



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

Warszawa, dnia 25.10.2007

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Joanny Idy Sułkowskiej
pt. „Zwijanie i rozwijanie białek w modelach gruboziarnistych”**

Dużej skali przejścia konformacyjne w białkach, a w szczególności zwijanie i rozwijanie struktury natywnej białek, należą do najbardziej fascynujących procesów molekularnych zachodzących w organizmach żywych. Doświadczalne badania tych procesów są niezwykle skomplikowane, kosztowne i pracochłonne. Stąd poszukiwanie nowych technik eksperymentalnych i próby modelowania molekularnego zwijania i rozwijania struktury białek. Mikroskopia sił atomowych, teorii której w dużej mierze dotyczy praca pani mgr Sułkowskiej, jest nowoczesną i bardzo obiecującą techniką doświadczalną, dostarczającą istotnych informacji na temat struktury białek, oddziaływań molekularnych w białkach a także kinetyki i mechanizmów dużych zmian konformacyjnych łańcuchów polipeptydowych (i innych makromolekuł).

Klasyczne modelowanie molekularne białek ograniczone jest dziś do bardzo małych układów lub/i bardzo krótkich skal czasowych badanych procesów, a co za tym idzie ograniczonych przestrzennie zmian konformacyjnych. Wynika to ze stopnia komplikacji układu (setki, a częściej tysiące atomów) i fizycznego czasu trwania procesów zwijania/rozwijania białek (rzędu milisekund do minut). Klasyczna dynamika molekularna dla białek jest zwykle ograniczona do skali czasowej rzędu nanosekund, a w najlepszym przypadku do mikrosekund. Stąd próby uproszczenia problemu poprzez redukcję liczby traktowanych jawnie stopni swobody ruchu układu i zastosowanie uproszczonego opisu oddziaływań molekularnych. Stosuje się różnorodne poziomy upraszczania reprezentacji geometrycznej molekuł białek, od zjednoczonych reszt (gdzie cała reszta aminokwasowi jest traktowana jako pojedyncze centrum oddziaływań) do kilku zjednoczonych atomów dla każdej reszty (reprezentujących segmenty łańcucha głównego i fragmenty grup bocznych). Zależnie od przyjętej reprezentacji modelu mezoskopowego definiuje się odpowiednie schematy oddziaływań, na ogół wyprowadzane na podstawie analizy statystycznych prawidłowości obserwowanych w już znanych strukturach białek.

Oddzielną klasę modeli mezoskopowych (czy „gruboziarnistych”, jak to jest określane w pracy mgr Sułkowskiej, i w innych publikacjach) stanowią tak zwane modele Go. W modelach tych zakłada się, że istotne są tylko oddziaływania, które obserwowane są w strukturze natywnej. Oczywistą wadą modeli go jest fakt, że aby przystąpić do symulacji molekuly trzeba znać strukturę jej zwoju natywnego. Co za tym idzie, modele tego typu nie nadają się więc do przewidywania struktury białek. Modelowanie dynamiki białek w stanie denaturowanym za pomocą modeli Go musi być również traktowane z dużą ostrożnością. Wiadomo, że w procesach zwijania wielu białek zasadniczą rolę odgrywają oddziaływania nienatywne. Wróć do tego zagadnienia w dalszej części tej recenzji.

