



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

14 stycznia, 2022

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 683
<https://bionano.cent.uw.edu.pl>

Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
61-614 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Szały-Mendyk

Rozprawa doktorska mgr Beaty Szały-Mendyk zatytułowana „*Kinetics and mechanisms of peptide aggregation from molecular dynamics simulations*” została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Andrzeja Molskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Temat badawczy poruszony w rozprawie dotyczy ważnego zjawiska agregacji białek oraz peptydów i związane z tym tworzenie się nierozpuszczalnych fibryli. Agregacja białek czy ich fragmentów jest obserwowana w przypadku wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, czy Parkinsona. W mózgach chorych na Alzheimera zaobserwowano akumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek β -amyloidu w tzw. złoży β -amyloidowe oraz akumulację białek tau. W chorobie Parkinsona obserwuje się złoży innego białka o nazwie alfa-synukleina. Kolejnym znanym przykładem jest choroba Huntingtona, w przypadku której obserwuje się agregację końcowych fragmentów białka huntingtyny, zawierających długie powtarzające się sekwencje glutamin. Wiadomo, że po przekroczeniu progu długości ok. 35-40 glutamin białka agregują i występują objawy choroby. Mimo, że włókna białkowe mają też istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, zwykle kojarzy się je z agregatami chorobotwórczymi bądź będącymi efektem choroby.

Mechanizm agregacji białek i peptydów zależy od wielu czynników i nie został w pełni poznany. Etapy agregacji, poprzez tworzenie przejściowych oligomerów peptydów do końcowych fibryli nie są do końca wyjaśnione. Zwykle doświadczalnie najłatwiej jest badać końcowe złoży, a ważne są też mechanizmy ich formowania, a w szczególności kinetyka tych procesów. Wiadomo też, że stany przejściowe mogą być bardziej toksyczne niż dojrzałe fibryle. Mając te informacje na względzie autorka rozprawy podjęła próbę wyjaśnienia kinetyki formowania się stanów przejściowych i fibryli za pomocą metod obliczeniowych.

Rozprawa doktorska jest oparta o trzy publikacje, w których mgr Beata Szała-Mendyk jest pierwszym autorem, a drugim autorem jest promotor rozprawy. Są to prace, które ukazały się w wysoko notowanych dla dyscypliny nauki chemiczne czasopismach z listy *Journal Citation Reports* o wskaźniku oddziaływania (tzw. *impact factor*, IF) między 3 a 5. Praca oznaczona jako P1 i zatytułowana „*Chiral structure fluctuations predicted by a coarse-grained model of peptide aggregation*” została opublikowana w czasopiśmie *Soft Matter* wydawnictwa *Royal Society of Chemistry* w roku 2020 o IF wynoszącym 3.7. Praca P2 została opublikowana też w roku 2020 w

czasopiśmie *Biomolecules* wydawnictwa MDPI (IF = 4.7) i jest zatytułowana „*Clustering and Fibril Formation during GNNQQNY Aggregation: A Molecular Dynamics Study*”. Trzecia praca P3 pod tytułem „*Diverse Aggregation Kinetics Predicted by a Coarse-Grained Peptide Model*” ukazała się w roku 2021 w *Journal of Physical Chemistry B* (IF = 3.0).

Autorka przedstawiła do oceny rozprawę opartą o powyższe publikacje. Rozprawa została napisana w języku angielskim, zawiera także streszczenie w języku polskim.

W pierwszym rozdziale zatytułowanym „*Introduction*” Beata Szała-Mendyk opisuje krótko zjawisko agregacji białek i peptydów oraz podkreśla jego znaczenie biologiczne. Podkreśla także, że istotne są stany przejściowe przyjmowane przez układy w czasie oligomeryzacji, gdyż właśnie te stany przejściowe, a nie końcowe agregaty, mogą być toksyczne. Autorka podkreśla też, że kinetyka tworzenia agregatów ma duże znaczenie dla ich toksyczności, a jest trudna do badań doświadczalnych. Dodatkowo, zwykle myślimy o negatywnych aspektach agregacji białek, ale mogą one być też pozytywne, jeśli chodzi o funkcje biologiczne. Autorka przedstawia też modele kinetyki tworzenia agregatów, oparte na nukleacji oraz bezpośredniej asocjacji oligomerów. Opisuje też pokrótce białko prionowe drożdży, o nazwie Sup35, którego siedmioaminokwasowy fragment badała w rozprawie. W dalszej części tego podrozdziału autorka opisuje metodę dynamiki molekularnej, a także istotność modeli i pól siłowych w symulacjach dynamiki molekularnej.

