



Gdańsk, dnia 20.01.2022

## Recenzja rozprawy doktorskiej Pani magister Beaty Szwały-Mendyk pt. „Kinetics and mechanisms of peptide aggregation from molecular dynamics simulations”

Agregacja peptydów i białek jest od paru dziesięcioleci tematem intensywnych badań, przede wszystkim w związku z implikacjami tego procesu w chorobach określanych mianem „konformacyjnych”, do których przykładowo należą choroba Huntingtona, Alzheimer, prionowa oraz fińska amyloidoza rodzinna. Działanie agregatów białkowych, które są nazywane amyloidami polega, w przypadku tych chorób, na uszkodzeniu neuronów. Z drugiej strony kontrolowana agregacja białek jest niezbędna np. krzepnięciu krwi po zranieniu czy też osłaniania oocytów. Pomimo dużego znaczenia i ogromnego wysiłku włożonego w jej badanie, agregacja białek nie została jeszcze dostatecznie poznana. Dopiero ok. 20 lat temu Tycko i współpracownicy zaproponowali, przy użyciu metody magnetycznego rezonansu jądrowego, strukturę amyloidu złożonego z jednostek peptydu  $A\beta_{42}$ . Struktura ta okazała się jednak nieprawidłowa i po paru latach zaproponowano model lepiej zgadzający się z danymi. Ten fakty dają wyobrażenie o ogromnych trudnościach, z jakimi spotykali i spotykają się naukowcy w badaniach agregacji białek nawet jeżeli chodzi o wyznaczenie dość jasno określonej struktury końcowego produktu agregacji. Tymczasem ten końcowy produkt jest stosunkowo najmniej „szkodliwy” dla neuronów; najgroźniejsze są prawdopodobnie oligomery, które perforują ich błonę komórkową, powodując nekrozę całych fragmentów tkanki nerwowej. Struktura tych agregatów jest znacznie bardziej „płynna” i przez to trudna do określenia eksperymentalnie.

Treścią rozprawy doktorskiej p. mgr Beaty Szwały-Mendyk były badania teoretyczne mechanizmów i kinetyki tworzenia oligomerów i agregatów oraz fibryli heptapeptydowego fragmentu białka prionowego Sup35 o sekwencji GNNQQNY, o dalej skrótem GNN. W swoich badaniach używała dwóch modeli gruboziarnistych łańcuchów polipeptydowych: modelu minimalnego, który opracowała w ramach rozprawy doktorskiej oraz bardziej szczegółowego modelu Bereau-Deserno (BD). Użycie modeli gruboziarnistych umożliwia symulacje znacznie większych układów w znacznie dłuższym czasie, w porównaniu z reprezentacją pełnoatomową. Silnikiem symulacji była metoda dynamiki molekularnej Langevina zaimplementowana w pakiecie GROMACS, który umożliwia wprowadzenie różnych modeli i potencjałów zdefiniowanych przez użytkownika. Materiał rozprawy został opublikowany w postaci trzech publikacji, oznaczonych jako P1, P2 i P3, w latach 2020 (P1 i P2) oraz 2021 (P3). Prace te zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych (odpowiednio *Soft Matter*, *Biomolecules* i *J. Phys. Chem. B* a p. mgr Szwała-Mendyk jest ich pierwszą autorką. Prace P1 i P3 dotyczą badań z wykorzystaniem modelu minimalnego, natomiast praca P2 tych przeprowadzonych przy użyciu modelu Bereau-Deserno.

Przedstawiony do recenzji tekst rozprawy składa się ze streszczenia, listy stosowanych skrótów, listy publikacji będących podstawą rozprawy, spisu treści, wprowadzenia (rozdział 1), którego podrozdziałem są cele rozprawy, metodologii (rozdział 2), opisu wyników (rozdział 3), dyskusji (rozdział 4), podsumowania (rozdział 5), oraz dodatku A, zawierającego zestawienie dorobku Kandydatki. Rozprawa jest napisana w języku angielskim z wyjątkiem streszczenia, które podano również w wersji polskiej.

