

Toruń, 25 lutego 2021 r.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak  
Katedra Biofizyki,  
Instytut Fizyki  
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu  
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5  
(wiesiek@fizyka.umk.pl)

Recenzja pracy doktorskiej autorstwa  
**mgr. Pham Dinh Quoc Huy**

**„Oddziaływania pochodnych fulerenów i jonów  $\text{Cu}^{+2}$  z peptydami amyloidu beta i ich włókienkami”**

Każdy z nas chce żyć jak najdłużej. Ponadto każdy marzy o tym, aby długo żyć w zdrowiu. Niestety, z obserwacji empirycznych wynika, że im człowiek jest starszy, tym większe jest prawdopodobieństwo wystąpienia problemów zdrowotnych. Wiek jest prawdopodobnie parametrem o najsilniejszej korelacji z początkiem choroby Alzheimer'a (ang. Alzheimer's disease, w skrócie AD). Choroba Alzheimer'a jest dolegliwością występującą w wielu krajach, w których liczba osób starszych szybko rośnie - dotyka ona milionów ludzi na całym świecie. Obecnie nie ma zgody co do etiologii AD, ani skutecznego leku na tę chorobę. Wysiłek badawczy w tej dziedzinie jest ogromny, zainteresowanie jest bardzo duże, a wszystkie prace naukowe są szeroko cytowane. Pan Pham Dinh Quoc Huy przygotował swoją pracę doktorską na temat, który jest bardzo „gorący” i ważny pod wieloma względami. Pracując pod kierunkiem prof. Mai Suan Li z Zakładu Fizyki Teoretycznej Instytutu Fizyki PAN w Warszawie, wykorzystał On dobrze rozwiniętą metodologię obliczeniową do badania układów amyloidu beta (dalej w skrócie A $\beta$ ). Główne pytanie brzmiało: Czego możemy dowiedzieć się dzięki modelowaniu oddziaływań A $\beta$  z zewnętrznymi ligandami : pochodnymi fulerenów lub jonami  $\text{Cu}^{+2}$ ? Odpowiedź jest prosta: Całkiem sporo!

Wyboru związków chemicznych dokonano na podstawie ich potencjalnego udziału w leczeniu lub tworzeniu złożeń A $\beta$ . Peptydami tymi były monomery A $\beta$ 40 lub A $\beta$ 42, wielokrotnie badane i dość dobrze poznane. Jednak po raz pierwszy zbadano w ten sposób fulereny o coraz większych rozmiarach oraz fulerenol. Recenzowana praca charakteryzuje się wysokim stopniem nowatorstwa, a podstawą tego stwierdzenia jest fakt, że wyniki zostały opublikowane w ważnych międzynarodowych czasopismach naukowych z wysokim IF.

Praca składa się z czterech artykułów, których współautorem jest Pham Dinh Quoc Huy [1-4] i podzielona jest na rozdziały. Rozdział 1 (2 strony) jest zwięzłą i logiczną prezentacją całego projektu doktorskiego. Rozdział 2 (7 stron) jest dobrym i imponującym przeglądem literatury na temat AD, kaskady amyloidowej oraz roli jonów miedzi w AD. W rozdziale 3 przedstawiono krótką (5 stron) prezentację metod obliczeniowych i eksperymentalnych (AFM, fluorescencja). Zarówno rozdział 4 (29 stron) jak i rozdział 5 (42 strony) składa się z dwóch artykułów, odpowiednio na temat fulerenów i peptydów A $\beta$  ([1],[2]) oraz jonów miedzi i peptydów A $\beta$  ([3], [4]). W rozdziale 6 zebrano wnioski i plany badawcze na przyszłość. Bibliografia zawiera 228 starannie dobranych i zredagowanych pozycji (drobne literówki w pozycjach 7 i 145).

1. Huy, P.D.Q. and M.S. Li, *Binding of fullerenes to amyloid beta fibrils: size matters*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(37): p. 20030-20040.
2. Bednarikova, Z., et al., *Fullerenol C 60 (OH) 16 prevents amyloid fibrillization of A $\beta$  40-in vitro and in silico approach*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016. **18**(28): p. 18855-18867.

3. Huy, P.D.Q., et al., *Impact of Cu (II) binding on structures and dynamics of A $\beta$ 42 monomer and dimer: Molecular dynamics study*. ACS Chemical Neuroscience, 2016. 7(10): p. 1348-1363.
4. Pham, D.Q.H., M.S. Li, and G. La Penna, *Copper binding induces polymorphism in amyloid- $\beta$  peptide: Results of computational models*. The Journal of Physical Chemistry B, 2018. 122(29): p. 7243-7252.

