
Autoreferat

1. *Imię i nazwisko:* Maciej Długosz

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:*

- ❖ dr nauk fizycznych, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 2006, praca doktorska pt. *“Algorytmy dynamiki molekularnej w stałym pH i ich zastosowanie do związków modelowych i małych peptydów”*
- ❖ mgr fizyki (specjalizacja biofizyka), Uniwersytet Warszawski, Warszawa 2002, praca magisterska pt. *“Metody analizy eksperymentów w spektrometrze zatrzymanego przepływu”*

3. *Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:*

- ❖ od 01/2012 Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii, adiunkt naukowy
- ❖ 05/2007 - 06/2012 Uniwersytet Warszawski, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego / Centrum Nowych Technologii, staż podoktorski w ramach programu FOCUS Fundacji na rzecz Nauki Polskiej
- ❖ 09/2007 - 12/2011 Uniwersytet Warszawski, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego, adiunkt naukowy
- ❖ 05/2007 - 08/2007 Uniwersytet Warszawski, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego, starszy referent inżynierijno techniczny
- ❖ 05/2006 - 05/2007 Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, starszy asystent

-
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.): złożony z 6 prac cykl, zatytułowany:

Dynamika brownowska w modelowaniu dyfuzji i asocjacji biomolekuł - efekty anizotropii, oddziaływań hydrodynamicznych i molekularnego tłoku.

- A. Długosz, M.; Trylska, J. "Diffusion in crowded biological environments. Applications of Brownian dynamics", BMC Biophysics, 2011, 4:3, praca przeglądowa
- B. Długosz, M.; Zieliński, P.; Trylska, J. "Brownian dynamics simulations on CPU and GPU with BD_BOX", Journal of Computational Chemistry, 2011, 32, 2734-2744
- C. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M.; Zieliński, P.; Trylska, J. "Contributions of far-field hydrodynamic interactions to the kinetics of electrostatically driven molecular association", Journal of Physical Chemistry B, 2012, 116, 5437-5447
- D. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. "Hydrodynamic effects on the relative rotational velocity of associating proteins", Journal of Physical Chemistry B, 2013, 117, 6165-6174
- E. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. "Anisotropic diffusion effects on the barnase-barstar encounter kinetics", Journal of Chemical Theory and Computation, 2013, 9, 1667-1677
- F. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. "Evaluation of protein's rotational diffusion coefficients from simulations of their free Brownian motion in volume-occupied environments", Journal of Chemical Theory and Computation, 2014, 10, 481-491

O modelowaniu dyfuzji w układach biologicznych

Procesy zachodzące w komórkach organizmów żywych przy małych wartościach liczby Reynoldsa w przeważającej części opierają się na dyfuzji lub zawierają etapy przez dyfuzję kontrolowane (1). Transport, formowanie złożonych kompleksów makromolekularnych, reakcje enzymatyczne, propagacja sygnałów, to tylko niektóre z procesów zachodzących dzięki dyfuzji. Wszechobecność dyfuzji i jej fundamentalna rola w biologii komórki, motywuje badania eksperymentalne i teoretyczne.

Znaczna część naszej wiedzy na temat molekularnych podstaw funkcjonowania komórek organizmów żywych zdobyta została dzięki badaniom *in vitro* rozcieńczonych

