



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Ewa Gudowska-Nowak  
Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego  
ul. S. Łojasiewicza 11  
30-048 Kraków

Kraków, 6.06.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Agaty  
Wawrzekiewicz-Jałowieckiej.**

Rozprawa doktorska zatytułowana *Studia teoretyczne i symulacje nad kanałowym transportem jonów potasu przez błony biologiczne* została wykonana w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów Politechniki Śląskiej, pod opieką promotorską pana profesora dr hab. Zbigniewa Grzywny z Wydziału Chemicznego PŚ.

Rozprawa składa się z 6 rozdziałów, w tym wstępu omawiającego elektrofizjologię i modele kanałów potasowych oraz przedstawiającego techniki doświadczalne (patch clamp) stosowane powszechnie w analizie przewodności biokanałów, trzech rozdziałów przedstawiających wyniki badań własnych i symulacji numerycznych Autorki, podsumowania wraz z uzupełnieniami i przedstawieniem perspektywy dalszych badań oraz obszernej bibliografii zawierającej około 140 pozycji. W rozprawie umieszczono także w charakterze dodatków - wykaz osiągnięć naukowych pani Wawrzekiewicz-Jałowieckiej oraz informację na temat dodatkowych źródeł finansowania projektu badawczego będącego przedmiotem rozprawy.

Cele pracy, sformułowane w Rozdziale 2 odnoszą się do obecnego stanu wiedzy o budowie i właściwościach dwóch podstawowych modeli biologicznych kanałów potasowych, t.j. kanałów BK i Kv i dotyczą kinetyki procesu przełączania się kanału pomiędzy stanami otwarcia i zamknięcia oraz wpływu czynników zewnętrznych (np. drgań membrany, temperatury, obrotów łańcuchów bocznych aminokwasów i mechanicznej podatności białka kanałowego do odkształceń) na konformację bramki i aktywność kanału. Autorka

postawiła sobie przy tym za zadanie wytypowanie prawdopodobnych scenariuszy aktywacji oraz, po zaproponowaniu prostych modeli stochastycznych - ich weryfikację poprzez symulacje numeryczne kinetyki w ujęciu jednowymiarowego błędzenia przypadkowego lub w formie dyfuzji stochastycznej - z użyciem równania Langevina z fenomenologicznym, efektywnym potencjałem dla kompleksowej zmiennej (współrzędnej) reakcji.

W Rozdziale 3.1.a omówione są szczegółowo dwa modele błędzenia przypadkowego w przestrzeni stanów współrzędnej reakcji opisującej stan konformacyjny bramki aktywacyjnej kanału. Liczba dostępnych stanów w przestrzeni dyfuzyjnej jest przy tym ograniczona położeniem dwóch synchronicznie ruchomych odbijających granic reprezentujących zmienną w czasie grubość błony komórkowej. Prawdopodobieństwa skoku (zmiany) współrzędnej reakcji w kierunku stanów otwarcia bądź zamknięcia kanału wyrażone jest przez zmianę wartości potencjału pomiędzy stanami konformacyjnymi bramki. Przy jednoczesnym założeniu rozdzielania skal czasowych ruchu błony oraz kinetyki przełączania bramki kanału pomiędzy stanami otwarcia i zamknięcia, model taki pozwala na wykonanie prostych symulacji odpowiedniego dwustanowego procesu Markowa i dopasowanie jego parametrów do obserwowanych w doświadczeniu prawdopodobieństw otwarcia, rejestrowanych dla różnych wartości napięcia aktywującego. Oryginalnym wynikiem tej części pracy jest odtworzenie dla obydwu modeli M1, M2 długozasięgowych korelacji czasowych (ze współczynnikiem Hursta  $0.5 < H < 1$ ) i wykazanie potęgowego prawa rozkładu czasów pobytu w stanie zamkniętym (dla modelu M1).

