

## ZAŁĄCZNIK 2A

dr Artur Gieldon  
Pracownia Symulacji Polimerów  
Katedra Chemii Teoretycznej  
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański  
ul. Wita Stwosza 63  
80-308 Gdańsk  
tel. 58-523-5128  
e-mail: artur.gieldon@ug.edu.pl

**AUTOREFERAT**  
(w języku polskim)

I. Imię i nazwisko: **Artur Gieldoń**

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 1999 Dyplom magistra  
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii  
Temat pracy magisterskiej: Modelowanie molekularne oddziaływań receptora V2 i jego oddziaływań z biologandami.  
Promotor – prof. dr hab. inż. Jerzy Carkowski
- 2004 Stopień naukowy doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia  
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii  
Tytuł rozprawy doktorskiej: Modelowanie molekularne oddziaływań receptorów wazopresyny i oksytocyny z wybranymi bioligandami.  
Promotor – prof. dr hab. inż. Jerzy Carkowski

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

12.2000	12.2001	Ośrodek Informatyczny Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Wita Stwosza 57, 80-952 Gdańsk-Oliwa	technik
02.2004	01.2005	Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk	asystent
02.2005	08.2008	J.W. Goethe-Universitat Frankfurt, Institut fur Organische Chemie  AK Prof. Schwalbe, Max-von-Laue Str. 7, D-60439 Frankfurt, a.M. Germany  CERM, University of Florence, Via Sacconi, 6, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy	postdoc
10.2008	09.2009	Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk	specjalista ds. informatyki
09.2009	obecnie	Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk	adiunkt

IVa. Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Empiryczne pola siłowe, jako narzędzie w badaniu właściwości biologicznych wybranych białek receptorowych, proteaz serynowych oraz białek osocza.**

IVb. Wykaz artykułów naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

**H1.** Theoretical study on binding of S100B protein.

**Gieldon Artur**, Mori Mattia, Del Conte Rebecca,

JOURNAL OF MOLECULAR MODELING, 13, 11, 1123-1131, 2007

DOI: 10.1007/s00894-007-0231-6

Impact Factor: 1.425 – 2016, 1.54 – 5 letni, 7 cytowań

**H2.** Theoretical Study of the Human Bradykinin-Bradykinin B2 Receptor Complex.

**Gieldon Artur**, Lopez Jakob J., Glaubitz, Clemens, Schwalbe Harald,

CHEMBIOCHEM 9, 15, 2487-2497, 2008

DOI: 10.1002/cbic.200800324

Impact Factor: 2.847 – 2016, 2.751 – 5 letni, 9 cytowań

**H3.** Temperature-induced conformational changes within the regulatory loops L1-L2-LA of the HtrA heat-shock protease from Escherichia coli.

Sobiecka-Szkatula Anna, Polit Agnieszka, Scire Andrea, **Gieldon Artur**, Tanfani Fabio, Szkarlat Zaneta, Ciarkowski Jerzy, Zurawa-Janicka Dorota, Skorko-Glonek Joanna, Lipinska Barbara,

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS 1794, 11, 1573-1582, 2009

DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.07.002

Impact Factor: 2.773 – 2016, 2.879 – 5 letni, 13 cytowań

**H4.** The role of the L2 loop in the regulation and maintaining the proteolytic activity of HtrA (DegP) protein from Escherichia coli.

Sobiecka-Szkatula Anna, **Gieldon Artur**, Scire Andrea, Tanfani Fabio, Figaj Donata, Koper Tomasz, Ciarkowski Jerzy, Lipinska Barbara, Skorko-Glonek Joanna,

ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 500, 2, 123-130, 2010

DOI: 10.1016/j.abb.2010.05.028

Impact Factor: 3.165 – 2016, 2.974 – 5 letni, 5 cytowań

**H5.** The LA Loop as an Important Regulatory Element of the HtrA (DegP) Protease from Escherichia coli: structural and functional studies.

Figaj Donata, **Gieldon Artur**, Polit Agnieszka, Sobiecka-Szkatula Anna, Koper Tomasz, Denkiewicz Milena, Banecki Bogdan, Lesner Adam, Ciarkowski Jerzy, Lipinska Barbara Skorko-Glonek Joanna,

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 289, 22, 15880-15893, 2014

DOI: 10.1074/jbc.M113.532895

Impact Factor: 4.125 – 2016, 4.323 – 5 letni, 10 cytowań

**H6.** Preliminary studies on trigonelline as potential anti-Alzheimer disease agent: Determination by hydrophilic interaction liquid chromatography and modeling of interactions with beta-amyloid.

Makowska Joanna, Szczesny Damian, Lichucka Agnieszka, **Gieldon Artur**, Chmurzynski Lech, Kaliszan Roman

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES 968, 101-104, 2014

DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.12.001

Impact Factor: 2.603 – 2016, 2.711 – 5 letni, 9 cytowań

**H7.** RASMOL AB - New functionalities in the program for structure analysis

Pikora Mateusz; **Gieldon Artur**

ACTA BIOCHIMICA POLONICA 62, 3, 629-631, 2015

DOI: 10.18388/abp.2015\_972

Impact Factor: 1.159 – 2016, 1.491 – 5 letni, 3 cytowania

**H8.** Anti-inflammatory effect of novel analogs of natural enkephalinase inhibitors in a mouse model of experimental colitis .

Kamysz Elzbieta, Salaga Maciej; Sobocinska Malgorzata; **Gieldon Artur**; Fichna Jakub  
FUTURE MEDICINAL CHEMISTRY 8, 18, 2231-2243, 2016

Impact Factor: 3.556 – 2016, 3.853 – 5 letni, 1 cytowania

**H9.** The LD loop as an important structural element required for transmission of the allosteric signal in the HtrA (DegP) protease from Escherichia coli.

Figaj Donata, **Gieldon Artur**, Bartczak Marlena, Koper Tomasz, Zarzecka Urszula, Lesner, Adam, Lipinska Barbara, Skorko-Glonek, Joanna

FEBS JOURNAL 283, 18, 3471-3487, 2016

DOI: 10.1111/febs.13822

Impact Factor: 3.902 – 2016, 4.129 – 5 letni, 3 cytowania

**H10.** Distinct 3D Architecture and Dynamics of the Human HtrA2(Omi) Protease and Its Mutated Variants.

**Gieldon Artur**, Zurawa-Janicka Dorota, Jarzab Mirosław, Wenta Tomasz, Golik Przemysław, Dubin Grzegorz, Lipinska Barbara, Ciarkowski Jerzy  
PLOS ONE 11, 8, e0161526, 2016  
DOI: 10.1371/journal.pone.0161526  
Impact Factor: 2.806 – 2016, 3.394 – 5 letni, 2 cytowania

**H11.** Rapid insight into C60 influence on biological functions of proteins.

**Gieldon Artur**, Witt Magdalena, Gajewicz Agnieszka, Puzyn Tomasz  
Structural Chemistry, 28, 6, 1775-1788, 2016  
DOI: 10.1007/s11224-017-0957-4  
Impact Factor: 1.582 – 2016, 1.789 – 5 letni, 1 cytowanie

**H12.** Biochemical properties of the HtrA homolog from bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*.

Zarzecka Urszula, Modrak-Wojcik Anna, Bayassi Martyna, Szewczyk Maciej, **Gieldon Artur**, Lesner Adam, Koper Tomasz, Bzowska Agnieszka, Sanguinetti Maurizio, Backert Steffen, Lipinska Barbara, Skorko-Glonek Joanna.  
International Journal of Biological Macromolecules 109, 1, 992-1005, 2018  
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.086  
Impact Factor: 3.671 – 2016, 3.657 – 5 letni, 0 cytowań

#### IVc. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników.

##### 1.0.0. Cel badań.

Przedstawiony do oceny cykl publikacji jest poświęcony badaniom nad zastosowaniem empirycznych pól siłowych do przewidywania / wyjaśnienia molekularnych mechanizmów funkcjonowania wybranych białek. W celu uzyskania dostępu do szerokiego materiału badawczego, podjąłem współpracę z grupami eksperymentalnymi, gdyż tylko metody eksperymentalne są w stanie zweryfikować poprawność przewidywań. Jednocześnie, metody teoretyczne są w stanie wyjaśnić molekularne podstawy obserwowanych efektów dając tym samym pełen obraz działania badanych układów molekularnych.

##### 2.0.0. Wstęp.

###### 2.1.0. Rys historyczny oraz geneza empirycznych pól siłowych.

Metody empirycznych pól siłowych wynikają bezpośrednio z przybliżenia Borna - Oppenheimera pozwalającego na matematyczne rozseparowanie ruchu jąder i elektronów [1]. W następstwie tego założenia możemy przedstawiać cząsteczki chemiczne, jako naładowane sfery połączone ze sobą sprężynkami. Historycznie rzecz ujmując, wszystko zaczęło się w 1865 roku, kiedy to August Wilhelm von Hofmann zbudował pierwszy model cząsteczki etanu. Model ten był daleki od doskonałości, niemniej jednak pozwalał na zobrazowanie wyglądu cząsteczki. [2]. Autorem idei cząsteczek przedstawionych jako naładowane kulki połączone ze sobą sprężynkami, jest DQNALD H. Andrews. Taki sposób przedstawiania cząsteczek pozwolił mu na wyjaśnienie widm typu Ramana. [3]. Pierwszą symulację dynamiki molekularnej przeprowadzili Alder i Wainwright z wykorzystaniem przybliżenia kul twardych, w którym atomy mogły oddziaływać ze sobą tylko podczas idealnych zderzeń [4]. Jednakże fundamentalną pracą, dającą podstawy opracowaniu empirycznych pól siłowych jest publikacja Synder i Schachtschneider, w której autorzy pokazują możliwość przenoszenia stałych siłowych wiązań chemicznych pomiędzy cząsteczkami [5].

###### 2.2.0. Funkcja energii używana w empirycznych polach siłowych.

Współczesne pola siłowe w większości przypadków opierają się o stosunkowo prostą funkcję energii (patrz Równanie 1).

$$E = \underbrace{\sum_i \frac{1}{2} k_i^d (d_i - d_i^0)^2}_{E_s} + \underbrace{\sum_i \frac{1}{2} k_i^\theta (\theta_i - \theta_i^0)^2}_{E_b} + \underbrace{\sum_i \sum_{j<i} 332 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}}}_{E_{el}} + \underbrace{\sum_i \sum_{j<i} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{E_{nb}} +$$

$$\underbrace{\sum_i \frac{V_i^{(1)}}{2} (1 + \cos \tau_i) + \frac{V_i^{(2)}}{2} (1 \pm \cos 2\tau_i) + \frac{V_i^{(3)}}{2} (1 + \cos 3\tau_i)}_{E_{tor}}$$

Równanie 1. Funkcja służąca do obliczania energii potencjalnej w przybliżeniu empirycznych pól siłowych.  $E_s$  – energia odkształcenia wiązania,  $E_b$  – energia odkształcenia kąta walencyjnego,  $E_{el}$  – energia oddziaływań typu kulombowskiego,  $E_{np}$  – energia oddziaływań typu van der Waals, przybliżoną potencjałem Leonarda-Jonesa,  $E_{tor}$  – wkład pochodzący od obrotu wokół wiązań.

Oddziaływania wiążące pochodzące od odkształcenia wiązań oraz kątów walencyjnych zostały przybliżone potencjałem harmonicznym. Główną zaletą tego rozwiązania jest bardzo niski koszt obliczeniowy, jednakże trzeba pamiętać, iż ten potencjał działa poprawnie w stosunkowo wąskim zakresie odkształceń. Oddziaływania niewiążące pochodzące od oddziaływań ładunek – ładunek przybliża się zgodnie z prawem Culomba, natomiast oddziaływania typu van der Waals potencjałem Leonarda Jonesa. Zastosowane w równaniu potęgi, najlepiej pasują do danych eksperymentalnych. Ze względu na symetrię, wkład pochodzący od obrotu wokół wiązań jest obliczany za pomocą funkcji cosinus z odpowiednimi współczynnikami oznaczającymi barierę rotacji oraz ilość minimów występujących podczas pełnego obrotu.

Energia układu dana równaniem 1 jest funkcją współrzędnych jąder atomowych. Z uwagi na niski koszt obliczeń funkcja ta umożliwia symulowanie stosunkowo dużej (w chwili obecnej jest to ok.  $10^6$ ) grupy atomów [6,7].

### 2.3.0. Badanie układów molekularnych przy użyciu empirycznych pól siłowych.

W przypadku empirycznych pól siłowych istnieją dwie klasy metod umożliwiające badanie zachowania się układów molekularnych w czasie.

Metody mapowania adiabaticznego umożliwiają obliczenie konformacji układów biologicznych z zadeklarowanymi więzami. Mogą to być więzy nałożone na odległość lub kąt. Ich celem jest zawężenie przeszukiwanej przestrzeni konformacyjnej tylko do określonego rejonu. Odmianą mapowania adiabaticznego jest metoda aproksymacji stanów. W metodzie tej mamy do dyspozycji stan początkowy oraz końcowy układu a następnie za

pomocą operacji translacji i rotacji uzyskujemy konformacje na drodze pomiędzy zadeklarowanymi wcześniej stanami.

Drugą klasą metod pozwalającą na symulowanie zachowania się układów molekularnych w czasie jest dynamika molekularna. W metodzie tej wykorzystujemy siły, które występują w układzie na skutek oddziaływań pomiędzy atomami. Robimy to dokładnie jak w mechanice klasycznej, najczęściej korzystając z równań Newtona (Równanie 2).

$$m_i \frac{d^2 r}{dt^2} = F_i(r)$$

Równanie 2. Klasyczne równanie ruchu wynikające z II zasady dynamiki Newtona. Przyspieszenie zostało tu zapisane, jako druga pochodna położenia po czasie.

Istnieje wiele algorytmów rozwiązujących ten problem, niemniej jednak najprostszym i najbardziej efektywnym wydaje się być algorytm Verleta. Najczęściej stosowaną jego wersją jest tak zwany algorytm „żabiego skoku”. Algorytm żabiego skoku używa położenia atomów w czasie ( $t$ ) oraz prędkości w czasie ( $t-\Delta t$ ) do obliczenia brakujących położenia i prędkości, używając sił działających na atomy wyliczanych jako pochodna z funkcji energii w symulowanym układzie molekularnym (patrz Równanie 3).

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \frac{dx(t)}{dt} \left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t$$
$$\frac{dx(t)}{dt} \left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{dx(t)}{dt} \left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2 x(t)}{dt^2} \Delta t$$

Równanie 3. Algorytm Verleta w wersji „żabiego skoku”,  $\Delta t$  – arbitralny krok czasowy.

Na początku symulacji następuje losowanie prędkości początkowych zgodnie z rozkładem Maxwella. Co oznacza, że kierunek symulacji (a konkretnie jego początek) w czasie jest arbitralny. W konsekwencji ewolucja badanego układu molekularnego może prowadzić do innego zestawu konformacji [6,8].

