

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Katedra Biofizyki
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń
ul. Grudziądzka 5

Toruń, 20.01.2025 r.

(wiesiek@umk.pl)
+48.56.611.32.04
607 53 47 00

Recenzja osiągnięcia naukowego (zbiór publikacji w postępowaniu habilitacyjnym)
Dr. Pawła Krupy
pt.
„Rozwój i wykorzystanie pól siłowych o różnych poziomach rozdzielczości do badania
struktury i dynamiki wybranych białek”
oraz ocena istotnej aktywności naukowej habilitanta

Wstęp

Nauki fizyczne nie mogą zajmować się wyłącznie materią nieożywioną. Organizmy żywe to nie tylko źródło pożywienia i energii dla nas, to również MY sami. Złożoność najprostszej bakterii z punktu widzenia fizyki, opisu na poziomie molekularnym jest ogromna. Zasada działania organizmów żywych, tj. mechanizmy biochemiczne podlegają jednak uniwersalnym prawom fizyki. Oznacza to, że działanie takiego systemu, (np. całej bakterii, a może i nawet bardziej skomplikowanych organizmów) powinno się dać opisać przy pomocy znanych już praw fizyki. Stąd wiele pomysłów teoretyków jak np. wywodzić funkcje biologiczne ze struktur związków chemicznych jakie te funkcje zapewniają czy kontrolują. Do najważniejszych biomolekuł należą białka, badaniu których poświęcona jest w dominującym stopniu działalność naukowa dr. Pawła Krupy. Opis kwantowy struktur i dynamiki białek nie jest przy obecnym stanie zaawansowania teorii i technologii obliczeniowych możliwy. Przez ostatnie kilkadziesiąt lat sukcesy na tym polu odnosi podejście klasyczne, w którym oddziaływania części składowych białek (aminokwasów czy nawet poszczególnych atomów) przybliża się przy pomocy odpowiednio dobranych potencjałów klasycznych. Zestaw funkcji analitycznych wraz z odpowiednio dobranymi parametrami, który ma opisywać energię danego białka, nazywa się polem siłowym. Pionierzy tej dziedziny nauki: M. Karplus, A. Warshel i M. Lewitt zostali uhonorowani nagrodą Nobla. Oczywiście zaproponowane przed laty pola siłowe (CHARMM, AMBER czy OPLS) ulegają stałym udoskonaleniom, w dziedzinie jednak panuje przekonanie, że idealne, optymalne i „prawdziwe” klasyczne pole siłowe nie istnieje. Jednak jest w pełni uprawnione i naukowe poszukiwanie coraz lepszych i efektywniejszych metod klasycznego opisu dynamiki białek. Osiągnięcie habilitacyjne dr P. Krupy wpisuje się w ten ważny dla biofizyki, biologii i medycyny nurt. Tematyka badań nie

jest zbyt oryginalna ani nowa, jednak nadal aktualna i na pewno ważna. Czy stosowanie klasycznych pól siłowych i praw mechaniki do opisu zachowania dużych molekuł biologicznych będzie trwało długo, jest pytaniem otwartym w dobie lawinowego rozwoju metod opartych na uczeniu maszynowym i AI. Wiedza na temat białek będzie zawsze potrzebna.

Dr Paweł Krupa jest młodym uczonym (38 lat), doktorat w zakresie chemii uzyskał w 2015 roku. Jest autorem 45 publikacji (WoS), cytowanych łącznie ok. 640 razy (bez autocytowań, WoS), z indeksem $h=18$ (WoS). Sumaryczny IF artykułów sięga 200, zaś punktacja ministerialna przekracza 5600 pkt. Od strony oceny wskaźników bibliometrycznych, które przytaczam tutaj tylko zwyczajowo, bo nie one decydują, dorobek wygląda b. dobrze. Pan dr Krupa jako swoje główne osiągnięcie habilitacyjne przedstawia cykl kilkunastu artykułów H1-H13, poza jedną współautorskich, opublikowanych w latach 2016-2024. Sześć razy habilitant jest pierwszym autorem, zaś 4 razy autorem korespondującym. Tytuł cyklu jest niesłychanie ogólny, niezbyt mi się to podoba, ale zważywszy na charakter wybranych do oceny prac nie za bardzo mógł być inny. Publikacje w swej treści i charakterze mieszczą się w zaproponowanym tytule-„worku”. Dotyczą głównie udoskonalania metody symulacji dynamiki białek przy pomocy gruboziarnistego pola siłowego UNRES oraz badania białek o dużym znaczeniu medycznym, np. beta-amyloidów.

Przebieg postępowania

Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne wszczęto na wniosek zainteresowanego z dnia 10.09.2024 roku. Rada Doskonałości Naukowej (RDN) po dokonaniu oceny formalnej wniosku na posiedzeniu w dniu 15 października 2024 roku wyznaczyła część składu komisji habilitacyjnej. Ostateczny skład powołano w dniu 24.10.2024 r. na mocy uchwały (sprawa nr RN.432.3.2024. Rada ma odpowiednie uprawnienia do nadawania stopnia doktora habilitowanego.