Rozprawa doktorska mgr Sułkowskiej dotyczy kilku, powiązanych tematycznie i metodologicznie, zagadnień dotyczących mezoskopowego modelowania struktury, dynamiki i termodynamiki białek. We wstępie do rozprawy przedstawiono w bardzo jasny i dobrze zorganizowany sposób główne cele pracy i ich znaczenie dla teorii i badań doświadczalnych białek. W dwóch pierwszych rozdziałach (około 20 stron) omówiono podstawowe zagadnienia dotyczące związków struktury i funkcji białek z ich własnościami mechanicznymi oraz przedstawiono podstawowe problemy modelowania molekularnego struktury i dynamiki układów białkowych. Rozdział 3 dostarcza bardzo obszernego omówienia szeregu gruboziarnistych modeli Go. Większość z tych modeli zostało sformułowanych i starannie przeanalizowanych przez autora pracy. Modele różnią się poziomem reprezentacji i sposobem zdefiniowania schematu oddziaływań. Prostsze modele są jednocentrowe – każda reszta jest reprezentowana przez pojedynczy zjednoczony atom o współrzędnych odpowiedniego atomu Ca. Bardziej skomplikowane modele uwzględniają dodatkowy atom symulujący grupy boczne o współrzędnych atomu Cb. Poza tym modele różnią się sposobem opisu lokalnej sztywności konformacyjnej (w tym chiralności) łańcucha głównego i sposobem zdefiniowania oddziaływań Go – map kontaktów natywnych. Wszystkie modele były symulowane w przestrzeni ciągłej z zastosowaniem klasycznych schematów dynamiki molekularnej. Dla odpowiednich zastosowań opisanych w dalszej części pracy schematy dynamiki molekularnej były odpowiednio modyfikowane w celu odtworzenia siły bądź przesunięcia symulujących doświadczalne rozciąganie białek (mikroskopia sił atomowych). W rozdziale 4 dokonano wyboru optymalnego modelu Go do symulacji procesów rozciągania białek. Rozważono 504 modele opisane w rozdziale 3 przy czym próbne symulacje wykonano dla 61 najbardziej realistycznych modeli. Najlepszy model wybrano na podstawie oceny zgodności wyników symulacji z dostępnymi danymi doświadczalnymi dla starannie wyselekcjonowanego zbioru 29 białek. W rozdziale 5 opisano protokół symulacji procesów zwijania białek i sposób interpretacji wyników. Rozdział 6 poświęcony jest przeglądowi mechanicznych własności reprezentatywnego podzbioru białek z Protein Data Bank na podstawie symulacji przeprowadzonych przez mgr Sułkowską. Wykonano olbrzymią pracę obliczeniową. Dzięki uzyskanym wynikom udało się zidentyfikować „najsilniejsze” białka i skorelować własności mechaniczne z rodzajami ich zwojów natywnych. W rozdziale 7 wyodrębniono wyniki dla białek, których łańcuchy główne są zapętlone i dla których podczas rozciągania mechanicznego zachodzi zaciskanie się węzłów. W trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej mgr Sułkowska zbudowała serwer internetowy do rozciągania białek. Serwer zawiera też bazę danych dotyczących własności mechanicznych białek. Jest to bardzo pożyteczna aplikacja. Zasady działania serwera opisane są w rozdziale 8. W rozdziale 9 porównano i połączono przewidywania modelu Go i jeszcze prostszego modelu sieci gausowskiej (GNM –Gaussian Network Model) dotyczące kolejności zrywania kontaktów natywnych na przykładzie tytyny. W rozdziale 10 opisano symulacje termicznego zwijania i rozwijania białka z zastosowaniem wybranego w pracy modelu Go. Pracę zamyka podsumowanie najważniejszych wyników pracy.

Układ rozprawy jest czytelny. Rysunki i wykresy są doskonale dobrane i ilustrują główne tezy rozprawy. Język rozprawy jest na ogół poprawny, aczkolwiek zauważyłem trochę błędów gramatycznych, literówek i niezręczności terminologicznych. Oto kilka przykładów:

- w całej pracy używany jest termin „reziduum” zamiast polskiego „reszta (aminokwasowa)”.
- sformułowanie „terminal aminowy” powinno raczej brzmieć „N-koniec” lub „koniec aminowy” (str. 9).
- „lewy rysunek” zamiast „rysunek po lewej stronie” (str. 10).
- słowo „foldów” powinno być zastąpione polskim „zwojów” (str. 19).

-zamiast „redukcja stopni swobody” powinno być napisane „redukcja liczby stopni swobody” (str. 18).

- kilka razy słowo „ilość” jest użyte zamiast prawidłowego w danym kontekście słowa „liczba” (str.29).

