

Gdańsk, 12 września 2014

**Recenzja rozprawy doktorskiej
pana magistra Grzegorza Nawrockiego
pt. „Oddziaływania biomolekuł z powierzchniami ciał stałych w
symulacjach dynamiki molekularnej”**

Oddziaływania białek z powierzchniami ciał stałych – zarówno kryształów pierwiastków lub związków nieorganicznych jak i polimerów – stanowią niezwykle ważny obiekt badań współczesnej fizykochemii wskutek ich roli w budowie i funkcjonowaniu organizmów żywych (chociażby połączenia mięśni i ścięgien kręgowców z kośćmi czy mięśni stawonogów z zewnętrznym szkieletem chitynowym) oraz znaczenia w nanotechnologii. Mechanizmy oraz energetyka tych oddziaływań nie są jeszcze dobrze poznane na poziomie molekularnym. Dlatego badania zawarte w rozprawie doktorskiej p. mgra Grzegorza Nawrockiego, której przedmiotem jest głównie poznanie oddziaływań aminokwasów, peptydów i białek z wybranymi nanocząstkami są ważnym krokiem do zrozumienia tego zagadnienia.

Na główny tekst rozprawy składają się 4 rozdziały o klasycznym układzie: wprowadzenie, które zawiera cel pracy (11 stron), metody (27 stron), wyniki (44 strony) i podsumowanie (3 strony). Po ostatnim rozdziale podana jest bibliografia (110 pozycji) a do rozprawy dołączone są 3 publikacje Autora (odpowiednio w PCCP, J. Chem. Phys. i J. Phys. Chem. C; są to bardzo dobre czasopisma), które obejmują większość materiału zawartego w rozprawie. Jeszcze jedna praca jest w przygotowaniu. Tekst jest ilustrowany dobrze dobranymi rysunkami.

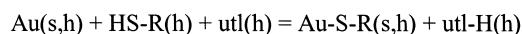
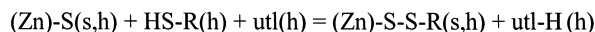
W pracy Autor przebadał oddziaływania wody, terminalnie blokowanych naturalnych aminokwasów, modelowych cząsteczek reprezentujących same łańcuchy boczne aminokwasów, dipeptydów, oligopeptydów o różnej długości i sekwencji oraz modelowego białka – klatki tryptofanowej – (kod PDB: 1L2Y) z powierzchniami czterech ciał stałych: tlenku cynku (II), siarczku cynku (II), metalicznego złota i celulozy. W badaniu oddziaływań aminokwasów peptydów i białek powierzchnie ciał stałych były hydratowane; dla porównania wykonano również obliczenia energii w próżni. W przypadku ZnO, ZnS i Au były uwzględnione wszystkie możliwe płaszczyzny przekroju kryształu. Układy będące przedmiotem badań oraz metody badań adsorpcji peptydów i białek na powierzchniach wymienionych ciał stałych są krótko ale wyczerpująco scharakteryzowane w części wstępnej.

Narzędziem obliczeniowym była dynamika molekularna z użyciem pól siłowych AMBER99, CHARMM27, CHARMM36 i OPLS/AA. Dla złota stosowano trzy różne

warianty pola siłowego: FFB (potencjał Lennarda-Jonesa), FFV (potencjał Lennarda-Jonesa ale o zwiększonej głębokości studni potencjału tak, aby oddziaływania z wodą były silniejsze) i FFI (potencjał Lennarda-Jonesa oraz dodatnie i ujemne punktowe ładunki elektryczne aby uwzględnić polaryzację atomu złota przy oddziaływaniach z wodą). Metoda dynamiki molekularnej, empiryczne pola siłowe oraz pojęcie i metody wyznaczania potencjałów średniej siły (PMF) są opisane w części metodologicznej rozprawy.