Sylwetka habilitanta

Paweł Krupa uzyskał tytuł zawodowy licencjata nauk chemicznych (z chemii medycznej) na Uniwersytecie Gdańskim (UG) w roku 2009. Tamże uzyskał tytuł zawodowy magistra chemii (chemioinformatyka) na Wydziale Chemii w 2011 roku. Nie mam wiedzy czy doktorat realizował w ramach studiów doktoranckich czy w innym trybie. Stopień doktora nauk chemicznych, nadany z wyróżnieniem przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskał w dniu 08.07.2015 na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Rozszerzenie pola siłowego UNRES o potencjały lokalne i dane z metod porównawczych w celu lepszego przewidywania struktur białek”. Promotorem był prof. dr hab. Cezary Czaplewski. W okresie

08.10.2014 – 31.07.2015 pracował jako specjalista analityk w Centrum Informatycznym Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej (CI TASK), Gdańsk. Z danych wynika, że w tym samym okresie (17.11.2014 – 01.05.2015) odbył staż (jako *Research Aide*) w grupie prof. A. Kłoczowskiego w Battelle Center for Mathematical Medicine, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital and Ohio State University w Columbus, OH, USA. Staż podoktorski odbył z kolei w bardzo dobrym ośrodku tj. Cornell University (NY, USA) w grupie prof. H. Scheragi w okresie 01.08.2015 – 31.07.2016. Przez ostatnie 8 lat, tj. od 01.09.2016 pracuje jako adiunkt w Oddziale Fizyki Teoretycznej, Zespole Biofizyki Teoretycznej, Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Nie mam wątpliwości, że przebieg pracy naukowej habilitanta świadczy o tym iż realizował on badania na więcej niż jednej uczelni (IF PAN, UG, Uniwersytet Cornell - USA) i odznaczał się w tych ośrodkach istotną aktywnością naukową, czego dowodem są liczne wieloautorskie publikacje naukowe; czyli wymóg art. 219. Par 3, ustawy z dn. 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce jest spełniony.

Opinia nt. poszczególnych publikacji z cyklu.

W Autoreferacie habilitant swoje różnorodne dokonania naukowe składające się na recenzowany cykl publikacji podzielił następująco:

„• 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)”

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracami z cyklu uważam, że taka ogólna charakterystyka ich zawartości jest poprawna i właściwa. Gdybym miał podzielić dokonania habilitanta na dwa główne nurty to nazwałbym je (1) rozwój metod i protokołów obliczeniowych (2) testy i zastosowania, z przewagą jednak (2). Poniżej omawiam poszczególne artykuły.

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.
IF(2021) = 6.931, Punkty Ministerstwa (1.12.2021) (PM) = 200

Publikacja ta jest sprawozdaniem z prac i osiągnięć jednego z zespołów startujących w zawodach/eksperymentach *Critical Assessment of Protein Structures CASP11*. Zadaniem zespołów jest jak najwierniejsze przewidywanie struktury zestawu białek, dla których punktem wyjścia jest jedynie sekwencja. Wyniki należy uzyskać w stosunkowo krótkim okresie (3 tyg.) a weryfikacja następuje poprzez porównanie przewidywań z utajnionymi wcześniej danymi doświadczalnymi. Autorzy wykorzystali rozwijane przez szereg lat w grupach prof. Liwo (Gdańsk) i prof. Scheragi (Cornell) gruboziarniste pole siłowe UNRES. Jest to rodzaj techniki zwijania białka „*de novo*”, bez korzystania z wzorców czy danych statystycznych. Przez wiele lat żywiono nadzieję, że oparte na prawach fizyki pola siłowe osiągną taki poziom rozwoju, że w końcu biolodzy zamiast mozolnie oczyszczać i krystalizować białko oraz stać w kolejce do synchrotronu, będą wykorzystywać serwery obliczeniowe. Jak dotąd, mimo pewnych sukcesów, m.in. pola UNRES, marzenie to się nie spełniło, rewolucji dokonał zespół w zasadzie informatyczny z firmy DeepMind, który stworzył system AlphaFold 2 oparty na AI i z dużym zapasem pokonał na CASP wszystkie inne grupy stosujące inne podejścia. Oczywiście osiągnięcie to (i nagroda Nobla dla Habashisa i Jumpara w 2024 roku) nie byłoby możliwe bez wykorzystania zasobów danych doświadczalnych z PDB przez dziesiątki lat gromadzonych mozolnym wysiłkiem wielu grup krystalografów białek. Habilitant w tej publikacji (ukazała się tuż po doktoracie) odegrał poważną rolę: zaplanował jednolity protokół przewidywania struktury białek przy pomocy UNRESa oraz wykonał symulacje z wymianą replik. Przygotował ocenę wyników i wstępną wersję manuskryptu. Autorzy zwinęli 55 białek o rozmiarach od 44 do 595 aminokwasów, w sześciu przypadkach białek jednodomenowych zwijanie dało solidny wynik – rmsd Ca było na poziomie 4 Å w stosunku do eksperymentu. Praca napisana jest bardzo solidnie i daje dużo materiału porównawczego. Przypuszczam, że wkład habilitanta w powstanie tego raportu w prestiżowym czasopiśmie (200 pkt.) był większy niż 1/16 wynikająca z prostej arytmetyki.

