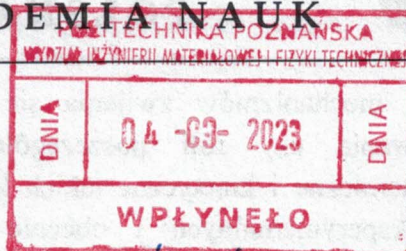




prof. dr hab. Małgorzata Lekka
Zakład Badań Mikroukładów Biofizycznych
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
Radzikowskiego 15,
31-342 Kraków, PL.



Kraków, 26.08.2023

Opinia o pracy doktorskiej

Autor: Jakub Dąbrowski

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Ocena roli wiązań wodorowych w stabilności α -helikalnych peptydów poprzez symulacje dynamiki molekularnej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Jakuba Dąbrowskiego została wykonana pod kierunkiem **dr hab. Arkadiusza Ptaka** na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej.

Struktura przestrzenna i właściwości termodynamiczne i kinetyczne posiadają fundamentalne znaczenie dla wielu dziedzin współczesnej biologii i medycyny, w szczególności dla racjonalnego projektowania nowych leków celujących w specyficzne cechy mechanizmów komórkowych zmieniających się w czasie powstawania i trwania różnorodnych chorób. Rozwój metod eksperymentalnych prowadzi do ogromnych baz danych zawierających opis i strukturę wielu układów białkowych i tych klasycznych i tych do tej pory nieosiągalnych takich jak białka błonowe czy duże kompleksy białkowe. Pomimo to, wciąż wg. np. pracy Burley et al. Nuclei Acids Res. z 2019, istnieje ogromna grupa około 5000 rodzin białkowych, która nie posiada rozpoznanego przynajmniej jednego reprezentanta swojej struktury przestrzennej. W takich sytuacjach modelowanie jest skuteczną metodą do uzyskania takiej struktury, przynajmniej dla części niezbadanych do tej pory białek. Stałym wyzwaniem modelowania jest strategia wydajnego próbkowania przestrzeni konformacyjnej realizowane zwykle w różnych wariantach dynamiki molekularnej lub dynamiki Monte Carlo, często w schemacie wymiany replik zwiększającej efektywność algorytmu. Postęp w przewidywaniu struktur przestrzennych wynika z integracji informacji z różnych obszarów badań takich jak sekwencjonowanie metagenomów czy analizy koewolucyjnej wykonywanych coraz częściej z wykorzystaniem technik uczenia maszynowego i metod przewidywania struktur całych lub fragmentów białek *de novo*. Kluczowanymi pytaniami są te dotyczące zarówno struktury białek jak i te dotyczące mechanizmów oddziaływania, selektywnego rozpoznawania czy określenia czynników wpływających na procesy związane w mechanizmem rozpoznawania molekularnego. Z upływem czasu wyznaczanie trójwymiarowych struktur pojedynczych cząsteczek białka, eksperymentalne i obliczeniowe, stanowi tylko niewielką część biologii strukturalnej. Potrzeba również precyzyjnej wiedzy na



w temat mechanizmów zwijania się białek, dynamiki cząsteczek i ich wzajemnego oddziaływania czy roli poszczególnych typów wiązań. Struktury i właściwości termodynamiczne i kinetyczne takich kompleksów są znacznie większym wyzwaniem dla badań eksperymentalnych i obecnie stają się ważnym kierunkiem rozwoju metod modelowania obliczeniowego. Rozprawa doktorska mgr Jakuba Dąbrowskiego wpisuje się znakomicie w ten trend. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie zagadnienia dotyczącego stabilności α -helikalnych peptydów uwzględniających obecność wiązań wodorowych. Tytuł pracy „Ocena roli wiązań wodorowych w stabilności α -helikalnych peptydów poprzez symulacje dynamiki molekularnej”, w pełni odzwierciedla jej zawartość, równocześnie wskazując, że poruszona tematyka badawcza jest bardzo aktualna, umiejscowiona w domenie nauk interdyscyplinarnych o dużym znaczeniu praktycznym.

