Data: Toruń, 12 listopada, 2022
L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Katedra Biofizyki
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5
(wiesiek@umk.pl)

RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr Natalii Ostrowskiej pt.

"Effects of macromolecular crowding on the activity and dynamics of the NS3/4A protease from hepatitis C virus. The synergy between experiments and molecular dynamics simulations."

Fizyczny opis świata, w zasadzie w każdym aspekcie, zawiera modele. Dążenie do „abstrakcyjnego" odrzucenia nieistotnych elementów opisu układu czy zjawiska pozwala na uogólnienie oraz stanowi o sile i znaczeniu fizyki. W numerycznym modelowaniu układów biologicznych, zwłaszcza na poziomie molekularnym, prostota modelu jest wielką zaletą. Dlatego ogromna większość publikacji poświęconych modelowaniu białek zakłada, że otoczeniem badanej cząsteczki jest po prostu woda, czasem w dodatkiem odpowiednich jonów gwarantujących neutralność elektryczną układu. W naturze białka pełnią swoją funkcję głównie w komórkach. Są to elastyczne, ograniczone przestrzenie, dominuje w nich woda (na masę ciała ludzkiego składa się ok. 70 % wody), ale odległości między białkami nie są duże. Często można obserwować tzw. zatłoczenie (*crowding*). Struktury i funkcje białek doświadczających takiego zatłoczenia mogą być inne, niż te obserwowane dla izolowanych w dużej objętości pojedynczych molekuł. Modelowanie białek „samotnych" i osadzonych w realistycznym, zatłoczonym otoczeniu może dać różne wyniki. Co więcej, można przypuszczać, że niektóre białka wymagają ograniczenia swobody konformacyjnej do prawidłowego wykonywania funkcji fizjologicznych.

Rozprawa doktorska p. mgr Natalii Ostrowskiej poświęcona jest badaniu tych ważnych i aktualnych problemów związanych w wpływem zatłoczenia na białka. W rozprawie trafnie wybrano ciekawy układ modelowy – stosunkowo niewielki, ale ważny enzym proteazę NS3/4A z wirusa wywołującego wirusowe zapalenie wątroby. Jako czynniki wprowadzające zatłoczenie wykorzystano 3 różne substancje modelowe. Zastosowano głównie metody symulacji komputerowej właściwe tzw. biofizyce obliczeniowej, ale prezentowane są również wyniki badań kinetycznych i spektroskopowych tego układu. Pomysł na projekt, sprawdzający w jakiej relacji będą wyniki doświadczeń i wyniki modelowania, uważam za bardzo cenny. Wg mojej wiedzy nie było w literaturze badań tego typu, zatem jest on też oryginalny.

Praca doktorska, napisana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Joanny Trylskiej (CENT) i Pana prof. dr hab. Bogdana Lesynga (Wydział Fizyki UW), ma formę monografii. Napisana jest w bardzo poprawnym języku angielskim. Składa się ze streszczeń (PL i ANG), 4 zasadniczych rozdziałów, krótkiego podsumowania zawierającego też opis przyszłych możliwych badań oraz Bibliografii. Tutaj pojawia się zagadka: Bibliografia zaczyna się na stronie 137 i obejmuje 137 pozycji, czyli odwrotność stałej struktury subtelnej – czy to przypadek czy zamierzone działanie doktorantki ☺ ??. W rozprawie zamieszczono też Spis publikacji autorki (3 prace z doktoratu i jedna z innej tematyki - wszystkie w dobrych czasopismach z tzw. listy ISI).

