

Recenzja pracy doktorskiej

Autor- mgr Lipska Agnieszka

Tytuł: Badanie struktury i dynamiki wybranych białek metodą symulacji gruboziarnistych

Promotor: prof. dr hab. Adam Liwo

Promotor pomocniczy: dr Adam K. Sieradzan

Ośrodek: Katedra Chemii Teoretycznej, Pracownia Modelowania Molekularnego, Wydział Chemii Uniwersytet Gdański.

Praca doktorska p. Lipskiej Agnieszki zaprezentowana została w postaci opisu zagadnienia stanowiącego obiekt analizy w ramach pracy doktorskiej, do którego dołączone zostały trzy publikacje stanowiące dorobek naukowy Kandydatki. Opis podany jest w języku polskim. Liczy łącznie z bibliografią 140 stron wraz z trzema publikacjami, w których dwóch p. Agnieszka Lipska jest pierwszym Autorem.

Praca omawia zagadnienia biologiczne dotyczące struktury białek w szczególności. Praca doktorska reprezentuje tematykę w ramach dyscypliny, jaką jest bioinformatyka. W badaniach wykorzystywany jest model gruboziarnistego pola siłowego. Ten Autorski model stanowi od lat obiekt analizy zespołu, z którym Doktorantka współpracuje.

Struktura pracy jest tradycyjna.

Opis dorobku Kandydatki rozpoczyna się Rozdziałem 1, gdzie Autorka zamieszcza listę użytych skrótów. Rozdział 2 zawiera zestaw celów stawianych pracy doktorskiej. Autorka określa je jako:

1. identyfikacja zmian strukturalnych w białku wiążącym i transportującym Arg – zadanie zostało omówione w publikacji :

Lipska AG, Sieradzan AK, Krupa P, Mozolewska MA, D'Auria S, Liwo A. Studies of conformational changes of an arginine-binding protein from *Thermotoga maritima* in the presence and absence of ligand via molecular dynamics simulations with the coarse-grained UNRES force field. *J Mol Model*. 2015 Mar;21(3):64. doi: 10.1007/s00894-015-2609-1

2. ocena mocy predykcyjnej modelu gruboziarnistego z uwzględnieniem oddziaływań hydrodynamicznych – zostało to opracowane w publikacji

Lipska AG, Seidman SR, Sieradzan AK, Giełdoń A, Liwo A, Scheraga HA. Molecular dynamics of protein A and a WW domain with a united-residue model including hydrodynamic interaction. *J Chem Phys*. 2016 May 14;144(18):184110. doi: 10.1063/1.4948710.

3. znaczenie efektu ekranowania wiązań peptydowych względem oddziaływania z wodą, co stanowi treść publikacji

Sieradzan AK, Lipska A, Lubecka EA. Shielding effect in protein folding. *J. Mol. Graphics Model*, 2018, 79, 118-132.

Cały Rozdział 3 zawiera opis podstaw dotyczących analiz struktur białek podając przegląd wykorzystywanych modeli, metod obliczeniowych zwracając szczególną uwagę na zastosowany przez Autorkę model.

W przeglądzie tym omówione są zasady budowy białek, metod przewidywania struktury 3D białek w oparciu o wyłączną znajomość sekwencji aminokwasów łańcuchu polipeptydowym. Omawiając modele zwijania białek Autorka rozważa jedno i dwu-etapowy charakter tego procesu wskazując argumenty za i przeciw każdego z nich.

Autorka omawia też techniki eksperymentalne dostarczające pozyskiwania informacji na temat struktury 3D białek podkreślając, że zasadniczym źródłem na temat struktur białek jest właśnie eksperyment.

Obok technik eksperymentalnych Autorka prezentuje podejścia stosowane w numerycznym przewidywaniu struktury białek zwracając uwagę na pełno-atomowe pola siłowe przechodząc do prezentacji pola gruboziarnistego. Szczegółowo prezentuje pole UNRES, które wykorzystuje w dalszej części swojej pracy doktorskiej.

