

Prof.dr hab.Lucjan Pielą
Pracownia Chemii Kwantowej
Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, dn. 21.V.2012 r.

**Recenzja rozprawy habilitacyjnej p.dra Mariusza Makowskiego przedstawionej
w formie cyklu dziewięciu publikacji zatytułowanego**

***„Projektowanie i parametryzacja gruboziarnistych, opartych na fizyce potencjałów
oddziaływań łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych w wodzie do zastosowania w
wielkoskalowych symulacjach białek”***

Pan dr Mariusz Makowski jest naukowcem o wielkim dorobku. Ma 37 lat, a jest współautorem 61 publikacji. To pewnie właściwy wiek, aby przystępować do habilitacji, choć, oczywiście, sztywnych reguł tu być nie może (jestem zwolennikiem nawet jeszcze wcześniejszych habilitacji). Jego dorobek przed doktoratem to 24 publikacje, chyba jeden z największych ilościowo dorobków publikacyjnych doktoranta, z którymi się zetknąłem. Od pierwszej publikacji są to prace, które ukazały się w czasopismach międzynarodowych i to w dobrych i bardzo dobrych czasopismach. Nie zauważyłem wśród publikacji prac jednoautorskich Kandydata. Są to zawsze prace wieloautorskie i to z reguły „bardzo wieloautorskie”, często w konfiguracji międzynarodowej współautorów, ostatnio często związanej z Cornell University, USA (prof.Harold Scheraga) – jest to doskonałe laboratorium o światowej renomie.

Jednym z największych teoretycznych wyzwań jest określenie struktury przestrzennej białek. Z kolei w tym wyzwaniu jednym z najważniejszych zagadnień jest efekt hydrofobowy, ciągle jeszcze trudny do teoretycznego opisu. Właśnie teoretycznego opisu efektu hydrofobowego dotyczy cykl publikacji habilitacyjnych. W skład rozprawy habilitacyjnej p.dra Makowskiego wchodzi 9 prac (H1-H9)

opublikowanych w latach 2007-2009, z których wszystkie poza ostatnią ukazały się w czasopiśmie *Journal of Physical Chemistry B*, zaś ostatnia ukazała się w czasopiśmie *Protein Design Engineering and Selection*. Wszystkie prace H1-H9 są wieloautorские (od 3 do 7 współautorów), w przeważającej mierze pochodzących z zespołu gdańskiego kooperującego z grupą profesora Harolda Scheragi. W tej sytuacji ciekawy byłam subtelności oświadczeń współautorów. Są to oświadczenia konkretne, ale wkład Kandydata powstaje przez odejmowanie. Niemniej, takie odejmowanie wskazuje na wiodącą rolę habilitanta w tym temacie badawczym. Dla mnie to bardzo ważne, bo w długim okresie mojej aktywności zawodowej widziałem już rzeczy zadziwiające. Uważam, że nie tylko w tym, ale w każdym przypadku habilitacji niezbędny jest kontakt ocenianego z oceniającym, np. w formie referatu habilitanta w obecności recenzenta(ów).

Struktura geometryczna białka czyli długiego polimeru (na ogół kilkaset merów) złożonego z 20 rodzajów występujących w Przyrodzie aminokwasów jest kluczowa dla jego funkcjonowania w organizmach i wynika najczęściej z jego sekwencji aminokwasowej. Narasta lawinowo liczba poznawanych sekwencji aminokwasowych, podczas gdy liczba struktur przestrzennych rośnie powoli m.in. ze względu na wysokie koszty doświadczeń. Praktycznie jedynymi metodami badawczymi są ogromnie złożona i kosztochłonna analiza rentgenograficzna kryształów oraz analiza wyników jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Trzecią metodą przewidywania kształtu przestrzennego jest teoria. Tymczasem poznany jest genom ludzki, także inne genomy, a to oznacza mnóstwo znanych sekwencji białkowych o nieznanym przeznaczeniu w organizmie. Kształt zwiniętego białka czyli tzw. konformacja natywna sugeruje funkcję biologiczną białka, a funkcje biologiczne białek genomu to klucz do rozwiązywania np. problemów chorób dziedzicznych i innych. Rozwiązaniem tego problemu zainteresowani są wszyscy, w tym największe koncerny farmaceutyczne.

