



Warszawa, 6 sierpnia 2012

Dr hab. Joanna Trylska, prof. UW
tel. (22) 5540843

Rada Naukowa
Instytutu Fizyki PAN
al. Lotników 32/36
02-668 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Mateusza Sikory pt. "Stabilność mechaniczna białek i agregaty sfunkcjonalizowanych nanocząstek w modelach gruboziarnistych"

Rozprawa mgr Mateusza Sikory została napisana w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki PAN pod kierunkiem prof. dra hab. Marka Cieplaka. Celem pracy było zbadanie i zrozumienie stabilności mechanicznej różnych białek oraz agregacji i kompresji w warstwach technologicznie ważnych nanocząstek. Cel realizowano przy użyciu modeli pełnoatomowych i gruboziarnistych w symulacjach komputerowych. Stosowane metody to głównie modele zredukowane w symulacjach klasycznej dynamiki molekularnej (włączając w to tzw. dynamikę Brownowską i Langewinowską) oraz algorytmy Monte Carlo. Ze względu na długie skale czasowe studiowanych zjawisk i w większości przypadków niemożliwość symulowania tylu obiektów na poziomie pełnoatomowym autor musiał zastosować modele gruboziarniste. Dobrał je jednak tak, aby uzyskać odpowiedzi na zadany problem badawczy.

Rozprawa doktorska magistra Mateusza Sikory zawiera 67 stron w języku polskim opisujących modele komputerowe wykorzystane w pracy badawczej oraz wyniki dwóch głównych problemów tematycznych wnikliwie zbadanych przez autora pracy. Do rozprawy załączono także obszerny aneks w języku angielskim zawierający odbitki publikacji autora oraz manuskryptów publikacji wysłanych do czasopism. Część w języku polskim jest streszczeniem wyników opisanych w tych publikacjach. Wynikiem rozprawy doktorskiej

Mateusza Sikory jest dziewięć publikacji. W siedmiu z nich pan Sikora jest pierwszym autorem. Sześć z nich ukazało się już w druku. Wszystkie czasopisma, w których opublikowano prace są na liście filadelfijskiej o wysokim pięcioletnim tzw. "impact factor" — IF. Są to PLoS Comput. Biol. (IF 5.8), Nucleic Acids Research (IF 7.4), J. Chem. Phys. (IF 3.2), Proteins: Struct. Funct. Genet. (IF 3.2), Nanotechnology (4.0), Langmuir (4.5). Trzy publikacje zostały przedstawione w rozprawie w formie pełnych manuskryptów. Pierwsza publikacja pana Sikory w PLoS Comput. Biol. z 2009 roku ma już 11 cytowań (dane z ISI Web of Science, stan na 01.08.2012), kolejne ukazały się w zeszłym lub w tym roku, więc nie można ocenić ich cytowalności.

W rozprawie opisane są dwa ważne zagadnienia. Jednym z nich jest mechanostabilność białek. Autor zbadał stabilność mechaniczną wielu tysięcy białek, których struktury zostały zdeponowane w bazie danych struktur białkowych Protein Data Bank. Przegląd rozciągania struktur białkowych przeprowadzono dla ponad 17 tysięcy białek monomerycznych. Metody użyte przez autora pozwoliły na zrozumienie z czego wynika duża stabilność pewnych białek i opisanie mechanizmów, które są za tę mechanostabilność odpowiedzialne. Znalaziono także, że oprócz rozrywania wiązań wodorowych pomiędzy strukturami drugorzędowymi niezwykle istotną rolę pełnią pseudowęzły cystynowe. Występowały one w kilkunastu najbardziej stabilnych białkach. Zaobserwowano, że stabilność białek zależy od ich długości oraz od struktury drugorzędowej. Przykładowo, białka o przewadze struktury helikalnej nie są białkami silnymi tak jak niektóre białka o przewadze struktur typu beta-kartki. Najsilniejsze białka nie są konieczne białkami strukturalnymi, a na przykład tytyna, uznawana dotychczas za jedno z najbardziej stabilnych białek, w klasyfikacji autora była na pozycji o numerze ponad 3000. Systematyczne zbadanie stabilności tylu białek wymagało od autora wielu obliczeń nawet dla pojedynczego białka, gdyż określenie mechanizmu rozciągania wymaga przykładania siły w wielu miejscach białka (punkty zaczepienia dźwigni), tak aby sukcesywnie eliminować pewne mechanizmy. Wymaga też wielu symulacji kontrolnych.