### 2.3.1. Czas symulacji.

Bardzo ważnym aspektem, który powinniśmy uwzględnić w celu dostosowania warunków symulacji komputerowej do przeprowadzonego eksperymentu jest czas. Rozwiązując równania Verleta musimy uwzględnić krok czasowy symulacji. Zbyt duży krok czasowy spowoduje zbyt długie działanie obliczonych sił, bez korekty kierunku, na atomy badanego



układu, co spowoduje utratę integralności symulowanego systemu. Efektem będzie zakończenie symulacji z błędami. By ograniczyć czas działania sił wykonuje się ich aktualizację z czasem wynoszącym ok. 0,1 czasu drgania wiązań kowalencyjnych zawierających atom wodoru. Zazwyczaj jest to ok. 1 fs. Niestety czas procesów biologicznych, które chcielibyśmy symulować jest znacznie dłuższy i np.: proces zwijania białek czy wiązania się ligandów może wynosić nawet 10 s. Oznaczałoby to konieczność wykonania  $10^{16}$  kroków algorytmu. Nawet przy użyciu super-komputerów jest to wykonalne w rozsądnym czasie. Dlatego stosujemy różnorodne metody by pomimo ograniczonej skali czasowej odwzorować naturalne procesy. Zazwyczaj procesy biologiczne przechodzą przez bliżej nieokreśloną liczbę stanów przejściowych. Stany te charakteryzują się pewną trwałością, naturalnie spowalniając obserwowany proces. Podczas symulacji komputerowej możemy nienaturalnie zwiększyć energię potencjalną takiego układu dając mu tym samym możliwość opuszczenia lokalnego minimum. Drugim sposobem jest symulacja układu molekularnego, który jest stosunkowo niedaleko minimum globalnego a tym samym przeszedł już wszystkie pośrednie stany przejściowe [9,10].

### 2.3.2. Otoczenie badanego obiektu molekularnego.

Badając biomolekuły, takie jak białka, niezbędne jest uwzględnienie naturalnego otoczenia badanego obiektu. Większość biomolekuł występuje w środowisku wodnym, dlatego też jak najbardziej racjonalne odwzorowanie tego środowiska jest istotne dla prawidłowości otrzymanych wyników. Istnieją dwa sposoby na uwzględnienie środowiska wodnego w badanym układzie. Pierwszym z nich jest dodanie pewnej liczby cząsteczek wody, która będzie otaczać symulowane białko. Istnieje wiele modeli cząsteczek wody, do najważniejszych należy zaliczyć: TIP3P, TIP4P, TIP5P, SPC, SPC/E czy F3C różniących się między sobą ilością obiektów oraz lokalizacją ładunków punktowych.

Drugim sposobem jest zastosowanie funkcji matematycznej by „symulowała” obecność wody w badanym układzie. Najpopularniejszym matematycznym modelem wody jest *Generalized Born Surface Area* (GBSA) [11,12].

### 2.4.0. Zastosowanie empirycznych pól siłowych.

Przy pomocy empirycznych pól siłowych można przewidzieć / obliczyć następujące parametry opisujące badane układy molekularne:

a) parametry opisujące energetykę:

- ciepło właściwe, energię deformacji,

- energię konformacyjną,
- wysokości bariery energetycznej oddzielającej poszczególne konformacje.

b) parametry opisujące geometrię:

- geometrię cząsteczek przyjmujących różnorodne konformacje (długości wiązań, wartości kątów walencyjnych oraz torsyjnych) w stanie podstawowym,
- geometrię cząsteczek w stanie krystalicznym,
- geometrię cząsteczek stanach przejściowych, separujących dwie konformacje,
- geometrię cząsteczek w bliżej nieokreślonym punkcie czasowym.

c) parametry opisujące drgania oscylacyjne:

- częstości oscylacyjne oraz ich amplitudę.

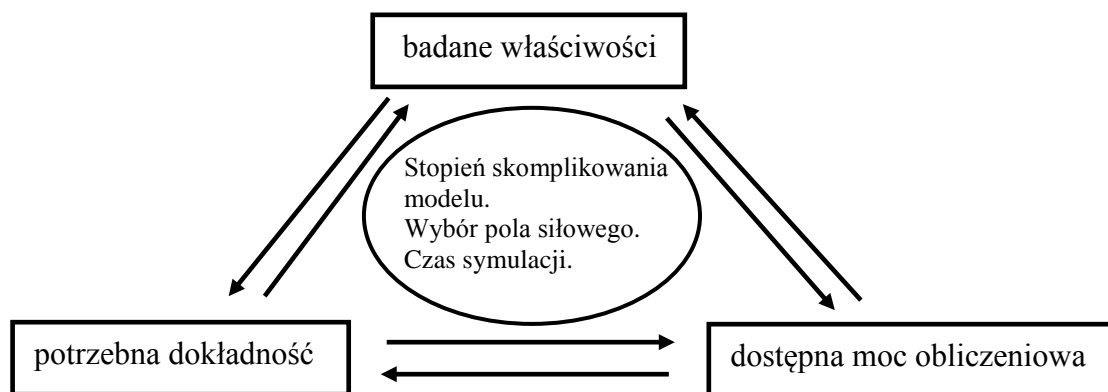
d) pozostałe parametry:

- powinowactwo chemiczne zależne od konformacji i/lub odkształcenia cząsteczki,
- dane termodynamiczne takie jak kinetyka oraz entropia.

#### 2.5.0. Korelacja otrzymanych wyników z danymi eksperymentalnymi.

Aby wyniki otrzymane z użyciem danego pola siłowego były wiarygodne, musi ono zostać skrupulatnie sparametryzowane w oparciu zarówno o obliczenia teoretyczne na wysokim poziomie chemii kwantowej małych układów modelujących istotne fragmenty przewidzianych do badania klas związków. W tym podejściu powierzchnia energii potencjalnej małego układu reprezentuje fragment powierzchni energii potencjalnej badanego układu. Drugim źródłem parametrów są dane eksperymentalne. Niewłaściwie wykonana parametryzacja sprawi, iż wszystkie uzyskane wyniki nie będą miały sensu fizycznego.

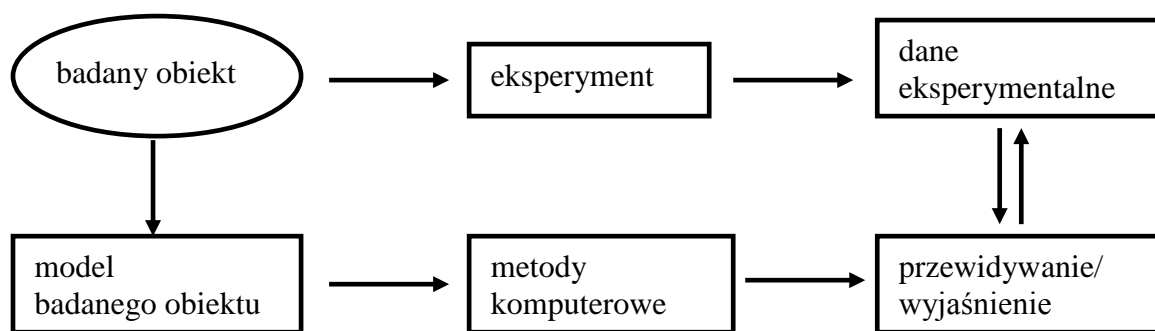
By przewidywania teoretyczne były poprawne, najważniejsze jest takie dostosowanie naszego modelu by w jak najbardziej dokładny sposób odwzorowywał badany obiekt. W tym miejscu zawsze stajemy przed wyborem pomiędzy dokładnością modelu a stopniem jego skomplikowania. Wraz ze wzrostem ilości składowych modelu oraz stopnia ich skomplikowania, rośnie także czas potrzebny na obliczenia komputerowe, które mają ten model symulować (patrz Rysunek 1).



Rysunek 1. Diagram obrazujący zależność pomiędzy dokładnością modelu, dostępną mocą obliczeniową oraz badanymi właściwościami układu molekularnego.

Wybór sposobu wykonania modelowania badanego zjawiska będzie głównie zależał do trzech czynników: pytań na które nasz model będzie miał odpowiedzieć, dokładności tych odpowiedzi oraz wykonanych przewidywań a także od dostępnej mocy obliczeniowej. Jeżeli wybrany / zbudowany model będzie zbyt prosty, badane zjawisko może nie być przez niego wystarczająco oddane. Jeśli model będzie zbyt skomplikowany próbkowanie przestrzeni konformacyjnej może być niemożliwe do wykonania.

W całym przedstawionym procesie poznawczym bardzo istotna jest korelacja z danymi eksperymentalnymi. Cały proces najlepiej ilustruje następujący schemat zobrazowany na Rysunku 2.



Rysunek 2. Diagram obrazujący korelację pomiędzy danymi teoretycznymi a eksperymentalnymi.

W przedstawionym diagramie najbardziej istotna jest korelacja pomiędzy danymi eksperymentalnymi a danymi teoretycznymi. W idealnym przypadku jest ona kompletna. Ten fakt pozwala na dokładne wyjaśnienie obserwowanych efektów a także waliduje zarówno badania eksperymentalne jak i teoretyczne. Jednakże przeważnie korelacja jest częściowa lub brak jej wcale. W takim przypadku niezbędne jest powtórzenie/sprawdzenie procesu modelowania a także ponowna walidacja lub powtórzenie eksperymentu [13].

W badaniu zależności struktura / aktywność białek poprawna budowa modelu ma kluczowe znaczenie, gdyż tylko wtedy będziemy w stanie poprawnie zidentyfikować wszystkie reszty aminokwasowe odpowiedzialne za konkretne oddziaływania. Najbardziej optymalnym przypadkiem jest dostępność struktury eksperymentalnej badanego białka. Jeśli tak nie jest, lub struktura eksperymentalna zawiera braki, niezbędne jest wykonanie modelowania molekularnego brakującego fragmentu. Dostępne są dwa główne sposoby by wykonać to zadanie. Jest to użycie metod typu „knowledge-based” lub „bioinformatics-based”, w których wykorzystujemy dostępne dane eksperymentalne. Najprostszym użyciem „knowledge-based” jest modelowanie przez homologię. Można także użyć potencjału opartego na fizyce oddziaływań „physics based”, w którym łączymy brakujące fragmenty białka łańcuchem w konformacji rozciągniętej a następnie używając naszego pola siłowego znajdujemy minimum energetyczne dla naszego białka. W niektórych przypadkach niezbędne jest użycie obu metod w sposób sekwencyjny.

#### 2.6.0. Wizualizacja wyników.

W całym procesie budowy modelu oraz analizy wyników bardzo pomaga wizualizacja. Dokładnie jak w przypadku procesu budowy modelu, wybór programu komputerowego umożliwiającego „naoczną” analizę wyników będzie zależał od postawionego pytania. Dlatego też posiadanie dobrego a jednocześnie niezbyt skomplikowanego narzędzia umożliwiającego oglądanie i analizowanie wyników jest równie ważne.

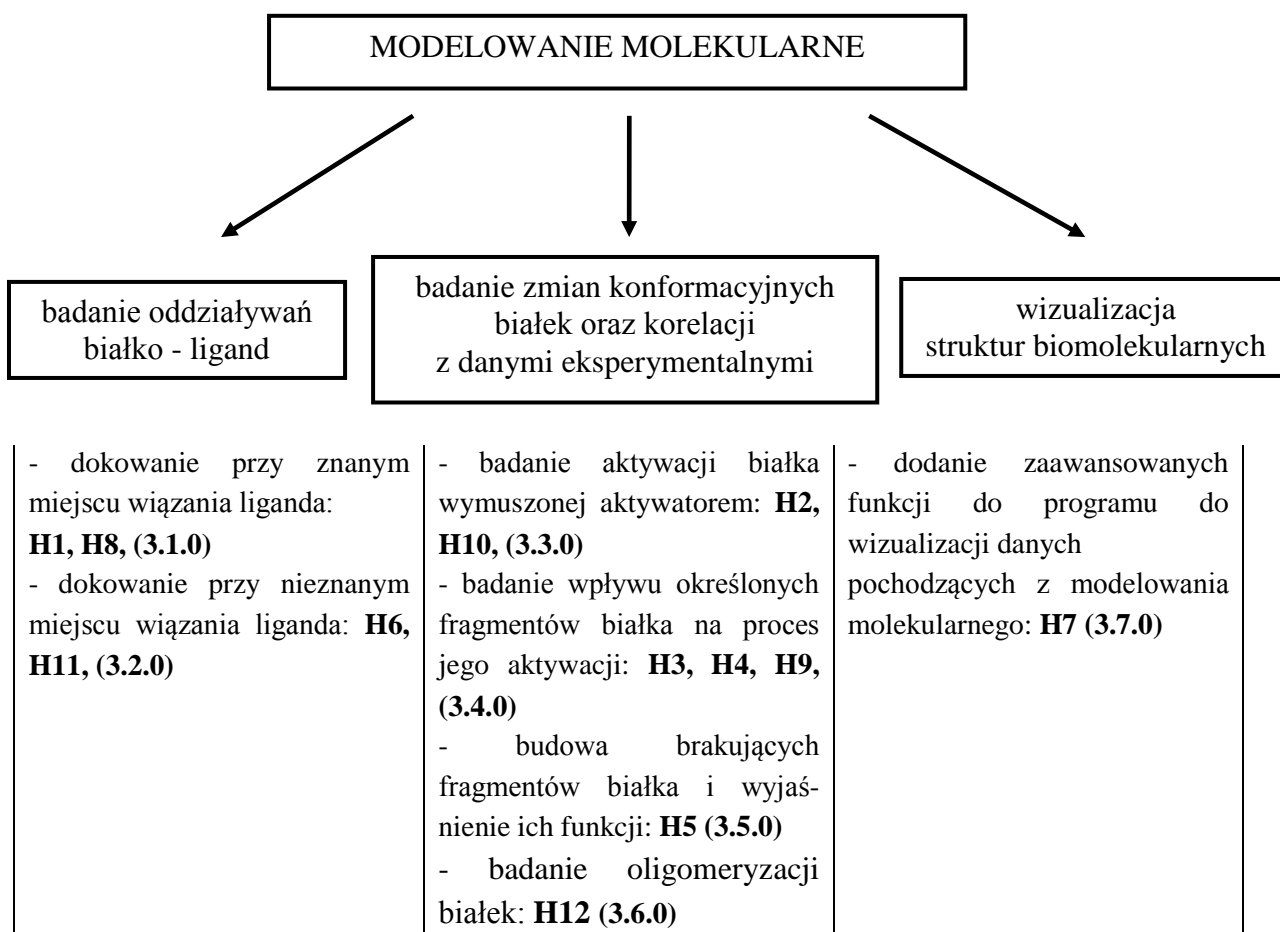
#### 2.7.0. Białka jako badane układy molekularne.

