



UNIwersytet
Warszawski

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

5 marca, 2023

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 600
<http://bionano.cent.uw.edu.pl>

Instytut Chemii Fizycznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Tomasza Skóry

Rozprawa doktorska mgra Tomasza Skóry zatytułowana „*Diffusion and reactions under crowding: Theory and simulations*” została wykonana pod kierunkiem dra hab. Svyatoslava Kondrata w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk. Temat badawczy poruszony w rozprawie dotyczy charakterystyki dyfuzji cząsteczek biologicznych oraz ich reakcji w środowisku zatłoczenia makromolekularnego.

Wszelkie procesy zachodzące w komórkach, zachodzą w wieloskładnikowym, heterogennym i zatłoczonym środowisku. Oprócz wody, jonów czy metabolitów, komórki zawierają wiele makrocząsteczek takich jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy czy rybosomy. Typowe stężenia tych makrocząsteczek w cytoplazmie to 200-400 g/L, co powoduje, że zajmują one nawet do 45% objętości. Obecność innych makrocząsteczek wpływa na dyfuzję biomolekuł (np. enzymów i ich substratów), zwijanie się białek do funkcjonalnej struktury trzeciorzędowej, dynamikę wewnętrzną biomolekuł, termodynamikę i kinetykę różnych procesów, czy równowagi chemiczne. Tłok komórkowy to nie tylko efekt wyłączonej objętości, ale daleko- i krótko-zasięgowe oddziaływania makrocząsteczek z enzymami, substratami czy innymi makrocząsteczkami.

Dla ułatwienia przeprowadzania i interpretacji eksperymentów, reakcje biochemiczne były zwykle badane w niezatłoczonych roztworach (bez innych makrocząsteczek). W ostatnich dwóch dekadach nastąpił jednak znaczny postęp i tłok makromolekularny jest brany pod uwagę w wielu badaniach. Jeśli chodzi o symulacje to, ze względu na moce obliczeniowe, pierwsze modele zatłoczonego środowiska pojawiały się przeważnie w modelach zredukowanych. Obecnie możemy już symulować coraz większe układy i w dłuższych skalach czasowych, więc efekty tłoku molekularnego powinny być uwzględnione w badaniach dyfuzji, dynamiki wewnętrznej czy asocjacji cząsteczek, a także wiązania ligandów. Badacze dostosowują, zarówno metody jak i parametry (tzw. pola siłowe) do opisu molekuł w zatłoczonym środowisku. Ważną kwestią jest także uwzględnienie oddziaływań hydrodynamicznych. Tematyka poruszona w rozprawie mgra Tomasza Skóry jest więc istotna z punktu widzenia i rozwoju metodologii symulacji oraz w kontekście interpretacji badań doświadczalnych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Tomasza Skóry jest oparta o wyniki badań opublikowanych w trzech artykułach, jednym artykule wysłanym do czasopisma oraz dwóch w przygotowaniu. W dwóch artykułach już opublikowanych mgr Tomasz Skóra jest pierwszym autorem. Są to prace, które ukazały się w wysoko notowanych dla dyscypliny nauki chemiczne czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, m. in., w *J. Phys. Chem.*, czy *Phys. Chem. Chem. Phys.* Z sześciu zaplanowanych z tej tematyki prac, w pięciu mgr Skóra jest lub będzie wiodącym autorem. Rozprawa stanowi jednak odrębne dzieło. Efektem badań mgra Tomasza Skóry jest też stworzone przez niego oprogramowanie, które wykorzystywał do przeprowadzenia i analizy symulacji (pyBrown, pyBrown-tools, ExVol, PyGRPY).

