

Recenzja
pracy doktorskiej mgr Anny Starzyk
pt.: „Białka w pobliżu powierzchni naładowanych i w warunkach tłoku molekularnego”

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska mgr Anny Starzyk ma 47 stron, z czego 2 pierwsze to podziękowania i przedmowa wyjaśniająca, że praca oparta jest na dwóch opublikowanych artykułach oryginalnych oraz na wynikach jeszcze nieopublikowanych, ale odrębnych od tych już opublikowanych, a ostatnich 5 stron to spis cytowanej literatury. Praca ma też aneks, zawierający zapowiadane w przedmowie dwa artykuły oryginalne.

Rozprawa nie ma typowego dla prac doktorskich układu, tj., podziału na Wstęp, Metody, Wyniki, Dyskusja i Podsumowanie. Poza tym, brakuje w niej spisu treści, ale przede wszystkim wyróżnionych celów pracy. Na dysertację składają się trzy niezależne części, z czego dwie są niedokładnym i niebyt starannym tłumaczeniem bardzo dobrych prac oryginalnych zamieszczonych w Aneksie.

Praca doktorska mgr Anny Starzyk dotyczy trzech ważnych zagadnień, badanych metodami obliczeniowymi w grupie prof. Marka Cieplaka, dotyczących:

(1) wiązania białek do stałego podłoża oraz zachowania związanych z podłożem białek. Te badania mają zarówno znaczenie czysto poznawcze jak i szerokie zastosowanie w technologiach bazujących na białkach (protein-based technologies). Poznanie mechanizmów wiązania oraz sposobów kontroli tego procesu są konieczne. W niektórych zastosowaniach (np. mikro-macierzach białek) istotne jest i samo wiązanie i sposób wiązania cząsteczek białka z podłożem, w innych zaś (np. implantów biomedycznych) istotne jest zapobieżenie procesowi wiązania białka.

(2) wpływu pola elektrycznego na wiązanie białek do powierzchni stałych. Na powierzchni białek występują grupy polarne i naładowane oraz niepolarne. Pole elektryczne zewnętrzne, lub generowane przez ładunki na powierzchni stałej, wpływa na efektywność wiązania białka przez powierzchnię. Zbadanie wpływu pola elektrycznego na proces wiązania białka ma szczególne znaczenia dla określenia parametrów kontrolujących proces wiązania białka z powierzchnią.

(3) zachowania białka „w tłoku molekularnym”. Otoczenie białek w roztworze, gdzie cząsteczka białka oddziałuje praktycznie tylko z rozpuszczalnikiem, jest zupełnie inne niż w komórce, gdzie stężenia i bliskość innych związków są duże. Badanie wpływu zatłoczonego środowiska na strukturę, własności fizyko-chemiczne, dostępną przestrzeń konformacyjną itp.

białka jest niezwykle istotne dla zrozumienia sposobu funkcjonowania białek w natywnym środowisku.

Opisane w dwóch pierwszych częściach pracy badania prowadzone były na modelach pełnoatomowych metodą symulacji dynamiki molekularnej. Częsteczki były sparametryzowane w polu siłowym GROMOS 53A6, a do symulacji wykorzystano pakiet GROMACS.

W badaniach zagadnień z grupy (1), układy symulacyjne składały się z powierzchni miki, białka, wody oraz jonów. Układem porównawczym było uwodnione białko, prawdopodobnie bez jonów. Powierzchnia miki zbudowana była z regularnie rozłożonych na płaszczyźnie cząsteczek SiO₂ i była ujemnie naładowana lub neutralna. Sprawdzane było wiązanie trzech różnych cząsteczek białka z powierzchnią, 20-aa klatki tryptofanowej, 56-aa domeny białka G oraz 70-aa hydrofobiny, a także 129-aa lizozymu, w obecności różnego stężenia jonów, dla trzech różnych orientacji i odległości początkowych względem powierzchni miki. Ze względu na obecność jonów i naładowanych grup, w obliczeniach oddziaływań elektrostatycznych nie użyto metody sumowania Ewalda, lecz promienia obcięcia $R_c = 2.5$, lub 3.1 nm, z wyjątkiem układu o neutralnym ładunku gdzie zastosowano obie metody. Nie podano natomiast, jaki był promień obcięcia oddziaływań van der Waalsa oraz czy układ był periodyczny. Symulacje prowadzono przez czas dłuższy niż 10 ns. Szereg wygenerowanych trajektorii przeanalizowano pod kątem (a) zmian kształtu cząsteczki białka, używając do tego dwóch parametrów, promienia żyracji, R_g (wzór 2) oraz parametru w (wzór 3); (b) ruchliwości (fluktuacji) bezwzględnej (wzór 4) i względnej (wzór 5) reszt aminokwasowych w białku.