Rozprawa doktorska jest napisana w miarę przejrzystym i jasnym językiem umożliwiającym osobie nie posiadającej głębokiej wiedzy zrozumienie tematyki i znaczenia prowadzonych obliczeń. Fragmenty, które są nieco zagmatwane w opisie, generują pytania w niniejszej recenzji. Rozprawa doktorska została ona podzielona na siedem rozdziałów. Pierwsze trzy rozdziały rozprawy wprowadzają czytelnika w istotę tego typu badań, przedstawiając aktualny stan wiedzy opisujący wyniki uzyskane do tej pory przez inne grupy badawcze oraz podstawy teoretyczne stosowanych metod obliczeniowych. Celem rozprawy doktorskiej, zdefiniowanym w Rozdziale 1, była analiza stabilności struktury α -helikalnych rozciąganych dwóch polipeptydów (tj. dekaalaniny (10 identycznych aminokwasów alaniny) raz peptydu AAKA(AEAAKA)₅AC) ze szczególnym uwzględnieniem roli wiązań wodorowych w stabilizacji takiej struktury oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych i energetycznych pojedynczego wiązania wodorowego (energia aktywacji wraz z udziałami entalpii i entropii). Zasadność obliczeń i wybór peptydów jest bardzo dobrze umotywowana i umiejscowiona na tle obecnego stanu wiedzy.

Rozdział 2 zawiera dobrze napisane wprowadzenie w zagadnienia związane ściśle z tematyką pracy. Przedstawiony podział wielopoziomowej struktury białek uzupełniłabym ryciną (choćby wziętą z literatury z odpowiednim odnośnikiem i pozwoleniami) umożliwiającą czytelnikowi spoza dziedziny wyobrazić sobie złożoność problemu. Część dotycząca budowy białek i peptydów została uzupełniona o opis metod badania ich struktur od strony eksperymentalnej, wraz z opisem eksperymentalnym i teoretycznym wymuszonego siłą zrywania wiązań. Te sekcje rozprawy wydzieliłabym jako osobną część, czytelnik spodziewa się paru słów na temat metod obliczeniowych, które są *de facto* opisane dokładnie później tj. w Rozdziale 3. W opisie modeli wymuszonego rozrywania kompleksów molekularnych (czy pojedynczych wiązań) brakuje mi dokładnego opisu czym modele BE (Bell-Evans), DHS (Dudko-Hummer-Szabo) oraz FNDY (Fridl-Noy-De Yoreo) różnią się od siebie.

Rozdział 3 wprowadza nas w świat metod obliczeniowych, podając w jasny sposób podstawowe równania oraz zasady obliczeń mechaniki molekularnej, dynamiki molekularnej oraz sterowanej dynamiki molekularnej. Rozdziałowi temu towarzyszy część poświęcona identyfikacji i klasyfikacji rodzaju struktury drugorzędowej peptydów i białek. Mapa



Ramachandrana ilustruje gdzie leżą struktury α -helisy (lewoskrętnej, prawoskrętnej i enigmatycznej dla czytelnika nieobebranego dokładnie z tematyka rozprawy doktorskiej helisy 3-10) oraz harmonijki β . Dołożyłabym graficzne przedstawienie tych struktur do tej ryciny. W tej części brakuje mi informacji jak na podstawie wartości kątów torsyjnych klasyfikuje się konformacje łańcuchów peptydowych (ta informacja znajduje się ze 20 stron wcześniej). Tu powstaje pytanie jak zaznacza się na takiej mapie strukturę typu skręt? Kąty torsyjne są bardzo podobne do kątów torsyjnych co do wartości, ale jak wspomniał autor rozprawy w rzeczywistości wartości kątów torsyjnych leżą w dużych zakresach, co powoduje, że struktura typu skręt może przekrywać się ze strukturą prawoskrętnej helisy. Na tym etapie pracy nie ma słowa o tym aspekcie rozróżnialności.

