

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.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Natalii Ostrowskiej została wykonana pod kierunkiem Profesor Joanny Trylskiej z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego i Profesora Bogdana Lesynga z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Praca jest napisana w języku angielskim i jest oparta na trzech publikacjach, w których mgr Ostrowska jest współautorką. Prace te (P1, P2, P3) ukazały się w obiegu międzynarodowym w czasopismach o wysokim wskaźniku IF:

- P1: N. Ostrowska, M. Feig and J. Trylska, Modeling crowded environment in molecular simulations. *Frontiers in Molecular Biosciences* 6:86, 2019. (IF = 6.11).
- P2: A. Popielec, N. Ostrowska, M. Wojciechowska, M. Feig and J. Trylska, Crowded environment affects the activity and inhibition of the NS3/4A protease. *Biochimie* 176:169-180, 2020. (IF = 4.37).
- P3: N. Ostrowska, M. Feig and J. Trylska, Crowding affects structural dynamics and contributes to membrane association of the NS3/4A complex. *Biophysical Journal* 120(17):3795-3806, 2021. (IF = 4.03).

Publikacje P1-3 stanowią zwarty tematycznie cykl publikacji koncentrujących się na wpływie obecności w roztworze makrocząsteczek na aktywność enzymatyczną i dynamikę konformacyjną enzymów. Cząsteczki takie, nazwane przez Autorkę crowderami (ang. crowdery), wywierają wpływ na enzym poprzez załoczenie środowiska wokół enzymu: zmniejszenie objętości dostępnej dla substratu i ograniczenie swobody konformacyjnej enzymu. Publikacja P1 jest pracą przeglądową, w której Autorka omawia modele crowderów stosowane w symulacjach dynamiki molekularnej. Publikacja P2 przedstawia wyniki eksperymentalne dotyczące wpływu m.in. glikolu polietylenowego (PEG) i polisachardu (Ficoll) na aktywność enzymatyczną i inhibicję aktywności enzymatycznej proteazy NS3/4A. Wyniki eksperymentalne uzupełnione są o symulacje układów NS3/4A, NS3/4A/PEG, NS3/4A/substrat i NS3/4A/substrat/PEG. W publikacji P3 przedstawiono analizę dynamiki konformacyjnej układu NS3/4A/PEG stosując modele o różnej rozdzielczości.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Ostrowskiej omawia wyniki już opublikowane w pracach P1-3, uzupełnione o wstępne wyniki i analizy symulacji z wykorzystaniem polisacharydu Ficoll. Rozprawa podzielona jest na sześć części: 1. Wstęp, 2. Metody, 3. Crowdery, 4. Wpływ crowderów na proteazę NS3/4A, 5. Podsumowanie i dalsze perspektywy, Bibliografia (137 pozycji). Rozprawa jest obszerna (147 stron). Biorąc pod uwagę, że rozprawa prezentuje głównie wyniki już opublikowane (publikacje P1, P2, P3) mogłaby być z powodzeniem krótsza.

Część pierwsza rozprawy (Wstęp) wprowadza przedmiot, cele i zakres pracy. Przedmiotem rozprawy jest analiza efektów załoczenia środowiska w cytoplazmie, tj. efektów obecności

makromolekuł takich jak RNA i białka, na dyfuzję substratu i enzymu oraz dynamikę konformacyjną enzymu, co może wpływać na aktywność enzymów a także na oddziaływanie enzymu z membranami biologicznymi. Jako układ badany wybrano proteazę NS3/4A wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). Praca porównuje eksperymentalnie wyznaczone efekty różnych crowderów (głównie glikolu polietylenowego i polisachardu Ficoll) na zachowanie proteazy NS3/4A w zatłoczonych układach z wynikami symulacji komputerowych. Temat pracy jest ważny dla zrozumienia zachowania enzymów w komórkach biologicznych. Dynamika molekularna pozwala uzyskać informacje o rozdzielczości molekularnej, które byłyby trudno dostępne w eksperymencie.

Część druga rozprawy (Metody) opisuje aspekty metodologiczne pracy zarówno odnośnie symulacji komputerowych jak i syntezy substratu i oznaczania aktywności enzymu. Autorka wskazuje, że większość danych eksperymentalnych zostało uzyskane przez Jej współpracowniczkę. Sugeruje to, że informacje techniczne odnośnie eksperymentów mogłyby być ograniczone do niezbędnego minimum.

