maszynopisu).

W rozdziale 2 opisano wyniki symulacji ciekawych zastosowań zaproponowanej metody symulacji rozciągania struktury białek do interpretacji danych z mikroskopii atomowej białek (angielski termin AFM-SMFS Atomoc Force Microscopy – Single Molecule Force Spectroscopy). Ta metoda pomiarowa zyskuje dużą popularność w ostatnich latach, a grupa promotora recenzowanej rozprawy profesora Marka Cieplaka ma duży wkład w rozwój tej techniki pomiarowej. Interpretacja danych AFM-SMFS nie jest łatwa i nie jest też proste właściwe kontrolowanie pomiarów. Jak pokazały symulacje opisane w rozprawie, modelowanie procesu rozciągania struktur białek może dostarczać istotnych wskazówek. W szczególności w przekonujący sposób pokazano, że dobrym sposobem rozciągania białek jest użycie odpowiednio przygotowanych kompleksów zbudowanych z dwóch lub więcej globul, przy czym białka tworzące taki układ powinny znacznie różnić się stabilnością struktury trójwymiarowej. W takich warunkach wiarygodny opis mechanizmu rozwijania mniej trwałej struktury w doświadczeniach AFM staje się łatwiejszy do uzyskania.

Rozdział 3 rozprawy opisuje wyniki symulacji procesów rozciągania struktur białek, w których łańcuchy główne są zapętlone. Możliwość istnienia zapętlonych struktur białek globularnych rozważano już przed dwudziestu laty. W miarę rozwoju krytalografii białek, a także (w trochę mniejszym zakresie) innych metod doświadczalnych, znamy dziś ponad 100 tysięcy struktur białek, z czego kilkaset ma topologię pseudo-węzłów (pseudo, gdyż łańcuch białka nie jest linią zamkniętą). Większość z nich to tak zwane węzły płytke, gdzie pseudo-splątanie zlokalizowane jest blisko jednego

**UW**<sup>N</sup>  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365



UNIwersytet  
Warszawski



z końców łańcucha. Takie węzły mogą zanikać stosunkowo łatwo na skutek niewielkich fluktuacji przestrzennych globuli białka. Jednak niektóre ze znanych struktur zapętlonych mają węzły zlokalizowane bliżej środka łańcucha. Jak zauważa autor rozprawy taka cecha strukturalna ma olbrzymie znaczenie dla szeregu własności białka. Symulacje modeli gruboziarnistych opisane w rozprawie pokazują ciekawy i dość wiarygodny mechanizm rozwijania takich struktur, ale także powstawania splątanej struktury przestrzennej (struktury natywnej tych specyficznych białek). Modelowano też proces zwijania struktury na granicy faz (woda-powietrze) a także w interakcji z rybosomem. W tym celu zaproponowano uproszczony model struktury rybosomu, spójny z gruboziarnistym modelem stosowanym w symulacji dynamiki białek. To bardzo ciekawa część rozprawy. Trochę zabrakło mi głębszej dyskusji tego, w jakim zakresie opis uzyskiwany z analizy symulacji gruboziarnistych może być interpretowany jako przybliżony obraz rzeczywisty. W szczególności warto było zwrócić uwagę na to, do jakiego stopnia model Go może być wiarygodny w opisie kotranslacyjnego zwijania się struktury natywnej. Pewnie dość często w trakcie syntezy białka mają miejsce sytuacje, kiedy niekompletny łańcuch tworzy struktury pośrednie o nienatywnej mapie kontaktów. Takie alternatywne ścieżki zwijania są ignorowane przez modele oparte na strukturze finalnej.

Bardzo ciekawe są również prace opisane w Rozdziale 4 rozprawy, gdzie przedstawiono wyniki modelowania białek posiadających duże wnęki we wnętrzu ich struktury przestrzennej. Wymagało to opracowania wiarygodnej metody wyznaczania powierzchni wewnętrznej i kształtu oraz rozmiaru wnęk w tego typu białkach. Stworzone zostały odpowiednie algorytmy, a cała metoda została przetestowana i udostępniona społeczności naukowej w postaci serwera internetowego SPACEBALL. Narzędzie te, w moim przekonaniu bardzo uniwersalne, może mieć duże znaczenie dla różnorodnych analiz biologii strukturalnej. Pokazano w jaki sposób zaproponowana metoda może być wykorzystywana w modelowaniu dynamiki białek z dużymi wnękami ich struktur przestrzennych.

Rozdział 5 dotyczy bardzo ambitnego testowania metodami symulacji pełnoatomowych i gruboziarnistych wpływu mutacji punktowych na stabilność strukturalną celulosomu. W szczególności pokazano, że modyfikacja map kontaktów spowodowana mutacjami punktowymi może być wystarczająca dla znaczącej zmiany wyników symulacji dynamiki białek na poziomie gruboziarnistym. Biorąc pod uwagę, że wyniki przewidywań teoretycznych wydają się być dobrze potwierdzone doświadczalnie, podejście takie (tzn. projektowanie korzystnych mutacji w oparciu o szybką metodę modelowania molekularnego) może mieć duże znaczenie dla biologii strukturalnej, w szczególności badań powiązanych z biotechnologią.