Rozprawa została napisana w języku angielskim, ale zawiera także streszczenie w języku polskim. Rozprawa wraz z bibliografią i załącznikami liczy 150 stron. Rozprawę bardzo dobrze się czyta, gdyż jest napisana poprawnym językiem. Autor odnosi się też do ciekawych przykładów i cytatów. Rozprawa ma nieco nietypowy układ, gdyż zawiera obszerne przeglądy literaturowe pokazujące tzw. *state-of-the-art*, nie we Wstępie, ale w każdym rozdziale, w którym opisywane są wyniki. Nie utrudnia to jednak czytania pracy, a nawet poprawia zrozumienie badań autora w kontekście badań innych. Poniżej omawiam części rozprawy.

Po streszczeniach w języku angielskim i polskim pojawiają się odpowiednio lista publikacji autora, wykaz rysunków oraz tabel, a także wykaz skrótów. Właściwa rozprawa zaczyna się od rozdziału zatytułowanego „*Introduction*”. Jest to krótki, kilkustronicowy rozdział, w którym autor przedstawia motywację badań, a także przedstawia tematy kolejnych rozdziałów. Nie ma ogólnego celu pracy, są to raczej cele szczegółowe.

W rozdziale 2, zatytułowanym „*Theoretical background*”, mgr Tomasz Skóra opisuje podstawowe zagadnienia, które będą poruszane w rozprawie: ruchy Browna, twierdzenie o fluktuacji i dyssypacji, anomalną dyfuzję, zatłoczenie molekularne, pojęcia wyłączonej oraz zajmowanej objętości, a także równowagi chemiczne.

Rozdział 3 dotyczy stosowanych metod i technik symulacji. Autor przedstawia podstawy symulacji dynamiki brownowskiej i co ważne opisuje sposoby uwzględniania oddziaływań hydrodynamicznych między cząstkami, czyli mediowanych przez ciecz, zarówno bliskiego jak i dalekiego pola. Poświęca uwagę przybliżeniu Rotne-Pragera-Yamakawy i macierzy współczynników dyfuzji. Opisuje sposoby propagowania dynamiki układów przy użyciu metod Monte Carlo oraz obliczenia wyłączonej objętości.

W kolejnych rozdziałach autor opisuje już własną pracę badawczą i uzyskane wyniki, które w każdym podrozdziale dyskutuje w kontekście badań innych grup.

W rozdziale 4 zatytułowanym „*Diffusion in crowded media*” najpierw mamy dość obszerny ponad 10-cio stronicowy przegląd literatury dotyczącej doświadczeń i symulacji dyfuzji w środowisku zatłoczonym. Na jego podstawie autor wypunktowuje sześć możliwych powodów obserwowanego spowolnienia dyfuzji cząsteczek w układach zatłoczonych. Część z tych efektów podejmuje się uwzględnić w symulacjach (np. zależność od uwzględnienia w symulacjach oddziaływań hydrodynamicznych, przyciągania się cząstek, czy ich kształtu). Wiadomo, że uwzględnienie

oddziaływań hydrodynamicznych dalekiego pola nie wystarcza do prawidłowego opisu dyfuzji w układach makromolekularnych. Autor chciał więc sprawdzić, czy uwzględnienie efektów bliskiego pola poprawia wyznaczenie współczynnika dyfuzji zgodnego z badaniami doświadczalnymi. W tym celu napisał program, w którym do propagacji dynamiki cząstek uwzględnione są efekty dalekiego (w postaci przybliżenia Rotne-Prager-Yamakawa) i bliskiego pola. Autor wybrał układ modelowy, twardych kul o promieniu odpowiadającym promieniowi hydrodynamicznemu Ficollu 70 (rozgałęzionego policukru, używanego jako makrocząsteczki do „realizacji” tłoku w probówce). Symulacje były przeprowadzane metodą dynamiki Brownowskiej oraz rozwiązania równań Stokesa. Stosowano periodyczne warunki brzegowe, więc do obliczeń macierzy współczynników dyfuzji RPY zastosowano sumowanie Ewalda (na podstawie pracy Smith et al. z roku 1987), podobnie jak w przypadku obliczania elektrostatyki w symulacjach dynamiki molekularnej. Autor napisał własny program do tych obliczeń (*pyBrown*).