Białka są najbardziej uniwersalnymi i cząsteczkami, które uczestniczą w niemalże każdym procesie odbywającym się w organizmach żywych. Biorą udział między innymi w : katalizowaniu procesów biochemicznych, transporcie i magazynowaniu innych cząsteczek, obronie immunologicznej, przenoszeniu impulsów nerwowych. Białka pełnią także funkcje mechaniczno-strukturalne. Z tego względu szczegółowe poznanie mechanizmów ich działania jest kluczowe dla zrozumienia procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych. Struktura białek a co za tym idzie ich funkcja jest determinowana przez sekwencję aminokwasową. Podczas procesu fałdowania się, białko przybiera odpowiednią strukturę, która umożliwia mu pełnienie wyspecjalizowanej funkcji. Analizując oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów wewnątrz białek, oddziaływania typu białko - ligand a także dynamikę zmian konformacyjnych białka można wyciągnąć wnioski odnośnie mechanizmu jego działania. [14,15]. Kolejnym wyzwaniem jest

projektowanie, badanie oraz zrozumienie mechanizmów działania cząsteczek, które mogą być agonami lub antagonistami białek. W tym celu poszukuje się miejsc wiązania tych cząsteczek do białek. W większości przypadków możemy mówić o mechanizmie „klucz-zamek”, gdzie związany ligand przesuwając równowagę w stronę formy aktywnej (agon) lub nieaktywnej (antagon) lub blokując miejsce aktywne białka tym samym wyłączając jego funkcje [15,16]. Dokowanie jest matematycznym procesem, który ma za zadanie odpowiedzieć na pytanie odnośnie wzajemnego ułożenia w przestrzeni białka i jego liganda. Dokładnie jak w przypadku symulowania procesu zwijania białek, tu także wyróżniamy metody oparte na fizyce oddziaływań oraz metody modelowania porównawczego. W przypadku metod homologicznych wiemy gdzie znajduje się kieszeń wiążąca ligand i zasadniczo nasze pytanie skupia się na samej konformacji związanego liganda oraz reszt aminokwasowych z nim oddziałujących. Jeśli natomiast miejsce wiązania liganda nie jest znane, musimy wykorzystać metody oparte na fizyce oddziaływań. Prawdopodobieństwo danej konformacji białko - ligand jest ustalane na podstawie badania statystyk rozkładu względnych orientacji liganda względem białka oraz przy użyciu przedstawionej wcześniej funkcji energii a konkretnie członów opisujących oddziaływania niewiążące [17,18,19].

### 3.0.0. Opis dorobku.

Wyniki przedstawionych do oceny badań zobrazowałem za pomocą schematu przedstawionego na Rysunku 3.



Rysunek 3. Schemat przedstawiający dorobek habilitacyjny.

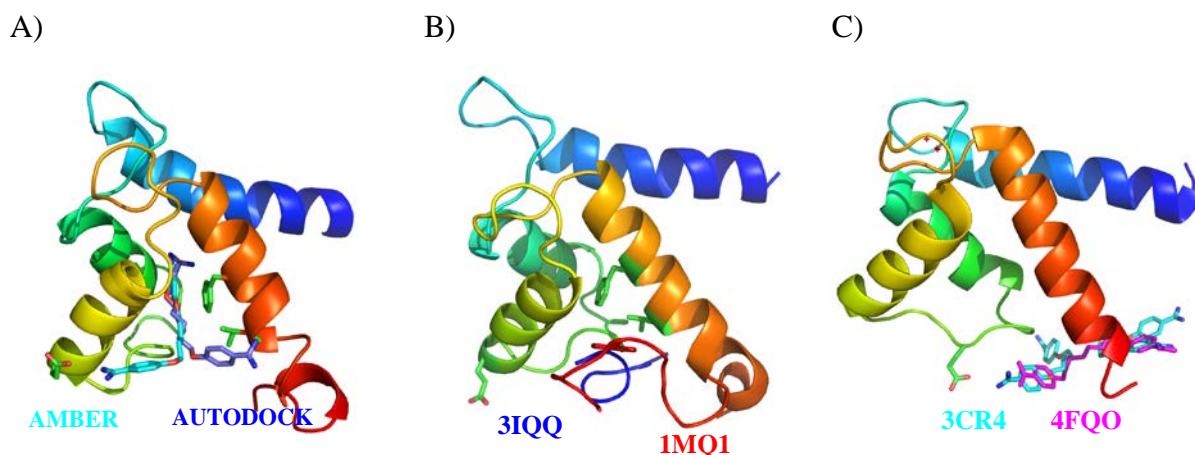
#### 3.1.0. Poszukiwanie konformacji białko – ligand przy znanym miejscu wiązania liganda.

Badanie oddziaływań białko - ligand przy znanym miejscu wiązania znacznie zawęża przeszukiwaną przestrzeń konformacyjną czyniąc badania znacznie szybszymi. Najpewniejszym źródłem informacji o miejscu wiązania się ligandów są dane eksperymentalne. Struktury krystaliczne lub określone widmami NMR stanowią nieocenione źródło informacji nie tylko o miejscu wiązania się liganda a także o jego konformacji oraz resztach z nim oddziałujących. Takie badania wykonywałem w pracach **H1** oraz **H8**.

##### 3.1.1. Praca **H1**.

W przypadku pracy **H1** zajmowałem się kompleksem białka S100B z pentamidyną. Białko S100B jest członkiem małej rodziny białek S100 (do dzisiaj znanych jest jedynie 25

przedstawicieli). Nazwa tych białek wzięła swój początek z faktu, iż pierwszy poznany przedstawiciel tej rodziny był rozpuszczalny w 100% nasyconym roztworze siarczanu amonu. Białka te wykazują dosyć duże podobieństwo sekwencyjne wahające się w granicach 25-65% a także zawierają motyw wiążący wapń „EF”, który składa się z dwóch helis „E” oraz „F” połączonych ze sobą 12 resztową pętlą, która wiąże jon wapniowy. Białko S100B jest zaangażowane we wiele procesów komórkowych. Bierze udział w gospodarce wapniowej a także w specjalizacji funkcyjnej komórek. Jednakże główną funkcją białka S100B jest regulacja aktywności białka p53 odpowiadającego za apoptozę komórek. Podwyższony poziom S100B hamuje funkcje p53 pozwalając na nadmierne namnażanie się komórek. Dlatego podwyższony poziom białka S100B używany jest jako marker komórek nowotworowych (głównie chodzi o czerniaka) [20,21]. Wiadomo, że pentamidyna bardzo dobrze przeciwdziała tworzeniu się kompleksu S100B - p53. Dlatego dokładne zrozumienie jak działa ten bloker, było celem mojej pracy opisanej w publikacji **H1**. Do modelowania molekularnego użyłem eksperymentalną strukturę S100B w kompleksie z peptydem TRTK-12 (1MQ1) (Rysunek 1B), który to peptyd wiąże się z resztami aminokwasowymi odpowiedzialnymi za oddziaływanie S100B - p53. Pozycja tryptofanu z peptydu TRTK-12 posłużyła jako centrum zadeklarowanej przestrzeni dokowania. Najniżej energetyczne konformacje otrzymane przeze mnie przy pomocy metod obliczeniowych zostały przedstawione na Rysunku 4A (oraz Rys. 1 w publikacji **H1**).



Rysunek 4. Białko S100B w kompleksie z ligandami. A) zamodelowana konformacja pentamidyny praca **H1**; B) struktury eksperymentalne z peptydem TRTK-12; C) struktura kompleksu z pentamidyną (niebieski) oraz ligandem (SBi4211) (bardzo podobnym do pentamidyny) (fioletowy).

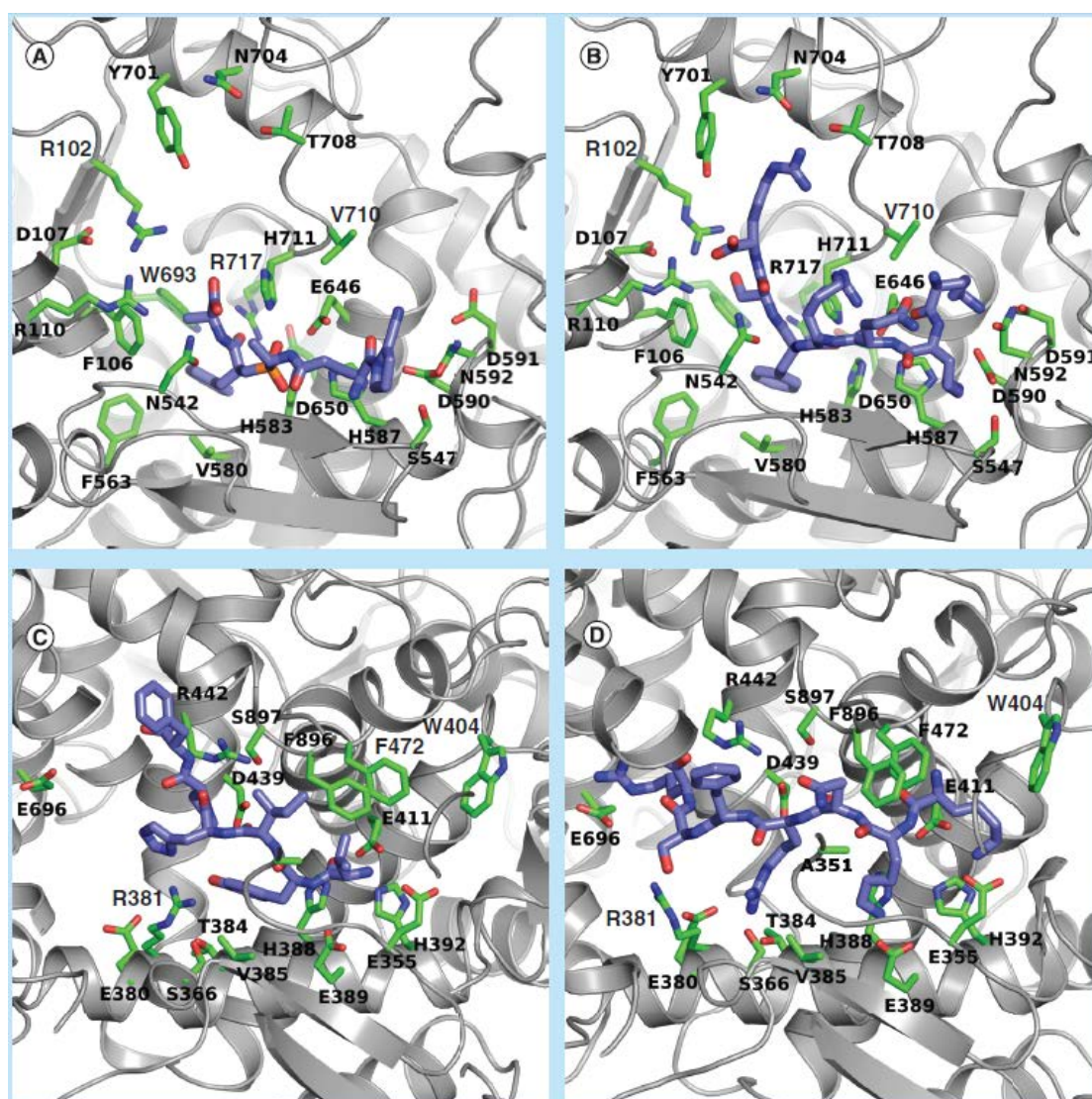
Najistotniejszym oddziaływaniem zidentyfikowanym przy pomocy otrzymanego modelu jest mostek solny pomiędzy E39 a pentamidyną utworzony wewnątrz białka. Na powierzchni białka AUTODOCK wskazywał na dominującą rolę oddziaływań hydrofobowych z V80. Do walidacji wyników postanowiłem użyć pola siłowego AMBER i dynamiki molekularnej. Używając zadeklarowanego wcześniej miejsca wiązania, umieściłem w nim peptyd a następnie wykonałem symulację w polu siłowym AMBER. Wynik symulacji wskazywał na obecność drugiego mostka solnego S100B (E51) - pentamidyna, utworzonego na powierzchni białka (Rysunek 4A). Dokładna identyfikacja reszt aminokwasowych miała posłużyć do zaprojektowania innych inhibitorów S100B. Śledząc postęp badań nad białkiem S100B zobaczyłem że w 2008 roku ukazała się praca opisująca kompleks S100B z pentamidyną (3CR4), natomiast po trzech latach ukazała się inna struktura z peptydem TRTK-12 (3IQQ). W tym przypadku pozycja peptydu TRTK-12 jest diametralnie inna niż w strukturze (1MQ1) (Rysunek 4B). Dodatkowo w roku 2012 ukazała się struktura bardzo podobnego inhibitora do pentamidyny (SBI4211) (4FQO) (Rysunek 4C). Z tych prac i opublikowanych struktur (3IQQ, 3CR4 oraz 4FQO) wynika diametralnie inny obraz odnośnie reszt biorących udział w oddziaływaniu S100B - p53. Przy błędnym założeniu, metoda nie mogła dobrze przewidzieć miejsca wiązania peptydu. Z drugiej strony struktura pentamidyny z S100B (3CR4) oraz SBI4211 - S100B (4FQO) pokazują oddziaływanie typu mostek solny z pętli łączącej pierwszy i drugi motyw (EF) wiążący kation wapniowy, zlokalizowany w pobliżu wytypowanego wcześniej oddziaływania, co można niewątpliwie uznać za sukces metody, iż nawet w przypadku błędnie zdefiniowanej przestrzeni dokowania potrafiła znaleźć właściwe oddziaływanie na powierzchni białka.

### 3.1.2. Praca **H8**.

Nieswoiste zapalenie jelit (ang. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) jest to grupa przewlekłych chorób zapalnych przewodu pokarmowego, głównie jelita grubego lub cienkiego. Najczęściej objawia się to jako choroba Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego [22]. Prowadzone badania pokazują, iż endogenne peptydy opioidowe takie jak Met- oraz Leu- enkefalina mają korzystny wpływ w terapii IBD. Jednakże peptydy te są rozkładane przez białka z rodziny enkefalinaz [23]. W pracy **H8** zajmowałem się wyjaśnieniem molekularnego mechanizmu działania inhibitorów białek NEP (neprylizyna) oraz APN (aminopeptydaza N). Struktury obu tych białek w kompleksie z inhibitorami są dostępne w bazie danych PDB pod kodami NEP - 2QPJ oraz APN - 4FYS. W przypadku kompleksu NEP - (ligand I20) nie można było dokonać komputerowej mutacji reszt aminokwasowych,



z tego względu użyłem pozycji liganda jako znacznika dla łańcucha głównego dokowanego peptydu. Dane literaturowe wskazują, iż reszta w pozycji trzeciej musi znajdować się w kieszeni S1' białka. Tak zbudowany kompleks zoptymalizowałem za pomocą dynamiki molekularnej, zaimplementowanej w programie AMBER. W przypadku białka APN sprawa była już łatwiejsza, gdyż wystarczyło wykonanie komputerowej mutacji peptydu, który już znajdował się w kieszeni wiążącej liganda. Dokładnie jak w poprzednim przypadku, nowo zbudowany model zoptymalizowałem przy użyciu pola siłowego AMBER. Zamodelowane kompleksy białek NEP i APN z peptydami zostały przedstawione na Rys. 1 manuskryptu **H8** oraz Rysunku 5.



