

Załącznik 3

AUTOREFERAT

Paweł Krupa

Warszawa, 10.09.2024

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne.....	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego.....	2
5. Osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.....	4
5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
5.2 Lista powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu.....	4
5.3 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego zastosowania.....	5
5.3.1 Cel, motywacja i podstawowe założenia przy wykonywaniu badań.....	5
5.3.2 Streszczenie wykonanych badań.....	6
5.3.3 Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki.....	8
5.3.4 Podsumowanie znaczenia publikacji.....	35
5.4 Wyniki spoza cyklu publikacji opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora.....	36
5.5 Wyniki spoza cyklu publikacji opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora.....	39
5.5.1 Przewidywanie struktury i dynamiki białek i ich kompleksów.....	39
5.5.2 Określenie podstaw molekularnych potencjalnej nanotoksyczności molekuł.....	40
5.5.3 Badania koncentrujące się na roli i wpływie błon lipidowych na białka oraz wpływie różnych molekuł na dwuwarstwy lipidowe.....	41
5.5.4 Ustalenie podstaw molekularnych mechanicznej stabilności kwasów nukleinowych o określonych sekwencjach.....	41
5.5.5 Pozostałe prace naukowe.....	42
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	46
6.1 Staże naukowe w jednostkach zagranicznych w latach 2012-2016.....	46
6.2 Krótkoterminowe wizyty naukowe w jednostkach zagranicznych w latach 2015-2019.....	47
6.3 Ważniejsze współprace naukowe z ośrodkami zagranicznymi w latach 2019-2024.....	48
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	48
7.1 Prowadzenie zajęć dla studentów.....	48
7.2 Promowanie studentów.....	49
7.3 Działania organizacyjne i popularyzujące naukę.....	49
8. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	49
8.1 Projekty naukowe udzielane na poziomie ogólnokrajowym, w których habilitant występuje w funkcji kierownika.....	49
8.2 Działalność recenzencka.....	49
8.3 Wykłady na zaproszenie wygłoszone na konferencjach o międzynarodowym charakterze.....	50
8.4 Pozostałe wykłady wygłoszone na konferencjach o międzynarodowym charakterze.....	50
9. Bibliografia.....	50

1. Imię i nazwisko

Paweł Krupa

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

- Stopień doktora nauk chemicznych nadany z wyróżnieniem przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w dniu 08.07.2015 na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem: Rozszerzenie pola siłowego UNRES o potencjały lokalne i dane z metod porównawczych w celu lepszego przewidywania struktur białek. Promotor: Prof. dr hab. Cezary Czaplewski.
- Tytuł zawodowy magistra nauk chemicznych, specjalność chemioinformatyka, nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 2011. Promotor: Dr Magdalena Ślusarz.
- Tytuł zawodowy licencjata nauk chemicznych, specjalność chemia medyczna, nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 2009. Promotor: Dr Magdalena Ślusarz.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.09.2016 – obecnie adiunkt w Oddziale Fizyki Teoretycznej, Zespole Biofizyki Teoretycznej, Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa.
- 01.08.2015 – 31.07.2016 staż podoktorski (z ang. postdoctoral associate) w grupie Profesora Harolda Scheragi w Baker Laboratory of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- 17.11.2014 – 01.05.2015 asystent naukowy (Research Aide) w grupie Profesora Andrzeja Kłoczowskiego w Battelle Center for Mathematical Medicine, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital and Ohio State University w Columbus, OH, USA.
- 08.10.2014 – 31.07.2015 specjalista analityk w Centrum Informatycznym Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej (CI TASK), Politechnika Gdańska, Gdańsk.

4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego

Aktualne dane bibliograficzne mogą zostać sprawdzone przy użyciu następujących identyfikatorów habilitanta:

- Open Researcher and Contributor ID (ORCID): 0000-0002-9710-7837
- ResearcherID: S-2292-2016

Wybrane dane bibliometryczne:

- **Web of Science Core Collection:**
 - 45 pozycji (liczone tylko pełne artykuły naukowe)
 - 833 cytowań (640 bez autocytowań)
 - 448 cytujących artykułów
 - H-index = 18
 - i10-index = 26.

- **Google Scholar:**

- 95 pozycji (liczone wszystkie pozycje)
- 1155 cytowań
- H-index = 21 (od 2019 roku: 19)
- i10-index = 28 (od 2019 roku: 24).

Dla przejrzystości, podsumowanie aktualnych wartości współczynników wpływu (z ang. impact factor) oraz punktów ministerialnych zestawilem w postaci Tabeli 1.

Tabela 1. Podsumowanie artykułów w czasopismach i rozdziałach w książkach posiadających przypisaną wartość współczynnika wpływu (Impact Factor, dane z Web of Science, maj 2024) i/lub liczbę punktów ministerialnych (wykaz z 05.01.2024).

Czasopismo	Impact Factor	Impact Factor pięcioletni	Liczba punktów MEiN	Liczba publikacji
Proceedings of the National Academy of Sciences	11,1	12	200	2
Nanoscale	6,7	6,8	140	1
Bioinformatics	5,8	8,3	200	2
Journal of Chemical Information and Modeling	5,6	5,9	100	4
Journal of Molecular Biology	5,6	5,5	140	1
International Journal of Molecular Sciences	5,6	6,2	140	2
Journal of Chemical Theory and Computation	5,5	5,8	140	3
Chemico-Biological Interactions	5,1	4,9	100	1
Scientific Reports	4,6	4,9	140	1
Molecules	4,6	4,9	140	1
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics	4,4	3,8	70	1
The Journal of Chemical Physics	4,4	3,5	100	1
Progress In Molecular Biology And Translational Science	4	5,3	100	1
Genes	3,5	3,9	100	1
BBA Biomembranes	3,4	3,5	100	1
The Journal of Physical Chemistry B	3,3	3	140	10
Journal of Computational Chemistry	3	3,3	100	1
Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	2,9	2,9	100	4
Journal of Molecular Graphics and Modelling	2,9	2,4	70	4
Journal of Molecular Modeling	2,2	1,8	40	2
Methods in Molecular Biology	0	0	70	3
Supercomputing Frontiers and Innovations	0	0	70	1
TASK Quarterly	0	0	20	3
Suma	193,8	199,1	5630	51

5. Osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Rozwój i wykorzystanie pól siłowych o różnych poziomach rozdzielczości do badania struktury i dynamiki wybranych białek

5.2 Lista powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu

H1. **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Marta Wiśniewska, Yanping Yin, Yi He, Adam K. Sieradzan, Robert Ganzynkowicz, Agnieszka G. Lipska, Agnieszka Karczyńska, Magdalena Ślusarz, Rafał Ślusarz, Artur Giełdoń, Cezary Czaplewski, D. Jagieła, B. Zaborowski, Harold A. Scheraga*, Adam Liwo, “Performance of protein-structure predictions with the physics-based UNRES force field in CASP11”, *Bioinformatics* 2016, 32(21), 3270-3278.

H2. **Paweł Krupa**, Anna Hałabis, Wioletta Żmudzińska, Stanisław Ołdziej, H.A. Scheraga, Adam Liwo*, “Maximum Likelihood Calibration of the UNRES Force Field for Simulation of Protein Structure and Dynamics”, *Journal of Chemical Information and Modeling* 2017, 57 (9), 2364-2377.

H3. Nguyen Hoang Linh, **Paweł Krupa**, Minh Hai Nguyen, Huynh Quang Linh, Mai Suan Li*, “Structure and physicochemical properties of A β 42 tetramer: Multi-scale molecular dynamics simulations”, *Journal of Physical Chemistry B* 2019, 123, 7253–7269.

H4. **Paweł Krupa***, Pham Dinh Quoc Huy, and Mai Suan Li*, “Properties of Monomeric A β 42 Probed by Different Sampling Methods and Force Fields: Role of Energy Components”, *The Journal of Chemical Physics* 2019, 151(5), 055101.

H5. Daniela Marasco⁺, Caterina Vicidomini⁺, **Paweł Krupa**⁺, Federica Cioffi, Pham Dinh Quoc Huy, Mai Suan Li, Daniele Florio, Kerensa Broersen, Maria Francesca De Pandis, Giovanni N Roviello*, “Plant isoquinoline alkaloids as potential neurodrugs: A comparative study of the effects of benzo [c] phenanthridine and berberine-based compounds on β -amyloid aggregation”, *Chemico-Biological Interactions* 2021 334, 109300.

H6. Yuliia Varenyk, Panagiotis E. Theodorakis, Dinh Q. H. Pham, Mai Suan Li, and **Paweł Krupa***, “Exploring Structural Insights of A β 42 and α -Synuclein Monomers and Heterodimer: A Comparative Study Using Implicit and Explicit Solvent Simulations”, *J. Phys. Chem. B* 2024, 128 (19), 4655–4669.

H7. **Paweł Krupa**, Giovanni La Penna*, Mai Suan Li, “Amyloid- β Tetramers and Divalent Cations at the Membrane/Water Interface: Simple Models Support a Functional Role”, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24 (16), 12698.

H8. Natalia Karska, Igor Zhukov, Andrea D Lipińska, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, **Paweł Krupa***, “Why does the herpes simplex 1 virus-encoded UL49. 5 protein fail to inhibit the TAP-dependent antigen presentation?”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2023, 1865 (8), 184200.

H9. **Paweł Krupa***, “Treatment of disulfide bonds in coarse-grained UNRES force field”, *TASK Quarterly* 2016, 20 (4), 393-398.

H10. **Paweł Krupa**, Adam K. Sieradzan, Magdalena A. Mozolewska, Huiyu Li, Adam Liwo, and Harold A. Scheraga*, “Dynamics of Disulfide-Bond Disruption and Formation in the Thermal Unfolding of Ribonuclease A”, *Journal of Chemical Theory and Computation* 2017, 13 (11), 5721–5730.

H11. Pamela Smardz, Adam K. Sieradzan*, **Paweł Krupa***, “Mechanical Stability of Ribonuclease A Heavily Depends on the Redox Environment”, The Journal of Physical Chemistry B 2022, 126, 33, 6240–6249.

H12. **Paweł Krupa**, Agnieszka G. Karczyńska, Magdalena A. Mozolewska, Adam Liwo, Cezary Czaplewski*, “UNRES-Dock - protein-protein and peptide-protein docking by coarse-grained replica-exchange MD simulations”, Bioinformatics 2021 37 (11), 1613-1615.

H13. **Paweł Krupa***, Marta Spodzieja, Adam K. Sieradzan, “Prediction of CD28-CD86 protein complex structure using different level of resolution approach”, Journal of Molecular Graphics and Modelling 2021 103, 107802

*autor korespondencyjny

⁺autorzy o równym wkładzie do pracy

5.3 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego zastosowania

5.3.1 Cel, motywacja i podstawowe założenia przy wykonywaniu badań

Podstawowym celem wykonywanych przeze mnie badań naukowych było zbadanie właściwości strukturalnych, fizykochemicznych i dynamicznych jednych z najważniejszych z punktu widzenia życia biomakromolekuł – białek – przy użyciu metod biofizyki obliczeniowej na różnych poziomach rozdzielczości. Ze względu na nietrywialny charakter badanych układów uwzględniający białka zwinięte i inherentnie nieustrukturyzowane (IDP), różne formy oligomeryczne oraz obecność innych komponentów, takich jak inne białka, jony metali czy błony lipidowe, wykonane przeze mnie badania były wieloetapowe. W pierwszym kroku określałem możliwości istniejących metod obliczeniowych, następnie rozwijałem je lub udoskonalałem, jeśli okazało się to konieczne, a dopiero wtedy wykorzystywałem je do zbadania biologicznie istotnych właściwości. Ostatnim etapem było porównanie otrzymanych wyników z danymi eksperymentalnymi i dostępnymi danymi literaturowymi w celu określenia ich dokładności. Wykonywane przeze mnie badania mają charakter interdyscyplinarny i łączą biofizykę obliczeniową, bioinformatykę strukturalną, biologię molekularną, chemię teoretyczną i immunologię, często bazując na danych eksperymentalnych uzyskanych w ramach współprac naukowych w celu uzyskania możliwie wysokiej wiarygodności i otrzymania pełnego obrazu badanych zjawisk.

Dwoma podstawowymi narzędziami wykorzystywanymi i rozwijanymi podczas prowadzonych przeze mnie badań były: (i) gruboziarniste pole siłowe UNRES (D4), wchodzące w skład pakietu UNICORN (R3), rozwijane w grupie Profesora Adama Liwo z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a wcześniej także przez grupę Profesora Harolda Scheragi z Cornell University, oraz (ii) pełnoatomowe pola siłowe Amber, rozwijane w ramach pakietów Amber i AmberTools głównie pod przewodnictwem Profesora Davida Case’a z Rutgers University.¹ W części przedstawianych badań obie metody zostały wykorzystane łącznie w celu podniesienia wiarygodności wykonywanych obliczeń oraz uzyskania pełnego obrazu obserwowanych zjawisk fizycznych na poziomie rozdzielczości białek i ich reszt aminokwasowych (reprezentacja gruboziarnista) i pojedynczych atomów (reprezentacja pełnoatomowa).

Przeprowadzone przeze mnie badania bazowały na różnych podstawowych założeniach, począwszy od tego, że struktura globularnych białek zależy od ich sekwencji (twierdzenie Anfinsena)², a aktywność większości białek, peptydów, ale także kwasów nukleinowych jest ściśle uzależniona od ich struktury i nawet jej niewielkie zaburzenia mogą mieć istotny wpływ na

aktywność i właściwości fizykochemiczne³. Prawdopodobnie najbardziej znanym przykładem tego, jak zamiana jednej reszty aminokwasowej w dużym białku może wywołać drastyczne zmiany dla całego organizmu jest anemia sierpowata, wywoływana przez mutację kwasu glutaminowego na walinę (Glu⁶Val), która powoduje tworzenie się agregatów hemoglobiny o odmiennej morfologii i tym samym zmniejszających efektywność transportowania tlenu przez erytrocyty w stosunku do białka natywnego⁴. Z drugiej jednak strony, istnieje grupa peptydów i białek, których fragmenty lub całe molekuly nie posiadają w fizjologicznych warunkach dobrze zdefiniowanej struktury. Są to tzw. białka inherentnie nieustrukturyzowane (z angielskiego: intrinsically disordered proteins, IDP)⁵. Do tej grupy należą między innymi peptydy amyloidu β ($A\beta$) i α -synukleina, których obecność jest ściśle związana z chorobami neurodegeneracyjnymi. Z kolei znajomość struktury i dynamiki białek jest niezbędna do przeprowadzenia większości badań w biofizyce obliczeniowej, do komputerowego projektowania substancji leczniczych oddziałujących z tymi białkami, czy badania i wpływania na proces agregacji. Ze względu na to, że subtelne zmiany peptydów i białek, jak i ich otoczenia mogą znacząco wpływać na badanie układy i ich właściwości, niezwykle istotne jest, aby używane metody oraz zaplanowane eksperymenty umożliwiły na osiągnięcie wystarczającej dokładności.

Chociaż istnieją metody obliczeniowe umożliwiające skuteczne przewidywanie struktury białek, w większości przypadków w oparciu o analizę statystyczną baz danych sekwencji i struktur białek, takie jak I-TASSER⁶, Robetta⁷, czy AlphaFold3⁸, skuteczność tych metod ograniczona jest głównie do pojedynczych białek jednodomenowych, o strukturze zbliżonej do białek o rozwiązanej eksperymentalnie konformacji. Dokładność tych metod jest szczególnie niska dla kompleksów białek i białek częściowo nieustrukturyzowanych, a dodatkowo nie dostarczają one żadnych informacji dotyczących dynamiki badanych układów oraz wpływu czynników zewnętrznych na ich strukturę i właściwości. Z tego powodu konieczne jest dalsze rozwijanie metod wykorzystujących pola siłowe oparte o fizykę oddziaływań, a nie dane statystyczne. Co więcej, w przypadku uniwersalnych pól siłowych, czyli takich, które nie są zoptymalizowane pod konkretny układ, zdolność przewidywania struktury białka jest doskonałym sposobem na przybliżoną ocenę ich wydajności w przewidywaniu także ich dynamiki i właściwości fizykochemicznych. Należy zaznaczyć, że właściwości te często są bardzo trudne lub wręcz niemożliwe do uzyskania eksperymentalnie. Zatem podstawowym celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie zdolności predykcyjnych dostępnych metod obliczeniowych, wytypowanie tych, które charakteryzują się najlepszą wiarygodnością, ich rozszerzenie o niezbędne funkcje i następnie wykorzystanie do zbadania wybranych układów białek, stanowiących wyzwanie dla istniejących metod, takich jak różne formy oligomeryczne i agregacja amyloidu β , kompleksy białek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu i białka zawierające wiązania disulfidowe, które mogą pełnić odmienne funkcje w białkach ustrukturyzowanych i tych nieposiadających stabilnej struktury.⁹

5.3.2 Streszczenie wykonanych badań

W ramach prezentowanego cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych w pierwszym kroku skupiłem się na opracowaniu zunifikowanego protokołu przewidywania struktury białek w polu siłowym UNRES oraz wykorzystaniu go do określenia, jedynie na podstawie sekwencji, struktur wszystkich 55 białek wytypowanych do przewidywania struktury w 11 edycji eksperymentu CASP (H1). Otrzymane wyniki umożliwiły mi dokonanie rzetelnej oceny metody i zaplanowanie wykonania optymalizacji wag potencjałów wchodzących w skład funkcji energii w gruboziarnistym polu siłowym UNRES bazując na danych eksperymentalnych z magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) dla 7 wybranych białek treningowych w różnych temperaturach, zawierających zarówno konformacje zwinięte, jak i częściowo rozwinięte (H2) w celu poprawy zdolności predykcyjnych metody.

Następnie wykorzystałem nowo zoptymalizowane gruboziarniste pole siłowe UNRES, które dzięki użyciu zróżnicowanych zespołów struktur treningowych charakteryzuje się dobrą zgodnością w przewidywaniu zarówno konformacji zwiniętych, jak i nieustrukturyzowanych (H2), do przewidzenia struktury i dynamiki tetramerycznej formy amyloidu β (H3). W celu określenia wiarygodności otrzymanych struktur oligomerów ich stabilność została przetestowana w dwóch wybranych pełnoatomowych polach siłowych oraz zestawiona z dostępnymi danymi literaturowymi. Równocześnie przeprowadziłem badania w pięciu pełnoatomowych polach siłowych z rodziny Amber i CHARMM, określając wydajność wybranych metod do przewidywania struktur i dynamiki inherentnie nieustrukturyzowanej monomerycznej formy amyloidu β wraz z określeniem wpływu poszczególnych członów energii potencjalnej odpowiedzialnych za różne właściwości fizykochemiczne (H4).

W celu dalszego zrozumienia czynników wpływających na proces agregacji amyloidu β określiłem mechanizm inhibicji tego procesu pod wpływem wybranych alkaloidów izochinolinowych na podstawie pełnoatomowych symulacji dynamiki molekularnej (H5). Otrzymane wyniki stanowią teoretyczne wytłumaczenie obserwacji eksperymentalnych prezentując jak powinowactwo różnych alkaloidów izochinolinowych wpływa na ich aktywność w inhibicji wczesnych etapów procesu agregacji (H5). Pokrewnym wykonanym przeze mnie badaniem było określenie molekularnych podstaw występowania choroby otępienia z ciałami Lewy'ego, DLB (od ang. dementia with Lewy bodies). W tym celu zaplanowałem i wykonałem badania mechanizmu agregacji monomerycznych form amyloidu β i α -synukleiny oraz porównanie ich form monomerycznych, homo- i heterodimerycznych (H6). Przeprowadzone badania wykazały znaczący wzrost struktur typu β w heterodimerze oraz zaproponowały stabilny model tej struktury.

Następnie zbadałem wpływ błony lipidowej oraz jonów miedzi na agregację, strukturę i dynamikę dimerów i tetramerów amyloidu β , wykorzystując różne warianty metod symulacji pełnoatomowych (H7). W ramach tej pracy określiłem także powinowactwo mono- i biwalentnych jonów metali z modelowymi homogenicznymi dwuwarstwami lipidowymi przy użyciu próbkowania parasolowego (z ang. "umbrella sampling") i szacowania potencjału średniej siły przy użyciu metody ważonych histogramów (z ang. WHAM). Następnie określiłem jak skład heterogenicznej błony lipidowej, zbliżonej składem do błon biologicznych występujących w warunkach fizjologicznych, wpływa na strukturę i dynamikę herpeswirusowego białka UL49.5 z dwóch wirusów w stosunku do prostych modeli homogenicznych składających jedynie się z łańcuchów 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC) (H8), używanych powszechnie zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i teoretycznych. Wykonane przeze mnie badania teoretyczne umożliwiły także na zdefiniowanie przyczyny braku aktywności inhibicyjnej jednego z nich w ludzkim organizmie (H8).

Równolegle z przedstawionymi powyżej badaniami zainteresowała mnie tematyka roli wiązań disulfidowych w białkach, a w szczególności ich wpływ na ścieżki zwijania i stabilność wybranych białek. Warto zaznaczyć, że wiązania te występują naturalnie w ponad 20% białek zdeponowanych w bazie PDB (z ang. Protein DataBank), ale są także często dodawane zarówno do nieustrukturyzowanych jak i zwiniętych peptydów i białek w trakcie badań eksperymentalnych w celu uzyskania określonego efektu. W celu określenia roli wiązań disulfidowych w wybranych białkach okazało się niezbędne wprowadzenie i udoskonalenie potencjału umożliwiającego dynamiczne tworzenie i zrywanie wiązań disulfidowych w trakcie symulacji w gruboziarnistym polu siłowym UNRES (H9 i H10). Następnie opracowany został analogiczny potencjał do pełnoatomowego pola siłowego Amber (H11) oraz wykonane zostały badania przy użyciu klasycznych, sterowanych i z wymianą replik symulacji dynamiki molekularnej w gruboziarnistym polu siłowym UNRES i pełnoatomowym Amber w celu określenia mechanicznej i termodynamicznej stabilności wiązań disulfidowych w rybonukleazie A i ich wpływu na stabilność tego białka (H10 i H11).

W trakcie wykonywania wyżej wymienionych badań, które nierzadko dotyczyły form oligomerycznych białek, opracowałem szereg narzędzi ułatwiających przygotowywanie i

analizowanie wyników, a także zaprojektowałem i zaimplementowałem funkcję umożliwiającą rutynowe przeprowadzanie przewidywania struktury kompleksów białko-peptyd i białko-białko w uprzednio zoptymalizowanym (H2) gruboziarnistym polu siłowym UNRES (H12). Początkowe składniki metody wykorzystałem do wygenerowania struktur początkowych heterodimeru amyloidu β i α -synukleiny (H6) i tetramerów amyloidu β (H7), a kompletny protokół dokowania typu białko-białko posłużył mi do przewidzenia struktury kompleksu białek CD28-CD86, istotnego w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Stabilność tak otrzymanych heterodimerów CD28-CD86 zweryfikowałem przy użyciu metod pełnoatomowych i dostępnych danych literaturowych wykazując dobrą wydajność metody (H13).

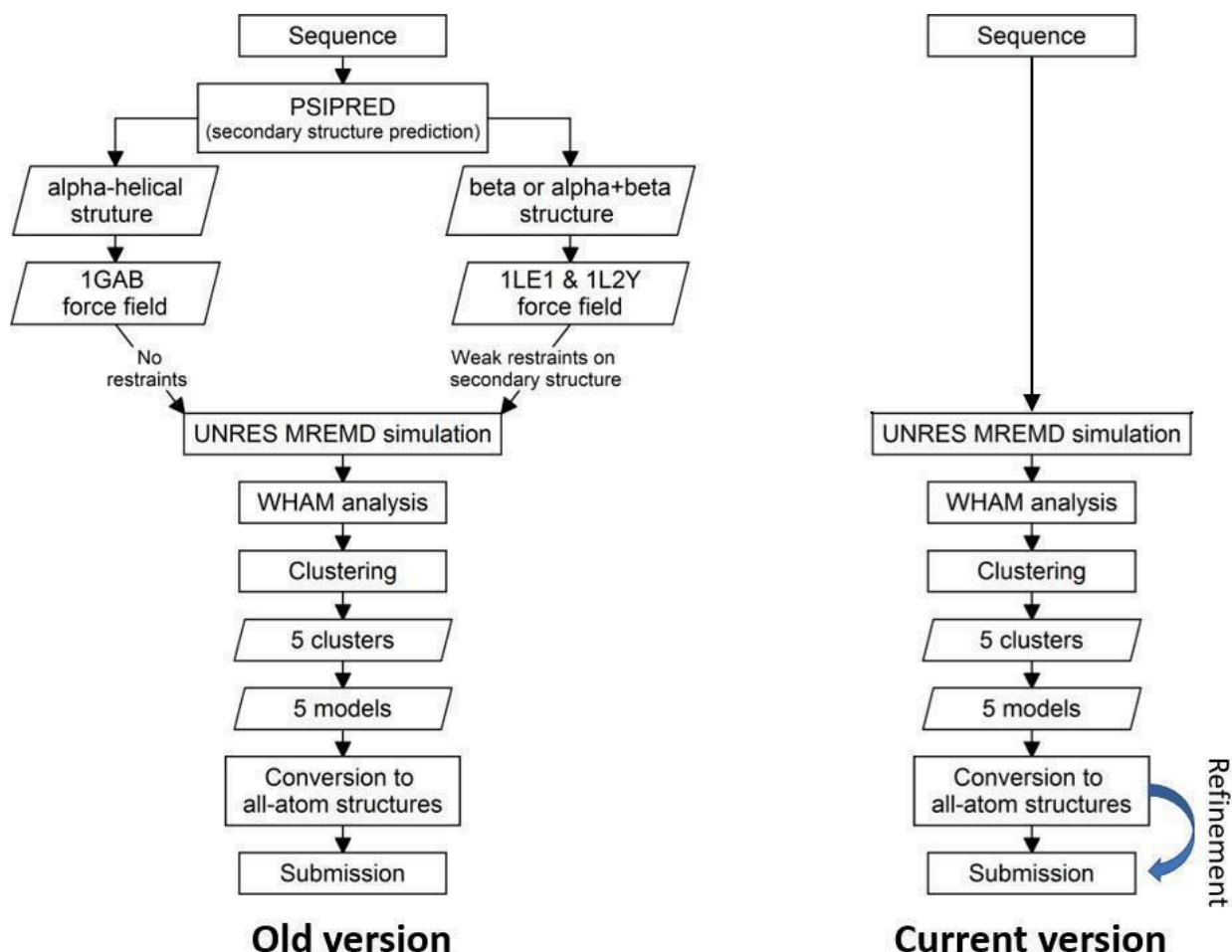
Podsumowując, wykonane w ramach cyklu powiązanych tematycznie publikacji badania naukowe można podzielić ze względu na nakładające się na siebie cele badawcze, które tworzą spójną całość prowadzącą do rozbudowy, poznania możliwości i ograniczeń metod i narzędzi stosowanych w biofizyce obliczeniowej, a następnie wykorzystanie ich do zbadania właściwości wybranych białek:

- Rozwój i optymalizacja gruboziarnistego pola siłowego UNRES (prace H1, H2, H10, H12)
- Rozwój i określenie możliwości predykcyjnych pól pełnoatomowych (prace H3, H4, H11)
- Wykorzystanie metod na różnych poziomach rozdzielczości w celu otrzymania pełnego obrazu badanego zagadnienia (H3, H13)
- Określenie właściwości fizykochemicznych, struktur i dynamiki wybranych białek (H1-H13)
 - Białek nieustrukturyzowanych (H3-H7)
 - Białek z wiązaniami disulfidowymi (H9-H11)
 - Białek w otoczeniu błon lipidowych (H7-H8)
 - Kompleksów białek (H3, H5-H7, H12-H13)

5.3.3 Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki

H1. Opracowanie jednolitego protokołu przewidywania struktur białek w polu siłowym UNRES w oparciu o fizykę oddziaływań oraz ocena możliwości predykcyjnych metody

Pierwszym krokiem w celu wykonania rzetelnej oceny możliwości predykcyjnych gruboziarnistego pola siłowego UNRES, rozbudowanego uprzednio o dodatkowy potencjał opisujący zachowanie łańcuchów bocznych oparty o fizykę oddziaływań, który umożliwił usunięcie członów korelacyjnych wyższych rzędów z równania energii (D5), było opracowanie zunifikowanego protokołu przewidywania struktur białek (H1) (Rysunek 1). Protokół ten bazuje w pełni na półautomatycznych krokach, nie wymagając manualnej ingerencji użytkownika na żadnym etapie, co jest szczególnie istotne w przypadku typowania struktur reprezentatywnych z symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik.¹⁰ W opracowanej wersji struktury reprezentatywne otrzymywane są poprzez wykonanie analizy skupień (z ang. clustering) zespołów konformacyjnych otrzymanych przy użyciu analizy metodą ważonych histogramów (WHAM)¹¹ poniżej otrzymanej temperatury przejścia fazowego w pełni bazując na analizie oszacowanej energii swobodnej konformacji. Opracowanie protokołu przewidywania struktur białek (Rysunek 1) wraz z dołączeniem do niego niezbędnych skryptów półautomatyzujących proces umożliwiło nie tylko na ułatwienie i przyspieszenie procesu, ale także unifikację wyników między różnymi użytkownikami oraz oparcie całego procesu przewidywania na fizyce oddziaływań i wyborze struktur reprezentatywnych na podstawie minimum energii swobodnej, zamiast manualnej selekcji.