Dla ZnO Autor wyznaczył parametry potencjału Lennarda-Jonesa i ładunki punktowe metodą DFT. Pozostałe parametry były albo standardowymi parametrami pól siłowych albo zostały wzięte z literatury. W przypadku złota traktowanego w polu FFV, Autor dopasował parametry potencjału Lennarda-Jonesa tak, aby kąt zwilżania wody na powierzchni był równy zeru a obliczona energia oddziaływania pojedynczej cząsteczki wody była zgodna z energią obliczoną metodami chemii kwantowej.

Autor badał również kowalencyjne wiązanie grupy bocznej cysteiny z ZnS (poprzez siarkę, z utworzeniem wiązania disulfidowego) oraz złotem (z utworzeniem wiązania AuS). Do opisu tych oddziaływań kowalencyjnych zastosował potencjał Morse'a o głębokości minimum odpowiadającej energii wiązania S-S lub Au-S (obie są rzędu 250 kJ/mol). Takie podejście nie jest do końca poprawne, ponieważ obliczona w ten sposób energia oddziaływań jest znacznie zawyżona. Powodem jest to, że Autor założył tworzenie odpowiednich wiązań z rozdzielonych atomów w próżni. Tymczasem należałoby rozważać następujące reakcje chemiczne a następnie oszacować zmianę energii swobodnej (co byłoby spójne z faktem, że Autor analizuje dalej potencjały średniej siły) lub wewnętrznej w ich wyniku:



gdzie R oznacza cysteinę bez końcowej grupy wodorosiarczkowej, utl oznacza cząsteczkę utleniacza, symbol (h) obok odpowiedniego indywiduum chemicznego oznacza, że rozpatrujemy hydratowaną cząsteczkę a symbol (s,h), że rozpatrujemy hydratowaną powierzchnię ciała stałego. Hydratacja jest co prawda w przeprowadzonych symulacjach MD uwzględniona ale utlenianie już nie. Pozostaje też problem co przyjąć za utleniacz; zwykle w organizmach żywych jest to utleniona forma glutationu. Poprawny opis procesu wiązania grupy bocznej cysteiny doprowadziłby do znacznie niższych wartości energii wiązań niż te podane dla mCys w tabelach 3.3 i 3.4 i na pewno nie byłoby tak kolosalnej różnicy między potencjałem średniej siły związanej niekowalencyjnie i kowalencyjnie cysteiny na rys. 3.21. Przykładowo, wyznaczona eksperymentalnie energia swobodna reakcji tworzenia mostka disulfidowego łączącego dwie reszty cysteiny w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej wynosi ok. 21 kJ/mol (Doig i Williams, J. Mol. Biol., 1991, 217, 389); jest to wartość ponad 10-krotnie niższa niż wartość głębokości studni potencjału przyjęta przez Autora. Ponieważ kowalencyjne wiązanie cysteiny stanowiło niewielki ułamek badań a ponadto wydaje się, że można porównywać obliczone energie np. dla różnych powierzchni tego samego ciała stałego uważam, że powyżej sformułowane zastrzeżenie do metodologii stosowanej przez Autora nie umniejsza w znaczącym stopniu wartość pracy.

W przypadku badania oddziaływań blokowanych aminokwasów i dipeptydów, Autor prowadził symulacje z więzami na odległość między środkiem masy aminokwasu/dipeptydu a powierzchnią. Te symulacje miały na celu wyznaczenie potencjałów średniej siły oddziaływań aminokwasów i dipeptydów z powierzchniami ciał stałych. W przypadku badania adsorpcji wody, oligopeptydów oraz klatki tryptofanowej prowadził symulacje bez więzów. Do obliczania potencjałów średniej siły z symulacji ograniczonej dynamiki molekularnej, Autor opracował oryginalny algorytm polegający na obliczeniu średniej siły dla każdego okna symulacyjnego w centrum potencjału ograniczającego a następnie scałkowaniu

sił w celu uzyskania potencjału średniej siły. Metoda ta jest poprawna jednak wydaje mi się, że prościej byłoby zastosować metodę analizy ważonych histogramów (WHAM) opracowaną w 1992 roku przez Kumara (J. Comput. Chem., 1992, 13, 1011). Zaletą algorytmu Kumara jest to, że umożliwia obliczenie wartości PMF w każdym punkcie a nie tylko dla odległości cząsteczki adsorbentu od powierzchni odpowiadających centrom potencjałów ograniczających. Bardzo wysoko oceniam to, że Autor zadał sobie trud oszacowania błędów wartości potencjałów średniej siły.