Przedstawione w pracy artykuły [1-4] uzyskały do tej pory ponad 100 cytowań (łącznie), a więc zainteresowanie środowiska naukowego tymi wynikami jest duże. Formalne oświadczenia o indywidualnym wkładzie każdego ze współautorów w każdą z prac zostały przedstawione, a dane te wskazują, że rola Pana Pham Dinh Quoc Huy jest w każdym przypadku dominująca lub bardzo znacząca. Nie mam wątpliwości, że bez jego wkładu prace te nie zostałyby opublikowane.

Cele pracy, przedstawione w rozdziale 1, były następujące:

- a) Obliczeniowa ocena wpływu małych związków (fulerenów, fulerenolu C<sub>60</sub>(OH)<sub>16</sub>) na strukturę i dynamikę formowania A $\beta$ .
- b) Obliczeniowe badania oddziaływań jonów miedzi z peptydami A $\beta$ , w szczególności z dimerami A $\beta$ .

**Moim zdaniem wszystkie cele zostały w pełni osiągnięte.**

Poniżej krótko podsumuję rozdziały i przedstawię szczegółowe oceny.

**W Rozdziale 2** Autor przedstawia chorobę Alzheimera i problemy z ustaleniem etiologii tej choroby. Wydaje się, że obecnie najbardziej akceptowana jest hipoteza kaskady amyloidowej. Włókienka (fibryle) A $\beta$ , zbudowane z peptydów A $\beta$ , tworzą złogi, które z kolei przyczyniają się do uszkodzenia neuronów. Jednak ostatnio więcej uwagi poświęca się mniejszym oligopeptydom obecnym w szczelinach synaptycznych, które również mogą przyczyniać się do neurotoksyczności. Dlatego szczególnie ważne są badania najczęściej występujących peptydów A $\beta$ 1-40 i A $\beta$ 1-42. Niektóre artykuły, w tym dane przedstawione przez grupę prof. Wojciecha Bala (IBB PAN), pokazują, że jeszcze jeden odcięty peptyd, a mianowicie AP4-x, może mieć kluczowe znaczenie dla neuroprzewodnictwa i być może dla AD. (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.9b01399>). Warto byłoby dowiedzieć się, być może podczas obrony tej pracy doktorskiej, dlaczego te blisko spokrewnione układy nie były badane w ramach tego projektu. Rozdział jest bardzo treściwy, zebrano w nim najważniejsze fakty dotyczące inhibitorów i „z werwą” omówiono rolę Cu<sup>2+</sup> w CA. Rozdział ten wykazuje bardzo dobrą znajomość przez Doktoranta literatury istotnej dla badanego problemu.

**Rozdział 3** stanowi bardzo skrótową prezentację metod zastosowanych w badaniach. To, jak obszerna powinna być taka prezentacja, jest kwestią preferencji. Ponieważ wszystkie metody były standardowe, prezentację uważam za wystarczającą. Rozdział ułatwia zapoznanie się z oryginalnymi publikacjami. Zauważyłem problemy w notacji w ostatnim wierszu na stronie 12 (xim xjn). Również symbol P użyty na stronie 13 ma dwa różne znaczenia (3-7) i (3-10), co pozostawiono bez żadnego wyjaśnienia. Na Rysunku 3-3 w opisie idei AFM użyto terminu „laser odbity”. Należało użyć zwrotu „odbita wiązka laserowa”.

**Rozdział 4** („Oddziaływanie fulerenu i jego pochodnych na włókienka A $\beta$  i agregację A $\beta$ ”) ma bardzo ładną i pouczającą przedmowę. Podoba mi się dobry schemat na Rys. 4-1 oraz Rys. 4-2 pokazujący główny wynik symulacji. W artykule [1] autorzy badali dokowanie C20, C36, C60, C70 i C84 do włókien A $\beta$ 9-40 i A $\beta$ 17-42 oraz wykonywali symulacje MD. O ile mi wiadomo, jest to pierwsze badanie tego problemu metodą MD. Zgodnie z