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.
IF(2021) = 6.162, PM = 100

Istotą publikacji **H2** jest opracowanie nowego sposobu parametryzacji (kalibracji) pola UNRES. Celem była poprawa jakości przewidywania struktury białek i uniknięcie interwencji manualnych poprzez nakładanie więzów, co było wymagane w oryginalnych protokołach zwijania białek polem UNRES. Wykorzystano nowy schemat obliczeniowy, który automatycznie wybiera struktury (małe klastry wynikające z rozkładu konformacji), które posłużą do optymalizacji parametrów. Sam kalibracja, realizowania w cyklach, oparta jest na wcześniej opisanej (2015 JCIM, bez udziału PK) metodzie maksymalnego podobieństwa, wykorzystywane są dane doświadczalne z NMR (od 17 do 300 konformacji dla każdego układu, czasem w różnych temperaturach). Wyniki są zachęcające, dobór parametrów oparty tym razem nie na małym białku TrpCage, a zbiorze 46 zróżnicowanych białek, daje rezultaty wyraźnie lepsze niż wcześniejsze pole UNRES, zwłaszcza dla białek zawierających

fragmenty drugorzędowe β . Habilitant brał udział w testowaniu metody, optymalizacji parametrów, implementacji potencjałów dla pola siłowego. Wykonał też symulacje REMD. Nie mam wątpliwości, że ta praca stanowi postęp w dziedzinie doskonalenia narzędzi biofizyki teoretycznej i modelowania białek.

H3. Pawel 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. IF(2021) = 4.304, PM = 100

W tej publikacji stykamy się z tematyką badań realizowanych od lat w grupie prof. Mai Suan Li w IF PAN w Wwie. Wiele danych wskazuje na to że poważnie nam zagrażające choroby neurodegeneracyjne mają swoje przyczyny w niszczeniu neuronów poprzez tzw. złoگی amyloidowe. W wielu laboratoriach bada się procesy agregacji peptydów i poszukuje metod odwrócenia tego procesu, spowolnienia lub czynników warunkujących agregację. Znaczenie praktyczne tych badań może być ogromne, Dzięki modelowaniu, coraz lepiej rozumiemy co dzieje się z poszczególnymi cząsteczkami w przypadku patologicznych agregacji.

W publikacji tej wiele się dzieje: najpierw dynamika gruboziarnista UNRES jest wykorzystywana do rozbijania tetramerów do formy zbioru statystycznego czterech monomerów A β 42, by następnie śledzić ścieżki (też metodą UNRES) ponownej agregacji monomerów do stabilnego tetrameru. Wyniki pokazują, że najczęstszym mechanizmem jest 2+2 tj. połączenie dwóch uprzednio utworzonych dimerów. Najstabilniejsze w UNRES tetrametry były poddane dalszej szczegółowej analizie pod względem dynamiki za pomocą symulacji MD pełnoatomowych AMBER i OPLS. Publikacja zawiera wiele danych szczegółowych, ale też pewne obserwacje ogólne. Na przykład, ciekawe i moim zdaniem ważne jest to, że cechy fizyczne modeli tetrameru uzyskanych z prostej selekcji monomerów sąsiadujących w doświadczalnie określonych protofibrylach włókiem amyloidowych są odmienne od najstabilniejszych tetramerów uzyskanych w drodze symulowanej UNRESem agregacji. Autorzy zalecają ostrożność w doborze modelu startowego w innych podobnych badaniach. Słuszne są też ostrzeżenia, że wyniki modelowania odnoszą się do agregacji w wodzie, w warunkach fizjologicznych inne czynniki typu błony lub obecność kompleksów białkowych, mogą wpływać na mechanizm tworzenia złoów. Praca jest wg mnie ciekawa, łączy aspekty metodologiczne – jak poprawnie symulować agregacje peptydów - z aspektami fizjologicznymi: co się dzieje z ważnym medycznie peptydem w organizmie ludzkim

Wkład habilitanta jako pierwszego autora do tej publikacji jest znaczny, poza zaplanowaniem obliczeń i wykonaniem symulacji pełnoatomowych MD nadzorował On obliczenia REMD, analizował dane i spisywał wyniki do formy artykułu.

H4. Nguyen Hoang Linh, Pawel 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.

IF(2021) = 3.466, PM = 140

Szczegółowe wyniki modelowania MD dla A β 42 opisano z kolei w publikacji **H4**, gdzie rola dr P. Krupy była raczej drugoplanowa. Uczestniczył On w planowaniu obliczeń i przygotowaniu wstępnych danych do symulacji, nadzorował obliczenia i analizy wyników, uczestniczył w pisaniu manuskryptu.

