

Prof. dr hab. Adam Patkowski
Uniwersytet im Adama Mickiewicza
Wydział Fizyki
Zakład Biofizyki Molekularnej
Poznań
Tel: +48-61-8295262
E-mail: patkowski@amu.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

“Oddziaływanie pochodnych fulerenu i jonów Cu^{2+} z peptydami amyloidu beta i ich fibrylami”

przedstawionej przez mgra **Pham Dinh Quoc Huy**

Rozprawa doktorska Pana P.D.Q. Huy składa się z: (i) czterech publikacji wieloautorskich, w których można wyodrębnić samodzielny wkład autora oraz (ii) dodatkowego wstępu, opisu badanych systemów i zastosowanych metod oraz rozszerzonej dyskusji wyników. Autor zawarł w swojej pracy doktorskiej oświadczenia wszystkich współautorów, w których zdefiniowany został ich indywidualny wkład. Określił również swój indywidualny wkład w każdą z publikacji w zakresie wykonanej pracy oraz jako procent całości pracy. Oświadczenia autora są zgodne z oświadczeniami wszystkich pozostałych współautorów. Zatem wymogi formalne: Ustawa o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i Rozporządzenie Ministra NiSW z dnia 19 stycznia 2018 §5 p.2 (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) dotyczące formy rozprawy doktorskiej zostały spełnione.

Publikacje składające się na rozprawę doktorską Pana P.D.Q. Huy to:

1. **Pham Dinh Quoc Huy**, and Mai Suan Li, “Binding of fullerenes to amyloid beta fibrils: size matters”, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16, no. 37, 20030-20040, (2014).

Jego wkład (około 80%) polegał na wykonaniu wszystkich symulacji, analizie danych, prezentacji wyników i współudziale w pisaniu publikacji.

2. Zuzana Bednarikova*, **Pham Dinh Quoc Huy***, Maria-Magdalena Mocanu, Diana Fedunova, Mai Suan Li, and Zuzana Gazova, “Fullerenol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{16}$ prevents amyloid fibrillization of $\text{A}\beta_{40}$ – in vitro and in silico approach”, *Physical Chemistry Chemical Physics* 18, 18855-18867 (2916).

*Autorzy ci wniesli równy wkład.

Jego wkład (około 30%) polegał na budowie i parametryzacji struktur fulerenoli, wykonaniu wszystkich symulacji dokowania i dynamiki molekularnej, analizie danych i prezentacji wyników.

3. **Pham Dinh Quoc Huy**, Quan Van Vuong, Giovanni La Penna, Peter Faller, and Mai Suan Li, "Impact of Cu(II) binding on structures and dynamics of A β ₄₂ monomer and dimer: Molecular dynamics study", ACS Chemical Neuroscience, 7(10), 1348-1363 (2016).

Jego wkład (około 40%) polegał na wykonaniu wszystkich symulacji dynamiki molekularnej, analizie danych i prezentacji wyników w publikacji.

4. **Pham Dinh Quoc Huy**, Mai Suan Li, and Giovanni La Penna, "Copper binding induces polymorphism in amyloid- β peptide: results of computational models", The Journal of Physical Chemistry B, 122, 7234-7252 (2018).

Jego wkład (około 50%) polegał na wykonaniu wszystkich symulacji dynamiki molekularnej i symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik, analizie danych i prezentacji wyników.

We wszystkich czterech publikacjach Pan P.D.Q. Huy jest pierwszym autorem. Jego wkład może być wyodrębniony i polegał na budowie i parametryzacji struktur molekuł, wykonaniu wszystkich symulacji dokowania i dynamiki molekularnej, analizie wyników symulacji i ich prezentacji w publikacjach. Wkład ten jest znaczący i wynosił odpowiednio 80, 30, 40 i 50%.