- w spisie literatury, pozycja 188, powinno być napisane Godzik a nie Godzin.

Poza tym niektóre (zauważyłem niewiele takich przypadków) definicje wydają mi się nieprecyzyjne. Oto dwa przykłady:

- definicja układu mikrokanonicznego na stronie 32 nie jest ogólnie przyjęta.

- podane na str. 18. udziały procentowe struktury II-rzędowej w różnych klasach białek według schematu CATH nie wydają się poprawne. W tekście pracy napisano, że według CATH białka beta to takie, w których 65% aminokwasów występuje w niciach beta. Jest bardzo mało białek beta, dla których ten udział procentowy jest tak duży. Dla przykładu, plastocjanina, typowe białko beta, ma mniej niż 50% aminokwasów sklasyfikowanych jako beta przez program DSSP.

Cytowania literaturowe są w zasadzie poprawne, ale nieco „spłaszczone” w kierunku cytowań prac opartych wyłącznie na modelach Go. Dla przykładu, na stronie 44 napisano: „bardziej realistyczny sposób konstrukcji mapy kontaktów został zaproponowany przez Tsai” (i tu następuje odnośnik do pracy z 1999 roku). Chodzi tu o mapy kontaktów grup bocznych zdefiniowanych na podstawie kontaktów par ciężkich atomów należących do dwóch grup bocznych. Otóż taka definicja była zaproponowana znacznie wcześniej i stosowana przynajmniej kilkanaście razy w dziesięcioleciu przed 1999 rokiem w kontekście modeli gruboziarnistych, nie zakładających przybliżenia Go. W pracy można znaleźć jeszcze kilka takich przykładów niestarannych cytowań.

Wszystkie powyższe uwagi są raczej natury technicznej i nie mogą wpływać w żaden znaczący sposób na ogólną ocenę merytorycznej wartości rozprawy.

Warto podkreślić, że główne tezy rozprawy zostały wcześniej opublikowane przez mgr Sułkowską (wraz z ich naukową dokumentacją) w szeregu artykułów, z których większość ukazała się (lub jest przyjęta do druku) w bardzo dobrych czasopismach naukowych, takich jak: The Journal of Chemical Physics, Proteins, Biophysical Journal czy Physical Review Letters. Zatem tezy rozprawy zostały już w dużej mierze pozytywnie zrecenzowane przez społeczność naukową.

Moja ocena wartości naukowej rozprawy pani Joanny Sułkowskiej jest bardzo wysoka. Zdecydowanie najważniejszym osiągnięciem pracy jest znalezienie odpowiedniego modelu Go do modelowania mechanicznego rozciągania struktury białek. Pokazano na reprezentatywnym zbiorze struktur, że model Go odtwarza stosunkowo dokładnie wyniki doświadczalne. Co za tym idzie własności mechaniczne mogą być przewidywane dla innych białek. Z punktu widzenia teorii nietrywialnym aspektem tego osiągnięcia jest fakt, iż założenie tylko natywnych oddziaływań niezwiązanych w gruboziarnistych modelach jest wystarczające dla stosunkowo dokładnego odtworzenia procesu deformacji i zrywania struktury. Serwer do modelowania rozciągania białek jest bardzo użytecznym narzędziem biologii obliczeniowej.


Bardzo ważnym wynikiem pracy jest również pokazanie że mezoskopowy model GNM jest jakościowo zgodny z wynikami symulacji modelu Go, wskazując te same oddziaływania natywne, które powinny ulegać zerwaniu jako pierwsze podczas deformacji białek. Tego typu predykcje mogą być łatwo weryfikowane metodami inżynierii białek (tj. kierowanej mutagenezy). Zakres prac obliczeniowych przeprowadzonych przez mgr Sułkowską w celu wyboru najlepszego modelu Go, a następnie dokonany przegląd reprezentatywnego podzbioru struktur PDB pod względem ich przewidywanych własności mechanicznych są imponujące.

