

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng
Zakład Biofizyki IFD, Wydział Fizyki
Uniwersytet Warszawski
oraz
Pracownia Bioinformatyki
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Warszawa

Warszawa, 14.07.2014

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Molecular dynamics investigation of the structure-function relationships in proteins with examples from Hsp70 molecular chaperones, α A-crystallin, and sericin.

Badanie metodą dynamiki molekularnej zależności między strukturą a funkcją białek na przykładzie molekularnych chaperonów Hsp70, α A-krystaliny i serycyny.

Autor rozprawy: Mgr Ewa Irena Gołaś

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Józef Adam Liwo.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Ireny Gołaś zrealizowana została pod kierunkiem prof. Józefa Adama Liwo w Pracowni Molekularnego Modelowania, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, z wykorzystaniem infrastruktury informatycznej i serwisów w Pittsburgh Supercomputer Center, Argonne National Laboratory, Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej oraz Interdyscyplinarnego Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego. Część obliczeń i analizy wykonywana była również w Baker Laboratory na Cornell University kierowanym przez prof. Harolda H. Scheragę.

Obiektem badań teoretycznych są trzy białka: białko opiekuńcze Hsp70 (*Heat shock protein 70kDa*), α A-krystalina oraz biopolimer serycynowy. α A-krystalina spełnia funkcję białka opiekuńczego oraz jednocześnie pełni rolę strukturalną w soczewce oka kręgowców. Przewodnym elementem badań jest wskazanie wzajemnej zależności pomiędzy strukturą i funkcją w w/w układach biomolekularnych.

Praca o objętości 75 stron napisana jest w języku angielskim, zawiera wstęp, sekcję teoretyczną, opis wyników, streszczenie, wnioski końcowe oraz bibliografię zawierającą 61

cytowanych prac, jak również trzy załączniki w postaci dwóch publikacji oraz jednej pracy wysłanej do druku - których Ewa Gołaś jest pierwszą autorką. Są to:

- Ewa I. Gołaś, Cezary Czaplewski, Harold A. Scheraga, Adam Liwo. *Common functionally- important motions of the nucleotide-binding domain of Hsp70*. Submitted to Journal of Chemical Theory and Computation.
- Ewa Gołaś, Gia G. Maisuradze, Patrick Senet, Stanisław Ołdziej, Cezary Czaplewski, Harold A. Scheraga, Adam Liwo. *Simulation of the Opening and Closing of Hsp70 Chaperones by Coarse- Grained Molecular Dynamics*. J. Chem Theory Comput. **8**, 1750-1764, 2012.
- Ewa I. Gołaś, Cezary Czaplewski. *Computational Simulation and Analysis of a Candidate for the Design of a Novel Silk-Based Biopolymer*. Biopolymers, **101**, 915-923, 2014.

Tematyka pracy doktorskiej w pierwszej części dotyczy podstawowych problemów o istotnym znaczeniu dla zrozumienia mechanizmów regulacyjnych komórek z funkcjonalnym udziałem białek opiekuńczych, co do których wiadomo że ich tradycyjna nazwa odzwierciedla jedynie wąski aspekt ich aktywności biologicznej. Z wykorzystaniem metod symulacyjnych MD, przy użyciu pola siłowego AMBER opisano w Hsp70 zachowanie poddomeny NBD (*Nucleotide Binding Domain*). Po przeprowadzeniu symulacji MD trajektorie były poddane analizie *Essential Dynamics* (metoda oparta na analizie głównych składowych, PCA), która umożliwiła określenie dynamiki białka jako superpozycji ruchów wyznaczonych przez wektory własne macierzy wariancji-kowariancji współrzędnych. Najistotniejsze ruchy odpowiadają największym wartościom własnym. Dominującym ruchem okazał się obrót składowych poddomen względem siebie. Uzyskano zgodność z wynikami badań NMR.

Symulacje dynamiki całego białka opiekuńczego przeprowadzone zostały przy użyciu gruboziarnistego modelu oraz pola siłowego UNRES. Stan wiązania nukleotydu był symulowany poprzez wprowadzenie harmoniczných potencjałów ograniczających na odległości w obrębie domeny NBD, odpowiadające stanowi niezwiązanemu bądź związanemu z ADP oraz stanowi związanemu z ATP. Pokazano, że funkcja białka Hsp70 jest określona poprzez dynamikę NBD, która zależy od rodzaju związanego nukleotydu oraz od oddziaływań między domenami białka.

Jeżeli chodzi o α A-krystalinę przeprowadzone zostały symulacje metodami sterowanej dynamiki molekularnej (*Steered Molecular Dynamics*) z wykorzystaniem pola siłowego AMBER. Zbadany został wpływ podstawienia reszty D-aminokwasu na właściwości

mechaniczne oraz strukturalne białka. Racemizacja aminokwasów jest szkodliwym, naturalnie zachodzącym procesem w soczewce oka, stanowiąc jedną z modyfikacji postranslacyjnych α A-krystaliny - wynikiem takich podstawień jest zaćma oraz twardnienie soczewki, co jest jednym z czynników powodujących starczą dalekowzroczność. W symulacjach użyta została siła rozciągająca wzdłuż głównej osi białka. W analizie wyników wykorzystana została metoda podobna do *Essential Dynamics* - w tym przypadku, zamiast współrzędnych kartezjańskich użyto wszakże obiektów nazwanych "ogniwami strukturalnymi". Wektory własne wynikające z takiej analizy korelują siłę rozciągającą z występującym układem ogniw strukturalnych. Ogólnym skutkiem mutacji jest zmiana sztywności poszczególnych elementów strukturalnych występujących w białku. Wzrost sztywności spowodowany jest reorganizacją w/w "ogniw" w stosunku do struktury natywnej. Zmniejszenie sztywności wywołane zostało zanikaniem pierwotnego zestawu ogniw występujących w strukturze natywnej, a w związku z tym zanikaniem korelacji tych ogniw z siłą. Następstwem tych procesów jest naturalnie też zmiana ścieżki rozwijania się białka.