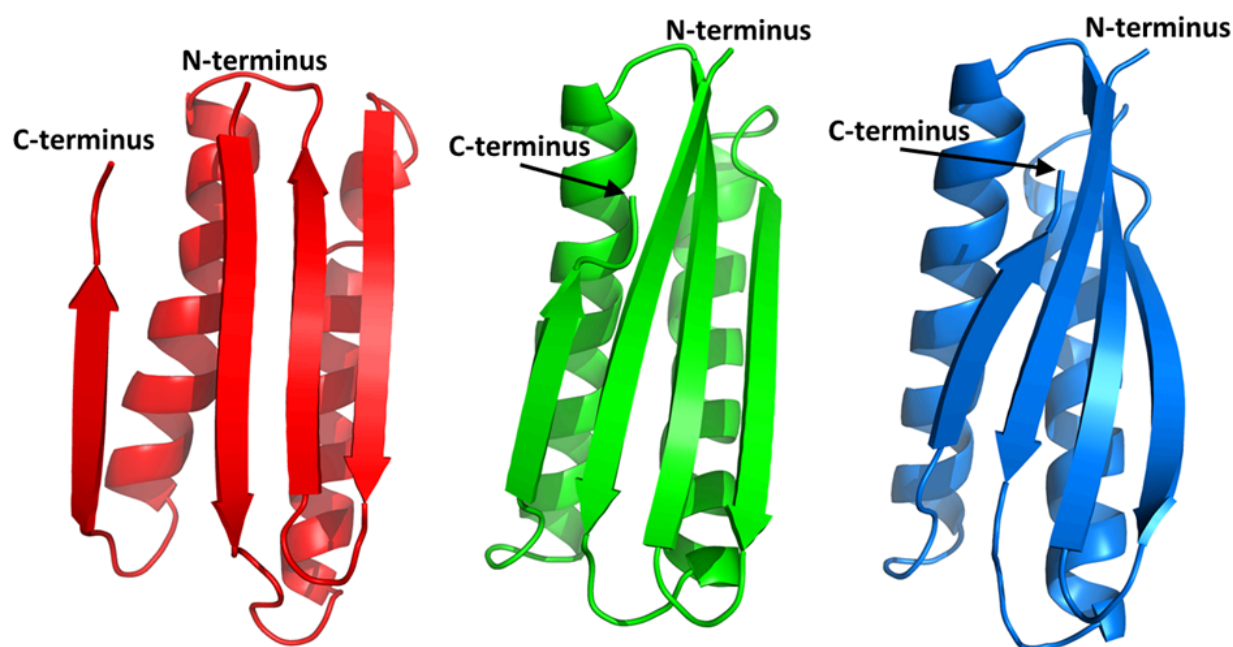


Rysunek 1. Schemat opracowanego protokołu zunifikowanego przewidywania struktury białka w polu siłowym UNRES (praca H1, lewy panel) oraz po optymalizacji pola siłowego (praca H2, prawy panel). Lewy panel rysunku pochodzi z pracy H1. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Bioinformatics, Volume 32, Issue 21, November 2016, Pages 3270–3278. Copyright 2024 Oxford University Press, licencja 5740260555795).

W celu osiągnięcia możliwie bezstronnej i rzetelnej oceny zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES przy użyciu opracowanego protokołu przewidywania struktur białek, wraz z grupą naukowców wziąłem udział w jedenastej edycji inicjatywy CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction)¹². Jest to odbywający się co dwa lata międzynarodowy eksperyment, w ramach którego co najmniej kilkadziesiąt grup badawczych z całego świata konkuruje ze sobą w celu jak najdokładniejszego przewidzenia struktury wybranych białek na podstawie samej sekwencji (tryb podstawowy) oraz przy użyciu dodatkowych danych eksperymentalnych (np. z eksperymentu SAXS). Najważniejszą zaletą tego eksperymentu jest to, że na takich samych warunkach, wszystkie grupy badawcze i metody obliczeniowe biorące udział w eksperymencie dokonują ślepego przewidzenia struktur białek, które nie zostały jeszcze opublikowane (najczęściej znajdują się w trakcie otrzymywania metodami eksperymentalnymi), w ściśle określonym zakresie czasu, wynoszącym najczęściej dwa tygodnie dla regularnego trybu przewidywania struktur. Wysyłane struktury białek są następnie analizowane przez zewnętrzny zespół ekspertów, a wyniki oficjalnie ogłaszane po kilku miesiącach na stronie internetowej eksperymentu CASP, prezentując dokładność poszczególnych metod przy użyciu obiektywnych miar i kryteriów. Z tego powodu, aby rzetelnie i bezstronnie przetestować opracowany protokół przewidywania struktur białek wykonałem symulacje dla większości z 55 różnych białek, których rozmiar wahał się od 44 do 595 reszt aminokwasowych, ze średnią wynoszącą 251 reszt, dostarczonych w formie sekwencji przez organizatorów eksperymentu CASP. Był to pierwszy tak obszerny test możliwości pola siłowego

UNRES, zawierający wyniki dla wszystkich białek biorących udział w tej edycji eksperymentu CASP. Co ważne, zbiór struktur zawierał w sobie zarówno białka jednodomenowe, jak i wielodomenowe o różnych typach struktur drugorzędowych, pozwalając na reprezentatywną ocenę jakości przewidywania struktur większości klas białek.

Poprawa funkcji energii pola siłowego UNRES oraz zastosowanie zunifikowanego protokołu przewidywania struktury białek eliminującego potrzebę ręcznego wybierania struktur reprezentacyjnych, a stosującego energię swobodną jako kryterium selekcji zaowocowało znaczącą poprawą otrzymanych wyników w stosunku do poprzedniego, zakrojonego na mniejszą skalę, testu w 10 edycji eksperymentu CASP (D1). Szczególnej poprawie uległa zdolność do prawidłowego uszeregowania jakości struktur spośród generowanych pięciu modeli reprezentacyjnych dzięki wykorzystaniu energii swobodnej jako kryterium do selekcji. Co więcej, wykonane badania wykazały, że pole siłowe UNRES jest w stanie prawidłowo przewidywać struktury wielu białek, konkurując z najlepszymi dostępnymi metodami, szczególnie gdy przewidywane struktury nie były podobne do białek o znanych strukturach. Z drugiej strony, wykonane testy wykazały, że ze względu na uproszczenia wynikające z gruboziarnistej reprezentacji, rozdzielczość pola siłowego UNRES jest ograniczona, dla przykładu osiągając wartość pierwiastka średniego odchylenia kwadratowego (RMSD) wynoszącą około 3.8 Å dla 97-resztowego białka (Rysunek 2).

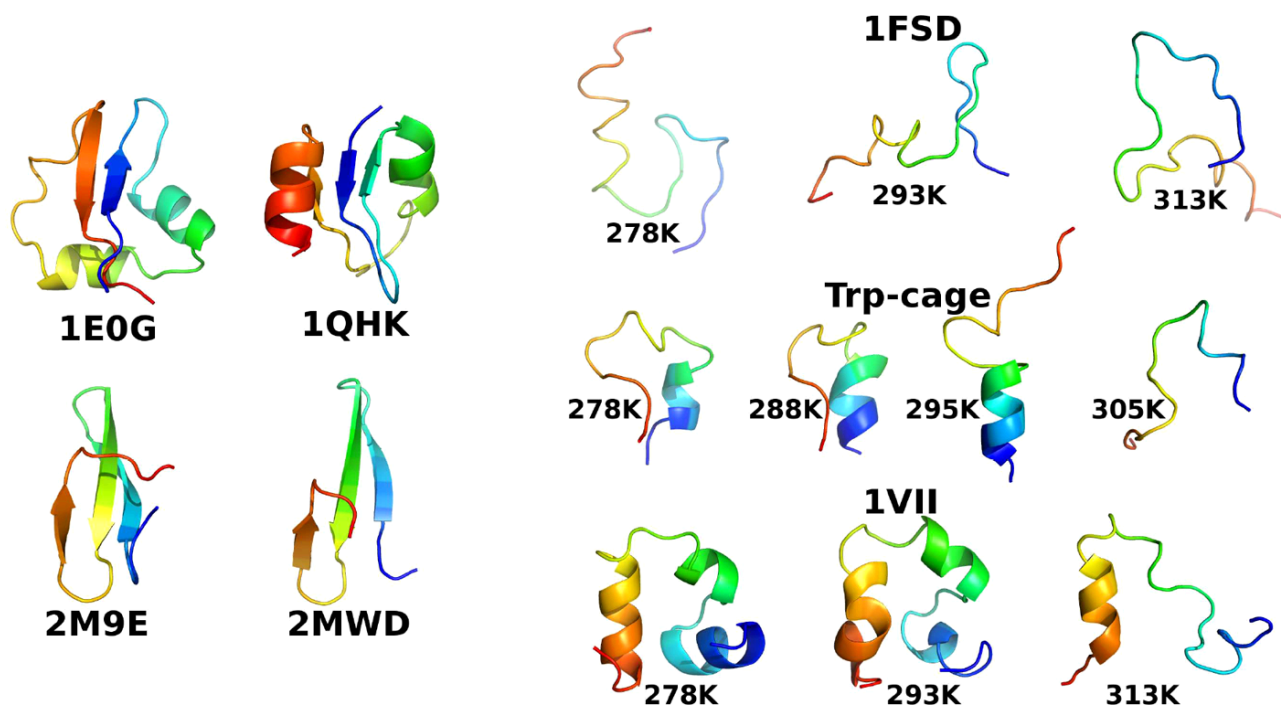


Rysunek 2. Przedstawienie modelu pierwszego (z pięciu wysyłanych do oceny) dla przykładowego białka przewidzianego przez opracowaną metodę opartą o gruboziarniste pole siłowe UNRES (czerwony), struktura eksperymentalna (zielony) i najwyżej oceniona struktura przewidziana metodami opartymi o statystykę (niebieski) (rysunek z pracy H1). Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Bioinformatics, Volume 32, Issue 21, November 2016, Pages 3270–3278. Copyright 2024 Oxford University Press, licencja 5740260555795).

W celu poprawy rozdzielczości oraz eliminacji konieczności używania informacji zewnętrznej podczas symulacji w postaci więzów na strukturę drugorzędową typu β (Rysunek 1) zdecydowałem się na zoptymalizowanie funkcji energii w polu siłowym UNRES używając metody największego podobieństwa (z ang. maximum likelihood method) (H2). Natomiast w celu ograniczenia efektu spadku rozdzielczości na skutek wykorzystywania modelu gruboziarnistego, zauważalnego podczas rekonstrukcji modeli pełnoatomowych, zdecydowałem się na połączenie gruboziarnistych i pełnoatomowych symulacji dynamiki molekularnej w celu uzyskania modeli o dokładności pojedynczych atomów, a zarazem zapewniając weryfikację otrzymanych struktur (prace H3, H11 i H13).

H2. Optymalizacja pola siłowego UNRES

W celu wykonania optymalizacji wag wkładów do funkcji energii w polu siłowym UNRES, wytypowałem zespół zróżnicowanych strukturalnie małych białek o znanych strukturach eksperymentalnych (Rysunek 3). Zespół treningowy stanowiły zespoły konformacji białek otrzymanych przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego NMR (od 17 do 300 konformacji dla każdego układu), co umożliwiło uwzględnienie podczas optymalizacji pola siłowego fluktuacji konformacyjnych białek obserwowanych podczas badań eksperymentalnych, które są możliwie zbliżone do warunków fizjologicznych. Aby jeszcze lepiej uwzględnić fakt przyjmowania przez jedno białko zróżnicowanych konformacji, dla trzech układów pozyskane zostały dane eksperymentalne otrzymane przy możliwie szerokim zakresie temperatur. Takie podejście jest kluczowe do prawidłowej optymalizacji pola siłowego UNRES (jak i zapewne większości pól siłowych), ponieważ (i) minimalizuje ryzyko nadmiernego wytrenowania (przetrenowania), (ii) uwzględnia zależność konformacji białka od temperatury, (iii) a także nie powinno wpływać negatywnie na zdolność metody do przewidywania struktury i dynamiki białek inherentnie nieuporządkowanych. Zależność konformacji od temperatury jest szczególnie przydatna w przypadku wykonywania symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik, które stanowią podstawowe narzędzie do przewidywania struktur białek w polu siłowym UNRES (H1).



Rysunek 3. Wizualizacja struktur białek (pierwsze modele z zespołów struktur) użytych do przeprowadzenia optymalizacji pola siłowego UNRES (P3). Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from J. Chem. Inf. Model. 2017, 57, 9, 2364–2377. Copyright 2024 American Chemical Society).

Równie starannie przygotowany został zestaw białek testowych, składający się z 46 białek zawierających od 12 do 126 reszt aminokwasowych. W jego skład wchodziło: 22 białka o strukturze helikalnej, 12 białek o strukturze typu β i 12 białek o strukturze $\alpha + \beta$. Białka te charakteryzowały się w zdecydowanej większości niskim podobieństwem sekwencyjnym do białek treningowych oraz innych białek testowych, tak aby otrzymać możliwie najbardziej reprezentatywne wyniki wydajności przewidywania konformacji białek.

Procedura optymalizacji składała się z kilku etapów: (i) symulacji dynamiki molekularnej z hamiltonowską wymianą replik dla białek treningowych, (ii) wytypowania struktur najbardziej prawdopodobnych dla określonych temperatur przy pomocy metody ważonych histogramów, (iii)

optymalizacji różnych zestawów parametrów przy pomocy metody największego podobieństwa (z ang. maximum likelihood method), (iv) symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik dla białek treningowych i testowych, (v) wytypowania struktur najbardziej prawdopodobnych dla określonych temperatur przy pomocy metody ważonych histogramów, (vi) oceny wyników.

Podstawowym narzędziem symulacyjnym używanym do optymalizacji wag parametrów na etapie treningu były hamiltonowskie symulacje dynamiki molekularnej z wymianą replik oparte o dwa parametry: "miękkie" więzy o różnej sile nałożone na konformacje na podstawie danych eksperymentalnych oraz temperatura. Takie podejście, zwane próbkowaniem parasolowym (z ang. "umbrella sampling"), było niezbędne aby dokładnie przeszukać całą przestrzeń konformacyjną układów treningowych. Każda symulacja treningowa składała się z co najmniej 384 trajektorii, a każda trajektoria z 80 000 000 kroków, o długości kroku 4,89 fs (nie uwzględniając przyspieszenia wynikającego z użycia gruboziarnistego pola siłowego), dając w sumie łączny czas symulacji ok. 150 ms. W następnym kroku metoda ważonych histogramów użyta była na końcowej części trajektorii, w której białka osiągnęły stan równowagi termodynamicznej, w celu wytypowania najbardziej prawdopodobnych, czyli charakteryzujących się najniższą wartością energii swobodnej, konformacji w danych temperaturach.

W celu określenia optymalnego protokołu optymalizacji wypróbowałem kilka wariantów, w których optymalizacji podlegała tylko część z parametrów, na które składały się m.in. ogólne wagi poszczególnych potencjałów, wagi wewnętrzne potencjałów lokalnych i korelacyjnych, promienie łańcuchów bocznych i parametry opisujące ich anizotropię oraz głębokości potencjałów opisujących oddziaływanie między łańcuchami bocznymi. Takie podejście miało na celu znalezienie minimalnego zestawu parametrów do optymalizacji, które zapewniłyby znaczącą poprawę zdolności predykcyjnych, jednocześnie nie skutkując "przetrenowaniem" parametrów na zespół białek treningowych.

Następnie wykorzystałem udoskonalony protokół przewidywania struktur białek bez użycia informacji zewnętrznych, czyli innych niż sekwencja białka, opracowany w pracy H1 (Rysunek 1), do określenia wydajności zoptymalizowanego pola siłowego. W tym celu przeprowadziłem symulacje dynamiki molekularnej z wymianą replik w szerokim zakresie temperatur (225-525K), z których każda z 72 trajektorii składała się z 50 000 000 kroków, dając łączny czas symulacji ok. 17,6 ms. Następnie wykonywałem analizę ważonych histogramów w celu wytypowania struktur najbardziej prawdopodobnych w temperaturze 10 K poniżej zaobserwowanego maksimum pojemności cieplnej, a otrzymywany zespół struktur poddawałem analizie skupień w celu wytypowania struktur reprezentatywnych. W ostatnim kroku procedury przeprowadzałem analizę podobieństwa otrzymanych modeli do struktur eksperymentalnych.

Wykonana optymalizacja znacząco poprawiła zdolności predykcyjne pola siłowego UNRES, szczególnie dla białek typu $\alpha + \beta$ i β , podczas gdy wydajność przewidywania struktur dla białek typu α uległa tylko niewielkiej poprawie, głównie dlatego, że dla tego typu struktur uprzednie wersje pola siłowego uzyskiwały wyjątkowo dobre rezultaty. Wykonana optymalizacja pola siłowego umożliwiła także używanie jednej wersji parametrów dla wszystkich klas białek, bez konieczności wykorzystywania więzów na strukturę drugorzędową w trakcie przewidywania konformacji białek (Rysunek 1), a także poprawiła rozkład struktur zwiniętych i rozwiniętych oraz zdolność określania temperatury przejścia fazowego dla białek. Wykonana optymalizacja, dzięki wykorzystaniu danych eksperymentalnych dla białek częściowo nieustrukturyzowanych umożliwiła także używanie go dla białek o słabo zdefiniowanych strukturach, takich jak monomeryczna forma amyloidu β .

H3. Badania agregacji amyloidu β na różnych poziomach rozdzielczości

W kolejnym kroku wykorzystałem połączenie metod gruboziarnistych i pełnoatomowych do zbadania ścieżek agregacji amyloidu β (H3). W tym celu nadzorowałem przeprowadzenie

gruboziarnistych symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik (REMD) w polu siłowym UNRES dla czterech łańcuchów amyloidu β 1-42 ($A\beta_{42}$) umieszczonych w różnych orientacjach względem siebie. Dzięki wykorzystaniu metody REMD układ ulegał dysocjacji w trajektoriach o wysokiej temperaturze, po czym ponownie asocjował w trajektoriach o niższej temperaturze, umożliwiając zbadanie mechanizmu agregacji białka. Całkowity efektywny czas symulacji wynosił ok. 50 ms, uwzględniając przyspieszenie wynikające z gruboziarnistej reprezentacji na poziomie 3-4 rzędów wielkości. Pozwoliło to na uzyskanie wystarczająco dużych zespołów statystycznych, odzwierciedlających wielokrotne procesy asocjacji-dysocjacji, żeby wytypować potencjalnie różne ścieżki tych zjawisk. Przeprowadzona analiza grafów wykazała, że podstawową ścieżką tworzenia tetramerów $A\beta_{42}$ jest agregacja dwóch dimerów (Rysunek 4). Proces ten jest znacznie częstszy niż tworzenie tetramerów z monomeru i trimeru. Wykonana analiza przy użyciu metody ważonych histogramów (WHAM) połączona z analizą skupień otrzymanej grupy struktur umożliwiła wytypowanie pięciu reprezentatywnych modeli tetramerów $A\beta_{42}$ (Rysunek 4), które następnie zostały poddane symulacjom dynamiki molekularnej w dwóch popularnych pełnoatomowych polach siłowych: AMBER99SB-ILDN i OPLS-AA/L.

Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie mechanizmu agregacji amyloidu β (lewa część rysunku) i wizualizacja pięciu struktur reprezentatywnych modelu tetrameru (prawa część rysunku) otrzymanych na podstawie przeprowadzonych symulacji gruboziarnistych. Rysunek pochodzi z pracy H3. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from J. Phys. Chem. B 2019, 123, 34, 7253–7269. Copyright 2024 American Chemical Society).

Ponadto pokazaliśmy, że używanie eksperymentalnej struktury protofibryli amyloidu β (kod PDB: 2NAO) nie stanowi dobrego modelu początkowego do symulacji struktury oligomerycznej. Tetrameryczna forma amyloidu β , otrzymana poprzez usunięcie z modelu protofibryla wszystkich łańcuchów oprócz czterech sąsiadujących, co jest praktyką stosowaną w niektórych badaniach naukowych, okazała się niestabilna i ulegała znaczącym zmianom konformacyjnym w trakcie

symulacji, wynikającym z odsłonięcia hydrofobowego rdzenia fibryla na oddziaływania z wodą. Wynik ten, choć oczekiwany, wskazuje na błędność założenia, że dostępne dane eksperymentalne dla innej formy peptydu lub białka zawsze stanowią dobry punkt startowy dla symulacji innych jego wariantów.

Dekompozycja składowych energetycznych odpowiedzialnych za stabilność tetrameru A β 42 wykazała, że w przeciwieństwie do formy monomerycznej (H4), oddziaływania van der Waalsa stanowią główny typ oddziaływań stabilizujących wewnątrznie peptydy amyloidu β . Niezmienne w stosunku do monomerycznej formy pozostało to, że oddziaływania tetrameru A β 42 z wodą stanowią dominujący wkład do jego energii, a zatem dominujący czynnik wpływający na strukturę. Oddziaływania czterech łańcuchów wyciętych z protofibrylarnej formy amyloidu β (2NAO) z wodą są porównywalne do oddziaływań formy tetramerycznej uzyskanej z symulacji gruboziarnistych, jednak charakteryzują się silnym elektrostatycznym odpychaniem się łańcuchów amyloidu β , które jedynie w nieznaczącej części równoważone jest przez oddziaływania van der Waalsa. Zachowanie te wskazuje na potencjalną niestabilność struktury tak otrzymanego modelu tetrameru amyloidu β . W przypadku modeli tetramerycznych uzyskanych z symulacji w gruboziarnistym polu siłowym UNRES, wewnętrzne oddziaływania elektrostatyczne są zazwyczaj bliskie zeru, natomiast oddziaływania van der Waalsa są około dwukrotnie silniejsze niż w modelu otrzymanym na podstawie struktury protofibryla. Ponadto, ze względu na dużo silniejsze oddziaływanie z wodą, tetramer A β 42 posiada mniejszą zawartość struktur typu β , a rozkład ładunków jest w nim bardziej izotropowy niż w fibrylach.

H4. Ocena możliwości pełnoatomowych pól siłowych i wpływu oddziaływań różnego typu na monomeryczną formę amyloidu β

Równolegle do badań w reprezentacji gruboziarnistej, przeprowadziłem szeroko zakrojone analizy z wykorzystaniem pełnoatomowych pól siłowych. Wybrałem do tego celu niewielki układ, którego przestrzeń konformacyjną można efektywnie przeszukać podczas obliczeń uwzględniających wszystkie atomy - monomeryczną formę amyloidu β , zbudowaną z 42 reszt aminokwasowych. Peptyd ten nie posiada eksperymentalnie rozwiązanej struktury ze względu na swój inherentnie nieuporządkowany charakter (IDP), a jednocześnie odgrywa istotną rolę w rozwoju choroby Alzheimera, której towarzyszy obecność toksycznych form oligomerycznych i fibrylarnych amyloidu β .