Opis metodologii symulacji i analizy danych jest obszerny i pozwala na odtworzenie wyników. W symulacjach z rozdzielczością atomową Autorka korzystała z modelu wody TIP3P i modyfikowanego pola siłowego CHARMM 36m. Opis uproszczonych modeli crowderów i ich parametryzacji został przeniesiony do części trzeciej. Trajektorie były analizowane przez wiele deskryptorów, m.in. przesunięcie średniokwadratowe RMSD, fluktuacje średniokwadratowe RMSE, promień bezwładności R_g , współczynnik dyfuzji translacyjnej, czas korelacji rotacji, liczba kontaktów międzycząsteczkowych, liczba wiązań wodorowych. Analizowane były także struktura drugorzędowa i grupowanie konformacji.

Opis zastosowanej modyfikacji parametrów pola siłowego CHARMM 36m został zawarty w sekcji 2.2.5 Optymalizacja [parametrów] wody. Autorka przedstawiła tam zarówno motywację skalowania parametrów jak i sposób jej przeprowadzenia. Taka ad hoc procedura skalowania, która zapobiega jednym artefaktom (niefizyczna agregacja), może jednocześnie kreować nowe artefakty. Wskazuje to, że aktualnie dostępne pełno-atomowe pola siłowe nie są w pełni zoptymalizowane do badania procesów agregacji i dynamiki biopolimerów i sugeruje ostrożność w interpretacji wyników dla pola CHARMM 36m.

Część trzecia (Crowdery) opisuje modele crowderów zastosowane w pracy. Symulacje komputerowe były prowadzone metodą dynamiki molekularnej z rozdzielczością atomową lub mieszaną, tj. rozdzielczością atomową dla enzymu i wody oraz rozdzielczość gruboziarnistą dla crowderów. Parametryzacja modeli cząsteczek wymaga znajomości dynamiki molekularnej na wysokim poziomie. Autorka poradziła sobie z tym problemem bardzo dobrze, a opis metody jest wystarczający do odtworzenia wyników. Części druga i trzecia wskazują, że Autorka dysponuje zaawansowanym warsztatem badawczym i jest dobrze przygotowana do planowania, prowadzenia i analizowania symulacji komputerowych.

Część czwarta (Wpływ crowderów na proteazę NS3/4A) przedstawia i dyskutuje wyniki uzyskane

w rozprawie. Autorka opisuje i dyskutuje zarówno wpływ zatłoczenia środowiska zarówno na aktywność enzymatyczną proteazy NS3/4A jak i na dynamikę strukturalną na NS3/4A. Jest to obok części trzeciej najważniejszy rozdział rozprawy. Omawiane tam wyniki zostały w większości opublikowane w pracach P2 i P3. Nowym elementem jest odniesienie się do symulacji z polisacharydem Ficoll.

Część piąta (Podsumowanie i dalsze perspektywy) krótko streszcza uzyskane wyniki w zwraca uwagę na najważniejsze osiągnięcia.

Część szósta (Bibliografia) podaje literaturę cytowaną w pracy. Dobór pozycji literatury świadczy o znajomości przedmiotu i dobrze ilustruje motywację do podjęcia tematu rozprawy. Bibliografia w kompetentny sposób odsyła czytelnika do prac niezbędnych dla zrozumienia zastosowanych metod i umieszcza uzyskane wyniki w kontekście innych prac analizujących efekty zatłoczenia środowiska.

Za główne osiągnięcia rozprawy uważam:

- 1) próbę wytłumaczenia przeciwstawnych efektów PEG i Ficoll na podstawie wyników symulacji komputerowych (praca P2 i część 4 rozprawy) oraz
- 2) parametryzację modeli crowderów oraz analizę dynamiki strukturalnej enzymu w zależności od zatłoczenia środowiska (praca P3 i części 3 i 4).

Na szczególną uwagę zasługują wyniki eksperymentalne wpływu crowderów na aktywność enzymatyczną NS3/4A (Tabela 1 w pracy P2 i Tabela 4.1 w rozprawie doktorskiej). Wraz ze wzrostem stężenia crowderów PEG 6000 i Ficoll 400 można zauważyć wyraźne trendy: maleńie stałej Michaelisa-Menten K_M i szybkości maksymalnej $v_{maks} = k_{kat}[E]_0$ dla PEG 6000 i wzrost K_M i v_{maks} dla Ficoll 400. Te przeciwstawne efekty są bardzo interesujące, gdyż wskazują na złożony wpływ oddziaływań międzycząsteczkowych na efekty crowderów, które często są uważane za neutralne (słabo oddziaływające). Autorka wysuwa hipotezę, że przyczyną różnych efektów PEG i Ficoll na aktywność enzymatyczną NS3/4A jest przeciwstawny wpływ crowderów na szybkości dyfuzji substratu. Autorka słusznie postuluje, że symulacje efektu Ficoll odpowiadające symulacjom PEG byłyby bardzo pomocne w zrozumieniu efektu zmian dyfuzji.