Rozdział 1 stanowi zwięzłe, ale „informatywne” wprowadzenie w tematykę doktoratu. Autorka podkreśla często pomijany w modelowaniu fakt, że białka w komórce znajdują się w środowisku dalekim od rozcieńczonego roztworu wodnego. Wprowadza dwa podstawowe dla rozprawy pojęcia związane z zatłoczeniem: efekt ograniczenia objętości (*excluded volume effect*) i oddziaływań niespecyficznych z molekułami sąsiadów (*non-specific interactions with crowders*). Ważna w dalszej części jest sekcja 1.2, gdzie opisane są możliwe konsekwencje zatłoczenia, m.in., wzrost szybkości asocjacji białek o kilka rzędów wielkości, zmiany w szybkości dyfuzji czy zmiany konformacyjne białek. Autorka zapowiada też we Wstępie jakie układy modelowe będą używane w badaniach doświadczalnych (tzw. Ficoll i PEG) oraz w modelowaniu (oligosacharoza udająca Ficoll, model glikolu polietylenowego, czyli PEGu, oraz własny model quasi-sferyczny „inertnej” molekuły imitującej molekułę „crowdera”). We wstępie metody badawcze są tylko wymienione z nazwy (spektroskopia fluorescencyjna FRET, CD, NMR), zaś metody obliczeniowe opisywane są w dalszej części dysertacji. Ważne informacje nt. białka zawiera podrozdział 1.4, w którym prosto i jasno opisano badaną proteazę (NS3 i jej peptydowy „kofaktor” NS4A). Rozdział zamyka opis celów projektu doktorskiego. Przy wykorzystaniu zarówno własnych (lub uzyskanych w laboratorium CENT) wyników pomiarów oraz wyników doświadczeń komputerowych pani mgr Natalia Ostrowska chciała poznać efekty zatłoczenia na protezę NS3/4A analizując (i) tempo reakcji enzymatycznej w dwóch środowiskach (ii) dynamikę badanego kompleksu (iii) proces dyfuzji samego enzymu i jego substratu wraz z możliwymi oddziaływaniami z molekułami środowiska. W mojej ocenie wszystkie cele postawione w tym podrozdziale zostały osiągnięte.

Rozdział wstępny liczy sobie tylko ok. 14 stron, więc wiele informacji nie można było w nim zamieścić. Selekcja była moim zdaniem dość poprawna, materiał ilustracyjny właściwy i główne prace z tej coraz popularniejszej dziedziny są przytoczone w Bibliografii. Mam tutaj kilka drobnych uwag krytycznych

(1) Na rysunku 1.2 przedstawione są trzy reprezentacje białek, jak rozumiem po to, by wytłumaczyć czytelnikowi co to jest struktura pierwszo-, drugo- i czwartorzędowa. W podpisie wspomniana jest jeszcze struktura trzeciorzędowa. Mimo pewnego wysiłku za strony autorki, moim zdaniem rysunek ten nie spełnia swojego zadania, nie jest to do końca dobrze przemyślane (są liczne książki z lepszymi przykładami) i kto nie wie o co chodzi, z podpisu się nie dowie w czym rzecz. Zaletą Rys. 1.2c jest pokazanie schematyczne badanego kompleksu. Szkoda, że poza Rys. 1.2c i Rys. 1.7 nigdzie w rozprawie nie znalazłem porządnego opisu struktury i dużego rysunku tego jedynego badanego w rozprawie białka.

(2) Na stronie 13 podano promienie białek w złych jednostkach (Ang^3).

(3) Na str. 13 jest zapewne „przejęzyczenie”: „*while the distance is exceeded, the atoms are strongly repelled as they start to overlap*”. Atomy się zaczynają odpychać wówczas kiedy są coraz bliżej i wg mnie słabo tutaj pasuje słowo “*exceeded*” (przekroczony (??)).

(4) Mam wrażenie, że Panele na rysunku 1.3 są zamienione, w stosunku do opisu (góra/dół). Ten sam rysunek jest skopiowany na Rys. 2.3 (i raczej też z błędnym podpisem).

(5) Opis zmian termodynamicznych w roztworze wywołanych zatłoczeniem mógłby być lepszy.
Np. Znam pojęcie chemiczne “*activity*”, nie znam pojęcia “*thermodynamic activity*”; nie za bardzo widać z opisu dlaczego rozwijamy (wzór 1.2) wyraz $\ln(\gamma_i)$, a nie np. $\ln(c_i\gamma_i)$, opis współczynnika a_{ij} podany w tym wzorze ma chyba jakiś błąd typograficzny (--) bo nie jest zrozumiały.

(6) Stałe równowagi opisane w równaniu (1.3) odnoszą się tylko do jednego (z pośród wielu możliwych) typów reakcji (reakcje drugiego rzędu) i to ograniczenie nie jest jawnie opisane; ponadto, ściśle rzecz biorąc opisane w tym fragmencie dyskusji zatłoczenie może przesuwać

równowagę nie tylko w kierunku produktów (ale czasem w kierunku substratów – zależnie od stosunku współczynników gamma).