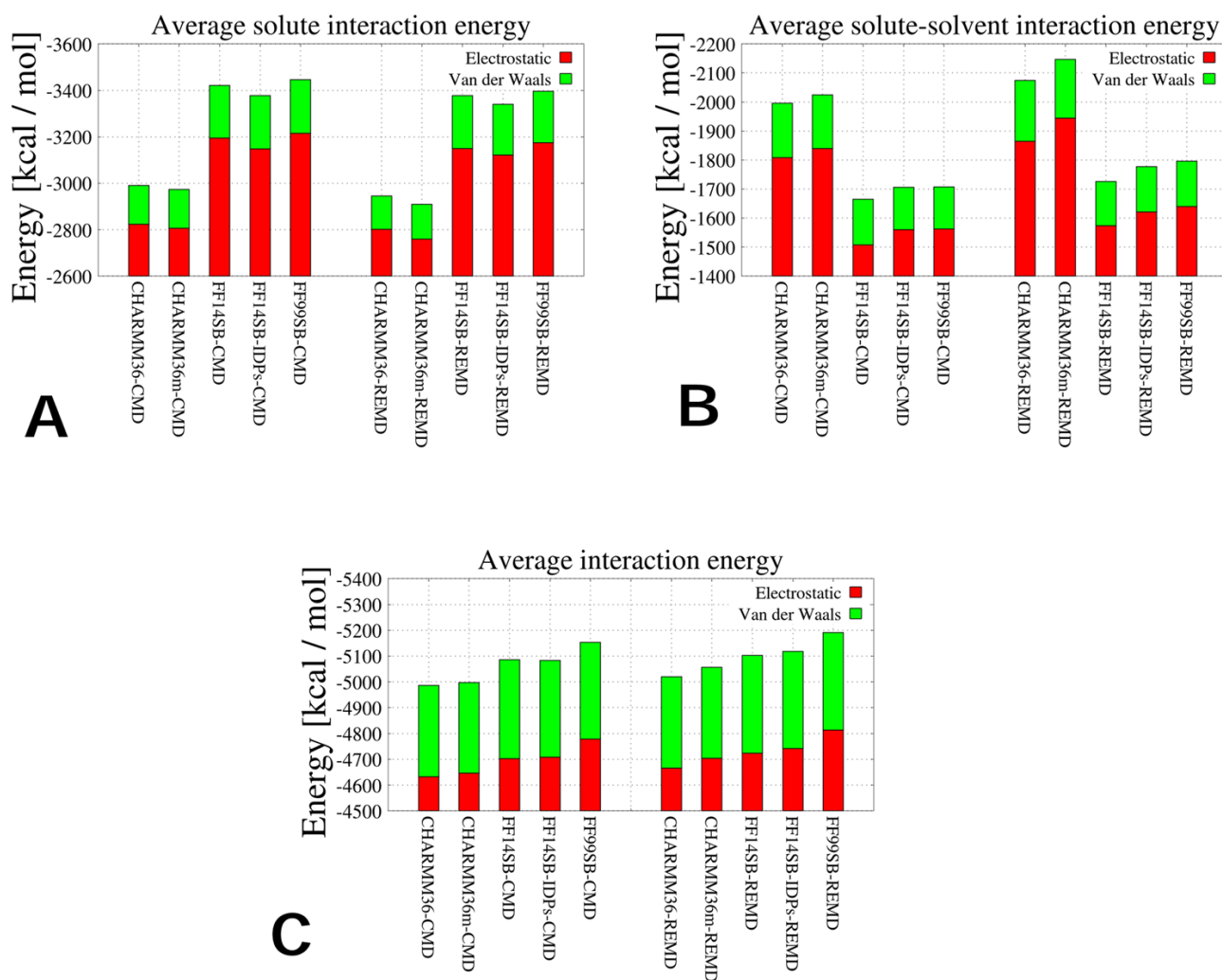
Celem badań była nie tylko ocena zdolności popularnych pełnoatomowych pól siłowych do prawidłowego przewidywania zespołu konformacyjnego monomeru amyloidu β , ale także określenie wpływu metody próbkowania przestrzeni konformacyjnej oraz poszczególnych składowych energetycznych na stabilizację lub destabilizację peptydu. W tym celu wybrałem pięć powszechnie stosowanych pełnoatomowych pól siłowych: trzy z rodziny Amber (uniwersalne pola siłowe: ff99SB i ff14SB oraz pole siłowe dedykowane białkom nieustrukturyzowanym: ff14SB_IDPs) i dwa z rodziny CHARMM (CHARMM36 i CHARMM36m, z których to drugie zawiera drobne poprawki względem pierwszego, mające na celu zwiększenie dokładności symulacji układów zarówno zwiniętych, jak i nieustrukturyzowanych).

Przeprowadzone symulacje jednoznacznie wykazały, że nowsze wersje pól siłowych cechują się wyższą dokładnością w przewidywaniu struktury peptydu w porównaniu z dostępnymi danymi eksperymentalnymi, takimi jak zakresy obecności struktur drugorzędowych, promień żyracji czy wartości przesunięć chemicznych. Najgorsze wyniki uzyskano dla najstarszego z testowanych, lecz wciąż popularnego pola siłowego ff99SB, które m.in. znacząco przeszacowało zawartość struktury β ($34.0 \pm 7.0\%$).

Porównanie wyników symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik (48 trajektorii w zakresie temperatur 278.00-373.77 K, każda o długości 0.6 μ s, łączny czas symulacji 28.8 μ s dla jednego pola siłowego) z pojedynczą 10 μ s trajektorią klasycznej dynamiki molekularnej pokazało,

że ulepszone próbkowanie w każdym przypadku poprawia zgodność z danymi eksperymentalnymi. Średni współczynnik korelacji przewidywanych przesunięć chemicznych względem wartości eksperymentalnych wyniósł poniżej 0.90 (0.845-0.898) dla klasycznych pól siłowych przy próbkowaniu pojedynczą trajektorią (Amber ff99SB, ff14SB i CHARMM36), wyraźnie wzrastając po zastosowaniu dynamiki molekularnej z wymianą replik (0.903-0.945). Poprawa zgodności wyników symulacyjnych z danymi eksperymentalnymi nastąpiła również dla nowszych pól siłowych, choć nie była aż tak znacząca, co wskazuje, że dokładniejszy opis układu ułatwia uzyskanie wyników bliskich rzeczywistości bez konieczności stosowania technik poprawiających próbkowanie. Jednocześnie sugeruje, że nowsze pola siłowe prawidłowo opisują niewielkie bariery energetyczne pomiędzy różnymi konformacjami nieustrukturyzowanej monomerycznej formy amyloidu β , umożliwiając ich przekraczanie nawet przy użyciu klasycznych symulacji dynamiki molekularnej.

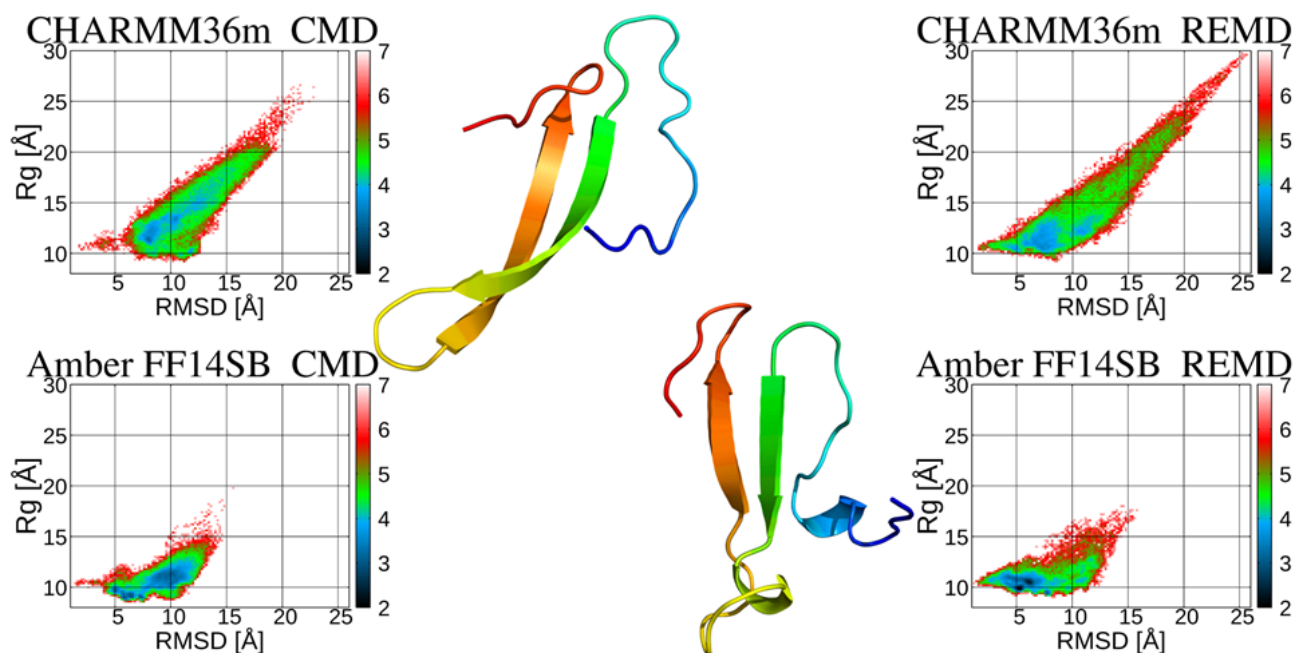
Przeprowadzone badania ujawniły także, że pola siłowe Amber i CHARMM bazują na odmiennych założeniach. O ile w przypadku pól siłowych Amber właściwości układu zależą głównie od oddziaływań wewnątrz peptydu, to w polach siłowych CHARMM kluczową rolę odgrywają oddziaływania peptyd-woda (Rysunek 5), niezależnie od zastosowanej metody próbkowania. Silniejsze oddziaływanie amyloidu β z rozpuszczalnikiem w polach siłowych CHARMM prowadzi do tego, że peptyd jest mniej stabilny i bardziej hydrofilowy w porównaniu do pól Amber. Warto też zauważyć, że dla monomerycznej formy amyloidu β dominujący wkład do energii potencjalnej mają oddziaływania elektrostatyczne, o rząd wielkości większe od oddziaływań van der Waalsa.



Rysunek 5. Wizualizacja różnic we wkładach energii oddziaływań w obrębie peptydu oraz peptydu z wodą w przeprowadzonych symulacjach klasycznej dynamiki molekularnej (CMD) i dynamiki

molekularnej z wymianą replik (REMD). Obrazek z pracy H4. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from J. Chem. Phys. 151, 055101 (2019). Copyright 2024 AIP Publishing, licencja 5744180590277).

Co ciekawe, pomimo zupełnie różnych rozkładów poszczególnych składowych energii potencjalnej, przekładających się na odmienne tendencje amyloidu β do przyjmowania konformacji rozwiniętych, analiza skupień struktur odpowiadających minimom energii swobodnej wykazała bardzo duże podobieństwo reprezentatywnych konformacji (najczęściej występujących form metastabilnych) uzyskanych dla pól siłowych Amber ff14SB i CHARMM36m (Rysunek 6).



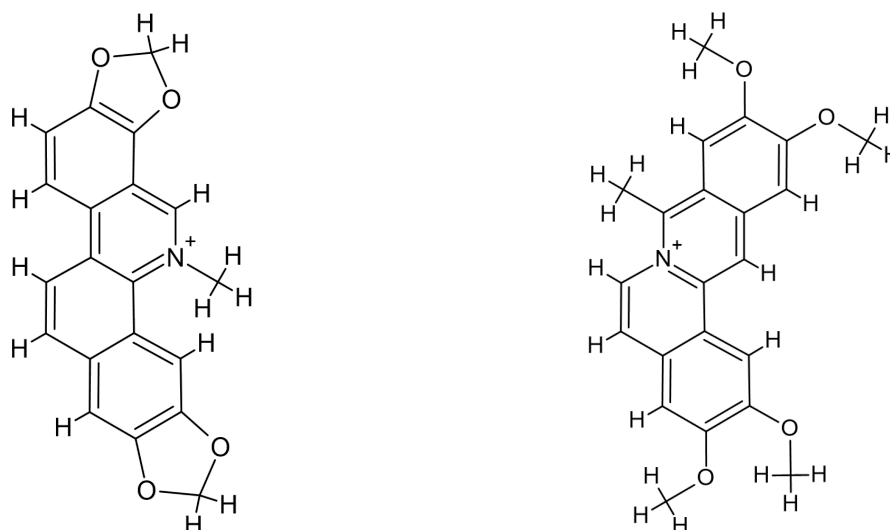
Rysunek 6. Wizualizacja różnic we właściwościach strukturalnych amyloidu β w przeprowadzonych symulacjach klasycznej dynamiki molekularnej (CMD) i dynamiki molekularnej z wymianą replik (REMD) wraz z przedstawieniem w reprezentacji typu wstążka struktur reprezentatywnych dla pól siłowych CHARMM i Amber. Rysunek z pracy H4. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from J. Chem. Phys. 151, 055101 (2019). Copyright 2024 AIP Publishing, licencja 5744180590277).

Przeprowadzone badania potwierdziły dotychczasowe obserwacje, że zastosowanie dynamiki molekularnej z wymianą replik poprawia zdolność pól siłowych do odnajdywania najbardziej prawdopodobnych konformacji amyloidu β . Okazało się jednak, że wykorzystanie nowszych pól siłowych lub pól dedykowanych białkom nieustrukturyzowanym zwiększa efektywność próbkowania, zmniejszając różnicę między klasyczną dynamiką molekularną a wariantem z wymianą replik. Jest to istotna obserwacja, gdyż klasyczne symulacje dynamiki molekularnej można z powodzeniem prowadzić z użyciem kart graficznych (GPU), przyspieszających obliczenia nawet 100-krotnie w stosunku do typowych procesorów (CPU), podczas gdy ich zastosowanie w symulacjach z wymianą replik jest znacząco utrudnione i daje znacznie mniejszy wzrost wydajności. Ponadto, zwłaszcza w przypadku pola siłowego CHARMM36m, dynamika molekularna z wymianą replik prowadzi prawdopodobnie do uzyskania zbyt dużej liczby struktur mocno rozwiniętych o wysokich wartościach promienia żyracji. Wykazałem zatem, że pośrednie podejście polegające na przeprowadzeniu serii kilku niezależnych, lecz stosunkowo długich symulacji klasycznej dynamiki molekularnej, może stanowić optymalne połączenie efektywności przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej z wymaganiami sprzętowymi i czasowymi.

Co więcej, uzyskanie wyników o dużej zgodności z danymi eksperymentalnymi oraz podobieństwo najbardziej prawdopodobnych struktur metastabilnych między polami siłowymi Amber i CHARMM jednoznacznie świadczy o przydatności tych metod do symulacji amyloidu β . Wyniki te wskazują, że przy odpowiednim doborze pola siłowego i metody próbkowania, symulacje pełnoatomowe mogą dostarczyć wiarygodnych informacji na temat struktury i dynamiki monomerycznej formy amyloidu β , co jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmów agregacji tego peptydu i jego roli w rozwoju choroby Alzheimera.

H5. Badania mechanizmu inhibicji agregacji amyloidu β na skutek oddziaływania z alkaloidami izochinolinowymi

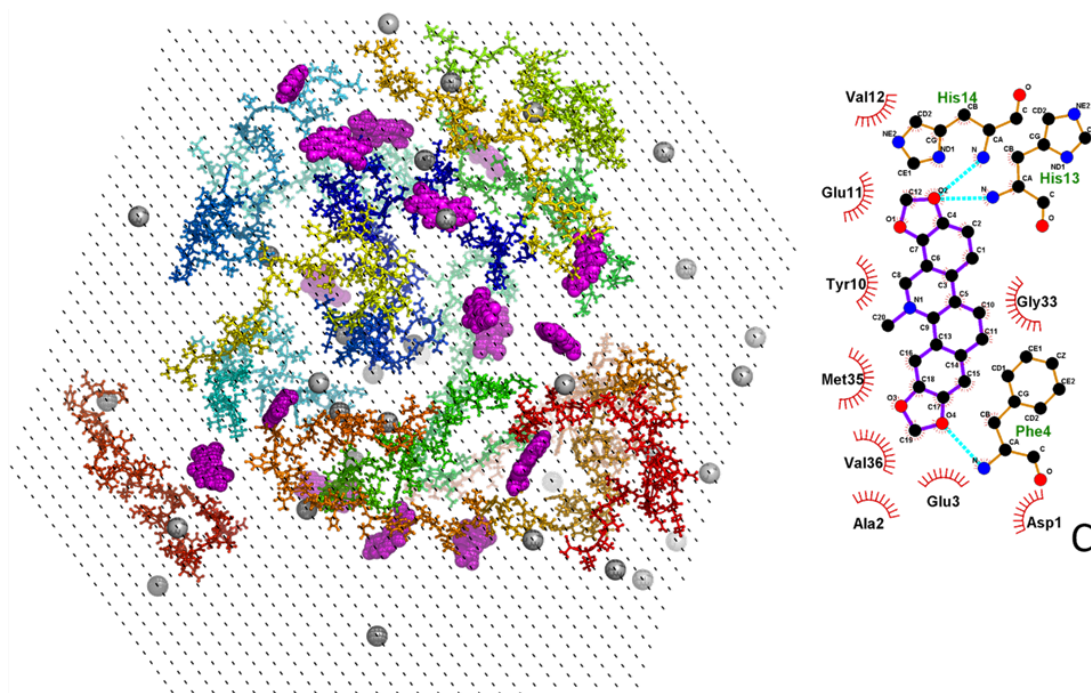
Kolejna praca stanowiła teoretyczne wytłumaczenie eksperymentalnych obserwacji dotyczących różnego wpływu wybranych alkaloidów izochinolinowych na agregację amyloidu β . Współpracując w ramach projektu grupy wykonujące badania eksperymentalne, pod przewodnictwem Giovanniego N. Roviello, określili, że dwa podobne do siebie alkaloidy izochinolinowe, sanguinaryna i koralina (Rysunek 7), mają zupełnie odmienny wpływ na agregację amyloidu β . Otóż pierwsza z tych molekuł posiada silne właściwości inhibicyjne, a druga powoduje przyspieszenie procesu agregacji.



Rysunek 7. Wzory strukturalne badanych molekuł: sanguinaryny (lewy panel) i koraliny (prawy panel); rysunki własne.

W celu wyjaśnienia zaobserwowanych różnic we wpływie sanguinaryny i koraliny na agregację amyloidu β , wykonałem serię dokowań molekularnych tych molekuł do otrzymanych we wcześniejszych badaniach form amyloidu β : trzech modeli reprezentatywnych monomeru (H4), tetramerycznej (H3) i protofibrilarniej (kształt typu U (kod PDB: 2LMN) i kształt typu LS (kod PDB: 2MXU)). Wykonane przeze mnie badania wykazały, że obie molekuły wiążą się do wszystkich form amyloidu β z porównywalną siłą oraz tworzą podobne typy oddziaływań, potwierdzając obserwacje eksperymentalne, nie tłumacząc jednak odmiennego wpływu na agregację amyloidu β . Główną zaobserwowaną różnicą w wiązaniu się alkaloidów izochinolinowych z różnymi formami amyloidu β jest różna liczba miejsc, w których się wiążą - sanguinaryna dokuje się dużo bardziej selektywnie niż koralina, która może oddziaływać z bardziej zróżnicowanymi fragmentami amyloidu β . Przeprowadzone następnie symulacje dynamiki molekularnej dla sanguinaryny i koraliny oddziałującej z dwoma modelami protofibrili

potwierdziły niemal identyczne wartości energii swobodnej oddziaływania, wskazując że obie molekuly silnie oddziałują z amyloidem β .



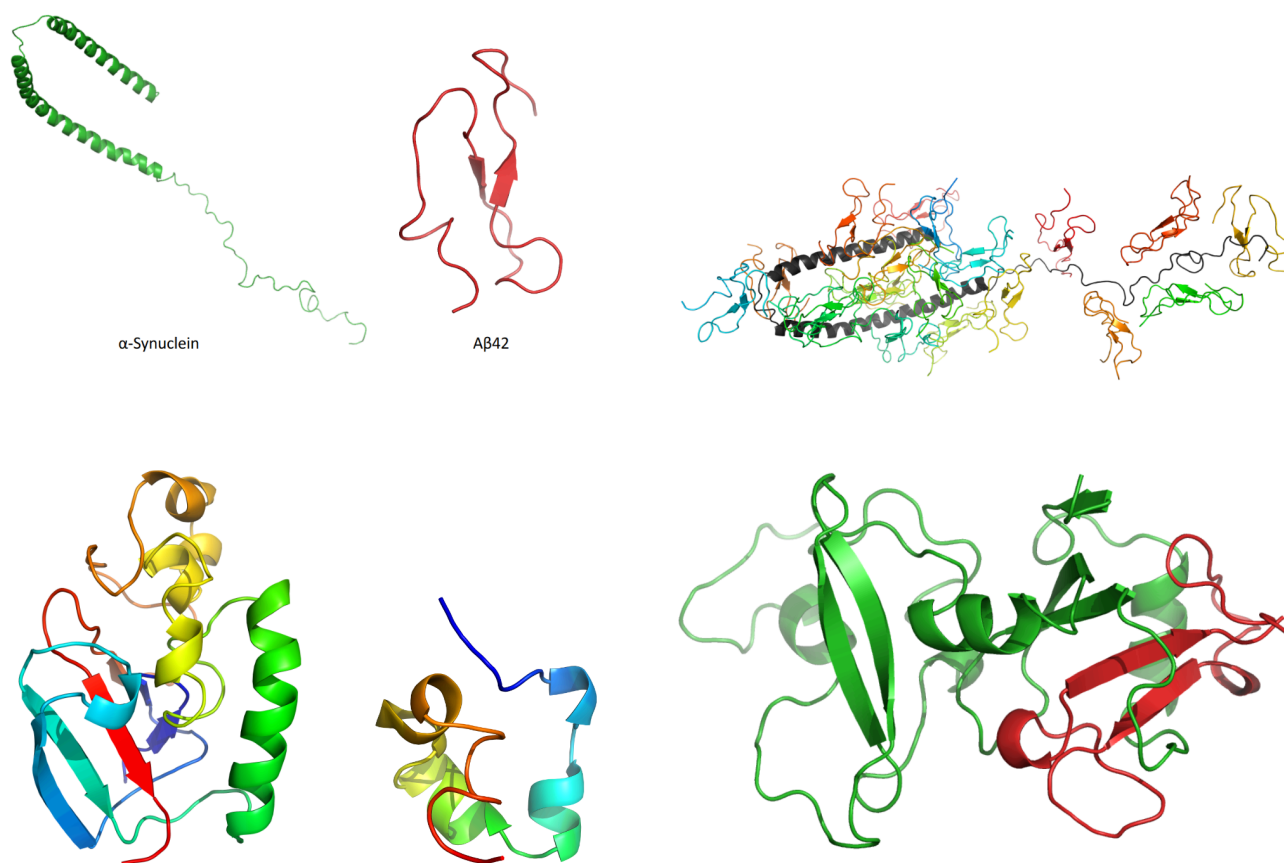
Rysunek 8. Przedstawienie układu początkowego składającego się z 12 łańcuchów amyloidu β (struktury "szkieletowe" w 12 kolorach) wraz z cząsteczkami wody (małe ciemne kule), przeciwjonami (szare kule) i badanymi alkaloidami izochinolinowymi (fioletowe kule; lewa część rysunku) oraz schematyczna wizualizacja oddziaływań między amyloidem β a wybranym alkaloidem izochinolinowym (prawa część rysunku). Rysunki z pracy H5. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from *Chemico-Biological Interactions* Volume 334, 25 January 2021, 109300. Copyright 2024 Elsevier).

Aby poznać mechanizm wpływu molekuł na agregację amyloidu β przeprowadziłem symulacje dynamiki molekularnej dla układu składającego się z 12 łańcuchów amyloidu β umieszczonych w proporcji 1:1 z sanguinaryną i koraliną (Rysunek 8). Początkowe ułożenie molekuł zostało specjalnie przygotowane w taki sposób aby wszystkie komponenty układu były od siebie oddalone o co najmniej 8 Å, aby umożliwić wystąpienie rotacji molekuł przed potencjalną asocjacją. Konieczne jest zaznaczenie, że otrzymane stężenie amyloidu β w symulacjach dynamiki molekularnej jest wyższe niż te stosowane w badaniach eksperymentalnych, jednak nie znajduje się on w fazie szkła. Stosowanie tak dużego zagęszczenia amyloidu β miało bezpośredni związek z czasem symulacji, który aby uchwycić warunki fizjologiczne (patologiczne) musiałby być rzędu godzin i dni, które są nieosiągalne obliczeniowo nawet przy użyciu metod gruboziarnistych, natomiast zwiększenie stężenia umożliwiło uzyskanie różnic w zachodzeniu początkowych etapów procesu agregacji w skali mikrosekund. Analiza symulacji wykazała, że sanguinaryna zwiększa tendencję amyloidu β do tworzenia struktur helikalnych, zmniejszając jednocześnie jego tendencję do tworzenia struktur typu β co jest przeciwstawne do wpływu koraliny. Wcześniejsze badania wykazały, że zawartość struktury typu β w formach monomerycznych i małych oligomerów jest kluczowym czynnikiem wpływającym na szybkość agregacji¹³. Co ciekawe analiza otrzymanych form oligomerycznych wykazała, że tetramery i heptamery stanowią dominujące typy oligomerów przy nieobecności alkaloidów izochinolinowych, potwierdzając wykorzystane przez nas uprzednio założenie, że formy tetrameryczne stanowią ważny etap agregacji amyloidu β (H3), podczas gdy obecność koraliny w symulacjach agregacji zmniejsza tendencję amyloidu β do tworzenia struktur oligomerycznych wyższych rzędów.

H6. Otrzymanie i badania strukturalne heterodimeru α -synukleiny i amyloidu β 42

Następnym krokiem było zbadanie możliwości oddziaływania między inherentnie nieuporządkowanymi formami monomerycznymi α -synukleiny (α -Syn) i amyloidu β 42 (A β 42) oraz wpływu tych oddziaływań na ich strukturę i dynamikę oraz porównanie do ich form monomerycznych i homodimerycznych (H6). Dodatkowym celem było dokonanie oceny możliwości symulacji dynamiki molekularnej przy wykorzystaniu niejawnego (z ang. “implicit”) i cząsteczkowego modelu wody w popularnych polach siłowych Amber i CHARMM. Pierwszy typ rozpuszczalnika umożliwił na wykorzystanie metody dynamiki molekularnej z wymianą replik, podczas gdy symulacje z wodą cząsteczkową wykonywane były w klasycznym wariancie dynamiki molekularnej, jednak z wykorzystaniem kart graficznych (GPU), które znacząco przyspieszyły wykonywane symulacje.

W celu osiągnięcia możliwie dobrego próbkowania przestrzeni konformacyjnej, symulacje heterodimeru α -synukleiny-A β 42 rozpoczęliśmy od wygenerowania 20 jak najbardziej zróżnicowanych położeń początkowych cząsteczek względem siebie, używając do tego celu początkowych algorytmów używanych w opracowanej przeze mnie metodzie UNRES-Dock (H12) (Rysunek 9). Użycie połączenia metody dynamiki molekularnej z wymianą replik z różnorodnymi strukturami początkowymi zaowocowało możliwością dysocjacji niestabilnych orientacji w replikach charakteryzujących się wysoką temperaturą, a zatem także energią kinetyczną, i uzyskaniem zbieżności symulacji w ciągu łącznego czasu wynoszącego 40 μ s (20 replik, każda po 2 μ s).



Rysunek 9. Wizualizacja struktur α -synukleiny (lewe panele), amyloidu β (środkowe panele) oraz ich heterodimeru (prawe panele): początkowe (górny rząd) i najbardziej prawdopodobne na podstawie analizy symulacji (dolny rząd). Synteza dwóch rysunków z pracy H6. Wykorzystano i zmodyfikowano na podstawie licencji CC BY 4.0.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że wybrane pole siłowe pełnoatomowe z modelem niejawnego rozpuszczalnika (AMBER ff14SBonlysc z modelem GB-Neck2) miało tendencję do generowania zbyt zwartych i ustrukturyzowanych konformacji, co było szczególnie widoczne w przypadku monomerycznej formy α -synukleiny. Jednak dla heterodimeru α -synukleiny-A β 42 najbardziej prawdopodobna struktura pozostawała stabilna zarówno w symulacjach z niejawnym, jak i jawnym rozpuszczalnikiem przy użyciu pól siłowych AMBER ff14SBonlysc z modelem GB-Neck2 oraz AMBER-FB15 i CHARMM36m, a otrzymane zestawy struktur monomerycznej formy A β 42 mieściły się w zakresach danych obserwowanych w poprzednich badaniach eksperymentalnych i teoretycznych.