Celem pracy było znalezienie głównych czynników odpowiedzialnych za agregację. Aby go zrealizować, Kandydatka postanowiła odpowiedzieć na następujące pytania: (a) czy agregacja peptydów ma cechy niezależne od rodzaju peptydu? (b) w jakim stopniu za szybkość agregacji jest odpowiedzialny łańcuch główny a w jakim łańcuchy boczne? (c) w jakim stopniu łańcuch główny a w jakim łańcuchy boczne są odpowiedzialne za

rodzaj kinetyki agregacji? Odpowiedzi na pytanie pierwsze Autorka poszukiwała głównie przy użyciu modelu gruboziarnistego a na dwa pozostałe pytania przy użyciu bardziej szczegółowego modelu Berneau-Deserno.

Rozdział składa się z dwóch podrozdziałów. Pierwszy z nich Kandydatka zaczyna od krótkiego omówienia znaczenia agregacji peptydów i białek w biologii i medycynie. Następnie omawia morfologię agregatów białek i peptydów, kinetykę agregacji oraz agregację białka prionowego Sup3 i jego fragmentów, które były obiektem jej badań. Te informacje są podane poprawnie i zwięźle oraz ilustrowane cytataми literaturowymi. Tym niemniej Autorka pominęła sporo zagadnień. W podrozdziale 1.1.1 powinny się, moim zdaniem, znaleźć informacje o agregacji białka tau wraz z peptydami  $A\beta$ . Ostatnio badania teoretyczne nad tymi białkami były prowadzone przez grupę zmarłego niedawno prof. H.A. Scheragi z Cornell University [np. A. Rojas et al., *J. Phys. Chem. B* **122**, 7049-7056 (2018)]. Również trochę miejsca można było poświęcić agregacji amyliny i peptydów gelsolinowych.

Druga część rozdziału 1 (wstępu) jest poświęcona metodzie dynamiki molekularnej oraz bardzo lakonicznemu omówieniu modeli gruboziarnistych. Wydaje się, że metoda dynamiki molekularnej powinna być częścią metodologii (rozdział 2) a druga część rozdziału 1 powinna być poświęcona dokładniejszemu omówieniu modeli gruboziarnistych, zarówno pod względem filozofii tego podejścia, jak i przykładów. Autorka pominęła wiele modeli, które odniosły spore sukcesy w przewidywaniu struktur i badaniu dynamiki i termodynamiki zwijania białek i ich kompleksów, np. AWSEM, CABS, OPEP, ROSETTA, UNRES. W przeciwieństwie do wymienionych, modele MARTINI, SIRAH i BD wymienione przez Kandydatkę nie mają zdolności predykcyjnych, jakkolwiek konstrukcja modelu MARTINI, umożliwiająca automatyczne „ugruboziarnistwienie” (coarse-graining) dowolnego układu lub jego części powoduje, że jest ono najpowszechniej używanym gruboziarnistym polem siłowym. Należało przynajmniej napisać, że prototypem pól gruboziarnistych są potencjały średniej siły badanych układów otrzymane przez uśrednienie czynnika boltzmannowskiego względem stopni swobody nieuwzględnionych w modelu.

Metoda dynamiki molekularnej jest, moim zdaniem, omówiona zbyt ogólnikowo. Z diagramu 1.2 co prawda wynika, że należy całą trajektorię podzielić na kroki czasowe i dla każdego z nich rozwiązać równania ruchu ale to jest zdecydowanie za mało. Jak zawsze, diabeł tkwi w szczegółach i jeżeli nie powie się w tym miejscu o algorytmach z rodziny algorytmów Verleta (do których należy algorytm żabiego skoku stosowany w symulacjach przeprowadzonych przez Kandydatkę) to czytelnik nieznający tej metody, natomiast znający drugie prawo Newtona nie dowie się niczego istotnego. Na pewno należałoby w tym miejscu omówić termostatowanie, barostatowanie, dynamikę Langevina oraz periodyczne warunki brzegowe.