Rysunek 5. Wizualizacja kompleksów białko – ligand użytych w pracy H8. (A) Eksperymentalna struktura ludzkiej neprylizyny (NEP) z inhibitorem I20 (kod PDB: 2QPJ). (B) Zbudowany model NEP z peptydem XIII (KKQRFSR). (C) Struktura eksperymentalna ludzkiej aminopeptydazy N (APN) z angiotensyną (VYIHPF) (kod PDB: 4FYS). (D) Zbudowany model APN z peptydem XIII (KKQRFSR).

Kolejnym etapem badań była identyfikacja reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za oddziaływanie białko - ligand. Dane eksperymentalne pokazały, iż bardzo dobrą modyfikacją było wprowadzenie dwóch reszt lizyny na N- końcu peptydu. Efekt był widoczny zarówno dla układów z białkiem NEP jak i APN. Moje modele pokazały, iż dla aminopeptydazy N zwiększony efekt inhibicyjny peptydu XII był skutkiem tworzenia się dwóch mostków solnych pomiędzy resztami lizyny pochodzącymi z peptydu oraz resztami kwasu asparaginowego (590 oraz 591). Dla neprylizyny wyjaśnienie dobrego działania dwóch reszt lizyny na N- końcu badanych peptydów jest bardzo podobne, tylko że w tym przypadku mostki solne tworzą się z kwasem glutaminowym (355 i 411). Podsumowując, zbudowane przeze mnie modele pozwoliły na wiarygodne wyjaśnienie obserwowanych efektów inhibicyjnych we wszystkich badanych peptydach. Zidentyfikowane reszty aminokwasowe posłużyły do zaprojektowania bardziej efektywnych inhibitorów (patrz publikacja P22).

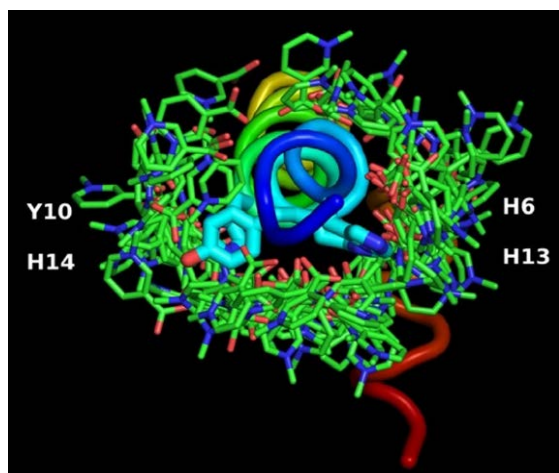
### 3.2.0. Poszukiwanie konformacji białko - ligand przy nieznanym miejscu wiązania liganda.

Badanie oddziaływań białko - ligand gdy miejsce wiązania liganda nie jest znane, ze względu na ilość minimów lokalnych na hiperpowierzchni energii potencjalnej jest niezwykle utrudnione. W takim przypadku musimy zaufać zastosowanej funkcji energii. Jednakże wyniki uzyskane przy pomocy nowoczesnych programów komputerowych cechują się dużym prawdopodobieństwem sukcesu. Dodatkowa walidacja przy użyciu danych eksperymentalnych zwiększa prawdopodobieństwo ich poprawności. Takimi badaniami zajmowałem się w pracach **H6** oraz **H11**.

### 3.2.1. Praca **H6**.

Choroby neurodegeneracyjne mogą mieć podłoże genetyczne lub środowiskowe i powodują zaburzenia struktury i funkcji neuronów. W skrajnych przypadkach następuje śmierć komórek mózgowych. Zazwyczaj są to choroby wieku średniego lub starszego a wraz ze statystycznym wzrostem długości ludzkiego życia ich występowanie będzie się sukcesywnie zwiększać [24]. W związku z tym badania nad tym tematem są niezwykle istotne. Jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób neurodegeneracyjnych jest choroba Alzheimera. Istnieje kilka hipotez jej powstawania, jednakże najbardziej rozpowszechnioną jest hipoteza złogów amyloidowych [25]. Złogi te są tworzone przez peptydy (1-42)  $\beta$  amyloidowe. Pojedynczy peptyd ma strukturę  $\alpha$  helisy, jednakże po zmianie struktury II-rzędowej na  $\beta$ -kartkę formuje fibryle mające negatywny wpływ na komórki układu nerwowego. Celem badań opisanych w pracy **H6** było zbadanie, czy trygonelina (jeden z alkaloidów występujących w kawie) może

zapobiegać formowaniu złogów amyloidowych. W tym celu użyłem strukturę eksperymentalną (1-42) peptydu  $\beta$ -amyloidowego a następnie wykonałem serię dokowań trygoneliny. Ze względu na fakt nieznaności miejsca oddziaływania peptyd - ligand, zadeklarowana przestrzeń dokowania obejmowała całą cząsteczkę peptydu. Wynik dokowania został przedstawiony na Rys. 2 w manuskrypcie **H6** oraz Rysunku 6.



Rysunek 6. Wynik dokowania trygoneliny (kolor zielony) do (1-42) peptydu  $\beta$ -amyloidowego. Istotne reszty histydyny oraz tyrozyny zostały pokolorowane na niebiesko i odpowiednio podpisane.

Z uwagi na fakt, iż badany peptyd  $\beta$ -amyloidowy nie posiada wyraźnie zdefiniowanej kieszeni wiążącej ligand, niezbędna była ilościowa analiza wyników. W tym celu użyłem języka skryptowego zaimplementowanego w programie RASMOL AB (publikacja **H7**, opis w dalszej części tekstu). Okazało się, iż trygonelina preferuje reszty histydyny (6, 10, 13 i 14) oraz tyrozinę w pozycji 10. Wiadomo, iż to właśnie te reszty odpowiadają za formowanie się złogów amyloidowych. Zastosowana przeze mnie metoda ilościowego zliczania konformacji liganda okazała się skuteczna w demonstracji działania trygoneliny, co daje szansę na użycie jej w badaniach kolejnych ligandów mających potencjalne działanie terapeutyczne. Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania teoretyczne potwierdzają potencjalną możliwość zastosowania trygoneliny jako czynnika przeciwdziałającego tworzeniu się złogów amyloidowych. Jednocześnie napisane przeze mnie skrypty do programu RASMOL AB pozwoliły na wyjaśnienie molekularnego mechanizmu przeciwdziałania przez trygonelinę tworzeniu się złogów amyloidowych.

### 3.2.2. Praca **H11**.

Nanotechnologia jest stosunkowo młodą dziedziną nauki o dużym potencjale rozwojowym. Jednakże, ciągle stosunkowo mało wiemy o szkodliwości materiałów „nano” na organizm człowieka [26,27]. Publikacja **H11** próbuje odpowiedzieć na to pytanie. W tym celu zostało wybrane 6 reprezentacyjnych białek wchodzących w skład osocza krwi:  $\alpha$ 1-antytrypsyna, albumina, ceruloplazmina, laktoferyna, lizozym oraz transferyna. Wybrane białka posiadają

znane struktury, zdeponowane w bazie PDB. Cząsteczka fulerenu C<sub>60</sub> została wybrana jako reprezentant cząsteczek „nano”. Następnie zaprojektowałem warunki dokowania, które zostało wykonane przez dr Magdalenę Witt. Dokowanie zostało wykonane programem AUTODOCK dla każdego z wybranych modeli białek. Zadeklarowana przestrzeń dokowania obejmowała cały model białka. Najbardziej prawdopodobne kompleksy białko - fuleren (posiadające największą populację oraz najniższą energię oddziaływania), zostały wybrane do dalszej analizy. Większość znalezionych miejsc oddziaływania ma potwierdzenie eksperymentalne, jako istotne dla funkcjonowania wybranych białek. Z tego względu niezbędne było dodatkowe oszacowanie siły wiązania fulerenu. W tym celu umieściłem najbardziej prawdopodobne kompleksy białko - fuleren w pudle wody odpowiednio dużym by można było wykonać symulacje Jarzyńskiego zgodnie z równaniem 4, [28].

$$e^{-\beta\Delta F} = e^{-\beta W}$$

Równanie 4. Równanie Jarzyńskiego,  $\Delta F$  - zmiana energii swobodnej,  $W$  - siła potrzebna do wyciągnięcia liganda z białka liczona jako średnia po wszystkich trajektoriach,  $\beta=1/RT$ .

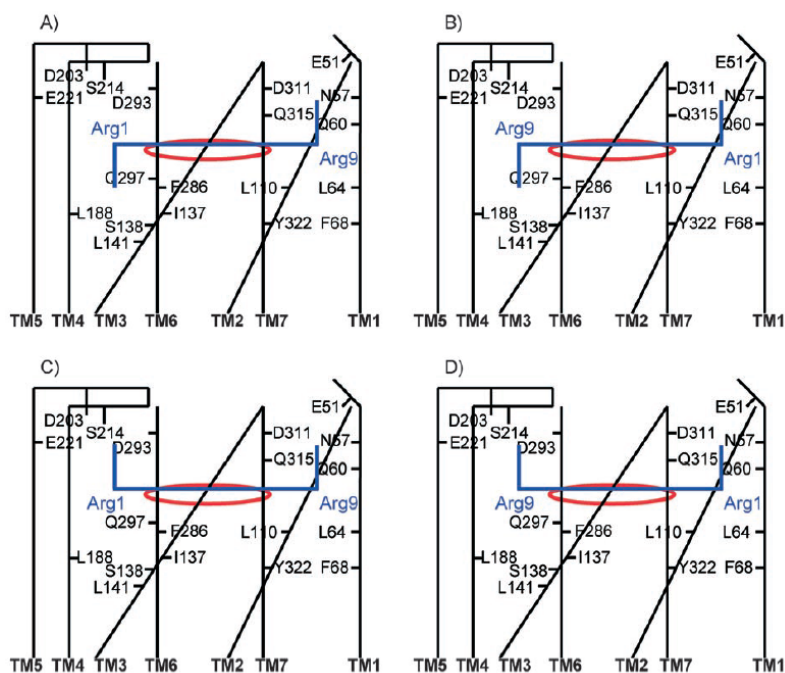
By uzyskać wiarygodny wynik przy użyciu symulacji Jarzyńskiego, należy ją przeprowadzić kilkakrotnie a następnie wyciągnąć średnią. Wykres z każdej przeprowadzonej symulacji został przedstawiony na Rys. 7 w publikacji **H11** a otrzymane wyniki zebrane w tabeli 1. Okazało się, że symulacje Jarzyńskiego są zbieżne z wynikami otrzymanymi za pomocą programu AUTODOCK jedynie w przypadku, gdy ligand znajdował się na powierzchni białka. W przypadkach gdy był zagłębiony, wyniki nie były spójne. Można to wytłumaczyć niedoskonałością pola siłowego zaimplementowanego w programie AUTODOCK. Otrzymane wyniki pokazały, iż fuleren nie wiąże się mocno z wybranymi do symulacji białkami. Obliczone zmiany energii swobodnej po związaniu liganda wynoszą w granicach 10-40 kcal/mol. Jednakże przy znacznym stężeniu fuleren może wykazywać właściwości toksyczne dla człowieka. Ze względu na kształt fulerenu możliwe są wszystkie trzy mechanizmy inhibicji białek: kompetycyjna, niekompetycyjna i allosteryczna. Podsumowując, wykonane przeze mnie symulacje pozwoliły na częściową walidację pola siłowego zaimplementowanego w programie AUTODOCK w celu zastosowania do badania powinowactwa do białek nano-cząstek fulerenu. Z pewnymi obostrzeniami można je stosować do badania oddziaływań białko – fuleren. Jednakże w celu uzyskania wiarygodnych wyników niezbędne jest użyciu bardziej zaawansowanych pól siłowych.

### 3.3.0. Badanie procesu aktywacji białka wymuszonego aktywatorem.

Badanie samorzutnych zmian konformacyjnych białek przy użyciu dynamiki molekularnej wymaga sporej mocy obliczeniowej, głównie z uwagi na fakt szybkości tych zmian. By ten czas zredukować niezbędne jest wprowadzenie do symulowanego układu molekularnego czynnika aktywującego, który przesunie równowagę w pożądaną stronę (formy aktywnej lub nieaktywnej). Takim czynnikiem aktywującym/dezaktywującym najczęściej jest mała cząsteczka, która umiejscowiona w centrum aktywnym wywołuje odpowiedni efekt. Innymi czynnikami przesuwanymi równowagę pomiędzy odpowiednimi formami białek mogą być specyficzne mutacje punktowe oraz temperatura. Ten typ badań opisałem w pracach **H2** oraz **H10**.