Dodatkowo, przeprowadziłem analizę porównawczą wpływu A β 42 na skłonność α -synukleiny do agregacji w symulacjach z niejawnym i cząsteczkowym modelem rozpuszczalnika. Wykazałem, że obecność A β 42 znacząco zwiększa zawartość struktur typu β w α -synukleiny w symulacjach z jawnym rozpuszczalnikiem, co jest zgodne z danymi eksperymentalnymi wskazującymi na przyspieszenie agregacji α -synukleiny przez A β 42. Efekt ten nie był obserwowany w symulacjach z niejawnym rozpuszczalnikiem, co dodatkowo potwierdza znaczne przeszacowanie stabilności monomerycznej formy α -synukleiny w tym podejściu.

Aby zidentyfikować najbardziej prawdopodobną konformację heterodimeru α -synukleiny-A β 42, przeprowadziłem dokładną analizę istotnych właściwości strukturalnych i fizykochemicznych zarówno dla struktur monomerycznych, jak i heterodimerycznych. Otrzymane wyniki wykazały, że wiązanie się cząsteczek znacząco wpływa na ich ruchliwość i elastyczność. Co ciekawe, odkryłem także, że obecność α -synukleiny wywiera znacznie większy wpływ na konformację A β 42 niż w przypadku sytuacji odwrotnej, co przypisuję hydrofobowemu charakterowi oddziaływań międzyłańcuchowych oraz jej większemu rozmiarowi.

Podkreślając kluczową rolę modeli wody w modelowaniu agregacji białek, wykazałem, że wpływ A β 42 na skłonność α -synukleiny do agregacji jest dokładnie uchwycony przez modele wody cząsteczkowej, ale nie przez niejawne. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze doniesienia (H3 i H4) o bardzo dużym wpływie oddziaływań białko-rozpuszczalnik, szczególnie na struktury białek nie posiadających stabilnej struktury drugorzędowej w warunkach fizjologicznych, takich jak badane monomery A β 42 i α -synukleiny.

Używając metody MM-PBSA do oszacowania energii swobodnej wiązania między molekułami na podstawie trajektorii dynamiki molekularnej, porównałem heterodimer α -synukleiny-A β 42 z modelami homodimerów A β 42 i α -synukleiny wykazując, że wiąże się on około dwa razy silniej niż struktury dimeryczne A β 42, ale nieco słabiej niż homodimer α -synukleiny. Sugeruje to, że α -synukleina i A β 42 mogą rzeczywiście tworzyć stabilne kompleksy, potencjalnie służące jako "zarodki" dla struktur fibrylowych i konkurujące z procesem agregacji A β 42.

Wykonane symulacje dynamiki molekularnej heterodimeru α -synukleiny-A β 42 ujawniły także, że fragmenty 16-19 i 29-34 A β 42 są najbardziej zaangażowane w tworzenie oddziaływań z α -synukleina, co jest zgodne z regionami β -spinki w peptydach i oligomerach A β 42 zidentyfikowanymi we wcześniejszych badaniach.¹⁴ Moje ustalenia są również zgodne z poprzednimi przewidywaniami wykonanymi poprzez symulacje dynamiki molekularnej metodą dyskretną (DMD) wskazującymi miejsca oddziaływania α -synukleiny-A β 42.¹⁵

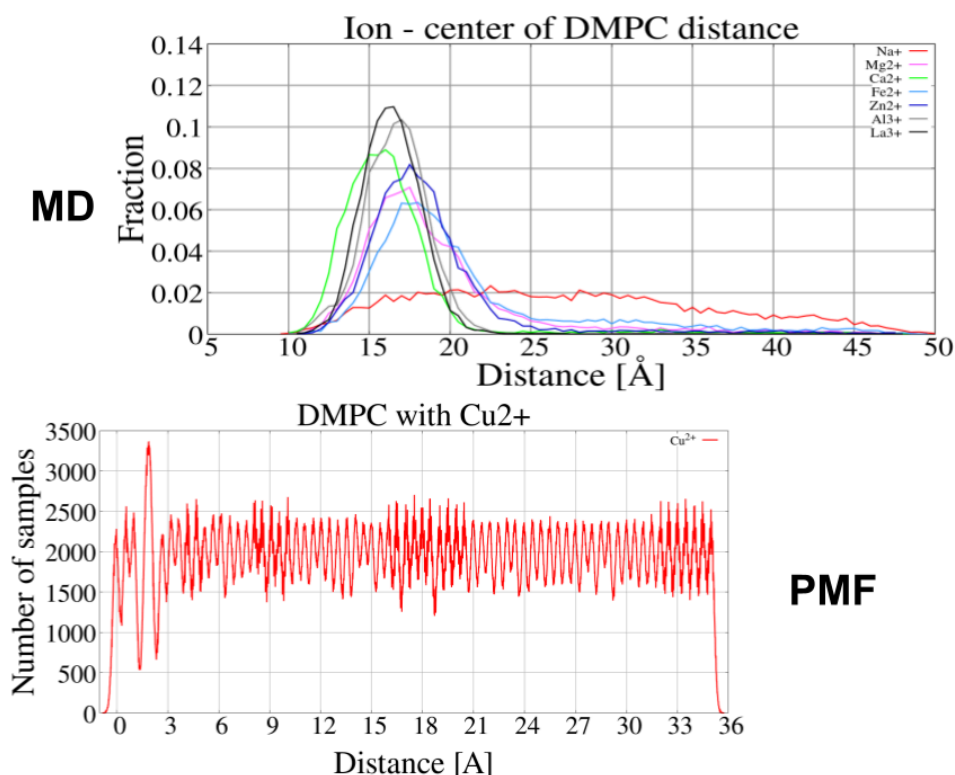
Podsumowując, w pracy H6 wykazałem możliwość tworzenia stabilnych heterodimerów α -synukleiny-A β 42, które mogą odgrywać istotną rolę we wczesnych etapach agregacji tych białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. Udostępniona przeze mnie struktura (w formacie pliku PDB) najbardziej prawdopodobnego heterodimeru α -synukleiny-A β 42 może być wykorzystana do dalszych badań nad strukturą, dynamiką i projektowaniem potencjalnych inhibitorów agregacji tych białek.

H7. Badanie wpływu jonów metali na błony lipidowe z uwzględnieniem obecności amyloidu β

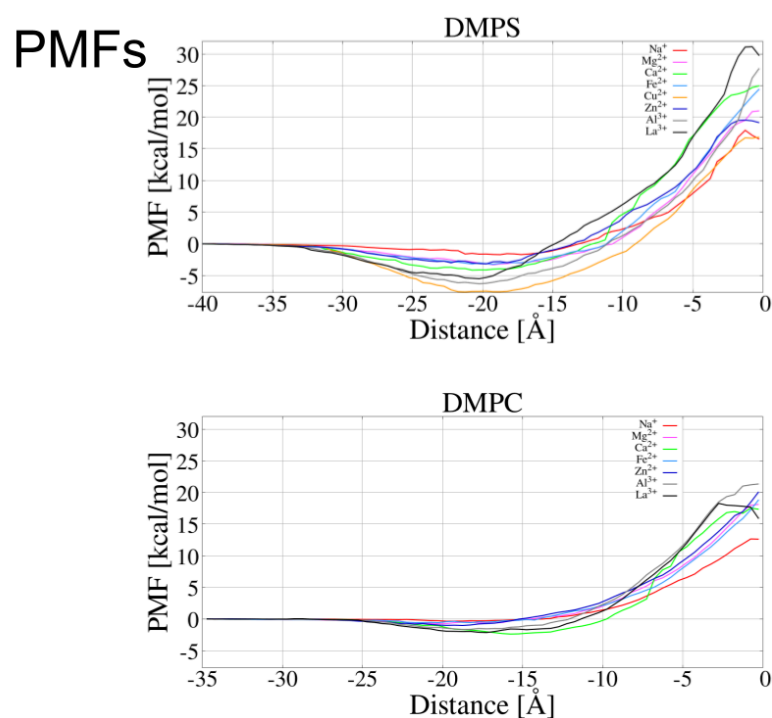
W kolejnym badaniu pokazałem, że proste modele mogą zostać skutecznie wykorzystane do pokazania skomplikowanych zjawisk fizycznych. W ramach projektu określone zostało powinowactwo oraz bariery energetyczne związane z penetracją modelu homogenicznej błony lipidowej przez różne mono- i biwalentne jony metali oraz różnice konformacyjne tetramerycznych form amyloidu β zarówno w obecności, jak i bez błon lipidowych oraz jonów miedzi.

W tej pracy zastosowałem niedawno zaproponowany bardziej realistyczny model dwuwartościowych kationów wykorzystujący potencjały 12-6-4 zamiast typowych potencjałów 12-6, zwanych potencjałem Lennarda-Jonesa, do określenia powinowactwa jonów do dwuwarstwy cząsteczek di-mirystoilofosfatydylocholiny (DMPC). Model ten częściowo niweluje problemy wynikające z punktowego traktowania ładunków jonów i powinien pozwolić na dość dobry opis zmian w hydratacji naładowanych i polarnych grup przy wiązaniu kationów do atomów lipidów.

Badania te składały się z szeregu symulacji dynamiki molekularnej w wariantach klasycznym i z próbkowaniem typu parasola (z ang. umbrella sampling). W pierwszym kroku ułożyłem względem siebie modele dimerów amyloidu β niezawierających jonów miedzi oraz z jonami miedzi na jak najbardziej zróżnicowane sposoby, przy wykorzystaniu uproszczonego protokołu UNRES-Dock (H12). Tak otrzymane 128 różnych położeń poddałem symulacjom pełnoatomowej dynamiki molekularnej, a następnie używając energii wiązania między dimerami jako kryterium wstępnej selekcji, wykonałem analizę skupień podzbioru struktur w celu wytypowania pięciu najbardziej prawdopodobnych modeli tetrameru amyloidu β . Tak otrzymane modele tetramerów amyloidu β umieściłem w pobliżu homogenicznego modelu dwuwarstwy lipidowej i obserwowałem jak obecność błony wpływa na strukturę i stabilność tetramerów amyloidu β oraz jak te oddziałują i wpływają na błonę lipidową. Ponieważ wiązanie jonów miedzi, występujących w wysokich stężeniach w otoczeniu błon synaptycznych, jest istotne zarówno dla stabilności tetramerów amyloidu β , jak i błon lipidowych, w drugim kroku przeprowadziłem symulacje próbkowania parasolowego (z ang. “umbrella sampling”) oraz klasyczne symulacje dynamiki molekularnej dla określenia pozycji oraz barier energetycznych towarzyszących penetracji błony lipidowej przez mono- i biwalentne jony metali. Na podstawie wykonanych symulacji wykonałem analizę ważonych histogramów i wyznaczyłem potencjał średniej siły oddziaływania z błoną lipidową (Rysunek 10 i 11).



Rysunek 10. Wykresy przedstawiające różnice w próbkowaniu odległości między jonami metali a środkiem błony lipidowej dla klasycznych symulacji dynamiki molekularnej (MD) - rozkład zbliżony do rozkładu Gaussa oraz metody próbkowania parasolowego (umbrella sampling) wykorzystywanej w obliczeniach potencjału średniej siły (PMF). Rysunki nieopublikowane.



Rysunek 11. Wykresy potencjałów siły średniej w funkcji odległości wybranych jonów metali od środka błon lipidowych: DMPS (górna część rysunku) i DMPC (dolna część rysunku). Rysunki nieopublikowane.

Analiza wykonanych symulacji wykazała, że jony Cu^{2+} zachowują się podobnie do jonów Ca^{2+} pod względem rodzaju oddziaływań z DMPC i siły wiązania. Natomiast jony Mg^{2+} , Fe^{2+} i Zn^{2+} silniej utrzymują swoje sfery hydratacyjne, wykazując słabsze oddziaływania z dwuwarstwą lipidową. Zauważyłem także, że obecność jonów miedzi oddziałujących z amyloidem β powoduje zmniejszenie stabilności tetramerów A β 42. Interesujące jest, że tetramery A β 42 bez związanego jonu miedzi oddziałują silniej z głowami lipidów DMPC, wykazując możliwość dotarcia do regionów wiążących jony i potencjalnej ekstrakcji dwuwartościowych kationów z interfejsu lipid-woda. Chociaż głębokość penetracji jest zbliżona do tej osiąganą przez formy monomeryczne A β 42 (P13), to wpływ tetramery na właściwości błony jest większy niż w przypadku monomeru A β 42. Natomiast gdy tetramery A β 42 mają związane jony miedzi, ich skłonność do oddziaływania z interfejsem lipidy-woda staje się mniejsza. Efekt ten jest szczególnie widoczny, gdy jony miedzi tworzą mostki między peptydami, łącząc je w związane ze sobą dimery, w przeciwieństwie do sytuacji, gdy jony miedzi występują jedynie w obrębie pojedynczych dimerów.

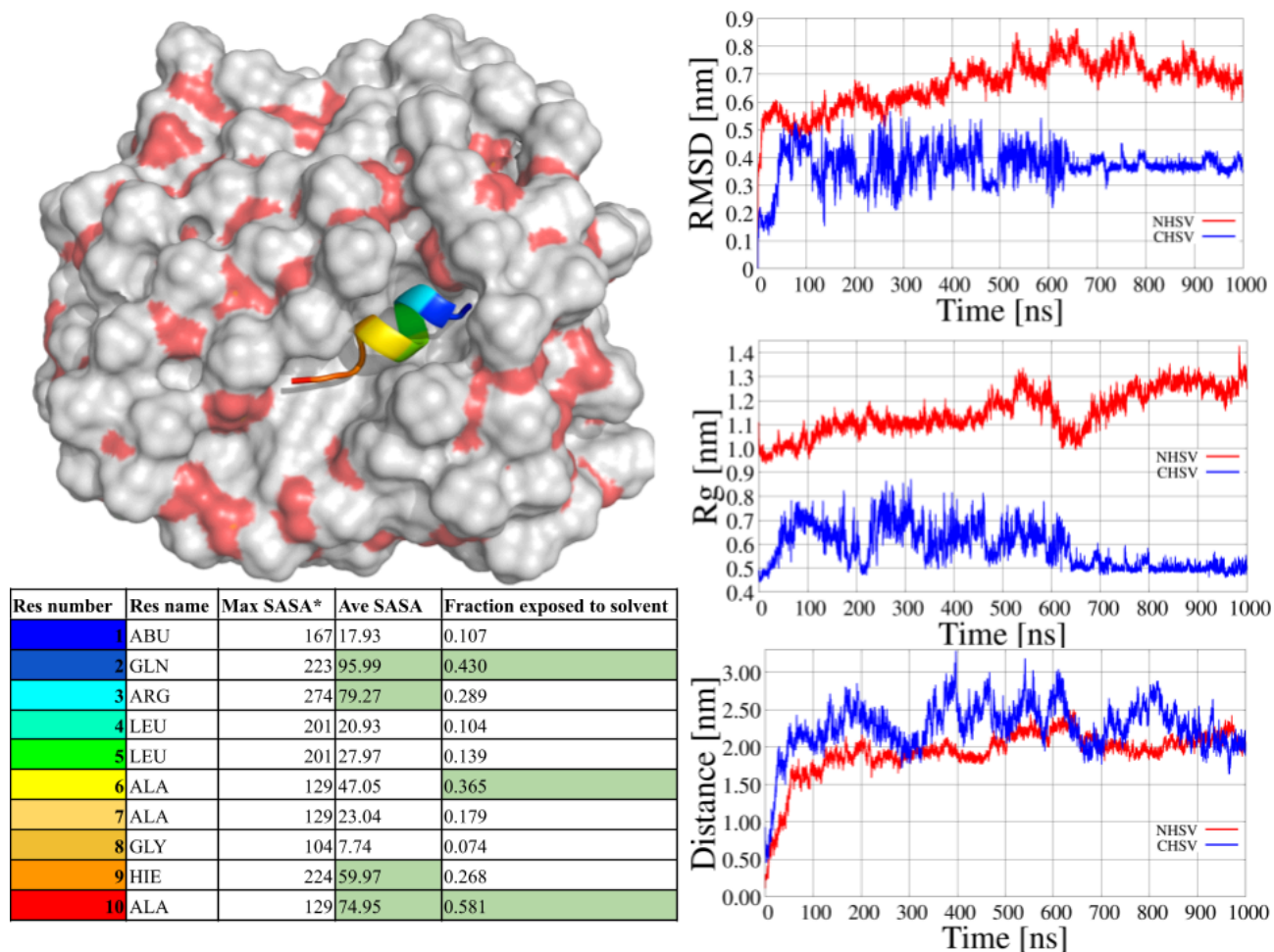
Podsumowując, wykonane badania wskazują, że tworzenie kompleksów miedzi z różnymi formami oligomerycznymi A β 42 może chronić błony lipidowe przed destabilizacją i utlenianiem przez wolne kationy dwuwartościowe, których wysokie stężenie występuje w otoczeniu synaps, a uwalnianie nieustrukturyzowanych peptydów A β może być mechanizmem przywracania homeostazy jonowej i błon lipidowych. Z drugiej strony zauważyliśmy, że jony miedzi skutecznie ograniczają możliwość penetrowania błony lipidowej przez tetrametyczną formę amyloidu β , zatem jednoczesna obecność jonów miedzi i peptydów A β niweluje negatywny wpływ na błony lipidowe, obserwowany w obecności jedynie jednego typu cząsteczek.

H8. Wpływ składu błony lipidowej na herpeswirusowe białka UL49.5

Herpeswirusowe białka UL49.5 stanowią interesujący przedmiot badań ze względu na ich zdolność do omijania odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez blokowanie transportu peptydów przez białko TAP (transporter związany z przetwarzaniem antygenów) do kompleksu MHC-1. Wykonane przez nas wcześniejsze badania eksperymentalno-teoretyczne wykazały, że białko UL49.5 z BoHV-1 (bydłęcego herpeswirusa 1) zawiera specjalne rejony kotwiczące je w błonie, które po zmutowaniu powodują znaczące zmiany strukturalne i utratę właściwości inhibicyjnych TAP (P16). Pomimo uzyskania bardzo dobrej zgodności badań eksperymentalnych i teoretycznych osiągniętej w tamtej pracy (P16), należy zauważyć, że zostały wykonane one przy użyciu prostego homogenicznego modelu błony lipidowej POPC, który nie oddaje właściwości fizykochemicznych błon retikulum endoplazmatycznego (ER), w której występują ludzkie białka TAP. Z tego powodu w kolejnym projekcie (H8) wykonaliśmy badania przy użyciu modelu błony lipidowej zawierającego dwa typy ogonów (DM i PO) oraz trzy typy głów lipidowych (nienaładowane PC i PE oraz naładowane PS), które odzwierciedlają fizjologiczny skład błony retikulum endoplazmatycznego:

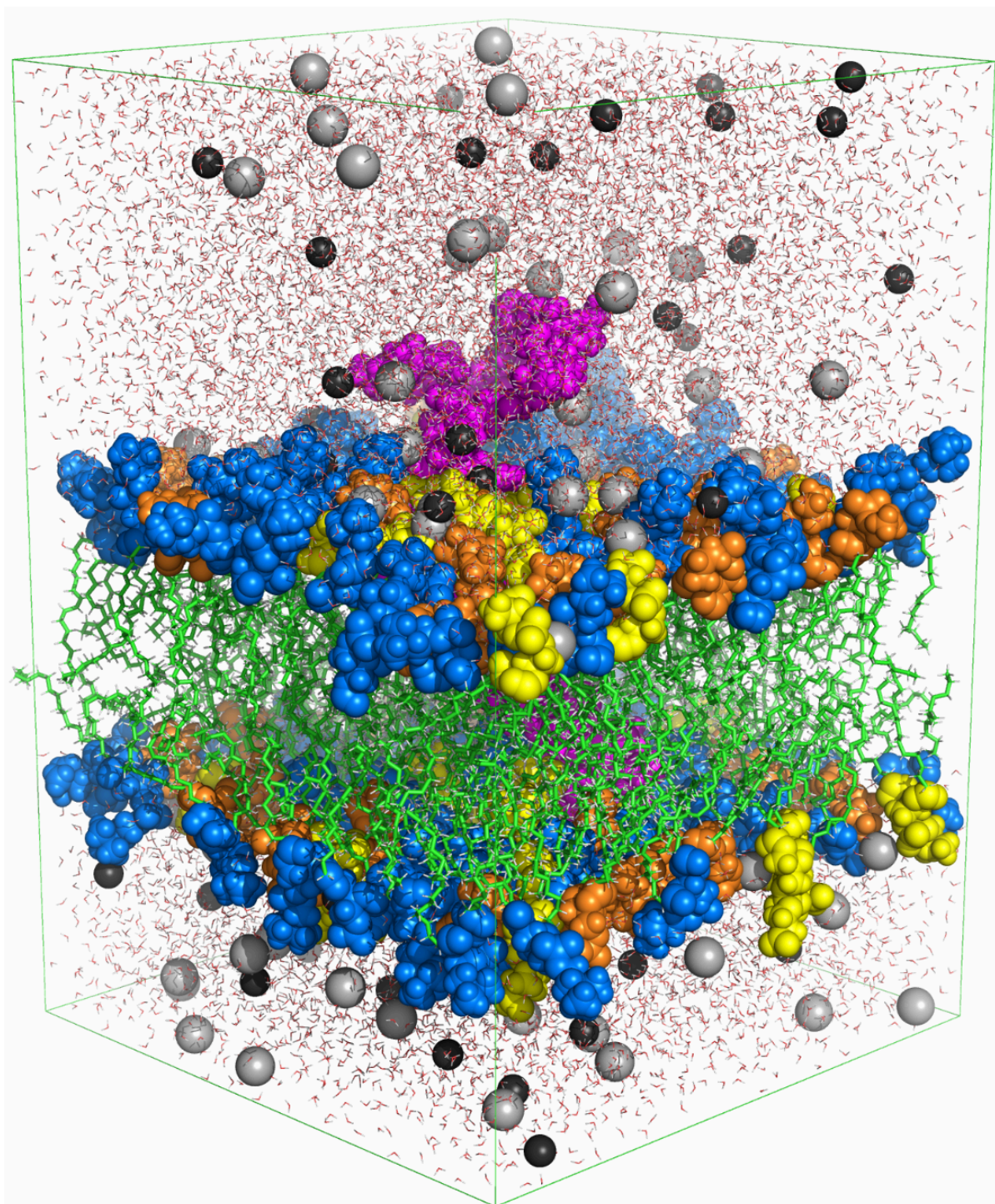
POPC (1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina),	
(1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoetranoloamina),	POPE
(1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfol-seryna),	POPS
(1,2-dimiristoilo-sn-glicero-3-fosfocholina),	DMPC
(1,2-dimiristoilo-sn-glicero-3-fosfoetranoloamina)	DMPE
(1,2-dimiristoilo-sn-glicero-3-fosfol-seryna).	DMPS

Jednocześnie, po raz pierwszy w literaturze, otrzymaliśmy eksperymentalne struktury fragmentów białka UL49.5 z HSV-1 (ludzkiego herpeswirusa 1), które poddałem, na wzór eksperymentu, symulacjom dynamiki molekularnej w miceli (Rysunek 12). Badania NMR wykazały, że N-terminalny fragment białka UL49.5 z HSV-1 przyjmuje wysoce elastyczną, nieuporządkowaną strukturę w części pozakomórkowej z powodu obecności dużej liczby reszt proliny i glicyny. Z kolei region transbłonowy składa się z pojedynczej długiej helisy α , w przeciwieństwie do homologu z BoHV-1, który zawiera dwie krótsze helisy zorientowane pod kątem 90°.



Rysunek 12. Wizualizacja eksperymentalnie wyznaczonej części białka UL49.5 podczas symulacji dynamiki molekularnej w miceli DPC (micela została przedstawiona w formie powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, gdzie szary i czerwony kolor przedstawia odpowiednio atomy wodoru i tlenu eksponowane do rozpuszczalnika, a peptyd został przedstawiony w reprezentacji typu wstążka w kolorach tęczy) (górna lewa część rysunku); wykresy RMSD, Rg i odległości od środka micelu dla dwóch części białka UL49.5 podczas symulacji dynamiki molekularnej w miceli DPC (dodecylofosfocholiny) (prawa część rysunku) oraz przedstawienie ekspozycji do rozpuszczalnika poszczególnych części peptydu. Część rysunku z pracy H8. Wykorzystano na podstawie licencji CC BY 4.0 Deed.

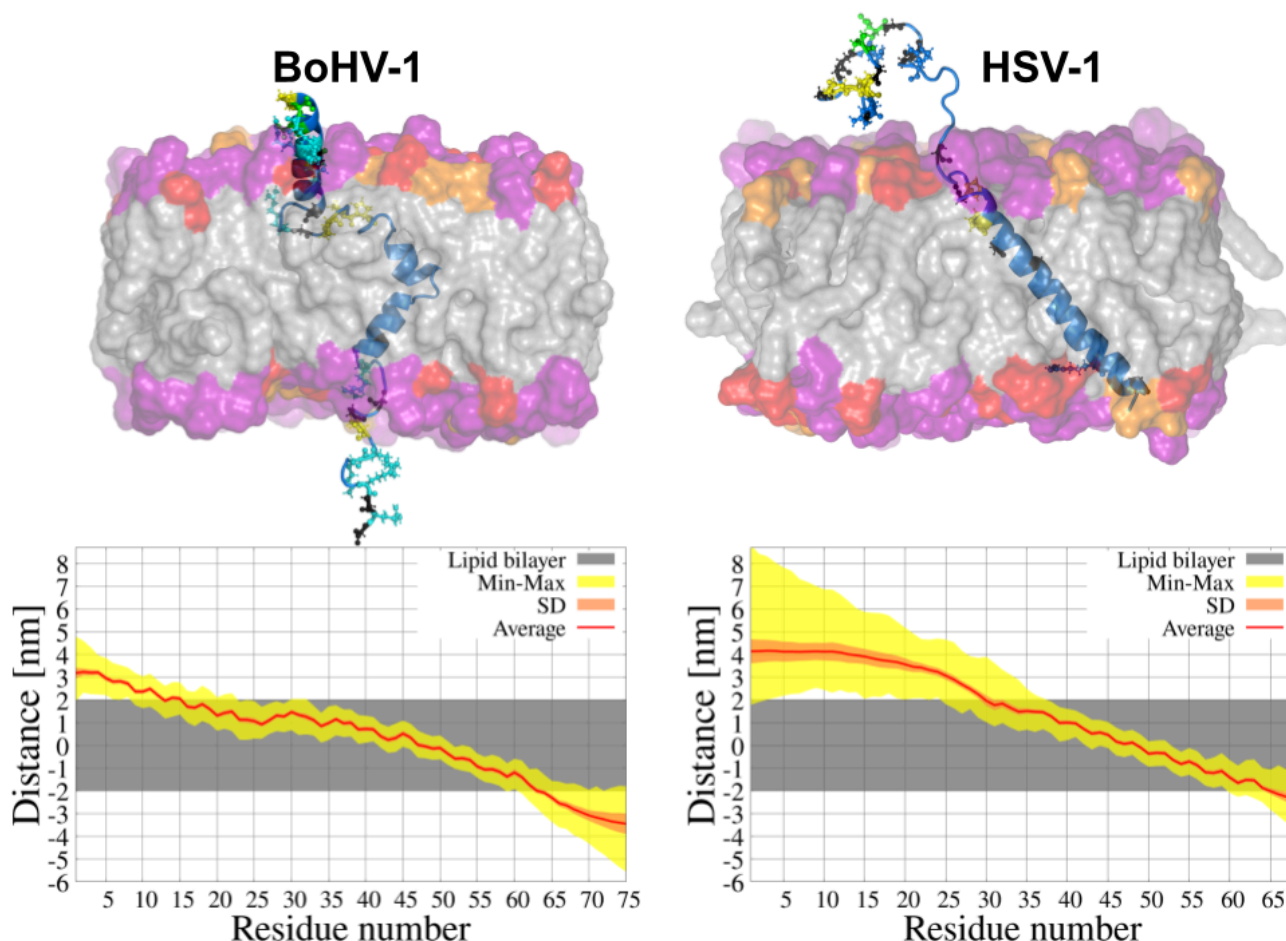
Otrzymane w wyniku symulacji dynamiki molekularnej w miceli równowagowe formy struktur fragmentów N- i C-terminalnych białka połączyłem ze sobą w celu odtworzenia kompletnej struktury białka UL49.5 z HSV-1. Tak otrzymany model białka umieściłem w heterogenicznej błonie lipidowej opisanej powyżej i poddałem go seriom symulacji dynamiki molekularnej, a otrzymane wyniki bazujące na uzbieżnionych częściach trajektorii porównałem z białkiem UL49.5 z BoHV-1 (Rysunek 13). Wykonane symulacje wykazały, że szczególnie białko z BoHV-1 wykazuje wysoką specyficzność do wiązania się z jednym typem lipidów – naładowanymi głowami PS, co powoduje dodatkową stabilizację struktury fragmentu N-terminalnego tego białka w stosunku do symulacji w homogenicznym modelu POPC. Ponadto białko UL49.5 z BoHV-1 wykazuje większe powinowactwo do błony retikulum endoplazmatycznego i tworzy więcej oddziaływań z głowami lipidowymi w porównaniu z białkiem z HSV-1.