wodnych roztworów biomolekuł, o dokładnie znanym i kontrolowanym składzie. Choć od dawna zdawano sobie sprawę, że środowisko w jakim procesy biologiczne zachodzą (wnętrze komórek biologicznych, przestrzeń międzykomórkowa) to złożone heterogeniczne medium, w którym całkowite stężenie molekuł waha się w zakresie od 50 do 400 mg/ml, przy czym molekuły te zajmują nawet do 40% dostępnej objętości, aspekt ten był w badaniach biomolekuł przez długi czas ignorowany (2,3). Teoretyczne i eksperymentalne prace prowadzone pod koniec XX i na początku XXI wieku pozwoliły stwierdzić (2-6), że warunki panujące we wnętrzu komórki wpływają na dyfuzję molekuł i zmieniają w sposób jakościowy i ilościowy przebieg procesów zachodzących w komórkach biologicznych w porównaniu do przebiegu tych samych procesów zachodzących w roztworach rozcieńczonych. Obserwowany w ostatnich latach znaczący postęp na polu technik eksperymentalnych sprawił, że metody takie jak NMR (7,8) czy fluorescencja (9,10) pozwalają badać złożone układy molekularne zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Do pełnego zrozumienia, jakie czynniki wpływają na dyfuzję molekuł i na przebieg procesów biologicznych w różnych warunkach, konieczne są jednak także symulacje komputerowe. Ich główne zalety to przede wszystkim możliwość obserwacji układów biologicznych z dowolną rozdzielczością, jednoczesne śledzenie wielu rodzajów molekuł obecnych w badanym układzie i możliwość bezpośredniej oceny wpływu różnych czynników (np. siły jonowej, pH, kompozycji molekularnej roztworu, stężeń składników) i różnego rodzaju oddziaływań (intermolekularnych np. sterycznych, polarnych i niepolarnych, oraz propagowanych przez rozpuszczalnik oddziaływań hydrodynamicznych) na zachowanie badanego układu.

W grupie metod modelowania komputerowego, które znajdują zastosowanie w badaniach złożonych układów biologicznych jest dynamika brownowska (11), która umożliwia (przynajmniej w teorii) symulacje układów o liczbie składników rzędu dziesiątek, setek czy tysięcy, w przestrzeni o rozmiarach rzędu nano i mikrometrów, w czasie miarowym czy nawet milisekund, z rozdzielczością atomową lub z wykorzystaniem modeli gruboziarnistych. Algorytmy dynamiki brownowskiej, ich ograniczenia oraz przykłady ich zastosowań opisane zostały w pracy przeglądowej (A), przy czym

szczególną uwagę poświęcono w niej zagadnieniom modelowania dyfuzji i asocjacji molekuł w warunkach *molekularnego tłoku* panującego we wnętrzu komórek biologicznych.

Pierwotnie najpopularniejszym zastosowaniem dynamiki brownowskiej w biofizyce były symulacje asocjacji w układzie dwóch molekuł zanurzonych w nieskończonym wodnym rozpuszczalniku, pozwalające oszacować stałe szybkości ich dyfuzyjnej asocjacji (11,12). W ostatnich latach pojawiło się kilka prac dokumentujących zastosowanie dynamiki brownowskiej do modelowania dyfuzji i asocjacji molekuł biologicznych w warunkach zbliżonych do tych jakie istnieją we wnętrzu komórek biologicznych (A), jednak tego rodzaju symulacje dalekie są od rutynowych. Z jednej strony jest to problem techniczny, związany z ograniczoną dostępnością oprogramowania dynamiki brownowskiej, które umożliwia prowadzenie symulacji skomplikowanych układów biologicznych. Z drugiej strony, modele i algorytmy wykorzystywane w tego rodzaju symulacjach często opierają się na dokonywanych *ad hoc* i nie zawsze uzasadnionych przybliżeniach, które mogą fałszować lub ograniczać wnioski płynące z symulacji. Weryfikacja i rozwój modeli i algorytmów symulacji są ważne zarówno z punktu widzenia rozwoju warsztatu współczesnej biofizyki jak i dla zrozumienia często bardzo podstawowych aspektów procesów biologicznych.

Moje badania wykorzystują technikę dynamiki brownowskiej i koncentrują się na roli czynników, które choć często zaniebywane w symulacjach, warunkują przebieg zależnych od dyfuzji procesów biologicznych. Przedstawione tutaj prace dotyczą efektów związanych z propagowanymi przez wodny rozpuszczalnik oddziaływaniami hydrodynamicznymi oraz z wynikającą ze skomplikowanych kształtów molekuł biologicznych anizotropią dyfuzji.