Niemniej interesujące są badania modelu dynamiki Langevina w potencjale logarytmicznym (sekcja 3.1.b). Model cząstki Brownowskiej poruszającej się w takim potencjale jest paradygmatycznym opisem dyfuzji zimnych atomów w sieciach optycznych, procesów kondensacji i denaturacji DNA. Konsekwencją przyjętego opisu jest wówczas pojawienie się transportu subdyfuzyjnego i łamanie ergodyczności. W tym sensie wyniki badań przedstawionych w pracy można byłoby uznać za predyktywne. Doktorantka rozszerza jednak proponowany mechanizm dyfuzji o dodatkowy ruch granic usytuowanych w minimach potencjału współrzędnej reakcji. W tej wersji model pozwala opisać zachowanie kanału dla różnych wartości potencjału błonowego oraz poprawnie odtworzyć zależność obserwowanych średnich czasów otwarcia kanału od prawdopodobieństwa otwarcia i uzyskać efekt długozasięgowych korelacji ze współczynnikiem Hursta niezależnym od podanego napięcia aktywacji kanału.

Z kolei w rozdziale 3.2. omówione są wyniki badań prawdopodobnych scenariuszy aktywacji napięciowej przy zmianie geometrii kanału, w tym ruchu helis S4-S5 i S6. Na podstawie otrzymanych struktur poru podczas polaryzacji i depolaryzacji możliwe było także oszacowanie znormalizowanych prze-

wodności kanału przy różnym napięciu. Eksperymentalne wyniki, do których odnoszono obliczenia modelowe zostały pozyskane z literatury przedmiotowej (badania nad przewodnością kanałów Kv 1.2). Symulacja zaproponowanych modeli pozwoliła rozszerzyć opis literaturowy, w którym podawano zakres ruchu segmentu S4 o dodatkowe zmiany położenia i orientacji helis S4-S5 i S6. Eleganckim dopełnieniem tej części analizy jest model fluktuacji bramki aktywacyjnej kanału Kv 1.2 przy ustalonym potencjale błonowym, opisany w rozdziale 3.2.b. Godnym podkreślenia jest fakt, że model ten konfrontowany był z danymi doświadczalnymi uzyskanymi przez Doktorantkę. Finalnie, efektem projektu opisanego w tym rozdziale jest wskazanie, w jaki sposób kształt poru uwarunkowany stanem aktywacji kanału może wpływać na wartość prawdopodobieństwa otwarcia.

Badanie wpływu czynników fizykochemicznych, w tym temperatury i ciśnienia na aktywność kanału BK zostało przeanalizowane w rozdziale 3.3. Pani Wawrzkiwicz-Jałowiecka przytacza w nim na wstępie uzyskane dane doświadczalne, które poddaje analizie termodynamicznej i statystycznej. Rozważając wpływ temperatury na zachowanie kanału Doktorantka wskazuje na możliwość aktywowania bogatszych energetycznie stanów, ale także zmiany morfologii błony i zmiany grubości dwuwarstwy podczas przemiany fazy żelowej w ciekłokrystaliczną. Odnotowuje także wzrost aktywności kanałów BK przy rosnącym naprężeniu membrany wywołanym podciśnieniem.

Rozdział 4, stanowiący podsumowanie wyników projektu doktorskiego formułuje jednocześnie dalsze perspektywy badań. Autorka zwraca uwagę na niepoznane jeszcze dostatecznie mechanizmy kontroli aktywności kanałów biologicznych, w tym np. efektu spontanicznej utraty cząsteczek wody z wnętrza kanałów o hydrofobowej powierzchni czy też wpływu morfologii błony na funkcjonowanie kanału i efekt bramkowania.

Praca jest przejrzysto napisana, z dużą dbałością o język i starannie dobrane pozycje literaturowe.

Poniżej przedstawiam w kolejności kilka uwag krytycznych:

1. Wyniki obliczeń numerycznych zaprezentowanych w oparciu o modele M1 i M2 i omówione w sekcji 3.1a wskazują na pojawienie się długozasięgowych korelacji w szeregach czasowych reprezentujących wartości prądów otwarcia/zamknięcia kanału. Autorka nie dyskutuje, w jakim stopniu obserwowany efekt jest wynikiem nałożenia na proces dyfuzyjny w liniowym potencjale dodatkowego ruchu barier. Bardzo podobny proces dyfuzyjny, ale ze stałą pozycją odbijającej bariery badany był analitycznie i numerycznie w kilku pracach Goychuka i Hänggiego (vide pozycje 53,54 i 68 w spisie literaturowym). Wydaje się, że porównanie i dyskusja wyników obydwu modeli M1,M2 z przewidywaniami wspo-

mnianych prac nie powinna nastroczać trudności, a mogłaby stanowić interesujący głos w dyskusji nad minimalnym modelem kinetycznym poprawnie odtwarzającym ciężkoogonową statystykę czasów pobytu w stanie zamkniętym i eksponencjalną statystykę czasów otwarcia.

