



Dziekanat Wydziału Mat., Fiz. i Inf. UG

Pismo wpłynęło dnia 06 MAR. 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej
Magister Katarzyny Walczewskiej-Szewc

pt. *Interpreting resonance energy transfer experiments with Monte-Carlo and molecular dynamics simulations*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc została wykonana w Instytucie Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Research School of Biology, Australian National University.

Rozprawa doktorska posiada formę zszywki, z obszernym 100 stronicowym opisem/komentarzem autorskim w języku angielskim, oraz trzema oryginalnymi opublikowanymi pracami własnymi. Została podzielona na pięćdziesiąt, nieco rozdrobnionych podrozdziałów, wliczając w to streszczenie, 10 rozdziałów głównych, podsumowanie, 4 załączniki i spis literatury. Praca zawiera ponadto przydatne spisy tabel i rysunków. Należy jedynie żałować, że nie zamieszczono wykazu, stosowanych licznie, skrótów i oznaczeń. Poniższa recenzja nie zawiera oceny współautorskich, zrecenzowanych publikacji, a ogranicza się do oceny wartości merytorycznej całości pracy doktorskiej oraz zgodności celów z osiągnięciami końcowymi, wyboru materiału, metod badawczych, wyników symulacji oraz ich analizy.

Podstawowym celem pracy doktorskiej mgr K. Walczewskiej-Szewc było wykorzystanie szerokiej gamy modeli numerycznych do optymalizacji interpretacji wyników pomiarów Försterowskiego rezonansowego przenoszenia energii, z uwzględnieniem takich czynników wpływających na transfer, jak nieokreśloność położenia i uporządkowania molekuł, przy równoczesnej nieoznaczoności swobody konformacyjnej makromolekuł (oraz dyfuzji barwników). Autorka postawiła sobie za cel zbadanie zasięgu zjawiska FRET i przydatności narzędzia, jakim jest "linijka spektroskopowa", do badania zjawisk w dużych układach biologicznych, o rozmiarach oddziaływania powyżej 100 Å.

Rozdział 1 ocenianej rozprawy doktorskiej zawiera dobrze skonstruowany opis teorii zjawiska Försterowskiego rezonansowego przenoszenia energii (FRET) oraz przegląd aktualnego stanu wiedzy w doniesieniu do pomiarów FRET stacjonarnych i rozdzielczych czasowo, zakresu przekazywania energii, czynnika orientacyjnego i dyfuzji barwników.

W rozdziałach 2 i 3 zaprezentowano metodykę symulacji odpowiednio Monte Carlo (MC) oraz Dynamiki Molekularnej (MD). Opis zawiera prostą charakteryzację metod, a następnie rozwinięcie kryteriów foselekcji, ewolucji systemu wydajności FRET oraz zaników fluorescencji.

Wprowadzenie do wyników obliczeń zawiera rozdział 4. Po raz wtóry wyartykułowano cel badań w postaci trzech problemów, które zostaną poddane analizie.

Z wynikami symulacji opublikowanymi w załącznikach, sprzężone są opisy zawarte w kolejnych, nieparzystych rozdziałach: 5, 7 i 9.

Bardzo interesujące, z silnym aspektem aplikacyjnym, są wyniki badań opublikowanych w pracy K. Walczewska-Szewc, et al., *J. Mol. Model* (2013,19,4195), w których Doktorantka dokonała drobiazgowych obliczeń i analizy przydatności metody symulacji MC, dla modelu, gdzie pojedynczy akceptor zastąpiono grupą ściśle upakowanych akceptorów. Panuje powszechne przekonanie (poparte wynikami licznych badań), że ze względu na czynnik zaniku proporcjonalny do szóstej potęgi odległości, wydajność procesu rezonansowego Försterowskiego transferu energii maleje do niemierzalnie małych wartości, już przy odległościach donor-akceptor rzędu 80-100 Å. Czyni to analizę FRET, dla wysoko rozmiarowych makromolekuł biologicznych bezwartościowymi. Autorka wykazała jednak, że wydajny proces FRET może, w specyficznych warunkach układów multi-akceptorowych, zachodzić przy odległościach ponad 150 Å, czyli dla dystansu niemal dwukrotnie przekraczającego odległości uznawane dotychczas jako efektywne, z punktu widzenia przekazywania energii typu dipol-dipol. Wynik jest obiecujący, z punktu widzenia zastosowania do badania procesu rezonansowego przenoszenia energii, w kompleksach donorowo-akceptorowych podwójnych helis DNA, w których Försterowski promień osiąga wartości nawet ~ 170 Å. Mimo iż jak oszacowano, wydajność układów multi-akceptorowych podnosi wydajność FRET o ponad 50 %, to warto jednak zwrócić uwagę, że oszacowana bezwzględna wydajność tego procesu nie przekracza 0,2, przy wymiarze białka globularnego wynoszącym 100 Å (rys. 4, str. 4199).