Istotą publikacji **H4** jest nie tyle poszukiwanie wyjaśnienia zjawiska fizjologicznego, co gruntowne porównanie skuteczności rozmaitych pól siłowych i ich wariantów (5 modeli teoretycznych) w jak najlepszym odzwierciedleniu danych doświadczalnych nt. konformacji β amyloidu (przesunięcia NMR). Dyskutowana jest ważna kwestia metodologiczna – co jest lepsze do próbkowania przestrzeni konformacyjnej – jedna długa trajektoria klasyczna (10 μ s) czy szereg krótkich trajektorii REMD (łącznie ok. 30 μ s), znacznie tańszych. W badanym przypadku okazuje się, że lepsze korelacje z danymi doświadczalnymi daje stosowanie serii (np. 20) krótkich obliczeń REMD (niezależnie od stosowanego pola siłowego) niż ojedynczych długich trajektorii CMD. Zważywszy na zastosowania GPU i pewne trudności w uruchomieniu REMD na kartach graficznych optymalna strategia próbkowania może być jeszcze inna. Publikacja zawiera szereg ciekawych obserwacji o charakterze technicznym, np. dekompozycje energii na wkłady od poszczególnych rodzajów oddziaływań. Praca ta nie jest przełomowa, ale daje lepsze zrozumienie czy postęp w parametryzacji, np. dla modeli białek nieustrukturalizowanych, jest możliwy.

H5. Daniela Marasco+, Caterina Vicidomini+, **Pawel 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.
IF(2021) = 5.168, PM = 100

Bardzo ciekawa w recenzowanym cyklu jest “nietykowa” publikacja **H5**. Habilitant wraz z zespołem zastosowali dość wyrafinowane protokoły obliczeniowe by spróbować wyjaśnić intrygującą obserwację doświadczalną (zespoły z Włoch): dlaczego sanguinaryna (SA) opóźnia tworzenie amyloidów, zaś koralina (CO) przyspiesza ten proces? Poza danymi doświadczalnymi w artykule przedstawiono wyniki serii symulacji MD wraz z próbami dokowania obu tych alkaloidów izochinolinowych o bardzo podobnej strukturze do różnych form amyloidów. Wyniki dokowania nie są konkluzywne, jest wiele miejsc korzystnego wiązania tych cząsteczek do badanych modeli amyloidów. Różnice pojawiają się w modelowaniu dynamiki: SA opóźnia tworzenie agregatów A β 1-42 bowiem promuje α -helisy, zaś CO ułatwia ich tworzenie ponieważ wspomaga tworzenie się wyższej zawartości β struktur w amyloidach, a te formy dominują w fibrylach. Badania modelowe są w tym artykule ważne i mocno rozbudowane. Dla mnie jest to cenny przykład współpracy teoretyków z eksperymentatorami, przykład możliwości technik MD w testowaniu hipotez tłumaczących

pewne procesy o znaczeniu medycznym. Artykuł ten uzasadnia sens ulepszania metod badawczych w obszarze modelowania biocząsteczek i potencjalnych leków. Zdolność do szerokiej współpracy naukowej jest w mojej opinii bardzo cennym wyróżnikiem samodzielności badacza. Takich przykładów w karierze pana dr. P. Krupy znajdziemy więcej. Rola habilitanta w powstaniu teoretycznej części tego artykułu była wiodąca.

H6. Yuliia Varenky, 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.
IF(2021) = 3.466, PM = 140

Bardzo duży wkład (autor korespondujący) wniósł habilitant również do publikacji **H6**, która ukazała się w ub. roku. Ta publikacja jest trudna w lekturze, ponieważ nie bardzo wiadomo o co chodzi: czy o stwierdzenie jak wygląda kompleks monomeru α -synukleiny z β A42, czy o testowanie skuteczności metod modelowania, w szczególności akceptowania lub nie modeli z *implicit solvent* w tego rodzaju badaniach. Pierwszy problem wydaje mi się sensowny, ponieważ są doniesienia doświadczalne, że oba te układy oddziałują *in vivo*, a szczegółów strukturalnych na temat agregatów nie ma. Nie za bardzo natomiast widzę celowość „testowania” modeli teoretycznych rozpuszczalnika na kompleksie mało ustrukturalizowanego białka (w zasadzie IDP) i dużego pepetydu, czyli β amyloidu (1-42). Zwłaszcza, że różne oceny wartościujące zawarte w publikacji („*This allows us to propose with confidence the most probable heterodimer structure*”) nie są oparte na strukturalnych danych doświadczalnych tylko na ogólnym zdrowym rozsądku (by nie powiedzieć intuicji) teoretyka. Wiemy, że metoda MM-PBSA oceny energii swobodnej wiązania jest wybitnie przybliżona, a są nawet opinie wśród teoretyków, że nie powinna być stosowana. W każdym razie logiczny jest wniosek, iż należy unikać stosowania taniego podejścia tj. pomijającego jawne stosowanie molekuł wody, oraz że kompleksy α -synukleiny z A β 42 są przypuszczalnie trwałe i mogą być krokiem wstępnym w tworzeniu groźnych włókien w mózgu.

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.
IF(2021) = 5.168, PM = 100

Co robią jony metali (np. (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺) w białkach jest fundamentalnym pytaniem od lat. Wiemy, że pozbawienie organizmów żywych mikroelementów prowadzi do poważnych zaburzeń metabolizmu, a bez dostępu do jonów np. żelaza człowiek by umarł.