Rysunek 13. Wizualizacja opracowanego modelu układu białka UL49.5 z herperwirusa HSV-1 (różowe kule) w heterogenicznym modelu błony lipidowej (różne głowy lipidowe zostały oznaczone różnokolorowymi kulami), otoczonego jonami Na^+ , Cl^- (odpowiednio jasno- i ciemnoszare kule) i wodą (cienkie linie) w pudełku periodycznym (zielony obrys). Rysunek stanowi fragment abstraktu graficznego w pracy H8. Wykorzystano na podstawie licencji CC BY 4.0 Deed.

Analiza dynamiki białka UL49.5 z HSV-1 wykazała bardzo dużą ruchliwość fragmentu N-terminalnego z powodu obecności licznych reszt glicyny i proliny, która zapewne stanowi przyczynę utraty zdolności do inhibicji białka TAP (Rysunek 14). Białko z HSV-1 posiada także długą i sztywną helisę transbłonową, która w przeciwieństwie do dwóch helis transbłonowych

połączonych elastycznym łącznikiem (pętlą) w białku UL49.5 z BoHV-1, gorzej pasuje do białka TAP. Dodatkowo, fragment C-terminalny białka UL49.5 z BoHV-1 wystaje po luminalnej stronie błony, podczas gdy w HSV-1 jest on całkowicie zagłębiony w dwuwarstwie lipidowej.



Rysunek 14. Wizualizacja struktur reprezentatywnych białek UL49.5 z herpesvirusów BoHV-1 i HSV-1 (górna część rysunku) i wykresy odległości średniej (czerwona linia), odchylenia standardowego (pomarańczowy kontur) i zaobserwowanych wartości minimalnych-maksymalnych (żółty kontur) od środka błony lipidowej (dolna część rysunku). Rysunek z pracy H8. Wykorzystano na podstawie licencji CC BY 4.0 Deed.

Porównując strukturę fragmentu N-terminalnego obu białek, widać wyraźnie, że UL49.5 z BoHV-1 tworzy helisę, podczas gdy UL49.5 z HSV-1 przyjmuje głównie nieuporządkowaną strukturę z pojedynczym i niezbyt stabilnym skrętem α -helisy. Ponadto, analizując ruchliwość tej części obu białek, można zauważyć, że UL49.5 z BoHV-1 tworzy stabilną helisę N-terminalną o niewielkiej ruchliwości, która ulega częściowej deformacji w hydrofilowej części błony i jest utrzymywana w błonie przez zakotwiczenie resztami aminokwasowymi 30RRE32. W przypadku białka z HSV-1, fragment N-terminalny jest niezwykle elastyczny z powodu licznych reszt Gly i Pro. Tworzy on zmienne struktury podczas symulacji dynamiki molekularnej i orientuje się w różnych kierunkach względem powierzchni błony. N-terminalna część białka UL49.5 z HSV-1 nie posiada reszt kotwiczących całe białko w błonie, jak ma to miejsce w przypadku białka z BoHV-1. Jest to kolejna istotna różnica w strukturze, zachowaniu i skrajnie odmiennej aktywności biologicznej obu białek kodowanych przez różne wirusy.

Analiza strukturalna białka UL49.5 kodowanego przez oba wirusy pokazuje znaczące różnice w budowie i zachowaniu części transbłonowej. Białko UL49.5 z BoHV-1 ma dwie krótkie α -helisy ułożone pod kątem około 90° względem siebie, podczas gdy to kodowane przez HSV-1 ma jedną długą helisę transbłonową jednak fluktuacje tej części białka z obu wirusów są podobne. Co ciekawe, oba białka w N-terminalnej części helisy transbłonowej zawierają reszty prolin, które, jak zostało wykazane w poprzedniej pracy (P16), są kluczowe dla aktywności biologicznej białka UL49.5 z BoHV-1. Z kolei nie jest pewne jak reszty prolin w tej pozycji w UL49.5 z HSV-1 wpływają na aktywność biologiczną, wiadomo jednak na podstawie wykonanych symulacji, że usztywniają pierwszy zwój helisy transbłonowej.

W poprzedniej pracy (P16) przeprowadziliśmy badania dynamiki molekularnej białka UL49.5 z BoHV-1 w prostym, homogenicznym modelu błony POPC. W porównaniu z wynikami dynamiki molekularnej w wieloskładnikowym modelu błony retikulum endoplazmatycznego, nie zauważyliśmy znaczących zmian w strukturze, z wyjątkiem C-terminalnej części 93RGRG96 białka. W dwuwarstwie POPC C-terminalny koniec białka UL49.5 jest ukryty w błonie, podczas gdy w wieloskładnikowym modelu błony ER ta część białka wystaje z błony po jej luminalnej stronie. Na podstawie wcześniejszych obserwacji ten motyw C-terminalny powinien aktywować całą ścieżkę degradosomu. Porównując strukturę i ułożenie C-terminalnej części białka UL49.5 z obu wirusów, widać, że C-terminalny koniec białka UL49.5 z HSV-1, w przeciwieństwie do tego białka z BoHV-1, jest całkowicie ukryty w błonie. Ponadto białko UL49.5 kodowane przez HSV-1 wykazuje znacznie większą tendencję do oddziaływania z naładowanymi głowami lipidowymi PS niż białko UL49.5 kodowane przez BoHV-1. To kolejna różnica w strukturze obu białek, która, choć niewielka, może również wpływać na ich odmienne właściwości biologiczne.

Dotychczasowe badania podkreślają rolę zakotwiczonej w błonie domeny N-terminalnej białka UL49.5 z BoHV-1 jako najważniejszej części w hamowaniu aktywności TAP. Wykazaliśmy wcześniej (P16), że domena N-terminalna zawiera motyw kotwiczący PPQ, który jest niezbędny do bezpośredniego wiązania TAP lub regulacji konformacji UL49.5 wymaganej do wiązania TAP. UL49.5 z HSV-1 ma nieustrukturyzowaną, elastyczną domenę N-terminalną, której brakuje motywu podobnego do PPQ. Ponadto podczas dokowania białka UL49.5 z HSV-1 do TAP za pomocą serwera HDock okazało się, że wysoka elastyczność domeny N-terminalnej wydaje się być główną przyczyną niepowodzenia w dopasowaniu przestrzennym białek, a serwer automatycznie obciął 28 N-terminalnych reszt aminokwasowych (efekt ten nie był obserwowany dla białka UL49.5 z BoHV-1).

Podsumowując, nasze wyniki pokazują, że istnieje kilka czynników przyczyniających się do braku wiązania się UL49.5 z HSV-1 do TAP. Po pierwsze, długa i sztywna helisa domeny transbłonowej (TMD) HSV-1, w przeciwieństwie do BoHV-1, gorzej pasuje do części transbłonowej białka TAP. W przypadku białka UL49.5 z BoHV-1 fragment transbłonowy jest dłuższy, co wymusza na białku przybranie struktury dwóch połączonych ze sobą krótszych helis aby zmieścić się w błonie retikulum, a taki układ helis prawdopodobnie umożliwia lepsze dopasowanie do TAP. Po drugie, wysoce ruchoma część N-terminalna białka HSV-1, wzbogacona o reszty Gly i Pro, czyni ją wysoce elastyczną. Ta elastyczność, w połączeniu z brakiem motywów kotwiczących, takich jak motyw PPQ występujący w UL49.5 z BoHV-1, utrudnia części N-terminalnej białka z HSV-1 zanurzenie się w błonie w taki sam sposób, jak robi to białko z wirusa BoHV-1. Te różnice strukturalne, szczególnie elastyczność regionu N-terminalnego i brak motywów kotwiczących w HSV-1 z UL49.5, mogą przyczyniać się do jego niezdolności do hamowania kompleksu TAP, w przeciwieństwie do białka UL49.5 z BoHV-1.

H9, H10 i H11 Stabilność i wpływ wiązań disulfidowych na wybrane białka zbadana przy użyciu modeli statycznych i dynamicznych.

Pomimo że wiązania disulfidowe obecne są w ponad 20% białek w bazie struktur białkowych PDB, ich rola jest często pomijana podczas badań eksperymentalnych i teoretycznych. Wynika to

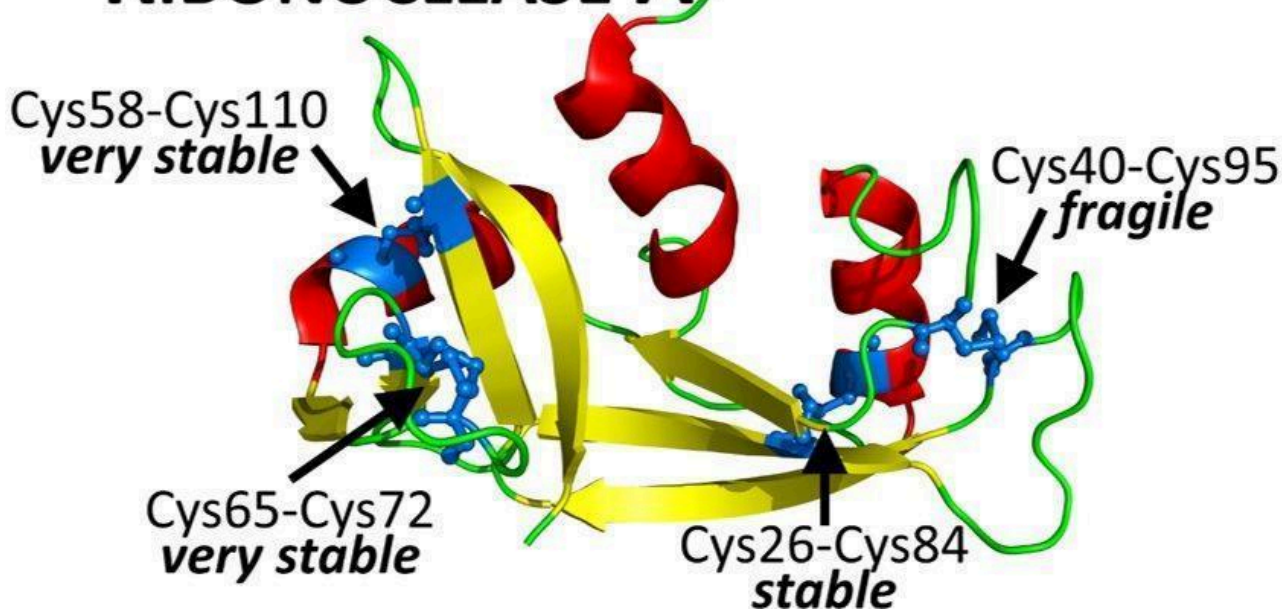
częściowo z powszechnego, lecz nie zawsze słusznego poglądu, że wiązania disulfidowe pełnią głównie funkcję stabilizatorów struktury białka. Tymczasem wiadomo, że redukcja jednego wiązania disulfidowego nie zawsze obniża stabilność białka, a dodanie nowego wiązania nie zawsze ją zwiększa. Wiazania disulfidowe mogą pełnić także inne role, jak utrzymywanie sztywności, zapobieganie proteolizie enzymatycznej czy regulacja funkcji białka. Niestety, klasyczne pola siłowe nie umożliwiają przeprowadzania reakcji chemicznych, takich jak tworzenie i zrywanie wiązań disulfidowych między łańcuchami bocznymi cystein, w trakcie symulacji dynamiki molekularnej. Jediną możliwością jest wstępne zdefiniowanie, które cysteiny mają być związane mostkiem disulfidowym.

Ponieważ tworzenie zarówno natywnych jak i nienatywnych wiązań disulfidowych jest naturalnym etapem zwiwania części białek, takich jak np. rybonukleaza A, udoskonaliłem metodę dynamicznego tworzenia i zrywania wiązań disulfidowych w gruboziarnistym polu siłowym UNRES (H9) z dodatkową barierą energetyczną uniemożliwiającą tworzenie potrójnych wiązań disulfidowych (H10). Możliwość tworzenia takich niefizycznych oddziaływań pomiędzy trzema łańcuchami bocznymi cystein, naśladujących wiązania disulfidowe, wynikała ze stosowania uproszczonej, gruboziarnistej reprezentacji białek. Opracowany potencjał wykorzystywał do określenia możliwości tworzenia i zrywania wiązań disulfidowych odległość oraz kąt między łańcuchami cystein znajdującymi się w swoim pobliżu umożliwiając regulowanie głębokości studni potencjału, dopasowując zachowanie do badanych warunków redukcyjno-oksydacyjnych.

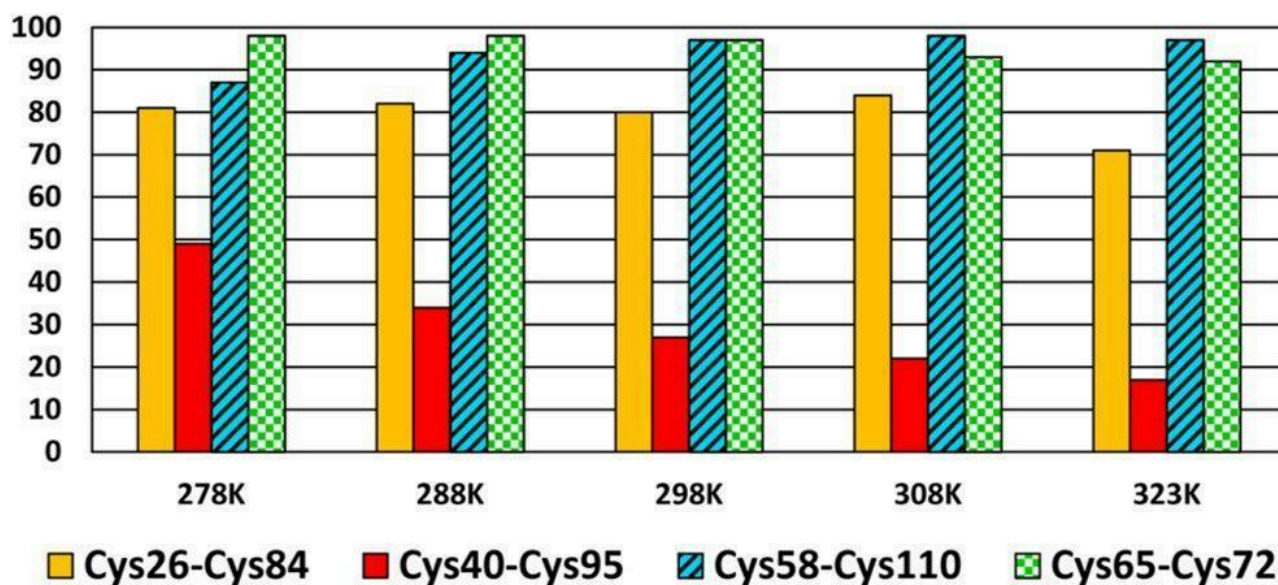
W następnym kroku przeprowadziłem testowe symulacje dynamiki molekularnej dla wybranych białek i możliwości prawidłowego ich zwinięcia się w trakcie symulacji, czyli otrzymania struktury natywnej białka w symulacji rozpoczynającej się od konformacji rozciągniętej, w polu siłowym UNRES bez wiązań disulfidowych i ze statycznym i dynamicznym ich traktowaniem (H9). Otrzymane wyniki wskazują na to, że proste włączenie wiązań disulfidowych w przypadku białek nie zwiniętych nie poprawia znacząco jakości przewidywania struktury, ponieważ białka często utykają wtedy w konformacjach nienatywnych, blokowanych energetycznie przez obecność wiązań disulfidowych, wytwarzając na przykład konformacje spletane. Używanie dynamicznego opisu wiązań disulfidowych również nie poprawia znacząco zdolności przewidzenia struktury natywnej białek ze względu na dłuższy czas obliczeń potrzebny do przeprowadzenia zwinięcia wynikający m.in. z tworzenia się nienatywnych wiązań disulfidowych. Przeprowadzone badania wykazały, że badanie procesu zwiwania białek jest trudne, natomiast obecność wiązań disulfidowych dodatkowo znacząco zwiększa tę trudność.

Z powyższego powodu, opracowane rozszerzenie metody dynamicznego traktowania wiązań disulfidowych wykorzystałem do przeprowadzenia szeregu symulacji dynamiki molekularnej w różnych temperaturach obserwując dynamikę rybonukleazy A i stabilność poszczególnych wiązań disulfidowych. Wykonane badania wykazały, że termiczne rozwijanie białka następuje najczęściej przez zerwanie wiązania disulfidowymi między resztami cysteiny Cys40-Cys95 (Rysunek 15), które łączą dwie słabo ustrukturyzowane części białka. Co więcej fragmenty rybonukleazy A w otoczeniu reszty 40 i 95 wykazują głównie odpychające oddziaływania, które w warunkach redukcyjnych prowadzą do znaczącej destabilizacji wiązania disulfidowego spinającego je. Podobny mechanizm obniżonej stabilności występuje w przypadku wiązania disulfidowego między resztami cysteiny Cys26-Cys84, jednak w tym przypadku zmniejszenie stabilności jest mniejsze, gdyż oba te fragmenty są wysoce ustrukturyzowane i nie charakteryzują się zbyt dużą fluktuacją struktur drugorzędowych, w skład w których wchodzi, ani jej zmian ich orientacji.

RIBONUCLEASE A



Percentage of trajectories with stable disulfide bonds



Rysunek 15. Reprezentacja typu wstążki rybonukleazy A (górna część rysunku) i wykres procentu trajektorii, w których dane wiązanie disulfidowe było stabilne (dolna część rysunku). Rysunek z pracy H10. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from J. Chem. Theory Comput. 2017, 13, 11, 5721–5730. Copyright 2024 American Chemical Society).

W celu uzyskania kompletnego obrazu stabilności i funkcji wiązań disulfidowych w rybonukleazie A, przeprowadziliśmy gruboziarniste i pełnoatomowe symulacje sterowanej dynamiki molekularnej (SMD), odpowiadające eksperymentowi spektroskopii sił atomowych (AFM) zwiększając w czasie odległość między N- i C-terminalnymi końcami białka. Pierwszym krokiem w tym kierunku było wprowadzenie do pełnoatomowego pola siłowego Amber potencjału umożliwiające zrywanie i tworzenie wiązań disulfidowych w trakcie symulacji, na podobieństwo tego zaimplementowanego w gruboziarnistym polu siłowym UNRES. Ze względu na wykorzystanie reprezentacji pełnoatomowej, potencjał ten nie musiał zawierać w sobie

różnicowania ze względu na kąt walencyjny sąsiadujących cystein, a opierał się jedynie na odległości atomów siarki znajdujących się w grupach tiolowych łańcuchów bocznych.

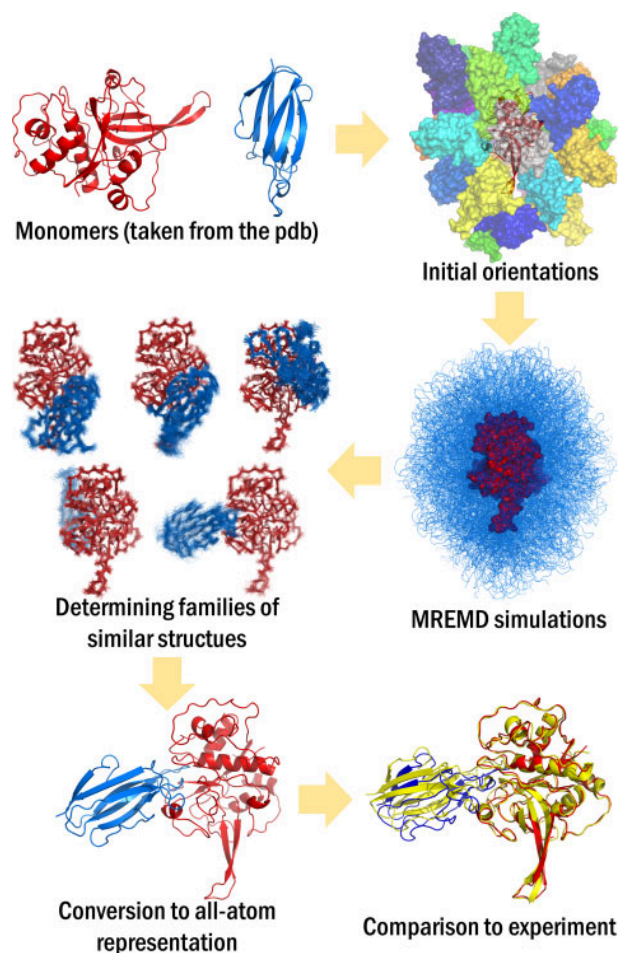
Przeprowadzone gruboziarniste i pełnoatomowe symulacje rozciągania rybonukleazy A cechowały się dużą zgodnością względem siebie oraz wykazały, że stabilność tego białka znacząco zależy od warunków redukcyjno-utleniających w jakich się znajduje. Ponadto, wytypowaliśmy, że najbardziej wewnętrzne wiązanie disulfidowe Cys65-Cys72, będące jednocześnie wiązaniem łączącym ze sobą najbardziej lokalne fragmenty białka, jest najbardziej stabilne i w trakcie mechanicznego rozciągania białka ulega rozerwaniu jako ostatnie. Obserwacja ta została następnie potwierdzona przez niezależne badania eksperymentalne wykonane przez inną grupę badawczą.¹⁶

Otrzymane profile siły stawianej przez białko podczas rozciągania jasno pokazały, że każdemu zerwaniu wiązania disulfidowego podczas rozciągania białka towarzyszy wzrost (tzw. pik) siły oraz znaczące lokalne i globalne zmiany konformacyjne. Przeprowadzone badania dostarczyły szczegółowego wglądu w kluczową rolę stabilizującą wiązań disulfidowych oraz dynamikę ich zrywania podczas rozwijania rybonukleazy A, wykazując dobrą zgodność zarówno między używanymi metodami, jak i z danymi eksperymentalnymi a opracowane modele dynamicznego traktowania wiązań disulfidowych w trakcie symulacji dynamiki molekularnej umożliwiają badanie różnorodnych procesów, w jakie zaangażowane są białka, także tych trudnych do uchwycenia w eksperymentach.

H12. Opracowanie metody UNRES-Dock do przewidywania struktur kompleksów białko-białko i białko-peptyd.

Kolejną pożądaną funkcjonalnością brakującą w pakiecie UNRES była funkcja przewidywania struktur kompleksów białko-białko i białko-peptyd. Z tego powodu opracowałem protokół UNRES-Dock do przewidywania takich struktur, oparty o gruboziarniste symulacje dynamiki molekularnej z wielokrotną wymianą replik (MREMD) (H12). Otrzymana metoda wykorzystywała struktury peptydów i białek lub opcjonalnie sekwencje peptydów do wygenerowania „chmury” możliwie różnorodnych położenia początkowych układów (Rysunek 16). Następnie wykonywane są symulacje dynamiki molekularnej z wymianą replik w celu przeszukania przestrzeni konformacyjnej układu (72 repliki w 36 temperaturach w wykonanych symulacjach), a ich uzbite część poddawana jest analizie ważonych histogramów i analizie skupień w celu wygenerowania struktur reprezentatywnych, które następnie przekształcane są do modeli pełnoatomowych.

Podczas opracowywania protokołu dokowania odkryłem, że każdy z elementów protokołu ma istotne znaczenie na jakość otrzymanych struktur i wydajność całej metody. Dla przykładu, tworzenie chmury położenia początkowych, w przeciwieństwie do klasycznego dokowania, nie dopasowuje idealnie do siebie powierzchni i oddziaływań białek, lecz generuje zespoły różnorodnych struktur w celu przyspieszenia i poprawy przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej badanego systemu podczas symulacji dynamiki molekularnej z wymianą replik. Przeprowadzone przeze mnie testy wykazały, że podejście to jest znacznie wydajniejsze zarówno od używania jednej początkowej orientacji białek, jak i modeli kompleksów białek o dużym interfejsie oddziaływania. Szczególnie problematyczne okazało się drugie podejście, często skutkujące niską zbiteżnością symulacji w wyniku utrzymywania się układu w jednej orientacji będącej lokalnym minimum energetycznym.