#### 3.3.1. Praca **H2**.

Receptory sprzężone z białkami G (ang. *G-protein-coupled-receptor*) są jednymi z najbardziej istotnych białek błonowych. Regulują odpowiedzi komórkowe w odpowiedzi na hormony, neurotransmitery, fotony, cząsteczki zapachowe i wiele innych sygnałów. O ich istotności świadczy fakt, iż ok. 40% znanych leków działa poprzez te receptory [29]. GPCR posiadają charakterystyczną budowę. Składają się z 7  $\alpha$ -helis umieszczonych w błonie komórkowej, połączonych ze sobą pętlami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi. Pomimo dużych sukcesów w rozwiązaniu struktur eksperymentalnych zarówno w formie nieaktywnej jak i aktywowanej, mechanizm aktywacji GPCR ciągle nie został do końca poznany [30]. W swojej pracy **H2** badałem mechanizm aktywacji receptora bradykininy (B2R). Z uwagi na brak odpowiedniej struktury badanego receptora, wykonałem jego modelowanie homologiczne w oparciu o strukturę rodopsyny formie nieaktywnej. W kolejnym kroku umieściłem model aktywatora (który zbudowałem w oparciu o więzy uzyskane z eksperymentu NMR wykonanego przez grupę prof. Clemensa Glaubitza) wewnątrz kieszeni receptora na cztery różne sposoby. (Patrz Rys. 1 w publikacji **H2** oraz Rysunek 7)

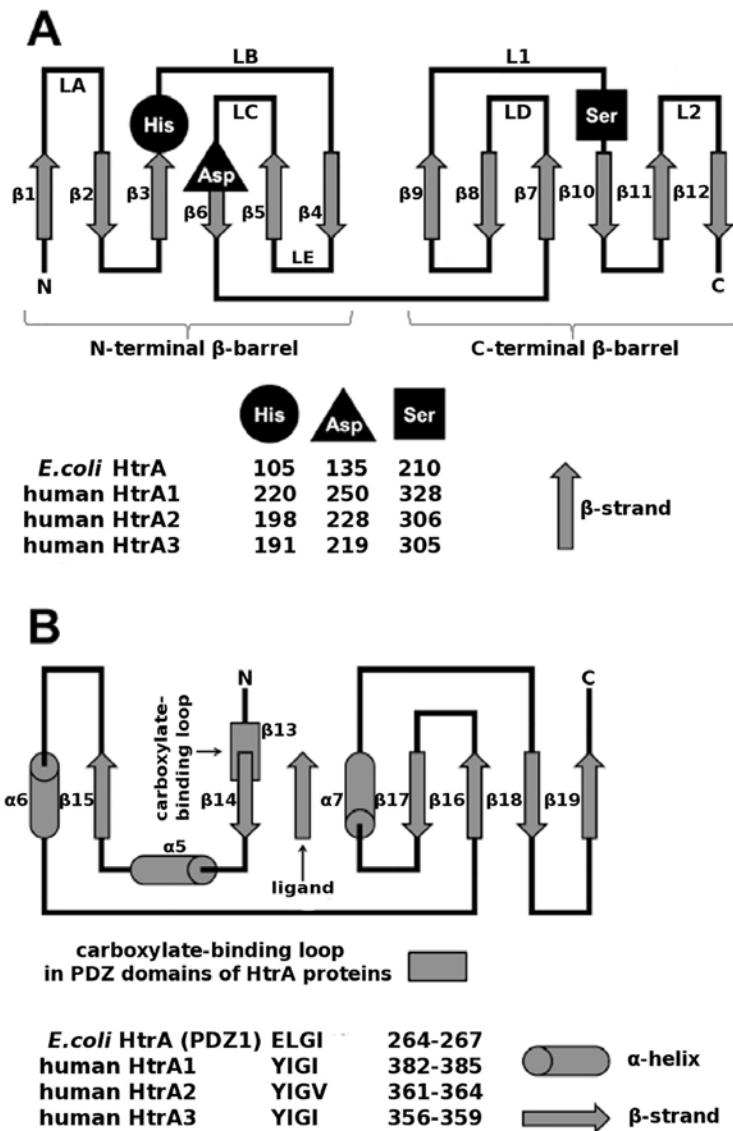


Rysunek 7. Schematyczna reprezentacja symulowanych układów receptora bradykininy B2 z zadokowanym hormonem. Transmembranowe odcinki helikalne receptora zostały oznaczone jako TM1 - TM7.

Tak zbudowane kompleksy umieściłem w modelu błony lipidowej a następnie wykonałem symulacje dynamiki molekularnej. Wyniki symulacji porównałem ze strukturą częściowo aktywowanej rodopsyny. Celem przeprowadzonych symulacji była odpowiedź na pytanie, która konformacja B2R - bradykinina prowadzi do aktywacji receptora. Tylko jedna symulacja prowadziła do modelu spójnego konformacyjnie ze strukturą aktywowanej rodopsyny (kompleks D, patrz Rysunek 7). Na jej podstawie udało mi się zidentyfikować reszty aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie receptor - aktywator. Dodatkowo udało się wysunąć hipotezę przełącznika tryptofanowego odpowiedzialnego za ustalenie się równowagi konformacyjnej pomiędzy formą nieaktywną a aktywowaną receptora B2. Podsumowując, zidentyfikowałem konformację bradykininy wewnątrz receptora B2, która prowadzi do jego aktywacji. Zbudowany model pozwolił na identyfikację reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za oddziaływanie białko – ligand a także specyficznych zmian konformacyjnych receptora B2 zachodzących podczas jego aktywacji.

### 3.3.2. Rodzina białek HtrA.

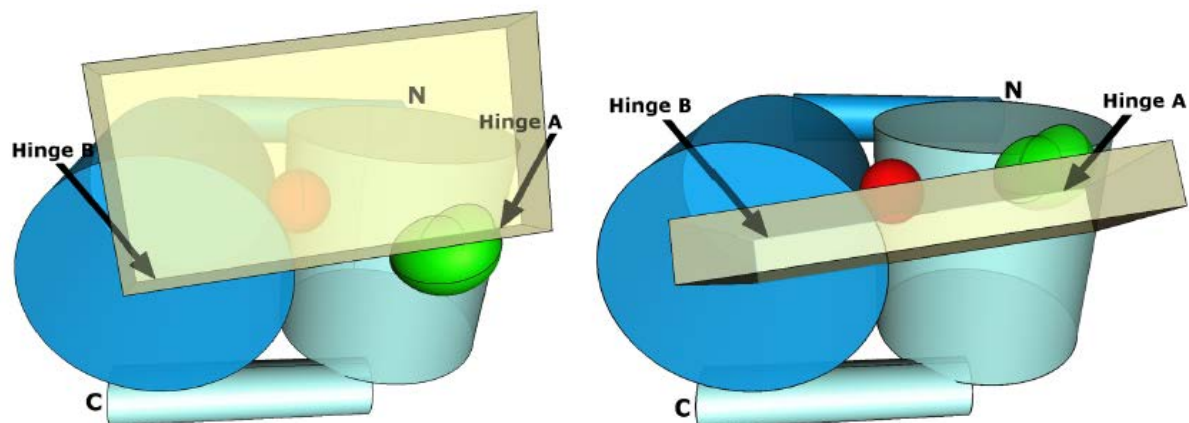
Białka z rodziny HtrA (ang. *High Temperature Requirement A*) należą do proteaz serynowych i występują w niemalże wszystkich znanych organizmach, prokariotycznych i eukariotycznych. Ich główną funkcją jest ochrona organizmu przed niewłaściwie sfałdowanymi białkami oraz potencjalnie szkodliwymi peptydami, głównie poprzez ich degradację. Drugą znaną funkcją białek HtrA jest ich działanie jako chaperony, fałdując niewłaściwie zwinięte białka do ich konformacji natywnej. Obydwie funkcje białek HtrA odbywają się bez udziału ATP a aktywacja białka następuje pod wpływem czynnika sygnałowego, którym może być niewłaściwie zwinięte białko lub podwyższona temperatura [31]. HtrA zbudowane są z domeny proteazowej oraz jednej lub dwóch domen PDZ [32]. Domena proteazowa (której struktura występuje w chymotrypsynie) składa się z dwóch  $\beta$  beczek położonych względem siebie prostopadle, pomiędzy którymi znajduje się triada katalityczna (H,D,S). Domena PDZ (jedna lub dwie) następuje po C-terminalnej  $\beta$  beczce i składa się z 4-5  $\beta$  kartek oraz 1 lub dwóch  $\alpha$  helis. Główną rolą domeny PDZ jest rozpoznawanie sygnałowych sekwencji aminokwasowych [33,34] (patrz Rysunek 8 oraz 9).



Rysunek 8. Topologia białek z rodziny HtrA. (A) Domena proteazowa. Triada katalityczna His, Asp, Ser oraz pętle sygnałowe są opisane zgodnie z nomenklaturą stosowaną w chymotrypsynie. (B) Domena PDZ.

Aktywacja białka ma mechanizm allosteryczny, gdzie następuje przekazywanie sygnału pomiędzy pętlami LA, L1, L2, L3 oraz LD z jednoczesnym otwarciem się domeny PDZ. Podczas procesu aktywacji obydwie  $\beta$  beczki domeny protezowej nie zmieniają swojej konformacji, wykonując jedynie nieznaczne ruchy w celu właściwego ustawienia się reszt z triady katalitycznej [35,36] (patrz Rysunek 9).





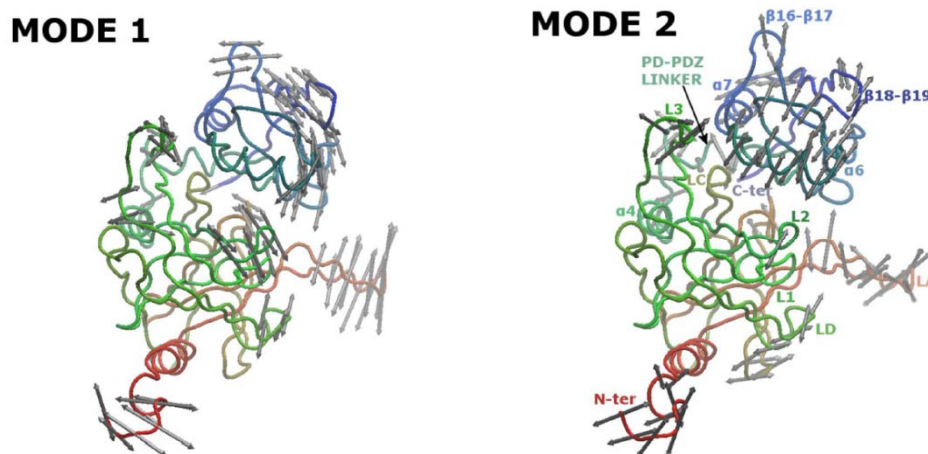
Rysunek 9. Schemat budowy oraz aktywacji (forma nieaktywna - lewa, aktywowana - prawa strona rysunku) białek z rodziny HtrA. N-terminalna  $\beta$  beczka została zaznaczona kolorem niebieskim, C-terminalna kolorem cyjan. Miejsce triady katalitycznej zostało zaznaczone czerwoną kulką a pętli L3 - zieloną. Słonkowy blok reprezentuje domenę(y) PDZ.

Białka z rodziny HtrA występują w formie oligomerów. W przypadku HtrA<sub>E.coli</sub> w formie nieaktywnej występuje heksamer, natomiast w formie aktywnej mogą to być następujące formy oligomeryczne: 3, 6, 12 i 24. Uważa się, iż wyższe formy oligomeryczne biorą udział w aktywności chaperonowej białka [37]. Natomiast HtrA2<sub>human</sub> zarówno w formie aktywnej jak i nieaktywnej jest trimerem. Ludzkie białko HtrA2<sub>human</sub> jest protezą, która odpowiada na kontrolę jakości białek mitochondrialnych. Białko to uczestniczy także w apoptozie komórki a w konsekwencji w ontogenezie. Mutacje w genie kodującym HtrA2 są kojarzone z chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak choroba Alzheimera i Parkinsona. Dlatego też dokładne poznanie mechanizmu działania tego białka może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne dla osób z chorobami nowotworowymi czy neurodegeneracyjnymi [38,39].

### 3.3.2.1. Praca **H10**.

W swojej pracy **H10** badałem molekularny mechanizm aktywacji białka HtrA2<sub>human</sub>. Ze względu na fakt dostępności jedynie formy nieaktywnej białka (struktura zdeponowana pod kodem PDB 1LCY) niezbędne było wymodelowanie białka w formie aktywnej. W tym celu użyłem trzech technik obliczeniowych. 1) symulacja dynamiki molekularnej formy nieaktywnej z umieszczonym peptydem aktywującym w kieszeni wiążącej; 2) symulacja dynamiki molekularnej mutantów HtrA2<sub>human</sub> wykazujących zwiększoną aktywność proteolityczną; 3) symulacja dynamiki molekularnej z więzami pochodzącymi

z eksperymentu FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). W przypadku technik 1 oraz 2 w celu najlepszego odwzorowania rzeczywistych parametrów badanego układu, zbudowane modele HtrA2<sub>human</sub> umieściłem w pudle wody o wymiarach ok. 125x125x95 Å. W przypadku techniki 3 nie było to konieczne ze względu na dużą ilość więzów, które uniemożliwiły zniekształcenie struktury białka. W tym przypadku do symulacji otoczenia wystarczył uogólniony model Borna. By zaobserwować zmiany konformacyjne białka, a zwłaszcza zmiany wywołane przez mutację punktową niezbędny jest dosyć długi czas symulacji. We wszystkich układach symulowanych technikami 1 oraz 2, czas symulacji wynosił 50 ns. W przypadku symulacji z więzami (technika 3), wystarczył znacznie krótszy czas symulacji - 50 ps. Dzięki przeprowadzonej analizie czynnikowej ustaliłem, iż za aktywację białka HtrA2 odpowiadają dwa główne ruchy domeny PDZ. Pierwszy ruch polega na obrocie domeny PDZ wokół wirtualnej osi znajdującej się pomiędzy  $\alpha$ 4PD a  $\alpha$ 7PDZ oraz translacji przy  $\alpha$ 5PDZ. Zidentyfikowane ruchy zostały pokazane na Rysunku 10 oraz materiałach uzupełniających do publikacji **H10**.



Rysunek 10. Dominujące ruchy występujące podczas symulacji dynamiki molekularnej, zidentyfikowane przy użyciu analizy czynnikowej (PCA). Mode1 – rotacja, Mode 2 – translacja domeny PDZ podczas aktywacji HtrA2

Dodatkowo udało mi się ustalić pozycję sygnałowej pętli L3 biorącej aktywny udział w tworzeniu tzw. klastrów sygnałowych pomiędzy pętlami L3-LD-L1-L2. Podsumowując, moim osiągnięciem naukowym była potwierdzona eksperymentalnie identyfikacja ruchów domeny PDZ oraz identyfikacja reszt klastru sygnałowego podczas procesu aktywacji białka.

### 3.4.0. Badanie wpływu mutacji punktowych na aktywność białka HtrA.

Zmiany konformacyjne zachodzące wewnątrz białek warunkują poprawne wykonywanie przez nie odpowiednich procesów biologicznych. Zmiany takie wiążą się z przebudowaniem wewnętrznej sieci oddziaływań. Wzmocnienie lub osłabienie specyficznego oddziaływania może przesunąć równowagę pomiędzy formą aktywną i nieaktywną białka. Ten typ badań prowadziłem w pracach **H4**, **H5** oraz **H9**.

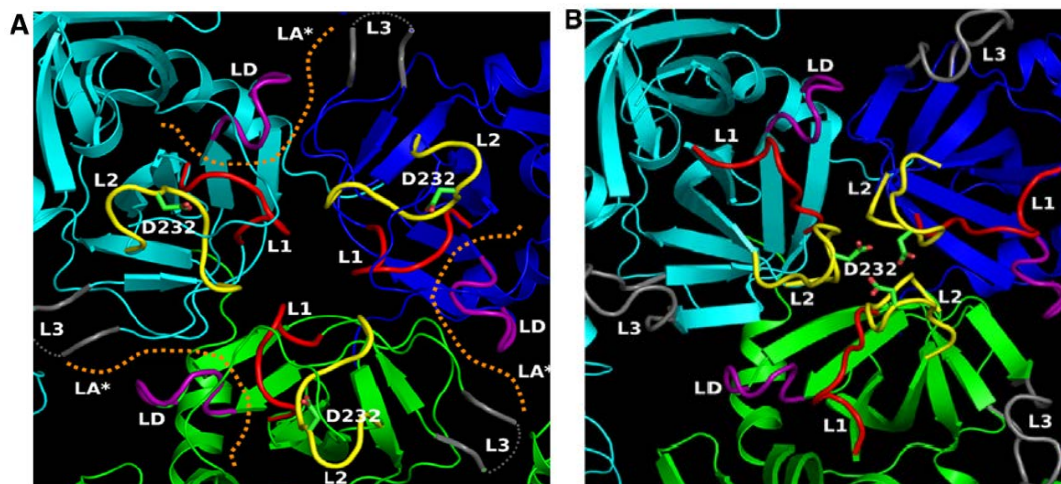
#### 3.4.1. Praca **H3**.

