



UNIwersytet
WARSAWski

Wydział Chemii



RP11/2345/2022 N
Data: 2022-01-31

Prof. dr hab. Andrzej Koliński
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pracownia Teorii Biopolimerów
<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/>

Warszawa, dnia 21.01. 2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Magister Beaty Szały-Mendyk zatytułowanej
„Kinetics and mechanisms of peptide aggregation from molecular dynamics simulations”**

Praca doktorska Pani magister Beaty Szały-Mendyk została zrealizowana w Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem rozprawy jest Profesor Andrzej Molski. Na rozprawę doktorską składają się trzy publikacje w dobrych czasopismach naukowych o zasięgu ogólnościowym oraz kilkunastostronicowy opis podsumowujący uzyskane wyniki. Ten dodatkowy tekst napisany jest również w języku angielskim, ale zawiera też krótkie streszczenie w języku polskim.

Tytuł rozprawy „*Kinetics and mechanisms of peptide aggregation from molecular dynamics simulations*” (W luźnym tłumaczeniu: „*Kinetyka i mechanizm agregacji peptydów z symulacji dynamiką molekularną*”) jest poprawny, aczkolwiek dla niektórych czytelników może być trochę mylący. Wynika to z tego, że dla większości fizyków i chemików dynamika molekularna oznacza dość dokładnie zdefiniowaną technikę modelowania, opartą na klasycznej aproksymacji cząsteczek chemicznych za pomocą dość dokładnie zdefiniowanych modeli atomowych, specyficznego przybliżenia oddziaływań i specyficznego modelu poruszania się cząsteczek. Tego typu przybliżenie, zwykle nazywane klasyczną dynamiką molekularną (Molecular Dynamics, MD) jest wbrew pozorom dość drastycznym uproszczeniem modelowanych procesów, które działa jednak dość dobrze w określonym zakresie temperatur, ale tylko dla układów, w których można zignorować reakcje chemiczne i wtedy, gdy użyje się odpowiednio dokładnego, (ale zawsze przybliżonego) modelu dynamiki. Ta nieścisłość tytułu rozprawy nie jest jednak poważnym problemem, gdyż treść rozprawy jest dość precyzyjna i nawet tytuły publikacji naukowych stanowiących jej podstawę są już bardziej jednoznaczne. Być może lepiej by było w tytule posłużyć się określeniami „dynamika gruboziarnista” (Coarse-Grained dynamics) albo „przybliżone modele dynamiki” (approximate models of dynamics).

Podstawą rozprawy są trzy artykuły opublikowane w dobrych czasopismach anglojęzycznych o dużym współczynniku oddziaływania (Impact Factor, IF), od około 3 do blisko 5.5, według kilkuletniej statystyki. Pierwszym autorem wszystkich publikacji jest doktorantka, a drugim jej promotor. Tak więc, wkład doktorantki w prezentowane badania jest dobrze udokumentowany. Publikacje te oznaczone są symbolami P1-P3, i będę używał tych oznaczeń w dalszej części tej recenzji.

(P1) Beata Szała, Andrzej Molski, "*Chiral structure fluctuations predicted by a coarse-grained model of peptide aggregation*", *Soft Matter* 16, 5071-5080 (2020) IF=3.7

(P2) Beata Szała-Mendyk, Andrzej Molski, "*Clustering and Fibril Formation during GNNQQNY Aggregation: A Molecular Dynamics Study*", *Biomolecules* 10, 1362 (2020) IF=5.4

(P3) Beata Szała-Mendyk, Andrzej Molski, "*Diverse Aggregation Kinetics Predicted by a Coarse-Grained Peptide Model*", *J. Phys. Chem. B*, 125, 7585-7597 (2021) IF=3.1

Powyższe publikacje są bardzo spójne tematycznie i opisują nowe sposoby gruboziarnistego modelowania poszczególnych etapów procesów formowania się włókien amyloidowych. To ważne zagadnienie nie tylko fizykochemii teoretycznej, ale też współczesnej biologii molekularnej, o istotnym znaczeniu dla medycyny i farmakologii. Krótko to uzasadnię.

Z licznych badań doświadczalnych wiadomo, że w określonych warunkach peptydy oraz białka (lub ich fragmenty) mogą ulegać specyficznej zmianie ich struktury przestrzennej, do stanów losowych lub ściśle uporządkowanych, ale jakościowo różnych od ich pierwotnej struktury natywnej. Wiele takich „alternatywnych” struktur może ulegać procesom agregacji, często prowadzących do powstania dużych regularnych włókien (fibryli). Wiadomo, że takie agregaty molekularne mogą prowadzić do szeregu zaburzeń funkcjonowania żywych organizmów, w tym do poważnych chorób neurodegeneracyjnych czy metabolicznych. Szczegółowe opisanie tych procesów i czynników wpływających na ich przebieg ma podstawowe znaczenie dla dalszego postępu wielu dziedzin biologii i medycyny, ze szczególnym wpływem na racjonalne projektowania nowych leków i terapii.