Kolejny etap badań dotyczył sprawdzenia jak kształt molekuł wpływa na dyfuzję, co było wzorowane na badaniach doświadczalnych i we współpracy z grupą doświadczalną J. Fittera, która badała dyfuzję znakowanej streptawidyny metodami spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Symulacje zostały przeprowadzone dla układów zawierających modele cząsteczek Ficollu 70 oraz dupleksu DNA. Główna konkluzja była taka, że to obecność wydłużonych dupleksów DNA jako makrocząsteczek ma decydujący wpływ na spowolnienie dyfuzji. Autor badał też jak tłok wpływa na współczynnik dyfuzji rotacyjnej, czyli czasy korelacji rotacyjnej. Symulacje pokazały, że dyfuzja translacyjna jest bardziej wrażliwa na tłok makromolekularny niż rotacyjna. Kolejne efekty, które były badane to oddziaływania między makrocząsteczkami, w szczególności oddziaływania przyciągające, które realizowano za pomocą potencjału Lennarda-Jonesa. Wiadomo, że potraktowanie makrocząsteczek jako twardych kul jest przybliżeniem. Może ono dobrze działać dla globularnych białek czy polimerów, takich jak Ficoll, ale już glikol polietylenowy (PEG) jest polimerem, który nie przyjmuje formy globularnej. Do badania ich oddziaływań i dyfuzji autor rozprawy zastosował też potencjały innego typu, tzw. miękkich czy przekrywających się kul.

W rozdziale 4 autor rozprawy podjął się próby wyjaśnienia jakie efekty odpowiadają za spowolnienie dyfuzji w układach wieloskładnikowych i zatłoczonych oraz przybliżył skalę tych efektów.

Kolejny rozdział (numer 5) jest zatytułowany „*Enhanced enzyme diffusion*”. Autor przechodzi do aktywności enzymatycznej w roztworach zatłoczonych i omawia ciekawe zjawisko zwiększonej dyfuzji niektórych enzymów w przypadku obecności substratów reakcji. Zrozumienie sprzężenia dyfuzji i aktywności enzymatycznej jest istotne by móc symulować reakcje zachodzące w cytoplazmie. Reakcje chemiczne mogą wpływać na mobilność molekuł w komórce oraz vice versa. Autor zajmuje się modelowym enzymem, którego dyfuzja wzrasta po związaniu substratu. Następnie porównuje wyniki z doświadczeniem. W Tabeli 5.1 przedstawia podsumowanie znanych doświadczalnie enzymów, których dyfuzja wzrasta i ten wzrost nie musi być spowodowany egzotermiczną reakcją. Wynikać on może z forezy lub zmian konformacyjnych spowodowanych wiązaniem substratu powodujących zmniejszenie promienia enzymu. Domykanie się miejsc wiążących po związaniu substratu może taki efekt powodować, a większość doświadczeń była przeprowadzona w warunkach rozcieńczonych roztworów enzymów bez obecności innych makrocząsteczek.

W rozdziale 5 autor przedstawia wyniki symulacji dla wybranych modeli enzymów zmieniających konformację. W pierwszym przypadku jako model przyjęto dwie kule ze zmieniającą się odległością równowagową między ich środkami, co odzwierciedlało zmianę kształtu i wielkości. W symulacjach bez makrocząsteczek tłoku autor zaobserwował wzrost dyfuzji modelowego enzymu. Przygotował też symulacje, które odzwierciedlały eksperyment służący do mierzenia współczynnika dyfuzji cząstek, które transportują inne. Dobrał odpowiednio parametry, żeby układ symulacyjny odtwarzał eksperyment i dane doświadczalne.