Nowe narzędzia modelowania molekularnego

Przedstawiona powyżej tematyka badawcza wymaga tworzenia i stosowania nowych narzędzi modelowania molekularnego. Jednym z rezultatów moich badań jest

ogólnodostępne¹ oprogramowanie do symulacji dynamiki brownowskiej. W pracy (B) przedstawiono modele i algorytmy zastosowane w oprogramowaniu oraz jego funkcjonalność. Pierwotna wersja oprogramowania umożliwiała gruboziarniste symulacje wieloskładnikowych układów molekuł biologicznych, z uwzględnieniem oddziaływań intermolekularnych, hydrodynamicznych (w dwuciałowym przybliżeniu dalekiego pola) oraz swobody konformacyjnej symulowanych obiektów (B). Kolejne wersje zostały rozszerzone o algorytm dynamiki brownowskiej ciał sztywnych, umożliwiając symulacje pełnoatomowych modeli hydrodynamicznie anizotropowych molekuł. Narzędzie to zostało wykorzystane w badaniu zagadnień opisanych w pracach (C, E, F).

Wpływ oddziaływań hydrodynamicznych na dyfuzyjną asocjację molekuł

Tworzenie kompleksów molekularnych zawiera zazwyczaj etap, w trakcie którego molekuly poszukują partnerów oddziaływań w drodze dyfuzji. Często jest to etap w procesie tworzenia kompleksu najwolniejszy i tym samym limitujący jego szybkość. W pracach (C) i (D) opisane zostały badania nad wpływem oddziaływań hydrodynamicznych na kinetykę dyfuzyjnej asocjacji molekuł.

W pracy (C), dzięki symulacjom dynamiki brownowskiej modelowych molekuł izotropowych i anizotropowych, określono jakościowy i ilościowy wpływ oddziaływań hydrodynamicznych na kinetykę asocjacji, kiedy między partnerami wiązania istnieją przyciągające oddziaływania elektrostatyczne ekranowane przez obecne w rozpuszczalniku jony soli. Pokazano, że oddziaływania hydrodynamiczne zmniejszają stałą szybkości dyfuzyjnej asocjacji i że względna wielkość tego efektu nie zależy od stopnia ekranowania oddziaływań elektrostatycznych partnerów wiązania zarówno w przypadku molekuł izotropowych, jak i w przypadku niespecyficjnej asocjacji molekuł anizotropowych. Co ciekawe, w przypadku specyficjnej asocjacji (określona względna orientacja partnerów wiązania w kompleksie) obiektów anizotropowych, względna wielkość efektu hydrodynamicznego zależy w sposób niemonotoniczny od siły jonowej rozpuszczalnika, przy czym maksymalny efekt obserwowany jest dla fizjologicznych

¹ oprogramowanie dostępne obecnie pod adresem www.browniandynamics.org

wartości siły jonowej. W pracy (C) pokazano także, że oddziaływania hydrodynamiczne mogą faworyzować konkretne wzajemne orientacje partnerów wiązania, przyczyniając się do powstawania efektywnego "sterowania hydrodynamicznego" ku określonej konfiguracji kompleksu. Ten sterujący wpływ oddziaływań hydrodynamicznych jest jednak osłabiany przez oddziaływania steryczne i elektrostatyczne, co może mieć znaczenie w przypadku procesów zachodzących w warunkach *in vivo*.

Badania opisane w pracy (C), mimo że prowadzone dla prymitywnych modeli molekuł, pozwoliły poczynić kilka interesujących obserwacji dotyczących roli oddziaływań hydrodynamicznych w asocjacji molekuł. Ich kontynuację stanowi praca (D), w której prymitywne modele molekuł zastąpiono szczegółowymi modelami molekularnymi i hydrodynamicznymi rzeczywistych białek, barnazy i barstar. W pracy tej zastosowano model oddziaływań hydrodynamicznych wykraczający poza dwuciałowe przybliżenie dalekiego pola z pracy (C). Z racji na jego wysoki w rozważanym przypadku koszt obliczeniowy, zrezygnowano z bezpośrednich symulacji dynamiki brownowskiej, ograniczając się do badania względnych prędkości rotacji białek poruszających się w kierunku konfiguracji obserwowanej w kompleksie krystalograficznym pod wpływem sił i momentów sił wynikających z oddziaływań elektrostatycznych. W pracy (D) przeanalizowano skomplikowane relacje kształtów barnazy i barstar, ich oddziaływań elektrostatycznych oraz oddziaływań hydrodynamicznych, i ich wpływ na względny ruch rotacyjny białek w trakcie tworzenia kompleksu. Pokazano, że obraz ruchu asocjujących molekuł, jaki wynika z zastosowania uproszczonych metod i modeli hydrodynamicznych, daleki jest od kompletności.