W pracy **H3** niezbędne było wyjaśnienie obserwowanych zmian w widmach reszt tryptofanu, podczas eksperymentów CD w zakresie widma 240-330 nm, podstawionych w kluczowych pozycjach pętli aktywacyjnych (L1 oraz L2). W tym celu zbudowałem dwa modele HtrA<sub>E.coli</sub> w formie nieaktywnej oraz aktywnej w oparciu o dostępne struktury eksperymentalne (1KY9 oraz 3OU0). Następnie wykonałem analizę strukturalną otoczenia oraz ekspozycji do rozpuszczalnika reszt w pozycjach 205, 228, 229 oraz 336. Wyniki modelowania molekularnego (potwierdzone widmami CD) pokazały, iż reszty aminokwasowe z pętli L2 są eksponowane do rozpuszczalnika natomiast reszta w pozycji 205 znajdująca się w pętli L1 jest zagłębiona w białku. By umożliwić prawidłowe działanie triady katalitycznej (a konkretnie S210) ruchy tego fragmentu białka nie mogą być zbyt duże, co pokazują zbudowane modele białka w formie nieaktywnej oraz aktywnej. W związku z tym podczas procesu aktywacji reszta w pozycji 205 nie zmienia otoczenia a co za tym idzie nie jest eksponowana do rozpuszczalnika.

Najlepiej eksponowaną do rozpuszczalnika (zarówno w formie aktywnej jak i nieaktywnej) jest reszta L229 z pętli L2. Podsumowując, zbudowane przeze mnie modele pozwoliły na dokładne wyjaśnienie zarejestrowanych widm CD a także dały podstawę do wyjaśnienia roli pętli L1 oraz L2 w mechanizmie aktywacji białka HtrA<sub>E.coli</sub>.

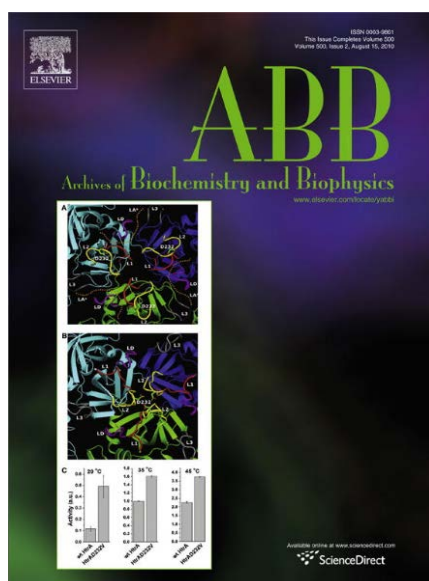
#### 3.4.2. Praca **H4**.

Badanie mechanizmu aktywacji białka HtrA<sub>E.coli</sub> a konkretnie roli pętli aktywacyjnych kontynuowałem w pracy **H4**. By zrozumieć dokładnie mechanizm przekazywania sygnału aktywacyjnego pomiędzy pętlami L1, L2 oraz LD wykonałem analizę strukturalną zbudowanego wcześniej modelu nieaktywnego oraz aktywnego białka HtrA<sub>E.coli</sub> (patrz Rys 1. w publikacji **H4**). Zbudowane przeze mnie modele pozwoliły na wyjaśnienie roli reszty w pozycji 232 w aktywności proteolitycznej białka HtrA<sub>E.coli</sub> (patrz Rys 4. w publikacji **H4** oraz Rysunek 11).



Rysunek 11. Wizualizacja zmian konformacyjnych zachodzących w pętach sygnałowych podczas procesu aktywacji białka HtrA<sub>E.coli</sub>. A – forma nieaktywna, B – forma aktywna.

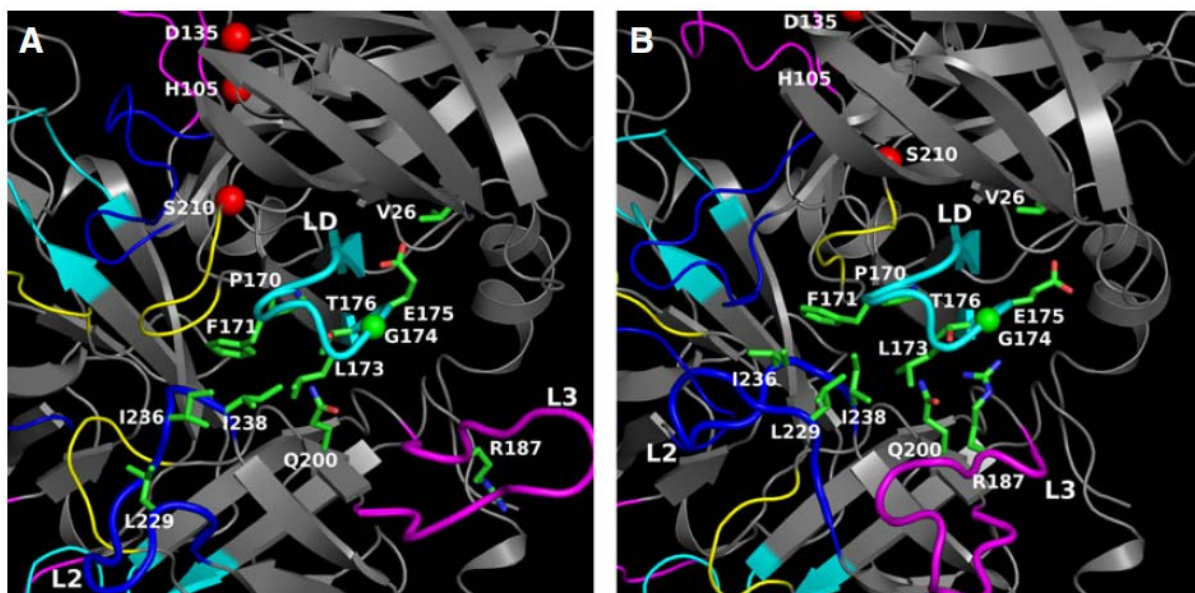
W formie nieaktywnej pętla L2 znajduje się pomiędzy pętlami L1 oraz L3. Podczas procesu aktywacji pętla L2 ze wszystkich podjednostek białka przesuwa się ku centrum trimeru, tworząc skomplikowaną sieć oddziaływań. Model komputerowy pokazał, iż w samym centrum tych oddziaływań znajduje się reszta w pozycji 232. Gdy w pozycji 232 znajdzie się reszta waliny, tworzy ona hydrofobowy klaster, który dobrze stabilizuje formę aktywną białka a co za tym idzie można zaobserwować wzrost aktywności proteolitycznej HtrA<sub>E.coli</sub>. Zaburzenie naturalnych hydrofobowych oddziaływań pętli L2 (mutacje w pozycji 229 oraz 238) powodowały kompletny brak aktywności proteolitycznej. Na modelach HtrA<sub>E.coli</sub> widać, iż ten fragment białka znajduje się stosunkowo daleko od triady katalitycznej, także nie wpływa na sposób wiązania liganda oraz nie zaburza samej triady katalitycznej. Podsumowując, dzięki analizie strukturalnej zbudowanych modeli, udało mi się wyjaśnić molekularny mechanizm stojący za wprowadzonymi mutacjami punktowymi, efektami których był wzrost lub spadek a także brak zmian aktywności proteolitycznej HtrA<sub>E.coli</sub>. Współpraca metod teoretycznych oraz eksperymentalnych w przypadku tej pracy zaowocowała wybraniem jej przez edytora Archives of Biochemistry and Biophysics na motyw przewodni okładki czasopisma (patrz Rysunek 12).



Rysunek 12. Okładka czasopisma Archives of Biochemistry and Biophysics zawierająca rysunki z pracy **H4**.

### 3.4.3. Praca **H9**.

W przeciwieństwie do pętli L1 czy L2, konformacja pętli LD podczas procesu aktywacji pozostaje niezmieniona (patrz Rysunek 11 oraz Rys.1 w pracy **H9**). Poznanie roli reszt aminokwasowych tworzących pętle LD, podczas procesu aktywacji białka HtrA<sub>E.coli</sub>, było przedmiotem pracy **H9**. Pętla LD jest położona na styku dwóch domen protezowych. Tworzy ona sieć kontaktów z pętlami L1, L2 oraz L3. W przeciwieństwie do pętli LD, której konformacja nie ulega zmianie, podczas procesu aktywacji białka pętle L1, L2 oraz L3 drastycznie zmieniają swoje położenie. Wprowadzone mutacje punktowe: P170G, F171A, L173A, E175A oraz E175L prowadziły do zmniejszenia się aktywności proteolitycznej białka. Zbudowany przez mnie model komputerowy pozwolił na postawienie hipotezy, iż pętla LD pełni rolę rusztowania, które pozwala na utrzymanie właściwej konformacji pętli L2. Podczas procesu aktywacji i otwierania się domen PDZ pętla L3 przekazuje sygnał do pętli LD a ta poprzez sieć oddziaływań hydrofobowych przekazuje go pętli L2 jednocześnie utrzymując ją w konformacji umożliwiającej prawidłowe działanie triady katalitycznej (patrz Rysunki 11 oraz 13 a także Rys. 1 w pracy **H9**).



Rysunek 13. Nieaktywna (A) oraz aktywna (B) forma białka HtrA<sub>E.coli</sub>. Pętla LD została zaznaczona kolorem jasnoniebieskim. Reszty aminokwasowe należące do triady katalitycznej zostały zaznaczone czerwonymi kulkami.

Zaburzenie oddziaływań pętli LD z pętlami L2 oraz L3 opisanych w pracy **H9**, poprzez wprowadzenie mutantów alaninowych prowadzi do obniżenia aktywności proteolitycznej białka. Na potwierdzenie wysuniętej hipotezy rusztowania świadczy fakt, iż mutant P170G także wykazywał obniżenie aktywności proteolitycznej. Wprowadzenie reszty glicyny zamiast proliny zwiększyło swobodę konformacyjną pętli LD a co za tym idzie, nie mogła ona stanowić dobrego rusztowania układającego pętlę L2 w pozycji, która umożliwiła by triadzie katalitycznej prawidłowe funkcjonowanie. Podsumowując, zbudowane przeze mnie modele aktywnej oraz nieaktywnej formy białka HtrA<sub>E.coli</sub> pozwoliły na dokładne wyjaśnienie molekularnego mechanizmu allosterycznego przekazywania sygnału pomiędzy pętlami L1, L2, L3, LD oraz LA a także wysunięcie hipotezy, iż pętla LD stanowi rusztowanie dla utrzymania właściwej konformacji przez pętlę L2.

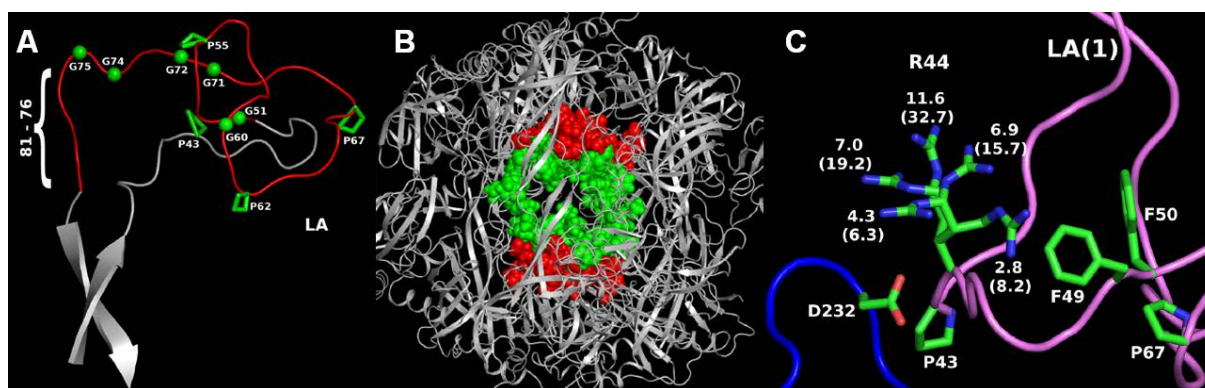
### 3.5.0. Budowa brakujących fragmentów białka.

#### 2.5.1. Praca **H5**.

W pracach **H3**, **H4** oraz **H9** zajmowałem się badaniem molekularnego mechanizmu allosterycznego przekazywania sygnału pomiędzy pętlami L1, L2 oraz LD podczas procesu aktywacji białka HtrA<sub>E.coli</sub>. Jednakże duży element układanki ciągle pozostał nieznan. Do dnia dzisiejszego struktura eksperymentalna pętli LA pozostaje nieznaną. W pracy **H5**

podejmuję próbę rozwikłania tego problemu. Wiadomo, iż pętla LA pełni istotną rolę w allosterycznym przekazywaniu sygnału utrzymując pętle L1 oraz L2 w konformacji nieaktywnej. Dodatkowo pętla LA utrzymuje nieaktywną formę białka HtrA, stabilizując jego heksamer. Ostatnią istotną funkcją pętli LA jest blokowanie dostępu do triady katalitycznej. Wiadomo, iż delecja pętli LA powoduje wzrost aktywności proteolitycznej HtrA, natomiast delecja fragmentów 34-39 i 60-68 powoduje spadek aktywności proteolitycznej a delecja fragmentów 34-37 i 80-83 nie wpływa na aktywność proteolityczną HtrA<sub>E.coli</sub> [40].