W kolejnych podrozdziałach omawia sposoby przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej, gdzie wykorzystuje symulacje dynamiki molekularnej.

Następnie w kolejnym podrozdziale poświęconym przewidywaniu struktur białek omawia technikę bazującą na podobieństwie (w tym na homologii w szczególności) oraz na zasadzie wykorzystania praw fizyki. Podkreśla zalety i wady każdej z nich.

Zagadnienia przewidywania struktur białek nie można omawiać bez odwołania się do projektu CASP. Autorka taką dyskusję zamieszcza w podrozdziale 3.3.5.

Bardzo ważne zagadnienie udziału obecności rozpuszczalnika omówiony jest w rozdziale 3.4. Poza przeglądem modeli stosowanych w innych modelach Autorka z powodów oczywistych przechodzi do omówienia tego zagadnienia w ujęciu modelu UNRES omawiając aspekty hydrodynamiczne oraz efekt ekranowania.

Wyniki uzyskane przez Autorkę przedstawione są w Rozdziale 4. Trudno jest oceniać dorobek, który już wcześniej podlegał recenzji wydawniczej odpowiednich czasopism. Nie mniej jednak z obowiązku recenzenta postaram się ocenić znaczenie dorobku Autorki.

Publikacja dotycząca kompleksowania Arg przez TmArgBP omawia szereg wersji strukturalnych (otarta/zamknięta, z/bez obecności liganda oraz dwie pozycje wiązania liganda). Symulacja została przeprowadzona w dwóch różnych warunkach temperaturowych 300 K oraz 353 K. Po szczegółowej prezentacji uzyskanych wyników postaci rozkładu populacyjnego struktur określanych za pomocą odległości między-domenowych Autorka identyfikuje korzystny układ dla wiązania Arg jaką jest forma zamknięta zwłaszcza w temp 300 K. Autorka wyraża pewien niedosyt związany z wynikami uzyskanymi dla temp 353 K. Przyczynę upatruje w zastosowaniu gruboziarnistego modelu sugerując, że małe rozmiary liganda powinny być oceniane za pomocą modelu hybrydowego (gruboziarnisty + pełnoatomowy).

Moja uwaga do tej części pracy dotyczy jednoznacznego przełożenia warunków temperaturowych. Autorka wskazuje temperaturę 353 K określaną jako optymalna dla aktywności bakterii. Porównanie jest przeprowadzone wobec temperatury 300 K. Czy były wykonywane testy porównawcze dotyczące relacji między temperaturą stosowaną w *eksperymentie in vitro* a temperaturą zadeklarowaną w *eksperymentie in silico* ? Czy ta jednoznaczność temperaturowa jest rzeczywiście w pełni wiarygodna ?

2. W drugiej publikacji Autorka przeprowadza fałdowanie *in silico* dwóch testowych białek. Obiektem analizy jest wprowadzenie oddziaływań hydrodynamicznych do protokołu symulacji dynamiki molekularnej. Testowymi białkami są: 1BDD oraz 1E0L – białka o zróżnicowanej strukturze drugo-rzędowej. Symulacja została przeprowadzona w dwóch różnych temperaturach : 300 K oraz 335 K w wersji z i bez obecności oddziaływań hydrodynamicznych. Dobór temperatur został podyktowany warunkami termicznymi przejść fazowych omawianych białek. Dzięki takiemu zdefiniowaniu warunków przeprowadzenia eksperymentu *in silico* możliwe stało się określenie mechanizmu i etapowości procesu fałdowania się łańcucha polipeptydowego w formę natywną. Analizie poddano 200 trajektorii dla każdej z omawianych form, co umożliwia przeprowadzenie analizy klastracyjnej definiując struktury bliskie natywnej o RMSD < 6 Å, produkt przejściowy dla RMSD w granicach 6 – 10 Å oraz struktury nieukształtowane dla RMSD > 10 Å. Symulacje przeprowadzone przez Autorkę ujawniły obecność – jak sama to określa – pułapek kinetycznych polegających na zbyt szybkim uzyskiwaniu kontaktów, które wyprzedzając inne zmiany konformacyjne stanowią pewien czynnik zaburzający późniejsze etapy procesu fałdowania. Bardzo przekonujące jest śledzenie obecności struktury natywnej w trakcie procesu fałdowania.

