



Uniwersytet
Gdański



Związek
Uczelni
Fahrenheita

Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Gdańsk, dnia 10.06.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Nguyena Truonga Co
pt. „Study of factors governing mechanism of protein aggregation
by using computer simulation”**

Agregacja peptydów i białek ma ogromne znaczenie w funkcjonowaniu żywych organizmów, pełniąc zarówno rolę funkcjonalną (np. w krzepnięciu krwi) jak i destrukcyjną, powodując choroby konformacyjne. Agregacja peptydów jest również wykorzystywana w tworzeniu bio-nanomateriałów, mających zastosowanie np. jako otoczki cząsteczek leków lub jako części opatrunków na zranienia czy oparzenia. Pomimo intensywnych badań prowadzonych od wielu lat, struktury agregatów oraz mechanizmy ich tworzenia nie zostały w pełni poznane. Badanie agregacji peptydów i białek jest tym trudniejsze, że jedynie struktury w pełni uformowanych agregatów, zwanych amyloidami, są możliwe do eksperymentalnego określenia, natomiast najbardziej toksyczne dla komórek oligomery i agregaty o stosunkowo małej masie cząsteczkowej oraz agregaty peptydów wykorzystywane w opatrunkach mają strukturę słabo zdefiniowaną. Ponadto długi czas agregacji stanowi dużą uciążliwość, zarówno w badaniach teoretycznych, jak i doświadczalnych.

Rozprawa doktorska pana mgra Nguyena Truonga Co dotyczy teoretycznych badań nad wpływem różnych czynników na agregację oraz mechanizmami termicznego rozpadu agregatów peptydów. Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Maisuana Li, który jest jednym z najlepiej rozpoznawalnych w świecie naukowców zajmujących się teoretycznymi badaniami nad agregacją. Rozprawa powstała na podstawie 3 publikacji, z których jedna została opublikowana w *Biomolecules* a dwie w *Journal of Chemical Physics*. Kandydat jest pierwszym autorem dwóch z nich a załączone oświadczenia współautorów dowodzą jego dominującego lub bardzo istotnego wkładu w ich utworzenie. Wszystkie czasopisma, w których opublikowano materiał rozprawy mają znakomitą renomę w naukach przyrodniczych. Oprócz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, Kandydat ma w swoim dorobku 5 innych związanych tematycznie publikacji oraz 1 rozdział w książce. Jest ponadto autorem jednej prezentacji konferencyjnej.

Przedstawiony do recenzji tekst rozprawy składa się z wprowadzenia (rozdział 1), przeglądu literaturowego (rozdział 2), opisu metod obliczeniowych (rozdział 3), załączonych oryginalnych trzech wspomnianych publikacji, z których każda jest poprzedzona syntetycznym jej

omówieniem, abstraktem oraz oświadczeniami współautorów i Kandydata (rozdział 4) oraz wniosków, wraz ze wskazaniem przyszłych badań (rozdział 5). Ta główna część rozprawy jest poprzedzona deklaracją Kandydata odnośnie autorstwa pracy, syntetycznym streszczeniem, wykazem publikacji stanowiących podstawę rozprawy, spisem treści oraz listą rysunków i tabel. Po głównym tekście rozprawy następuje spis literatury. Całość rozprawy została napisana w języku angielskim.

Rozdział pierwszy składa się z dwóch części, z których pierwsza jest zatytułowana „Motivation” i zawiera cel pracy oraz krótką charakterystykę przeprowadzonych badań i drugiej zatytułowanej „Other important information”, zawierającej spis treści głównej części rozprawy, listę publikacji stanowiących podstawę rozprawy, listy pozostałych publikacji i prezentacji konferencyjnych oraz informację o liczbie cytowań i indeksie Hirscha Kandydata. Informacja o głównym celu pracy znajduje się w pierwszym akapicie pierwszej części rozdziału. Wynika z niej, że było nim zbadanie, metodami symulacyjnymi, czynników wpływających na agregację peptydów. W dalszych akapitach pojawiają się cele szczegółowe, pozwalające czytelnikowi zorientować się, że chodziło o zbadanie wpływu oddziaływań z powierzchnią i zawartości struktur drugorzędowych w monomerze na szybkość agregacji oraz zbadanie mechanizmów dysocjacji agregatów. Opis celów szczegółowych rozprawy jest jednak przemieszany z nawiązaniem do uzyskanych wyników. Uważam, że cele rozprawy powinny być jaśniej wyodrębnione. Z kolei druga część rozdziału zawiera informacje już podane w preambule (część spisu treści i lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy).