W pierwszym etapie pracy Autor wyznaczył rozkład gęstości oraz polaryzacji wody w otoczeniu badanych powierzchni. Stwierdził, na tej podstawie, że powierzchnie ZnO mają charakter hydrofilowy (wyraźne maksimum rozkładu gęstości blisko powierzchni), powierzchnie ZnS charakter hydrofobowy (gęstość rośnie prawie monotonicznie w miarę oddalania się od powierzchni aż do wartości odpowiadającej czystej wodzie) a powierzchnia celulozy pośredni. Charakter powierzchni złota zależy od użytego pola siłowego; w przypadku pola FFB jest hydrofobowy natomiast w przypadku dwóch pozostałych hydrofilowy. Jest interesujące, że wyraźnie decyduje tutaj siła oddziaływania z cząsteczkami wody a nie obecność explicite komponentu elektrostatycznego. Na podstawie zbadanego eksperymentalnie zachowania powierzchni złota o różnym stopniu czystości Autor wnioskuje, że potencjał FFB opisuje zachowanie złota zanieczyszczonego a dwa pozostałe czystego. Wnioski dotyczące charakteru powierzchni mają odzwierciedlenie w wiązaniu aminokwasów o różnym charakterze, które jest omówione w dalszej części rozprawy.

W dalszej części badań Autor wyznaczył potencjały średniej siły oddziaływań aminokwasów, modeli łańcuchów bocznych aminokwasów oraz dipeptydów z badanymi powierzchniami. Wartość potencjału średniej siły w minimum była identyfikowana z energią wiązania danego indywiduum z daną powierzchnią. Są tutaj dwie nieścisłości: terminologiczna i merytoryczna. Nieścisłość terminologiczna polega na tym, że potencjał średniej siły ma znacznie więcej wspólnego z energią swobodną, niż z energią potencjalną, ponieważ zawiera on wkład entropowy. Można oczywiście, w uproszczeniu (i spotyka się to często w literaturze) nazwać go „energią” ale trzeba wyraźnie zaznaczyć, że takie uproszczenie się stosuje. Nieścisłością merytoryczną było zrównanie wartości potencjału średniej siły w minimum z energią (swobodną) wiązania. Stan związany należy raczej zdefiniować jako rezydencję adsorbentu w całym basenie minimum potencjału średniej siły, czyli np. w odległości od zera do położenia maksimum desolvacyjnego lub efektywnego osiągnięcia asymptoty poziomej, jeżeli maksimum nie ma (oznaczam dalej tę odległość przez d_w). Należałoby zatem scałkować potencjał średniej siły po odległościach do odległości granicznej i potraktować całość jako wielkość proporcjonalną do całki konfiguracyjnej dla stanu związanego a następnie scałkować go dla stanu niezwiązanego, od d_w do „wysokości” pudełka, d_{max} . W podejściu klasycznym, standardową energią swobodną wiązania (ΔF_w) można wtedy obliczyć następująco:

$$\Delta F_w = -RT \ln \frac{[w]}{[nw]} = -RT \ln \left[\frac{\frac{1}{d_w} \int_0^{d_w} \exp(-W(x)/RT) dx}{\frac{1}{d_{max} - d_w} \int_{d_w}^{d_{max}} \exp(-W(x)/RT) dx} \right]$$

gdzie $W(x)$ jest potencjałem średniej siły, R jest uniwersalną stałą gazową, T jest temperaturą bezwzględną a $[w]$ i $[nw]$ oznaczają odpowiednio stężenie adsorbentu w stanie związanym i niezwiązanym. Ponieważ powierzchnia jest nieskończona, całkowanie jest przeprowadzone w jednym wymiarze. Wydaje się jednak, że porównanie wartości potencjałów średniej siły w

minimum daje przynajmniej półilościowy obraz zdolność wiązania aminokwasów i białek przez poszczególne powierzchnie.