3. Publikacja trzecia omawia szczegółowo aparat matematyczny wprowadzony w celu zapisu efektu ekranowania wiązań peptydowych w relacji do wody. Modyfikacja wyraża się wprowadzeniem zmienionej stałej dielektrycznej w interakcji z wiązaniami peptydowymi. In Modyfikacja ta została przetestowana w edycji konkursu CASP12, gdzie zweryfikowano efekty wprowadzonej modyfikacji.

W rozdziale 5 Autorka zestawia wnioski wynikające z wykonanej pracy omawiając kolejno wnioski zawarte w każdej z publikacji stanowiącej dorobek naukowy dla uzyskania stopnia doktora.

1. Symulacja dynamiki molekularnej formy wolnej i skompleksowanej z Arg wykazując, że wiązanie liganda występuje w sposób korzystny w formie zamkniętej podkreślając zgodność tego wyniku z obserwacjami eksperymentalnymi.

2. Wprowadzenie oddziaływań hydrodynamicznych do symulacji dynamiki w gruboziarnistym polu UNRES ujawniło spowodowanie spowolnienia procesu zwijania białek oraz ukierunkowaniem symulacji tego procesu do wytworzenia nienatywnych oddziaływań określając je jako pułapki kinetyczne.

3. Wnioski wynikające z udziału w eksperymencie CASP12 ujawniły wyraźną poprawę uzyskanych wyników po wprowadzeniu efektu ekranowania. Spowodowało to także przyspieszenie procesu fałdowania.

Zaprezentowane publikacje dowodzą etapu rozwoju modelu gruboziarnistego na polu poszukiwania mechanizmu fałdowania (praca 2 i 3) oraz symulacji zjawisk związanych z aktywnością biologiczną (praca 1). Autorzy modelu opartego na polu gruboziarnistym wyraźnie nie zadawałają się już samym odtworzeniem struktury 3D białka na podstawie sekwencji, ale poszukują zastosowania swojego modelu w odtwarzaniu konkretnych zjawisk i mechanizmów procesów biologicznych. Jest to kierunek bardzo cenny prowadzący do wyjaśnienia mechanizmu fałdowania się białek jako zjawiska biologicznego, a nie ograniczający się jedynie do zagadnienia czysto numerycznego.

Część opisowa dorobku Kandydatki do stopnia Doktora zakończona jest zestawem cytowanej literatury w liczbie 192.

Praca doktorska mgr Agnieszki Lipskiej została wykonana w wiodącym w Polsce i szeroko rozpoznawanym w świecie ośrodku badań strukturalnych białek na Uniwersytecie Gdańskim pod kierunkiem prof. Adama Liwo należącego do ścisłego światowego grona specjalistów w

dziedzinie analiz struktur białkowych jak i przewidywania struktur białek na bazie znanej sekwencji aminokwasowej.

Zagadnienie udziału form dynamicznych w aktywności białek jest fundamentalnym problemem biologicznym. Statyczne struktury dostępne w bazie PDB dostarczają jedynie informacji o topologii danego białka, podczas gdy elastyczność i fluktuacje strukturalne są krytyczne dla pełnienia funkcji biologicznych przez białka.

Dostępne powszechnie programy symulacji dynamiki molekularnej umożliwiają śledzenie zmian strukturalnych w bardzo ograniczonym stopniu. Umożliwiają śledzenie jedynie lokalnych zmian strukturalnych jak np. dynamikę eksponowanej pętli. Wynika to z zapisu dynamiki każdego atomu indywidualnie, co wyraża wysoką precyzję, ale wyklucza śledzenie zmian wielkoskalowych. Zmiany konformacyjne związane z przemieszczaniem się większych części molekuly białka jak np. całych domen są trudno odtwarzalne w tych symulacjach.