Rozdział drugi składa się z trzech części. W części pierwszej Autor omawia kinetykę procesu agregacji w świetle teorii krajobrazów energii, następnie struktury fibryli amyloidowych oraz choroby konformacyjne, których przyczyną jest agregacja peptydów i białek. Bardzo dobrą ilustracją faz procesu agregacji jest rysunek 2. Ta część rozdziału jest napisana bardzo jasnym językiem i zawiera istotne informacje, jednak nie powinna być zatytułowana „Protein self assembly kinetics”, ponieważ omawiane w niej zagadnienie są znacznie szersze. Nieco mylące jest zdanie na stronie 5 zaczynające się w 3 linii części 2.1, „*A protein functions correctly if it can adopt a specific compact and energetically favorable three-dimensional structure called a folded structure or native state*” – to stwierdzenie nie dotyczy białek wewnątrznie nieuporządkowanych, o których Autor pisze w dalszej części rozprawy, a którym właśnie plastyczność umożliwia pełnienie różnorodnych funkcji. W drugiej części rozdziału są omówione czynniki wpływające na agregację. Ta część jest napisana znakomicie i stanowi doskonałą syntezę zagadnienia. W trzeciej części rozdziału są omówione modele używane w badaniach teoretycznych agregacji peptydów i białek, które Autor dzieli na pełnoatomowe, gruboziarniste i siatkowe. Uważam, że ta część powinna się znaleźć w rozdziale 3, który jest poświęcony metodom obliczeniowym.

Podział modeli podany przez Autora w sekcji 2.3 uważam za nienajlepszy. Siatka lub przestrzeń ciągła stanowią wybór reprezentacji przestrzeni. Natomiast reprezentowanie molekuly w postaci atomów (modele pełnoatomowe) lub centrów oddziaływań obejmujących wiele atomów (modele gruboziarniste) wiąże się z pominięciem odpowiedniej części stopni swobody – elektronów w reprezentacji pełnoatomowej lub innych niż kolektywne stopnie swobody całych grup atomów w reprezentacji gruboziarnistej. W każdym z tych przypadków te pominięte stopnie swobody muszą być uwzględnione w funkcji efektywnej energii potencjalnej. Zarówno modele pełnoatomowe, jak i gruboziarniste można przedstawiać w przestrzeni ciągłej lub dyskretnej (siatka), jakkolwiek znacznie częściej używa się dyskretnej reprezentacji przestrzeni dla modeli gruboziarnistych. Dlatego z pewnością byłoby mówić o modelach pełnoatomowych (przestrzeń ciągłą) oraz modelach gruboziarnistych w przestrzeni ciągłej lub na siatce, zresztą Kandydat

taki podział przyjmuje w dalszej części rozprawy. Omawiając modele gruboziarniste w reprezentacji siatkowej, Autor powinien wspomnieć o modelu CABS grupy prof. Kolińskiego który, w przeciwieństwie do modeli siatkowych omówionych w rozprawie, umożliwia symulacje rzeczywistych białek, czego dowodem są znakomite wyniki uzyskane przez tę grupę w eksperymentach CASP przewidywania struktur białek.

W rozdziale trzecim Kandydat omawia metody obliczeniowe. W pierwszej części rozdziału jest omówiona metoda Monte Carlo Metropolisa, w drugiej gruboziarnisty model łańcuchów polipeptydowych Li-Klimova-Strauba-Thirumalai, który stanowił podstawę większości obliczeń Kandydata. W modelu tym łańcuch polipeptydowy jest zredukowany to śladu atomów węgla α , umieszczonych na siatce sześcienniej, z prostymi potencjałami kontaktowymi. W tej części są również omówione modele siatkowe powierzchni. W części 3, Autor pokrótce charakteryzuje dynamikę Langevina. W tym miejscu powinna znaleźć się informacja o pełnoatomowych polach siłowych używanych w rozprawie. Końcowe dwie części dotyczą odpowiednio sterowanej dynamiki molekularnej oraz metod analizy wyników symulacji gruboziarnistych i pełnoatomowych.