W Rozdziale 4, autor rozprawy doktorskiej opisuje odpowiednio dokładnie modele peptydów, wybranych do badań czyli dekaalaninę oraz peptyd złożony z sekwencji aminokwasów AAKA(AEAAKA)₅AC. Przedstawiono przy jakich założeniach zostały stworzone oraz przedstawiono ich układ geometryczny. Nie do końca jest jasne, dlaczego zastosowano podgrzewanie i wygrzewanie modelu, choć to staje się jasne dopiero po przeczytaniu legend rycin 4.1 do 4.2. Podczas analizy geometrii układu wyznaczono kąty torsyjne oraz odległości między atomami tworzącymi wiązanie wodorowe (które są wykorzystywane do rozróżnienia konformacji skrętu od helisy o czym czytelnik dowiaduje się dużo później w rozdziałach zawierających wyniki obliczeń). Będąc osobą pracującą raczej w obszarze eksperymentalnym niż teoretycznym nasuwa mi się pytanie – na ile poprawne jest stwierdzenie, że średnie wartości kątów torsyjnych wynoszące $-67.8^\circ \pm 9.6^\circ$ oraz $-39.4^\circ \pm 8.6^\circ$ są zbliżone do wartości predefiniowanych -57° oraz -47° ? W rozdziale tym znajduje się rysunek 4.5 ilustrujący identyfikację struktury drugorzędowej. Brakuje mi komentarza co tak naprawdę on przedstawia. Prawdopodobieństwo, z jakim została wykryta struktura α -helisy? Układ zero (jest) - jedynkowy (nie ma)? Ciekawi mnie jaki jest rozrzut parametru helikalności dla każdego badanego aminokwasu łańcucha dekaalaniny tj., ALA1 do ALA10. W peptydzie AAKA(AEAAKA)₅AC oprócz alaniny znajdujemy trzy odmienne typy aminokwasów tj. lizynę, kwas glutaminowy, oraz cysteinę. Analiza kątów torsyjnych oraz wartości odległości wiązania wodorowego raczej nie wykazuje zmian związanych z typem aminokwasu użytego do utworzenia tego peptydu oraz długością peptydu. Ciekawe dla mnie jest porównanie modelowych peptydów z danymi uzyskanymi dla fragmentów białek ludzkich z znanej struktury wyznaczonej krystalograficznie, gdyż uzyskuje się informację o poprawności uzyskanym modelowych struktur. Struktury referencyjne o których wiemy, że posiadają strukturę helikalną posiadają kąty torsyjne na poziomie $-(62-64)^\circ$ oraz $-(39-40)^\circ$. Jaki jest sens porównywania tych wyników do wartości -57° i odpowiednio -47° ? Skąd biorą się te ostatnie wartości. W tym rozdziale, w kontekście uzyskanych wyników, nie jest do końca jasny wybór symulacji kontrolnych, w szczególności tych związanych z wymuszonym rozciąganiem peptydów. Dlaczego wykonano symulacje kontrolne tylko dla AAKA(AEAAKA)₅AC a nie dla dekaalaniny? Wydaje się, że typ model wody powinna mieć większy wpływ na helikalność krótszego peptydu. Nie bardzo wiadomo, jak wyniki średniej siły zrywającej wiązanie wodorowe oraz wielkości błędu standardowego tej siły są



symulacjami kontrolnymi do części związanej z wyznaczeniem kątów torsyjnych i długości wiązania wodorowego. Też nasuwa się pytanie dlaczego nie wykonano takiej symulacji dla dekaalaniny. Zresztą kwestię rozciągania peptydów opisałabym w osobnym rozdziale (i nie nazwałabym symulacjami kontrolnymi) opisujących właściwości termodynamiczne i kinetyczne.

