

**Recenzja**  
**pracy doktorskiej mgr Nguyen Truong Co**  
**pt.: „ Study of factors governing mechanism of protein aggregation by using computer simulation”**

Tworzenie się złogów (blaszek) amyloidowych w mózgu jest przyczyną fatalnych w skutkach chorób degeneracyjnych. Choroby te prowadzą do demencji i są tragedią indywidualną, a także poważnym problemem społecznym. Złogi amyloidowe tworzą się na skutek agregacji białek – w przypadku choroby Alzheimera agregacji ulegają peptydy amyloidu beta ( $A\beta$ ), będące produktami trawienia białka prekursorowego amyloidu APP. Znane są czynniki wpływające na tę agregację oraz struktury wysoce uporządkowanych fibryli powstających w wyniku łączenia się agregatów, jednak mechanizm i przyczyny tworzenia się amyloidów pozostają nadal niejasne. Nie ma też metod zapobiegania powstawaniu złogów i leczenia chorób nimi wywołanych. Dlatego poznanie mechanizmów zarówno ich tworzenia jak i dezintegracji jest wysoce palącym i aktualnym problemem.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska poświęcona jest modelowym badaniom wpływu różnych czynników na tworzenie się złogów amyloidowych oraz ich rozpad. Opisane w niej badania zostały wykonane metodami komputerowymi. Użyte metody umożliwiają przewidywanie zachowania modelowanego układu i pomimo prostoty modelu, są w stanie dostarczyć istotnych informacji o molekularnych mechanizmach procesu agregacji. Praca doktorska oparta jest na trzech artykułach opublikowanych w prestiżowych czasopiśmie, co oznacza, że każdy z nich był pozytywnie oceniony przez co najmniej dwóch kompetentnych recenzentów. Udział doktoranta w tych publikacjach jest znaczący i wynosi kolejno 85, 35 i 50%.

Rozprawa doktorska mgra Nguyen Truong Co została wykonana w Zakładzie Fizyki Teoretycznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Mai Suan Li. Składa się z pięciu głównych części, zawiera też istotne informacje dodatkowe.

Pierwsza część jest wstępem (*Introduction*), gdzie przedstawiona jest motywacja prowadzonych badań, ich znaczenie dla badań podstawowych oraz potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

Druga część jest przeglądem literaturowym (*Literature Review*). Przedstawione są tam aktualne poglądy na temat mechanizmów tworzenia się złogów amyloidowych, wpływu czynników wewnętrznych i zewnętrznych na ten proces oraz metody i wyniki jego badań. Zwrócono w nim szczególną uwagę na problem agregacji peptydów na powierzchniach o różnej szorstkości. W trzeciej części (*Computational Methods*) opisane są metody komputerowe oraz modele użyte w pracach, na których opiera się rozprawa doktorska. Metody obliczeniowe to przede wszystkim metoda Monte Carlo (MC) na siatce z algorytmem Metropolisia oraz różne warianty symulacji dynamiki molekularnej (MD). Szczegółowo opisany są modele powierzchni o różnej szorstkości, na których mogą agregować peptydy oraz podane są kryteria energetyczne i strukturalne powstających agregatów.

Czwarty rozdział (*Summary of Publications*) ma trzy podrozdziały; w każdym z nich omówiony jest kolejny z trzech artykułów, na których oparta jest rozprawa.

Podrozdział 4.1 jest wprowadzeniem do badań modelowych nad wpływem szorstkości powierzchni na agregację polipeptydów. Te badania zostały opisane w pracy Co, N.T.; Li, M.S. *Effect of Surface Roughness on Aggregation of Polypeptide Chains: A Monte Carlo Study*. *Biomolecules* 2021, 11, 596 (udział doktoranta 85%). Badanie wpływu powierzchni na agregację peptydów jest wysoce uzasadnione, ponieważ w tkance jest wiele różnych powierzchni – choćby błony komórkowe o różnym składzie białkowo-lipidowych. Stosując prosty model kulkowy zarówno peptydu jak i powierzchni oraz metodę MC na siatce autorzy pracy pokazali, że rodzaj powierzchni ma wpływ zarówno na szybkość agregacji jak i strukturę powstającego agregatu. W przypadku gładkiej powierzchni, czas agregacji peptydów zależy od energii oddziaływania peptydów z powierzchnią. Gdy oddziaływania są słabe lub silne, czas agregacji rośnie z energią oddziaływania, a dla energii pośrednich, maleje. W przypadku szorstkiej powierzchni, dla słabych i silnych oddziaływań, czas agregacji rośnie z szorstkością powierzchni, a bardzo wysoka szorstkość całkowicie hamuje agregację. Dla pośrednich oddziaływań, wykres zależności czasu agregacji od szorstkości powierzchni ma minimum.

Przeprowadzone w tej pracy badania komputerowe, oprócz potwierdzenia wcześniejszych badań eksperymentalnych i symulacyjnych, przewidziały nie znaną z badań eksperymentalnych zależność czasu agregacji peptydów od szorstkości powierzchni dla pośredniej energii oddziaływań peptydów z powierzchnią, której wykres jest zbliżony kształtem do krzywej łańcuchowej (*U-shape*). Oznacza to, że dla pewnej szorstkości powierzchni, czas agregacji jest krótszy niż dla niższych i wyższych szorstkości.