Corocznie w USA urządzany jest konkurs (CASP – czyli Critical Assessment of Protein Structure Prediction) wielu laboratoriów, w którym zespoły badawcze starają się przewidzieć nieznanne jeszcze (ale w trakcie ustalania metodami doświadczalnymi) struktury przestrzenne białek o podanych sekwencjach. Tu laboratoria polskie są dominujące w świecie. Jednak największe sukcesy święcą podejścia teoretyczne, które opierają się na analizie statystycznej baz już rozwiązanych struktur białek. Od tej filozofii odżegnuje się praca p.dra Mariusza Makowskiego, której ambicją jest

stworzenie modelu opartego, jak to wielokrotnie podkreśla autor, na „fizyce oddziaływań”. To bardzo ambitne zadanie. Co jest alternatywą do takiego podejścia? W zasadzie alternatywa dotyczy korzystania z podobieństwa tego, co jest nieznanne do tego co jest znane np. z baz wyników eksperymentalnych. To nie jest, oczywiście, podejście nienaukowe, ale tego rodzaju filozofia nauki razi wielu użytecznością i w pewnym sensie „zamiataniem problemów pod dywan”. Można mieć nadzieję i ta nadzieja bywa niepłonna, że kiedyś później odgadnięte „skuteczne liczby” dadzą się wyjaśnić z tzw. „pierwszych zasad”.

Nie jest łatwo być wiernym zasadzie oparcia się na „fizyce oddziaływań”. Ten zamiar jest osłabiany zaraz na początku przez przyjęcie koncepcji „reszt scalonych” czyli w zasadzie pseudoatomów, obiektów zawierających wiele atomów, czasem do kilkunastu atomów, traktowanych jako jeden obiekt i to jeszcze z jednym czy dwoma punktami działania sił. To, w zasadzie, można zaakceptować, bo cała fizyka oparta jest (co jest samo w sobie zadziwiające) na modelu hierarchicznym: kwarki, hadrony i leptony, jądra i elektrony, atomy i molekuly jako punkty materialne, mechanika ośrodków ciągłych, bryła sztywna itp. Uproszczenie za uproszczeniem, ale wszystko jakoś działa i jest ze sobą spójne. Trzeba to także zaakceptować z tego prozaicznego powodu, że bez tego będziemy nieefektywni (znowu ukłon w stronę użyteczności).

W rozpatrywaniu przypadku musimy potem powiedzieć, jak sobie wyobrażamy oddziaływanie takich obiektów jak pseudoatomy, a to powinno prowadzić do koncepcji „potencjałów gruboziarnistych”. W pomyślnym przypadku można abstrahować od wielu właściwości składowych atomów, aby zastąpić je jakąś charakterystyką pseudoatomów, z jednej strony tworów naszej wyobraźni, a z drugiej jednak czegoś realnego, bo wyodrębnionego na podstawie silnej korelacji pozycji atomów, pewnej sztywności ich konfiguracji, także niepodzielności pseudoatomów w zakresie rozpatrywanych zdarzeń. Jak dotychczas nie wypracowano sposobów jednoznacznego przejścia od charakterystyki ilościowej *atomów* do charakterystyki ilościowej *zjednoczonych atomów*, nie licząc zgrubnych parametrów takich jak objętość, powierzchnia, itp.

Kandydat kontynuuje prace p.prof. Adama Liwy i współpracowników, którzy w celu uproszczenia problemu zaproponowali wiele lat temu potencjał UNRES („united residue”). Jest to podejście typu „bottom up”, a więc fizyczne; jego alternatywą jest myślenie w kategoriach *skuteczności* przewidywania końcowej struktury przestrzennej

białka np. poprzez zadanie konkretnej energii oddziaływania reszt aminokwasowych nie dlatego, że one tak oddziałują tylko dlatego, że to zapewnia sukces przewidywania struktury.