Jesteśmy dziś jeszcze daleko od zadawalającego zrozumienia na poziomie atomowym wspomnianych wyżej procesów agregacji łańcuchów białek i peptydów. Istnieje wprawdzie mnóstwo danych doświadczalnych, ale są one zwykle bardzo fragmentaryczne i trudne do interpretacji. Stąd oparty o fizyczne pomiary opis przebiegu procesów agregacji i struktur pośrednich jest bardzo trudny i na ogół wysoce niekompletny. Również metody teoretyczne, przede wszystkim symulacje metodą dynamiki molekularnej, nie prowadzą do zadawalających wyników. Dzieje się tak z powodu paru dość oczywistych przyczyn. Procesy agregacji białek dotyczą dużych układów cząsteczkowych, składających się z wielkiej liczby atomów, a na dodatek skala czasowa tego typu procesów jest znacznie większa od osiągalnej w symulacjach atomowych z użyciem współczesnych komputerów. Jesteśmy dziś w stanie skutecznie symulować metodą MD cały proces związania się struktury natywnej tylko

niewielkich pojedynczych białek, i raczej tych, które tworzą charakterystyczny zwój relatywnie szybko. Pomijam tu trochę bardziej złożony problem tego czy bardzo długie trajektorie klasycznej MD wielkich układów w ogóle dają poprawny obraz rzeczywistej dynamiki.

Wykorzystanie modeli przybliżonych do teoretycznych badań bio-makromolekuł jest od dawna ważnym i intensywnie rozwijanym kierunkiem badań. Pionierzy tej dziedziny - Martin Karplus, Michael Levitt i Arieh Warshel uhonorowani zostali w roku 2013 Nagrodą Nobla („za rozwój wieloskalowych modeli dla złożonych układów chemicznych”). Spośród tej trójki laureatów szczególny wkład w rozwój wydajnych metod do gruboziarnistego modelowania białek miał profesor Michael Levitt. Modele CG mają od parudziesięciu lat, obok metod bioinformatycznych, decydujący wkład w obliczeniowe przewidywania struktury przestrzennej białek, modelowanie ich przejść konformacyjnych czy też dokowanie molekularne. W rozwijaniu gruboziarnistych modeli olbrzymie znaczenie odgrywa też specyficzne podejście do projektowania wydajnych przybliżeń modeli oddziaływań cząsteczkowych, często zasadniczo różnych od klasycznych pól siłowych. W moim przekonaniu w najbliższych latach powstaną zupełnie nowe strategie wieloskalowego modelowania wielkich układów bio-molekularnych, wykorzystujące nie tylko odpowiednie połączenia modeli różnej rozdzielczości, ale też tak zwane techniki uczenia maszynowego do projektowania opartych na wiedzy statystycznych potencjałów (pól siłowych). Po prostu, olbrzymie zasoby nagromadzonych danych doświadczalnych czekają na lepsze spożytkowanie.

Tak więc, tematyka rozprawy doktorskiej Pani magister Beaty Szały-Mendyk jest ważna i aktualna. Warto też zaznaczyć, że rozwijanie i stosowanie metod modelowania molekularnego, opartego na wykorzystaniu metod gruboziarnistych, nie jest łatwe i wymaga obszernej wiedzy interdyscyplinarnej. Z modelowaniem gruboziarnistym nie jest tak, jak z stosowaniem klasycznej pełno-atomowej dynamiki molekularnej (MD), dla której istnieją sprawdzone i dobrze opisane algorytmy i schematy symulacji. Wiadomo też, zwykle ze sporą dokładnością, jakie układy i w jakiej skali czasowej mogą być zadawalająco modelowane. Oczywiście pojawiają się również nowatorskie sposoby użycia metod MD (i ich modyfikacji), ale zazwyczaj stosownie metod MD ogranicza się do wsparcia szczegółowych badań doświadczalnych układów, które są już dość dobrze poznane.