Nie bardzo rozumiem dlaczego Autor umieścił „kreski” w wierszach odpowiadających Asp, Glu, Lys i Arg w tabelicy 3.3 (oddziaływanie z ZnS). Z potencjałów średniej siły przedstawionych na rysunku 3.19 wynika, że istnieją stany związane (minima potencjału średniej siły) dla każdego z tych aminokwasów. Minimumm tym odpowiada dodatnia wartość potencjału średniej siły co oznacza, że stan związany jest na pewno mniej prawdopodobny niż niezwiązany ale, tym niemniej, istnieje.

Autor następnie wyznaczył potencjały średniej siły modeli samych łańcuchów bocznych. Stwierdził, że wartości „energii” wiązania pozostają w dość dobrej zgodności z energiami wiązania aminokwasów, jeżeli uwzględni się wkład pochodzący od łańcucha głównego.

Dalsza część pracy dotyczy potencjałów średniej siły wiązania dipeptydów Autor stwierdza, że „energia” adsorpcji nie jest rozkładalna na wkłady poszczególnych aminokwasów. Jest to wniosek bardzo ważny w kontekście tendencji do wyrażania, w badaniach QSAR, właściwości oligo- i polipeptydów jako superpozycji wkładów pochodzących od poszczególnych aminokwasów.

W ostatniej części rozprawy Autor zbadał adsorpcję oligopeptydów i klatki tryptofanowej. Stwierdził, że czas rezydencji oligopeptydu zależy nie tylko od charakteru tworzących go aminokwasów ale również od jego długości. Adsorpcja białka na powierzchniach ZnO i ZnS okazała się zdarzeniem zachodzącym rzadko, natomiast adsorpcja na złocie była trwała, niezależnie od użytego pola siłowego z tym, że w przypadku pola FFB białko wiązało się z powierzchnią złota a w przypadku dwóch pozostałych wiązało się z nim za pośrednictwem warstwy wody.

Moim zdaniem największą wartością rozprawy jest wyznaczenie potencjałów średniej siły wiązania aminokwasów i modeli łańcuchów bocznych z badanymi powierzchniami. Oprócz wartości poznawczej oraz możliwych zastosowań w projektowaniu nanomateriałów, uzyskane dane mogą okazać się bezcenne w rozwijaniu modeli gruboziarnistych do symulacji adsorpcji białek na powierzchniach.

Praca jest napisana poprawnym językiem. Stwierdziłem tylko nieliczne literówki (np. na str. 51 „Watości” w podpisie pod tablicą 1). Ponadto rysunki 3.25 i 3.26, na których zostały porównane „energic” wiązania aminokwasów ze złotem w różnych polach siłowych mogłyby być lepiej opisane; nie wiadomo jakie kolory odpowiadają jakim energiom; ta informacja jest podana w tekście ale rysunek powinien być zwartą całością. Przydałyby się też wartości współczynników korelacji.

Podsumowując, rozprawę doktorską p. mgra Grzegorza Nawrockiego uważam za niezwykle wartościową, zarówno pod względem naukowym jak i prezentacji wyników. Wymienione powyżej uwagi krytyczne, z których część ma charakter dyskusyjny, nie umniejszają w znaczącym stopniu jej wartości. Autor jednoznacznie udowodnił, że potrafi rozwiązywać nietrywialne i wymagające ogromnego nakładu pracy problemy naukowe na poziomie profesjonalnym i przekonująco przedstawić swoje wyniki. Rozprawa spełnia z nawiązką ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie p. mgra Grzegorza Nawrockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę ogrom i wysoki profesjonalizm wykonanej pracy, znakomitą jakość wyników, potencjalne znaczenie tych wyników w przyszłych badaniach naukowych

oraz fakt, że materiał rozprawy został już opublikowany w postaci trzech artykułów w bardzo dobrych czasopismach naukowych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



prof. dr hab. Józef Adam Liwo