danymi doświadczalnymi stwierdzono, że fulereny dość silnie oddziałują z modelami A $\beta$ . Im większy jest fuleren, tym większa jest energia swobodna wiązania (oszacowana metodą MM-PBSA). W układach tych oddziaływania niezwiązane VdW dominują nad oddziaływaniami elektrostatycznymi. Przedstawiono szczegółowe opisy preferowanych miejsc dokowania fulerenów CXY. Interesującą obserwacją jest przewidywany wpływ C60 na mostek solny D23-K28 oraz modulacja czasu agregacji i możliwe rozpadanie się pentamerów A $\beta$ 17-42. W kolejnym artykule [2] przedstawiono funkcjonalizowany fulerenol C60(OH)<sub>16</sub> (FOL), tj. związek rozpuszczalny. Eksperymenty przedstawione w tej pracy oraz symulacje MD wskazują, że FOL ma pewien potencjał do niszczenia włókien A $\beta$  ponieważ, zgodnie z obliczeniami, FOL silnie wiąże się z modelami A $\beta$ 40. Autorzy przedstawiają szczegółową analizę typów oddziaływań występujących w tym wiązaniu. Problem nie jest łatwy do poprawnego rozwiązania, gdyż obliczone energie wiązania wahają się od -10 do -37 kcal/mol w zależności od użytego w modelowaniu izomeru. Tak więc szczegółowe dane dotyczące oddziaływań nie dają zbyt szerokiej wiedzy, chyba że dobrze wiemy, jaki konkretnie izomer przestrzenny A $\beta$ 40 dominuje in vivo. Obawiam się, że na to pytanie nie ma odpowiedzi, ponieważ monomeryczny A $\beta$ 40 należy do IDP. W tej pracy podobają mi się silne interakcje pomiędzy zespołami doświadczalnymi i teoretycznymi, dlatego praca ta dowodzi, że modelowanie może w znacznym stopniu przyczynić się do lepszego zrozumienia obrazów AFM i eksperymentów fluorescencyjnych.

**Rozdział 5**, składający się z artykułów [3,4], jest moim zdaniem najbardziej wartościową częścią tej rozprawy. Rola jonów Cu<sup>2+</sup> i Cu<sup>+</sup> w mózgu nie jest jeszcze poznana. Istnieją liczne kontrowersje dotyczące obserwacji, czy wyższe stężenie Cu<sup>2+</sup> w AD jest przyczyną choroby czy efektem ubocznym stanów patologicznych. Obecność Cu<sup>2+</sup> może w różny sposób wpływać na strukturę monomerów, dimerów i wyższych agregatów. Efekty dotyczące agregacji mogą zależeć od stężenia Cu<sup>2+</sup>. Istnieją tylko ograniczone zestawy parametrów pola siłowego odpowiednie do modelowania kompleksów Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ . Dlatego postęp teoretyczny w tej dziedzinie jest bardzo pożądany. W pracy [3] autorzy opracowali własną wersję pola siłowego Amber 99SB, dedykowaną do takich symulacji (praca Quan Van Young, nie widziałem informacji o stanach spinowych w obliczeniach QCh opartych na UB3LYP...) i ta technika została wykorzystana do modelowania oddziaływań Cu<sup>2+</sup> z monomerami i dimerami A $\beta$ 42. Autorzy założyli, że Cu<sup>2+</sup> jest całkowicie kowalencyjnie związany z peptydem, natomiast niektóre dane doświadczalne wskazują, że wiązanie to może być słabe, a nawet to, że skłonność albuminy w stosunku do Cu<sup>2+</sup> jest wyższa niż w skłonność A $\beta$ . Niemniej jednak dane strukturalne uzyskane przez Pham i in. są unikatowe i pomagają usystematyzować wszystkie działania jonów miedzi na strukturę A $\beta$ . W szczególności, zreorganizowana sieć mostków solnych i wiązań wodorowych wskazuje, że obecność Cu<sup>2+</sup> sprzyja amorficznej agregacji monomerów. Przy stechiometrii 1:1 jony metali spowalniają samoorganizację protowłókien.

W nowszej pracy [4] przedstawiono kolejne wyniki modelowania agregatów Cu-A $\beta$ . Chcąc ograniczyć problemy z ergodycznością, autorzy zastosowali metodę dynamiki molekularnej z wymianą replik (replica Exchange MD). Jest to uzasadnione podejście, które pozwala na lepsze próbkowanie konformacyjne modeli CuA $\beta$ . Skłonność do tworzenia włókien badano analizując promień bezwładności (kształty), populacje wiązań wodorowych, obliczenia SASA oraz interesujące mapy energii swobodnej. Głównym rezultatem jest odkrycie na drodze obliczeń polimorficznych form agregacji A $\beta$  w obecności Cu<sup>2+</sup> - agregaty te są różne dla A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42. Duży wpływ na zawartość struktury beta w amyloidach mają również jony. Obie prace są więc bogate w liczne szczegółowe dane strukturalne oraz dostarczają podstaw do porównania z innymi pracami teoretycznymi lub eksperymentalnymi dotyczącymi roli Cu<sup>2+</sup> w układach neuronalnych i chorobie Alzheimerera.