Wysoki koszt obliczeniowy oddziaływań hydrodynamicznych w symulacjach dynamiki brownowskiej powoduje, że w przypadku złożonych układów molekularnych o dużej liczebności składników, są one modelowane w ramach przybliżenia traktującego molekuły jak sfery (13, 14). Wyniki prac (C) i (D) sugerują, że takie podejście nie zawsze jest poprawne. Nie jest jednak obecnie możliwe modelowanie oddziaływań hydrodynamicznych w symulacjach dynamiki brownowskiej złożonych układów molekularnych w sposób rygorystyczny i jednocześnie wydajny.

Konsekwencje anizotropii molekuł

Kształty molekuł biologicznych często są bardzo skomplikowane, czego efektem jest anizotropowy charakter ich dyfuzji. Fakt ten jest jednak zazwyczaj ignorowany w typowych zastosowaniach dynamiki brownowskiej, co od strony technicznej sprowadza się do przypisania molekułom w symulacjach średnich współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej zamiast tensorów dyfuzji.

Przedmiotem pracy (E) jest rola hydrodynamicznej anizotropii molekuł w ich dyfuzyjnej asocjacji. Symulacje dynamiki brownowskiej układu złożonego z pełnoatomowych modeli białek barnazy i barstar pokazały, że zignorowanie nawet stosunkowo niewielkiej hydrodynamicznej anizotropii tych dwóch białek prowadzi do stałych szybkości mniejszych o 20% w porównaniu do tych, jakie są rezultatem symulacji poprawnie uwzględniających anizotropię molekuł. Pokazano także, że hydrodynamiczna anizotropia białek umożliwia ich szybszą dysocjację po utworzeniu kompleksu. Efekty hydrodynamicznej anizotropii partnerów wiązania są tym silniej manifestowane, im większe jest znaczenie oddziaływań sterycznych w badanym układzie, co pozwala spekulować, że rola hydrodynamicznej anizotropii molekuł jest znacznie większa w przypadku procesów asocjacji zachodzących w warunkach *in vivo* (E).

Związek hydrodynamicznej anizotropii i oddziaływań sterycznych opisany w pracy (E) umotywowwał częściowo badania opisane w pracy (F), które poświęcone są dyfuzyjnej dynamice rotacyjnej hydrodynamicznie anizotropowych molekuł w warunkach molekularnego tłoku. Dzięki symulacjom dynamiki brownowskiej roztworów białka lizozym o stężeniach sięgających 250 mg/ml, które opisano w pracy, pokazano, że wraz ze wzrostem zatłoczenia środowiska w jakim odbywa się dyfuzja anizotropowych molekuł, wzrasta także anizotropowość ich dyfuzji rotacyjnej. To efekt o potencjalnym znaczeniu biologicznym, niemożliwy do przewidzenia na podstawie symulacji dynamiki brownowskiej, w którym molekuły opisywane są izotropowymi, średnimi współczynnikami dyfuzji. Dodatkowo w pracy (F) zaproponowano metodę analizy trajektorii symulacji komputerowych, opartą o model dyfuzji swobodnej, która pozwala wyznaczać efektywne tensory dyfuzji rotacyjnej molekuł.

Podsumowanie

Przedstawione tutaj zagadnienia związane są z podstawowymi właściwościami biomolekuł oraz ich oddziaływań i stanowią zaledwie wstęp do modelowania złożonych procesów zachodzących we wnętrzach komórek biologicznych. Tworzenie warsztatu symulacji układów biologicznych wymaga jednak systematycznego podejścia, w którym poprzez rozważanie zagadnień i układów o rosnącym stopniu skomplikowania, stopniowo zdobywa się wiedzę o mechanizmach rządzących badanymi układami. Takie podejście, w połączeniu z wynikami badań eksperymentalnych, pozwoli być może w przyszłości określić, jakie czynniki i oddziaływania determinują przebieg procesów biologicznych i w jakim stopniu zachowanie molekuł obserwowane w próbówce przypomina to, z którym mamy do czynienia we wnętrzu komórek biologicznych.