Model pętli LA zbudowałem przy użyciu pola siłowego UNRES. Jako wstępne kryterium selekcji modelu wykorzystałem potwierdzony fakt, iż pętla musiała pasować do wnętrza białka oraz posiadać mostek disiarczkowy pomiędzy resztami S57 a S69. W kolejnym kroku zwinięty fragment pętli dobudowałem do struktury eksperymentalnej z uwzględnieniem pozycji wszystkich podjednostek heksameru. Otrzymany przeze mnie model pozwolił na dokładną identyfikację reszt aminokwasowych tworzących hydrofobowy klaster stabilizujący nieaktywną formę białka (patrz Rysunek 14B oraz Rys. 2 w pracy **H5**). Klaster ten był postulowany w publikacji opisującej rozwiązana strukturę HtrA<sub>E.coli</sub>, [33], jednakże nie był on widoczny w kryształach. Zaburzenie interakcji tegoż klastra powoduje wzrost aktywności proteolitycznej białka HtrA. Mój model pokazuje oddziaływania pomiędzy resztami fenyloalaniny w pozycjach 46, 49, 50, 63 oraz 68. Ze względu na swoje położenie istotne są także reszty: Pro43, Arg44, Gln47 oraz Gly70. Destabilizacja zwłaszcza oddziaływań hydrofobowych tworzących się pomiędzy resztami fenyloalaniny prowadzi do potwierdzonego eksperymentalnie wzrostu aktywności proteolitycznej białka. Jednakże najbardziej interesujący przypadek wystąpił w mutancie R44A. Ze względu na jego hiperaktywność, grupie prof. Skórko-Głonek nie udało się go oczyścić. Tak więc pytanie brzmiało, dlaczego reszta w pozycji 44 jest tak ważna. Przeprowadzona przeze mnie analiza rotametryczna pokazała, iż R44 stabilizując nieaktywną formę HtrA<sub>E.coli</sub> może tworzyć dwa typy oddziaływań, kation –  $\pi$  z F49 oraz mostek solny z D232 (patrz Rysunek 14C).



Rysunek 14. A – zbudowany przeze mnie model pętli LA, B – model pętli LA wbudowany w strukturę nieaktywnego heksameru HtrA<sub>E.coli</sub> wraz z pokazaniem oddziaływań stabilizujących nieaktywną formę białka, C – analiza rotametrów R44 wraz z pokazaniem oddziaływań stabilizujących nieaktywną formę białka oraz prawdopodobieństw wystąpienia zidentyfikowanych konformacji.

Podsumowując, dzięki zbudowanemu przeze mnie modelowi udało się dokładnie zidentyfikować oraz pokazać molekularny mechanizm działania reszt aminokwasowych pętli LA uczestniczących w stabilizacji nieaktywnej formy białka HtrA<sub>E.coli</sub>.

### 3.6.0. Badanie oligomeryzacji białek z rodziny HtrA.

Jak wspomniałem w rozdziale 3.3.2. białka z rodziny HtrA występują w postaci oligomerów. W przypadku HtrA<sub>E.coli</sub> w formie nieaktywnej występuje jako heksamer, natomiast w formie aktywnej mogą to być następujące formy oligomeryczne: 3, 6, 12 i 24. Uważa się, iż wyższe formy oligomeryczne biorą udział w aktywności chaperonowej białka [37].

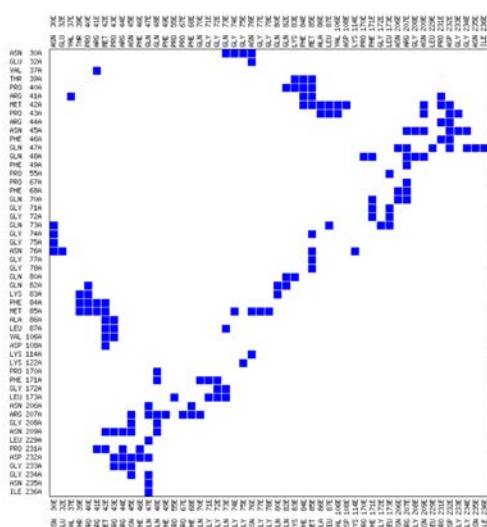
### 3.6.1. Praca **H12**.

*Stenotrophomonas maltophilia* odgrywa coraz większą rolę w patogenezie zakażeń człowieka, mimo iż jest zaliczany do grupy drobnoustrojów oportunistycznych. Bakteria ta jest w stanie przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiskowych a co za tym idzie także w organizmie człowieka. *S. maltophilia* wykazuje naturalną oporność na większość antybiotyków, co przekłada się na wysoką śmiertelność (ok. 40%) pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym [41]. Jednym z czynników pozwalającym tej bakterii na przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych jest kontrola białek zapewniona przez protezę HtrA.

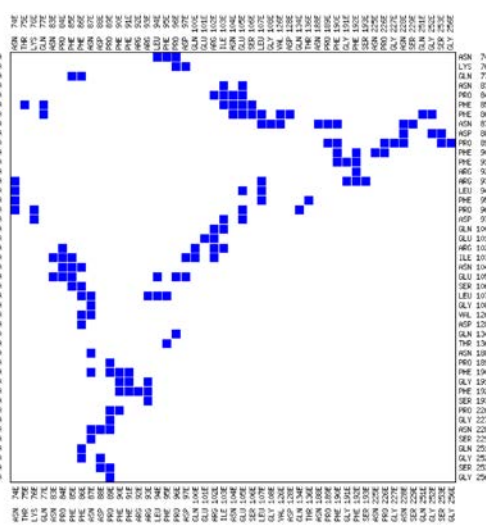


W pracy **H12** opisuję badania polegające na porównaniu działania białek HtrA<sub>S.M.</sub> oraz HtrA<sub>E.coli</sub>. Badania eksperymentalne pokazały, iż heksamer HtrA<sub>S.M.</sub> wykazuje znacznie mniejszą stabilność niż HtrA<sub>E.coli</sub>. Oba białka wykazały także różnicę w powinowactwie wiązanych sekwencji białkowych. By rozwiązać ten problem użyłem zbudowanych wcześniej modeli formy aktywnej oraz nieaktywnej białka HtrA<sub>E.coli</sub>. Ze względu na brak struktur eksperymentalnych HtrA<sub>S.M.</sub> modele tych białek zbudowałem na bazie HtrA<sub>E.coli</sub> przy użyciu technik modelowania porównawczego. Następnie wykonałem analizę porównawczą nowo zbudowanych modeli zarówno w formie aktywnej jak i nieaktywnej. Okazało się, iż w kluczowych miejscach kieszeni S1 występują znaczne różnice reszt aminokwasowych potencjalnie rozpoznawanych specyficznych sekwencji białkowych. Trzy najważniejsze różnice to: HtrA<sub>E.coli</sub> - R207, I228 oraz A230; HtrA<sub>S.M.</sub> - P226, S247 oraz N249. Znalezione różnice reszt oddziałujących z wiązanimi sekwencjami aminokwasowymi tłumaczą różną specyficzność badanych białek. Kolejnym problemem do rozwiązania była obserwowana różnica w stabilności nieaktywnej formy heksametycznej białka HtrA w obu badanych bakteriach. Analiza ilościowa kontaktów międzydomenowych nie przyniosła rozstrzygnięcia. Ten fakt nie jest zaskakujący, gdyż wszystkie modele opierały się na strukturach białek pochodzących od *E.coli*. Widać to dokładnie na Rysunku 15 oraz w materiałach uzupełniających do pracy **H12**. Jednakże przy analizie typów oddziaływań okazało się iż HtrA<sub>E.coli</sub> posiada więcej oddziaływań polarnych, które są znacznie silniejsze niż oddziaływania niepolarne, występujące w modelu HtrA<sub>S.M.</sub>.

HtrA<sub>E.coli</sub>



HtrA<sub>S.M.</sub>



Rysunek 15. Przykładowa mapa kontaktów międzydomenowych dla analizowanych modeli białek HtrA.

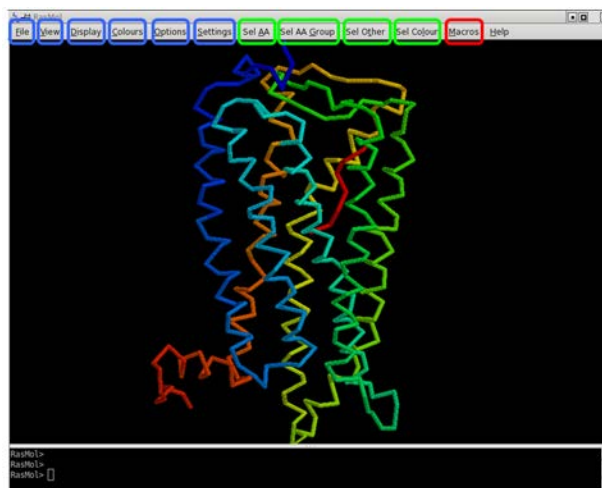
Podsumowując, moim osiągnięciem naukowym było wyjaśnienie molekularnych różnic powodujących specyficzną rozpoznawanych sekwencji aminokwasowych w obydwu badanych białkach HtrA<sub>S.M.</sub> oraz HtrA<sub>E.coli</sub> oraz wyjaśnienie różnic w stabilności nieaktywnej formy heksametrycznej obu białek.

### 3.7.0. Wizualizacja danych biomolekularnych.

Wizualizacja cząsteczek jest jednym z podstawowych narzędzi do analizy danych biomolekularnych. Dlatego posiadanie programu, który będzie to robił w efektywny sposób pozwala na dokładną analizę otrzymanych wyników.

#### 3.7.1. Praca **H7**.

Jednym z najstarszych programów dedykowanych wizualizacji molekularnej jest RASMOL, którego pierwsza wersja powstała ponad 20 lat temu. Ponieważ program został napisany w języku ANSI C, można go uruchomić nawet na komputerach posiadających małą moc obliczeniową a jednocześnie będzie możliwe wyświetlenie dużej liczby atomów. Z uwagi na fakt prostoty programu nie użyto w nim żadnych skomplikowanych bibliotek graficznych, w konsekwencji program nie jest w stanie wyświetlić tak efektownej grafiki jak nowoczesne programy używające OPEN GL czy DirectX. Celem pracy opisanej w publikacji **H7** było dodanie dodatkowych funkcji do programu RASMOL czyniąc z niego prosty w obsłudze a jednocześnie zaawansowany funkcyjnie program do analizy danych biomolekularnych. Na Rysunku 16 zostało przedstawione okno programu. W pasku obsługi (u góry ekranu) kolorem niebieskim oznaczyłem opcje programu, które są dostępne w jego oryginalnej wersji. Kolorem zielonym oznaczyłem opcje dodane w programie a kolorem czerwonym najbardziej użyteczną opcję, czyli makra.



Rysunek 16. Okno programu RASMOL AB z przykładowym białkiem. W pasku obsługi (u góry ekranu), kolorem niebieskim zostały zaznaczone oryginalne opcje programu, kolorem zielonym opcje dodane a kolorem czerwonym opcja programowalnych przycisków.

Makra, czyli skrypty poleceń do programów są dostępne we wielu programach do analizy danych biomolekularnych. Jednakże, tylko w programie RASMOL AB są one widoczne za pomocą przycisków, które tworzą się automatycznie. Użytkownik może łatwo zaprogramować czynności, które chce wykonać na swoim modelu a następnie mieć do nich dostęp w postaci przycisku do kliknięcia. Podsumowując, wprowadzone przeze mnie modyfikacje do programu RASMOL uczyniły z prostego programu do wizualizacji zaawansowane a jednocześnie bardzo proste w obsłudze narzędzie do analizy danych biomolekularnych. Z programu tego w różnych wersjach (częściowo deweloperskich a później finalnych) korzystałem i nadal korzystam przy prowadzonych przez siebie badaniach. Program jest dostępny na zasadzie otwartej licencji na stronie projektu:

<http://etoh.chem.univ.gda.pl/rasmol/>

#### 4.0.0. Podsumowanie.

Dynamiczny rozwój technologii komputerowych sprawia, iż staje się możliwe symulowanie coraz bardziej skomplikowanych układów molekularnych. Nowe technologie sprawiają, iż ciągle przesuwamy granicę wielkości i stopnia skomplikowania symulowanych modeli a zastosowane funkcje są obarczone coraz to mniejszymi błędami. Jednakże same badania teoretyczne są niekompletne bez eksperymentalnego potwierdzenia wysuwanych hipotez. Ze względu na stopień skomplikowania badań, niezbędna jest współpraca wielu specjalistów w swojej dziedzinie. Tylko i wyłącznie taka współpraca pozwala na dogłębne zrozumienie badanego obiektu a jednocześnie sprawia, że badania są w pełni wiarygodne.

Moim wkładem oraz osiągnięciem naukowym w przedstawionych do oceny badaniach było wykorzystanie technik modelowania molekularnego oraz empirycznych pól siłowych do wyjaśnienia oraz przewidywania obserwowanych eksperymentalnie efektów.

1. Przewidziałem / wyjaśniłem wpływ mutacji punktowych na aktywność proteolityczną białka HtrA<sub>E.coli</sub>.
2. Przy użyciu moich modeli wyjaśniłem molekularne podstawy mechanizmu aktywacji dwóch białek z rodziny HtrA (HtrA<sub>E.coli</sub> and HtrA<sub>human</sub>).
3. Zidentyfikowałem reszty aminokwasowe odpowiadające za oddziaływanie białko – ligand a także konformację liganda wewnątrz kieszeni wiążącej białko (konformacja bradykininy zdolna do aktywacji B2R, konformacje inhibitorów peptydowych białek NEP i APN oraz w pewnym stopniu S100B).
4. Zidentyfikowałem potencjalne miejsca wiązania nano-cząstek do wybranych białek osocza (te badania ciągle czekają na eksperymentalne potwierdzenie wyników).
5. Wyjaśniłem molekularne podstawy obserwowanych eksperymentalnie różnic w stabilności oligomerów HtrA<sub>E.coli</sub> and HtrA<sub>S.M.</sub>.
6. Wprowadziłem zmiany w kodzie programu RASMOL czyniąc z niego zaawansowane narzędzie do analizy struktur biomolekularnych.

5.0.0. Opis pracy nieuwzględnionej w cyklu habilitacyjnym.

5.1.0. Czas przed doktoratem.

Kiedy zaczynałem swoją pracę naukową w roku 2000 ukazała się pierwsza struktura krystaliczna Receptora Sprzężonego z Białkiem G (ang. GPCR) a konkretnie rodopsyny wołowej w formie nieaktywnej. Można powiedzieć, że wraz z ukazaniem się pracy Palczewskiego i współpracowników dokonał się kamień milowy w dziedzinie projektowania leków oraz badaniu mechanizmów aktywacji GPCR [42]. Jest to o tyle istotne, gdyż ok. 40% znanych leków działa poprzez te receptory [29]. Wiadomo, że wszystkie GPCR mają bardzo podobną topologię, co umożliwia modelowanie pozostałych receptorów przy użyciu metod wykorzystujących homologię sekwencyjną. Jest to o tyle ułatwione, iż w środku każdej helisy znajduje się tak zwana reszta „50” która jest bardzo dobrze zachowana ewolucyjnie [43]. Po jej identyfikacji wystarczyło wykonanie mutacji punktowych by uzyskać model badanego receptora. Sprawą trudniejszą stanowiły i dalej stanowią pętle łączące helisy. W tym przypadku niezbędne jest użycie pola siłowego w celu uzyskania wiarygodnego modelu.

Gdy dołączyłem do grupy prof. Ciarkowskiego zacząłem się zajmować modelowaniem molekularnym receptorów wazopresyny V1A oraz V2 a także receptora oksytocyny OT.