**Podsumowując** - prace przedstawione w rozprawie nie stanowią jednego „przełomu” w biofizyce obliczeniowej. Natomiast stanowią one rzetelny zbiór danych, które trudno zebrać w sposób alternatywny wobec symulacji. Zastosowana metodologia jest zgodna z najnowszym stanem wiedzy. Interpretacje są oparte na danych i dobrze porównane z wynikami innych badań. Statystyka jest oczywiście ograniczona, ale takie obliczenia, dla dużych agregatów i w skrzyniach wodnych, są dość pracochłonne i kosztowne. Część poświęcona analizie danych została wykonana w bardzo dobry sposób. Prezentacja jest doskonała, użycie języka angielskiego (głównie sąto przecież prace po recenzjach ) jest bardzo dobre. **Pracę tę oceniam bardzo wysoko.** Warto podkreślić, że dorobek publikacyjny Doktoranta jest imponujący: 4+12 regularnych prac badawczych opublikowanych w wysoko notowanych czasopismach międzynarodowych (2013-2020) z blisko 200 cytowaniami i  $h=8$  (prawie na poziomie habilitacji).

## **WNIOSEK**

Pan Pham Dinh Quoc Huy przedstawił bardzo dobrze zorganizowaną i bogatą w liczne i ważne wyniki rozprawę doktorską. Wykonał On ogromną pracę obliczeniową, która przyczyniła się do lepszego zrozumienia układów białek amyloidowych. Autor rozwiązał trudne problemy i wykazał się umiejętnościami niezbędnymi do prowadzenia efektywnej i owocnej pracy naukowej. Praca ma charakter interdyscyplinarny, ale może być przypisana do nauk fizycznych i biofizyki obliczeniowej. **W mojej ocenie praca spełnia wszystkie warunki wymagane przez polskie prawo oraz wymagania jednostek naukowych i dlatego rekomenduję mgr Pham Dinh Quoc Huy do nadania mu stopnia naukowego doktora (dr) w dyscyplinie nauk fizycznych.** Osobno przedstawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy.



Wiesław Nowak, prof. zw.



UNIwersytet MIKOŁAJA KOPERNIKA  
INSTYTUT FIZYKI

ul. Grudziądzka 5/7 87-100 TORUŃ

<http://www.phys.uni.torun.pl/>

Tel. centr. (48 56) 611 33 10

Fax (48 56) 622 53 97

Sekretariat: (48 56) 622 63 70

e-mail: [ifiz@phys.uni.torun.pl](mailto:ifiz@phys.uni.torun.pl)



Data: 25/02/2021

Prof. dr hab. Wiesław Nowak

E-mail: [wiesiek@fizyka.umk.pl](mailto:wiesiek@fizyka.umk.pl),

Tel. 56 611 32 04; 607 53 47 00

**Załącznik do recenzji prof. W. Nowaka**

Szanowny Pan

Prof. dr hab. Jacek Kossut

Przewodniczący Rady Naukowej IF PAN w Warszawie

Szanowny Panie Profesorze,

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską i moją wysoką jej oceną zawartą w mojej recenzji wnoszę o wyróżnienie tego dzieła zgodnie z panującymi w Instytucie Fizyki PAN zwyczajami.

**Uzasadnienie**

W ramach przygotowywanej rozprawy pan mgr Pham Dinh Quoc Huy opublikował 4 prace w solidnych specjalistycznych czasopismach międzynarodowych (IF ok. 3-4.5, 100-140 pkt. MNiSzW), z szacowanym wkładami 80%, 30%, 40%, 50%. Poziom prac jest bardzo dobry, chociaż były opublikowane niedawno, to mają do 40 cytowań. Wyróżniający wkład polega na tym, że we wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem (w CPPC wraz z Z. Bednarikową), zaś w pracy dwuautorskiej w Phys Chem Chem Phys 16 (2014) 20030-20040 Jego wkład jest dominujący (80%). Badania pana Pham Dinh Quoc Huy wnoszą liczne nowe informacje na temat struktury i dynamiki niezwykle ważnych biologicznie układów tj. beta-amyloidów.

Z poważaniem

Wiesław Nowak