(7) Ciekaw jestem, co Autorka rozumie pod terminem „*chemical interactions, called soft interactions.*.” str. 17?

(8) Niektóre zadania są nieprecyzyjne, np. *“Crowder-protein repulsion interacts with entropic effects…”* (??).

Rozdział 2 jest znacznie ważniejszy, bowiem opisane są w nim metody badawcze stosowane w rozprawie. Widać wysiłek doktorantki by opis ten był wyczerpujący, zwłaszcza w części technicznej. Podbudowa teoretyczna podana w b. krótkim podrozdziale 2.1. jest na elementarnym poziomie, są tam pewne nieistotne nieścisłości (np. we wzorze 2.2 podana jest gęstość prawdopodobieństwa, a nie prawdopodobieństwo, w opisie równania 2.4 można odnieść wrażenie, że funkcje Gaussa spełniają równanie Schroedingera, itp.). W omawianym Rozdziale 2 podano opis budowy modelu, co jest samo w sobie ważnym osiągnięciem doktorantki, pewną dyskusję przyjętych uproszczeń i założeń, wybór parametrów pola siłowego CHARMM używanego w badaniach oraz ważną dyskusję modeli wody. Nowością dla mnie była poprawka na PBC wprowadzona w części poświęconej sposobowi obliczania parametru dyfuzji translacyjnej. To dowodzi, iż doktorantka (i zespół) dołożyła starań, by ważny aspekt uzyskanych trajektorii MD analizować jak najrzetelniej. Fragment poświęcony dyfuzji rotacyjnej (str. 46) powinien być uzupełniony o informację jaki kształt zakłada się dla modelowego układu, by można było stosować przytoczone wzory (sferyczny). Pewne zastrzeżenie budzi brak podania uzasadnienia, dlaczego przy analizie liczby wiązań wodorowych rozszerzono wartość kryterium kątowego ze standardowego (140 stopni) do 120 stopni. Kolejne sekcje Rozdziału 2 zawierają opis metod eksperymentalnych, m.in., syntezy substratu peptydowego przeprowadzonej przez doktorantkę, pomiarów dichroizmu kołowego peptydu (wykonani: NO) oraz pomiarów aktywności enzymu metodą FRET (wykonanie: M. Wojciechowska i A. Popielec). Dla mnie Rozdział 2 jest pisemnym potwierdzeniem faktu, iż doktorantka rozumie metody badawcze, którymi się posługiwała.

Nowy materiał, który należy zaliczyć do ważnych efektów osiągniętych w rozprawie jest zawarty w **Rozdziale 3**. Opisane są w nim szczegółowo przyjęte modele molekuł opracowane po to, by imitować środowisko zatłoczone, tak jak np. w komórce. Założenia przyjęte są logiczne i akceptowalne. Opis konstrukcji ma charakter techniczny, ale daje to podstawę do kolejnych ulepszeń zaproponowanych trzech modeli. Moją uwagę zwrócił model gruboziarnisty CG. Jest on bardzo zawiły, myślę, że są prostsze technicznie sposoby ominięcia trudności obliczeniowych o jakich pisze doktorantka w rozprawie, jednak to co powstało po wielu testach i próbach też zasługuje na pewne uznanie i uwagę. Okazało się, że pewien klaster specyficznie oddziałujących sfer, może zapewnić imitację czystego (niemal) efektu ograniczonej objętości. Taki układ testowy na pewno jest potrzebny biofizykom teoretycznym, i sądzę, że jest kwestią czasu by inne grupy badawcze zaadoptowały ten czy podobny model do swoich potrzeb. Ważne jest w tym rozdziale też to, że Autorka zdaje sobie sprawę ograniczeń stosowanych modeli. Sam też jestem zdania, że model Ficollu (polisacharoza) jest nie za dobry. Brakuje w nim porządnego linkera, układ jest mocno różny pod względem masy cząsteczkowej i homogeniczności od realnej substancji komercyjnej. Jednak, mimo tych ograniczeń, warto było realizować kosztowne obliczenia właśnie z tym modelem, w literaturze nie ma wiele danych nt. dynamiki tak mocno osłodzonych białek (białko w syropie).

