



Prof. dr hab. Andrzej Koliński
Pracownia Teorii Biopolimerów
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

Warszawa, dnia 13.02.2009

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana magistra Maksima Kouzy zatytułowanej:
„Numerical simulation of folding and unfolding of proteins”**

Białka to niezwykle fascynujące obiekty molekularne. Białka naturalne zazwyczaj, acz nie zawsze i nie wszystkie, w odpowiednich warunkach przyjmują ściśle określoną strukturę przestrzenną, która jest konieczna dla ich prawidłowego funkcjonowania w żywej komórce. Pomimo, że sekwencje białek naturalnych wyglądają czasem jak losowe sekwencje kopolimerów dwudziestu aminokwasów to w istocie takimi nie są. Jedynie maleńki ułamek wszystkich możliwych sekwencji (a liczba wszystkich możliwych sekwencji jest ponad-
astronomiczna) posiada cechy białek naturalnych. Białka, są starannie „wyedytowanymi” w procesie ewolucji polipeptydami.

Od szeregu lat symulacje komputerowe stanowią potężne narzędzie badania białek. Najważniejsze wyzwania molekularnej biologii obliczeniowej białek to: zrozumienie oddziaływań odpowiedzialnych za stabilność stanu natywnego białek, ilościowy opis termodynamiki i mechanizmów molekularnych procesu formowania struktury natywnej i opis oddziaływań białek z innymi biomolekułami, w tym z innymi białkami. Na bardziej szczegółowym poziomie molekularna biologia obliczeniowa białek zmierza do przewidywania struktury białek, projektowania sztucznych białek podobnych do naturalnych, przewidywania molekularnych podstaw działania leków, itp.

Rozprawa doktorska pana magistra Maksima Kouzy poświęcona jest mechanizmom molekularnym związania się struktury natywnej białek. Narzędziem badawczym są symulacje komputerowe procesów związania i rozwijania struktury w różnych warunkach i na różnych

poziomach szczegółowości wykorzystywanych modeli molekularnych. Wyniki symulacji są starannie konfrontowane z dostępnymi danymi doświadczalnymi.

Tekst rozpraw napisany jest w języku angielskim, zawiera się na 122 stronach. Praca zawiera szereg ilustracji i liczne (240) odnośniki literaturowe. Układ i język pracy są poprawne, aczkolwiek autor nie ustrzegł się pewnych niezręczności gramatycznych. Nie są one jednak zbyt liczne i nie utrudniają czytania pracy. Styl opisu jest logiczny i jasny. Mam pewne wątpliwości co do stopki strony tytułowej rozprawy. Otóż wydaje mi się, że stopień naukowy przyznaje się w Polsce w określonej dziedzinie, a nie stopień doktora filozofii.

Pierwsze trzydzieści stron rozprawy stanowi wstęp teoretyczny gdzie autor w zarysie przedstawia stan wiedzy z zakresu biofizyki molekularnej białek (Rozdział 2), opisując proces zwijania się struktury białek, zarówno w warunkach równowagowych jak i pod wpływem przyłożonej siły rozciągającej. Następnie przedstawione zostały podstawy modelowania molekularnego białek (Rozdział 3). W tym rozdziale omawiane są różne modele białek, czy też układów „białko-podobnych”. Sporo uwagi autor poświęca modelom Go. Modele Go zakładają, że proces zwijania się białka można odtworzyć stosując schemat oddziaływań, który dopuszcza tylko oddziaływania obserwowane w stanie natywnym, tzn. dwie reszty izoleucynowe traktowane są jako przyciągające się o ile stykają się w strukturze natywnej, oddziaływania innych par izoleucynowych są ignorowane, itp. Jest to oczywiście bardzo sztuczne i drastyczne uproszczenie. Wróć jeszcze do problemu modelu Go w dalszej części recenzji. Końcowy fragment wstępu teoretycznego przedstawia zastosowane dalej w pracy schematy dynamiki molekularnej. Autor słusznie zwraca tu uwagę, że aby osiągnąć odpowiednie skale czasowe w symulacjach modeli pełnoatomowych stosuje się często drastyczne zwiększenie temperatury czy działającej siły. Na ostatnich stronach tej części rozprawy przedstawiono, w sposób bardzo elegancki, podstawowe sformułowania kinetycznej teorii zwijania białek.

Wstęp teoretyczny jest napisany ciekawie, aczkolwiek odnoszę wrażenie, że dobór przedstawianych zagadnień jest trochę przypadkowy i że można było dokonać bardziej starannego doboru pod względem tematu i zakresu badań podjętych w trakcie realizacji tej pracy doktorskiej. Zauważyłem kilka istotnych nieścisłości, czy błędnych interpretacji. Oto niektóre z nich:

1. (strona 5). „Proteins... acquire well defined compact three-dimensional shapes”. Otóż nie wszystkie białka mają ściśle określoną strukturę w warunkach fizjologicznych. Tym bardziej nie wszystkie przyjmują strukturę kompaktową. Niektóre białka przyjmują określoną strukturę tylko w wyniku asocjacji z innymi

biomakromolekułami, itd. Generalnie, istnieje mnóstwo, często bardzo ważnych odstępstw, od tego typu ogólnych stwierdzeń biologii molekularnej.