Jeśli hipoteza Autorki jest prawdziwa, to dalsze symulacje powinny wykazać zmianę szybkości dyfuzji substratu korelującą się ze zmianami aktywności enzymatycznej. Korelacja taka może jednak nie wystarczyć do wyjaśnienia ilościowego trendów K_M i v_{maks} . W symulacjach nie obserwowano wiązania się substratu z enzymem i rozpadu kompleksu enzym/substrat (ani tym bardziej etapu chemicznego i uwolnienia produktów), co nie pozwala jednoznacznie wnioskować w mechanizmie wpływu crowderów na v_{maks} . Zmiany v_{maks} mogą być związane ze zmianami energii aktywacji etapu chemicznego wywołanymi wpływem stłoczonego środowiska na dynamikę konformacyjną kompleksu enzym/substrat. Zmiany dynamiki konformacji enzymu Autorka odnotowuje w rozprawie.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Ostrowskiej napisana jest w klarowny i logiczny sposób i dobrze przedstawia wkład Autorki uzyskane wyniki. Kilka punktów w rozprawie wymagały komentarza

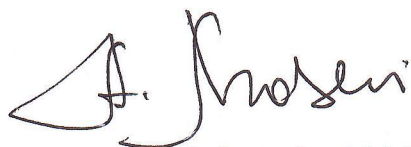
dla zainteresowanych wykorzystaniem wyników przedstawionych w rozprawie do zrozumienia efektów stłoczenia środowiska. W pracy P2 (str 174) autorzy stwierdzają, że liczba obrotów k_{kat} jest dobrym parametrem aktywność enzymu, ale nie przywiązują znaczenia do informacji zawartych w K_M wskazując, że wartości K_M pozostają tego samego rzędu dla różnych stężeń crowdera. Jaka zmienność K_M miałaby znaczenie dla interpretacji wyników?

Dla PEG 6000 i Ficoll 400 zmiana stężenia crowdera wywołuje monotoniczną zmianę K_M i v_{maks} , zaś dla PEG 600 zmiany te są niemonotoniczne. Czy tego typu różnice w zachowaniu PEG 6000 i 600 są dostatecznie duże żeby mieć znaczenie? Jeśli tak, to zachowanie PEG 600 w porównaniu z PEG 6000 niesie informacje o zależności wpływu crowdera od jego wielkości.

Wyniki symulacji są jakościowo korelowane z eksperymentalną aktywnością enzymu wyrażoną przez wzrost lub malenie szybkości reakcji enzymatycznej. W kontekście planowanych dalszych symulacji, czy możliwe jest, przy aktualnie dostępnych mocach obliczeniowych, przeprowadzenie symulacji, które pozwoliłyby na racjonalizację trendów K_M i v_{maks} . Podobne pytanie odnosi się do wyjaśnienia stałej inhibicji K_i .

Nie znalazłem odnośnika do postaci równania Morrisona stosowanego do wyznaczenia K_i (praca P2 str. 175). Równanie to jest stosowane w wielu postaciach. Czy zastosowano postać występującą w programie GraphPad Prism? Czy dopasowane wartości K_M , v_{maks} i K_i zależą znacząco od zastosowanej metody dopasowania modelu? Jakie było uzasadnienie wyboru modelu mocnego wiązania (tight binding)? Nie znalazłem także Dodatku, w którym Autorka przedstawiła program `par_generator.py` do generowania parametrów (str. 69 rozprawy).

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska wskazuje na obszerną wiedzę i umiejętności Kandydatki w zastosowaniach dynamiki molekularnej do badania procesów zachodzących w komórkach biologicznych. Przedmiotem pracy doktorskiej jest analiza wpływu środowiska molekularnego na dynamikę i aktywność wybranego enzymu. Temat ten jest ważny dla zrozumienia aktywności enzymatycznej w komórkach biologicznych. Kandydatka zastosowała oryginalne metody, osiągnęła interesujące wyniki i wykazała, że potrafi samodzielnie prowadzić pracę naukową. Jestem przekonany, że rozprawa spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe warunki stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Molski
Zakład Chemii Fizycznej
Wydział Chemii UAM