Pomysł by zbadać jak jony miedzi wpływają na tetramery dobrze już poznanych peptydów β -amyloidów i na błonę modelową DMPC uważam za bardzo dobry i ciekawy. W pracy może nie dokonano wielkich syntez i odkryć, ale pokazano, że jony miedzi tworzą stabilne kompleksy z peptydami amyloidowymi. Moje duże wątpliwości budzi sekcja 2.1 tej

publikacji. Autorzy przy pomocy metody próbkowania parasolowego policzyli tzw. potencjały średniej siły dla przejścia poszczególnych jonów przez błonę modelową. Z danych wynika np. że jony sodu, i to solwatowane, praktycznie bez bariery energetycznej mogą przejść przez błonę. Według mnie nie odpowiada to rzeczywistości fizycznej - transport Na^+ przez błony jest wysoce selektywny i wymaga kanałów jonowych, gdyby jony tak swobodnie uciekały to komórki nie mogłyby mieć ujemnego potencjału spoczynkowego. Gdzieś jest błędne założenie albo komentarz do tych wyników jest zbyt uproszczony. Zdanie „*Therefore, the bilayer thickness is approximately 17 Å for DMPC*” (ibid.) jest też nieścisłe, ponieważ grubość takiej biwarstwy to ok. 34 Å. Mimo pewnych braków publikacja ta wnosi nowe dane nt. potencjalnego znaczenia A β 42 w obszarze synapsy – pepetyd może wiązać liczne w tym rejonie jony miedzi i modyfikować poprzez takie kompleksy właściwości błony neuronalnej. Może to być (wywiedziona z obliczeń) ciekawa inspiracja do nowych doświadczeń. W tej publikacji udział habilitanta był bardzo duży, zarówno na etapie planowania i wykonani badań jak i analiz wyników.

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.
IF(2021) = 6.578, PM = 140

Niedawno opublikowana praca **H8** naszpikowana jest terminologią biochemiczną i można zastanawiać się co robi w wykazie autorów fizyk. Przyczyna jest prosta: jest to kolejny przykład możliwości jakie dają metody obliczeniowe (modelowanie, symulacje dynamiki, analizy struktur) biologom i biochemikom. Istota tej pracy polega na poszukiwaniu różnic, strukturalnych, które mogą wytłumaczyć odmienne oddziaływania białka nazwijmy, je dla prostoty A (UL49.5) z ludzkiego wirusa opryszczki (herpes) i białka B (z podobnego wirusa, ale z bydlą - UL49.5 z BoHV-1) w pewnym ważnym dla obrony przed wirusami białkiem TAP (*transporter associated with antigen processing*). Pan dr Krupa wykazał się tutaj bardzo cenna umiejętnością współpracy z eksperymentatorami, którzy dokonali szeregu pomiarów zwłaszcza dla białka A i jego oddziaływań. Utworzył on hipotetyczne modele obu białek oraz nowy model błony retikulum endoplazmatycznego gdzie poprawnie dobrano kompozycje poszczególnych fosfolipidów. Praca ta jest ważna w dorobku habilitanta bowiem poświęca jej omówieniu stosunkowo wiele miejsca w Autoreferacie. W wyniku obszernych symulacji MD i analiz autorzy podali szereg przyczyn odmiennego oddziaływania białka A z białkiem B. Są to tutaj mniej istotne szczegóły. Chciałbym tylko zwrócić uwagę, że w tej publikacji widać pewien upór badawczy i dociekliwość, wielostopniowe przygotowywanie modeli, korzystanie z serwerów światowych, analiza dostępnych danych doświadczalnych, dość ostrożne formułowanie wniosków. Wirus ludzi ma jedną długą helisę transmembranową, zwierzęcy dwie krótsze ustawione prostopadle i to być może rzutuje w głównym stopniu na brak oddziaływania z TAP. W publikacji nie ma dyskusji jakie znaczenie medyczne ma ta obserwacja, ale mam nadzieję, że pomoże w walce z wirusem HV-1, który jest tak rozpowszechniony w populacji ludzkiej. Wkład habilitanta w powstanie tej ciekawej

publikacji był dominujący, wykonał nie tylko planowanie obliczeń ale i same symulacje oraz opracował ich wyniki. Projekt był częścią realizacji “Sonaty” kierowanej przez P.K.

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

Ta niewielka publikacja z roku 2016 ma kilka charakterystycznych cech: powstała tuż po doktoracie, czasopismo jest lokalne i dość niszowe, jest najkrótsza z publikacji cyklu i jako jedyna jest jednoautorska. Zapewne została dołączona do cyklu z powodów „politycznych”: Gdyby ktoś miał wątpliwości, to artykuł ten dowodzi umiejętności habilitanta jeśli chodzi o całkowicie samodzielne przeprowadzenie drobnego projektu naukowego zakończonego publikacją wyników. Przedmiotem badań była ocena czy stosowanie więzów związanych z mostkami disiarczkowymi w procesie modelowania zwijania białek polem gruboziarnistym UNRES ma sens i czy lepszy jest wariant z statycznymi czy z dynamicznymi wiązaniami S-S. Wnioski są dość oczywiste, mostki disiarczkowe zwłaszcza statyczne poprawiają jakość zwiniętych *de novo* niewielkich białek, jednak chcąc szeroko próbować przestrzeń konformacyjną w celu zbadania mechanizmów zwijania lepiej jest stosować wersje dynamiczną mostków S-S. Podsumowując określiłbym ten artykuł jako pożyteczny przyczynek do wiedzy o metodzie UNRES.