Podrozdział 4.2 poświęcony jest zagadnieniu zależności szybkością agregacji peptydu od jego struktury drugorzędowej. Ta część badań została opisana w publikacji Thu, T.T.M. *et al.*

*Aggregation rate of amyloid beta peptide is controlled by beta-content in monomeric state.* J. Chem. Phys. 2019, 150, 225101 (udział doktoranta 35%). W tej pracy użyto metody *replica exchange molecular dynamics (REMD) simulation*. Symulacje przeprowadzono z niejawnym uwzględnieniem wody na prawie pełno-atomowych modelach monomerów peptydu A $\beta$  zbudowanego z 42 reszt aminokwasowych (A $\beta$ 42) i jego 19 mutantach. Wygenerowane w symulacjach struktury różniły się zawartością  $\beta$ -nici. Każdej z otrzymanych struktur przypisano wyznaczoną eksperymentalnie względną szybkość agregacji (względem szybkości agregacji A $\beta$ 42). Porównanie struktur z liczbami wskazało na silną zależność szybkości agregacji peptydów od zawartości  $\beta$ -nici w ich strukturze. Nowością pracy jest przewidzenie, że tę zależność można opisać funkcją zarówno liniową jak i wykładniczą. Jednakże jednoznaczne stwierdzenie, czy zależność jest liniowa, jak sugerują wyniki eksperymentalne, czy wykładnicza, nie jest możliwe, gdyż w obu przypadkach rozrzut punktów wokół fitowanej krzywej jest podobny.

Podrozdział 4.3 poświęcony jest zagadnieniu termicznej dezintegracji agregatów peptydowych. Badania i ich wyniki opisane są w artykule Co, N.T. *et al. Heat-induced degradation of fibrils: Exponential vs. logistic kinetics.* J. Chem. Phys. 2020, 152, 115101 (udział doktoranta 50%). W tych badaniach użyto kulkowego i pełno-atomowego modelu peptydów. W modelu kulkowym, symulowanym w kilku temperaturach metodą MC, rejestrowano zanik w czasie kontaktów wewnątrz- i między-łańcuchowych w agregatach zbudowanych z 10, 16 i 28 cząsteczek. Agregaty peptydów w modelu pełno-atomowym poddano symulacjom MD z jawnym uwzględnieniem wody w trzech temperaturach. Zbudowano dwa agregaty; jeden składał się z 10 cząsteczek peptydu A $\beta$ 42, z którego usunięto 36 pierwszych reszt (A $\beta$ 37-42), a drugi z pięciu cząsteczek peptydu A $\beta$ 42, z którego usunięto 16 pierwszych reszt (A $\beta$ 17-42). W symulacjach MC modelu kulkowego otrzymano wyniki, które, zgodnie z wynikami eksperymentalnymi przewidują, że indukowana termicznie degradacja agregatów w funkcji czasu jest dla każdej badanej temperatury opisana funkcją dwu-wykładniczą. Przewidziano również, że zmiana w czasie wielkości agregatu wywołana termiczną dysocjacją pojedynczych peptydów, jest dla badanych temperatur opisana funkcją logistyczną. Ta funkcja, powyżej krytycznej wielkości agregatu, tj. początkowo, maleje wolno, a poniżej tej wielkości, tj. dla dłuższych czasów, maleje szybko. Zmiany wielkości agregatu są wolniejsze, gdy możliwa jest re-agregacja peptydów. Symulacje MD modelu pełno-atomowego wykazały podobną zależność funkcyjną zmiany w czasie wielkości agregatu na skutek termicznej dysocjacji pojedynczych peptydów, jak symulacje MC z re-agregacją.

Dwu-wykładnicza zależność czasowa destabilizacji termicznej agregatu peptydów przewidziana w symulacjach MC jest zgodna z wynikami eksperymentalnymi. Taka zależność

jest wynikiem zerwania oddziaływań między peptydami na skutek deformacji ich struktur  $\beta$ . Z kolei, wyniki eksperymentalne wskazywały na mono-wykładniczą zależność czasową zmiany wielkości agregatu na skutek termicznej dysocjacji peptydów. Ta zależność obowiązywała dla długich czasów. Nowością omawianej pracy było wykazanie, że cały przebieg czasowy procesu dysocjacji termicznej peptydów z agregatu jest opisany funkcją logistyczną. Autorzy pokazali, że poniżej pewnej wielkości pozostałego agregatu, tj. dla długich czasów, ta funkcja zachowuje się jak funkcja mono-wykładnicza, co jest w zgodzie z wynikami eksperymentalnymi.

Rozdział piąty (*Conclusions and Future Work*) jest podsumowanie najważniejszych wyników i zawiera też plany przyszłych badań.

Zarówno publikacje, na których oparta jest rozprawa doktorska mgr Nguyen Truong Co, jak i sama rozprawa napisane są bardzo dobrze – informacje zawarte w tekstach są zwięzłe, ale wyczerpująco i interesująco podane. Autorzy prac, jak i autor rozprawy dołożyli wszelkich starań, aby jednoznacznie przedstawić czytelnikowi cele, metody i wyniki prowadzonych badań. Nie ma w tych pracach niejasności. Poza tym prace są bardzo starannie ilustrowane, co doskonale uzupełnia i wyjaśnia informacje słowne.

Z punktu widzenia edytorskiego, znalazłam w tekście kilka pomyłek i literówek, ale nie zmieniały one sensu przekazywanych informacji. Nie mam podstaw, aby oceniać poprawność języka angielskiego, w którym napisana jest praca, ale czytając pracę miałam wrażenie, że doktorant swobodnie i prawidłowo posługuje się tym językiem.

Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym wymaga, aby rozprawa doktorska stanowiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazywała ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktoranta. Na podstawie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgra Nguyen Truong Co stwierdzam, że potrafi on samodzielnie i umiejętnie rozwiązywać postawione przed nim problemy naukowe oraz że posiada ogólną i szczegółową wiedzę teoretyczną w dziedzinie biofizyki, a także umiejętności w zakresie zastosowań zaawansowanych metod obliczeniowych do badania układów biocząsteczkowych. Dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Instytutem Fizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgra Nguyen Truong Co do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Wasieleski ew. A. Ciemula