Wyniki opisywane w rozdziałach 2-5 posumowane są na końcu rozprawy.

**UW**<sup>N</sup>  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365



UNIwersYTET  
WARszAWSKI



Opublikowane artykuły naukowe, na których opiera się rozprawa, to dziewięć poniższych tytułów:

1. Theoretical tests of the mechanical protection strategy in protein nanomechanics M. Chwastyk, A. Galera-Prat, M. Sikora, À. Gómez-Sicilia, M. Carrión-Vázquez, M. Cieplak *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 82, 717–726 (2014)
2. Knotted Proteins under Tension M. Chwastyk, M. Cieplak *Israel J. Chem.* 54, 1241–1249 (2014)
3. Cotranslational folding of deeply knotted proteins M. Chwastyk, M. Cieplak *J. Phys.: Condens. Matter – special issue: Knots* 27, 354105 (2015)
4. Multiple folding pathways of proteins with shallow knots and co-translational folding M. Chwastyk, M. Cieplak *J. Chem. Phys.* 143, 045101 (2015)
5. Structure-based analysis of thermodynamic and mechanical properties of cavity-containing proteins – case study of plant pathogenesis-related proteins of class 10 M. Chwastyk, M. Jaskólski, M. Cieplak *FEBS J.* 281, 416-429 (2014)
6. The volume of cavities in proteins and virus capsids M. Chwastyk, M. Jaskólski, M. Cieplak *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 281(1), 416-429 (2016)
7. Statistical radii associated with amino acids to determine the contact map: fixing the structure of a type I cohesin domain in the *Clostridium thermocellum* cellulosome M. Chwastyk, A. Poma, M. Cieplak *Phys Biol.* 12, 046002 (2015)
8. Coarse-grained model of the native cellulose I $\alpha$  and the transformation pathways to the I $\beta$  allomorph A. B. Poma, M. Chwastyk, M. Cieplak *Cellulose* 23, 2247 (2016)
9. Polysaccharide – protein complexes in a coarse-grained model A. Poma, M. Chwastyk, M. Cieplak *J. Phys. Chem. B* 119, 12028-12041 (2015)

Oraz dwa teksty przesłane lub przygotowywane do druku:

1. Topological transformations in proteins: effects of heating and proximity of an interface Y. Zhao, M. Chwastyk, M. Cieplak
2. Towards designer cohesins – single-site mutations exert a powerful non-local influence on the protein structure and stability M. Chwastyk, A. Galera-Prat, A. M. Vera-Gomez, M. Gunnoo, D. Thompson, M. Carrión-Vázquez, M. Cieplak

Zapoznałem się z wymienionymi powyżej publikacjami magistra Chwastyka. To dobrze napisane i ciekawe artykuły naukowe obejmujące w zarysie cały zakres tematyczny rozprawy. Ponieważ prace te zostały opublikowane niedawno (lata 2014-2016) to trudno precyzyjnie ocenić, na podstawie liczby cytowań, jak szeroki będzie ich oddźwięk w środowiskach naukowych. Może on być znaczny, gdyż niektóre artykuły były już cytowane kilka razy.

**UW**  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365



UNIwersYTET  
WARszawSKI



**W podsumowaniu** pragnę podkreślić, że pomimo pewnych zastrzeżeń dotyczących zawartości wstępu teoretycznego do rozprawy i niektórych interpretacji wyników modelowania molekularnego, rozprawę pana magistra Mateusza Chwastyka oceniam bardzo wysoko. Doktorat dotyczy niezwykle ważnych zagadnień współczesnej biofizyki i teoretycznej biologii molekularnej. Zakres badań i dokumentowany dorobek naukowy doktoranta są imponujące. Nie mam też wątpliwości, że doktorant jest doskonale przygotowany do dalszej pracy badawczej. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana magistra Mateusza Chwastyka do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki merytoryczny poziom rozprawy, istotne znaczenie uzyskanych wyników badawczych, a także szerokie udostępnienie tych wyników innym badaczom, nie tylko w formie licznych publikacji naukowych w renomowanych czasopismach, ale także jako bardzo przydatnego serwera internetowego, pragnę także wnioskować do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o nagrodzenie pracy doktorskiej pana magistra Mateusza Chwastyka stosownym wyróżnieniem.

Prof. dr hab. Andrzej Koliński

**UW**<sup>120</sup>  
Dwa stulecia  
Dobry początek

Profesor  
Pracownia Teorii Biopolimerów  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: kolinski@chem.uw.edu.pl  
tel: +48 22 552 6365