Bibliografia

1. Purcell, E. M. *"Life at low Reynolds number"*, American Journal of Physics, 1977, 45, 3-11
2. Ellis, R. J. *"Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment"*, Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11, 114-119
3. Ellis, R. J. *"Macromolecular crowding: obvious but under appreciated"*, TRENDS in Biochemical Sciences, 2001, 26, 597-604
4. Dix, J. A.; Verkman, A. S. *"Crowding effects on diffusion in solutions and cells"*, Annual Reviews of Biophysics, 2008, 37, 247-263
5. Elcock, A. H. *"Models of macromolecular crowding effects and the need to for quantitative comparisons with experiments"*, Current Opinion in Structural Biology, 2010, 20, 196-206
6. Zhou, H. X.; Rivas, G.; Minton, A. P. *"Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences"*, Annual Reviews in Biophysics, 2008, 37, 375-397
7. Pielak, G. J.; Li, C. G.; Miklos, A. C.; Schlesinger A. P.; Slade, K. M.; Wang, G. F.; Zgoneanu, I. G. *"Protein nuclear magnetic resonance under physiological conditions"*, Biochemistry, 2009, 48, 226-234
8. Wang, Q. H.; Zhurulyeva, A.; Gierasch, L. M. *"Exploring weak, transient protein-protein interactions in crowded in vivo environments by in-cell nuclear magnetic resonance spectroscopy"*, Biochemistry, 2011, 50, 9225-9236

-
9. Philip, Y.; Kiss, V.; Schreiber, G. "Protein-binding dynamics imaged in a living cell", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2012, 109, 1461-1466
 10. Xie, X. S.; Choi, P. J.; Li, G. W.; Lee, N. K.; Lia, G. "Single molecule approach to molecular biology in living bacterial cells", Annual Reviews in Biophysics, 2008, 37, 417-444
 11. Ermak, D. L.; McCammon, J. A. "Brownian dynamics with hydrodynamic interactions", Journal of Chemical Physics, 1978, 69, 1352-1360
 12. Gabdouliline, R. R.; Wade, R. C. "Brownian dynamics simulation of protein-protein encounter", Methods, 1998, 14, 329-41
 13. Ando, T.; Skolnick, J. "Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo molecular motion", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2010, 107, 18457-18462
 14. Merghetti, P.; Wade, R. C. "Atomic detail Brownian dynamics simulations of concentrated protein solutions with a mean field treatment of hydrodynamic interactions", Journal of Physical Chemistry B, 2012, 116, 8523-8533

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Kinetyka reakcji molekularnych – spektrofotometria zatrzymanego przepływu

1. Długosz, M.; Bojarska, E.; Antosiewicz, J. M. "A procedure for analysis of stopped-flow transients for protein-ligand association", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2002, 51, 179-193
2. Długosz, M.; Błachut-Okraśńska, E.; Bojarska, E.; Darżynkiewicz, E.; Antosiewicz, J. M. "Effects of pH on kinetics of binding of mRNA-cap analogs by translation initiation factor eIF4E", European Biophysics Journal, 2003, 31, 608-616
3. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M.; Bzowska, A. "Stopped-flow studies of guanine binding by calf spleen purine nucleoside phosphorylase", Biophysical Chemistry, 2005, 115, 67-76
4. Wielgus-Kutrowska, B.; Antosiewicz, J. M.; Długosz, M.; Holy, A.; Bzowska, A. "Towards the mechanism of trimeric purine nucleoside phosphorylases: stopped-flow studies of binding of multisubstrate analogue inhibitor – 2-amino-9-[2-(phosphonomethoxy)-ethyl]-6- sulfanylpurine", Biophysical Chemistry, 2007, 125, 260-268

-
5. Antosiewicz, J. M.; Wielgus-Kutrowska, B.; Długosz, M.; Holy, A.; Bzowska, A. *"Kinetics of binding of multisubstrate analogue inhibitor (2-amino-9-[2(phosphonomethoxy)ethyl]-6-sulfanylpurine) with trimeric purine nucleoside phosphorylase"*, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2007, 26, 969-974