Rozdział czwarty zawiera wyniki uzyskane w rozprawie. Jego integralną częścią są 3 oryginalne publikacje Kandydata, będące podstawą rozprawy. Ten materiał został już oceniony pozytywnie pod względem merytorycznym przez recenzentów publikacji. Uzyskane wyniki są podsumowane i przedyskutowane w rozdziale piątym. W badaniach Kandydat prowadził symulacje gruboziarniste metodą Monte Carlo, z użyciem modelu Li-Klimova-Strauba-Thirumalai (wszystkie 3 prace) oraz pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej z użyciem pól siłowych OPLS (praca 2) i AMBER (praca 3).

Poniżej podaję krótkie zestawienie najważniejszych moim zdaniem osiągnięć Kandydata, uzyskanych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej.

1. Wprowadzenie siatkowej reprezentacji powierzchni do modelu Li-Klimova-Strauba-Thirumalai, co umożliwiło jego rozszerzenie na badania agregacji w obecności powierzchni o różnym stopniu chropowatości i sile oddziaływań z peptydami. Kandydat wykazał, że średnio silne oddziaływania peptydów z powierzchnią powodują przyspieszenie agregacji, wskutek częściowego ograniczenia swobody konformacyjnej łańcuchów, natomiast słabe lub silne oddziaływanie z powierzchnią obniża szybkość agregacji. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami niezależnych eksperymentów.
2. Pokazanie, metodą symulacji pełnoatomowych monomerów amyloidogennego peptydu $A\beta_{42}$ oraz jego 19 mutantów, że szybkość agregacji jest wprost skorleowana z zawartością struktury drugorzędowej w monomerze oraz wyprowadzenie zależności korelacyjnej pomiędzy zmianą szybkości agregacji a zawartością struktury β w monomerze, hydrofobowością oraz zmianą ładunku pod wpływem mutacji.
3. Opracowanie fenomenologiczno-analitycznej teorii, opisującej mechanizm dysocjacji monomerów z fibryli pod wpływem temperatury, która obejmuje zarówno przypadek, gdy oddysocjowane monomery pozostają w środowisku, z możliwością ponownego dołączenia do fibryli, jak i przypadek usuwania monomerów ze środowiska. Wyprowadzone równanie kinetyczne ma postać równania logistycznego, którego rozwiązanie przechodzi w zależność eksponencjalną po osiągnięciu krytycznego stężenia fibryli. Teorię tę Kandydat potwierdził symulacjami z użyciem modelu Li-Klimova-Strauba-Thirumalai oraz symulacji pełnoatomowych. Uzyskane wyniki są zgodne z dostępnymi danymi eksperymentalnymi.

W czasie lektury rozprawy nasunęły mi się trzy następujące uwagi merytoryczne:

1. W pracy 2 stanowiącej część rozprawy (Thu, Co, Tu, Li, *J. Chem. Phys.* **150**, 225101 (2019) nie znalazłem informacji o tym, z jakich struktur były startowane pełnoatomowe obliczenia MD z wymianą replik peptydu A β 42 i jego mutantów. Czy była to eksperymentalna struktura typu dzikiego (PDB: 6SZF)? Co prawda metoda wymiany replik jest stosunowo mało czuła na konfigurację początkową układu, tym niemniej informacja o starcie powinna być podana.
2. Dlaczego w pracy 2 do określenia średnich po zespole z symulacji wymiany replik nie używano metody ważonych histogramów (WHAM) a wzięto tylko dane z replik dla wybranych temperatur? Użycie WHAM w wersji „bezbindowej” umożliwiłoby poprawienie statystyki.
3. Jaki może być sens fizyczny wprowadzenia wkładu z Θ^2 w równaniu 3 w pracy 3? Wkład ten zmienia kształt zależności czasowej Θ na ten odpowiadający krzywej logistycznej, jednak zapewne istnieje wiele modyfikacji, które dają podobny kształt rozwiązania równania kinetycznego.

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

Strona 10, linia 12 sekcji „Temperature”: ...*proteins complicatedly influent*.... Słowo *influent* jest użyte jako czasownik a nie może nim być; powinno być *influence* albo *affect*.

Strona 14, linia 1 sekcji „Charge”: ...*peptides the solubility*..., powinno być ...*the peptide solubility*...

