

Data: Toruń, 30 maja, 2013

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej
Instytut Fizyki Uniwersytetu M.Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5

**RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr Krzysztofa Baczyńskiego
pt.**

“Badanie atomowych modeli błony tylakoidy przy użyciu symulacji dynamiki molekularnej”

Proces fotosyntezy ma podstawowe znaczenie dla życia na Ziemi. Nadzieje na nowe, odnawialne źródła energii są w znacznym stopniu związane z utworzeniem sztucznych systemów przetwarzających światło słoneczne na wysokoenergetyczne substancje, a może nawet bezpośrednio na prąd elektryczny. Badania nad mechanizmami fotosyntezy należą do najważniejszych zadań współczesnej biofizyki i są prowadzone w wielu czołowych laboratoriach na świecie. Sprawne działanie komórki uwarunkowane jest odpowiednią konstrukcją organelli. Są one ograniczone błonami, które pełnią nie tylko funkcje strukturalno-konstrukcyjne, ale także zapewniają właściwe ułożenie i działanie elementów systemów fotosyntetyzujących. Skład i dynamika błon komórkowych są intensywnie badane wszystkimi dostępnymi metodami biofizycznymi. Znaczenie takich parametrów jak właściwości elektryczne błon, płynność czy możliwe przejścia fazowe jest w biologii i medycynie ogromne. Doświadczenia wielokrotnie pokazały, że istnieje w komórkach związek pomiędzy strukturą przestrzenną biomolekuł a ich funkcją. Dużą rolę biologiczną może mieć także dynamika samych biomolekuł czy ich zorganizowanych zespołów. Ruch w systemach modelowych można obecnie badać przy pomocy zaawansowanych metod symulacyjnych, wykorzystujących komputery i odpowiednie programy do analizy danych. Ten nurt ma w nauce już dobrze ugruntowaną pozycję, najważniejsze czasopisma publikują wyniki modelowania struktury i dynamiki biomolekuł, zaś sam proces zdobywania nowej wiedzy jest coraz tańszy dzięki postępom w technice komputerowej i bioinformatyce.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Krzysztofa Baczyńskiego, napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Pasenkiewicz-Gierula w Zakładzie Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wpisuje się w ten ważny i aktualny nurt badań. Poświęcona jest konstrukcji i badaniu

właściwości podstawowych modeli błony tylakoidów – pęcherzyków obecnych w chloroplastach. Tylakoidy są podstawowymi strukturami dla fotosyntezy w roślinach.

Pomimo niewątpliwej potrzeby i ich ogromnego znaczenia biologicznego (są to chyba najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie typy błon komórkowych) nie było dotąd w literaturze wielu danych na temat zachowania układów membranowych złożonych z takich komponentów jakie dominują w błonach tylakoidów: tj. digalaktozylodiacylodiglicerolu (18:3, DGDG) i monogalaktozylodiacylodiglicerolu (MGDG). Zadanie jakie otrzymał doktorant, tj. utworzenie modeli błon tylakoidowych galaktolipidów i zbadanie ich właściwości strukturalnych i dynamicznych jest moim zdaniem ważne i aktualne.

Celami bardziej szczegółowymi recenzowanej rozprawy było opracowanie nowych modeli atomowych zrębu lipidowego (bez białek) błony tylakoidowej w różnych stosunkach molowych (MGDG, DGDG, MGDG:DGDG 1:1), określenie wpływu MGDG na własności błony dwuskładnikowej, scharakteryzowanie modelu odwróconej fazy heksagonalnej H_{II} cząsteczek MGDG. Cele te obejmowały konstrukcje modeli komputerowych, weryfikacje modeli, przeprowadzenie symulacji przy pomocy standardowego pakietu MD – zwykle na stosunkowo długiej skali czasowej 200 ns, obliczanie parametrów dynamicznych, analizę i interpretację wyników. Moim zdaniem, cele szczegółowe, sprecyzowane w rozdziale 1.4 rozprawy, zostały w pełni osiągnięte.

Praca, licząca 101 stron, ma układ wzorowany na typowych publikacjach naukowych. Składa się z 8 stronicowego rozdziału wstępnego zawierającego b. krótkiego opis celów pracy (Rozdz. 1.4), rozdziału opisującego stosowane i metody (Rozdz. 2, 11 stron), najobszerniejszej części poświęconej wynikom (Rozdz. 3, 52 strony), dyskusji (Rozdz. 4, 11 str.) dwustronicowego podsumowania, Zawiera też spis ilustracji (36), spis tablic (7) i spisu literatury obejmującego 115 pozycji.