Efekt hydrofobowy (temat rozprawy) nie wynika z nowego typu oddziaływań, da się wyjaśnić znanymi innymi oddziaływaniami (oddziaływanie electrostatyczne, odpychanie walencyjne, oddziaływanie indukcyjne, dyspersyjne, itd.). Kluczem do tego efektu jest istnienie i pośrednictwo wody (której molekuly oddziałują ze sobą silnie i to tworząc nawet sieć wiązań wodorowych o pewnej strukturze przestrzennej) i istnienie w tym układzie mobilnych molekuł („hydrofobowych”), które z molekułami wody (a nawet ze sobą!) oddziałują słabo. To, plus fakt, że strukturę wody można traktować jako bibliotekę molekularną, w której znajdzie się (przez dostosowanie) sieć wiązań wodorowych pasująca *do każdego kształtu* substancji rozpuszczanej, jest podstawą procesu segregacji przestrzennej molekuł i wypychania hydrofobowych obiektów ze struktury wody. Koszt energetyczny tego wypychania jest najmniejszy, gdy następuje segregacja obu faz, albo asocjacja hydrofobowych molekuł w „kropkę oleju” wewnątrz wody, gdy inne oddziaływania (choćby sztywność łańcucha czy odpychanie walencyjne uwzględniane w modelach zgrubnych jako „excluded volume”) ograniczają mobilność reszt hydrofobowych .

W pracy H1 Autor kładzie podwaliny swojego modelu. Przede wszystkim aproksymuje on czasem dość złożony kształt przestrzenny łańcucha bocznego przez elipsoidę obrotową o gęstości hydrofobowości (praktycznie atomów niewodorowych) zanikającej gaussowsko, to samo robi z łańcuchem z otoczka hydratacyjną (też elipsoida współosiowa z tamtą). Warstwę hydratacyjną aproksymuje więc jako różnicę dwóch funkcji gaussowskich. To podejście może budzić wątpliwości, bo elipsoida obrotowa dość luźno jest związana z kształtami łańcuchów bocznych aminokwasów. Oznacza to jednak, iż już na wstępie na ołtarzu skuteczności kładziemy pewną część wyżej wspomnianej fizyki problemu. Gdy dwie takie elipsoidy reprezentujące dwa łańcuchy boczne się do siebie zbliżają, następuje sumowanie takich gęstości odpowiadające dimerowi. Pojawia się problem dehydratacji na styku takich elipsoid, w szczególności zmieniona hydratacja w obszarze siodeł bryły sumarycznej. Autor zakłada, że w tym ostatnim obszarze molekuly wody są słabiej związane wiązaniami wodorowymi z resztą roztworu, doznają unieruchomienia (obniżenie entropii), to powoduje wzrost energii swobodnej. Ta koncepcja doprowadza Autora do wyrażenia

analitycznego na potencjał średniej siły związanej z łączeniem się dwóch wnęk. Podejście odnotowuje sukces, bo, w odróżnieniu od koncepcji tworzenia powierzchni dimeru, daje jakościowo poprawny model dehydratacji. Autor to podkreśla i słusznie, ale wydaje mi się, że gdyby w modelu powierzchni dawać inne wagi za jej wypukłość a inne za wklęsłość, to ten efekt też powinien tam wyjść.

W pracy H2 Kandydat sprawdzał swoją koncepcję z H1 (uzupełnioną od wprowadzenie odpychania typu Lennarda-Jonesa) porównując wyniki z wynikami dynamiki molekularnej dla cząsteczek metanu w wodzie. Wynik był pomyślny. Wysoko cenię w podejściu Autora konsekwentne weryfikowanie swojego modelu na ciągu układów, zaczynając od najprostszych. Tylko niewiele laboratoriów tak robi, a tak być powinno.