Strona 16, sekcja 2.3.1.: Po równaniu 3 zamiast *the detail information* powinno być *the detailed information*.

Strona 21: Początek sekcji: *Li et al. were built*..., powinno być *Li et al. have built*.... Zamiast *The energy of N peptides*... powinno być *The energy of a N-peptide-chain system*..., ponieważ inaczej można równie dobrze zrozumieć zdanie jako odnoszące się do energii N różnych (izolowanych) peptydów.

Strona 27: Powinno być odniesienie do rysunku 11A i B a nie do 10A i B. W równaniu 10 wyrażenie pod znakiem sumy powinno być podniesione do kwadratu (w oryginalnej publikacji jest poprawnie). Nie zdefiniowano wielkości *h*.

Strona 49, linia 3: Zamiast *Contradict to the case*... powinno być *Contrary to the case*... lub *In contrast to the case*....

Strona 62, pierwszy akapit, linia 2: Zamiast ...*much toxic than mature fibrils*... powinno być ...*more toxic than mature fibrils*...

Rozprawę doktorską p. mgra Nguyena Truonga Co oceniam bardzo wysoko. Kandydat wzbogacił model gruboziarnisty Li-Klinova-Strauba-Thirumalai o oddziaływanie z powierzchnią, co istotnie rozszerza możliwości badania agregacji. Opracował oryginalny

analityczno-fenomenologiczny model dysocjacji monomerów z fibryli, wprowadzając do opisu tego zjawiska oryginalne równanie logistyczne. Wyprowadził zależność pomiędzy zmianą szybkości agregacji amyloidogenego peptydu A β 42 pod wpływem mutacji a zmianą zawartości struktury β , hydrofobowości i ładunków poszczególnych reszt. Badania wykonał rzetelnie i starannie. Wymienione powyżej uwagi krytyczne, z których część ma charakter dyskusyjny, nie umniejszają w istotny sposób jej wartości. Rozprawa zdecydowanie spełnia 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 Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizyki PAN o dopuszczenie p. mgra Nguyena Truonga Co do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wybitny charakter oraz wysoką wartość naukową rozprawy, stawiam wniosek o jej wyróżnienie. Uzasadnienie wniosku załączam.



prof. dr hab. Józef Adam Liwo



Uniwersytet
Gdański



Związek
Uczelni
Fahrenheita

Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk

Gdańsk, dnia 10.06.2022

**Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
Pana magistra Nguyena Truonga Co
pt. „Study of factors governing mechanism of protein aggregation
by using computer simulation”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgra Nguyena Truonga Co dotyczy badań nad mechanizmami agregacji peptydów amyloidogennych. Zagadnienie to jest niezwykle ważne w biologii i medycynie. Kandydat przeprowadził szeroko zakrojone badania symulacyjne, zarówno przy użyciu minimalnego modelu gruboziarnistego Li-Klimova-Strauba-Thirumalai, który rozszerzył na oddziaływanie peptydów z powierzchniami, jak i modeli pełnoatomowych, z użyciem pól siłowych OPLS i AMBER. Uzyskane przezeń wyniki wnoszą znaczący wkład do poznania mechanizmów i warunków asocjacji peptydów. W szczególności Kandydat udowodnił, że szybkość agregacji ulega zwiększeniu na powierzchniach średnio silnie oddziałujących z peptydami, zaproponował zależność pomiędzy zmianą szybkości agregacji pod wpływem mutacji peptydu amyloidogennego A β 42 a zawartością struktury β w izolowanym peptydzie oraz zmianą hydrofobowości i ładunków reszt aminokwasowych oraz wykazał, że kinetykę oddysocjowywania monomerów od agregatów opisuje równanie logistyczne. Badania zostały wykonane a ich wyniki opracowane bardzo profesjonalnie. Materiał rozprawy został opublikowany w postaci trzech publikacji w czasopismach z listy ISI, w dwóch z których p. mgr Nguyen Truong Co jest pierwszym autorem. Uważam, że rozprawa zdecydowanie wybija się ponad poziom typowych rozpraw doktorskich z zastosowań metod obliczeniowych w biofizyce. Ponadto Kandydat ma w swoim dorobku 5 innych związanych tematycznie prac i 1 rozdział w książce. Dlatego wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

prof. dr hab. Józef Adam Liwo