Dwa podrozdziały rozdziału 2 są kolejno poświęcone stosowanym metodom symulacji i ich analizie. W podrozdziale 2.1 Kandydatka omawia kolejno opracowany przez siebie minimalny model gruboziarnisty oraz model Bereau-Desero, jak również protokoły symulacji dynamiki molekularnej z użyciem tych modeli. W modelu minimalnym (sekcja 2.1.1) łańcuch oligo/poli-peptydowy jest reprezentowany przez sekwencję atomów węgla  $\alpha$  który, dzięki odpowiednio zaprojektowanemu potencjałom lokalnym, pozostaje w konformacji bliskiej rozciągniętej. Centrami oddziaływań są atomy  $C^\alpha$ , które oddziałują dobrze znanym potencjałem 12-6 (inaczej Lennarda-Jonesa). Model minimalny zawiera więc efektywnie dwa parametry, od których zależy zachowanie układu: stałą siłową cosinusa kąta między kolejnymi atomami  $C^\alpha$  oraz głębokość studni potencjału Lennarda-Jonesa. Nie ma w nim zakodowanej chiralności reszt aminokwasowych. Opis modelu minimalnego jest wyczerpujący i zwięzły. Opis modelu Bereau-Desero przedstawiony w sekcji 2.1.2 jest natomiast zbyt powierzchowny. Autorka wspomina np. o specyficznym „wyznierzowanym” przez jego autorów potencjale wiązań wodorowych, natomiast nie wspomina o co najmniej równie istotnym wkładzie oddziaływania dipoli grup peptydowych.

Podrozdział 2.2 omawia opracowane przez Kandydatkę metody analizy agregatów białkowych. Na szczególną uwagę zasługują opracowane przez nią miary skręcenia agregatu oraz chiralności fibryli.

Pod względem merytorycznym wyniki przedstawione w pracy zostały już ocenione przez recenzentów publikacji, poniżej więc podaję najważniejsze, moim zdaniem, osiągnięcia Kandydatki. Ogólnie, jako na praktyku symulacji gruboziarnistych, bardzo duże wrażenie zrobił na mnie ogrom przeprowadzonych badań oraz staranność i szczegółowość analizy wyników, co wymagało na pewno ogromnej pracy.

1. Opracowanie unikalnego minimalnego modelu gruboziarnistego, który doskonale oddaje podstawowe cechy agregacji białek.
2. Opracowanie dwóch deskryptorów: skrętu i helikalności fibryli, bardzo użytecznych w analizie struktury agregatów białkowych oraz jej zmienności w czasie.

3. Pokazanie, przy użyciu modelu minimalnego, że za tworzenie fibryli odpowiada przede wszystkim sztywność łańcucha peptydowego oraz silne, nawet niespecyficzne, oddziaływania między jego jednostkami oraz, że te parametry mają duży wpływ na mechanizm [nukleacyjny lub „w dół stoku” (downhill)] i kinetykę agregacji.
4. Pokazanie, przy użyciu modelu minimalnego, że chiralność łańcucha peptydowego nie jest warunkiem koniecznym występowania skrętu fibryli. W symulacjach z użyciem niechiralnego modelu minimalnego występują przejścia między strukturami o prawym lub lewym skręcie.
5. Pokazanie, że mechanizm agregacji zmienia się, w miarę wzrostu stężenia z nukleacyjnego na mechanizm „w dół stoku” (downhill).
6. Pokazanie, przy użyciu modelu Bernau-Deserno, że struktura fibryli tworzy się dopiero po osiągnięciu krytycznego rozmiaru agregatu.
7. Pokazanie, przy użyciu modelu Bernau-Deserno, że oddziaływania między aromatycznymi łańcuchami bocznymi są istotne w tworzeniu i stabilizacji hydrofobowego rdzenia fibryli.