Rozdział 6 jest zatytułowany „*Reactions under crowding*” i przedstawia próby symulacji kinetyki reakcji enzymatycznych w roztworach zatłoczonych. Jest to skomplikowany problem, gdyż wiele nakładających się efektów ma znaczenie, nie tylko sam proces biochemiczny, a także wielkość i kształt enzymu, czy otaczających go makrocząsteczek. Tłok w komórce nie jest realizowany tylko jako wyłączona przestrzeń dla danego procesu, ale realizowany jest przez specyficzne i niespecyficzne oddziaływania między komponentami komórki. Ponownie autor podejmuje próbę modelowania tego typu procesów. Enzymy modeluje w sposób przybliżony jako dwie kule, w otwartej i zamkniętej konformacji, z których tylko jedna jest aktywna. Stosuje metody numeryczne oraz symulacje i pokazuje, że zatłoczenie makromolekularne zmniejsza frakcje otwartych konformacji enzymów. Jest to układ modelowy i trudno będzie uzyskać tym modelem efekty w bardziej zatłoczonych środowiskach, gdyż jak autor słusznie zauważa w tłoku reakcje nie zachodzą zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten. W kolejnych częściach tego rozdziału autor podejmuje próbę dodania kolejnych efektów, które wynikają ze zmiany konformacji enzymów, takich jak wiązanie więcej niż jednego liganda do enzymu, czy kooperatywność takiego wiązania.

Rozdział 7 zawiera podsumowanie wyników badań i zastosowanych przez autora modeli, wraz z krótką dyskusją każdego rozdziału.

Praca zawiera obszerne załączniki, w których autor umieścił wyprowadzenia równań oraz opis programów. W załączniku D autor przedstawia oprogramowanie. Początkowo korzystał z oprogramowania BD_BOX, ale nie chcąc przerabiać cudzego oprogramowania ostatecznie napisał własne narzędzie do symulacji (pyBrown) oraz narzędzia do analizy. Te narzędzia są dostępne w repozytorium GitHub.

Ostatnia sekcja rozprawy to Literatura. W tej bibliograficznej części autor odwołuje czytelnika do ponad 300 pozycji, głównie publikacji w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports*.

Rozprawa jest napisana poprawnie językowo, nie znalazłam prawie żadnych literówek, czasem zostały jakieś powtórzone wyrazy, ale widać staranność autora w pisaniu tekstów, a także równań.

Poniżej wymieniam dla porządku tych kilka błędów, które zauważyłam:

- str. 12 i 92, powinno być raczej species, gdyż w biologii jest formą i poj. i mnogą, a specie oznacza coś innego
- str. 24, powinno być repelled
- str. 75, powinno być exhibited
- str. 81, 85, the enzyme
- str. 86, powinno być different

- str. 93, powinno być mimics
- str. 107, dwa razy z rzędu pojawia się słowo algorithm
- brakuje przedimków w kilku miejscach.

Po przeczytaniu rozprawy ciekawa jestem zdania autora dotyczącego kilku zagadnień, które wymieniam poniżej.

- str. 42, dlaczego wybrano akurat taką liczbę cząsteczek? Z jakich ograniczeń wynikała maksymalna wartość ok. 22% zajętej objętości. Podobnie w Tabeli 4.2 te zajmowane objętości są raczej małe – 5%?
- str. 46, Ficoll 70 czy Ficoll 400 nie są raczej „*inert crowders*”, tak jak jest on często określany w doświadczeniach, podobnie PEG. Czy przybliżenie Ficollu jako kuli nie było zbyt daleko idące?
- Czy nie było sytuacji w symulacjach dynamiki, w których przekrywające się kule agregowały?
- Tytuł podrozdziału 4.1.3 to „*Excluded volume interactions*”, ale zwykle odnosi się do efektów tego zjawiska jak *excluded-volume effects* a nie *interactions*.
- Na ile warto poprawiać opis oddziaływań hydrodynamicznych, skoro opis enzymów i ich aktywności jest w symulacjach autora traktowany modelowo?
- Czy autor prowadził jakieś obliczenia czy symulacje, w których przewidział zmiany współczynnika dyfuzji enzymu po związaniu substratu, dla którego potem przeprowadzono doświadczenia?
- Na ile takie uproszczone przedstawienie molekuł może służyć do przewidywania ilościowego czy jakościowego zmian dyfuzji w układach zatłoczonych?

