



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

dr hab. inż. Jacek Czub
Katedra Chemii Fizycznej
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
tel. +48 535970599
e-mail: jacek.czub@pg.edu.pl

Gdańsk, 07.10.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Ostrowskiej pt. *Effects of macromolecular crowding on the activity and dynamics of the NS3/4A protease from the hepatitis C virus. The synergy between experiments and molecular dynamics simulations*

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska autorstwa pani mgr Natalii Ostrowskiej powstała w Centrum Nowych Technologii i na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką naukową dwojga promotorów – prof. Joanny Trylskiej oraz prof. Bogdana Lesynga. Dotyczy ona wpływu zatłoczenia molekularnego na właściwości strukturalne i dynamiczne oraz aktywność katalityczną proteazy NS3/4A z wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). W przyjętym celu autorka wykorzystała multidyscyplinarne podejście integrujące symulacje molekularne i pomiary spektroskopowe.

Podjęta w pracy problematyka bardzo dobrze wpisuje się w całokształt intensywnych badań nad wpływem zatłoczenia molekularnego na procesy komórkowe. Ułamek objętościowy makrocząsteczek, głównie białek i RNA, w cytoplazmie komórek sięga 40 %, co ma istotny wpływ na wiele procesów komórkowych, takich jak homeostaza białek, rozpoznanie molekularne, kataliza enzymatyczna, transport metabolitów, tworzenie kondensatów biomolekularnych, etc. Szczególnie istotny jest wpływ zatłoczenia na stabilność sfałdowanych białek i kompleksów biomakromolekuł. Poprzez zmniejszenie dostępnej objętości, obecne w roztworze makrocząsteczki obniżają entropię stanu rozwiniętego lub zdysocjowanego, w konsekwencji przesuwając równowagę w kierunku formy zwiniętej bądź kompleksu (relatywnie do roztworu rozcieńczonego). Z drugiej strony, niespecyficzne oddziaływania z makrocząsteczkami mogą albo potęgować stabilizujący wpływ wykluczonej objętości, wtedy gdy są średnio odpychające, albo destabilizować formę zwiniętą lub kompleks, gdy są przyciągające. Ten entalpowy wkład do wypadkowego wpływu zatłoczonego środowiska jest silnie zależny od chemicznej natury czynników zatłaczających i w niektórych przypadkach może nawet dominować nad uniwersalnym efektem entropowym, prowadząc do zaskakujących obserwacji. Stąd ważne jest dogłębne zrozumienie właściwości chemicznych polimerów wykorzystywanych w doświadczeniach *in vitro* do wywoływania efektu zatłoczenia. Z tej perspektywy wyniki uzyskane przez autorkę stanowią ważne uzupełnienie stanu wiedzy na temat mechanizmów działania czynników wywołujących zatłoczenie, dostarczając mikroskopowych informacji na temat dwóch najczęściej stosowanych polimerów tego typu: glikolu polietylenowego (PEG) oraz polisacharozy. Wyniki te są tym bardziej wartościowe, że

stanowią efekt dobrze zaprojektowanych badań łączących pomiary spektroskopowe i symulacje wykonane dla tego samego modelowego systemu. Warto tutaj podkreślić, że autorka, mimo iż specjalizuje się w symulacjach molekularnych, wzięła także aktywny udział w części doświadczalnej, dokonując pomiarów widm dichroizmu kołowego oraz projektując i syntetyzując peptydowe substraty proteazy.

Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział rozprawy zawiera wprowadzenia do podejmowanej tematyki badawczej a także prezentuje szczegółowo cele pracy.

W części wprowadzeniowej autorka wyjaśnia znaczenie zatłoczenia molekularnego dla procesów komórkowych, opisuje wybrane metody jego badania oraz przedstawia teoretyczne podłoże działania czynników powodujących zatłoczenie (dalej: „crowderów”). W mojej opinii prezentacja efektu wykluczonej objętości mogłaby być nieco precyzyjniejsza, zwłaszcza że od czasu przełomowych pracy Asakury i Oosawy z lat 50-tych efekt ten jest dobrze poznany i był wielokrotnie opisywany matematycznie. Zdanie: „In an effort to maximize entropy, the system will seek to minimize the excluded volume, both in terms of volume and surface to volume ratio – as a result compact, globular protein conformations would be promoted” mogłoby sugerować, że entropia *układu* rośnie wraz z przyjmowaniem konformacji bardziej kompaktowej. W rzeczywistości na ogół tak nie będzie, bo stan kompaktowy często będzie się charakteryzował niższą entropią, nawet biorąc pod uwagę entropię rozpuszczalnika. Obecność crowderów obniża entropię konformacyjną stanu rozwiniętego (lub translacyjną stanu zdysocjowanego), co można interpretować jako pojawienie się dodatkowej siły entropowej stabilizującej stan bardziej kompaktowy relatywnie do stanu mniej kompaktowego. Z kolei w sposób bardzo klarowny i zrozumiały scharakteryzowany został w pracy wkład entalpowy związany z niespecyficznym oddziaływaniem biomolekuł z crowderami. Żadnych zastrzeżeń nie budzi także prezentacja mechanizmu działania badanego modelowego białka – proteazy NS3/A4, właściwie wprowadzająca w kontekst biologiczny zrealizowanych prac.

