



Data: Toruń, 11 września, 2009

L. Dz.

Dr hab. Wiesław Nowak, prof. UMK  
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej  
Instytut Fizyki UMK  
wiesiek@fizyka.umk.pl

**RECENZJA rozprawy doktorskiej**

**Mgra. Szymona Niewieczerała**

**pt.**

**“Dynamika zmian konformacyjnych białek i DNA w modelach gruboziarnistych”**

Do przeszłości odchodzą czasy gdy wysiłek młodych fizyków robiących doktorat skierowany był na dogłębne zbadanie atomu wodoru czy molekuly wody. Wyzwania współczesnej technologii zmuszają nas do szukania skutecznych metod opisu systemów znacznie bardziej złożonych. Przedstawiona mi do recenzji praca Szymona Niewieczerała dotyczy bardzo aktualnej tematyki poszukiwania opisu dynamiki biopolimerów w możliwie prostym i ogólnym języku fizyki. Symulacje numeryczne wykorzystujące komputery tradycyjnie odwołują się do modeli klasycznych, w których zjawiska kwantowe są ukryte w modelowych potencjałach, zaś atomy traktuje się jako punkty materialne. Niestety, podejście to, mimo iż tak proste, jest nadal zbyt kosztowne by badać tak fundamentalne procesy fizyczne jak zwijanie białek czy rozplatanie podwójnych helis DNA. Autor rozprawy wykorzystał w swoich badaniach jeszcze prostsze, ale i bardziej efektywne podejście, budując tzw. modele gruboziarniste białek i kwasów nukleinowych. Modele takie cieszą się ostatnio dużą popularnością, liczba publikacji z tej dziedziny rośnie lawinowo, a każde nowe pomysły są chętnie wykorzystywane przez liczne na świecie grupy badawcze uprawiające modelowanie biomaterii. Problemy atakowane w rozprawie uważam zatem za ważne i nowoczesne.

Praca, licząca 77 stron, składa się z dwustronicowego wprowadzenia, dwóch zasadniczych rozdziałów, 1 strony podsumowania oraz bibliografii obejmującej 112 starannie dobranych pozycji literaturowych. Oparta jest na 4 publikacjach (2 opublikowane, 2 wysłane do druku), w których Sz. Niewieczyński jest współautorem. Publikacje te są dołączone do egzemplarza rozprawy, jak rozumiem w celu lepszego poznania tematu przez czytelnika.

Przedstawię kolejno ocenę rozdziałów i uwagi merytoryczne na ich temat.

Rozdział 1 (czyli Wstęp, 2 strony) jest napisany bardzo pobieżnie. Autor daje mini-wprowadzenie w tematykę modelowania białek metodami gruboziarnistymi, prezentuje podstawową, wcześniejszą, literaturę naukową z tej dziedziny i podkreśla, że modelowanie wytrzymałości mechanicznej biopolimerów jest szczególnie ważne w świetle wielkiego rozwoju techniki mikroskopii sił atomowych czy szczypiec optycznych. Ponieważ techniki te pozwalają na pomiary sił (rzędu pikonewtonów) działających na pojedyncze molekuly wypada tylko zgodzić się z opiniami doktoranta. We Wstępie brakuje wyraźnego sformułowania celów pracy.

Rozdział 2 poświęcony jest dynamicznym modelom gruboziarnistym. Najpierw autor omawia konstrukcje modeli dla białek, potem dla aminokwasów. Dla białek stosuje wprowadzony w 2007 przez Sułkowską i Cieplaka model typu Go. Z grubsza polega on na zastąpieniu kilkunastu atomów aminokwasu jedną kulką umieszczoną w miejscu atomu C $\alpha$ . Kulki wzdłuż łańcucha powiązane są potencjałem harmonicznym, oddziaływania długi zasięgowe dzieli się na natywne (potencjał typu Lennarda-Jonesa) i nienatywne (potencjał odpychający). Szkoda, że autor w rozprawie nie podał szczegółów ważnego dla modelu białek, a stosowanego w obliczeniach, potencjału chiralnego. W badaniach dynamiki rozwiązuje równanie ruchu Langevina, które wprowadza termostat i uwzględnia efektywnie lepkość roztworu. W dalszej części

rozprawy model ten wykorzystywany jest do wprowadzenia oddziaływań hydrodynamicznych. Badana jest również dynamika brownowska białek.

Modelowanie DNA jest znacznie trudniejsze. Rozważane są trzy modele gruboziarniste (I –III), różniące się, m.in., liczbą (2-5) i ułożeniem atomów modelowych. Prezentacji modeli towarzyszy solidny przegląd literatury. Zrozumienie opisu modelu I jest utrudnione, gdyż brakuje rysunku z numeracją atomów. Sam pomysł starannego porównania tych modeli w różnych warunkach rozplatania czy rozciągania DNA uważam za bardzo cenny. Doktorant pomyślnie zrealizował to zadanie i zgromadził ważne dane porównawcze.