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.
IF(2021) = 6.578, PM = 140

Problem roli wiązań disiarczkowych w ustalaniu struktury i funkcji białek jest oczywiście bardzo poważny i zgadzam się z habilitantem, że trochę niedoceniany. Sam długo zmagalem się z kwestią potencjalnej kontroli wydzielania tlenu z neuroglobiny, gdzie tworenie/rozrywanie mostka S-S w wyniku reakcji redox mogłoby być sensorem stanu hipoksji w neuronach. Dlatego nie dziwi mnie opublikowanie w bardzo prestiżowym czasopiśmie JCTC artykułu na temat dynamiki wiązań disiarczkowych w rybonukleazie A, która dla biochemii białek jest tym czym cząsteczka wodoru dla fizyki. Rybonukleaza A przecina RNA i do swojej aktywności potrzebuje obecności 4 wiązań disiarczkowych, z czego dwa są krytycznie ważne. Zwijanie trwa bardzo długo, zatem autorzy badali komputerowo rozwijanie tego białka wykorzystując możliwość dynamicznego tworzenia wiązań S-S w polu UNRES. Symulacje wyjaśniają kolejność tworzenia się poszczególnych wiązań i ich role w stabilizacji struktury enzymu. Uzasadniają też zalety stosowania dynamicznego opisu połączeń Cys-Cys. Praca ta jest istotnym wkładem do metodologii badań teoretycznych białek. Habilitant jest tutaj pierwszym autorem, który wykonał większość obliczeń i analiz, łącznie z poszukiwaniem ważnego potencjału eliminującego niefizyczne oddziaływania cystein (SSS).

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.
IF(2021) = 3.466, PM = 140

Ta publikacja również dotyczy badania roli wiązań disiarczkowych w Rybonukleazie A, a dokładniej sprawdzenie znaczenia jakie ma środowisko redox dla stabilności mechanicznej tego enzymu. Autorzy zastosowali sprawdzone w modelowaniu wiązań S-S pole UNRES, ale dodali też pewien trick do pola AMBER: poprzez specjalny potencjał wzorowany na UNRES mogli śledzić metodami klasycznymi proces rozrywania wiązań S-S w modelu pełnoatomowym. Wyniki symulacji metodą sterowanej dynamiki molekularnej (SMD) w przypadkach CG i AA okazały się jakościowo zgodne. Tak jak można przypuszczać potencjał redox w środowisku ma bardzo duże znaczenie dla stabilności mechanicznej rybonukleazy. Ta publikacja też mi się podoba, ponieważ dotyka ważnych aspektów nanomechaniki białek i podpowiada, jak można realizować badania modelowe innych białek mających mostki disulfidowe (ok. 20 % znanych białek). Jestem przekonany, że ten artykuł zyska sporo cytowań, chociaż badania AFM czy SMD pojedynczych cząsteczek są już nieco mniej modne. Habilitant wykonał obliczenia SMD dla AA (AMBER) i wniósł poważny wkład w powstanie tego artykułu.

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.
IF(2021) = 6.931, PM = 200

W czasopiśmie “Bioinformatics” publikuje się informacje o metodach, algorytmach i programach szczególnie przydatnych dla społeczności badających struktury biomolekuł. Nie jest łatwo przewidywać struktury 3D białek z sekwencji, ale jeszcze trudniej jest przewidywać struktury kompleksów białko-białko. Najnowszy AlphaFold3 ma taką cechę, i jest dość skuteczny, ale pełen algorytm nie został opublikowany, ze względu na potencjalne zastosowania komercyjne. Habilitant wniósł kluczowy wkład w powstanie programu UNRES-Dock opisanego w artykule **H12**. Pomysł polega na wykorzystaniu pola UNRES i wymiany replik, wraz z odpowiednim doбором potencjałów mrozących/lub_nie dokowane białka, do możliwe szybkiego przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej. Funkcją celu jest energia układu liczona wg wzorów UNRES, którą bardzo przyjemnie koreluje z niskim RMSD (czy są poprawne struktury) dla testowanych kompleksów. Cenne jest zaproponowanie nowej metody dokowania. Niebezpieczne jest to, że wyniki bardzo silnie zależą od szczegółów parametryzacji poszczególnych kroków. Testy (**H13**) dają zachęające wyniki, zwłaszcza dla przypadków białko-peptyd. Czy UNRES-Dock się przyjmie - pokaże przyszłość. Autorzy twierdzą, że ta metoda jest lepsza niż znany od pewnego czasu CABS_Dock rozwijany na UW w grupie prof. A. Kolinskiego.