Kiedy czytałem ten rozdział, od razu nasunęło mi się pytanie, czy nie można by zastosować jako modelu CG po prostu fullerenów? Może na etapie obrony doktorantka da nam wyjaśnienie czy *„buckyballs”* są

dobrym czy złym modelem układów zatłoczonych? Druga myśl jaką miałem, to kwestia parametrów nowych układów. W rozprawie nie znalazłem informacji, że modele, opracowane na pewno z wielkim nakładem pracy i pomysłowości, są udostępnione społeczności naukowej. Drogą „prywatną" dowiedziałem się, że te cenne informacje pojawią się wkrótce na stronie www grupy badawczej.

Rozdział 3 to nie tylko prezentacja nowatorskich wyników dla „crowderów" – jest też tam obszerna i ciekawa dyskusja uzyskanych wyników. Podane analizy są krytyczne i dobrze osadzone w literaturze. Najbardziej intrygującym dla mnie wynikiem jest spostrzeżenie, że model Ficollu (polisacharoza) przyśpiesza dyfuzję translacyjną (Table 3.3) i to znacząco w stosunku do innych układów. Doktorantka próbuje dyskutować ten efekt, średnio przekonywująco, jakoś nie mogę znaleźć prostego molekularnego wyjaśnienia tego zjawiska, które rzutuje oczywiście na zachowanie się białka wirusowego w tym otoczeniu. Temat na pewno jest wart dalszych studiów. Od strony technicznej chcę pochwalić b. klarowne rysunki ze str. 83 (Figure 3.16) przestawiające w pomysłowy sposób dystrybucje molekuł „*crowderów*" wokół białka NS3 oraz Fig. 3.20, zgrabnie podsumowujący wyniki uzyskane nt. dynamiki różnych modeli.

Główne i najbardziej wartościowe rezultaty przedstawione są w obszernym **Rozdziale 4** (*Effects of crowders on the NS3/4A protease*). Rozpoczyna się on od opisu wyników doświadczeń nad aktywnością enzymu. Zastosowano ciekawy system – odpowiednio dobrany peptyd reprezentujący naturalny substrat tj. białko wirusowe wymagające cięcia proteazą. Peptyd zaopatrzono w dwa fluorofory na obu końcach – donor i akceptor. W normalnych warunkach, gdy są one blisko siebie, fluorescencja jest wygaszana, po przecięciu peptydu końce się oddalają i transfer energii wzbudzenia do akceptora ustaje, nie ma wygaszania via FRET i pojawia się fluorescencja donora, którą można zarejestrować w funkcji czasu. Zespół współpracowników dokonał pomiarów aktywności proteazy natywnej oraz w PEGu o różnych stężeniach i w Ficollu. Pani mgr Natalia Ostrowska z powodzeniem podjęła próbę interpretacji wyników tych pomiarów przy pomocy szeregu obszernych testów komputerowych. Zadanie to było ambitne i trudne. W sekcji 4.1.4 zgromadzono unikatowe dane teoretyczne (z analizy trajektorii MD) nt. współczynników dyfuzji translacyjnej proteazy oraz dyfuzji rotacyjnej. Widać wyraźne różnice i wpływ zatłoczenia na te parametry. Wyniki zależą też od przyjętego modelu zatłoczenia. Wartości podane są wraz z oszacowaniem błędów. Szacunek oparty jest na zaledwie kilku trajektoriach, stosunkowo krótkich (ale to jest duży układ, wiec ograniczone z konieczności dane są akceptowalne) i wg moich intuicji podane błędy są zbyt „optymistyczne" (niekiedy poniżej 1 %) zatem do danych obliczeniowych trzeba podejść z dużą ostrożnością. Jednak uzyskane wyniki są wybitnie nowatorskie, dają do myślenia i będą inspirowały kolejne badania białek w zatłoczonym otoczeniu.