2. (strona 5). „transition from a denatured state to the folded state is first order”. Otóż nie zawsze i tylko dla białek jednodomenowych.
3. (strona 9) zdania w ostatnim akapicie sugerują, że znamy obecnie około 54,500 białek. Jest to stwierdzenie mylące. Dla tylu białek wyznaczono doświadczalnie ich struktury przestrzenne. Białek znamy kilkaset razy więcej.
4. (strona 11). Opis struktury drugorzędowej białek jest bardzo nieściśły. Wynika z niego, że α -helisy są jedynymi formami helikalnymi i że zawierają 3.6 reszt na jeden skręt. Oba stwierdzenia nie są prawdziwe. Istnieją jakościowo inne formy helikalne, a α -helisa bardzo często ma okres 3.5 reszt, jak w bardzo powszechnych motywach typu coiled-coil. Podobnie opis β -kardków jest mylący.
5. (strona 12). Podana definicja ciekłej globuli jest daleka od powszechnie przyjmowanej.
6. (strony 13-15). Autor chyba zbyt serio traktuje tzw. paradoks Levinthala i teorię lejzków Wolynesa. Uważam, że paradoks Levinthala w istocie nie jest żadnym paradoksem (paradoksalnym jest raczej to, że proces zwijania się białka trwa tak długo, a nie że tak krótko) a teoria lejzków jest tak ogólną, że niezbyt wiele z niej wynika. Sukcesywny podział przestrzeni konformacyjnej w trakcie reorganizacji układów molekularnych jest zjawiskiem powszechnym, nie tylko w świecie białek.
7. (strona 20). Opisany mechanizm modelowania dynamiki łańcuchów polimerowych na siatce kubicznej nie jest ergodyczny. Dlatego też (strona 21), należy z wielką ostrożnością traktować wszelkie wnioski z symulacji na tego typu modelach.

Wyniki uzyskane przez autora i tezy rozprawy przedstawione są w rozdziałach od 5-go do 10-go. Kolejne rozdziały przedstawiają poszczególne zagadnienia cząstkowe badane przez autora przedstawione, a każdy rozdział zawiera wnioski z danego etapu badań, z nawiązaniem do rozdziałów poprzedzających. Podsumowujące rozprawę wnioski końcowe zamieszczone są na końcu tekstu. Omówię pokrótce wyniki opisane w poszczególnych rozdziałach.

W rozdziale 5 opisano pomiary widm dichroizmu kołowego (CD) dla małego białka (a właściwie domeny) hbSBD. Białko to ma bardzo prostą strukturę, zawierającą dwie równoległe helisy. Ze względu na prostotę zwoju, oczekuje się, że białko to będzie zwiijać się bardzo szybko, bez obserwowalnych stanów przejściowych. Dla tego białka przeprowadzono

też symulacje procesu zwijania metodą Brownowskiej dynamiki molekularnej dla ciągłego modelu Go. Model zakłada redukcję reprezentacji białka, która uwzględnia tylko atomy C α . Oddziaływania niezwiązane aproksymowane są poprzez potencjał posiadający minimum dla odległości C α -C α obserwowanych w strukturze natywnej. Tylko oddziaływania pomiędzy atomami, których odległość jest mniejsza niż 7.5 Å w strukturze natywnej były brane pod uwagę. Warto tu zwrócić uwagę na szereg niedostatków tego modelu. Po pierwsze podstawowe przybliżenie Go, zakładające że wzdłuż ścieżki zwijania struktury białka tylko oddziaływania obserwowane w stanie natywnym są istotne, nie jest generalnie prawdziwe. Może być ono w przybliżeniu prawdziwe dla bardzo prostych topologicznie i małych zwojów pojedynczych domen, tak jak to zapewne jest dla białka hbSBD opisanego w rozprawie. Istnieje jednak wiele białek, również jednodomenowych, dla których oddziaływania nienatywne mają zasadnicze znaczenie podczas procesu zwijania struktury. Dla nich modele Go prowadzą do jakościowo niepoprawnych wyników. Przykład takiego białka omawia autor w rozdziale 10. Inny problem związany jest ze szczególną definicją modelu Go stosowanego w tej pracy. Otóż, związanie oddziaływań z atomami C α z obcięciem 7.5 Å i tą samą amplitudą energii oddziaływania implikuje pewne niefizyczne efekty również dla oddziaływań natywnych. W β -kartce takie oddziaływanie w sposób niejawni uwzględnia też wiązania wodorowe łańcucha głównego, podczas gdy dla oddziaływań pomiędzy helisami są to tylko oddziaływania (dużo słabsze) grup bocznych. Co więcej, założony promień obcięcia sprawia, że niektóre oddziaływania pomiędzy helisami, tam gdzie są duże grupy boczne, zostają w ogóle pominięte. Można było tego uniknąć definiując oddziaływania Go dla atomów β . Komplikacje modelu i procedury obliczeniowej wynikające z tak zmodyfikowanej definicji są marginalne – geometria szkieletu C α jednoznacznie definiuje pozycje węgli β .