W swoich badaniach pani Beata Szała-Mendyk rozwija nowe sposoby modelowania gruboziarnistego i używa ich do analiz dynamiki i zmian strukturalnych wynikających z samo-agregacji peptydów, czy też fragmentów białek. W trzech publikacjach, prezentujących tezy rozprawy doktorskiej Pani magister Szały-Mendyk, opisano wykorzystanie dwóch różnych modeli gruboziarnistych do symulowania procesów agregacji wybranych łańcuchów peptydowych. W pracy pierwszej (P1. *“Chiral structure fluctuations predicted by a coarse-grained model of peptide aggregation”*) opisano symulacje oparte na bardzo prostym modelu łańcuchów peptydowych, zwanego przez autorów Modelem Minimalnym. W

modelu tym peptydy reprezentowane są jako łańcuchy identycznych pseudo-atomów, gdzie każdy taki atom reprezentuje całą resztę aminokwasową. Wszystkie reszty aminokwasowe traktowane są jako identyczne. Oddziaływania trzech kolejnych aminokwasów w modelowym łańcuchu peptydowym kontrolowane są prostym potencjałem kątowym, w grubym przybliżeniu odpowiadającym kątom płaskim dla trzech kolejnych alfa-węgla w łańcuchach preferujących rozciągniętą strukturę wstęgową. Ten model oddziaływań pomija jakiegokolwiek preferencje skrętności łańcucha. Oddziaływania niezwiązanych pseudo-atomów opisane są klasycznym potencjałem Lennarda-Jonesa (12/6) z minimum odpowiadającym kontaktowej odległości węgla alfa w dwóch sąsiadujących beta-wstęgach (związanych „wirtualnymi” wiązaniami wodorowymi). Rozpuszczalnik jest traktowany w sposób niejawny a do symulacji użyty jest program GROMACS 4.6.5. Uproszczenia takiego modelu są dość drastyczne. W strukturach beta mamy zawsze wstęgi powiązane wiązaniami wodorowymi w beta-kartkach, ale nie pomiędzy wstęgami z różnych beta kartek. To właśnie wiązania wodorowe wymuszają uporządkowaną strukturę drugorzędową. W wyniku symulacji za pomocą opisanego modelu również powstają gęsto upakowane struktury, które w dodatku tworzą „skręcone” (lewo, lub prawo-skrętnie) formy przypominające początkowe struktury protofibryli. To ciekawy wynik, sugerujący, że pewien rodzaj lokalnej sztywności oraz założona najmniejsza odległość kontaktowa pseudo-atomów wystarczy do wymuszenia uporządkowanego upakowania, mającego niektóre cechy lokalnego upakowania fibryli amyloidowych. Autorzy pracy P1 słusznie zauważają, że fakt, iż w symulacjach nie uzyskano końcowych struktur przypominających struktury fibryli może być spowodowany brakiem anizotropowych cech przyjętego w Modelu Minimalnym pola siłowego. Prawdopodobnie jakiś erzac kierunkowego wiązania wodorowego mógł być dobrym wyborem. Najwięcej wątpliwości w założeniach modelu budzi jednak przyjęty potencjał Lennarda-Jonesa. Pseudo-atomy zastępują w tym modelu duże grupy atomów. To atomy mają ściśle określoną odległość kontaktową (minimum potencjału), a grupy atomów ze względu na wewnętrzne stopnie swobody powinny być opisywane dużo bardziej rozmytymi potencjałami o znacznie łagodniejszym minimum. Co więcej, używając takiej, nieco wypłaszczonej, funkcji potencjału można znacząco zwiększyć krok czasowy symulacji MD. Czy była rozważana taka możliwość? W końcu modele gruboziarniste stosowane są właśnie głównie po to, aby rozszerzyć zakres (rozmiar i czas) dostępnych symulacji. Samo zredukowanie liczby jawnie traktowanych stopni swobody modelowanego układu to tylko jeden ze sposobów zwiększania wydajności obliczeń. Obawa, że rozmycie potencjału Lennarda-Jonesa może doprowadzić do zniekształcenia obrazu dynamiki jest raczej bez znaczenia. W momencie, gdy przyjmujemy w istocie niefizyczne przybliżenie pseudo-atomów (czy zjednoczonych atomów) uzyskujemy niedokładne trajektorie, które jednak mogą mieć sensowne interpretacje. W pracy (P1) powołano się na to, że w aplikacjach metody MARTINI wykorzystano podobne przybliżenia potencjału kontaktowego dla modelowanych białek. Warto jednak zauważyć, że o ile model MARTINI jest wyjątkowo skuteczny w modelowaniu błon lipidowych to nie jest już tak realistycznym narzędziem do modelowania białek membranowych i wymaga użycia odpowiednich, a priori przyjętych, więzów strukturalnych. Nie mniej uważam, że ta część

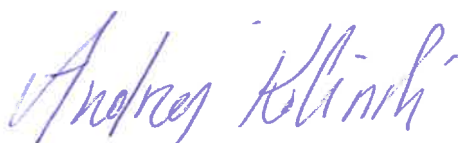
rozprawy jest interesująca, o ciekawych wnioskach ogólnych, aczkolwiek korzystna byłaby bardziej wielostronna analiza uzyskanych wyników symulacji.

