



UNIwersytet GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18, tel. (+48 58) 523 5373, fax (+48 58) 523 5472, e-mail: momo@chem.ug.edu.pl, www.chem.ug.edu.pl

dr hab. Mariusz Makowski, prof. nadzw. UG

Recenzja

rozprawy doktorskiej **Magistra Adama Kazimierza Sieradzana**

zatytułowanej:

„Zwiększenie rozdzielczości i zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES do symulacji zwijania białek poprzez udoskonalenie potencjałów opisujących oddziaływania z udziałem łańcucha głównego”

Gdańsk, 3 czerwca 2013 r.

Białka należą do grupy związków, które pełnią ważną funkcję w organizmach. Do najważniejszych zadań białek należy m.in. kataliza enzymatyczna. Mają one również wpływ na budowę i kształt komórki, pełnią funkcję magazynowania, przekazują sygnał, a także wpływają na odpowiedź immunologiczną. O tym jak kluczowe są badania nad strukturą białek świadczy fakt, że w bazie danych Protein Data Bank (PDB) zdeponowanych jest ponad 600 tysięcy rozpoznanych sekwencji aminokwasowych białek, a mniej niż 20 % z nich ma rozwiązana strukturę przestrzenną na drodze eksperymentalnej. Oznacza to, że techniki eksperymentalne wykorzystywane do rozwiązywania struktury białek tj.: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), dichroizm kołowy, spektroskopia w podczerwieni (IR) i Ramana, technika małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS), fluorescencja, spektroskopia sił atomowych, techniki wymiany atomu wodoru i inne, często nie mogą być użyte, ponieważ żądane białko nie spełnia warunków eksperymentu. Dlatego też z pomocą przychodzą tutaj metody obliczeniowe. Do teoretycznego badania struktury białek można wyróżnić dwie grupy metod, tj. metody oparte na przeszukiwaniu strukturalnych baz danych oraz metody *ab initio* oparte o fizykę oddziaływań. Weryfikacja metod obliczeniowych wykorzystywanych do badania struktury białek następuje co dwa lata podczas konkursu CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*). Badacze uczestniczący w tym eksperymencie rozwiązują nieznane im, a znane jury, struktury przestrzenne białek za pomocą narzędzi teoretycznych, którymi dysponują. Po zakończeniu eksperymentu następuje opublikowanie wyników eksperymentalnych, a także określenie dokładności przewidywania struktur poprzez poszczególne grupy badawcze.

Magister Adam Kazimierz Sieradzan wykonywał swoją pracę doktorską pod kierunkiem prof. Adama Liwo. Profesor Adam Liwo wraz prof. Haroldem A. Scheragą z Cornell University w Ithace (USA) są twórcami pola siłowego UNRES (*United RESidue*) służącego do przewidywania struktury białek. Pole siłowe UNRES jest ciągle modyfikowane i udokładniane. Można je zaliczyć do grupy pól opartych o fizykę oddziaływań. Opracowanie takiego pola wymaga przeprowadzenia szeregu symulacji, a następnie jego kalibracji z dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Należy zwrócić uwagę na fakt, że metody oparte na fizyce oddziaływań (wyżej wspomniany UNRES) pomimo iż korzystają z szeregu uproszczeń, tj. ograniczenie liczby centrów oddziaływań (tzw. gruboziarnistość), to są dużo tańsze i wygodniejsze w użyciu niż np. metody klasycznej mechaniki kwantowej, które w przypadku tak dużych układów stają się niewydolne obliczeniowo i nie można mówić o jakiegokolwiek dokładności wyników obliczeń. Przejdę teraz do charakterystyki samej rozprawy doktorskiej.