Ten wkład dr P. Krupy do biofizyki oceniam wysoko, wykorzystał On swoją wiedzę i doświadczenie do przygotowania nowego narzędzia badawczego.

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. IF(2021) = 2.942, PM = 70

Artykuł **H13** to przykład konkretnego zastosowania wcześniej omawianego podejścia UNRES-Dock do praktycznego zagadnienia jakim jest określenie struktury (nieznanej) pary białek CD28-CD86 ważnych w działaniu układu immunologicznego. Autorzy przedstawiają ciekawą dyskusję znaczenia tego kompleksu, wykorzystują nowy schemat obliczeniowy UNRES-Dock do wygenerowania hipotetycznych kompleksów oraz klasyczne AA MD do udokładnienia proponowanego modelu. Praca wymagała wielu obliczeń i prób, wynik oczywiście musi być zweryfikowany w doświadczeniach, jednak główny morał jest taki, że modelowanie może być bardzo użyteczne w wypełnianiu luk w naszej wiedzy o tych tysiącach kompleksów białkowych regulujących homeostazę ludzkiego (czy zwierzęcego) organizmu. Artykuł demonstruje biegłość ekipy w tego typu badaniach, daje też sugestie, które aminokwasy są ważne w tworzeniu kompleksu zmieniającego zapewne aktywność limfocytów T. Prace te dają wkład w „długodystansowe” polepszenie technik racjonalnego projektowania leków. Habilitant jest tutaj pierwszym i korespondującym autorem.

Prace cyklu, opublikowane były w latach 2016-2023, są wieloautorskie, naliczyłem łącznie ok. 20 współpracowników. Oświadczenia współautorów są maksymalnie kompletne i nie budzą moich większych wątpliwości (niektóre zamieszczono nawet podwójnie). Ocena wkładu habilitanta w powstanie publikacji jest zwykle dość trudna, a nie pomaga w niej powtarzające się wielokrotnie sformułowanie jakie widziałem w omawianych oświadczeniach „konsultacje naukowe”, bowiem jest ono bardzo pojemne. Z racji liczby załączanych do cyklu publikacji (13) częstego pełnienia roli autora korespondującego, czy pierwszego autora, nie mam wątpliwości, że bez udziału doktora P. Krupy prace z cyklu by nie powstały albo byłyby bardzo okrojone. Zatem warunek poważnego wkładu habilitanta w ten cykl uważam za spełniony.

Jakość czasopism liczona ich rangą w środowisku jest dobra lub bardzo dobra (Bioinformatics, JCI, JChemPhys, JPhysChem). Cytowania są ilościowo umiarkowane, ale to wynik z tego, że pole UNRES nie jest aż tak popularne, zaś wiele prac z cyklu opublikowano niedawno w ostatnich latach.

Ocena osiągnięcia naukowego

Po zapoznaniu się z bardzo obszernym materiałem uważam, że przedstawiony mi do oceny cykl prac **H1-H13** stanowi istotny wkład do nauk fizycznych, w szczególności do biofizyki obliczeniowej. Prace są różnorodne, ale wpisują się w ogólny nurt podany w tytule osiągnięcia. Co prawda publikacje cyklu jak dotąd nie były cytowane jakąś imponującą

liczbę razy (mam na myśli cytowania obce – 640, i tak więcej niż w niejednej profesurze, ale to zależy od tematyki), jednak wkład habilitanta do (1) zwiększenia zakresu stosowalności konkretnego ważnego pola siłowego oraz (2) zrozumienia dynamiki szeregu istotnych układów molekularnych jest pożyteczny, w wielu aspektach nowatorski i może przyczynić się do postępu w obszarze modelowania białek. Bez tych publikacji nasza wiedza byłaby uboższa i narzędzia obliczeniowe mniej przydatne do realizacji nowych projektów. Pewne zastrzeżenia mam co do stopnia autonomiczności młodego badacza jakim jest dr P. Krupa. W przedstawionym do oceny dorobku wyraźnie widzę pewną „doraźność” podejmowanych tematów, wynikającą z „zadanych” z zewnątrz problemów. Przyczyną była zrozumiała konieczność realizacji badań, na które są środki (granty). Tylko niewielka część prac **H1-H13** to osiągnięcia związane z realizacją własnego grantu Sonata, ale cenię tę część, bo sygnalizuje ona początek samodzielności naukowej, którą ma dokumentować habilitacja. Rezultaty zawarte w recenzowanych publikacjach nie są wg mnie przełomowe, ale są to bardzo solidnie udokumentowane prace, wykonane wg reguł sztuki, w dobrych i uznanych zespołach międzynarodowych, opublikowane na ogół w b. dobrych specjalistycznych czasopismach o zasięgu światowym.