W pracy H3 znowu sprawdzano zaproponowany model dla par łańcuchów bocznych (takiego samego rodzaju). Podobne studium wykonano w pracy H4 dla różnych łańcuchów bocznych. W obu przypadkach energię swobodną tworzenia wnęki (opracowaną w pracy H1) uzupełniano o nieco zmodyfikowany potencjał Lennarda-Jonesa (potencjał Gay-Berne). I tym razem imponuje zasadniczość tego podejścia, gdyż rozpatrywano proste molekuly organiczne – bliskie analogi hydrofobowych łańcuchów bocznych kilku aminokwasów: etan (analog alaniny), propan (czy to jest, jak napisano w publikacji, analog proliny – tu mam wątpliwości), isobutan (analog waliny), izopentan (analog leucyny i izoleucyny), etylobenzen (analog fenyloalaniny), siarczek metylopropylu (analog metioniny) i indol (analog tryptofanu). Porównanie z wynikami dynamiki molekularnej (zawsze stosowano AMBER), a nawet z niezależnymi ocenami kontaktowych energii swobodnych wydedukowanych na podstawie baz danych krystalograficznych (to bardzo ważne!) okazało się w zasadzie pomyślne, także jeśli chodzi o zależność od orientacji wzajemnej łańcuchów ujętej w wyniku z pracy H1. Korelacja z kontaktowymi energiami swobodnymi, jakkolwiek bardzo cieszę (bo oznacza, że oba podejścia mają sens) nie jest jednak imponująca - współczynnik korelacji jest równy 0.812.

W dalszej pracy (H5) Autor zajął się amfifilowymi łańcuchami bocznymi, które posiadają polarną lub naładowaną (a więc hydrofilową) „głowę” i hydrofobowy „ogon”. Filozofia jest podobna jak poprzednio, ale konieczna była modyfikacja: elipsoidy obrotowe uzupełnione są o polarne centrum w określonym miejscu na osi takiej elipsoidy. Autor wprowadza konieczne zmiany potencjału średniej siły

uzupełniając oddziaływania o oddziaływania coulombowskie, polaryzację części hydrofobowych i polaryzację rozpuszczalnika (model Borna). Wagę poszczególnych (traktowanych addytywnie) wkładów Kandydat ustala przez porównanie z pełnoatomowymi symulacjami dynamiki molekularnej metodą najmniejszych kwadratów. To jest, oczywiście, podejście „physics based”, ale tylko częściowo, bo ciśnie się jednak myśl, że takie tworzenie potencjałów gruboziarnistych ma jednak w sobie trochę z dopasowań charakterystycznych dla potencjałów empirycznych np. opartych na bazach danych. Ta moja krytyka jest wyrozumiała, jest tylko zwróceniem uwagi na wyrzeczenia, jakie konieczne są „w podejściu opartym na fizyce”.

W dalszych pracach Kandydat zmuszony jest zmodyfikować model amfifilowego łańcucha bocznego. Wskutek wielokonformacyjnego charakteru tych łańcuchów konieczna jest rezygnacja z jednej pozycji polarnej głowy i dopuszczenie jej drugiej pozycji wewnątrz elipsoidy obrotowej. Kandydat wprowadza odpowiednie zmiany w potencjale średniej siły, zmuszony jest również podjąć obronę przed sklejaniami się przeciwnych ładunków (oczywiście, broni się czymś najprostszym, co przypomina potencjał Lennarda-Jonesa). Później jednak stosuje coś, co nie jest w publikacji H6 (ani w autoreferacie Kandydata) porządnie wytłumaczone: człon kwadrupol-kwadrupol. Autorzy publikacji piszą: *„For pairs including arginine, the spread of the charge distribution must also be included by introducing a term corresponding to averaged quadrupole-quadrupole interactions and, for all pairs, an explicit Lennard-Jones term must be included between the charged centers.”* Może tu chodzi o efektywne uwzględnienie tych dwóch pozycji polarnej głowy? To powinno być jasno napisane. Cokolwiek by jednak to nie było, mam także problem z przyjęciem założenia o uśrednieniu po wszystkich orientacjach branych z jednakowymi wagami. W każdym razie miałbym na pewno obiekcje w realnej strukturze białka, a przecież o taką ma na końcu chodzić.

O ile dotychczas omówione prace są wyraźnie zogniskowane na podanej w pracy H1 koncepcji elipsoidy obrotowej z późniejszymi i niezbędnymi modyfikacjami, to prace H7 i H8 mają inny, ogólniejszy charakter.