Niestety, doświadczenia rozwijania białek przy użyciu mikroskopu sił atomowych, które mogłyby potwierdzić stwierdzoną teoretycznie mechanostabilność białek są niezwykle trudne do przeprowadzenia, więc przewidywania autorów nie mogą być szybko potwierdzone bądź obalone doświadczalnie. Istotne jest jednak, że autor zaproponował listę bardzo istotnych białek, dla których postuluje wyjątkowo wysoką stabilność i zasugerował grupom eksperymentalnym ciekawe i użyteczne obiekty badań. Dodatkowo, w jednej z prac, w której mgr Sikora jest drugim autorem, przeprowadzono symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej dla postulowanych metodami gruboziarnistymi najsilniejszych białek zawierających pierścienie cystynowe. Rozciąganie tych białek w modelu pełnoatomowym potwierdziło ich wyjątkową stabilność pochodzącą od szczególnego układu cystyn.

W kolejnym etapie poszerzono badania o białka występujące w postaci dimerów, gdyż wiadomo, że wiele białek w przyrodzie nie działa pojedynczo ale w kompleksach. Okazało się, że mechanizmy oporu dla dimerów istotnie zależą od sposobu rozciągania i miejsca przyłożenia siły i wykazują asymetrię. Sprawdzono też własności mechaniczne niektórych białek wielodomenowych i określono jak ta wielodomenowość wpływa na mechanizm rozciągania. Nie zaobserwowano korelacji między liczbą domen w białku a maksymalną siłą rozciągającą. Badania mechanostabilności białek dimerycznych jak i wielodomenowych jeszcze trwają.

Wszystkie obliczenia autora uzyskane zarówno metodami pełnoatomowymi jak i zredukowanymi dają jednak wyniki jakościowe a nie ilościowe, gdyż skale czasowe nie pozwalają na odtworzenie sił rozciągających, które są obserwowane doświadczalnie. Uzyskane siły maksymalne będą w symulacjach tego typu znacznie zawyżone, ale takie wzmocnione próbkowanie przestrzeni konformacyjnej białek daje wiele ciekawych odpowiedzi dotyczących mechanizmu rozciągania, a także możliwość relatywnego uszeregowania białek pod względem ich stabilności. Umożliwia też porównanie tej klasyfikacji z doświadczeniem tam, gdzie takie dane są dostępne. Brakuje mi jednak w rozprawie dyskusji jak mechanizmy rozciągania białek mogą zależeć od temperatury, pH lub innych czynników środowiska. Są białka, które mają optimum działania w niskich bądź wysokich temperaturach (psychrofilne czy termofilne). Czy metody stosowane przez autora nadają się do tego typu badań? Czy istnieje zależność mechanostabilności białek nie tylko od struktury drugorzędowej czy długości łańcucha ale od optymalnej temperatury działania danego enzymu? Czy niskocząsteczkowe ligandy/substraty zmieniają po związaniu w znaczący sposób stabilność białek? Wydaje mi się, że można w przyszłości podjąć próbę odpowiedzi i na te pytania.

Autor rozprawy stworzył i umieścił zarówno swoje wyniki, jak i wyniki, które uzyskali inni członkowie grupy w bazie danych mechanicznego rozwijania białek. Baza ta jest ogólnodostępna i oprócz wyników teoretycznych zawiera także dane doświadczalne. Oprócz bazy dostępny jest także zdalny serwer, któremu można zlecić symulacje rozciągania białka, dla którego nie ma wyników rozciągania w bazie. Baza ta jest pożyteczna i została opisana szczegółowo w jednej z publikacji pana Sikory, w której jest on pierwszym autorem.