Przedstawię kolejno ocenę rozdziałów i uwagi merytoryczne na ich temat. Uwagi formalne podam w dalszej części recenzji.

Rozdział 1 (czyli Wstęp, strony 1-8) napisany jest bardzo zwięźle. Pominięta jest historia badań składu błony tylakoidów, autor skupia się na omówieniu morfologii błony oraz struktury galaktolipidów. Rozdział zawiera podstawowe informacje potrzebne do zrozumienia treści rozprawy. Szkoda, że nie ma schematu chloroplastu i schematu tylakoidów albo nawet zdjęć z

mikroskopu elektronowego. Autor na str 3 pisze o tym, że obecność różnych morfologicznie struktur oraz asymetria w rozmieszczeniu kompleksów białkowych w błonach tylakoidowych może „równoważyć przepływ elektronów” pomiędzy fotosystemami I i II. Jest to b. ogólne stwierdzenie i warto by było tutaj wyjaśnić o co chodzi z tym „równoważeniem”. Szkoda też, że ważny wątek wpływu MGDG i DGDG – układów w końcu badanych intensywnie w tej rozprawie - na transfer elektronów w cytochromie b_{6f} został przedstawiony tylko w jednym zdaniu na str. 6. W rozdziale tym brakuje też, moim skromnym zdaniem, informacji o tym, czy lipidy w odwróconej fazie heksagonalnej H_{II} występują w błonach tylakoidów czy też nie i czy badanie tej fazy ma znacznie praktyczne, czy jest tylko „ciekawostką biofizyczną”. Wypadałoby ponadto, omówić we wstępie nieco szerzej jedyne trzy prace poświęcone symulacjom MD modeli błon zbudowanych z glikoglicerolipidów (48-50; 2005-2011) i skomentować jaki postęp w stosunku do stanu wiedzy wnoszą badania prezentowane w rozprawie.

W Rozdziale 2 (Materiały i metody) autor opisuje zwięźle metodę dynamiki molekularnej oraz założenia poczynione przy wyborze układów do symulacji oraz sposób ich konstrukcji. Podejście opisane nie budzi moich zastrzeżeń. Można oczywiście zastanawiać się jakie pole siłowe jest optymalne, czy promień obciążenia oddziaływań na poziomie 10 Ang. jest wystarczający, jaki schemat kontroli temperatury jest najlepszy i czy przyjęty sposób walidacji wyników jest jedyny. Jednak realizacja projektu wymagała podjęcia konkretnych decyzji i wybór takiego i innego sposobu przeprowadzenia obliczeń był podyktowany dużym doświadczeniem zespołu w modelowaniu układów lipidowych.

W rozdziale tym nie znalazłem żadnej dyskusji zachowania się wiązania glikozydowego sparametryzowanego wg pola siłowego OPLS. Z prac opublikowanych w ostatnich latach wynika (Foley B. Lachele, Tessier Matthew B., Woods Robert J.. Carbohydrate force fields. WIREs Comput Mol Sci 2012, 2: 652-697. doi: 10.1002/wcms.89), że statystyka konformacji w disacharydach związanych tym wiązaniem bywa błędna, np. przy standardowym polu siłowym CHARMM. Nie wiemy, czy parametry OPLS dla węglowodanów opublikowane przez Damma i Inn. [J Comp Chem 18 (1997) 1955] i stosowane w pracy nie wprowadzają nienaturalnych preferencji w konformacjach wiązania pierścieni pyranozowych w DGDG.

Z opisu podanego w rozdziale 2 wynika, że stosowano periodyczne warunki brzegowe, jeśli tak, to dla kompletności opisu należałoby podać rozmiary stosowanych „pudełek” dla poszczególnych modeli.

Rozdział 3 zawierający wyniki rozprawy jest najciekawszy. W pierwszej części omówione są wyniki równoważenia termicznego badanych modeli. Słusznie autor przywiązuje do tego zagadnienia dużą wagę, ponieważ wyniki modelowania często mają „obciążenie” związane z tym, iż układy modelowe nie miały dość czasu, albo stosowane protokoły były zbyt proste, by dane komputerowe nadawały się do nieobciążonych uśrednień. W prezentowanych wynikach fazy zrównoważania mają imponujące długości 100 ns (niedawno wystarczała 1 ns) i zaprezentowane wykresy przekonująco ilustrują tezę, że układy są w równowadze i nadają się do zbierania danych. Pewne niewielkie trendy spadkowe widać co prawda na wykresach energii potencjalnej dla układów DGD_295 i DGD310 (Rys. 3.2 e,f) ale zważywszy na stopień komplikacji tych układów i wielkość efektu nie dyskwalifikuje to tych rezultatów.