Cele, które postawiła sobie doktorantka, opisane są w sposób jasny i precyzyjny. Dobór proteazy NS3/A4 jako modelowego białka autorka przekonująco uzasadnia obecnością w niej regionów inherentnie nieuporządkowanych (IDPr), które są szczególnie wrażliwe na poziom zatłoczenia i rodzaj makrocząsteczek to zatłoczenie wywołujących. W szczególności analizie poddany został wpływ zatłoczenia na aktywność katalityczną proteazy NS3/A4, strukturę i dynamikę rejonów nieuporządkowanych oraz dyfuzję proteazy i jej substratów. Wobec potrzeby uzyskania wysokorozdzielczego wglądu w naturę badanych zjawisk, główną techniką symulacyjną wykorzystaną przez autorkę była dynamika molekularna w wariancie pełnoatomowym. W celu zdekomponowania efektu zatłoczenia na wspomniane powyżej wkłady entropowy i entalpowy, doktorantka dodatkowo zaprojektowała gruboziarnisty (CG) model crowdera charakteryzującego się brakiem korzystnych niespecyficzných oddziaływań z cząsteczkami białek.

Rozdział drugi i, w dużym stopniu, trzeci poświęcone są prezentacji wykorzystanych przez autorkę metod, przede wszystkim symulacyjnych ale także doświadczalnych, w proporcji

odzwierciedlającej ich udział w pracy. W sposób typowy dla prac z dziedziny dynamiki molekularnej, autorka prezentuje podwaliny teoretyczne tej metody, począwszy od klasycznych równań ruchu i algorytmów ich całkowania, po opis empirycznych pól siłowych stosowanych do opisu energetyki oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych. Szczególny nacisk położony jest na pole siłowe CHARMM wykorzystane w pracy. Czytelnik może też zapoznać się z wieloma technicznymi aspektami symulacji biomolekularnych oraz podstawowymi metrykami stosowanymi do analizy trajektorii dynamicznych pod kątem dynamiki i struktury biomakrocząsteczek, ich dyfuzji oraz oddziaływań. Trochę szkoda, że autorka zupełnie pomija w swojej prezentacji algorytmy utrzymania stałej temperatury i stałego ciśnienia oraz metodę Particle Mesh Ewald, z których szeroko korzystała.

Mimo że opis metodyki symulacyjnej wskazuje na dobre opanowanie warsztatu badawczego, znalazło się w nim kilka nieścisłości lub niezbyt fortunnych sformułowań. Dla przykładu, autorka pisze, że funkcje bazy gaussowskiej „spełniają” równanie Schrödingera i pozwalają na całkowanie Hamiltonianu („integration of the Hamiltonian operator”). W rzeczywistości, jako przybliżenia orbitali atomowych, funkcje te nie mogą spełniać wieloelektronowego równania Schrödingera a całkowane (rozwiązywane) w sposób przybliżony jest samo równanie a nie występujący w nim operator. Niezbyt precyzyjne są także frazy: „energy landscape of its [atom’s] surroundings” i „potential energy of each atom.” W rzeczywistości energia potencjalna nie jest addytywna a jej wartość charakteryzuje pełną konfigurację układu i nawet w uproszczonym opisie pola siłowego nie da się jej zdekomponować na wkłady atomowe. Sformułowanie „In this way the most energetically favourable starting structure of the system is obtained.” mogłoby sugerować, że prosta optymalizacja metodą sprzężonych gradientów, którą zastosowała doktorantka, skutkuje uzyskaniem globalnego minimum energii potencjalnej.