Drugim obszarem tematycznym, który został przedstawiony w rozprawie dotyczy symulacji komputerowych nanocząstek złota. Nanocząstki złota (AuNC) mogą być wykorzystywane w biologii molekularnej (jako sondy) oraz w diagnostyce medycznej. Podczas agregacji zmieniają się właściwości optyczne nanocząstek złota i można w ten sposób monitorować poziom różnych biomolekuł w komórkach. Autor rozprawy starał się zbadać jak agregują nanocząstki złota w obecności biomolekuł działających jako łączniki, czyli molekularny "klej" spajający takie układy. Wiadomo, że istnieje zależność pomiędzy poziomem białka C-

reaktywnego (tzw. CRP) a ryzykiem choroby wieńcowej. CRP mogłoby działać jako łącznik powodujący agregację nanocząstek złota i tym samym jego detekcję. Autor we współpracy z grupą doświadczalną przeprowadził symulacje agregacji nanocząstek złota w obecności modelowego łącznika, którym był związek reno-organiczny oraz łącznika modelującego białko CRP. Symulacje pokazały jak zależy szybkość agregacji od liczby łączników na danej nanocząstce, a także od wielkości nanocząstek. Te badania miały na celu znalezienie jak najlepszych warunków dla tworzenia agregatów nanocząstek z łącznikiem renowym.

Następnym tematem związanym z nanocząstkami złota było ich zastosowanie przemysłowe. Autor badał samoskładanie czy samotworzenie się układów nanocząstek złota, których powierzchnia została pokryta 16-węglowymi łańcuchami węglowymi. Badał też zachowanie takich nanocząstek przy powierzchniach. W tym przypadku najpierw przeprowadził symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej dla dwóch nanocząstek i dla jednej nanocząstki przy powierzchni. Następnie z pełnoatomowych symulacji wyznaczył parametry efektywnych potencjałów oddziaływań do dalszej gruboziarnistej dynamiki Brownowskiej układów nanocząstek.

Kolejnym rodzajem nanocząstki badanej przez autora rozprawy były nanocząstki tlenu indu domieszkowanego cyną. Przy użyciu modeli gruboziarnistych i algorytmu Monte Carlo autor badał agregację tych nanocząstek i porównywał z obrazami z transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM. Badał także ich przewodnictwo. Pozwoliło to na zaproponowanie optymalnych warunków tworzenia warstw tego typu nanocząstek.

Przedstawione w rozprawie wyniki są bardzo ciekawe. Poprzez zastosowanie modeli zredukowanych autor przeprowadził analizę stabilności wielu różnych białek. Odkrył nowe rodzaje mechanizmów stabilności białek oraz przewidział białka bardzo silne mechanicznie. Za najważniejszy wynik tej części pracy uważam zapostulowanie mechanicznej stabilności węzłów cystynowych. W przypadku nanocząstek złota autor podjął się trudnego zadania symulacji agregacji tych układów. Ogólnie, wyniki tych badań sugerują liczne doświadczenia oraz kolejne badania teoretyczne. Tematyka ta jest więc bardzo aktualna.

Autor nie uniknął jednak literówek i drobnych błędów stylistycznych w głównej części rozprawy napisanej w języku polskim. Wygląda to czasami jakby autor nie sprawdził pisowni słów. Razi mnie zwłaszcza używanie zwrotów „która tą pętlę wciąga” czy „pokazuje tą samą dystrybucję”. Nie istnieje też wiązanie hydrofobowe, mówimy raczej o oddziaływaniach czy siłach hydrofobowych. Tytuł sekcji 2.4 mówi chyba o innym materiale niż jest potem opisywany w tej sekcji. Na stronie 28, 30 i 32 autor odwołuje czytelnika do rysunków w pracy VIII i samej pracy VIII podczas, gdy opisuje wyniki i rysunki umieszczone w pracy nr VI. Te drobne błędy nie mają jednak dużego wpływu na wyniki obliczeń czy cały odbiór pracy biorąc pod uwagę liczbę publikacji autora.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magistra Mateusza Sikory stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej autora oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez autora. Modele zostały dobrze dobrane do problemów badawczych. Tym samym recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Według mojej oceny rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie i o nie wnioskuję.

J. Inyńska