Autor rozprawia się z tematyką zatłoczenia molekularnego bardzo starannie i przedstawia różne aspekty tego zagadnienia w sposób wysoce dydaktyczny. Części literaturowe i opisowe rozprawy będą mogły posłużyć studentom i doktorantom jako podręcznik na temat teorii badania wpływu zatłoczonego środowiska na dyfuzję molekuł i też reakcje biochemiczne. Rozprawa stanowi też przegląd stosowanych metod uwzględniania oddziaływań hydrodynamicznych w układach twardych i przekrywających się (miękkich) kul.

Mimo, że autor rozprawy przeprowadzał symulacje układów modelowych to dobierał je tak, żeby wyniki symulacji były zawsze odniesione do wyników badań doświadczalnych albo z literatury, albo ze współpracy z grupą doświadczalną. Zawsze przeprowadzał dodatkowe symulacje kontrolne. Dodatkowo wyraźnie przedstawiał ograniczenia stosowanych metod i modeli. Świadczy to o dojrzałości naukowej doktoranta i pełnym zrozumieniu jak można interpretować wyniki symulacji. We wszystkich opisach badań autor za każdym razem wyjaśniał czytelnikowi jaki efekt będzie brał pod uwagę w modelu i symulacjach. Przedstawienie dokładnego toku rozumowania autora znacznie ułatwia czytanie rozprawy.

Osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie dotyczą zbadania wpływu zatłoczonego otoczenia na dyfuzję biomolekuł oraz na reakcje biochemiczne. Autor przeanalizował tematykę dogłębnie i z pewnością jest ekspertem w teorii i symulacjach układów wieloskładnikowych i zatłoczonych oraz w charakteryzacji oddziaływań i dyfuzji w układach gruboziarnistych. Widać, że autor jest już dojrzałym naukowcem z opanowanym warsztatem programistyczno-symulacyjnym i z dogłębnym zrozumieniem procesów dyfuzji i reakcji w układach biologicznych.

Osiągnięcia naukowe mgra Tomasza Skóry i wartość naukową rozprawy, więc oceniam bardzo wysoko. Autor pokazał, że wykazuje dogłębne zrozumienie tematu symulacji modelowych gruboziarnistych układów w tłoku makromolekularnym oraz zrozumienie badań i wyników doświadczalnych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgra Tomasza Skóry stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza jego wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk chemicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w szczególności art. 187 tej Ustawy. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Tomasza Skóry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto oceniam, że dorobek mgra Tomasza Skóry wykracza poza standardowe wymagania stawiane doktorantom. Wyniki przedstawione w rozprawie dotyczą trudnego problemu wyznaczenia dyfuzji i aktywności molekuł w środowiskach zatłoczenia makromolekularnego. Badania mgra Tomasza Skóry wymagały ogromnego warsztatu technicznego i merytorycznego, a także dodatkowo znajomości zagadnień z zakresu biochemii i biologii komórki. Co ważne, autor rozprawy nie tylko zastosował metody zaproponowane przez innych badaczy, ale także opracował własne podejścia symulacji i napisał oprogramowanie do symulacji dynamiki Brownowskiej, a także narzędzia do jej analizy. Praca doktoranta wymagała dużego zaangażowania i cierpliwości. Biorąc pod uwagę wnikliwe podejście do teorii zjawiska zatłoczenia molekularnego, dyfuzji, oddziaływań hydrodynamicznych, ogromny nakład pracy, użyteczność badań i oprogramowania oraz dominujący wkład autora w publikacje wyników badań uważam, że praca doktorska mgra Tomasza Skóry zasługuje na wyróżnienie. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.