W rozdziale 2 autorka rozprawy przedstawia cele badawcze. Celem pracy było scharakteryzowanie jak agregują krótkie peptydy, zarówno jaką przyjmują strukturę końcowych agregatów, jak i w jaki sposób do tej struktury dochodzą. Autorka badała więc nie tylko aspekt strukturalny, ale też kinetyczny. Chciała odpowiedzieć na pytania, czy są jakieś ogólne cechy peptydów, niezwiązane z sekwencją reszt aminokwasowych, które są odpowiedzialne za zdolność agregacji. Czy za agregację i model kinetyczny odpowiada jedynie łańcuch peptydowy? Czy kinetyka tego procesu zależy od sekwencji peptydu? Pytania badawcze są dobrze postawione i metody odpowiedzi na nie dobrze dobrane.

Kolejny rozdział „*Methodology*” jest poświęcony metodom obliczeniowym, w szczególności modelom gruboziarnistym, które autorka stosowała w symulacjach dynamiki molekularnej. Pierwszy model to model jednokulkowy, w którym jeden aminokwas stanowi jedno centrum oddziaływania. Parametry tego modelu zostały przetestowane i dobrane przez autorkę rozprawy. Taki minimalny model zawiera tylko dwa typy oddziaływań wiążących (pseudo-wiązanie oraz pseudo-kąt jako funkcje harmoniczne) oraz jeden rodzaj oddziaływania niewiążącego (reprezentowany przez potencjał Lennarda-Jonesa). W kolejnej części mgr Szała-Mendyk przedstawia protokół symulacji oraz metody analizy trajektorii dynamiki molekularnej. Niektóre metody nie są standardowe i wymagały wprowadzenia własnych miar układów, a także napisania odpowiednich skryptów.

W rozdziale 3 „*Results*” podsumowane są główne wyniki zawarte w publikacjach, które są częścią rozprawy doktorskiej. Dla modelu minimalnego, tzw. jednokulkowego, autorka przetestowała różne parametry pola siłowego (w szczególności głębokość studni potencjału Lennarda-Jonesa odpowiadającą za siłę oddziaływania niewiążącego oraz stałą siłową kąta płaskiego odpowiadającą za sztywność łańcucha peptydowego), długości peptydów oraz ich liczbę w pudełku symulacyjnym (czyli stężenie peptydów). Model minimalny, jego testy i wyniki zostały recenzowane i opublikowane w

pracach P1 i P3. Autorka otrzymała diagram fazowy w funkcji tych dwóch parametrów pokazujący rejony tworzenia uporządkowanych i amorficznych agregatów. Mimo braku preferencji co do skrętności w potencjałach, w pewnych przypadkach autorka z równym prawdopodobieństwem obserwowała skręcenia końcowych struktur zarówno lewo- jak i prawoskrętne. Różne symulacje pozwoliły też wskazać i rozróżnić przykłady agregacji opartej na mechanizmie dołączania monomerów i na mechanizmie związanym z nukleacją. Określiła czas tworzenia zarodka agregacji oraz jego wielkość.

Model minimalny nie zawiera parametrów zależnych od sekwencji peptydu. Natomiast, kolejnym problemem badawczym autorki było wyjaśnienie jak zamiana końcowej tyrozyny na alaninę w heptapeptydzie z białka prionowego wpływa na struktury agregatów obserwowane eksperymentalnie oraz na kinetykę ich formowania. Do tego problemu autorka musiała więc zastosować bardziej szczegółowy model, uwzględniający zależność parametrów pola siłowego od sekwencji. Zastosowała model Bereau-Deserno, który zapewnia zależność wyników symulacji od sekwencji peptydu, gdyż jeden aminokwas jest reprezentowany przez 3 lub 4 pseudo-atomy z innymi parametrami oddziaływania. Autorka zaobserwowała, że zarówno peptyd dziki jak i zmutowany utworzyły fibryle w symulacjach, ale w pierwszym przypadku były one regularne, z peptydami ułożonymi równolegle i opartymi na szkielecie uformowanym z końcowych tyrozyn każdego peptydu. Dla formy zmutowanej peptydu taki szkielet agregacyjny się nie tworzył, choć peptyd też tworzył agregaty.