Dysertacja została napisana bardzo starannie, jasno i przejrzyście. Język, którego używa Autor wskazuje na jego dużą dojrzałość naukową i duże rozeznanie w tematyce prowadzonych badań. Zdarzają się drobne błędy językowe, ale nie mają one moim zdaniem wpływu na jakość przedstawionej pracy. Układ

rozprawy doktorskiej jest charakterystyczny dla tego rodzaju prac. Rozprawa została napisana na 100 stronach. Całość poparta jest 157 odnośnikami literaturowymi dotyczącymi badanej tematyki. Pracę rozpoczyna rozdział, w którym sformułowany został jej cel. Magister Adam Sieradzan założył sobie 4 główne cele pracy:

(i) wprowadzenie do pola siłowego UNRES potencjałów opisujących izomeryzację *trans-cis* grupy peptydowej uwzględniające poprawną energetykę pomiędzy minimami odpowiadającymi konfiguracjom *cis* i *trans*;

(ii) rozszerzenie stosowalności pola sił UNRES na układy zawierające D-aminokwasy;

(iii) zwiększenie zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES poprzez wprowadzenie potencjałów korelacyjnych sprzęgających lokalne stany konformacyjne łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych ze stanami konformacyjnymi łańcucha głównego;

(iv) wykonanie testów zdolności pola siłowego UNRES z nowowyprowadzonymi potencjałami dla układów zawierających ugrupowania, dla których nowe potencjały zostały wyznaczone. W etapie tym zaplanowane zostały m.in. symulacje asocjacji i zwijania peptydu o kodzie BBAT1 o stabilnym zwinięciu $\beta\beta\alpha$, tworzącym tetramer.

Kolejny rozdział „Część teoretyczna” został napisany na 24 stronach. Jest to zwięzłe wprowadzenie w tematykę badań Autora. W tej części rozprawy znaleźć można informacje na temat roli izomeryzacji *trans-cis* oraz o wpływie D-aminokwasów na proces zwijania białek; charakterystkę metod teoretycznych używanych do opisu układów molekularnych oraz opis metod do przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej. Po przeczytaniu tej części rozprawy nasuwa się pytanie czy do opisu układów molekularnych można również używać metod półempirycznych? Pomimo bardzo starannej korekty znalazłem jedno niepełne zdanie na stronie 9 (pierwszy akapit): „Przy ich użyciu wykazano że wczesnym etapie (...)”. Zdaniem recenzenta powinno być: „Przy ich użyciu wykazano, że we wczesnym etapie (...)”. Przy podpisie do rysunku 3.1. jest „klatka trypofanowa”, a Autor miał tu chyba na myśli „klatkę tryptofanową”.

Następny rozdział rozprawy jest napisany na 65 stronach i został zatytułowany „Wyniki”. Ta część dysertacji jest podzielona na 5 podrozdziałów, w których Kandydat opisuje po kolei etapy modyfikacji pola siłowego UNRES. W pierwszej kolejności wyznaczone zostały potencjały izomeryzacji *cis-trans* na modelowych układach grupy peptydowej N-metyloacetamidu i N-acetylopirolidyny, odpowiadające wiązaniu peptydowemu typu zwykłego i prolinowego w oparciu o obliczenia *ab initio* w schemacie MP2/6-31G(d,p). Następnie przy użyciu symulacji dynamiki Langevina wyznaczone zostały stałe szybkości reakcji przejścia z formy *trans* do formy *cis* dla dipeptydów Gly-Gly i Gly-Pro w polu siłowym UNRES. Do wyznaczenia potencjałów torsyjnych, podwójnych torsyjnych i walencyjnych zawierających D-aminokwasy Doktorant użył blokowanych reszt glicyny, alaniny i proliny, które w polu siłowym UNRES są prototypami rodzajów reszt aminokwasowych do modelowania oddziaływań lokalnych w obrębie łańcucha głównego. Obliczenia - podobnie jak w poprzednim rozdziale - przeprowadzone zostały w schemacie MP2/6-31G(d,p). Te modelowe obliczenia wykonane zostały dla aminokwasów o chiralności L. Powierzchnie energii potencjalnej dla aminokwasów o chiralności D uzyskane zostały poprzez zastosowanie symetrii inwersyjnej względem kątów $\lambda^{(1)}$ i $\lambda^{(2)}$. Następnie uzyskane na podstawie badań modelowych nowe potencjały torsyjne dla D-aminokwasów zostały wprowadzone do pola siłowego UNRES i przetestowane do zbadania stabilności termodynamicznej struktury gramicydyny, potwierdzając jednocześnie poprawność i użyteczność nowowyprowadzonych potencjałów. Dodatkowo Doktorant wykazał, iż podwójne podstawienie przez D-aminokwasy znacząco destabilizuje struktury helikalne. W przypadku turincyny H, peptydu zawierającego w swojej sekwencji D-aminokwasy zostało wykazane, że proces fałdowania tego peptydu przebiega jednoetapowo, bez jakichkolwiek produktów pośrednich. Dowodem na to jest obecność jednego maksimum na krzywej ciepła właściwego. Pełnym zastosowaniem zmodyfikowanego pola siłowego UNRES przez Doktoranta było przeprowadzenie symulacji ścieżki asocjacji i zwijania peptydu tworzącego strukturę czwartorzędową o zwinięciu $\beta\beta\alpha$ o kodzie PDB: BBAT1. Na podstawie uzyskanych wyników Kandydat wykazał, że proces fałdowania tetrameru BBAT1 zachodzi w trzech etapach, tj. asocjacji, utworzeniu struktury przypominającej „kłębek statystyczny” oraz propagacji struktury helikalnej i utworzeniu β -zgięcia. W ostaniej części rozprawy Doktorant przedstawia sposób w jaki wyprowadzone zostały potencjały