Rozdział trzeci w całości dotyczy opracowania i testowania modeli crowderów, zarówno pełnoatomowych, PEG i polisacharozy, jak i gruboziarnistego. W mojej ocenie najbardziej wartościową częścią obu rozdziałów poświęconych metodyce symulacyjnej jest właśnie skrupulatny, chronologiczny opis procesu projektowania modelu gruboziarnistego wraz z motywacją tworzenia jego kolejnych wariantów. To inżynierskie w swoim charakterze sprawozdanie dowodzi dobrej znajomości warsztatu symulacyjnego oraz technicznych ograniczeń symulacji i może służyć pomocą innym badaczom przy podobnych przedsięwzięciach. Podobał mi się także użyty przez doktorantkę sposób obejścia problemu przeszacowanych oddziaływań hydrofobowych w przypadku modelu PEG. Moje wątpliwości wzbudziły natomiast zaskakująco niskie ładunki cząstkowe polarnych atomów wodoru w terminalnych grupach hydroksylowych PEG (+0.08). Czy jest jakiś powód dla którego te ładunki są ok. 5 razy mniejsze niż w typowych alifatycznych grupach hydroksylowych, np. w łańcuchach bocznych seryny i treoniny?

Rezultaty badań dotyczących wpływu zatłoczenia na aktywność proteazową oraz właściwości strukturalne i dynamiczne białka NS3/4A przedstawione są w rozdziale 4. Autorka omawia w nim ideę oraz wyniki pomiarów aktywności NS3/4A z wykorzystaniem techniki FRET (samo oznaczenie zostało przeprowadzone przez jej współpracowniczkę). Doświadczenia te wykazały, że obecne w podobnej proporcji objętościowej PEG i polisacharoza (Ficoll) wywierają przeciwny wpływ na aktywność (mierzoną np. jako szybkość maksymalna): PEG

obniża ją, zaś polisacharoza zwiększa. W celu przeprowadzenia molekularnej interpretacji tych obserwacji doktorantka wykorzystała symulacje dynamiki molekularnej proteazy NS3/4A, zarówno w roztworze rozcieńczonym jak i w obecności trzech badanych rodzajów crowderów a także w obecności PEG i peptydowego substratu. Stwierdziła, że wszystkie crowdery ograniczają szybkość dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej białka, przy czym efekt ten jest wyraźnie silniejszy w przypadku PEG niż dla polisacharozy i cząstki CG. Analiza kontaktów białko-crowder i porównanie wpływu crowderów na dyfuzję translacyjną i rotacyjną pozwoliło na ustalenie, że PEG oddziałuje z powierzchnią białka korzystniej niż dwa pozostałe crowdery. Doktorantka zbadała też preferencje PEG i polisacharozy do oddziaływania z różnymi rodzajami reszt aminokwasowych występujących na powierzchni białka. Ponieważ nie stwierdziła większego wpływu obu tych crowderów na strukturę i dynamikę miejsca aktywnego proteazy, postawiła hipotezę, że duża różnica w aktywności proteazy NS3/4A w zależności od ich rodzaju wynika z różnego wpływu na szybkość dyfuzji substratu. W mojej opinii, jeśli założymy, że spełnione są założenia modelu Michaelisa-Menten, to hipoteza ta może mieć jednak trudności z wyjaśnieniem ok. 10-krotnego wzrostu maksymalnej liczby obrotów enzymu, k_{cat} , ponieważ parametr ten odpowiada maksymalnemu wysyceniu miejsca aktywnego a proteaza nie działa pod kontrolą dyfuzyjną.

Osobny podrozdział doktorantka przeznaczyła na prezentację wyników dotyczących wpływu zatłoczenia na strukturę regionów nieuporządkowanych kofaktora NS4A. Stwierdziła, że w obecności cząstek CG oraz polisacharozy, a zatem crowderów nie oddziałujących z powierzchnią białka lub oddziałujących z nią słabo, regiony IDPr przyjmują konformacje bardziej kompaktowe niż w obecności PEG. Zatłoczenie wywołane obecnością wszystkich badanych crowderów stymulowało natomiast formowanie krótkiej helisy (4–10 reszt) w obrębie N-terminalnego ogona NS4A. Biorąc pod uwagę, że wedle obowiązującej hipotezy, rejon ten zaangażowany jest w kotwiczenie białka do błony ER, autorka proponuje, że zatłoczenie molekularne może wspomagać ten proces.

Rozdział 5 stanowi podsumowanie wyników obejmujące też perspektywy przyszłych badań.