Rozdział 5 jest chyba najgorzej zaprezentowany z uwagi na różnorodność wyników. Zawiera on rezultaty dwóch typów symulacji – metodą dynamiki molekularnej oraz metodą sterowanej dynamiki molekularnej, zarówno dla modelu dekaalaniny z pełnym opisem elektrostatycznym wiązań wodorowych, jak i dla modelu ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi. Dla symetrii powstaje pytanie dlaczego dla odmiany nie zawarto wyników (przeprowadzono symulacji dla AAKA(AEAAKA)₅AC)? Porównanie wpływu sieci wodorowych dla obu peptydów byłoby interesujące. Skupiając się na wynikach dotyczących dekaalaniny. Rysunek 5.2 przedstawia zmiany długości wszystkich sześciu wiązań w funkcji czasu trwania symulacji wygrzewającej. Tu nasuwa się pytanie o przyczyny "rozpadu" wiązania wodorowego ALA6-ALA10 w zakresie dłuższych czasów symulacji (większe drgania termiczne?, mała stabilność temperatury?). Tworzenie się chwilowego wiązania wodorowego pomiędzy atomem w peptydzie a cząsteczką wody (czerwona linia na rysunku 5.5) powstaje mniej więcej w połowie zakresu dużej odległości pomiędzy donorem a akceptorem, więc nie wydaje się być wytłumaczeniem wzrostu tej odległości.

Porównanie symulacji dynamiki molekularnej dekaalaniny z modelem zredukowanych wiązań wodorowych z symulacją dynamiki molekularnej dekaalaniny bez zredukowanych wiązań wodorowych prowadzi w swoim zamierzeniu do oceny roli wiązań wodorowych w stabilności struktury dekaalaniny. Uzyskana wyższa średnia energia całkowita układu sugeruje, że symulowany układ z modelem bez wiązań wodorowych powinien być mniej stabilny niż model z wiązaniami wodorowymi, co też zostało wykazane przez Doktoranta, przy udziale analizy RMSD (odchylenie średniej kwadratowej pozycji atomów) szkieletu peptydu. Wzrost tego parametru wskazuje na rozwijanie się struktury białkowej czy peptydowej. Rozwijanie jest też widoczne jako wzrost odległości donor-akceptor (np. Rys. 5.9). Wyniki te pokazują, że bez obecności wiązań wodorowych nie jest możliwe istnienie stabilnej struktury α -helikalnej w dekaalaninie. Czy także w peptydzie AAKA(AEAAKA)₅AC)? Jakie są przesłanki, żeby traktować te peptydy tożsamo?

Modelowe rozciąganie dekaalaniny o minimum 2 Å dostarcza ciekawych wyników, pokazujących jak wiązania wodorowe wpływają na właściwości mechaniczne peptydu (wyniki są przedstawione na rysunku 5.15). Widoczna jest zależność stałej sprężystości peptydu od prędkości rozciągania oraz jej mniejsza wartość dla peptydu w braku obecności wiązań wodorowych. W zasadzie ten wynik potwierdza tezę rozprawy doktorskiej tj. obecność wiązań wodorowych stabilizuje strukturę dekaalaniny. w tym miejscu powstaje pewien niedosyt z powodu braku podobnych wyników dla AAKA(AEAAKA)₅AC. Wracając do danych, jaką funkcją ekstrapolowano dane dla dekaalaniny aby uzyskać wartości dla peptydu na którego nie działa siła zewnętrzna? Nie do końca rozumiem zastosowanie tutaj regresji liniowej (przerwana linia na rysunku 5.15 nie wydaje się być liniowa).