Rozdział 7 i odpowiadająca mu publikacja w *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2014,16,12317), zawierają analizę przydatności trzech uproszczonych metod obliczeniowych, pozwalających zastąpić czasochłonne symulacje metodą *Dynamiki Molekularnej* (MD). Pierwsza z tych metod opiera się na prostym geometrycznym algorytmie rekonstrukcji "dostępnej przestrzeni barwników" (AV), druga pod nazwą "biblioteki rotameru" (*Rotamer Library* - RL), bazuje na czynnikach orientacyjnym i konformacyjnym, a trzecie podejście, biorące pod uwagę trajektorie barwników, określone zostało jako: "free dye snapshots" (FD). Z przeprowadzonej analizy wynika, że Doktorantka jest świadoma ograniczeń wynikających z przyjętych uproszczeń, tj. założenia prostej statycznej struktury makromolekuł i braku oddziaływań barwnik-barwnik oraz barwnik-makromolekuła. Skrupulatnie

przeprowadzone symulacje pozwoliły na określenie stopnia poszerzenia czynnika odległości i rozkładu FRET, w zależności od dyfuzji barwnika i dynamiki molekuly gospodarza. Autorka wykazała, że zaproponowana metoda szybkich obliczeń powinna umożliwić oszacowanie, na ile dyfuzja barwników i ich uporządkowanie mogą wpływać na relacje pomiędzy wydajnością transferu energii a odległością pomiędzy barwnikami. Nieco zaskakująca jest konkluzja, że wszystkie trzy zastosowane metody obliczeń prowadzą do zbliżonych jakościowo rezultatów, choć z założeń i dyskusji wynika, że uwzględniają bardzo odmienne cechy symulowanych obiektów. Mimo drobnych różnic w wynikach symulacji, wykorzystane znakowane, dość różniące się układy molekularne zdają się jednak potwierdzać ten wniosek.

Rozdział 9 rozprawy i publikacja w *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2014,16,18949) zawierają sprawdzenie przydatności barwników bifunkcyjnych, rozwiązujących problem dyfuzji w symulacjach Försterowskiego rezonansowego procesu transferu energii. Autorka wykazała, że silne oddziaływanie pomiędzy znacznikami i molekułami gospodarza, ograniczające ruchy barwników i swobodną rotację, prowadzi do silnej redukcji efektu dyfuzji barwników i zmniejsza rozrzut wydajności FRET. Zgodnie z oczekiwaniami, w układzie w którym molekuly donora i akceptora są sztywno usytuowane w określonych miejscach (np. helisy DNA), wykorzystując wyniki badań FRET, bez wyrafinowanych metod analizy, można z większą dokładnością określić odległości barwników i zmiany orientacyjne układu. Mam tu jedynie drobną uwagę, w odniesieniu do sensu fizycznego wyznaczonych średnich wartości rozkładu $P(\kappa^2)$, przy bardzo specyficznych, dalekich od "normalnego" rozkładu (poza makromolekułami znakowanymi barwnikiem bifunkcyjnym, dla których rozkład jest "gaussowski"; rys. 3, str. 18951).

Poza "głównym tokiem" rozprawy, mgr K. Walczewska-Szewc wzbogaciła ją dwoma rozdziałami nr: 6 i 8 z nieopublikowanymi badaniami własnymi dotyczącymi odpowiednio, wzmocnionego dzięki obecności metalu rezonansowego transferu energii, oraz testowania możliwości próbkowania symulacji MD w celu śledzenia zachowania znaczników fluorescencyjnych w białkach.