Bardzo ciekawe są wykresy zależności średniego pola powierzchni przypadającej na lipid (A_L , Rys. 3.4 i 3.5). W tekście pracy nie znalazłem informacji czy do obliczenia wartości średniej wykorzystano dane z całego zakresu symulacji (raczej niedobrze), czy też tylko z jej zrównoważonej części (poprawnie).

Dużym sukcesem doktoranta, wymagającym zapewne wielu eksperymentów obliczeniowych, było uzyskanie stabilnego modelu MG_HEX dla fazy H_{II} (podrozdz. 3.1.2).

Następne podrozdziały 3.2 i 3.3 zawierają główne wyniki rozprawy przedstawione przeważnie w formie przejrzystych wykresów i prostych tabel. Poza omówionym już średnim polem powierzchni przypadającym na lipid analizowane są liczne parametry charakteryzujące biofizycznie modele błon tylakoidów: profile gęstości elektronowej, molekularne parametry uporządkowania S, orientacja łańcuchów węglowodorowych i nachylenie głów polarnych, profile ciśnienia lateralnego. Są to wszystko unikatowe dane, które po opublikowaniu na pewno przyczynia się do lepszego rozumienia błon tylakoidów. Opis w tej części pracy jest zwięzły i dane przedstawione są właściwie i jasno. Jedynie na wykresach 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 (itd.) zastosowano wg mnie pewien skrót myślowy, oznaczając oś rzędnych (y, pionową) jako „prawdopodobieństwo” – jest to raczej *gęstość prawdopodobieństwa*.

Bardzo ciekawy i wartościowy jest fragment rozprawy poświęcony analizie sieci oddziaływań i klastrów występujących w badanych układach galaktolipidów. Dzięki zastosowaniu metod symulacji pełnoatomowych można było ocenić statystykę i dynamikę wiązań wodorowych, obliczyć rozkłady wody, liczby pomostów wodnych itd. itp. Wyniki zaprezentowane oraz ich dyskusje pozwalają zrozumieć to, co się dzieje na granicy faz woda-lipid, jak te oddziaływania wyglądają w układach mono- a jak w digalaktozowych oraz dlaczego polarne głowy wiążą tak mało cząsteczek „wolnej” wody. Dane z tabeli 3.4 były dla mnie szczególnie ciekawe, zwłaszcza że taka statystyka będzie potem przydatna (*reference*) w

analizie bardziej realistycznych modeli zawierających nie tylko galaktolipidy ale i białka z błon tylakoidów.

Zastosowanie sieci do analizy klastrów pojawiających się w tych modelach oraz ich czasów życia też oceniam wysoko, W interpretacji liczby klastrów zabrakło mi komentarza objaśniającego typową sytuację występowania dwóch klastrów – b. dużego i b. małego: jest to przecież „oczywisty i oczekiwany” przypadek, gdy jeden lipid odrywa się (odpręga) od reszty modelu.

Oryginalne są też wykresy przedstawiające obliczone profile ciśnienia lateralnego w poprzek dwuwarstwy. Efekty prezentowane wydają się bardzo duże, oczywiście rodzi to naprężenia wewnętrzne. Byłoby na pewno ciekawym wiedzieć czy można je jakoś wykryć eksperymentalnie, np. stosując odpowiednio dobrane sondy fluorescencyjne. Profile te przypuszczalnie ulegną silnym zmianom w pobliżu białek zanurzonych w błonach.

Modelownie fazy H_{II} wydaje się najtrudniejszym zadaniem jakiego podjął się doktorant. Uzyskanie w miarę stabilnego modelu jest już sukcesem, analizy strukturalne są ciekawe i nawet pomysłowe. Co do wniosku przedstawionego pod koniec rozdziału (str. 74) o tym, że zaprezentowana zależność chwilowej wartości średniego promienia kanału wodnego od czasu świadczy o stabilności modelu miałbym odmienne zdanie. Jak słusznie zauważył sam autor rozprawy, r_{hex} wykazuje na wykresie 3.31 wyraźny trend. Oczywiście 200 ns to zbyt mało by ocenić, czy po jakimś czasie nie pojawi się oscylacja, jednak ekstrapolując ten paru procentowy wzrost do zakresu np. milisekund można oczekiwać, że kanały się rozpadną. Wynik ten moim zdaniem wskazuje na konieczność jeszcze staranniejszego parametryzowania indywidualnych składników fazy heksagonalnej, albo, co bardziej prawdopodobne, na potrzebę znalezienia odpowiedniego dla tej fazy schematu stosowania periodycznych warunków brzegowych. Pewne nowe dane mogłaby przynieść osobna analiza (i porównanie) zachowania promienia kanału wewnętrznego i każdego z 6 kanałów zewnętrznych modelu (Rys. 3.29).