Choroba Alzheimerera (AD) to postępująca choroba mózgu, która występuje głównie u osób starszych. Liczba przypadków rośnie wraz ze starzeniem się populacji. Nie do końca wiadomo co powoduje chorobę Alzheimerera i nie ma leku, który by ją wyleczył. Główne cechy AD na poziomie molekularnym to akumulacja w mózgu peptydów β -amyloidu (A β) w postaci złogów i splątków neurofibrylarnych (NFTs) oraz akumulacja białka τ . Neurotoksyczne złogi składają się głównie z β -amyloidów zawierających 40 i 42 aminokwasy (A β ₄₀ i A β ₄₂), które powstają w wyniku rozszczepienia białka prekursorowego amyloidu (APP) przez sekretarzy β i γ . Białko APP jest obecne w wielu tkankach i jest skoncentrowane w synapsach neuronów. Rozpuszczalne w środowisku wodnym nietoksyczne monomery A β ₄₀ i A β ₄₂ agregują do toksycznych oligomerów, a w końcu do rozległych wysoko uporządkowanych nierozpuszczalnych włókien i płytek bogatych w motywy β -harmonijki. Chociaż nie ma leku na chorobę Alzheimerera, opracowano kilka leków leczących objawy AD. Przyczyna AD pozostaje nieznana, postuluje się jednak kilka hipotez jej dotyczących: Hipoteza cholinergiczna zakłada, że AD spowodowana jest spadkiem poziomu acetylocholiny

– neuroprzekaźnika ważnego dla uczenia się i zapamiętywania. Hipoteza tau postuluje, że AD spowodowana jest nieprawidłowym zachowaniem białka tau, które jest białkiem wiążącym się z mikrotubulami, ważnym dla stabilizacji cytoszkieletu komórkowego. Hipoteza amyloidowa zakłada, że AD spowodowana jest agregacją $A\beta$ prowadzącą do tworzenia złogów i splątków neurofibrylarnych i uszkodzenia neuronów. Wobec sprzecznych dowodów eksperymentalnych hipoteza ta została zmodyfikowana i zakłada, że AD spowodowana jest przez mniejsze oligomery $A\beta$, których toksyczność wynika z ich zdolności do penetracji szczeliny synaptycznej, podczas gdy blaszki $A\beta$ mogą wносить wkład przez uszkodzenie neuronów.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej, opartej na hipotezie amyloidowej, było zbadanie oddziaływań monomerów, oligomerów i włókien $A\beta$ z fulerenami o różnych rozmiarach (C20, C36, C60, C70, C76, C82 i C84), fulerenolami i jonami Cu^{2+} zarówno pod nieobecność jak i w obecności wody. Badania przeprowadzono za pomocą połączenia metod dokowania molekularnego i all-atom symulacji MD. Niektóre wyniki symulacji porównano z eksperymentalnymi badaniami *in vitro* przeprowadzonymi przez współpracowników Kandydata z Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences. Badania te podjęto w nadziei, że zrozumienie tych oddziaływań na poziomie atomowym może pomóc w opracowaniu nowych leków na AD.

Symulacje prezentowane w tej pracy wykonano za pomocą metod dokowania molekularnego i dynamiki molekularnej (MD). Symulacje komputerowe odgrywają ważną rolę w strategii projektowania nowych leków pozwalając badać oddziaływania na poziomie atomowym pomiędzy potencjalnym lekiem i wybranymi biopolimerami.

Przedstawione w tej pracy badania należą do wiodącej tematyki w zakresie projektowania leków przy pomocy symulacji komputerowych.

Zawartość tej pracy doktorskiej ściśle odpowiada tytułowi.

Wstęp zawiera ogólny opis roli, jaką pełnią beta-amyloidy w AD i ogólne uzasadnienie planu badań, oparte na istniejącej literaturze. Zawiera również listę czterech publikacji, które stanowią podstawę tej pracy doktorskiej. Dodatkowo Pan P.D.Q. Huy jest współautorem 11 publikacji w wysokiej rangi czasopismach i w trzech z nich jest pierwszym autorem.

W Rozdziale 2 zaprezentowano obszerny przegląd literatury związanej z tematyką tej pracy. Zawarto tam opis AD, istniejących hipotez dotyczących jej przyczyn, w szczególności hipotezy amyloidowej, która stanowiła motywację tej pracy, opis wytwarzania i agregacji

badanych beta amyloidów i istniejących inhibitorów A β . Następnie, w oparciu o rozległą literaturę dotyczącą symulacji i badań eksperymentalnych, szczegółowo uzasadniono plan badań oddziaływania fulerenów o różnych rozmiarach, ich pochodnych i jonów Cu²⁺ z peptydami A β i wpływu tych substancji na agregację A β .