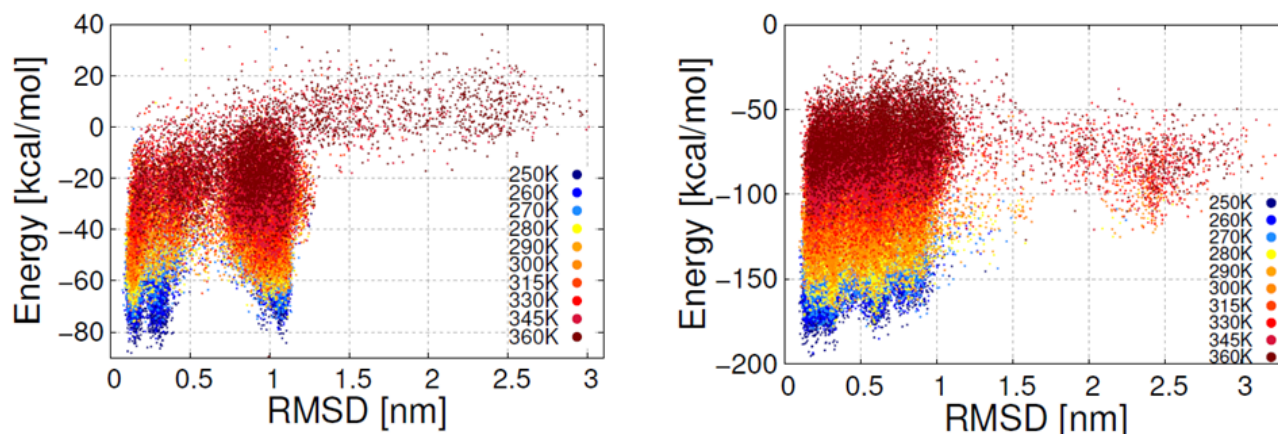


Rysunek 16. Schematyczna wizualizacja protokołu dokowania białko-białko w metodzie UNRES-Dock. Rysunek z pracy H12. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Bioinformatics, Volume 37, Issue 11, June 2021, Pages 1613–1615. Copyright 2024 Oxford University Press, licencja 5744190046736).

Opracowany przeze mnie protokół UNRES-Dock umożliwia dostosowanie poziomu elastyczności konformacyjnej, pozwalając na półsztywne (z ang. “semi-rigid”) i w pełni elastyczne dokowanie molekuł. Głównym elementem protokołu przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej są symulacje dynamiki molekularnej z wymianą replik, w których na białka nakładane są więzy stabilizujące struktury poszczególnych komponentów, nie wpływając jednocześnie na ich ułożenie względem siebie. Poprzez użycie wspomnianych więzów na odległości między centrami oddziaływań w obrębie pojedynczego białka możliwe jest regulowanie poziomu ich elastyczności podczas symulacji dokowania. Co ważne, opracowany protokół dokowania wykorzystuje pole siłowe UNRES z periodycznymi warunkami brzegowymi i okazał się znacznie wydajniejszy od poprzednio stosowanej metody typu „smycz” nie pozwalającej białkom oddryfować w nieskończonej przestrzeni, nie będąc jednocześnie obciążoną kierunkowym efektem związanym z utrzymywaniem przez więzy typu „smycz” białek w swoim pobliżu.

Zastosowanie metody dynamiki molekularnej w wariancie z wymianą replik okazało się kluczowe do osiągnięcia odpowiedniego stopnia przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej kompleksów i uzbliżania wyników symulacji ze względu na możliwość przekraczania barier energetycznych w trajektoriach o wysokiej temperaturze, a także umożliwiając oddysocjowanie mało stabilnym formom kompleksu. Wykonane symulacje testowe wykazały, że odpowiedni dobór temperatur replik i siły więzów nałożonych na poszczególne białka jest kluczowy do osiągnięcia zbieżności i uniemożliwienia białkom rozwinięcia się w wysokich temperaturach. Jest to o tyle ważne, że zdecydowana większość białek podczas wiązania się ze sobą w warunkach

fizjologicznych nie ulega drastycznym zmianom konformacyjnym, lecz jedynie niewielkiemu dopasowaniu, występującemu głównie w obrębie interfejsu oddziaływania i używanie więzów na odległości o odpowiedniej sile umożliwia na zachodzenie jedynie ograniczonych zmian konformacyjnych, znacząco poprawiając wydajność obliczeniową metody. Co istotne, dla większości układów pole siłowe UNRES wykorzystane w metodzie wykazywało dobrą zależność między energią swobodną układu a podobieństwem do natywnej struktury kompleksu przedstawioną w formie pierwiastka średniego odchylenia kwadratowego (RMSD, Rysunek 17), demonstrując możliwość rutynowego otrzymywania dobrych wyników, o ile tylko przestrzeń konformacyjna została wystarczająco efektywnie przeszukana.



Rysunek 17. Wykres zależności energii swobodnej kompleksu od wartości RMSD dla replik o różnej temperaturze dla wybranego kompleksu białko-białko (kod PDB: 2WFU; lewy panel) i białko-peptyd (kod PDB: 3BFQ, prawy panel). Rysunek z pracy H12. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Bioinformatics, Volume 37, Issue 11, June 2021, Pages 1613–1615. Copyright 2024 Oxford University Press, licencja 5744190046736).

Podsumowując, opracowany protokół UNRES-Dock umożliwia przewidywanie struktur kompleksów białko-białko i białko-peptyd z możliwością dostosowania poziomu sztywności układów, pozwalając na badanie mechanizmu wiązania półsztywnego i z dopasowaniem struktur komponentów. W przypadku układów białko-peptyd osiągnięta wydajność znacząco przewyższa wydajność podobnych metod, w tym CABS-Dock. Natomiast dokładność dokowania białko-białko osiąga zadowalający poziom, zarówno dla białek typowych, które są powszechnie używane jako białka treningowe i testowe przy projektowaniu metod dokowania molekularnego, jak i niestandardowych, czyli na przykład białek homodimerycznych, rzadko kiedy uwzględnianych w bazach kompleksów białek. Zachowanie to jest odmienne niż w innych metodach używanych do dokowania, takich jak Attract, które silnie bazują na danych statystycznych i osiągają bardzo wysoką wydajność dla układów typowych, znacząco tracąc na skuteczności dla układów niestandardowych lub nie znajdujących się w puli białek testowych używanych podczas optymalizacji metody (Tabela 2).

Tabela 2. Liczba kompleksów białko-białko i białko-peptyd przewidzianych z daną dokładnością według skali CAPRI (tzw. “CAPRI score”) dla metody UNRES-Dock przy generowaniu 10 struktur (Top10), 50 struktur (Top50) oraz dla metod Attract i CABS-Dock przy generowaniu domyślnej liczby 10 struktur. Tabela zaadaptowana z pracy H12. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Bioinformatics, Volume 37, Issue 11, June 2021, Pages 1613–1615. Copyright 2024 Oxford University Press, licencja 5744190046736).

Protein-protein			
Quality	Top10	Top50	Top10 Attract
High	0	0	12
Medium	8	8	1
Acceptable	3	7	1
Incorrect	9	5	6
Protein-peptide			
Quality	Top10	Top50	Top10 CABS-Dock
High	3	4	0
Medium	11	19	6
Acceptable	18	11	22
Incorrect	3	1	7

H13. Modelowanie kompleksu białek CD28-CD86

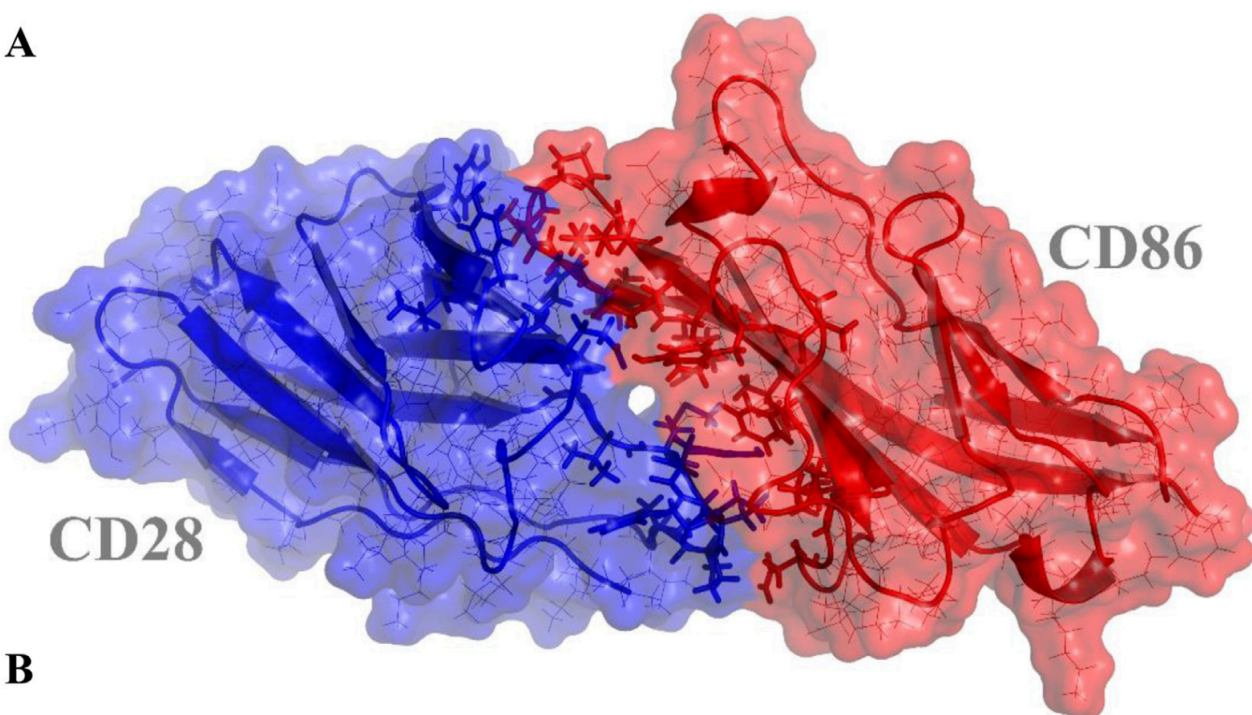
Ostatecznym testem metody UNRES-Dock było przewidzenie struktury kompleksu białek CD28-CD86, który nie został do tej pory rozwiązany eksperymentalnie (H13). W tym celu wykonałem pełny protokół przewidywania struktur kompleksu białek, który został opracowany i opisany w pracy H12, a następnie przeprowadziłem pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej w celu weryfikacji stabilności 10 przewidzianych modeli reprezentatywnych na podstawie analizy skupień zespołów konformacyjnych wygenerowanych przez metodę ważonych histogramów (WHAM) na gruboziarnistych trajektoriach dynamiki molekularnej z wymianą replik (H13). Wykonane symulacje pełnoatomowe wykazały, że z 10 otrzymanych modeli kompleksu CD28-CD86, jedynie model nr 7 jest w pełni stabilny podczas 500 ns symulacji. Dla potwierdzenia tego wyniku wykonałem 5 dodatkowych trajektorii pełnoatomowych dla tego ułożenia białek, w których struktury krystalograficzne CD28 (kod PDB: 1YJD) i CD86 (kod PDB: 1I85) umieściłem w orientacjach odpowiadających modelowi nr 7. Wszystkie te symulacje wykazały wysoką stabilność kompleksu, z wartościami RMSD rzędu 0,4 nm (Rysunek S3 w pracy H13). Badania wykazały także, że nawet dla stabilności heterodimeru dwóch białek o dużym interfejsie oddziaływania, duże znaczenie ma dokładność ułożenia lokalnych elementów struktur jego komponentów, ulegających drobnym deformacjom podczas rekonstrukcji z modeli gruboziarnistych do struktur pełnoatomowych.

Otrzymana struktura kompleksu CD28-CD86 w protokole UNRES-Dock została nie tylko potwierdzona symulacjami pełnoatomowymi, lecz wykazuje także podobieństwo do analogicznego kompleksu CTLA-4-CD86 oraz zgodność z dostępnymi danymi eksperymentalnymi dotyczącymi potencjalnych reszt aminokwasowych wchodzących w skład interfejsu oddziaływań. Analiza interfejsu w przewidzianym modelu wskazuje na kluczową rolę reszt Glu32, Arg34, Tyr51 oraz Met99, Tyr100 i Pro102 z regionu MYPPPY na CD28, a także Phe31, Val39, Glu42, Tyr44, Thr93 i Ile96 na CD86. Zaprojektowany model nie tylko potwierdza wcześniejsze obserwacje eksperymentalne, lecz także prezentuje kompletny interfejs oddziaływania (Rysunek 18) wraz z istotnością poszczególnych reszt aminokwasowych dla utrzymania jego stabilności. Ponadto, symulacje kinetyki asocjacji kompleksów CD28-CD86 i CTLA-4-CD86 wykazały około 4-krotnie niższą stabilność pierwszego z nich, co pozostaje w zgodzie z wynikami badań eksperymentalnych.

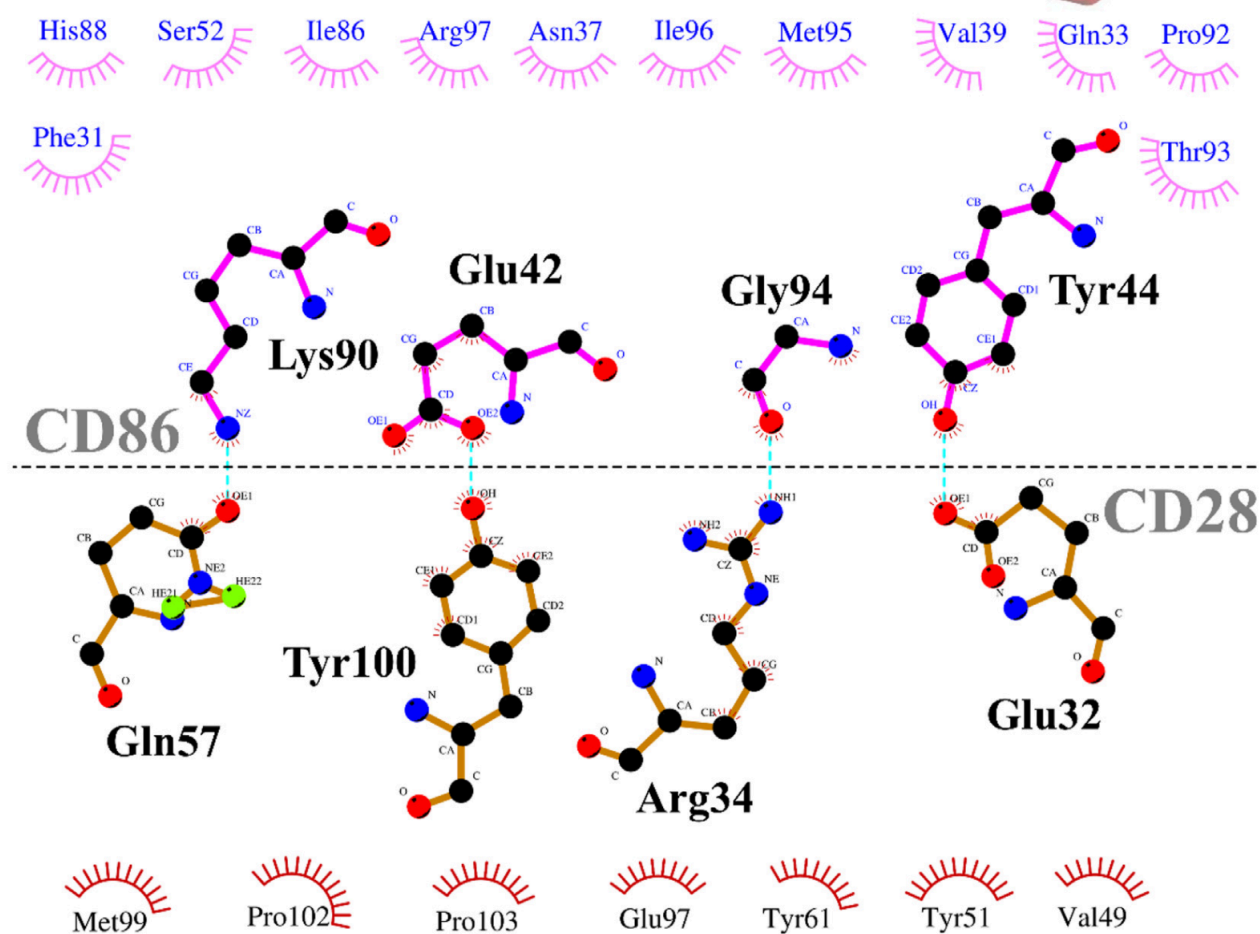
Reasumując, opracowana metoda, łącząca symulacje w różnych skalach rozdzielczości, pozwala na wiarygodne modelowanie struktury i dynamiki kompleksów białkowych. Uzyskane wyniki nie tylko weryfikują dokładność metody UNRES-Dock, ale dostarczają też cennych

informacji na temat strukturalnych i termodynamicznych podstaw oddziaływań białek układu odpornościowego, istotnych z punktu widzenia poszukiwania nowych terapii.

A



B



Rysunek 18. Wizualizacja otrzymanej stabilnej konformacji kompleksu CD86-CD28 wraz z wyszczególnionymi resztami aminokwasowymi biorącymi udział w oddziaływaniu między białkami. Rysunek z pracy H13. Pozyskano prawa do reprodukcji (reprinted with permission from Journal of Molecular Graphics and Modelling Volume 103, March 2021, 107802. Copyright 2024 Elsevier).

5.3.4 Podsumowanie znaczenia publikacji

Przedstawione przeze mnie wyniki wchodzące w skład cyklu powiązanych tematycznie publikacji przyczyniły się do znaczącego zwiększenia możliwości przeprowadzania symulacji przewidujących strukturę i dynamikę białek oraz ich kompleksów. Opracowane protokoły i metody umożliwiły wykonywanie i analizowanie rutynowych, powtarzalnych, a co najważniejsze, opartych w pełni na oddziaływaniach fizycznych, symulacji w celu przewidywania struktur białek, a wykonana optymalizacja znacząco poprawiła wydajność gruboziarnistego pola siłowego UNRES. Część z prezentowanych funkcji została zaimplementowana także w postaci serwera UNRES i UNRES-Dock, umożliwiającego intuicyjne wykonywanie prostych symulacji, a także generowania plików do przeprowadzania długich symulacji na superkomputerach. Opracowane metody przewidywania struktur białek i ich kompleksów zostały przetestowane i docenione w międzynarodowym eksperymencie CASP i CAPRI (P11) oraz posłużyły do otrzymania struktur wielu białek i ich kompleksów. Co więcej, wprowadzenie i zoptymalizowanie potencjału umożliwiającego dynamiczne tworzenie i zrywanie wiązań disulfidowych w trakcie symulacji dynamiki molekularnej rozszerza możliwości modelowania układów zawierających ten typ modyfikacji potranslacyjnych, stanowiących ponad 20% wszystkich białek.

Moje badania przyczyniły się także do lepszego poznania podstaw teoretycznych stojących za fundamentalnymi właściwościami białek. Przeprowadzone symulacje nie tylko określiły wydajność poszczególnych metod do przewidywania struktur i właściwości fizykochemicznych peptydów i białek, ale także określiły, że w szczególności w przypadku białek nieustrukturyzowanych, dominująca część energii swobodnej pochodzi z oddziaływań między białkiem a rozpuszczalnikiem (wodą), a nie oddziaływań w obrębie samego białka. Dostarczyłem także nowe informacje na temat oddziaływań w obrębie i między α -synukleina i A β 42, dwoma kluczowymi molekułami o inherentnie nieuporządkowanej strukturze zaangażowanymi w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych. Moje wyniki rzucają nowe światło na wczesne etapy procesu agregacji tych białek i mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw chorób neurodegeneracyjnych oraz ułatwić projektowanie nowych strategii terapeutycznych.

Dodatkowo wykazałem, że w przypadku zbadanych nieustrukturyzowanych peptydów i małych oligomerów, oddziaływania elektrostatyczne dominują nad van der Waalsa, potwierdzając istotność oddziaływania z rozpuszczalnikiem jako główny czynnik determinujący ich strukturę i dynamikę. Z tego powodu kluczowe jest wykorzystywanie w symulacjach jak najlepszych modeli nie tylko samych białek, ale także wody, jonów i lipidów oraz jak najdokładniejsze odzwierciedlenie warunków fizjologicznych. Te ostatnie okazało się niezwykle istotne podczas badania dynamiki i struktury wirusowych białek UL49.5, których zachowanie w przypadku monoskładnikowego modelu błony lipidowej wykazało dużą zgodność z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi przy użyciu tego samego modelu, jednak nie tłumaczyło wszystkich efektów fizjologicznych. Wykazałem także, że nie zawsze bardziej zaawansowane sposoby próbkowania przestrzeni konformacyjnej są niezbędne do otrzymania wysokiej precyzji obliczeń, a czasem mogą wręcz prowadzić do nieznacznego pogorszenia jakości przewidywania struktur.

Analiza warunków redukująco-oksydacyjnych wykazała, że wiązania disulfidowe znacząco różnią się stabilnością i funkcją a ich wpływ na stabilizację struktury białka znacząco zależy od lokalnego charakteru fragmentów, w których występują. Ponadto wykazałem, że stabilność i kolejność zrywania wiązań disulfidowych znacząco zależy od wpływu czynników zewnętrznych, takich jak środowisko redukująco-utleniające, temperatura czy naprężenia mechaniczne.

Udowodniłem, że połączenie badań na różnych poziomach rozdzielczości stanowi nie tylko weryfikację wyników w przypadku gdy nie są dostępne dane eksperymentalne, lecz także umożliwia poznanie właściwości molekuł w różnych skalach czasowych. Dzięki takiej obserwacji określiłem mechanizm i ścieżki agregacji czterech łańcuchów amyloidu β w gruboziarnistym polu

siłowym, pokazując, że dominująca ścieżka to tworzenie dimerów z monomerów a następnie tetramerów z dimerów, podczas gdy ścieżka tworzenia tetramerów z trimerów i monomerów jest dużo mniej korzystna. Otrzymane modele tetrameryczne zweryfikowałem przy użyciu symulacji pełnoatomowych i wytypowałem model, który jest zgodny ze wszystkimi niesprzecznymi danymi literaturowymi. Podobny schemat postępowania umożliwił mi także przewidzenie struktury kompleksu białek CD28-CD86, istotnego w odpowiedzi immunologicznej organizmu, przy użyciu gruboziarnistego protokołu UNRES-Dock, którego wyniki zweryfikowałem przy użyciu metody pełnoatomowej, która umożliwiła zawężenie z dziesięciu modeli gruboziarnistych do jednego pełnoatomowego, który wykazuje wysokie podobieństwo do analogicznego kompleksu BTLA-CD86. Opracowane modele białek, ich kompleksów i agregatów mogą posłużyć do dalszych badań, na przykład w celu opracowania substancji inhibitujących wczesne etapy agregacji amyloidu β .

5.4 Wyniki spoza cyklu publikacji opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Wykonane przeze mnie badania przed uzyskaniem stopnia doktora koncentrowały się na wykorzystaniu i udoskonaleniu pola siłowego UNRES do przewidywania struktur białek. W tym celu brałem udział w przewidywaniu struktur białek w ramach 10 edycji eksperymentu CASP, wykazując duży potencjał tkwiący w metodzie, przy jednoczesnym wykazaniu jej słabości polegających m.in. na arbitralności wyboru struktur reprezentatywnych oraz niejednorodnym wykonywaniu przewidywania zależnym od preferencji użytkownika pola (D1). Zastosowane podejście uwidocznilo wysoką wydajność w zakresie przewidywania ułożenia względem siebie domen białek, osiągając najlepszy wynik dla jednego z badanych układów spośród ponad 100 grup naukowych biorących udział w eksperymencie. W celu poprawy zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES w obrębie elementów słabo ustrukturyzowanych, wyznaczyłem i wprowadziłem do pola siłowego UNRES potencjały oparte na statystycznej analizie reszt aminokwasowych wchodzących w skład struktur białkowych typu pętli, przy użyciu uproszczonego alfabetu typów reszt aminokwasowych (D2) a następnie analogicznie, lecz dla wszystkich typów reszt aminokwasowych, dla potencjałów wyznaczonych metodami półempirycznymi (D5). Wprowadzenie tych potencjałów korelacyjnych znacząco poprawiło jakość przewidywania konformacji pętli i innych fragmentów częściowo nieustrukturyzowanych w zbiorze białek testowych. Poprawa jakości przewidywania fragmentów słabo ustrukturyzowanych poprawiła także ułożenie elementów ustrukturyzowanych, takich jak α -helisy i β -kartki, co było szczególnie widoczne w przypadku potencjału opartego na fizyce oddziaływań (D5).

Równocześnie, w ramach inicjatywy WeFold, podjąłem wysiłek w celu poprawy zdolności pola siłowego UNRES do przewidywania struktur białek dzięki wykorzystaniu danych zewnętrznych, dostarczanych przez współpracowników z innych grup badawczych, określających prawdopodobne zakresy odległości między resztami aminokwasowymi w protokole przewidywania (D3). Współpraca ta zaowocowała otrzymaniem dla kilku białek znaczącej poprawy przewidywania ogólnego typu struktury, jednak nie wpłynęła znacząco na poprawę lokalnych niedoskonałości wynikających z użycia reprezentacji gruboziarnistej.

Wprowadzane przeze mnie i innych twórców pola siłowego UNRES ulepszenia posłużyły do wytypowania dalszych kierunków rozwoju zjednoczonego modelu gruboziarnistego (z ang. UCGM, przemianowanego później na UNICORN) nie tylko dla białek (UNRES), ale także innych biomolekuł, takich jak kwasy nukleinowe (NARES), węglowodany (SUGRES) i lipidy (D4).

Następnie, udoskonalone pole siłowe UNRES wykorzystaliśmy do zbadania wpływu argininy na białko ją wiążące z *Thermotoga maritima* i związane z tym procesem zmiany strukturalne zachodzące w białku. Projekt ten, oprócz zaproponowania mechanizmu wiązania argininy przez białko z *Thermotoga maritima*, wykazał, że udoskonalone pole siłowe UNRES, mimo gruboziarnistego charakteru, dysponuje wystarczającą dokładnością do przewidywania wpływu

oddziaływania jednej reszty aminokwasowej z białkiem i zachodzących pod wpływem oddziaływania zmian strukturalnym (D6). Analogicznie do tej pracy, pole siłowe UNRES zostało wykorzystane do przewidzenia struktury i dynamiki kompleksu drożdżowych białek Isu1-Jac1, wykazując, że przy zachowaniu eksperymentalnego interfejsu wiązania przez trzy reszty aminokwasowe z Jac1 (L105, L109 i Y163), białka te posiadają trzy odmienne orientacje tworzące stabilne kompleksy (D8), różniące się dodatkowymi resztami aminokwasowymi biorącymi udział w wiązaniu się białek. Badania te wykazały, że białka te posiadają dużą swobodę konformacji i dynamiki orientacji białek, zachowując w każdej ze struktur oddziaływania między przynajmniej trzema resztami aminokwasowymi z białka Jac1.

Ostatnia wykonana przeze mnie praca przed uzyskaniem stopnia doktora skupiała się na użyciu wielomodalnych miękkich więzów bazujących na fragmentach struktur przewidzianych przy wykorzystaniu innych metod opartych na metodach statystycznych podobieństw sekwencyjno-strukturalnych białek do poprawy zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES (D7). Wykonane badania koncentrowały się na trudnych układach, w których struktury poszczególnych domen zostały przewidziane prawidłowo przez wiodące metody bioinformatyczne, lecz ich ułożenie względem siebie nie zostało poprawnie określone, ze względu na jego odmienny typ w stosunku do białek o znanych strukturach. Wykonane badania wykazały, że pole siłowe UNRES wspomagane danymi dotyczącymi struktur lokalnych jest w stanie przewidywać ułożenia domen wielu białek lepiej niż jakiegokolwiek inne metody, szczególnie jeśli posiadają one duży interfejs oddziaływania, dzięki wykorzystaniu potencjałów opartych na fizyce oddziaływań a nie statystyce.