Rozdział 4 zawiera krótką dyskusję każdej grupy wyników. Wnioski tam przedstawione są ostrożne, opierają się na danych z wcześniejszego rozdziału i nie budzą zastrzeżeń. Część ta pozytywnie świadczy o umiejętności krytycznej analizy danych jaką posiadał doktorant. Dane wskazują, że faktycznie udział *mgdg* w warstwie może wpływać na parametry biofizyczne i na wzorzec oddziaływań w błonie. Okazało się też, że obecność lipidów formujących fazę H_{II} wyraźnie zmienia profil ciśnienia lateralnego w błonie.

Wyniki przedstawione w rozprawie nie rozwiązują bezpośrednio żadnego palącego zagadnienia biologicznego. Stanowią jednak znaczący krok na drodze lepszego zrozumienia ważnego fragmentu przyrody jakim są błony tylakoidów. Zgromadzone w systematyczny i staranny sposób dane posłużą do tworzenia nowych, bardziej realistycznych modeli komputerowych całych fotosystemów. Dadzą ważne punkty orientacyjne przy dyskusji np. zmian fazowych w dwuwarstwach indukowanych, np., temperaturą czy obecnością innych cząsteczek chemicznych (cholesterolu, i innych). Sądzę, że pozornie prosty doktorat przyniósł nowe i użyteczne dane naukowe. Uzyskanie tych wyników wymagało systematycznej pracy, dużej pomysłowości, opanowania warsztatu symulacji komputerowych. Metoda obliczeniowa może być stosowana przez różne grupy badawcze. Warto, zważywszy na znaczenie dwuwarstw w biologii by podejście to było dalej rozwijane.

Praca napisana jest poprawnym językiem, zdarzają się drobne potknięcia gramatyczne. Redakcja pracy jest staranna, b. mało jest typowych „literówek”.

Lektura rozprawy prowadzi do uwag o charakterze stylistycznym i edytorskim:

- str. 3 - sufolipidy → sulfolipidy
- str. 7 – heksagonale → heksagonalnej
- str. 7 – nielamelare → nielameralne
- str. 7 - gram. „lipidami” → lipidów
- str. 10 – równanie Newtona jest to równanie różniczkowe i nie rozwiązuje się go „co krok czasowy”
- str. 11 - F , zwykle wielkości wektorowe jakoś się oznacza, np. strzałką nad symbolem lub „boldem”.
- str. 15 – dggd → dgdg
- str. 21 – posłuzы → posłużą
- str. 22 – biały wodór na białej kartce?
- str. 48 – dwuskładnikowych
- str. 50 , wzór 3.2 – dość rzadko spotykana definicja kąta (alfa) we wiązaniu wodorowym, alfa zero nie daje prawdziwego wiązania wodorowego
- str. 60 , pierwsza linia, zbędne „z”
- str. 70 - Rys. 3.29 – brak informacji jakim programem była robiona grafika
- str. 71 – wzór 3.4 – znów wektory
- str. 75 – duwarstwami → dwuwarstwami
- Ibid. – wciągu → w ciągu

Bibliografia : (a) trochę razi stosowanie AND pomiędzy autorami w rozprawie napisanej po polsku

(b) nazwy czasopism powinny być konsekwentnie pisane albo z wielkich liter albo z małych , jest mieszanka konwencji.

Nigdzie na ma danych na jakich komputerach wykonywano obliczenia, ani jak długo one trwały (WCT).

Pragnę zaznaczyć, że uwagi te nie pomniejszają pozytywnej oceny całości badań.

Uważam, że mgr Krzysztof Baczyński realizując swoją rozprawę doktorską wykonał zestaw spójnych, czasami trudnych, obliczeń, badań i analiz. Uzyskał wartościowe i oryginalne wyniki. Wydaje się, że będą one mogły być opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu światowym.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Baczyńskiego

pt. "Badanie atomowych modeli błony tylakoidu przy użyciu symulacji dynamiki molekularnej"

stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta w naukach fizycznych (i biologicznych) oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia w zupełności wymagania ustawowe [Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455] i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana magistra Krzysztofa Baczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W. Nowak