W trzeciej części pracy doktorantka zbadła oligopeptyd serycynowy oraz zaprojektowała obiekt, który nazwałbym nano-kompozytem, w skład którego wchodziły monomery serycyny oraz motyw elastyny. Serycyna (*łac.*) klej jedwabny, to białko zaliczane do skleroprotein, zlepiające włókna fibroinowe jedwabiu naturalnego. Zawiera do 40% reszt seryny, oraz m.in. reszty glicyny i kwasu asparaginowego. Biomateriały składające się z serycyny są kruche, natomiast struktura jedwabiu jest wysoko zorganizowana, a jej właściwości fizyczne są związane z występowaniem poszczególnych motyw strukturalnych. W badaniach Doktorantka zaprojektowała nowy biopolimer, w którego skład wchodzi monomery serycyny oraz motywu elastyny. Właściwości mechaniczne zaprojektowanego polimeru przetestowała przy pomocy symulacji SMD.

Chciałbym podkreślić, że symulacje komputerowe i ich analiza przedstawione w rozprawie zostały zrealizowane bardzo solidnie. Przedstawione w pracy wyniki zawierają wiele innowacyjnych elementów. Można z całą pewnością stwierdzić, że uzyskane wyniki niewątpliwie przyczynią się do lepszego zrozumienia struktury, funkcji i/lub biologicznej roli badanych białek. Praca napisana jest poprawnie pod względem redakcyjnym i jasno jeżeli chodzi o zawartość merytoryczną. Ważniejsze wyniki dyskutowane w rozprawie zostały w większości opublikowane w bardzo dobrych czasopismach.

Do najważniejszych wyników zaliczyłbym:

- Stwierdzenie, w oparciu o symulacje z wykorzystaniem środowiska symulacyjnego UNRES, że funkcja białka Hsp70 jest określona poprzez dynamikę NBD, która bezpośrednio zależy od rodzaju związanego nukleotydu, oraz oddziaływań między domenami białka. Dla struktur związanych z ATP występowała największa częstotliwość pojawiania się struktur związanych typu I. Już po zakończeniu badań teoretycznych prezentowanych w tej pracy, pojawiła się pierwsza struktura DnaK związanego z ATP, która była bardzo bliska strukturze obliczonej przez Doktorantkę.
- Opis wpływu racemizacji na właściwości mechaniczne oraz strukturalne α A-krystaliny, które były silnie powiązane z lokalizacją wprowadzonych mutacji.
- Zaprojektowanie "jedwabnego kopolimeru" o porządkanych właściwościach mechanicznych w skład którego wchodziły monomery serycyny oraz motyw elastyny.

Pomimo ograniczonego rozmiaru, praca doktorska zawiera w sobie duży potencjał solidnej wiedzy pozwalający znacznie lepiej zrozumieć i/lub poprawić strukturę białek. Bardzo pozytywnie oceniam osiągnięte wyniki w tej pracy. Modele przedstawione w rozprawie, stanowią bardzo dobrą podstawę do dalszych badań modeli o większym stopniu złożoności.

Mam kilka niewielkich uwag krytycznych lub dyskusyjnych. Myśl przewodnią pracy dotyczącą struktury i funkcji badanych białek jest często spotykanym schematem badań. Sądzę, że w tym przypadku należało raczej podkreślić, że wybór białek był podyktowany szczególnie interesującymi ich aspektami fizykochemicznymi i/lub biologicznymi, niekoniecznie kładąc nacisk na „*a structure-function journey along a thematic dipole*” (strona 15). Naturalnie prawdą jest, że α A-krystalina należy również do tej samej klasy co Hsp70, ale w każdym przypadku badany był inny aspekt ich funkcjonalności.

Nie mogłem też znaleźć dokładnej sekwencji badanego białka serycynowego. W literaturze mówi się raczej o całej klasie białek serycynowych.

Chciałbym też wyrazić pogląd o charakterze dyskusyjnym, że określenie dokładnych relacji struktura-funkcja, wymaga zastosowania modeli lub teorii, które zwierają nie tylko relacje chwilowe (takie jak PCA) ale korelacji zawierających w sobie jawną zależność kooperatywnych przemian strukturalnych od czasu, dokładniej mówiąc, z przesunięciem czasowym.

Jeżeli chodzi o doświadczenie naukowe mgr Ewy Gołaś to należy podkreślić, że odbyła m.in. staże naukowe na Cornell University w laboratorium prof. H. Scheragi oraz w laboratorium prof. L. Glassra na Curtin University w Australii. W sumie jest współautorką 11-tu publikacji w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych. Miała również 4 ustne wystąpienia na międzynarodowych konferencjach oraz jest współautorką 20 posterów.

W podsumowaniu chciałbym wyrazić opinię, że rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim, jak również stwierdzam że mgr Ewa Irena Gołaś posiada odpowiednie doświadczenie naukowe i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie tej rozprawy.



Prof. dr hab. Bogdan Lesyng