W Rozdziale 3 krótko opisano metody obliczeniowe i eksperymentalne użyte w tej pracy oraz podano pewne szczegóły symulacji. Obliczenia dokowania molekularnego wykonano za pomocą programu Autodock Vina i zmodyfikowanej wersji pola sił CHARMM. Dla każdego systemu wygenerowano dwadzieścia modów wiążących. Pudło symulacji o rozmiarach 27000 Å³, było wystarczająco duże by pomieścić małe receptory, natomiast dla dużych receptorów używano różnie zlokalizowanych pudeł obejmujących różne części receptora.

Wykonano symulacje dynamiki molekularnej (all-atom MD) za pomocą programu Amber MD z uwzględnieniem wody przy użyciu modelu wody TIP3P. Zdefiniowano szczegółowo pole sił i podano ogólny opis termostatu Langevine'a, algorytmu leap-frog, symulacji MD z wymianą replik (REMD) i metody Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA).

Wyniki symulacji analizowano i interpretowano pod względem kontaktów łańcuchów bocznych (SC) i między-łańcuchowych (ICC), mostków solnych (SB), wiązań wodorowych (HB), struktury drugorzędowej i krajobrazu energii swobodnej.

Krótko opisano metody eksperymentalne użyte do analizy włókien A β , a mianowicie fluorescencję Thioflawiny T (ThT) i mikroskopię sił atomowych (AFM).

Swoje własne wyniki Pan P.D.Q. Huy przedstawił w Rozdziałach 4-5.

W Rozdziale 4 przedstawiono badania wpływu fulerenu i jego pochodnej – fulerenolu na włókna A β i ich agregację. Rozdział ten oparty jest na publikacjach [1, 2]. Przeprowadzono symulacje dokowania i MD dla pięciu fulerenów (C₂₀, C₃₆, C₆₀, C₇₀ i C₈₄) i dwóch włókien: 5A β ₁₇₋₄₂ i 12A β ₉₋₄₀ (skrócone struktury A β ₄₂ i A β ₄₀). Struktury obu włókien wzięte z bazy danych PDB, otrzymano za pomocą NMR w ciele stałym. Struktury pięciu fulerenów pokazano na Rys.1 w [1]. Na Rys. 2 i 3 oraz w Tabelach 1 i 2 w [1] pokazano umiejscowienie fulerenów w kompleksach z dwoma włóknami, powinowactwo wiązania ΔE_{bind} i liczbę kontaktów łańcuchów bocznych (SCC) otrzymane z dokowania. Nie dziwi fakt, że wiązanie hydrofobowych fulerenów do hydrofobowych włókien nie jest zdominowane przez liczbę SCC ale przez oddziaływania vdW pomiędzy komplementarnymi

powierzchniami, a ujemne powinowactwo wiązania maleje ze wzrostem rozmiarów fulerenów.

Konfiguracje kompleksów otrzymane z dokowania były dalej użyte jako struktury wyjściowe do symulacji MM-PBSA MD. Stwierdzono, że dla obu włókien energia wiązania ΔG_{bind} maleje ze wzrostem rozmiarów fulerenów (Tabela 3 w [1]) i, zgodnie z oczekiwaniem, jest zdominowana przez oddziaływania vdW. Fulereny słabo lub wcale nie wpływają na stabilność mostka solnego.

Konkludując stwierdzono, że fulereny o różnych rozmiarach praktycznie nie zmieniają stabilności kontaktu włókien, za wyjątkiem C_{60} , który obniża FC we włóknach $5A\beta_{17-42}$ (Rys. 6 w [1]) i destabilizuje pentamer. W przeciwieństwie do oczekiwań, hydrofobowe wnętrze włókien wydaje się być penetrowane przez wodę, aczkolwiek, jak uważa autor, może to być stan metastabilny, który zależy od warunków inkubacji. Korelacja pomiędzy liczbą cząsteczek wody wewnątrz włókien i ΔG_{bind} raczej nie jest znacząca.

Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że wyników symulacji oddziaływań fulerenów o różnych rozmiarach z włóknami $5A\beta_{17-42}$ i $12A\beta_{9-40}$ nie mają bezpośredniego zastosowania do ośrodków wodnych i potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Jednakże informacje uzyskane o kompleksach fulerem – włókno i specjalna rola, jaką dla stabilności włókna odgrywa C_{60} wskazały drogę dalszych badań w bardziej realistycznych warunkach.