Uważam, że dr Paweł Krupa osiągnął próg samodzielności naukowej, a Jego osiągnięcie habilitacyjne spełnia w dobrym zakresie oczekiwania od kandydata do stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ocena istotnej aktywności naukowej habilitanta

Młody badacz poza przedstawionym do oceny cyklem prac „habilitacyjnych” ma przeważnie szereg innych publikacji, w tym przypadku odnotowałem ok. 23 (+5R) pozycji. na tym etapie rozwoju naukowego jest bardzo dobry. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w okresie przygotowywani doktoratu pan P. Krupa był współautorem 8 poważnych publikacji naukowych oraz kilku (5) rozdziałów w monografiach. Oceniałem wiele doktorantów i sam wypromowałem ponad 10 doktorów i wiem, że nie jest to standardowe i powszechne zjawisko.

Aktywność naukowa dr P. Krupy koncentruje się wokół wykorzystania metod symulacji komputerowych do modelowania białek i ich kompleksów. Poza tym głównym nurtem, w który wpisuje się cykl habilitacyjny mamy szereg zagadnień szczegółowych:

- określenie podstaw molekularnych potencjalnej nanotoksyczności molekuł;
- badania wpływu błon lipidowych na białka oraz wpływu różnych molekuł na dwuwarstwy lipidowe;
- ocena mechanicznej stabilności kwasów nukleinowych o określonych sekwencjach.

Podam jako dobry przykład wyjścia poza krąg UNRESa, AMBERa i białek, dokonania kwalifikujące się jako inne (poza cyklem) osiągnięcia naukowe dr P. Krupy. Są to solidne publikacje na temat stabilności kwasów nukleinowych (*“Computational Studies of the Mechanical Stability for Single-Strand Break DNA”*, Paweł Krupa*, David Wales, Adam K.

Sieradzan, Journal of Physical Chemistry B 2018, 122, 8166-8173) oraz oceny toksyczności w nanoskali (*"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). Artykuły te, zamieszczone w solidnych czasopismach branżowych, zyskują cytowania obce, a to wpływa na dyscyplinę. W dorobku widzę też ambitniejsze próby zrozumienia istotnych cech przybliżonych metod modelowania (*"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.), zatem mogę stwierdzić, że działalność naukowa Pana dr. P. Krupy, chociaż ma strukturę wynikającą z Jego doświadczenia i staży, nie jest całkiem monotematyczna, dotyczy różnych zagadnień fizykochemicznych, a nawet problemów biologiczno-medycznych. Mam nadzieję, że te eksploracje pomogą habilitantowi wyznaczyć własną markę i osiągnąć samodzielną, wiodącą, oryginalną specjalizację.

Konferencje

Pan dr P. Krupa był dość aktywny na konferencjach, wygłosił co najmniej 15 wykładów na konferencjach międzynarodowych, z czego 10 na zaproszenie. Był też współautorem ok. 50 komunikatów posterowych. Jest to bardzo przyzwoita statystyka.

Bardzo aktywnie działa jako recenzent w systemie „peer review”, recenzował dotąd blisko 60 prac do poważnych wydawnictw, co należy uznać za duży plus, w czasach komercjalizacji wszystkiego. Ma pewien minimalny dorobek organizacyjny (współorganizował przed laty jedną konferencję naukową). Nie zauważyłem czy należy do PTF, PTBI, PTBioifz czy nigdzie. Istotne jest to, że zna się na kierowaniu projektami naukowymi – uczestniczył w wielu jako wykonawca, ale był też kierownikiem Sonaty, co cenię b. wysoko. Ma dobre rozbudowaną współpracę międzynarodową (USA, Korea, Włochy, Wietnam) i na pewno prowadził badania w niejednym ośrodku naukowym (IF PAN, UG, Cornell Univ.)

Osiągnięcia dydaktyczne, popularyzacyjne, opieka naukowa

Praca w PANie nie daje wielu okazji do osiągnięć dydaktycznych. Jednak pan dr P. Krupa ma w swoim CV liczne epizody dydaktyczne – zajęcia dla studentów w Gdansk (technologie informatyczne/programowanie/chemia teoretyczna) a przede wszystkich regularne pełne (30h/rok) wykłady z metod modelowania/biofizyki dla słuchaczy szkoły doktorskiej (co najmniej 4 edycje). Oceniam te aktywności bardzo dobrze, dr Krupa stara się dzielić swoją wiedzę i popularyzować biofizykę, co wydaje się konieczne. Sprawował opiekę jako promotor pomocniczy nad jedną doktorantką (obrona odbyła się w 2019) i jest promotorem pomocniczym kolejnej osoby.

Brał udział w popularyzowaniu nauki, ale jak widzę tylko w USA, więc jest to dorobek mizerny.

Konkluzja

Analizując wszystkie elementy dorobku dra Pawła Krupy, w tym osiągnięcie habilitacyjne jakim jest cykl 13 publikacji **H1-H13** pt. „**Rozwój i wykorzystanie pól siłowych o różnych poziomach rozdzielczości do badania struktury i dynamiki wybranych białek**”, uważam, że spełnione są wymagania ustawowe (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. z 2022 poz. 54 ze zm.) i zwyczajowe uzasadniające nadanie kandydatowi, stopnia doktora habilitowanego nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne, zatem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o nadanie tego stopnia.

W. Nowak