W tej części pracy wykazano wpływ powierzchni miki na końcowy kształt cząsteczki białka oraz wpływ jonów na efekt miki. Niestety, nie omówiono wpływu jonów na wiązania się białek z powierzchnią miki oraz jak wyniki zależą od sposobów wyliczania oddziaływań elektrostatycznych. Przedstawione wyniki nasuwają ogólny wniosek, że struktura białka po związaniu z powierzchnią miki jest przypadkowa i mniej rozwinięta przy większym stężeniu jonów.

W badaniach zagadnień z grupy (2), użyto dwóch typów układów symulacyjnych. Jeden składał się z białka, wody oraz jonów; drugi miał dodatkowo dwie sztywne nienaładowane ściany na dole i na górze pudełka symulacyjnego. Układ pierwszy był periodyczny w trzech wymiarach, a drugi w dwóch. Do obu układów przykładano pole elektryczne o różnym natężeniu (0-10 V/nm) i badano zachowanie białka klatki tryptofanowej w funkcji natężenie pola oraz stężenia jonów. Doktorantka nie wyjaśnia motywacji tej części pracy, nie wiadomo, jaką rolę mają spełniać dwie sztywne powierzchnie, a konkluzja wynikająca z tych badań jest zwarta w zdaniu: „Widzimy, że strukturom bardziej rozciągniętym odpowiadają wyższe wartości w oraz wyższe wartości promienia żyracji”. Ta konkluzja jest tak oczywista, że zupełnie nie wymagała przeprowadzania tak wyrafinowanych badań jak opisane w tej części pracy.

Opisane w trzeciej części pracy symulacje dynamiki prowadzone były na trzech typach białek w modelu gruboziarnistym. Każde z białek było umieszczone w niejawnym rozpuszczalniku i otoczone kulami modelującymi zatłoczone środowisko. Wyniki symulacji wskazują, że fluktuacje reszt aminokwasowych albo nie zależą od zatłoczenia środowiska badanego białka, albo wzrastają wraz z zatłoczeniem i zależą od wielkości kul generujących zatłoczenie molekularne.

Rozprawa doktorska mgr Anny Starzyk jest skrótowa, a informacje, których dostarcza nie są wystarczające, aby inne osoby mogły samodzielnie powtórzyć przeprowadzone badania. Niemniej jednak Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, znajomością wielu technik używanych w modelowaniu molekularnym oraz wielką pracowitością i dociekliwością. Na szczególnie podkreślenie zasługują bardzo staranne ilustracje badanych układów i wykresy. Niestety, prezentacja wyników liczbowych nie jest przejrzysta – otrzymane wartości liczbowe powinny być umieszczone w tabeli, gdzie łatwo prześledzić trendy w zachowaniu układów i porównać układy między sobą.

Niestety, oprócz wymienionych wcześniej, praca ma jeszcze inne niedociągnięcia, które podsumuję poniżej.

1. Doktorantka powołuje się na model Go, bez wyjaśnienia jego istoty, czy choćby powołania się na jego opis w literaturze.
2. Opisując badane w pracy układy oraz narzędzia, Doktorantka nie podała wersji pakietu GROMACS, nie uzasadniła wyboru pola siłowego, nie wyjaśniła jak były sparametryzowane jony oraz jakich jonów użyła – dopiero na stronie 24 w rozdziale 4.3 podała, że układ został całkowicie zneutralizowany 13 jonami Cl^- i 88 jonami Na^+ .
3. Użycie promienia obciążenia oddziaływań elektrostatycznych może spowodować nierównomierny rozkład temperatury w układzie (*Molecular Simulation* 16,167-177,1996). W pracy brakuje szczegółów dotyczących kontroli temperatury układu – czy np. kontrolowano osobno temperaturę rozpuszczalnika i osobno białka?
4. Doktorantka wyraża się bardzo nieprecyzyjnie mówiąc „w czasie dynamiki białka”. Przecież białko w wodzie podlega dynamice cały czas.
5. Za bardzo niefortunna uważam nazwę „tłok molekularny”. W pierwszej chwili ma się skojarzenie z urządzeniem mechanicznym. Znacznie zgrabniejsze wydaje się nazwanie tego stanu „zatłoczeniem molekularnym”.
6. Tytuły rozdziałów – w języku polskim tylko pierwsze słowo w tytule pisze się z dużej litery, pozostałe z małej. Nie stawia się też kropek na końcu tytułu.
7. W pracy znalazłam też kilka niepoprawnych pojęć, np. „...symulacje stały się w ostatnich dziesięcioleciach ważną gałęzią nauki obok eksperymentu i teorii” i pomyłek językowych, np.

„bardziej wyraźny” zamiast „wyraźniejszy”, czy, w przypadku policzalnych obiektów, ilość zamiast liczba.

Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym wymaga, by rozprawa doktorska stanowiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazywała ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktoranta. Praca doktorska mgr Anny Starzyk wykazuje indywidualny wkład kandydata przy wykonywaniu części obliczeniowej pracy stanowiącej istotę przeprowadzonych badań oraz przy opracowaniu i interpretacji wyników, a tym samym spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Anny Starzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek Ciechanowski