Następnie w publikacji [2], na podstawie badań za pomocą symulacji pokazano, że fulerenol $C_{60}(\text{OH})_{16}$ zapobiega fibrilizacji $A\beta_{40}$. Badania eksperymentalne przeprowadzone zostały przez współpracującą grupę ze Słowacji. W pracy [1] pokazano, że nierozpuszczalny w wodzie fuleren C_{60} obniża stabilność włókien. Dlatego rozpuszczalny w wodzie analog - fulerenol $C_{60}(\text{OH})_{16}$ wybrano do dalszych badań jego wpływu na agregację $A\beta_{40}$.

Badania eksperymentalne za pomocą fluorescencji ThT i AFM uzupełnione zostały symulacjami all-atom MD i metodą MM-PBSA. Do badań oddziaływań użyto mieszaniny 10 μM $A\beta_{40}$ ze stosunkiem molowym $A\beta_{40}$: $C_{60}(\text{OH})_{16}$ wynoszącym 100:1, 20:1 i 1:1. Do symulacji użyto siedem izomerów $C_{60}(\text{OH})_{16}$ o różnym rozkładzie grup OH: L1 – L7 (Rys. 1 w [2]) i pięć różnych modeli $A\beta_{40}$. Symulacje all-atom MD wykonano dla najlepszych modów dokowania (Rys. 5 w [2]). Energia wiązania obliczona została za pomocą metody MM-PBSA dla konfiguracji w równowadze (Tabela 1 w [2]).

Zarówno wyniki fluorescencji ThT jak i AFM wykazały znaczną redukcję fibrylarnych agregatów dla najwyższego względnego stężenia fulerenolu. Było to zgodne z wynikami symulacji MM-PBSA, które wykazały silne wiązanie fulerenolu do monomerów $A\beta_{40}$, które

utrudniało proces agregacji. Wiązanie fulerenolu do $A\beta_{40}$ zdominowane było przez elektrostatyczne oddziaływania polarnych aminokwasów. Sprawdzono toksyczność fulerenolu używając komórek neuroblastoma SH-SY5Y i wykazano brak istotnych zmian żywotności po 24 godzinach ekspozycji.

W Rozdziale 5 opisano badania wpływu jonów miedzi na monomery $A\beta$ i ich dimeryzację. Rozdział ten oparty jest na załączonych publikacjach [3, 4]. Badania symulacyjne motywowane były przez eksperymentalne wyniki literaturowe. Pierwszym krokiem było opracowanie klasycznego pola sił dla oddziaływania jonów Cu^{2+} z $A\beta$ [3] w oparciu o zaczerpniętą z literatury strukturę, w której jony Cu^{2+} wiążą się do Asp1, His6 i His14. To pole sił użyte zostało do symulacji monomerów i dimerów $A\beta_{42}-Cu^{2+}$, przy stosunku $Cu^{2+}/A\beta$ wynoszącym 1:1 i 1:2, za pomocą pakietu Amber MD [3]. Wyniki symulacji analizowane były pod względem promienia bezwładności, struktury drugorzędowej, sieci mostków solnych i powierzchni energii swobodnej. Wykazano, że jony Cu^{2+} obniżają zawartość struktur β w monomerze i faworyzują tworzenie amorficznych agregatów zamiast amyloidowych struktur fibrylarnych.

Symulacje MD z wymianą replik (REMD) użyte zostały do badania wpływu jonów Cu^{2+} na strukturę i agregację monomerów $A\beta_{40}-Cu^{2+}$ [4]. Wyniki symulacji analizowane były pod względem pierwiastka ze średniego kwadratu odchylenia, struktury drugorzędowej, powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, promienia bezwładności, wiązań wodorowych, mostków solnych, przekroju ruchliwości jonów i powierzchni energii swobodnej. Pokazano, że jony Cu^{2+} powodują różnorodność struktury peptydu, zwiększają oddziaływania z wodą i zwiększają toksyczność peptydu $A\beta$ dla stosunku $A\beta/Cu^{2+}$ 1:1.

Podsumowanie wyników i potencjalne kierunki dalszych badań przedstawiono w Rozdziale 6.

Moim zdaniem najważniejszymi osiągnięciami i wnioskami tej pracy doktorskiej są:

- Fuleren C_{60} jest najbardziej efektywnym z fulerenów w niszczeniu fibrylarniej struktury $A\beta_{17-42}$.
- Fulerenol $C_{60}(OH)_{16}$ blokuje agregację $A\beta$.
- Wiązanie jonów Cu^{2+} do $A\beta_{42}$ obniża zawartość struktur β w monomerze i faworyzuje tworzenie amorficznych agregatów zamiast amyloidowych struktur fibrylarnych.
- Wiązanie jonów Cu^{2+} do $A\beta_{40}$ indukuje jego strukturalny polimorfizm i promuje tworzenie amorficznych agregatów.