Ocena formalna

Rozprawa liczy 147 stron, w tym 11 stron wykazu literatury, napisana jest po angielsku, językiem poprawnym pod względem gramatycznym i obejmuje wprowadzenie do podejmowanego problemu, cele badawcze, metodykę, wyniki oraz podsumowanie. Takie klasycznie dla prac doktorskich uszeregowanie treści bez wątplenia ułatwia ich przyswojenie. Na dużą pochwałę zasługuje klarowny styl tekstu, który sprawia, że w żadnym momencie nie miałem problemów z podążaniem za narracją i argumentami. Użyte słownictwo i terminologia są w zdecydowanej większości poprawne a rysunki i grafiki zostały przygotowane starannie, z dbałością o spójną konwencję. Konstrukcja niektórych rozdziałów robi niestety wrażenie nie do końca przemyślanej – treści często powtarzają się, włączając długi skopiowany fragment dotyczący korekty modelu wody oraz powtórzone rysunki (Figure 1.3 i Figure 2.3 oraz Figure 2.7 i Figure 4.5). Liczne odwołania do rozdziałów poprzedzających lub następujących także sugerują, że niektóre fragmenty tekstu wymagałyby przearanżowania. Taka repetytywna i nieco chaotyczna kompozycja sprawia, że lektura bywa miejscami nużąca i mniej przyjemna niż mogłaby być, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną. Jak to bywa w przypadku

długich opracowań, autorka nie ustrzegła się pojedynczych pomyłek typograficznych i innych drobnych błędów, które wymieniam poniżej:

s.11 „400,000 different proteins in the human body, each performing an unique specific task.” – liczba wydaje mi się przeszacowana, nawet jeśli uwzględnimy różne izoformy białek, tym bardziej że mowa jest o białkach pełniących unikalne funkcje

s.13 “with over 100,000 productive collisions per Mole per second” – formalnie podana liczba jest typową stałą szybkości dla asocjacji dwóch białek a nie liczbą produktywnych zderzeń

Figure 1.3 – podpisy paneli górnego i dolnego są zamienione

Formuła 1.2 – j powinno być w indeksie

s.18 “Protein stability is an example of a property that is inversely affected by individual crowding components.” – niejasne sformułowanie

Formuła 2.7 – brak drugiej potęgi przy Δt w wyrażeniu na aktualizację położenia

Formuła 2.8 – w wyjaśnieniach zamiast $a(t + 1/2\Delta t)$ powinno być $a(t + \Delta t)$

s.33 “Due to the potential values, electrostatic interactions are critical” – niejasne sformułowanie

Formuła 2.15 – definicja promienia żyracji może być nieco konfundująca: indeks i dla centrum geometrycznej wybranego zbioru atomów jest zbędny, zaś nawiasy kątowne sugerują uśrednianie po zespole a nie po atomach

Table 2.1 – obok liczby niezależnych trajektorii pomocna byłaby także ich całkowita długość

s.52 “The Förster distance depends on Q_c ” – we wzorze 2.30 wydajność kwantowa fluorescencji oznaczona jest jako Q_d

p.56 “even in solutes such as toluene” – powinno być “solvents”

Figure 3.4 – legenda i dyskusja sugerują że rysunek przedstawia radialną funkcję rozkładu crowderów względem powierzchni białka, podpis mówi jednak o rozkładzie atomów tlenu z cząsteczek wody

p.82 “maximal angle of 140 deg” – zapewne chodziło o kąt nie mniejszy niż 140 deg, względnie o odchylenie od linearności nie większe niż 40 deg

p. 86 masa molowa Ficoll 400 to 400 kDa a nie Da

Table 4.3 – przedstawione w tabeli współczynniki dyfuzji rotacyjnej zostały najwyraźniej omyłkowo obliczone przez podzielenie czasów relaksacji przez współczynnik 6; poprawnie podzielone przez 6 powinny zostać odwrotności tych czasów

Figure 4.11 – pomocna w interpretacji rysunku byłaby legenda przypisująca kolory poszczególnym strukturom drugorzędowym

Konkluzja

Podsumowując, uważam że rozprawa doktorska autorstwa pani mgr Natalii Ostrowskiej stanowi przykład właściwie zaprojektowanych i zrealizowanych oryginalnych badań

naukowych łączących symulacje molekularne z podejściem doświadczalnym. Cele, które postawiła sobie doktorantka, zostały osiągnięte, znacząco poszerzając całokształt wiedzy na temat wpływu zatłoczenia molekularnego na procesy komórkowe. Wyniki uzyskane w ramach pracy zostały już opublikowane w trzech artykułach i były cytowane ponad 30 razy, co świadczy, że spotkały się z pozytywnym odbiorem społeczności naukowej. Nie mam też żadnych wątpliwości że wykonane badania wskazują na wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej kandydatki a także jej dobrą znajomość metodologii badawczej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy.

Jestem zatem przekonany, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wymagania określone przez Senat Uniwersytetu Warszawskiego w uchwale nr 157 z 29 czerwca 2022 i wnoszę o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie pani mgr Natalii Ostrowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jerzy Czub