Wymienione osiągnięcia robią wrażenie. Najważniejsze jest to, że Autorka znalazła ogólne cechy agregacji a nie tylko takie, które występują w konkretnych układach. Dlatego jej wyniki mogą stać się odniesieniem dla kolejnych, już bardziej szczegółowych badań agregacji białek oraz czynników na nią wpływających oraz dla przewidywania, czy dany peptyd lub białko są potencjalnie amyloidogenne, a także dla projektowania inhibitorów agregacji.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na błędy i nieścisłości, które zauważyłem w rozprawie:

Ostatnia linia na str. 24: Tekst jest urwany na „Nevertheless”.

strona 28, początek sekcji „Simulation protocol”: Autorka pisze, że krok czasowy wynosił  $0.01 \tau$ , przy  $\tau \approx 0,16$  ns. Dawałoby to krok czasowy rzędu pikosekundy, co nie wydaje się możliwe. Dopiero lektura publikacji P1 pozwala stwierdzić, że w tekście rozprawy jest błąd i faktycznie  $\tau \approx 0,16$  ps.

strona 37, linie 5 i 6 od góry: Co oznacza zdanie „The kinetic curves for the scaled monomer decay overlap.”?

strona 37: Brak jest odniesienia opisu na tej stronie do rysunków 3.1 – 3.3.

strona 45, linia 12 od dołu: Powinno być „assemblies” (rzeczownik w liczbie mnogiej) a nie „assembles” (odpowiedni czasownik w trzeciej osobie liczby pojedynczej).

strona 51, linie 12 i 13 od góry: „...that are visible...” zamiast „...that visible...”.

strona 52, linia 6 od góry: „...differences are observed...” zamiast „...differences is observed...”.

Rozprawę doktorską p. mgr Beaty Szalę-Mendyk oceniam bardzo wysoko. Kandydatka opracowała unikalny model gruboziarnisty, który doskonale oddaje podstawowe cechy agregacji białek. Bardzo dokładnie zbadała metodami symulacyjnymi z użyciem własnego modelu oraz bardziej dokładnego modelu Berneau-Deserno mechanizmy i kinetykę agregacji białek. Opracowała bardzo użyteczne i nietrywialne deskryptory charakteryzujące agregaty białkowe. Praca zawiera bardzo dużo nowości naukowej a przedstawione przeze mnie powyżej krytyczne uwagi nie umniejszają istotnie jej wartości. Praca spełnia z nawiązką wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych. Wszystkie cele naukowe rozprawy zostały zrealizowane. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne o dopuszczenie p. mgr Beaty Szalę-Mendyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wybitny charakter oraz wysoką wartość naukową rozprawy wnoszę również wyróżnienie. Uzasadnienie wyróżnienia załączam.



prof. dr hab. Józef Adam Liwo



Gdańsk, dnia 20.01.2022

**Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej**  
**Pani magister Beaty Szalą-Mendyk**  
**pt. „Kinetics and mechanisms of peptide aggregation from molecular dynamics simulations”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Beaty Szalą-Mendyk dotyczy niezwykle ważnego w biologii i medycynie zagadnienia agregacji białek, które jest przyczyną tzw. chorób konformacyjnych. Autorka badała ten proces przy użyciu opracowanego przez siebie minimalnego modelu gruboziarnistego, który oddaje najbardziej fundamentalne cechy agregujących łańcuchów peptydowych a jednocześnie symulacje przy jego użyciu można kontrolować zmieniając jedynie 2 parametry, oraz bardziej szczegółowego modelu Bereau-Deserno. Oprócz opracowania unikalnego modelu minimalnego, Autorka opracowała dwa bardzo użyteczne deskryptory fibryli utworzonych z peptydów: skręt i helikalność, które mogą być zastosowane przez innych badaczy w symulacjach agregacji peptydów. Wykonała ogromną pracę, której wymagało wykonanie symulacji oraz interpretacja ich wyników, szczególnie biorąc pod uwagę to, że analiza wymagała nowatorskiego i niestandardowego podejścia. Uzyskała bardzo ważne wyniki dotyczące mechanizmu i kinetyki agregacji białek, które pozwalają zinterpretować proces agregacji nie tylko dla specyficznych układów. Badania zostały wykonane a ich wyniki opracowane bardzo profesjonalnie. Materiał rozprawy został opublikowany w trzech czasopismach z listy ISI, których p. mgr Beata Szalą-Mendyk jest pierwszą autorką. W mojej ocenie, rozprawa zdecydowanie wybijają się nad poziom typowych rozpraw doktorskich z chemii obliczeniowej i dlatego wnoszę o wyróżnienie.

prof. dr hab. Józef Adam Liwo