Szczególnie interesujące wydaje mi się pierwsze z ww. zagadnień, gdzie Autorka analizowała zależność wydajności FRET od grubości warstwy. Symulacje pozwoliły na wykazanie, że dla warstw grubszych od 150 Å, FRET nie zależy od grubości warstwy metalicznej. Mierzalny poziom FRET (~0,2) Równie ciekawym jest wynik zależności wydajności FRET od odległości pomiędzy fluoroforami, dla wybranych grubości warstw metalicznych. Autorka obserwowała dla odległości pomiędzy fluoroforami wynoszącymi nawet 500 Å. Rozdział ten zawiera wiele przyczynków, które doktorantka planuje rozwiązać w toku dalszych badań. Być może głębszej analizy wart jest obszar specyficznego minimum na wykresie wydajności FRET w funkcji odległości metal-barwnik, dla obliczeń układów bez uwzględnienia rozpraszania energii.

W rozdziale 10 przedstawiono obszerne wnioski końcowe, a rozprawę kończą: zbiór załączników zawierających publikacje własne Doktorantki, dodatki oraz bardzo bogaty, liczący 170 pozycji wykaz, dobrze dobranych i aktualnych pozycji literaturowych.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że tematyka badawcza rozprawy doktorskiej mgr K. Walczewskiej-Szewc jest oryginalna, zagadnienie nietrywialne, a treść pracy odpowiada tematowi określone w szeroko ujętym tytule. Głównym osiągnięciem Autorki było zbadanie zasięgu zjawiska FRET i przydatności narzędzia, jakim jest "linijka spektroskopowa" do badania zjawisk w dużych układach biologicznych, o rozmiarach oddziaływania powyżej 100 Å. Układ rozprawy jest logiczny, z jednoznacznym rozróżnieniem wkładu własnego Doktorantki i wyników innych autorów. Struktura podziału treści pracy jak również kolejność rozdziałów nie budzą wątpliwości. Na uznanie zasługuje rzetelna, bardzo szeroka dyskusja otrzymanych wyników w oparciu o przyzwoitą liczbę aktualnych i poprawnie wykorzystanych źródeł literaturowych.

Formalna strona rozprawy jest bez zarzutu, język jest precyzyjny i poprawny, praktycznie nie dający możliwości wytknięcia błędów natury edytorskiej.

Przedstawione powyżej nieliczne uwagi nie umniejszają wartości pracy i powinny posłużyć jedynie jako zachęta do dyskusji. Zawarte w rozprawie wyniki analizy przydatności szerokiej gamy modeli numerycznych do optymalizacji interpretacji wyników pomiarów Försterowskiego rezonansowego przenoszenia energii, z uwzględnieniem takich czynników wpływających na transfer jak nieokreśloność położenia i uporządkowania molekuł oraz dyfuzja, są znaczącymi wynikami naukowymi. Wymagało to od Doktorantki wiedzy teoretycznej, inwencji oraz przeprowadzenia żmudnych symulacji komputerowych, poprzedzonych doborem odpowiednich technik obliczeniowych. Uzyskane dane zostały wydajnie zinterpretowane, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej mgr K. Walczewskiej-Szewc. Zaproponowane zagadnienie badawcze jest aktualne i ma swoje uzasadnienie w doniesieniach najnowszej, światowej literatury. Stanowi wkład do wciąż intensywnie rozwijanego kierunku badań związku pomiędzy strukturą a funkcją kompleksów makromolekularnych. Zaprezentowane w rozprawie wyniki badań zostały częściowo zawarte w 3 obszernych pracach opublikowanych w renomowanych czasopismach, z tzw. *listy filadelfijskiej*. Uważam, że osiągnięcia autorki rozprawy są oryginalne i ważne, a otrzymane wyniki wpisują się w aktualny nurt badań.

W konkluzji oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc wysoko i stwierdzam, że spełnia ona bez zastrzeżeń wymagania zwyczajowe i formalne stawiane przez *Ustawę o tytule naukowym i stopniach naukowych*, wnioskuję zatem o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