Moje badania polegały na budowie wspomnianych receptorów oraz wykonaniu procesu dokowania małych cząsteczek będących agonami lub antagonistami tychże receptorów. Tak powstałe kompleksy umieszczałem w modelu błony lipidowej a następnie wykonywałem symulacje dynamiki molekularnej. Proces budowania modeli błon lipidowych poznałem będąc na krótkim stażu w grupie Pani Prof. Marty Pasenkiewicz-Gieruli na UJ. Na zakończenie procesu identyfikowałem reszty aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie receptor - ligand. Moje badania zostały opisane w pracach **D1** i **D4** a także pracy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem prof. Jerzego Ciarkowskiego pod tytułem : „Modelowanie molekularne oddziaływań receptorów wazopresyny i oksytocyny z wybranymi antagonistami.” Pracę doktorską obroniłem w 2004 roku.

#### 5.1.0. Opis badań po doktoracie.

W 2004 roku, po doktoracie zostałem zatrudniony na Wydziale Chemii w Katedrze Chemii Teoretycznej, jako asystent. W tym czasie współpracowałem z grupami Prof. Chmurzyńskiego przy obliczaniu równowag heterokoniugacji w układach kwas - zasada (**P1**) oraz Prof. Wiczka przy badaniu procesów fluorescencji (**P2**). Kontynuowałem także prace nad GPCR pomagając w pracy **P3**. Po roku pracy na etacie asystenta rozpocząłem uczestnictwo w programie „Marrie Currie Host Fellowship” (2005-2008). Był to pobyt naprzemienny w dwóch instytucjach: Uniwersytet Johanna Wolfganga Goethego we Frankfurcie nad Menem w grupie Prof. Schwalbego oraz w CERM, Uniwersytet we Florencji w grupie Prof. Luchinata. Pobyt ten zaowocował dwiema publikacjami **H1** oraz **H2**. Po powrocie w roku 2008 rozpocząłem pracę na Uniwersytecie Gdańskim, jako administrator lokalnych zasobów informatycznych. Od października 2009 roku rozpocząłem pracę, jako adiunkt w Katedrze Chemii Teoretycznej na Wydziale Chemii UG. Praca ta trwa do dnia dzisiejszego. Po powrocie najwięcej czasu spędziłem na współpracy z grupami eksperymentalnymi wyjaśniając obserwowane efekty wzrostu/spadku aktywności lub powinowactwo ligandów do białek. Współpraca zaowocowała następującymi publikacjami **P09**, **P11**, **P19**, **P21** oraz **P22**. Dodatkowo uczestniczyłem w mniejszym stopniu w pracach nad białkiem HtrA (prace **P17** oraz **P18**). Brałem także czynny udział w rozwoju pola siłowego UNRES oraz eksperymencie zwijania białek CASP opracowując między innymi protokół optymalizacji modeli gruboziarnistych przy konwersji do pełnoatomowych. Współpraca zaowocowała następującymi publikacjami **P10**, **P12**, **P13**, **P20** oraz **P23**. Brałem także udział w projektach realizowanych na Politechnice Gdańskiej, których kierownikiem

był dr Maciej Bobrowski a dotyczyły one badań nad polimerami parylenu (prace **P07**, **P08** oraz **P16**) a także badań nad właściwościami cieczy jonowych (prace **P14** i **P15**).

#### 5.1.1. Czas po doktoracie, plany na przyszłość.

W chwili obecnej pracuję nad modelowaniem molekularnym oddziaływań cieczy jonowych z nano-cząstkami. Jest to projekt realizowany we współpracy z Politechniką Gdańską. Nawiązałem również współpracę z prof. Brice Korkmaz z Uniwersytetu w Turs. Współpraca dotyczy badań nad białkiem ProCatC. Ciągłe współpracuję z grupami eksperymentalnymi, kierowanymi przez prof. Elżbietę Jankowską, prof. Elżbietę Kamysz oraz prof. Adama Lesnera.

Jakiś czas temu rozpocząłem prace nad implementacją łańcuchowego modelu Markova (ang. Markov Chain Model) (MCM) do identyfikacji ścieżki zwijania białek. Przy użyciu MCM jest możliwa identyfikacja meta-stabilnych stanów przejściowych występujących podczas procesu fałdowania się białek. Jest to rozszerzenie trój-stanowego modelu zwijania się białek, zakładającego formę rozwiniętą, stan przejściowy oraz formę zwiniętą białka. MCM umożliwia pełen wgląd w struktury zidentyfikowane jako stan przejściowy.

Z uwagi na fakt, iż nie ma odpowiedniego programu komputerowego do tego zadania, projekt jest niezwykle wymagający i czasochłonny. Kluczową sprawą jest tu analiza skupień, którą trzeba wykonać dla zbioru kilku milionów konformacji. W tej chwili kod jest niemalże gotowy i trwają testy programu.

W czasie wykonywania przedstawionych do oceny badań miałem okazję i szczęście współpracowania z wieloma grupami eksperymentalnymi: prof. Claudio Luchinat, Uniwersytet we Florencji, Prof. Harald Schwalbe oraz Prof. Clemens Glaubitz JWGU we Frankfurcie, Prof. Grzegorz Dubin UJ, Prof. Elżbieta Kamysz, Prof. Adam Lesner, Prof. Elżbieta Jankowska, Prof. Tomasz Puzyn, Prof. Joanna Skórko-Głonek oraz prof. Barbara Lipińska Uniwersytet Gdański. Wiedza i doświadczenie tych osób oraz wielu innych uczyniły przedstawione do oceny badania kompletnymi i wiarygodnymi.

Chciałbym także podziękować prof. Adamowi Liwo oraz prof. Cezaremu Czaplewskiemu z Katedry Chemii Teoretycznej za pomoc i życzliwość.

Na koniec chciałbym podziękować Panu Profesorowi Jerzemu Ciarkowskiemu za jego opiekę, wiedzę i doświadczenie, które prowadziły mnie we wszystkich etapach mojej kariery naukowej.

## 6.0. Bibliografia.

- <sup>1</sup> Born, M., Oppenheimer, R., 1927. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik* 389, 457–484. <https://doi.org/10.1002/andp.19273892002>
- <sup>2</sup> von Hofmann A.W., 1865. On the combining power of atoms. *Proceedings of the Royal Institution of Great Britain* 4, 401–430, <https://archive.org/details/noticesproceedi00britgoog/page/n442>
- <sup>3</sup> Andrews, D.H., 1930. The Relation Between the Raman Spectra and the Structure of Organic Molecules. *Phys. Rev.*, 36,3, 544–554, <https://doi.org/10.1103/PhysRev.36.544>},
- <sup>4</sup> Phase Transition for a Hard Sphere System  
*J. Chem. Phys.* 27, 1208 (1957); <https://doi.org/10.1063/1.1743957>  
B. J. Alder and T. E. Wainwright
- <sup>5</sup> Synder, R.G., Schachtschneider, J.H., 1965. A valence force field for saturated hydrocarbons. *Spectrochimica Acta* 21, 169–195. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(65\)80115-1](https://doi.org/10.1016/0371-1951(65)80115-1)
- <sup>6</sup> Leach, A.R., 2001. *Molecular modelling: principles and applications*, 2nd ed. ed. Prentice Hall, Harlow, England ; New York.
- <sup>7</sup> Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Weiner, P., 1984. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 765–784. <https://doi.org/10.1021/ja00315a051>
- <sup>8</sup> Mackerell, A.D., 2004. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1584–1604. <https://doi.org/10.1002/jcc.20082>
- <sup>9</sup> Elber, R., 2005. Long-timescale simulation methods. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.02.004>
- <sup>10</sup> Zwier, M.C., Chong, L.T., 2010. Reaching biological timescales with all-atom molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Pharmacology* 10, 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.008>
- <sup>11</sup> Levy, R.M., Gallicchio, E., 1998. COMPUTER SIMULATIONS WITH EXPLICIT SOLVENT: Recent Progress in the Thermodynamic Decomposition of Free Energies and in Modeling Electrostatic Effects. *Annual Review of Physical Chemistry* 49, 531–567. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.49.1.531>
- <sup>12</sup> Bashford, D., Case, D.A., 2000. GENERALIZED BORN MODELS OF MACROMOLECULAR SOLVATION EFFECTS. *Annual Review of Physical Chemistry* 51, 129–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.51.1.129>
- <sup>13</sup> van Gunsteren, W.F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., Gee, P., Gerke, D.P., Glättli, A., Hünenberger, P.H., Kastenholz, M.A., Oostenbrink, C., Schenk, M., Trzesniak, D., van der Vegt, N.F.A., Yu, H.B., 2006. *Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives*. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 4064–4092. <https://doi.org/10.1002/anie.200502655>
- <sup>14</sup> Carugo, O., Argos, P., 1997. Correlation between side chain mobility and conformation in protein structures. *Protein Eng.* 10, 777–787.
- <sup>15</sup> Changeux, J.-P., 2005. Allosteric Mechanisms of Signal Transduction. *Science* 308, 1424–1428. <https://doi.org/10.1126/science.1108595>
- <sup>16</sup> Erlanson, D.A., Lam, J.W., Wiesmann, C., Luong, T.N., Simmons, R.L., DeLano, W.L., Choong, I.C., Burdett, M.T., Flanagan, W.M., Lee, D., Gordon, E.M., O'Brien, T., 2003. In situ assembly of enzyme inhibitors using extended tethering. *Nature Biotechnology* 21, 308–314. <https://doi.org/10.1038/nbt786>
- <sup>17</sup> Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R., 2002. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 47, 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
- <sup>18</sup> van Dijk, A.D.J., Boelens, R., Bonvin, A.M.J.J., 2005. Data-driven docking for the study of biomolecular complexes: Data-driven docking. *FEBS Journal* 272, 293–312. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04473.x>
- <sup>19</sup> Karplus, M., McCammon, J.A., 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology* 9, 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>

- <sup>20</sup> Thelin, E.P., Nelson, D.W., Bellander, B.-M., 2017. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica* 159, 209–225. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3046-3>
- <sup>21</sup> Wang, T., Huo, X., Chong, Z., Khan, H., Liu, R., Wang, T., 2018. A review of S100 protein family in lung cancer. *Clinica Chimica Acta* 476, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.010>
- <sup>22</sup> Leitner, G.C., 2016. Pharmacological- and non-pharmacological therapeutic approaches in inflammatory bowel disease in adults. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 7, 5. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i1.5>
- <sup>23</sup> Owczarek, D., Cibor, D., Mach, T., Cieśla, A., Pierzchała-Koziec, K., Sałapa, K., Kuśnierz-Cabała, B., 2011. Met-enkephalins in patients with inflammatory bowel diseases. *Advances in Medical Sciences* 56, 158–164. <https://doi.org/10.2478/v10039-011-0051-x>
- <sup>24</sup> Maciotta, S., Meregalli, M., Torrente, Y., 2013. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00265>
- <sup>25</sup> Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- <sup>26</sup> Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., Abdollahi, M., 2016. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran. Biomed. J.* 20, 1–11.
- <sup>27</sup> Huang, Y.-W., Cambre, M., Lee, H.-J., 2017. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2702. <https://doi.org/10.3390/ijms18122702>
- <sup>28</sup> Jarzynski, C., 1997. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Physical Review Letters* 78, 2690–2693. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.2690>
- <sup>29</sup> Hauser, A.S., Chavali, S., Masuho, I., Jahn, L.J., Martemyanov, K.A., Gloriam, D.E., Babu, M.M., 2018. Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* 172, 41–54.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.033>
- <sup>30</sup> Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K., 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology* 25, 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>
- <sup>31</sup> Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., Ehrmann, M., 2011. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 152.
- <sup>32</sup> Nourry, C., Grant, S.G.N., Borg, J.-P., 2003. PDZ Domain Proteins: Plug and Play! *Science Signaling* 2003, re7–re7. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re7>
- <sup>33</sup> Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., Clausen, T., 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416, 455.
- <sup>34</sup> Clausen, T., Southan, C., Ehrmann, M., 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* 10, 443–455.
- <sup>35</sup> Singh, N., D'Souza, A., Cholleti, A., Sastry, G.M., Bose, K., 2014. Dual regulatory switch confers tighter control on HtrA2 proteolytic activity. *FEBS Journal* 281, 2456–2470. <https://doi.org/10.1111/febs.12799>
- <sup>36</sup> de Regt, A.K., Kim, S., Sohn, J., Grant, R.A., Baker, T.A., Sauer, R.T., 2015. A Conserved Activation Cluster Is Required for Allosteric Communication in HtrA-Family Proteases. *Structure* 23, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.012>
- <sup>37</sup> Hansen, G., Hilgenfeld, R., 2013. Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 761–775. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1076-4>
- <sup>38</sup> Li, W., Srinivasula, S.M., Chai, J., Li, P., Wu, J.-W., Zhang, Z., Alnemri, E.S., Shi, Y., 2002. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nature Structural Biology* 9, 436–441. <https://doi.org/10.1038/nsb795>
- <sup>39</sup> Skorko-Glonek, J., Zurawa-Janicka, D., Koper, T., Jarzab, M., Figaj, D., Glaza, P., Lipinska, B., 2013. HtrA protease family as therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* 19, 977–1009.



- <sup>40</sup> Jomaa, A., Damjanovic, D., Leong, V., Ghirlando, R., Iwanczyk, J., Ortega, J., 2007. The Inner Cavity of Escherichia coli DegP Protein Is Not Essential for Molecular Chaperone and Proteolytic Activity. *Journal of Bacteriology* 189, 706–716. <https://doi.org/10.1128/JB.01334-06>
- <sup>41</sup> Bartoszek, D., Fleischer, M., 2013. Clinical significance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Forum Zakazeń* 4, 165–171. <https://doi.org/10.15374/fz2013019>
- <sup>42</sup> Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
- <sup>43</sup> Isberg, V., de Graaf, C., Bortolato, A., Cherezov, V., Katritch, V., Marshall, F.H., Mordalski, S., Pin, J.-P., Stevens, R.C., Vriend, G., Gloriam, D.E., 2015. Generic GPCR residue numbers – aligning topology maps while minding the gaps. *Trends in Pharmacological Sciences* 36, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.001>

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

1. Autor lub współautor 39 (4 przed doktoratem, 35 po doktoracie) publikacji z listy filadelfijskiej.
2. Autor lub współautor 4 materiałów konferencyjnych.
3. Edytor wydania czasopisma, 1.
4. Główny autor 21, współautor 36, komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych.
5. 1 wykład na zaproszenie.
6. Uczestnictwo w 8 projektach badawczych krajowych i zagranicznych.
7. Dane parametryczne (zgodnie z bazą Web of Science – autor Gieldon A)  
h-index – 10, liczba cytowań - 297, bez autocytowań - 260  
Sumaryczny impact factor: 97,665  
Sumaryczny impact factor (dorobek habilitacyjny): 35,491

Artur Gieldoń