Model gruboziarnisty wprowadza właściwy balans pomiędzy precyzją w postaci określenia konkretnej pozycji atomu a dynamiką struktury, która siłą rzeczy wprowadza pewne rozmycie układu. Musimy zrezygnować ze ściśle określonego położenia na korzyść śledzenia form dynamicznych (patrz zasada nieoznaczoności Heisenberga). Za pomocą symulacji dynamiki gruboziarnistej staje się możliwe śledzenie przemieszczania się dużych fragmentów białek w tym domen w szczególności, co jest trudne do zaobserwowania w układach bazujących na reprezentacji pełno-atomowej.

Symulację zmian konformacyjnych z wykorzystaniem modelu gruboziarnistego p. Agnieszka Lipska zastosowała do symulacji zmian konformacyjnych TmArgBP – białka transportującego Arg przez błonę komórkową.

Obiektem analizy jest przejście strukturalne od tzw formy otwartej – wolnej od liganda do formy zamkniętej z zadokowanym ligandem – Arg.

Wyniki uzyskane przez p. Agnieszkę Lipską skonfrontowane ze strukturą krystaliczną wykazują różnice w obrębie krótkich fragmentów N- i C-terminalnych nie mających raczej wpływu na aktywność omawianego białka. Różnice pochodzą też z faktu, że obiektem dla symulacji był monomer a forma krystaliczna przedstawia dimer.

Wyniki uzyskane w opracowaniu drugiego zagadnienia jakim jest wprowadzenie oddziaływań hydrodynamicznych w procesie przewidywania struktur białkowych. Tutaj zastosowany był model opisany szczegółowo w części teoretycznej (Rozdział 3.4.2). Jako białko testowe Autorka wykorzystuje: 1BDD (Immunoglobulin-binding protein) oraz 1E0L (domena sh3). Dobór białek jest uzasadniony. Wynika on z ich odmiennej budowy: pierwsze reprezentuje

strukturę całkowicie złożoną z helis podczas gdy w drugim obecna jest trzy-fragmentowa płyta beta.

Za bardzo cenne uważam śledzenie zawartości struktury odpowiadającej formie natywnej oraz wartości RMS-D w czasie symulacji dynamiki molekularnej.

Wyniki uzyskane z uwzględnieniem oddziaływań hydrodynamicznych Autorka ocenia jako nie w pełni satysfakcjonujące zwracając uwagę na zbyt szybkie zapadanie się pewnych form strukturalnych trudnych do zmian w dalszych etapach procesu fałdowania się łańcucha polipeptydowego. Przyczynę tego efektu upatruje w zbyt dużej rozbieżności rozmiarów omawianych obiektów sugerując, że operowanie na błonie może skutkować lepszymi wynikami.

Kolejne zagadnienie omawiane przez Doktorantkę to efekt zastosowania ekranowania w polu siłowym UNRES w procesie przewidywania struktur białek. Wprowadzona modyfikacja została przetestowana w formie udziału grupy badawczej w kolejnej edycji projektu CASP12, gdzie porównano wyniki uzyskane bez i z wprowadzonym ekranowaniem.

Zestawienie wyników korzystne dla wersji InnoUNRES (Rysunek 4.14) wskazuje na zasadność wprowadzonego ekranowania. Wykazano bowiem znaczącą poprawę uzyskanych wyników dla białka docelowego T0898-D1. Aczkolwiek wyniki uzyskane dla białka docelowego T0882-D1 okazały się mniej korzystne dla wprowadzonej modyfikacji pola UNRES. Pozytywny wkład modyfikacji w polu InnoUNRES w skali ogólnej dla wszystkich rozpatrywanych białek docelowych wykazany został na Rysunku 4.16.