Te wszystkie nowe i bardzo interesujące wyniki zostały krytycznie przedyskutowane w ramach dostępnych modeli i porównane z literaturą. Otrzymane wyniki są bardzo ważne dla lepszego zrozumienia tworzenia i stabilności amyloidowych struktur fibrylarnych.

Autor wybrał do swoich badań dwa amyloidy: $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ i fragmenty ich struktur, które są dobrze scharakteryzowane w literaturze i były także badane eksperymentalnie.

Wstęp do tej pracy doktorskiej i załączone publikacje są bardzo dobrze napisane w poprawnym języku angielskim. Zawierają one wystarczający przegląd literatury w tej dziedzinie – Bibliografia zawiera 228 publikacji. Metody symulacji i analiza danych są dobrze dobrane i jasno opisane. Prezentacja wyników jest wystarczająca i jasna. Wyniki własne Autora są wyraźnie odseparowane od danych literaturowych i porównane z nimi, wszędzie gdzie to było możliwe.

W trakcie swoich studiów doktoranckich Pan P.D.Q. Huy stał się ekspertem w symulacjach MD. Niestety opis metod symulacji jest zbyt krótki aby w pełni docenić ogólną teoretyczną wiedzę Kandydata w dziedzinie symulacji komputerowych. Jako doktorant pokazał się być utalentowaną i ciężko pracującą osobą z wysokimi umiejętnościami w dziedzinie symulacji, zdolną niezależnie rozwiązywać problemy naukowe. Wykazał się również wysoką umiejętnością pracy z innymi.

Wartość naukowa przedstawionej pracy doktorskiej jest bardzo wysoka. Autor uzyskał bardzo interesujące, nowe i ważne wyniki symulacji. Doprowadziły one do ważnych wniosków dotyczących wpływu fulerenów, fulerenolu i jonów Cu^{2+} na tworzenie amyloidowych struktur fibrylarnych. Nie mam wątpliwości, że te nowe, bardzo interesujące wyniki otrzymane przez Kandydata istotnie poszerzają naszą wiedzę o strukturze, agregacji i stabilności amyloidowych struktur fibrylarnych i mogą pomóc w rozwijaniu wydajnych leków w terapii AD.

Jestem w pełni przekonany, że praca doktorska "Interaction of fullerene derivatives and Cu^{2+} ions with amyloid beta peptides and their fibrils" Pana mgr Pham Dinh Quoc Huy spełnia wszystkie formalne i naukowe wymagania (art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Pham Dinh Quoc Huy do publicznej obrony pracy.

Poznań, March 3, 2021.



Prof. dr hab. Adam Patkowski

Prof. dr hab. Adam Patkowski
Uniwersytet im Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Fizyki
Zakład Biofizyki Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2
61-614 Poznań
Tel: +48-61-8295262
E-mail: patkowski@amu.edu.pl

Poznań, 17.03.2021.

Załącznik do recenzji

Pan
Prof. dr hab. Jacek Kossut
Przewodniczący Rady Naukowej
Instytut Fizyki PAN
Al. Lotników 32/46
02-668 Warszawa

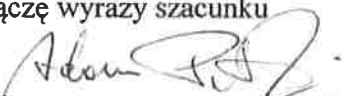
Szanowny Panie Profesorze,

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgra Pham Dinh Quoc Huy pt: „Interaction of fullerene derivatives and Cu^{2+} ions with amyloid beta peptides and their fibrils”, którą wysoko oceniłem w mojej recenzji, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

Uzasadnienie

Praca doktorska Pana mgra Pham Dinh Quoc Huy składa się z czterech prac opublikowanych w wysokiej rangi czasopismach naukowych. We wszystkich tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a jego wkład wyniósł odpowiednio 80, 30, 40 i 50%. Dodatkowo jest On współautorem 12 prac opublikowanych w wysokiej rangi czasopismach naukowych i w trzech z nich – pierwszym autorem. Liczba cytowań wszystkich Jego prac wynosi 182, a h-indeks – 8. Jest to wybitny dorobek naukowy na obecnym etapie Jego kariery naukowej, który z pewnością zasługuje na wyróżnienie.

Łączę wyrazy szacunku


Prof. dr hab. Adam Patkowski