Rozdział 6 przedstawia wyniki symulacji metodą sterowanej dynamiki molekularnej dla modelu α -helikalnego peptydu złożonego z sekwencji aminokwasów AAKA(AEAAKA)₅AC. Każda z serii symulacji wykonana została dla szeregu wartości prędkości rozciągania, następnie z wyznaczonych danych wyznaczono średnią siłę zerwania wiązania wodorowego. Dla tych danych zastosowano modele teoretyczne termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału, aby uzyskać parametry termodynamiczne pojedynczego wiązania wodorowego. W tym rozdziale skupiono się na dłuższym peptydzie – dlaczego? Rozciąganie jest prowadzone tutaj do dużych wartości tj. do 130 Å (dużo większej niż rozciąganie dekaalaniny opisanego w rozdziale 5), dlatego zaskakuje mnie zdanie "Podobnie jak dla dekaalaniny, peptyd rozwija się od końców molekuly, przy czym warto zauważyć, że dla wysokich prędkości rozwijanie zaczyna się od końca molekuly, do którego przyłożony został potencjał SMD". Mamy do czynienia z dwoma typami symulacji, które przekładają się na rozciąganie przy małej sile (2 Å, dekaalanina) oraz dużej sile (130 Å, AAKA(AEAAKA)₅AC). Skąd wiemy, że dekaalanina rozciągana z dużą siłą będzie zachowywać się podobnie jak w przypadku zastosowania małej siły rozciągającej. Ciekawym i jednocześnie oryginalnym dla mnie wynikiem jest zastosowanie trzech klasycznych modeli opisujących zrywanie pojedynczego wiązania (pojedynczego kompleksu) w pomiarach AFM oraz uzyskanie jakościowo podobnych zakresów odległości (pomiędzy minimum jamy potencjału a maksimum bariery energetycznej) oraz stałej szybkości dysocjacji do tych obserwowanych w eksperymentach rozciągających białka czy peptydy realizowanych za pomocą AFM. Jak słusznie zauważył Doktorant obecność dwóch (i więcej) zakresów zmiany siły względem szybkości obciążania w przypadku wiązania wodorowego nie ma sensu. Ale jeśli rozważany dekaalaninę jak peptyd 10 aminokwasów to dwuzakresowa krzywa może wskazywać na powstanie chwilowych wiązań wodorowych, co wskazywałoby na kompleksowe rozciąganie takiego peptydu (tj. rozciągane są co najmniej dwa aminokwasy równocześnie). Niemniej jednak pokusiłabym się o jakieś wytłumaczenie takiego stanu rzeczy. Czy jest to związane np. z zastosowaną procedurą obliczeniową czy też z faktem, że rozciągamy peptyd a nie pojedyncze wiązanie wodorowe. Zależność siły potrzebnej na rozciągnięcie łańcucha peptydowego (w trakcie tego procesu są zrywane wiązania wodorowe) była obserwowana w pomiarach AFM. Taka zależność może być ściśle związana ze strukturą peptydu i zrywaniem nakładających się wiązań wodorowych.

Całość pracy jest podsumowana w osobnym Rozdziale 7 *Podsumowanie i wnioski*. Zakończenie pracy obejmuje alfabetyczny spis bibliograficzny świadczący o zaangażowaniu Doktoranta w tematykę pracy doktorskiej oraz spis ilustracji i tabel oraz wykaz osiągnięć naukowych. Pomimo licznych pytań i uwag związanych, w mojej ocenie przedstawione informacje są poprawne i świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta umożliwiającym samodzielne sprecyzowanie i uzasadnienie celów pracy doktorskiej oraz zaplanowanie ich realizacji. Uwagi i pytania, które nasunęły mi się podczas czytania pracy opisałam i zadałam we wcześniejszych fragmentach mojej recenzji. Praca jest zredagowana w starannie, choć znajdują się w niej literówki a także nieścisłe sformułowania lub



sformułowania żargonowe typu „stała siłowa”. W kontekście prezentowanej pracy lepszy jest termin „stała siły” lub po prostu „stała sprężystości”.

Zauważone nieścisłości, które są nieuniknione w tak obszernej pracy, nie pomniejszają wysokiej wartości merytorycznej oraz mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej. W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Jakuba Dąbrowskiego stanowi nowatorskie podejście do badań wpływu wiązań wodorowych na stabilność łańcuchów peptydowych. Uzyskane wyniki są cenne i ważne dla zrozumienia mechanizmu tego rodzaju oddziaływań na poziomie molekularnym, a co za tym idzie mogą być zastosowane nie tylko do poszukiwania nowych substancji do zastosowań farmakologicznych (i nie tylko), ale także pomagają spojrzeć z innej perspektywy na badania związane z projektowaniem leków. Niezmierna aktualność i duże znaczenie praktyczne uzyskanych wyników podnosi wartość pracy.

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy recenzji stwierdzam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytule naukowym oraz przez normy akademickie i wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Jakuba Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 26.08.2023

Murphy's Law