Rozdział 4 zatytułowany „*Discussion*” podsumowuje dyskusję wyników zawartą w publikacjach autorki rozprawy. Dyskusja uwzględnia wyniki doświadczalne dla agregujących sekwencji homopeptydów oraz wcześniejsze symulacje innych grup badawczych.

Rozdział 5 to podsumowanie. Autorka stworzyła minimalny model jednokulkowy peptydów, który zastosowała do badań kinetyki agregacji tych peptydów. Model potwierdził, że sam łańcuch peptydowy i jego sztywność mają istotny wpływ na zdolność agregacji peptydów. Agregacja zachodzi szybciej dla dłuższych łańcuchów peptydowych, ale mechanizm agregacji nie zmienia się. Model minimalny odpowiada polimerom złożonym z glicyn, a wiadomo, że takie homopolimery agregują. Autorka zaobserwowała też, że peptydy skręcają swój łańcuch w agregatach mimo braku członu odpowiadającego za chiralność w polu siłowym. Mimo prostoty, model ten też odtwarzał jakościowo dane doświadczalne dotyczące kinetyki agregacji, a także modelu agregacji zależnego od stężenia peptydów w pudełku symulacyjnym. Jednak zastosowanie bardziej szczegółowego modelu pokazało, że morfologia agregatów zależy od sekwencji. W przypadku, gdy interesuje nas produkt agregacji dla różnych mutantów danego peptydu należy stosować modele bardziej szczegółowe.

Ostatnia sekcja rozprawy to Literatura. W tej bibliograficznej części autorka odwołuje czytelnika do 79 pozycji, głównie z listy *Journal Citation Reports*.

Rozprawa jest napisana klarownie, publikacje wchodzące w jej skład podlegały już ocenie niezależnych ekspertów. Po przeczytaniu rozprawy ciekawa jestem zdania autorki dotyczącego następujących zagadnień.

str. 21 zdanie „*Because the calculations for AA models take a lot of time, AA simulations are limited to small systems and short time-scales.*” To zdanie jest ogólnikowe jak na rozprawę doktorską. O jakich rzędach czasu mówimy oraz jakich wielkościach układów? Jakie są skale czasowe w doświadczeniach?

str. 22. zdanie „*Moreover, simulations at high resolution level give a lot information which can hinder understanding of interesting process or system properties*” Dlaczego bardziej szczegółowe informacje utrudniają zrozumienie procesów lub własności układu?

W modelach gruboziarnistych trudno jest mówić o realistycznej skali czasowej symulacji, jaką zakładamy w modelach pełnoatomowych. Nie można więc bezpośrednio porównywać skal czasowych symulacji pełnoatomowych i gruboziarnistych, co sugeruje autorka. Dodatkowo, czy możemy w modelach gruboziarnistych skale czasowe symulacji porównywać do doświadczalnych? Chętnie poznam opinię autorki na ten temat.

Rys. 1.3 Dla reprezentacji peptydu w modelu MARTINI na tym rysunku widać połączenia nie tylko wzdłuż łańcucha głównego, czy od łańcucha głównego do reszty aminokwasowej. Czy połączenia te odpowiadają potencjałom nałożonym na pseudo-atomy w tym modelu?

str. 26 Krok czasowy stosowany w modelu minimalnym wynosił 25 fs. Skąd wynikała ta liczba? Czy krok czasowy był testowany, być może krok czasowy mógłby być dłuższy?

Model minimalny nie zawierał kierunkowości oddziaływania, a mimo to autorka obserwowała w symulacjach lewo- i prawoskrętne agregaty. Z czego to mogło wynikać?

str. 44 Autorka napisała, że jej wyniki potwierdzają hipotezę, że wewnętrzna sztywność łańcucha peptydowego jest odpowiedzialna za wysoką tendencję peptydu do agregowania. Jak to koreluje z biologicznymi sekwencjami, tj. czy łańcuchy polyQ są sztywne właśnie? albo polyG?