2. Analogicznie można byłoby wyznaczyć z analizy numerycznej badanych szeregów (bądź eksperymentalnych, bądź symulacyjnych) widmo mocy dla sygnału prądowego. Jego charakterystyka (tzw. indeks spektralny) mogłaby wówczas wskazać na istnienie pamięci długozasiegowej. Ponieważ analiza DFA (*Detrended Fluctuation Analysis*) i analiza widma mocy pozwalają niezależnie dokonać oszacowania eksponenty Hursta  $H$  dla ułamkowego ruchu Browna ( $H = (\beta - 1)/2$ , gdzie  $\beta$  określa charakterystykę widma mocy sygnału  $S(\nu) \propto \nu^{-\beta}$ ), obliczenia takie byłyby dodatkowym testem modelu.
3. W poszukiwaniu algebraicznego zaniku funkcji gęstości prawdopodobieństwa czasów zamknięcia  $f_c(t)$  korzystniejszą metodą niż wyznaczenie histogramowe  $f_c(t)$  jest wykreślenie w skali logarytmicznej funkcji przeżywalności ( $\Phi(t > \tau)$ ), t.j. skorzystanie z relacji  $f_c(t) = -\frac{d\Phi_c(t)}{dt}$ . Funkcja przeżywalności lepiej wyznacza interesujące w tym przypadku - ogony rozkładów potęgowych.
4. W kilku przypadkach (np. Rys. 22, 27) prezentacji wyników doświadczalnych opisy ilustracji oraz analiza dopasowań modelowych nie odnoszą się do błędów statystycznych. To pewne uchybienie, ponieważ finalnie chcielibyśmy oszacować, jak dobrym modelem teoretycznym dysponujemy
5. W tekście wielokrotnie pojawia się symbol  $k$  oznaczający stałą kinetyczną reakcji (np. otwarcia bramki). Oznaczenie to koliduje ze stałą Boltzmanna, której brakuje indeksu  $B$ .

Niezależnie od powyższych uwag nieumniejszających wagi przedstawionych wyników stwierdzam, że materiał zaprezentowany w rozprawie jest bardzo bogaty i w mojej ocenie - przekracza zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim.

Pani Wawrzkiwicz-Jałowicka wykazała się dużą oryginalnością w zaproponowaniu prostych modeli dynamiki stochastycznej i scenariuszy bramkowania kanałów w oparciu o rozległą wiedzę biofizyczną i systematyczny plan badań, uwzględniający także prowadzenie doświadczeń. Odchodząc od szczegółowego opisu metodami Dynamiki Molekularnej wspartej badaniami strukturalnymi i krystalograficznymi, skupiła się na badaniach mezoskopowych, w których zamiast pojedynczych atomów obiektu analizowanych w

trakcie ruchów termicznych i wzajemnych oddziaływań, wyróżnione zespoły elementów kanału opisywane są pod kątem własności mechanicznych i elektrostatycznych. Za niezwykle cenne uważam wyniki odnoszące się do roli lokalnych zmian w grubości błony na zachowanie bramki aktywacyjnej oraz zaproponowanie i przebadanie ruchów potencjalnego czujnika napięcia (domeny S4) w kanale Kv. Kompleksowe podejście do zagadnienia oraz zaplanowanie i wykonanie szeregu eksperymentów zasługuje na szczególną uwagę; dlatego z całym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie pani Wawrzkievicz-Jałowickiej do dalszych etapów przewodu oraz o **wyróżnienie** przedłożonej rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab Ewa Gudowska-Nowak