



UNIwersytet
Warszawski

CNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

Warszawa, 6 listopada 2023

dr hab. Joanna Sułkowska, prof. UW

Centrum Nowych Technologii

Uniwersytet Warszawski

ul. Banacha 2C

02-093 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pana magistra Vu Van Quyen

pt. „INFLUENCE OF THE RIBOSOME ON PROTEIN

EJECTION AND FOLDING”

Białka są łańcuchami polimerowymi, które aby pełnić swoją funkcję biologiczną muszą przyjąć najpierw dobrze zdefiniowaną trójwymiarową struktury przestrzenne, tak zwaną strukturę natywną, która to odpowiada, zgodnie z hipotezą termodynamiczną Anfinsena, minimalnej energii swobodnej układu w warunkach fizjologicznych. Ta struktura przestrzenna determinuje różne funkcje biologiczne, chemiczne lub fizyczne, które białka pełnią w żywych komórkach i całych organizmach. Jednakże, aby pełnić daną funkcję, białko musi zwinąć się do stanu natywnego. Większość badań w ostatnich latach koncentrowała się na zwijaniu białek w izolowanym środowisku – luzem (bada wpływ solwatacji w wodzie); jednak znacznie mniej wiadomo o zwijaniu białek w bardziej naturalnych warunkach. Białka mogą przyjmować strukturę trzeciorzędową na dowolnym etapie: podczas ich biosyntezy, gdy są wypychane przez z rybosomu lub po-translacyjnie – po ich uwolnieniu z rybosomalnego tunelu, a także podczas oddziaływania między powstającym łańcuchem tzw. nascent chain a powierzchnią rybosomu. Czynniki te mogą potencjalnie wpływać na kinetykę i ścieżki zwijania białek.

Dodatkowym elementem, który potencjalnie może wpływać na poprawność zwijania, jest np. nie trywialna topologia (motyw splątanie), która występuje także w strukturze natywnej białka lub może się stworzyć spontanicznie podczas zwijania utrudniając lub wręcz blokując zwijanie. Jednym z typów splątania występującym w strukturze natywnej białek jest motyw lassa. Lasso jest tworzone przez zamkniętą pętlę, przez którą przechodzi co najmniej jeden koniec białka. Nawet jeśli pętla nie jest zamknięta np. wiązaniem kowalencyjnym, taka geometria może tworzyć motyw przestrzenny, który może powodować nieprawidłowe zwijanie. Zwijanie białek z motywem lassa bezpośrednio na rybosomie nie było dotychczas badane. Celem pracy jest zatem zbadanie wpływu rybosomów na białka na wczesnych etapach ich zwijania w porównaniu do ich zwijania się bez udziału rybosomów lub białek opiekuńczych. To zagadnienie naukowe jest przedmiotem rozprawy doktorskiej pana Vu Van Quyen, która została wykonana pod kierunkiem eksperta w tej tematyce profesora Mai Suan Li.

Rozprawa doktorska jest złożeniem 3 opublikowanych prac poprzedzonych wstępem wstęp i wprowadzeniem do każdej pracy. Główna część rozprawy składa się z 6 rozdziałów. Pierwsze dwa rozdziały, zatytułowane "Wprowadzenie" i "Tło obliczeniowe" (łącznie 34 strony), wprowadzają czytelnika w temat rozprawy, krótko opisują znane metody stosowane do badania zwijania białek oraz cele rozprawy. Pozostałe trzy rozdziały to dwustronicowe wprowadzenie do trzech prac, a następnie przytoczenie abstraktu publikacji i kopia poświadczeń uczestnictwa współ-autorów wraz z kopią publikacji. Rozdział 6 to podsumowanie i propozycja przyszłych badań (łącznie 2 strony). Pracę kończy obszerny wykaz literatury (153 pozycje). Część główną poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji autora, na których opiera się rozprawa (3 pozycje) oraz wykaz 4 publikacji doktoranta, które są związane z tematem rozprawy. Kolejne strony zawierają spis rysunków, tabel, wykaz skrótów oraz podziękowania. Trzy artykuły będące podstawą rozprawy zostały opublikowane w bardzo dobrych i dobrych czasopismach z listy ISI (J. Am. Chem. Soc., Chem. Sci., J. Phys. Chem. B). Autor rozprawy jest dwukrotnie pierwszym i raz drugim autorem tych publikacji. Dwa z czterech pozostałych artykułów są już opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach (Biochemistry, Nat. Commun.). Oprócz streszczenia w języku polskim, językiem rozprawy jest język angielski.