Oprócz regularnych artykułów naukowych, podczas doktoratu opublikowałem kilka artykułów pokonferencyjnych bazując na wstępnych obserwacjach dokonanych w trakcie prowadzenia badań do doktoratu (DM3-4). W ramach stażu naukowego w Jackson State University badałem zdolność oddziaływania i potencjalnej nanotoksyczności nanorurek węglowych do receptorów Tol (DM1) oraz oddziaływań nanocząstek złota z białkami i DNA (DM2). Dodatkowo w polskojęzycznym rozdziale w książce (DM5) syntetycznie opisałem podstawowe koncepty stosowane w modelowaniu molekularnym.

Lista publikacji opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora:

- D1. „Lessons from application of the UNRES force field to predictions of structures of CASP10 targets”, Yi He, Magdalena A. Mozolewska, **Paweł Krupa**, Adam K. Sieradzan, Tomasz K. Wirecki, Adam Liwo, Khatuna Kachlishvili, Shalom Rackovsky, Dawid Jagieła, Rafał Ślusarz, Cezary R. Czaplewski, Stanisław Ołdziej, Harold A. Scheraga*; Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 2013, 110(37), 14936-14941.
- D2. „Improvement of the treatment of loop structures in the UNRES force field by inclusion of coupling between backbone- and side-chain-local conformational states”, **Paweł Krupa**, Adam K. Sieradzan,* S. Rackovsky, Maciej Baranowski, Stanisław Ołdziej, Harold A. Scheraga, Adam Liwo, Cezary Czaplewski; Journal of Chemical Theory and Computation, 2013, 9(10), 4620–4632.
- D3. „WeFold: A Coopetition for Protein Structure Prediction”, George A. Khoury, Adam Liwo, Firas Khatib, Hongyi Zhou, Gaurav Chopra, Jaume Bacardit, Leandro O. Bortot, Rodrigo A. Faccioli, Xin Deng, Yi He, **Paweł Krupa**, Jilong Li, Magdalena A. Mozolewska, Adam K. Sieradzan, James Smadbeck, Tomasz Wirecki, Seth Cooper, Jeff Flatten, Kefan Xu, David Baker, Jianlin Cheng, Alexandre C. B. Delbem, Christodoulos A. Floudas, Chen Keasar, Michael Levitt, Zoran Popović, Harold A. Scheraga, Jeffrey Skolnick, Silvia N. Crivelli* and Foldit Players; Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014, 98(9):1850–1868.
- D4. „A Unified Coarse-Grained Model of Biological Macromolecules Based on Mean-Field Multipole-Multipole Interactions”, Adam Liwo*, Maciej Baranowski, Cezary Czaplewski,

Ewa Gołaś, Yi He, Dawid Jagieła, **Paweł Krupa**, Maciej Maciejczyk, Mariusz Makowski, Magdalena A. Mozolewska, Andrei Niadzedtski, Stanisław Ołdziej, Harold A. Scheraga, Adam K. Sieradzan, Rafał Ślusarz, Tomasz Wirecki, Yanping Yin, Bartłomiej Zaborowski; *Journal of Molecular Modeling*, 2014, 20(8):2306.

- D5. “Physics-based potentials for the coupling between backbone- and side-chain-local conformational states in the united residue (UNRES) force field for protein simulations”, Adam K. Sieradzan, **Paweł Krupa***, Harold A. Scheraga, Adam Liwo, and Cezary Czaplewski; *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, 11(2): 817–831.
- D6. “Studies of conformational changes of an arginine-binding protein from *Thermotoga maritima* in the presence and the absence of ligand with use of the molecular dynamics simulations with the coarse-grained UNRES force field.”, Agnieszka G. Lipska, Adam K. Sieradzan, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Sabato D’Auria, Adam Liwo*, *Journal of Molecular Modeling*, 2015, 21(3):64.
- D7. “Prediction of protein structure by template-based modeling combined with the UNRES force field”, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Keehyoung Joo, Jooyoung Lee, Cezary Czaplewski, Adam Liwo*, *Journal of Chemical Information and Modeling* 2015, 55(6):1271-1281.
- D8. “Molecular modeling of the binding modes of the Iron-sulfur protein to the Jac1 co-chaperone from *Saccharomyces cerevisiae* by all-atom and coarse-grained approaches”, Magdalena A. Mozolewska, **Paweł Krupa**, Harold A. Scheraga, Adam Liwo*, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2015, 83(8):1414-1426.

Recenzowane publikacje anglojęzyczne:

- DM1. “Preliminary studies of interaction between nanotubes and toll-like receptors”, M.A. Mozolewska,* **P. Krupa**, B. Rasulev, A. Liwo, J. Leszczynski; *TASK Quarterly*, 2014, 18(4), 351-355.
- DM2. “Towards mechanisms of nanotoxicity – interaction of gold nanoparticles with proteins and DNA”, **P. Krupa***, M.A. Mozolewska, B. Rasulev, C. Czaplewski, J. Leszczynski; *TASK Quarterly*, 2014, 18(4), 337-341.

Recenzowane publikacje polskojęzyczne:

- DM3. „Badanie procesu związania białek przy użyciu pola gruboziarnistego UNRES na podstawie peptydu 1E0L (domena WW) i jego mutantów”, Paweł Krupa, Magdalena Mozolewska, Gia Maisuradze, Adam Liwo, Harold A. Scheraga; *Młodzi naukowcy dla polskiej nauki*, pod redakcją dr inż. Marcin Kuczera, Część 11 – Nauki przyrodnicze, 213-219, CREATIVETIME, Kraków 2013.
- DM4. „Zastosowanie pola gruboziarnistego UNRES do symulacji dynamiki molekularnej kompleksów białek na przykładzie drożdżowych białek opiekuńczych”, Magdalena Mozolewska, Paweł Krupa; *Młodzi naukowcy dla polskiej nauki*, pod redakcją dr inż. Marcin Kuczera, Część 11 – Nauki przyrodnicze, 139-143, CREATIVETIME, Kraków 2013.

Polskojęzyczny rozdział w książce:

- DM5. „Podstawy modelowania molekularnego”, Paweł Krupa – rozdział w książce *Nowe trendy w naukach przyrodniczych 4* pod redakcją dr inż. Marcin Kuczera, Creative Science – Monografia 2013, tom 1, 154-163, CREATIVETIME, Kraków 2013.

5.5 Wyniki spoza cyklu publikacji opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

Prowadzone przeze mnie badania naukowe spoza cyklu powiązanych tematycznie publikacji koncentrowały się wokół różnych zagadnień istotnych z punktu widzenia fizyki, biologii i medycyny. Poniżej przedstawiłem ich syntetyczny opis z podziałem na pięć kategorii ze względu na tematykę badań.

5.5.1 Przewidywanie struktury i dynamiki białek i ich kompleksów

Gruboziarniste symulacje w polu siłowym UNRES posłużyły nam do określenia mechanizmu zwijania białka WW oraz wpływu mutacji wybranych reszt aminokwasowych na ten proces (P1). Dzięki użyciu zgrubnego modelu opisującego te białko, możliwe było wykonanie wielu (ponad 1000) trajektorii o długości umożliwiającej osiągnięcie konformacji natywnej. Tak duża liczba trajektorii była niezbędna do poznania nie tylko dominującej ścieżki zwijania, lecz także rzadziej występujących ścieżek, statystyki ich występowania i wpływu mutacji na ten proces. Wykonane symulacje umożliwiły także określenie temperatur przejścia fazowego białka i jego mutantów, wykazując dużą dokładność w stosunku do danych eksperymentalnych.

Jednym z obszarów moich zainteresowań był dalszy rozwój pola siłowego UNRES, tak aby zwiększyć jego możliwości przewidywania struktur białek. W tym celu opracowałem metodę nakładania więzów na fragmenty struktury białek bazując na wielu dostępnych modelach (P2) przy użyciu miękkich wielomodalnych więzów na kąty i odległości umożliwiając automatyczne wybranie najlepszych cech przewidzianych modeli podczas symulacji w gruboziarnistym polu siłowym UNRES. Metodę tę udoskonaliliśmy i przetestowaliśmy w ramach 12 edycji eksperymentu CASP (P7) uzyskując czołową wydajność na większości przewidywanych struktur. Ostatnie udoskonalenie metody polega na poprawie zdolności wyboru fragmentów wspólnych między przewidywanymi modelami białek oraz na wykorzystaniu statystycznych potencjałów na fragmenty aminokwasowe z metody DFA (P12). Analogiczne podejście, ale w ramach inicjatywy WeFold zastosowaliśmy do poprawy predykcji przy użyciu więzów na odległość dostarczonych przez współpracujące grupy badawcze (P8), poprawiając jakość przewidywanych struktur białek. Jeszcze inne podejście do przewidywania struktury białek zawierało wykorzystanie danych z eksperymentu SAXS do dopasowania rozkładów struktur modelowanych do obserwacji eksperymentalnych (P6) znacząco poprawiając rozkład struktur zwiniętych i częściowo rozwiniętych w symulacjach.

Równocześnie uczestniczyłem projekcie polegającym na poprawie zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES bez wykorzystania informacji zewnętrznych, takich jak częściowe dane eksperymentalne czy dane z analiz bioinformatycznych, a jedynie przy użyciu sekwencji białek (P10), po wykonanej optymalizacji pola siłowego (H2). Natomiast w 13 edycji eksperymentu CASP-CAPRI przewidywaliśmy struktury białko-białko (P11) używając wstępnej wersji metody UNRES-Dock (H11) wykazując wysoką wydajność metody i poznając mocne i słabe strony wersji testowych protokołu dokowania. Z kolei w 14 odsłonie eksperymentu CASP wykorzystaliśmy dodatkowo udoskonalone pole siłowe UNRES do przewidzenia struktur białek i kompleksów białek o zróżnicowanych rozmiarach (nawet do całego kapsydu wirusowego zawierającego niespełna 70 tysięcy reszt aminokwasowych) (P14). Należy zaznaczyć, że powyższe osiągnięcia nie byłby możliwe gdyby nie praca dotycząca problemu ergodyczności symulacji z dynamiki molekularnej z klasyczną i hamiltonowską wymianą replik w polu siłowym UNRES z użyciem więzów (P5). Badania te wykazały, że szczególnie przy niskiej jakości struktur początkowych, użycie większej liczby trajektorii z różną siłą więzów znacząco poprawia ergodyczność symulacji i jakość otrzymanych zespołów statystycznych. Efekt ten traci na znaczeniu gdy struktura początkowa jest bliska struktury natywnej a nałożone więzy są z nią wysoce zgodne, co jednak występuje głównie w przypadku białek o trywialnej topologii. Obserwacje te umożliwiły m.in. znacznie lepsze zaplanowanie badań w celu optymalizacji pola siłowego UNRES przy użyciu metody największego podobieństwa (H2).

Ze względu na swój wyjątkowy, bo oparty na oddziaływaniach fizycznych, a nie statystyce, charakter, funkcja energii z gruboziarnistego pola siłowego UNRES, po modyfikacjach umożliwiających przybliżone określanie energii białek z brakującymi fragmentami i użyciu metod uczenia maszynowego do optymalizacji wag poszczególnych wkładów, okazała się być dobrym narzędziem do oceny jakości przewidywanych modeli białek, stojąc na równi lub nawet przewyższając dostępne metody, takie jak np. DFIRE (P9). Warto zaznaczyć, że obserwacje uzyskane podczas wykonywania badań w ramach tego projektu (P9) ułatwiły także projektowanie więzów na odległości i kąty na podstawie wytypowanych modeli białek (P7 i P12).

Ciekawym przykładem wykorzystania wiązania disulfidowego jest badanie procesu agregacji amyloidu β z zamienionymi dwoma resztami aminokwasowymi na reszty cysteiny (L17C/L34C, P22). Zmodyfikowany amyloid β jest w stanie przyspieszyć agregację zachowując zdolność do agregowania z formą dziką, jednocześnie wykazując większą tendencję do tworzenia form zwiniętych przypominających protofibryle nawet w postaci monomeru. Co ciekawe, zmiana ta, zmniejszyła, a nie zwiększyła, co zwykle łączone jest z szybkości agregacji, tendencję monomerycznej formy amyloidu β do przyjmowania struktur drugorzędowych typu β . Co ważne, wynik ten został uzyskany przy użyciu trzech różnych pól siłowych (pełnoatomowego Amber oraz gruboziarnistych Martini 3 i SIRAH) w dwóch pakietach oprogramowania (Amber i Gromacs), zapewniając większą wiarygodność zaobserwowanych zjawisk.

Innym przykładem wykorzystania wielu metod w jednym badaniu oraz istotności uwzględniania obecności wiązań disulfidowych, jest przewidywanie wydajnego inhibitora kompleksu HVEM-LIGHT (P23). Badania te bazowały na pełnoatomowych symulacjach dynamiki molekularnej w różnych wariantach do znalezienia możliwie krótkiego peptydu bazującego na białku HVEM, silnie oddziałującego z białkiem LIGHT. Dzięki połączeniu klasycznych symulacji dynamiki molekularnej z analizą energii swobodnej metodą MM-GBSA z oszacowaniem entropii, pracy przejścia między formą wolną a związaną, symulacji sterowanej dynamiki molekularnej w celu oddysocjowania zaprojektowanych peptydów od białka LIGHT i użyciu metody próbkowania parasolowego do wyznaczenia potencjałów średniej siły wyznaczyliśmy właściwości dynamiczne i termodynamiczne oraz mechanizm wiązania tych peptydów do białka LIGHT. Otrzymane wyniki jednoznacznie wykazały, że peptyd, będący wariantem białka HVEM o skróconej sekwencji i pozbawiony jednego z wiązań disulfidowych występujących w fizjologicznej, pełnej formie białka, umożliwia najlepsze dopasowanie do białka LIGHT i największą siłę oddziaływania.

5.5.2 Określenie podstaw molekularnych potencjalnej nanotoksyczności molekuł

Thurincina H jest jednym z kilku wyjątkowych peptydów zawierających analogiczne do wiązań disulfidowych wiązania kowalencyjne, które jednak nie łączą ze sobą łańcuchów bocznych cystein, lecz łańcuch główny jednej reszty aminokwasowej z łańcuchem bocznym cysteiny (P3). Obecność takich nietypowych mostków jest jedną z przyczyn silnych właściwości antybakteryjnych tej molekuly. Wykonane przez nas gruboziarniste symulacje dynamiki molekularnej dla wszystkich możliwych wariantów obecności i braku tych wiązań wykazały, że obecność wszystkich mostków tioeterowych destabilizuje strukturę tego peptydu i pełni funkcję zapewniającą stabilność enzymatyczną, a nie strukturalną, i bezpośrednio wpływając na bakteriocynowy charakter peptydu.

W kolejnym projekcie zbadaliśmy możliwość zachodzenia zjawiska nanotoksyczności wywołwanego przez pochodne fullerenu C60 występujące w pobliżu białek. W tym celu przeprowadziliśmy szeroko zakrojone badania białek posiadających obszary, tzw. kieszenie wiążące, zdolne wiązać różnorakie pochodne fullerenów. Analiza wykonanych dokowań przesiewowych wskazała potencjalne układy, które w przeprowadzonych następnie symulacjach dynamiki molekularnej wykazywały wysoką stabilność pochodnych fullerenów w kieszeniach wiążących (P4). Badania te udowodniły, że przynajmniej niektóre pochodne fullerenów mogą być wydajnymi inhibitorami białek i powodować efekt nanotoksyczności dla organizmów. Uczestniczyłem także we wprowadzeniu modelu ciągłego i cząsteczkowego fullerenu C60 do

gruboziarnistego pola siłowego UNRES, nie tylko rozszerzając możliwości metody, lecz także wykazując właściwości inhibicyjne fullerenów na wybrane białka (P20). Powyższe prace wykazały, że nanocząstki węglowe mogą znacząco wpływać na strukturę i dynamikę białek wywołując lokalne efekty toksyczności.

5.5.3 Badania koncentrujące się na roli i wpływie błon lipidowych na białka oraz wpływie różnych molekuł na dwuwarstwę lipidowe

Wykonane pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że zarówno jony miedzi, jak i peptydy amyloidu β mogą wiązać się i destabilizować błony lipidowe, jednak ich połączenie niweluje ten efekt (P13). Zgodnie z nowymi doniesieniami literaturowymi, oligomery amyloidu β są bardziej toksyczne niż fibryle. Zdecydowaliśmy się więc przetestować jak formy zawierające dwanaście łańcuchów (dodekamery) i krótkie fibryle (protofibryle) oddziałują z błonami lipidowymi przypominającymi składem lipidów błony neuronów. W tym celu zbudowałem możliwe modele dodekamerów amyloidu β , używając najstabilniejszych struktur tetramerycznych otrzymanych w poprzednich badaniach (H3 i H7). Wykonane przez nas symulacje dynamiki molekularnej niezbicie dowiodły, że dodekamery znacznie silniej oddziałują na błony, powodując ich pęknięcia, niż protofibryle (P15), dla których efekt ten był nieobecny.

Z kolei wykonane symulacje dynamiki molekularnej na różnych poziomach rozdzielczości oraz wykonane pomiary eksperymentalne dla białka UL49.5 z herpeswirusa BoHV-1 wykazały, że motyw RRR jest kluczowy do stabilizowania ułożenia białka w błonie lipidowej, a jego mutacja na alaniny powoduje brak aktywności (P16). Badania te stanowiły podstawę do dalszych badań przy wykorzystaniu heterogenicznego modelu błony lipidowej, zbliżonego składem lipidów do błony retikulum endoplazmatycznego oraz porównania dynamiki konformacyjnej wariantów aktywnych i nieaktywnych białka pochodzących z różnych herpeswirusów (H7).

Jednymi z ciekawszych wykonanych przeze mnie badań były symulacje dynamiki molekularnej tłumaczące eksperymentalne obserwacje dlaczego serotonina ma różny wpływ na różne homogeniczne błony lipidowe (P17). Klasyczne symulacje dynamiki molekularnej pokazały, że cząsteczki serotoniny są mniej zorganizowane zarówno pod względem głębokości penetracji i kąta w błonach nienaładowanych (POPC) niż naładowanych (POPS), co wynikało ze słabszego oddziaływania części hydrofilowych z głowami nienaładowanych lipidów. Z kolei symulacje sterowanej dynamiki molekularnej wyjaśniły mechanizm zwiększonej wytrzymałości na przerwanie błon naładowanych w stosunku do nienaładowanych. Efekt ten spowodowany jest stworzeniem się w przypadku naładowanych głów lipidów warstwy trzech przeciwnie naładowanych molekuł: głów lipidowych, serotoniny i jonów obecnych w roztworze. W przypadku błon nienaładowanych efekt ten nie był obserwowany, a nieznaczne zmniejszenie wytrzymałości błony w obecności serotoniny wynikało z osłabienia oddziaływań między ogonami lipidowymi. Natomiast w kontynuacji badań nad wpływem serotoniny na komórki, pokazaliśmy jak obecność serotoniny wpływa na hydrofilowość błony oraz zwiększoną zdolność wody do przenikania do jej wnętrza, co skutkuje egzocytozą starych komórek zawierających większe stężenie serotoniny (P21).

5.5.4 Ustalenie podstaw molekularnych mechanicznej stabilności kwasów nukleinowych o określonych sekwencjach

Wykonany szereg symulacji sterowanej dynamiki molekularnej w gruboziarnistym polu siłowym NARES dla kwasów nukleinowych o różnych sekwencjach wykazał, że jedynie sekwencje telomeryczne wykazują silniejsze oddziaływanie ze sobą w obrębie podwójnej nici DNA i zachowanie stabilności podczas mechanicznego rozrywania poprzez odtwarzanie skokowo połączeń między powtarzającymi się sekwencjami nukleotydów (P18). Analogiczne symulacje wykonane dla kwasów nukleinowych z pękniętymi pojedynczymi nićmi (SSBs) wykazały silną zależność

stabilności od długości łańcuchów i ich sekwencji oraz dużą zgodność z prostymi modelami opisującymi te zależności (P19).

5.5.5 Pozostałe prace naukowe

W kilku rozdziałach książkowych (R1-R7) i jednej publikacji pokonferencyjnej (M1) opisałem aktualne możliwości pola siłowego UNRES, łącznie z nowymi funkcjami umożliwiającymi badanie rozrywania i tworzenia wiązań disulfidowych, symulowanie nanocząstek węglowych czy wykonywanie dokowania molekularnego oraz opis innych metod obliczeniowych do wykonywania symulacji białek, ich struktury i zdolności agregacji i kwasów nukleinowych.

Lista publikacji opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, niewchodzących w skład cyklu z podziałem na publikacje w czasopismach indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection (PX), rozdziały w książkach o zasięgu międzynarodowym (RX) oraz inne prace (MX):

- P1. “Preventing fibril formation of a protein by selective mutation”, Gia G. Maisuradze, Jordi Medina, Khatuna Kachlishvili, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Pau Martin-Malpartida, Luka Maisuradze, Maria J. Macias, and Harold A. Scheraga*, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 2015, 112(44):13549-13554.
- P2. “Use of Restraints from Consensus Fragments of Multiple Server Models to Enhance Protein-Structure Prediction Capability of the UNRES Force Field”, M.A. Mozolewska, P. Krupa, B. Zaborowski, A. Liwo*, J. Lee, K. Lee, C. Czaplewski, Journal of Chemical Information and Modeling 2016, 56(11), 2263–2279.
- P3. “Role of the sulfur to α -carbon thioether bridges in thurincin H”, M.A. Mozolewska, A.K. Sieradzan*, A. Niadzvedstki, C. Czaplewski, A. Liwo, **P. Krupa**, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics 2017, 35 (13), 2868-2879.
- P4. “Inhibitors or Toxins? Large Library Target-Specific Screening of Fullerene-based Nanoparticles for Drug Design Purpose”, Lucky Ahmed, Bakhtiyor Rasulev, Supratik Kar, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Jerzy Leszczynski*, Nanoscale 2017, 9 (29), 10263-10276.
- P5. “Ergodicity and model quality in template-restrained canonical and temperature/Hamiltonian replica exchange coarse-grained molecular dynamics simulations of proteins”, A.S. Karczyńska, C. Czaplewski, **P. Krupa**, M.A. Mozolewska, K. Joo, J. Lee, A. Liwo*, Journal of Computational Chemistry 2017, 38 (31), 2730-2746.
- P6. “Prediction of protein structure with the coarse-grained UNRES force field assisted by small X-ray scattering data and knowledge-based information”, Agnieszka S. Karczyńska, Magdalena A. Mozolewska, **Paweł Krupa**, Artur Giełdoń, Adam Liwo, Cezary Czaplewski, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2018, 86 (S1), 228–239.
- P7. “Use of the UNRES force field in template-assisted prediction of proteins structures and the refinement of server models: test with CASP12 targets”, Agnieszka Karczyńska, Magdalena A. Mozolewska, **Paweł Krupa**, Artur Giełdoń, Krzysztof K. Bojarski, Bartłomiej Zaborowski, Adam Liwo, Rafał Ślusarz, Magdalena Ślusarz, Jooyoung Lee, Keehyoung Joo, and Cezary Czaplewski*, Journal of Molecular Graphics and Modelling 2018, 83, 92-99.
- P8. “Formative assessment of WeFold: a framework of international collaborative pipelines for protein structure prediction”, Chen Keasar, Liam J. McGuffin, Björn Wallner, Gaurav Chopra, Badri Adhikari, Debswapna Bhattacharya, Lauren Blake, Leandro Oliveira Bortot, Renzhi Cao, B.K. Dhanasekaran, Itzhel Dimas, Rodrigo Antonio Faccioli, Eshel Faraggi, Robert Ganzynkowicz, Sambit Ghosh, Soma Ghosh, Artur Giełdoń, Lukasz Golon, Yi He, Lim Heo,

- Jie Hou, Main Khan, Firas Khatib, George A. Khoury, Chris Kieslich, David E. Kim, **Pawel Krupa**, Gyu Rie Lee, Hongbo Li, Jilong Li, Agnieszka Lipska, Adam Liwo, Ali Hassan A. Maghrabi, Milot Mirdita, Shokoufeh Mirzaei, Magdalena A. Mozolewska, Melis Onel, Sergey Ovchinnikov, Anand Shah, Utkarsh Shah, Tomer Sidi, Adam K. Sieradzan, Magdalena Ślusarz, Rafał Ślusarz, James Smadbeck, Phanourios Tamamis, Nicholas Trieber, Tomasz Wirecki, Yanping Yin, Yang Zhang, Jaume Bacardit, Maciej Baranowski, Nicholas Chapman, Seth Cooper, Alexandre Defelicibus, Jeff Flatten, Brian Koepnick, Zoran Popović, Bartłomiej Zaborowski, David Baker, Jianlin Cheng, Cezary Czaplewski, Alexandre Cláudio Botazzo Delbem, Christodoulos Floudas, Andrzej Kloczkowski, Stanisław Ołdziej, Michael Levitt, Harold Scheraga, Chaok Seok, Johannes Söding, Saraswathi Vishveshwara, Dong Xu, Foldit Players, and Silvia N. Crivelli, *Scientific Reports* 2018, 8, Article number: 9939.
- P9. “Re-optimized UNRES Potential for Protein Model Quality Assessment”, Eshel Faraggi, **Pawel Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Adam Liwo, Andrzej Kloczkowski*, *Genes* 2018, 9, 601.
- P10. “Evaluation of the scale-consistent UNRES force field in template-free prediction of protein structures in the CASP13 experiment”, Jozef Liwo, Adam Sieradzan, Agnieszka Karczyńska, Agnieszka Lipska, Artur Giełdoń, Celina Sikorska, Cezary Czaplewski, Emilia Lubecka, Karolina Zięba, Magdalena Mozolewska, Magdalena Ślusarz, **Pawel Krupa**, Rafał Ślusarz, Sergey Samsonov, Silvia N. Crivelli, Urszula Uciechowska, Łukasz Golon, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2019, 92, 154-166.
- P11. „Blind prediction of homo- and hetero-protein complexes: The CASP13-CAPRI experiment”, Marc F. Lensink*, Guillaume Brysbaert, Nurul Nadzirin, Sameer Velankar, Raphaël A.G. Chaleil, Tereza Gerguri, Paul A. Bates, Elodie Laine, Alessandra Carbone, Sergei Grudinin, Ren Kong, Ran-Ran Liu, Xi-Ming Xu, Hang Shi, Shan Chang, Miriam Eisenstein, Agnieszka Karczyńska, Cezary Czaplewski, Emilia Lubecka, Agnieszka Lipska, **Pawel Krupa**, Magdalena Mozolewska, Łukasz Golon, Sergey Samsonov, Adam Liwo, Silvia Crivelli, Guillaume Pagès, Mikhail Karasikov, Maria Kadukova, Yumeng Yan, Sheng-You Huang, Mireia Rosell, Luis Angel Rodríguez-Lumbreras, Miguel Romero-Durana, Lucía Díaz-Bueno, Juan Fernandez-Recio, Charles Christoffer, Genki Terashi, Woong-Hee Shin, Tunde Aderinwale, Sai Raghavendra Maddhuri Venkata Subraman, Daisuke Kihara, Dima Kozakov, Sandor Vajda, Kathryn Porter, Dzmitry Padhorny, Israel Desta, Dmitri Beglov, Mikhail Ignatov, Sergey Kotelnikov, Iain H. Moal, David W. Ritchie, Isaure Chauvot de Beauchêne, Bernard Maigret, Marie-Dominique Devignes, Maria Elisa Ruiz Echartea, Didier Barradas-Bautista, Zhen Cao, Luigi Cavallo, Romina Oliva, Yue Cao, Yang Shen, Minkyung Baek, Taeyong Park, Hyeonuk Woo, Chaok Seok, Merav Braitbard, Lirane Bitton, Dina Scheidman-Duhovny, Justas Dapkūnas, Kliment Olechnovič, Česlovas Venclovas, Petras J. Kundrotas, Saveliy Belkin, Devlina Chakravarty, Varsha D. Badal, Ilya A. Vakser, Thom Vreven, Sweta Vangaveti, Tyler Borman, Zhiping Weng, Johnathan D. Guest, Ragul Gowthaman, Brian G. Pierce, Xianjin Xu, Rui Duan, Liming Qiu, Jie Hou, Benjamin Ryan Merideth, Zhiwei Ma, Jianlin Cheng, Xiaoqin Zou, Panos I. Koukos, Jorge Roel-Touris, Francesco Ambrosetti, Cunliang Geng, Jörg Schaarschmidt, Mikael E. Trellet, Adrien S.J. Melquiond, Li Xue, Brian Jiménez-García, Charlotte W. van Noort, Rodrigo V. Honorato, Alexandre M.J.J. Bonvin, Shoshana J. Wodak, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2019, 87, 1200-1221.
- P12. “Improved consensus-fragment selection in template-assisted prediction of protein structures with the UNRES force field in CASP13”, Agnieszka S. Karczyńska, Karolina Zięba, Urszula Uciechowska, Magdalena A. Mozolewska, **Pawel Krupa**, Emilia A. Lubecka, Agnieszka G. Lipska, Celina Sikorska, Sergey A. Samsonov, Adam K. Sieradzan, Artur Giełdoń, Adam Liwo, Rafał Ślusarz, Magdalena Ślusarz, Jooyoung Lee, Keehyoung Joo, and Cezary Czaplewski*, *Journal of Chemical Information and Modeling* 2020, 60, 3, 1844-1864.