Pomimo powyższego kinetyka procesu zwijania hbSBD obserwowana w symulacjach i wynikająca z analizy widm CD w różnych temperaturach okazały się jakościowo zgodne. Autor słusznie zauważył, iż świadczy to o tym, że proces jest kontrolowany przez topologię zwoju białka a nie szczegóły oddziaływań molekularnych.

Rozdział 6 opisuje wyniki symulacji denaturacji pod wpływem rozciągania mechanicznego modeli Go pojedynczej domeny i trój-domenowego łańcucha ubikwityny. Okazało się, że oba układy podlegają denaturacji według modelu dwustanowego. Ten wynik jest bardzo interesujący, ale wymaga dalszej weryfikacji doświadczalnej. Aby umożliwić symulacje stosunkowo długich łańcuchów autor zaproponował bardzo ciekawą modyfikację

metody replik, w której poszczególne kopie symulowanego układu są kontrolowane przez tą samą temperaturę, ale podlegają innej sile rozciągającej.

W rozdziałach 7 i 8 opisano symulacje zwijania się monomeru i trimeru ubikwityny w warunkach niewielkiej siły rozciągającej – mniejszej niż prowadząca do denaturacji. Dla porównania przeprowadzono też symulacje termicznego rozwijania struktury ubikwityny. Pokazano, że sposób zakotwiczenia monomerycznej molekuly (N-koniec lub C-koniec) wpływają na kinetykę procesu, podczas gdy efekt dla molekuly trój-domenowej jest mniejszy, aczkolwiek w tym ostatnim wypadku zmienia się kolejność formowania poszczególnych domen. Wynikają z tego określone implikacje dla mechanizmu zwijania się tego białka. Odtworzono też obserwowane doświadczalnie różnice w zachowaniu się białka wielodomenowego wynikające z różnych chemicznie połączeń poszczególnych domen.

W rozdziale 9 pokazano na przykładzie białka DDFLN4, że model Go dobrze odtwarza wyniki doświadczeń fizycznych przeprowadzonych w warunkach małej szybkości rozciągania mechanicznego, podczas gdy dla dużych szybkości obserwowany w symulacjach jest prawdopodobnie niezgodny z rzeczywistością. Jest to potencjalnie ważny wynik, jako że z przyczyn technicznych symulacje modeli pełnoatomowych ograniczone są właśnie do przypadków dużych szybkości rozciągania. Końcowe zdania rozdziału 9 zawierają błędy literowe i/lub gramatyczne utrudniające nieco prawidłowe odczytanie podsumowania tej części pracy.

W rozdziale 10 opisano bardzo eleganckie, i prawdopodobnie bardzo kosztowne, symulacje rozciągania białka DDFLN4 w warunkach pełnoatomowej reprezentacji białka i jawnej reprezentacji rozpuszczalnika. Wybór tego białka jako obiektu badawczego jest bardzo trafny, jako jego własności mechaniczne mają zasadnicze znaczenie dla pełnionych funkcji biologicznych. W symulacjach zastosowano pole siłowe GROMOS96, uważane przez wielu badaczy za najbardziej odpowiednie dla modelowania białek. Symulacje pokazały, że pominięcie nienatywnych oddziaływań w modelach Go jest najprawdopodobniej przyczyną niefizycznego zachowania tych modeli, szczególnie dla dużych szybkości rozciągania. Jest to bardzo ważny wynik dookreślający zakres stosowalności tak popularnych modeli Go. Szkoda, że autor nie spróbował przeprowadzić bardziej pogłębionej dyskusji tego problemu, pomimo że zgromadził w tej rozprawie całkiem obszerny materiał porównawczy dla różnego typu symulacji.

Moja recenzja rozprawy zawiera sporo uwag krytycznych. Pragnę jednak podkreślić, że większość z nich ma w dużym stopniu charakter polemiki naukowej, która jest możliwa tylko wtedy gdy dyskutowane wyniki i interpretacje są znaczące. Jestem przekonany, że

przedstawione w tej rozprawie badania i wynikające z nich wnioski przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat kinetyki formowania zwojów białek, a także roli symulacji komputerowych w badaniach tego procesu. Warto też zauważyć, że znaczna część badań opisanych w tekście rozprawy została wcześniej opublikowana w renomowanych czasopismach naukowych. Tezy rozprawy były więc wcześniej przedmiotem pozytywnej oceny przez kilku ekspertów.

Uważam, że rozprawa doktorska pana magistra Maksima Kouzy spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana mgr. Kouzy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Andrzej Koliński