Przebadano cztery modelowe podwójne helisy DNA o długości ok. 22 par zasad – dwa obiekty pobrane z bazy PDB i dwie klasyczne sekwencje poly-(dA-dT) i poly-(dG-dC). Systemy te poddano mechanicznym odkształceniom, polegającym na przyłożeniu określonych sił lub momentów sił do wybranych atomów, w kierunkach ważnych dla interpretacji zjawisk fizycznych. Wyniki, m.in., zależności obserwowanych sił w funkcji wydłużenia, przedstawiono na kilkunastu wykresach i diagramach. Wszystkie modele DNA poprawnie przewidują większą trwałość par G-C niż A-T. Wartości maksymalnych sił ścinających zależą od sekwencji DNA. Bardzo ciekawe i, moim zdaniem, nowatorskie są wyniki związane z wymuszaniem przejść fazowych w DNA poprzez zewnętrzny moment siły – badania takie są rzadkie, zaś zjawisko skręcania DNA ma podstawowe znaczenie biologiczne.

W kolejnej części rozdziału drugiego (2.3) autor zajął się badaniem wpływu włączenia oddziaływań hydrodynamicznych (HI) do modelu gruboziarnistego na kinetykę zwijania białek. Jest to też istotny problem naukowy, do tej pory nie rozstrzygnięty jednoznacznie. Włączenie oddziaływań przyspieszyło zwijanie białek. Autor pokazał, że przyspieszenie to dotyczy fazy początkowego kolapsu struktury białka. Obliczane były też fluktuacje wokół

struktur natywnych w sytuacji, gdy oddziaływania HI występują i gdy się je zaniedbuje. Okazało się, że tutaj akurat ich wpływ jest znikomy.

Lektura Rozdziału 2 prowadzi do szeregu uwag i pytań szczegółowych:

- Str. 7 – Autor twierdzi, że efektywna temperatura pokojowa, w przyjętej w tej części definicji temperatury  $T_{\text{eff}} = k_B T / \epsilon$  efektywnej wynosi 0.3, zaś stosowany  $\epsilon = 1$  kcal/mol. Coś tu się nie zgadza, ponieważ z moich oszcowań wynika, iż pokój miałby przy tych założeniach temperaturę 150 Kelwinów! ( $k_B = 1.987$  cal/mol\*K)
- Nie ma żadnej dyskusji silnego założenia o równej masie wszystkich kulek w modelu.
- Str. 14 dyskusja o modelowych wartościach energii wiązań wodorowych jest ciekawa, brakuje jednak komentarza, jak przyjęte wartości mają się do wielkości mierzonych eksperymentalnie lub obliczanych metodami mechaniki kwantowej (wg mnie są one ok 10 x mniejsze).
- Str. 14 – przydałoby się podanie stosowanej w modelu II DNA definicji “persistence length” (długość sztywności).
- Przy omawianiu wyników pouczające mogłoby być zestawienie histogramów sił zrywania kontaktów natywnych (np. z rys. 2.5) dla par G-C i A-T, szerokość rozkładów mogalby przynieść nowe informacje o roli otoczenia danej pary w modelach I-III.
- Str. 27. “Zaobserwowaliśmy wyraźną zależność między dystansem rozciągnięcia  $d$  a prędkością ciągnięcia” – zdanie bez sensu. Kolejne zdanie w tym akapicie też jest nieprecyzyjne.
- Na publicznej obronie autor mógłby skomentować dość nieoczekiwane kształty (“wygięte do tyłu”) wykresów (prawe dolne panele) scenariuszy rozciągania DNA z rys. 2.10 i 2.14.
- W Rozdziale 2 zgromadzono wiele interesujących obserwacji, ale brakuje podsumowania i wniosków z tej części badań.