- P13. “A Computational Model to Unravel the Function of Amyloid- β Peptide in Contact with a Phospholipid Membrane”, Pham Dinh Quoc Huy, **Pawel Krupa**, Hoang Linh Nguyen, Giovanni La Penna, and Mai Suan Li*, *The Journal of Physical Chemistry B* 2020, 124 (16), 3300-3314.
- P14. “Modeling protein structures with the coarse-grained UNRES force field in the CASP14 experiment”, Anna Antoniuk, Iga Biskupek, Krzysztof K. Bojarski, Cezary Czaplowski, Artur Gieldoń, Mateusz Kogut, Małgorzata M. Kogut, **Pawel Krupa**, Agnieszka G. Lipska, Adam Liwo, Emilia A. Lubecka, Mateusz Marcisz, Martyna Maszota-Zieleniak, Sergey A. Samsonov, Adam K. Sieradzan, Magdalena J. Ślusarza, Rafał Ślusarz, Patryk A. Wesołowski, Karolina Zięba, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2021, 108, 108008.
- P15. “Amyloid beta dodecamer disrupts the neuronal membrane more strongly than mature fibril: Understanding the role of oligomers in neurotoxicity”, Hoang Linh Nguyen, Huynh Quang Linh, **Pawel Krupa**, Giovanni La Penna, Mai Suan Li*, *The Journal of Physical Chemistry B* 2022, 126, 20, 3659–3672.
- P16. “The N-terminal proline hinge motif controls the structure of bovine herpesvirus 1-encoded inhibitor of the transporter associated with antigen processing required for its immunomodulatory function“, Małgorzata Graul, Natalia Karska, Magda Wąchalska, **Pawel Krupa**, Magdalena J. Ślusarz, Marcin Lubocki, Krystyna Bieńkowska-Szewczyk, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Adam K. Sieradzan, Andrea D. Lipińska, *Journal of Molecular Biology* 2023, 435 (5), 167964.
- P17. “The unusual robustness of neurotransmitter vesicle membranes against serotonin-induced perturbations”, Ankur Gupta, **Pawel Krupa**, Oskar Engberg, Magdalena Krupa, Ankur Chaudhary, Mai Suan Li, Daniel Huster*, Sudipta Maiti*, *The Journal of Physical Chemistry B* 2023, 127 (9), 1947-1955.
- P18. “What Makes Telomeres Unique?”, Adam K. Sieradzan*, **Pawel Krupa**, David Wales, *The Journal of Physical Chemistry B* 2017, 121(10), 2207-2219.
- P19. “Computational Studies of the Mechanical Stability for Single-Strand Break DNA”, **Pawel Krupa***, David Wales, Adam K. Sieradzan, *Journal of Physical Chemistry B* 2018, 122, 8166-8173.
- P20. “Integrating explicit and implicit fullerene models into UNRES force field for protein interaction studies”, Natalia H. Rogoza, Magdalena A. Krupa, **Pawel Krupa***, Adam K. Sieradzan, *Molecules* 2024, 29(9), 1919.
- P21. “Serotonin Promotes Vesicular Association and Fusion by Modifying Lipid Bilayers”, Debsankar Saha Roy, Ankur Gupta, Vicky Vishvakarma, **Pawel Krupa**, Mai Suan Li, and Sudipta Maiti*, *Journal of Physical Chemistry B* 2024, 128, 20, 4975–4985.
- P22. “A Practical Guide to All-Atom and Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations Using Amber and Gromacs: A Case Study of Disulfide-Bond Impact on the Intrinsically Disordered Amyloid Beta”, Pamela Smardz, Midhun Anila, Paweł Rogowski, Bartosz Różycki, **Pawel Krupa***, *International Journal of Molecular Sciences* 2024, 25(12), 6698.
- P23. “Multi-Layered Computational Framework for Designing Peptide Inhibitors of HVEM-LIGHT Interaction”, Piotr Ciura, Pamela Smardz, Marta Spodzieja, Adam K. Sieradzan*, **Pawel Krupa**, *Journal of Physical Chemistry B* 2024, 128, 28, 6770–6785.
- R1. “Microscopic Physics-Based Models of Proteins and Nucleic Acids: UNRES and NARES”, M. Baranowski, C. Czaplowski, E. Gołaś, Y. He, D. Jagieła, **P. Krupa**, A. Liwo, G.G. Maisuradze, M. Makowski, M.A. Mozolewska, A. Niadzedtski, A.J. Niemi, S. Rackovsky, R. Ślusarz, A.K. Sieradzan, S. Ołdziej, T. Wirecki, Y. Yin, B. Zaborowski, H.A. Scheraga*, w

książce pt. Coarse-Grained Modeling of Biomolecules (Series in Computational Biophysics), Edytor: Garegin A. Papoian, ISBN 978-1466576063, Crc Pr I Llc 2017.

- R2. „Use of coarse-grained and all-atom molecular dynamics to study Hsp70 and Hsp40 chaperone action”, E.I. Gołaś, M.A. Mozolewska, **P. Krupa**, C. Czaplewski, H.A. Scheraga, A. Liwo, w książce pt. Frontiers in Structural Biology, 2018, Vol. 1, 22-45 (Bentham Science Publishers), Edytor: Mario D. Galigniana.
- R3. „Scale-consistent approach to the derivation of coarse-grained force fields for simulating structure, dynamics, and thermodynamics of biopolymers”, Adam Liwo, Cezary Czaplewski, Adam K. Sieradzan, Emilia A. Lubecka, Agnieszka G. Lipska, Łukasz Golon, Agnieszka Karczyńska, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Mariusz Makowski, Robert Ganzynkowicz, Artur Giełdoń, Maciej Maciejczyk, w książce pt. Computational Approaches for Understanding Dynamical Systems: Protein Folding and Assembly (część serii książek Progress in Molecular Biology and Translational Science) 2020, 170, 73-122. Edytorzy: Bogdan Barz, Brigit Strodel.
- R4. “Physics-based coarse-grained modeling in bio- and nanochemistry”, Adam Liwo, Adam K. Sieradzan, Agnieszka S. Karczyńska, Emilia A. Lubecka, Sergey A. Samsonov, Cezary Czaplewski, **Paweł Krupa**, Magdalena Mozolewska, w książce pt. Practical Aspects of Computational Chemistry V (PACC), 2021, V, 31-69. Edytorzy: Jerzy Leszczyński, Manoj Shukla.
- R5. “Modeling the Structure, Dynamics, and Transformations of Proteins with the UNRES Force Field”, Adam K. Sieradzan, Cezary Czaplewski, **Paweł Krupa**, Magdalena A. Mozolewska, Agnieszka S. Karczyńska, Agnieszka G. Lipska, Emilia A. Lubecka, Ewa Gołaś, Tomasz Wirecki, Mariusz Makowski, Stanisław Ołdziej, Adam Liwo, w książce pt. Protein Folding (część serii książek Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 2376)), 2021, 399-416. Edytor: Victor Muñoz.
- R6. “Computational models for study of protein aggregation”, TC Co, MS Li, **P. Krupa***, w książce pt. Computer Simulations of Aggregation of Proteins and Peptides, (część serii książek Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 2340)), 2022, 51-78. Edytorzy: Mai Suan Li, Andrzej Kloczkowski, Marek Cieplak, and Maksim Kouza.
- R7. “Free docking and template-based docking (physics versus knowledge-based docking)”, Magdalena A. Krupa, **Paweł Krupa***, w książce pt. Protein-protein docking: methods and protocols (część serii książek Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 2780)), 2024, 27-41. Edytor: Agnieszka Kaczor.

Recenzowane publikacje anglojęzyczne:

- M1. “High Performance Computing with Coarse Grained Model of Biological Macromolecules”, Emilia Lubecka, Adam Sieradzan, Cezary Czaplewski, **Paweł Krupa**, Adam Liwo; Journal of Supercomputing Frontiers and Innovations, 2018, 5(2), 63-75.

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Większość wykonywanych przeze mnie badań naukowych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora prowadzona była w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk, w którym od 01.09.2016 zatrudniony jestem jako adiunkt. Wcześniejsze badania naukowe prowadzone były głównie w Katedrze Chemii Teoretycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, z pracownikami której kontynuuję współpracę do chwili obecnej.

W 2021 roku nawiązałem także współpracę z pracownikami Katedry Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Środowiskowej Pracowni Biologicznego NMR w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN oraz Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, z którymi prowadzę aktywną współpracę naukową w zakresie połączonych badań eksperymentalno-teoretycznych, na które w 2023 roku zdobyliśmy finansowanie w ramach projektu NCN Sonata jako konsorcjum projektowe, a obecnie staramy się o przedłużenie finansowania badań naukowych i rozszerzenie tematyki wspólnych projektów w ramach złożonego do oceny wniosku o NCN Opus.

Moja działalność naukowa prowadzona jest także z wieloma ośrodkami zagranicznymi w ramach współprac, staży, wymian i wizyt naukowych, skupiających się na eksperymentalno-teoretycznym połączeniu metod w celu uzyskania pełnego obrazu badanych zjawisk fizykochemicznych.

6.1 Staże naukowe w jednostkach zagranicznych w latach 2012-2016

- 01.08.2015 – 31.07.2016:

Staż podoktorski w grupie Harolda Scheragi w Baker Laboratory of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, NY, USA.

W ramach stażu podoktorskiego poznawałem wiele różnych technik obliczeniowych i zdobywałem inne umiejętności naukowe uczestnicząc w spotkaniach grupowych oraz wykładach. Pracowałem także nad poprawą zdolności predykcyjnych pola siłowego UNRES o zredukowanej reprezentacji oraz dodania nowych funkcjonalności, jak zaktualizowane dynamiczne traktowanie wiązań disulfidowych w białkach. Opracowane metody wykorzystałem następnie do zbadania roli wiązań disulfidowych w RNazie A. Część wyników została spisana w formie publikacji naukowych: *Bioinformatics* 32 (21), 3270-3278, 2016, *Journal of Chemical Theory and Computation* 13 (11), 5721-5730, 2017, *J. Chem. Inf. Model.* 57 (9), 2364-2377, 2017.

- 17.11.2014 – 01.05.2015:

Asystent badawczy w grupie Andrzeja Kłoczowskiego w Battelle Center for Mathematical Medicine, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital i Ohio State University w Columbus, OH, USA.

Wykonany staż naukowy koncentrował się na opracowaniu narzędzia umożliwiającego ocenę jakości modeli białek i funkcji oceniających, pozwalających na wybór najbardziej prawdopodobnych struktur białek z dużych zespołów struktur przy użyciu różnych technik uczenia maszynowego do optymalizacji funkcji energii opartych na fizyce oddziaływań. Wyniki zostały opublikowane w *Genes* 9 (12), 601, 2018.

- 29.05.2014 – 17.08.2014, 15.05.2013 – 15.08.2013 i 15.05.2012 – 14.08.2012:

Staże naukowe w grupie Harolda Scheragi w Baker Laboratory of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University w Ithaca, NY, USA.

W ramach staży naukowych nauczyłem się różnych technik eksperymentalnych i teoretycznych oraz prowadziłem działania popularyzujące naukę wśród dzieci, uczniów i nauczycieli. Naukowa część stażu obejmowała również rozwój gruboziarnistego modelu UNRES poprzez dodanie nowych potencjałów opartych na statystyce i fizyce oddziaływań w celu poprawy traktowania pętli i innych słabo ustrukturyzowanych elementów białkowych podczas symulacji. Staże zaowocowały licznymi wynikami, z których część została opublikowana w międzynarodowych czasopismach: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (37), 14936-14941, 2013, *Journal of Chemical Theory and Computation* 9 (10), 4620-4632 2013, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 82 (9), 1850-1868, 2014, *Journal of Chemical Theory and Computation* 11 (2), 817-831, 2015, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83 (8), 1414-1426, 2015, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (44), 13549-13554, 2015.

- 17.01.2014 – 19.05.2014:

Staż naukowy w grupie Jerzego Leszczyńskiego w Department of Chemistry and Biochemistry, Jackson State University, MS, USA.

Podczas stażu naukowego badałem potencjalną nanotoksyczność różnych cząsteczek, takich jak fulereny, nanorurki węglowe i nanocząstki złota w kontakcie z białkami i kwasami nukleinowymi, stosując podejścia oparte na przeszukiwaniu baz danych, dokowaniu, DFT, modelowaniu molekularnym i dynamice molekularnej w pełnoatomowym polu siłowym. Staż zaowocował współpracą naukową, której część wyników została opublikowana w czasopismach: *Nanoscale* 9 (29) 2017, 10263-10276, *Task Quarterly* 18 (4), 337-341 2014.

6.2 Krótkoterminowe wizyty naukowe w jednostkach zagranicznych w latach 2015-2019

- 26.10.2019 – 01.11.2019, 30.09.2018 – 07.10.2018 i 10.09.2017 – 16.09.2017:

Wizyty naukowe w grupie Giovanniego La Penna w Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Chimica dei Composti Organo Metallici (ICCOM), Florencja, Włochy.

Podczas trzech wizyt naukowych odbytych w ramach polsko-włoskiego projektu bilateralnego przeprowadziłem i przedyskutowałem z uczestnikami projektu szerokie spektrum eksperymentalnych i teoretycznych metod badania wpływu jonów metali na różne biomakromolekuły, zwłaszcza białka, peptydy i ich agregaty, takie jak oligomery A β 42. Dodatkowo badałem rolę jonów dwuwartościowych oraz wpływ peptydów i oligomerów amyloidu β na błony lipidowe o różnym składzie. Niektóre z otrzymanych wyników zostały upublicznione w formie publikacji naukowych: *J. Phys. Chem. B* 124 (16), 3300-3314, 2020, *J. Phys. Chem. B* 2022, 126, 20, 3659–3672 i *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(16), 12698.

- 21-28.10.2018:

Udział w konferencji naukowej i wizyta naukowa w Institute for Computational Science and Technology, Ho Chi Minh city, Vietnam, która zaowocowała współpracą naukową dotyczącą badań wieloskalowych oligomerów amyloidu β i następującymi publikacjami: *J. Phys. Chem. B* 2019, 123, 34, 7253–7269 i *J. Phys. Chem. B* 2022, 126, 20, 3659–3672.

- 22-29.05.2015:

Udział w konferencji naukowej i wizyta naukowa w Korea Institute for Advanced Study, Seul, Republika Korei, grupie Profesora Jooyounga Lee, która zaowocowała współpracą naukową i publikacją łączonych metod bioinformatyczno-biofizycznych w celu poprawy

zdolności predykcyjnych metod obliczeniowych: J. Chem. Inf. Model. 2015, 55, 6, 1271–1281, J. Chem. Inf. Model. 2016, 56, 11, 2263–2279 i J Comput Chem. 2017 Dec 5;38(31):2730-2746.

6.3 Ważniejsze współprace naukowe z ośrodkami zagranicznymi w latach 2019-2024

- Od 2023 Dr. Kien Xuan Ngo, WPI-Nano Life Science Institute, Kanazawa University, Japonia - badania nad połączeniem wyników eksperymentalnych (mikroskopii sił atomowych HS-AFM) i symulacji komputerowych w celu określenia mechanizmu asocjacji α -hemolizyny na powierzchni i w błonach lipidowych - manuskrypt publikacji w trakcie przygotowywania.
- Od 2022 Prof. Sudipta Maiti, Tata Institute of Fundamental Research, Indie - badania nad rolą neuroprzekaźników oraz wpływem ich obecności na błony lipidowe. Część wyników opublikowana w: J. Phys. Chem. B 2023, 127, 9, 1947–1955 i J. Phys. Chem. B 2024, doi: 10.1021/acs.jpcb.4c00115.
- Od 2021 Prof. Zuzana Gazova, Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences - badania nad wpływem różnych substancji pochodzenia naturalnego na proces agregacji amyloidu β i lizozymu - praca pt. "Coumarin derivatives – the role of dimerization and linker length on the anti-amyloid activity" w recenzji w Journal of Biological Chemistry.
- Od 2019 Dr. Giovanni Roviello, The Institute of Biostructures and Bioimaging (IBB) of the National Research Council (CNR), Neapol, Włochy - badania nad wpływem substancji pochodzenia naturalnego na agregację amyloidu β . Wyniki opublikowane w Chemico-Biological Interactions 2021, 334, 109300.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

7.1 Prowadzenie zajęć dla studentów

- Opieka naukowa nad zaproszeniem wykładowcy, Prof. Davida Walesa, do wygłoszenia serii prestiżowych wykładów w ramach "Spotlight Talk" w Warszawskiej Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych, realizowanych i finansowanych w ramach "STER programme of the Polish National Agency for Academic Exchange, grant no. BPI/STE/2021/1/00034/U/00001"
- Wykładowca (samodzielnie i we współpracy z innymi naukowcami) w Warszawskiej Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych
 1. "Practical Aspects in Computational Biophysics", 30 godzin, 2023.
 2. "Introduction to theoretical and computational biophysics", 30 godzin, 2022.
 3. "Computational biophysics & Materials Science", 30 godzin, 2019.
 4. "Computational Methods in Materials Science and Biology", 30 godzin, 2017/2018.
- Prowadzenie lub asysta w prowadzeniu zajęć na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
 1. Asystent podczas zajęć z Programowania, 30 godzin, 2014/2015
 2. Prowadzący trzech grup Technologii Informatycznej, 90 godzin, 2013/2014
 3. Asystent podczas zajęć z Technologii Informatycznej, 30 godzin, 2012/2013

4. Asystent podczas zajęć z Chemii Teoretycznej, 45 godzin, 2011/2012

7.2 Promowanie studentów

- Promotor pomocniczy mgr inż. Pameli Smardz, wykonującej badania w ramach projektu NCN Sonata, którym kieruję w Instytucie Fizyki PAN.
- Promotor pomocniczy mgr Agnieszki Karczyńskiej, doktorantki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego od 16 grudnia 2015 – tytuł przewodu doktorskiego: „Przewidywanie struktury kompleksów białek przy użyciu gruboziarnistego pola siłowego UNRES z wykorzystaniem informacji z baz danych”. Obrona doktoratu: 11.09.2019.

7.3 Działania organizacyjne i popularyzujące naukę

- Zaplanowanie, stworzenie, organizacja i zarządzanie lokalnym klastrem obliczeniowym w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk, składającym się obecnie m.in. z kilkunastu specjalistycznych kart graficznych pozwalających na wykonywanie obliczeń dynamiki molekularnej o dwa rzędy wielkości szybciej niż w przypadku typowych procesorów (CPU).
- Organizacja warsztatów z doświadczeniami fizyczno-chemicznymi dla dzieci, młodzieży oraz nauczycieli szkół średnich w trakcie staży naukowych w grupie Prof. Harolda Scheragi w Cornell University, w ramach działalności popularyzujących naukę (outreach): 08.08.2015, 02.08.2014, 03.08.2013 i 12.07.2012.
- Współorganizacja konferencji From Computational Biophysics to Systems Biology (CBSB14) w Gdańsku w dniach 25.07.2014 – 27.07.2014.
- Współorganizacja Bałtyckiego Festiwalu Nauki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w dniach 23-24.05.2014 i 26.05.2011.
- Współorganizacja dnia otwartego Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 2012.

8. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

8.1 Projekty naukowe udzielane na poziomie ogólnokrajowym, w których habilitant występuje w funkcji kierownika

- Kierownik zadania badawczego z ramienia IF PAN w konsorcjum projektowym NCN Sonata 2022/47/D/NZ7/02399, pt. “Identification of key structural elements of immunomodulatory proteins - inhibitors of antigenic peptide transporter TAP encoded by selected alphaherpesviruses”, 01.08.2023-31.07.2026. Projekt w trakcie realizacji.
- Kierownik projektu NCN Sonata UMO-2019/35/D/ST4/03156 pt. “Computational studies of the disulfide-bond role in proteins”, 10.06.2020 – 09.06.2024. Projekt zakończony, sprawozdanie końcowe w trakcie oceny.
- Kierownik projektu NCN Preludium UMO-2015/17/N/ST4/03937 pt. “Global protein docking algorithms based on the UNRES coarse-grained model”, 28.01.2016 – 27.01.2018. Projekt został zakończony i pozytywnie rozliczony.

8.2 Działalność recenzencka

Autor 58 recenzji manuskryptów naukowych w międzynarodowych czasopismach: Biophysical Journal (1), Chemical Papers (16), Journal of Molecular Graphics and Modelling (3), Computational and Structural Biotechnology Journal (3), International Journal of Molecular Sciences (7), Molecules (4), Biomolecules (2), Axioms (4), J —

Multidisciplinary Scientific Journal (2), The Journal of Physical Chemistry B (2), Journal of Chemical Theory and Computation (2), ACS Chemical Neuroscience (2), Frontiers in Molecular Biosciences Biophysics (1), Journal of Physics D: Applied Physics (1), Journal of Biomolecular Structure & Dynamics (3), Physchem (2), Proteins: Structure, Function and Bioinformatics (3).

Recenzent projektów grantowych dla Teagasc Walsh Scholarship - the Agriculture and Food Development Authority, powiązanej z irlandzkim aparatem państwowym organizacji odpowiedzialnej za ocenę i przyznawanie finansowania projektów badawczo-rozwojowych.

8.3 Wykłady na zaproszenie wygłoszone na konferencjach o międzynarodowym charakterze

- 26-28.02.2024 – Ninth Korean-Polish Conference "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches", Seul, Korea Południowa
- 24-28.09.2023 – Eighth Polish-Korean Conference "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches", Jastrzębia Góra, Polska.
- 14-16.09.2022 – Symposium of Polish Bioinformatics Society, Warszawa, Polska.
- 07-08.2019 – The Fourth Workshop of Vietnamese Students in Poland, Warszawa, Polska.
- 25.10.2018 – The First ICST Workshop on Computational Biophysics and Medicine, Ho Chi Minh city, Vietnam.
- 14-18.08.2017 – 2nd International Conference on Computational Genomics and Proteomics, Playa Blanca, Panama.
- 25-29.07.2016 – Coarse-Grained Modeling of Structure and Dynamics of Biomacromolecules, Telluride, CO, USA.
- 01-04.12.2014 – 2nd Mathematical and Computational Medicine Conference, Cancun, Meksyk.

8.4 Pozostałe wykłady wygłoszone na konferencjach o międzynarodowym charakterze

- 27-31.10.2018 - 14th Rencontres du Vietnam, Computational Biophysics at the Molecular and MesoScales, Quy Nhon, Vietnam.
- 07.10.2017 - Coarse graining of biomolecules and beyond: theory and applications, Warsaw, Poland.
- 12-16.06.2017 - Physics and Biology of Proteins, Natal, Brazylia.
- 28.05-01.06.2016 - Second Polish-Korean Conference on Protein Folding Theoretical and Experimental Approaches, Gdańsk, Polska.
- 24-28.05.2015 - The First Korean-Polish Conference on Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches, Seul, Korea Południowa.

9. Bibliografia

1. Case, D. A. *et al.* AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.* **63**, 6183–6191 (2023).

2. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).
3. Hegyi H., Gerstein M., The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *J. Mol. Biol.* **288**, 147–164 (1999).
4. Harrington, D. J., Adachi, K. & Royer, W. E. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. *J. Mol. Biol.* **272**, (1997).
5. Trivedi, R. & Nagarajaram, H. A. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
6. Yang, J. *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8 (2015).
7. Baek, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* **373**, 871–876 (2021).
8. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* (2024) doi:10.1038/s41586-024-07487-w.
9. Ghag, G. *et al.* Disulfide bonds and disorder in granulin-3: An unusual handshake between structural stability and plasticity. *Protein Sci.* **26**, 1759–1772 (2017).
10. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141–151 (1999).
11. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. & Kollman, P. A. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021 (1992).
12. Kryshtafovych, A., Monastyrskyy, B. & Fidelis, K. CASP11 statistics and the prediction center evaluation system. *Proteins* **84 Suppl 1**, 15–19 (2016).
13. Thu, T. T. M., Co, N. T., Tu, L. A. & Li, M. S. Aggregation rate of amyloid beta peptide is controlled by beta-content in monomeric state. *J. Chem. Phys.* **150**, 225101 (2019).
14. Khaled, M. *et al.* A Hairpin Motif in the Amyloid- β Peptide Is Important for Formation of Disease-Related Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 18340–18354 (2023).
15. Huang, F. *et al.* Co-aggregation of α -synuclein with amyloid- β stabilizes β -sheet-rich oligomers and enhances the formation of β -barrels. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **25**, 31604–31614 (2023).
16. Lee, J. *et al.* Distinguishing protein chemical topologies using supercharging ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Angew. Chem. Weinheim Bergstr. Ger.* (2023) doi:10.1002/ange.202314980.

Pawel Krupa