korelacyjne opisujące sprzężenie lokalnych stanów konformacyjnych łańcuchów bocznych z lokalnymi konformacjami łańcucha głównego. Zdaniem recenzenta ta część rozprawy została napisana bardzo dobrze. Układ tej części pracy, tzn. od badań na modelach do badań na większych układach pokazuje, że Doktorant potrafi zaplanować w sposób należyty swój warsztat badawczy i jednocześnie zorganizować pracę. Uzyskane rezultaty znalazły potwierdzenie w wielkocząsteczkowych symulacjach w polu siłowym UNRES. Dodatkowo zawarte w tej części rozprawy wyniki zostały już opublikowane w 3 pracach o bardzo wysokim współczynniku wpływu.

Podsumowanie pracy i wnioski zapisane zostały na 3 stronach. Jest to zwięzłe i syntetyczne przedstawienie najważniejszych wyników uzyskanych w toku realizacji pracy doktorskiej przez Mgr. Adama K. Sieradzana. Na końcu rozprawy, w rozdziale 7 znajdują się załączniki. W sumie jest ich 10. Najważniejsze z nich stanowią 3 wydrukowane publikacje, których pierwszym autorem jest Doktorant. Dodatkowo znajduje się informacja o jednej pracy wysłanej do czasopisma i jednej będącej w przygotowaniu. Każda z tych prac zawiera krótki opis udziału Doktoranta w powstawaniu każdej z nich. Na dodatkowo załączonej płycie kompaktowej znajdują się inne, nie zawarte w pracy ze względu na swoją objętość materiały.

Magister Adam Kazimierz Sieradzan jest współautorem 4 opublikowanych prac w czasopismach z tzw. *listy filadelfijskiej*. Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań zawarte w Jego pracy doktorskiej opublikowane zostały w 3 artykułach w *Journal of Chemical Theory and Computation* o współczynniku wpływu ponad 5,2. We wszystkich tych pracach Mgr A. Sieradzan jest pierwszym autorem. Ponadto, Doktorant ma w swoim dorobku w sumie 12 wystąpień ustnych i prezentacji posterowych na zjazdach krajowych i zagranicznych. Pan Adam Sieradzan charakteryzuje się również dużą aktywnością i skutecznością w pozyskiwaniu środków na badania naukowe. Kierował On 4 grantami:

- PRELUDIUM - finansowany przez Narodowe Centrum Nauki,
- JUVENTUS PLUS - przyznany przez Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego
- dwa granty dla Młodych Naukowców i uczestników studium doktoranckiego - przyznane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Doktorant był wielokrotnie nagradzany za swoją działalność naukową. Wymienię tu tylko te najbardziej prestiżowe: Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w prowadzeniu badań (2012) i stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w programie START (2013). Pan Adam Sieradzan odbył również krótkoterminowy staż (4 miesiące) w 2012 roku w grupie prof. U. Hansmanna z Oklahoma University (USA).

Rozprawa zawiera wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone wynikami naukowymi wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej. Przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawą o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. Ust. nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. nr 204, poz. 1200, z dnia 22 września 2011 r.) a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony. Biorąc jednocześnie pod uwagę dorobek naukowy Kandydata oraz poziom naukowy dysertacji wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Magistra Adama Kazimierza Sieradzana.

Marek Melnicki