Wyniki pracy doktorskiej zostały przedstawione w 3 artykułach opublikowanych w prestiżowych czasopismach. W większości artykułów doktorant jest pierwszym lub drugim autorem. Opublikowane artykuły są już szeroko cytowane przez inne zespoły badawcze na całym świecie. Praktycznie wszystkie wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są zawarte w już opublikowanych pracach. Oznacza to, że zostały one pozytywnie zrecenzowane przez anonimowych ekspertów w danej dziedzinie. Oznacza to, że moja rolą jako recenzentki sprowadza się do stwierdzenia, czy waga przeprowadzonej pracy jest wystarczająca do nadania Autorowi stopnia doktora nauk fizycznych. Uważam, że przedstawiony materiał jest w pełni wystarczający do nadania tego stopnia. Niemniej jednak pozwolę sobie poniżej wypisać kilka uwag i pytań merytorycznych dotyczących analizy numerycznej mechanizmów zwijania się białek.

W rozdziale pierwszym doktorant krótko opisuje elementy struktury liniowej oraz

przestrzennej białek, ich podstawowe zasady tworzenie struktury natywnej oraz trochę więcej uwagi poświęca ważnemu zagadnieniu jakim jest wpływ środowiska hydrofobowego na zwijanie. Główna część wstępu skupia się na opisie historycznym etapów odkrywania i charakterystyki rybosomu, opisie jego struktury przestrzennej, a następnie bardziej szczegółowo wpływie rybosomu na kinetykę zwijania białek. Ogólnie można powiedzieć, iż wstęp jest dobrze skonstruowany. Brak mi tutaj jednak opis motywu lassa, jako elementu struktury przestrzennej białka. Lasso jest wprowadzone znacznie później w rozdziale poświęconym metodom obliczeniowym. Dodatkowo, opis lassa przedstawiony na Rys. 2.6 nie jest precyzyjny i może wprowadzać w błąd czytelnika. Na rysunku 2.6 (b), który przedstawia rzeczywiste białko, niebieska pętla (element przewlekający) ma prawie taką samą długość jak czerwona pętla, przez którą ma być przewleczony koniec. Można się zastanawiać, dlaczego na schemacie z rys. 2.6 (a) niebieski element jest kilkakrotnie mniejszy od pokazanego na panelu (b) i ma zupełnie inne znaczenie. Być może autor miał w tym jakiś cel, który niestety nie został opisany i dlatego trudno mi zrozumieć tę zmianę znaczenia geometrii (splątania).

W rozdziale drugim autor skupia się na znanych metodach obliczeniowych wykorzystywanych do badania zwijania białek swobodnie bez wpływu rybosomu i bezpośrednio na rybosomie. W pierwszej części przedstawiony jest bardzo ogólny opis modeli i spodziewałbym się znaleźć bardziej szczegółowy opis w kolejnych podrozdziałach, których jednak nie ma. W podrozdziale 2.2 pierwszy akapit jest prawie taki sam jak we wstępie, dodatkowo termin "pole siłowe" obejmuje tylko funkcję energii bez wyjaśnienia wartości różnych parametrów (np. stałych siłowych, równowagowych długości wiązań i kątów), które są opisane dla modelu gruboziarnistego. Brak tutaj podstawowego opisu parametryzacji. Nie jest również jasne, dlaczego autor używa pola siłowego Amber, a nie na przykład CHARMM. Warto byłoby to wyjaśnić. W opisie modelu gruboziarnistego na stronie 17 pierwsze dwa akapity są prawie takie same jak we wstępie. Dodatkowe 1,5 strony (strony 18-19) koncentruje się na wyszczególnieniu parametrów użytych w modelu. Przydatne byłoby skomentowanie tych wartości, wyjaśnienie, dlaczego zostały one wybrane i jakie są fizyczne podstawy takiego uogólnienia. Dodatkowo, autor pisze, że "... coarse-grained models are inherently less accurate than more detailed models, they can provide a valuable and efficient tool for understanding complex systems and designing new materials with desired properties.", jednak nie ma żadnych cytatów potwierdzających te stwierdzenie. Kolejne akapity są bardziej równomiernie omówione, jednak, jak to autor wspomina we wstępie, nadal nie jest w pełni zrozumiałe, w jaki sposób rybosom wypycha powstający łańcuch białkowy – nascent chain. W sekcji-2.6 dobrze byłoby wyjaśnić, dlaczego siła oscylacyjna nie jest tutaj brana pod uwagę w konstrukcji modelu. Sekcja 2.3, która koncentruje się na motywie lassa, pomija fakt, że lasso zostało poprawnie zdefiniowane wiele lat temu w białkach w oparciu o peptydy lassowe, a później dobrze sklasyfikowane w strukturze natywnej białka. Do charakterystyki lassa zastosowano dwie techniki: aproksymację minimalnej powierzchni i Gaussian linking number. Autor przedstawia pokrótce nowy deskryptor/parametr, który wykorzystuje ideę Gaussian linking number do zliczania kontaktów. Ponieważ jest to nowe podejście, dobrze byłoby wyjaśnić, dlaczego ta metoda pozwala wykrywać zmiany w chiralności oraz jaką ma przewagę (jeśli ma) nad wcześniejszymi metodami.