Przechodząc do oceny przedstawionego dzieła należy podkreślić, że przegląd metod podany w rozdziale 3 dowodzi szerokiej znajomości zagadnień związanych z problemem struktur białek w ujęciu metod obliczeniowych.

Wymieniając techniki eksperymentalne identyfikacji struktur 3D i wspominając zjawisko tzw misfolding (w tym wspominając amyloidy) Autora pomija niezmiernie cenną technikę dla analizy struktur amyloidowych, jaką jest solid state NMR.

Dyskusyjne dla mnie jest określenie „*ab initio*” jako określenie wyłącznie dotyczące metod w ramach chemii kwantowej. Historycznie rzecz biorąc określenie to stosowane było też dla metod – jak Autorka to określa – bazujących na zjawiskach fizycznych. Określenie „*ab initio*” oznacza „od początku”. Techniki przewidywania struktury białek z wyłączeniem

odwoływania się do dostępnych znanych struktur i wykorzystywanie ich jako modele typu szablon, mogą być tym mianem określane.

Wśród błędów i niedokładności należy wymienić następujące:

Str. 10 zawiera błędne określenie białka jako „biała” – zapewne błąd edytora.

Str. 15 w pierwszej linijce jest tekst niezrozumiały - zawiera zapewne nie usunięte słowa z poprzedniej wersji tekstu.

Str. 50 „Zaobserwować można również różnice w ułożeniu α -helis znajdujących się....”

Tab.4.2. – brak jednostki pomiarowej

Rysunek 4.3 – Nie podano źródła – czy to jest struktura zaczerpnięta z PDB ?

Tab. 4.3 i 4.4 – nie podano jednostek

Str. 70 – „.....zbyt mały rozmiarem obiektów zaangażowanych”

Pewną nowością dla mnie jest określenie zestawu użytych skrótów oraz listy cytowanej literatury w formie niezależnych rozdziałów – Rozdział 1 oraz Rozdział 6.

Ocena końcowa

Zestaw prac p. Agnieszki Lipskiej dotyczy kolejnych zastosowań rozwijanego z powodzeniem modelu o nazwie UNRES opartego na gruboziarnistej reprezentacji struktury białek. Testy wykonane przez Doktorantkę potwierdzają korzystne zastosowanie tego modelu do zagadnień związanych z szeroko rozumianą analizą strukturalną białek.

Symulacje dynamiki w modelu gruboziarnistym wykorzystane do analizy aktywności TmArgBP wydają się bardzo dobrym przykładem testowania wykorzystania modelu gruboziarnistego do celów symulacji dynamiki. Mimo pewnych lokalnych niezgodności można stwierdzić, że model ten spełnia oczekiwania.

Równocześnie stwierdzam, że zaprezentowany zakres tematyczny jak i swoboda poruszania się Autorki w omawianej tematyce kwalifikuje Ją do dalszej samodzielnej już pracy w dziedzinie bioinformatyki w tym badań strukturalnych białek w szczególności.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska w postaci zestawu trzech publikacji oraz wstępnego opisu zagadnienia spełnia warunki określone dla prac doktorskich. Wnoszę więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o przyznanie stopnia doktora mgr Agnieszce Lipskiej z oceną bardzo dobrą.

Dodatkowo składam też wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Agnieszki Lipskiej ze względu na Jej znaczący udział w realizacji ważnych dla rozwoju modelu gruboziarnistego zadań opracowanych w publikacji 1 i 2. Dodatkowo udział w projekcie CASP stawia zespół

prowadzony przez prof. Adama Liwo w światowej czołówce badań nad strukturą białek. Jest to konkurs wymagającym (krótki czas dla realizacji zadań oraz konieczność spełniania warunków przez ten konkurs narzuconych). Członkostwem mgr Agnieszki Lipskiej w tym wymagającym przedsięwzięciu naukowym wraz z przedstawionym dorobkiem uzasadniam jako czynnik kwalifikujący do uznania pracy doktorskiej jako wyróżnionej.

Prof. dr hab. Irena Roterman-Konieczna

Kraków, 31. września 2018