Nie ma tutaj miejsca na omawianie szczegółowe analiz strukturalnych podanych w Rozdziale 4, czyli opisu tego, co zmienia umieszczenie białka w dziwnym, ale naturalnym otoczeniu. Analizy prowadzone są starannie, wyniki prezentowane na niekiedy b. pomysłowych diagramach (Fig. 4.9, pomysł Fig. 4.13) dyskusje są raczej wyczerpujące dany temat i szczegółowe. Dla biologii może być istotne spostrzeżenie zjawiska, którego nie udałoby się zauważyć bez symulacji: zatłoczenie indukuje stabilizację helisy na N-końcu NS4A. Może fizyków to specjalnie nie obchodzi, ale rejony IDR przybierające struktury drugorzędowe w środowisku zatłoczonym to może być nowy mechanizm regulacji procesów biochemicznych w komórkach. Jeżeli proces ten faktycznie zachodzi przy infekcji wirusem HPC, to można rozważać, jak to wykorzystać, np. do zaburzenia tego zjawiska i zahamowania przez to replikacji groźnego patogenu. Wyniki zaprezentowane w Rozdziale 4 (4.5.5) wskazują też na to, że zatłoczenie

może wpływać na zdolność proteazy do zakotwiczania się w błonie komórkowej. To jest też niebanalny wniosek wypływający z prowadzonych przez p. mgr Natalię Ostrowską prac.

Chciałbym się też jakoś odnieść do postulatu synergii miedzy podejściem doświadczalnym i teoretycznym przedstawionym w tej rozprawie. Godna pochwały jest próba dyskusji wyników doświadczeń w świetle rezultatów MD (4.5.2, 4.5.3). Szczegółowe tezy tam zawarte mogą być krytykowane, jednak sama filozofia dążenia do dogłębnego wyjaśnienia zjawisk na poziomie oddziaływań międzymolekularnych jest bardzo dobra i cieszy każdego (bio)fizyka.

Rozdział 5 to dwustronicowe podsumowanie rozprawy i podanie kilku pomysłów na dalsze badania, głównie obliczeniowe, np. polegające na zastosowaniu lepszego modelu polisacharozy (Ficollu).

Od strony redakcyjnej recenzowana rozprawa robi b. dobre wrażenie. Nie ma w zasadzie literówek, wykryłem ich ok. 10 i mogę udostępnić na życzenie wykaz (np. str. 87, nie „polumer", a polymer; nawiasy we wzorze 2.18 są błędne, itp.). Jakość rysunków jest dobra lub bardzo dobra. Na rysunkach z peptydem dobrze byłoby oznaczać N-koniec i C-koniec. Uważam, że przydałby się osobny wykaz skrótów. Spis literatury jest poprawny, jednak szereg nazw w tytułach publikacji powinno być podanych wielką literą (np. cd, charmm, peg,..) zgodnie z zasadami pisowni.

KONKLUZJA jest POZYTYWNA

Pani mgr Natalia Ostrowska przedstawiła bardzo dobrą rozprawę doktorską, zawierającą nie tylko obszerne wyniki badań obliczeniowych (symulacji MD) ważnego białka wirusowego, ale także pewne rezultaty osobiście wykonanych doświadczeń. Praca ma wyraźny charakter interdyscyplinarny, łączy fizykę z chemia i biologią, wykorzystuje liczne metody numeryczne. Doktorantka opracowała w ramach swojego projektu doktorskiego nowe i pożyteczne modele układów imitujących zatłoczone środowisko komórki. Jestem przekonany, że p. mgr N. Ostrowska ma dużą sprawność w realizacji obliczeń MD dla bardzo złożonych układów biologicznych, dobrze opanowała warsztat teoretycznej biofizyki obliczeniowej. Wyniki zostały opublikowane w trzech artykułach o zasięgu międzynarodowym oraz były prezentowane na kilku poważnych konferencjach.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Natalii Ostrowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego związanego z naukami fizycznymi i biologią. Zarówno rozprawa jak i dorobek publikacyjny dowodzą, że doktorantka ma ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki fizyczne i potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe w wykorzystaniem metod biofizycznych**. Recenzowane dzieło spełnia ustawowe** (tj. ustawa – ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) **oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie pani magister Natalii Ostrowskiej do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.**

Wiesław Nowak, prof. zw.

W. Nowak