Bardzo interesujące są również wyniki symulacji termicznej denaturacji/denaturacji tytyny. Analiza tych symulacji pokazuje, że model Go odtwarza w sposób poprawny mechanizm (kolejność tworzenia/rozpadu poszczególnych elementów struktury drugorzędowej) procesu tworzenia/rozpadu zwoju natywnego tego białka. Oznacza to, że bardzo prosty model Go może być zastosowany do modelowania bardzo skomplikowanego procesu tworzenia struktury III-rzędowej niektórych białek. Należy tu jednak podkreślić, że dla znaczącego podzbioru białek uzyskanie poprawnych wyników zwijania struktury za pomocą modelu Go jest raczej mało prawdopodobne. Dla wielu białek obserwuje się, że w stadiach pośrednich procesu zwijania odgrywają zasadniczą rolę oddziaływania nienatywne. Tworzące się struktury przejściowe ulegają następnie (często bardzo skomplikowanym) przegrupowaniom do struktury natywnej. Może szkoda, że nie podkreślono wyraźnie tego faktu w tekście rozprawy. Ostatnie uwagi krytyczne nie umniejszają wartości pracy. Niewątpliwie model Go może być stosowany do modelowania zwijania niektórych białek (jak pokazano w tej pracy na przykładzie tytyny). Poznanie mechanizmów zwijania białek jest chyba istotnie trudniejsze niż przewidywania struktury natywnej. Stąd możliwość uzyskania jakościowo poprawnego opisu za pomocą tak prostego modelu jakim jest model Go ma duże znaczenie poznawcze i praktyczne. Wynik ten jest szczególnie ważny ze względu na ograniczony zakres stosowalności klasycznej mechaniki molekularnej dla modeli pełnoatomowych. Symulacje MD w temperaturze zwijania białka są zwykle niewykonalne ze względu na skalę czasową procesu. Jak wspominałem wcześniej zwianie białek w realnym świecie trwa od milisekund do minut (aczkolwiek znane są przykłady dużo szybszego i dużo wolniejszego zwijania), podczas gdy dostępny symulacjom czas jest rzędu nanosekund do mikrosekund. Czasami prowadzi się symulacje MD rozwijania białek w bardzo wysokich temperaturach, co pozwala uzyskać większe zmiany konformacyjnej w tym samym czasie symulacji. Jest dla mnie jednak wątpliwe, czy obserwowane w sztucznie zawyżonych temperaturach rozwijanie białek opisuje poprawnie rzeczywiste procesy, zachodzące w temperaturze fizjologicznej. W okresie ostatnich kilkunastu miesięcy ukazało się kilka prac, w których zastosowano modele mezoskopowe (gruboziarniste), nie zakładające przybliżeń Go, do symulacji procesów zwijania i rozwijania struktury natywnej. Może trochę szkoda, że w rozprawie nie zwrócono w ogóle uwagi na te prace. Są to jednak prace bardzo nowe i stąd pewnie łatwo było je przeoczyć. Ciekawym też byłoby sprawdzenie stosowalności takich mezoskopowych (nie Go) modeli do modelowania rozciągania białek. To zagadnienie, wykraczało jednak poza zakres tej rozprawy.

Przechodząc do uwag końcowych pragnę podkreślić, że praca doktorska mgr Sułkowskiej stanowi wzorcowy przykład pracy teoretyczno-obliczeniowej, w doskonały sposób powiązanej z doświadczeniem fizycznym. Uzyskane wyniki są weryfikowalne i mają duże znaczenie dla naszej wiedzy podstawowej i możliwych zastosowań praktycznych w inżynierii nowych białek, projektowaniu nowych leków, itp.

Jestem przekonany że rozprawa doktorska pani mgr Joanny Idy Sułkowskiej spełnia zawiązką wszelkie ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem o dopuszczenie pani mgr Sułkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter pracy, szeroko udokumentowane tezy i podstawowe znaczenie wyników dla biofizyki białek wnioskuję również o wyróżnienie tej rozprawy.



Andrzej Koliński