Praca H7 dotyczy zależności efektu hydrofobowego od rozmiarów przestrzennych obiektów hydrofobowych. To bardzo ważne zagadnienie i dobrze, że takie badania znalazły się w dorobku habilitacyjnym. Rezultat badań jest taki, że efekt hydrofobowy asocjacji dwóch molekuł hydrofobowych wzmacnia się, gdy rozmiary molekuł

hydrofobowych rosną. Nie jest to zaskakujące, choć brakuje mi tu studium dwóch związanych z tym aspektów: 1) czy symulacje komputerowe mogą doprowadzić do makroskopowej separacji faz czy tylko badamy efekt hydrofobowy spotkania dwóch molekuł w wodzie, oraz: 2) jak efekt hydrofobowy zależy od kształtu molekuł, a więc m.in. od powierzchni zetknięcia molekuł hydrofobowych ze sobą i z roztworem. Na to drugie pytanie Kandydat odpowiedział w pracy H8, w której przedmiotem studium były molekuły m.in. adamantanu i fullereny. Okazało się, że nie wystarczy, że molekuła jest duża (jak np. fulleren), jeszcze musi mieć odpowiedni kształt, aby przy tworzeniu dimeru monomery nie stykały się zbyt małą powierzchnią.


W pracy H9, kończącej cykl habilitacyjny, opisano wyniki badań zależności efektu hydrofobowego (na przykładzie oddziałujących dwóch czasteczek metanu w wodzie) od temperatury. Autor traktuje tę pracę tylko jako wstęp do dalszych, szerszych badań.

Moje ogólne wrażenie jest bardzo dobre, choć na dnie serca recenzenta, które nawet recenzent posiada, tli się iskierka rezerwy, o której za chwilę (z powodu tego, że serce niejedno widziało). Dorobek Kandydata jest jego wkładem w osiągnięcia kolektywne, dorobek ten ma zdecydowanie „nachylenie” obliczeniowe. Jest on twórczy, i w przypadku publikacji habilitacyjnych - twórczy w sensie kreatywnego modelowania złożonego, ważnego i nierozwiązanego dotąd problemu. Publikacje p.dra Mariusza Makowskiego są cytowane w literaturze prawie 500 razy, a ich łączny impact factor jest równy 150. To są bardzo duże liczby, jak na kandydata do habilitacji. Pan dr Makowski jest bardzo intensywnie pracującym naukowcem, pracującym w zespołach i niewątpliwie w takich zespołach bardzo przydatnym w rozwiązywaniu problemów naukowych. Dokonany przez niego opis, także publikacje habilitacyjne robią bardzo dobre wrażenie. Ich sukces jest mierzony zawsze możliwością dopasowania sumy założonych efektów do wyników dynamiki molekularnej w polu siłowym AMBER. Jak na razie Autor nie zdążył jeszcze swojego modelu zastosować do problemu zwijania białek, a byłoby to przecież jakże wymownym ukoronowaniem podejścia „physics based”.

Zasadnicze pytanie dotyczy tego, czy p.dr Mariusz Makowski ma cechy lidera naukowego. Jeszcze niedawno na takie pytania mógł odpowiedzieć wynik kolokwium habilitacyjnego. Teraz, w takiej sytuacji, w zasadzie jedynymi miejscami czerpania informacji są oświadczenia współautorów (akurat w tym przypadku sformułowane

rzetelnie), wywiad środowiskowy (w tym przypadku bardzo pozytywny) i zaproszenie do wygłoszenia referatu. *Pozwalam sobie powtórzyć już zasygnalizowaną wcześniej opinię: zwyczajem polskich uczelni w sytuacji nowej procedury habilitacyjnej powinny być seminaria umożliwiające naukowy kontakt habilitanta z recenzentem(ami).* Akurat w rozpatrywanym tutaj przypadku nie jest to absolutnie niezbędne, ale habilitacje mogą być w przyszłości bardzo różne.

Konkludując: przedstawioną rozprawę, także cały dorobek Kandydata, uważam za bardzo dobre i wnoszę o dopuszczenie p.dra Mariusza Makowskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Lucjan Piela