W rozdziale 3 autor krótko podsumowuje hipotezy i wyniki zawarte w pierwszej publikacji opublikowanej w *J. Am. Chem. Soc.* Praca ta opisuje proces wypychania powstającego łańcucha białkowego z rybosomu. W tym przypadku autor był odpowiedzialny za przeprowadzenie symulacji pełno-atomowych, analizę wyników, przygotowanie rysunków i udział w pisaniu manuskryptu. Ze względu na fakt, że autor był odpowiedzialny za badania numeryczne, można by oczekiwać dokładniejszego opisu uzasadnieniu wyboru użytych modeli. Niemniej jednak opis jest jasny i przejrzysty.

Celem publikacji zaprezentowanej w rozdziale 4 było zrozumienie wpływu oddziaływań hydrodynamicznych na zwijanie się białek w obecności i nieobecności rybosomu. Autor testuje hipotezę, że środowisko wokół rybosomu osłabia efekt hydrofobowy, a tym samym przyczynia się do zmniejszenia stabilności białka i spowolnienia jego zwijania. W tej publikacji autor był odpowiedzialny za przeprowadzenie symulacji pełno-atomowych, które pozwalają określić potencjał średniej siły między dwoma cząsteczkami hydrofobowymi w tunelu rybosomu i nieograniczonym przestrzennie rozpuszczalniku (wodzie). Na stronie 53 (po środku) autor pisze również, że porównał „thermodynamics and water structure properties”. Można się domyślać z kontekstu o co chodzi, ale nie jest to najlepsze sformułowanie i warto byłoby je doprecyzować.

W rozdziale 5 autor skupia się na wpływie samego procesu syntezy łańcucha peptydowego białka (zwijanie się z ograniczonego przestrzennie przez rybosom łańcucha białkowego) i zwijania po-translacyjnego (swobodnego) na kinetykę zwijania. Następnie porównuje otrzymane wyniki z zwijaniem się z konformacji zdenaturowanej. Na podstawie symulacji autor stwierdza, że wpływ rybosomów na wydajność zwijania zależy od wielkości i złożoności białka (również splątania). Autor pokazuje, że ograniczenie przestrzenne łańcucha peptydowego wspomaga zwijanie struktury 3D poprzez unikanie wpadania w nienatywne konformacje (minima energetyczne) np. typu lasso w porównaniu do zwijania z przypadkowej nieograniczonej przestrzennej konfiguracji.

W rozdziale 6 autor podsumowuje swoje osiągnięcia w 10 punktach. Wyniki są jasne i dobrze sformułowane.

W żadnej z prac autor nie zadeklarował udziału w tworzeniu ścieżki badań, ale zakładam, że brał w tym udział, a prezentowane wyniki, wynikające z przeprowadzonych symulacji i są efektem jego twórczych pomysłów naukowych.

Podsumowując, przedstawioną mi rozprawę doktorską Pana Vu Van Quyen oceniam jako bardzo dobrą. Doktorant opracował zaawansowane narzędzia numeryczne do opisu wpływu rybosomu na zwijanie białek i przeprowadził obszerne analizy biofizyczne w oparciu o różnego rodzaju symulacje komputerowe w celu scharakteryzowania kinetyki zwijania białek. Doprowadziło to do zrozumienia biofizycznych i chemicznych aspektów potrzebnych do zrozumienia podstaw zwijania białek. Bardzo ambitne cele rozprawy zostały w pełni zrealizowane, a zakres przeprowadzonych prac jest szeroki. Należy przy tym podkreślić, że doktorant wykazał się w swojej pracy również dużą wiedzą i umiejętnościami w zakresie wykorzystania eksperymentalnych danych biologicznych, co pozwoliło nie tylko na ilościową, ale również jakościową interpretację danych teoretyczno-numerycznych. Wymienione powyżej

uwagi krytyczne nie umniejszają wagi wartości tej pracy. Wyniki zostały przedstawione w trzech publikacjach, które doskonale się uzupełniają i tworzą całość. Przedstawiona mi praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawę z dnia 20 marca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85, z późn. zm), a także zwyczajowe standardy rozpraw doktorskich w naukach przyrodniczych i ścisłych. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana Vu Van Quyen do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy, jakość uzyskanych wyników, dodatkowe publikacje, które wpisują się w tą tematykę i ich znaczenie dla rozwoju tej tematyki badań wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi pracy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku,

Joanna Sułkowska