W pracy P3. (*"Diverse Aggregation Kinetics Predicted by a Coarse-Grained Peptide Model"*) zastosowano ten sam Model Minimalny do badania kinetyki agregacji modelowych peptydów o różnej długości. Zauważono, że w obserwowanym zakresie długości identycznych peptydów te dłuższe ulegają dużo łatwiej procesowi agregacji i tworzą bardziej regularne struktury. Nieco analogiczną tendencję obserwowano w badaniach doświadczalnych.

W pracy P2. (*"Clustering and Fibril Formation during GNNQQNY Aggregation: A Molecular Dynamics Study"*) opisano symulacje wykorzystujące znacznie dokładniejszy model gruboziarnisty. Doktorantka nazywa go modelem Bereau i Deserno. Analogiczne uproszczone podejście do reprezentacji łańcuchów białkowych wykorzystywano już dużo wcześniej, uwzględniając w sposób jawny współrzędne wszystkich „ciężkich” atomów łańcucha głównego i zastępując łańcuchy boczne „pseudo atomem”, umieszczonym tam gdzie atom beta (jeżeli aminokwas go zawiera), oraz używając niejawnego rozpuszczalnika, aby dodatkowo zredukować liczbę współrzędnych przetwarzanych w symulacjach MD. Różne metody próbkowania przestrzeni konformacyjnej i różne pola siłowe stosowali inni badacze dla podobnych modeli. Podejście Bereau i Deserno zaadoptowane przez doktorantkę jest jednak wyjątkowo spójne. Pole siłowe zawiera odpowiednie potencjały kątowe, odtwarzające konformacyjne preferencje białek i peptydów. Oddziaływania pomiędzy pseudo-atomami grup bocznych są aproksymowane za pomocą potencjału Lennarda-Jonesa. Stałe siłowe dopasowano do potencjałów statystycznych wyprowadzonych przez Miyazawę i Jernigana. To dobra strategia, aczkolwiek istnieją nowsze, moim zdaniem zdecydowanie bardziej adekwatne potencjały statystyczne, a co więcej od czasu wyprowadzenia tego potencjału nastąpiło jakościowe zwiększenie dostępnej bazy struktur, które dziś lepiej reprezentują istniejące białka i ich kompleksy. Działanie wirtualnych wiązań wodorowych aproksymowane są przez kierunkowe potencjały L-J. To znów chyba najlepszy możliwy wybór dla tego poziomu gruboziarnistości modelu, jeżeli chce się użyć klasycznych programów MD i tak zwanej „physics-based” argumentacji. Warto jednak zauważyć, że o ile wybór takiej metody symulacji wydaje się optymalnym, pod warunkiem, że chce się symulować stosunkowo wczesne etapy agregacji to w celu modelowania całego procesu powstawania dużych struktur amyloidowych potrzebne są bardziej złożone strategie modelowania wieloskalowego. Wyniki symulacji procesów agregacji wybranych peptydów (tu już sekwencje mają znaczenie) przedstawione w pracy P2 są bardzo interesujące i pokazują zdumiewającą złożoność tego procesu. Co ważne, wyniki są jakościowo zgodne z innymi badaniami teoretycznymi i ze znanymi faktami doświadczalnymi. Mogą też wskazywać nowe ważne cele doświadczeń fizycznych. Ciekaw jestem, czy doktorantka rozważała zastosowanie innych metod dynamiki molekularnej gruboziarnistych modeli białek, takich jak UNRES (United Residues), który to model, rozwinięty przez profesora Adama Liwo, opiera się na podobnym do modelu BD uproszczonej reprezentacji

aminokwasów i na bardzo wyrafinowanych polach siłowych. UNRES wykorzystuje różnorodne strategie próbkowania przestrzeni konformacyjnej, nie tylko dynamikę molekularną, umożliwiające radykalne przyspieszenie obliczeń.

W podsumowaniu pozwolę sobie zauważyć, że Pani magister Beata Szała-Mendyk jest dobrze przygotowana do dalszej pracy naukowej. Oprócz trzech artykułów stanowiących podstawę jej rozprawy doktorskiej opublikowała jeszcze dwa artykuły (o zbliżonej tematyce badawczej) w dobrych czasopismach naukowych. Wszystkie publikacje były recenzowane przez niezależnych recenzentów i zostały przez nich odpowiednio ocenione, jako istotne i warte udostępnienia społeczności naukowej. Pani magister odbyła też trzy krótkie staże naukowe, dwa z nich w ramach programu Erasmus, w renomowanych laboratoriach i prezentowała swoje prace na paru konferencjach naukowych. Uważam też, że rozprawa doktorska Pani magister Szały-Mendyk spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i ustawowe (Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani magister Beaty Szały-Mendyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Koliński