Mimo, że rozprawa jest napisana poprawnie językowo autorka nie uniknęła niestety pewnych uchybień językowych, czy literówek. Część z nich wymieniam w ramach roli recenzenta, ale nie umniejszają one merytorycznych aspektów rozprawy i nie utrudniały zrozumienia.

str. 9 – ostatnia linia, powinno być „klastra”

str. 10 powinno być „struktury”

W wielu miejscach (np. str. 15, 21) pojawia się „molecular dynamic simulations” zamiast „molecular dynamics simulations” (również w tytule podrozdziału 1.2)

str. 18 – ostatnia linia, powinno być „nucleus”

str. 20 – na dole, powinno być „These beta-sheets form”

str. 22 – powinno być „smoothing” oraz „representations”

str. 24 – Ostatnie słowo “Nevertheless,” powinno być wykreślone.

str. 31 – w równaniu 2.10 powinno być chyba oznaczenie H_{rib} a nie H_r tak jak w równaniu 2.9.

str. 38 – podrozdział 3.2, powinno być „in single sheets”, „fibrils consist of” oraz “indicating”

str. 48 – powinno być “fibrils do not”

str. 52 – powinno być „the structural difference is observed” lub “the structural differences are observed” oraz “oligomers can grow”

Oświadczenia autorki oraz jednego współautora, prof. Andrzeja Molskiego, który jest zarazem promotorem doktoratu wskazują, że udział doktorantki w tych pracach był dominujący. Wspólnie z promotorem brała udział w planowaniu badań, tworzeniu oprogramowania do analizy danych z symulacji, dyskusji nad wynikami oraz pisaniu manuskryptu publikacji. Doktorantka przeprowadziła i przeanalizowała prawie wszystkie symulacje. Opracowała i dokonała wizualizacji wyników. We wszystkich trzech pracach mgr Beata Szała-Mendyk występuje jako autor korespondencyjny; w dwóch z nich jest autorem korespondencyjnym wspólnie z promotorem, a w jednej występuje jako wyłączny autor korespondencyjny. Oprócz publikacji wyniki rozprawy były przez jej autorkę prezentowane na czterech konferencjach.

Jeśli chodzi o dorobek naukowy doktorantki to poza trzema pracami będącymi podstawą rozprawy doktorskiej, mgr Szała-Mendyk jest współautorem jeszcze dwóch prac opublikowanych w roku 2019 w *Biophysical Chemistry* oraz *J. Phys. Chem. Letters*. Mgr Szała-Mendyk odbyła w czasie pracy nad doktoratem kilka staży za granicą. Dwa z nich, w latach 2017 i 2018, były w ramach programu Erasmus+ na Uniwersytecie Padewskim. Trzeci staż odbyła w Niemczech w znanym centrum badawczym w Juelich.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Beaty Szały-Mendyk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza jej wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk chemicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia więc warunki ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Beaty Szały-Mendyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, że dorobek mgr Beaty Szały-Mendyk wykracza poza standardowe wymagania stawiane doktorantom. Wyniki przedstawione w rozprawie dotyczą trudnego problemu zbadania mechanizmów i kinetyki agregacji różnych peptydów oraz struktur końcowych takich agregatów. Co ważne, autorka nie tylko zastosowała metody zaproponowane przez innych badaczy, ale także opracowała własny jednokulkowy minimalny model peptydu i dopasowała jego parametry. Model ten jakościowo odtwarzał wyniki doświadczeń. Praca doktorantki wymagała dużego zaangażowania i cierpliwości w przeprowadzaniu oraz analizowaniu wielu symulacji z różnymi parametrami pola siłowego, różnymi długościami łańcucha peptydowego, czy stężeniami peptydów w pudełku symulacyjnym. Model, który autorka nazwała minimalnym, będzie mógł służyć innym badaczom, którzy chcieliby poznać mechanizmy agregacji takich peptydów, których agregacja jest determinowana własnościami łańcucha peptydowego. Dodatkowo, mgr Szała-Mendyk napisała własne skrypty i wymyśliła nowe deskryptory określające helikalność oraz chiralność agregujących peptydów. Opracowała też odpowiednie metody identyfikacji agregatów w trajektoriach ruchu pochodzących z symulacji dynamiki molekularnej. Biorąc pod uwagę wnikliwe podejście autorki do symulacji i ich analiz, ogromny nakład pracy, użyteczność badań oraz dominujący wkład autorki w publikacje wyników badań uważam, że praca doktorska mgr Beaty Szały-Mendyk zasługuje na wyróżnienie. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.