- Str 29, Rys, 2,16 W tekście rozdziału brak informacji jakie były kryteria klasyfikowania danej struktury do konkretnego typu DNA reprezentowanego na tym diagramie fazowym.
- Str 30, Tytuł akapitu “Rozciąganie przy stałej prędkości kątowej” nie oddaje jego treści – powinno raczej być “skręcanie...”; przydałby się też tutaj rysunek ilustrujący przyjęty do obliczeń model, wraz ze zdefiniowanymi przez autora “ramkami”.
- W języku polskim nie ma terminu “solwent” występuje “rozpuszczalnik” (str 32)
- Wyjaśnienia wymaga silne stwierdzenie: “Cząsteczki zanurzone w solwencie poruszając się wywołują długozasiegowe przepływy cieczy..”. Co jest przyczyną ruchu tutaj dyskutowanego? Skąd bierze się dysypowana energia? (str. 32)
- Przydałby się, moim zdaniem, lepszy opis tensora Rothe-Pragera. Niezbyt szczęśliwie dobrane są indeksy we wzorze 2.12, ponieważ raz (ij) oznaczają atomy (kulki), a raz współrzędne wektora położenia.
- Str. 36: niejasne są terminy: “Szerokie plateau optymalnego zwijania” oraz “niewypełnione punkty” – w podpisie do Rys. 2.18. Tam też występuje zupełnie dziwaczny termin “medianowy czas zwijania” (nieco wyżej autor pisze o medianie czasu zwijania – lepiej)
- Str. 37, Lepszym odpowiednikiem ang. “radius of gyration” zamiast “promienia gyracji” jest zgodny z terminologią proponowaną przez S. Banacha w 1938 termin “ramię (lub promień) bezwładności”.
- Str 38 , żargon : “ogony dla dużych czasów są ze sobą porównywalne”
- Styl tego Rozdziału, będącego w części pierwszej w znacznym stopniu tłumaczeniem pracy wysłanej do druku nr IV, zaś w drugiej części pracy nr II opublikowanej w JCP, nie jest, niestety, idealny. Zdarzają się lapsusy językowe typu:
  - “ Powstający wzór F-d można podzielić na trzy etapy” (str 18)

“ Scenariusz staje się zakrzywiony” (str 21); “oporowy moment siły” (str 30) zwany wcześniej (poprawnie) momentem siły oporu na skręcanie, czy też: “ Kulki w jednej ramce są przyczepione do swoich bliźniaków za pomocą sprężynek” (str. 30).

Pragnę zaznaczyć, że uwagi te nie pomniejszają zasadniczo wysokiej oceny tej części badań. Znaczenie tych wyników jest moim zdaniem bardzo duże, ponieważ dają one cenne wskazówki metodologiczne na temat jak najlepszego modelowania rzeczywistych (a więc złożonych z tysięcy aminokwasów czy nukleotydów) układów biologicznych.

Rozdział 3 I ostatni poświęcony jest modelowaniu kinetyki zwijania białek. Rozważane są modele wywodzące się z modelu spinowego Isinga o rosnącym stopniu złożoności: model 4-ro stanowy, 5-cio stanowy i 36 stanowy. Kontakty natywne konformacji – jeśli istnieją reprezentowane są spinem 1, jeśli ich nie ma – spinem 0. Autor zbadał kinetykę przejść posługując się równaniem M (*master equation*) nazywanym w rozprawie dość nietypowo “równaniem mistrzowskim”. Jest to ciekawy chociaż raczej trudny w lekturze fragment rozprawy. Staranne przebadanie cech serii tych modeli procesu zwijania białka prowadzi do ważnej konkluzji: wyznaczenie jednoznaczne stanów przejściowych w tym formalizmie jest możliwe tylko poprzez analizę wszystkich dróg prowadzących ze stanu zdenaturowanego do natywnego białka. Nie jest to zachęcający wynik, autor przypuszcza, że być może wprowadzenie bardziej rozbudowanych modeli pozwoli zbliżyć się do rzeczywistych układów i odkryć reguły wyznaczania stanu przejściowego. Rozdział 3 zawiera nowe, oryginalne wyniki analiz, rozszerzające znacznie wcześniej opublikowane w PRL dociekania prof. M. Cieplaka i in.

Rozdział ten wydaje się napisany staranniej niż poprzedni, chociaż i tutaj są pewne “kwiatki stylistyczne”, np. “Jest to dyskretny model, w którym wprowadzono bezpośrednio krajobraz energii swobodnej” (str 47), “kinetyka ruchów odpowiada ...

zmianom konformacyjnym”. Zauważyłem, że w rozprawie w żaden sposób nie są opisane “krzywe chevronowe” dyskutowane na str. 62.

W Bibliografii, wyczerpującej i na ogół starannie zredagowanej, są drobne problemy w pozycjach [9], [19], [21], [22]=[4], [29], [31], [35], [39], [56], [64], [75], o charakterze pomyłek drukarskich.

Pomimo tych w istocie drobnych uwag krytycznych, uważam, że mgr Szymon Niewieczerał realizując swoją rozprawę doktorską wykonał wiele różnorodnych, trudnych badań i uzyskał wyniki zasługujące na wyróżnienie. Większa ich część została już opublikowana w recenzowanych czasopismach o zasięgu światowym. Ocenę samej rozprawy komplikuje fakt, że treści rozdziałów są w znacznym stopniu tłumaczeniami prac współautorskich, załączonych do tekstu poddanego recenzji, trudny jest zatem do oszacowania indywidualny wkład doktoranta.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Szymona Niewieczerała pt. „Dynamika zmian konformacyjnych białek i DNA w modelach gruboziarnistych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta w fizyce oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia w zupełności wymagania ustawowe [Art. 13.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365)] i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr Szymona Niewieczerała do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

mgr. Nowak