Metoda zatrzymanego przepływu służy do badania kinetyki reakcji molekularnych w fazie ciekłej. Postęp reakcji zainicjowanej przez szybkie zmieszanie roztworów reagentów jest mierzony metodami spektroskopii optycznej. Przykładowo w eksperymencie zatrzymanego przepływu można rejestrować fluorescencję mieszaniny w funkcji czasu, jaki upłynął od zmieszania reagentów i na tej podstawie wyznaczać stałe szybkości badanej reakcji. Reakcje molekularne często zachodzą wieloetapowo, co znacznie utrudnia analizę rejestrowanych w eksperymencie zatrzymanego przepływu przebiegów reakcji. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że rejestrowany sygnał może pochodzić od wszystkich składników mieszaniny – substratów i produktów reakcji, których stężenia zmieniają się w czasie jej zachodzenia. Dokładna analiza eksperymentów zatrzymanego przepływu jest możliwa dzięki zastosowaniu metod numerycznego całkowania równań różniczkowych odpowiadających obserwowanej w eksperymencie reakcji przy jednoczesnej optymalizacji stałych szybkości reakcji z więzami zadanymi przez obserwowane w eksperymencie przebiegi kinetyczne. Opracowanie i zastosowanie tego rodzaju metod (1-5) było przedmiotem mojej pracy magisterskiej.

Wpływ pH na strukturę i dynamikę molekuł – dynamika molekularna w stałym pH

6. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. *"The impact of protonation equilibria on protein structure"*, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2005, 17, S1607-S1616
7. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. *"Effects of solute-solvent proton exchange on polypeptide chain dynamics: a constant pH molecular dynamics study"*, *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109, 13777-13784
8. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. *"pKas In dicarboxylic acids by constant-pH molecular dynamics simulations"*, *Zeitschrift für Naturforschung*, 2004, 59a, 873-874

-
9. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. "Constant-pH molecular dynamics simulations: a test case of succinic acid", *Chemical Physics*, 2004, 302, 161-170
 10. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M.; Robertson, A. D. "Constant-pH molecular dynamics study of protonation-structure relationship In a heptapeptide derived from ovomucoid third domain", *Physical Review E*, 2004, 69, 1-10

Molekuły żywych komórek występują i reagują w środowisku wodnym. pH środowiska (wielkość określająca stężenie w roztworze uwodnionych protonów – jonów hydroniowych, zmieniająca się w zależności od organu lub tkanki ciała ludzkiego) wpływa na stabilność, właściwości strukturalne i funkcje molekuł. Źródłem zależności od pH jest obecność w makromolekułach tzw. grup miareczkowlanych, które zdolne są wymieniać protony z otaczającym wodnym rozpuszczalnikiem. Równowaga procesów protonacji i deprotonacji grup miareczkowlanych zależna jest od pH. Zmiany stanów protonacyjnych poszczególnych grup miareczkowlanych modyfikują rozkład ładunku w obrębie molekuły oraz jej całkowity ładunek elektrostatyczny. Długozasięgowy charakter oddziaływań elektrostatycznych sprawia, że te zależne od pH, lokalne zmiany rozkładu ładunków mogą wywierać fundamentalny wpływ na właściwości i funkcje biomolekuł. Tradycyjne podejście stosowane w symulacjach dynamiki molekularnej polega na założeniu takich (stałych) stanów protonacyjnych grup miareczkowlanych biomolekuł, które można uznać za reprezentatywne w zadanym pH. Nie zawsze takie podejście jest poprawne - stany protonacyjne molekuł zależą od ich konformacji. Wybór konkretnego stanu protonacyjnego molekuły i utrzymywanie go w trakcie symulacji, kiedy konformacja molekuły zmienia się, jest problematyczny – stan protonacyjny grup funkcyjnych w niepożądany sposób ogranicza przestrzeń konformacyjną molekuły. Przedmiotem mojej pracy doktorskiej było opracowanie algorytmu umożliwiającego wykonywanie symulacji dynamiki molekularnej solwatowanych molekuł, w których pH roztworu jest zewnętrznym parametrem, zaś stany protonacyjne grup miareczkowlanych zmieniają się dynamicznie w trakcie symulacji. Algorytm dynamiki molekularnej w stałym pH łączy metody klasycznej dynamiki molekularnej z modelem Poissona-Boltzmana (który pozwala wyznaczyć różnice energii swobodnych poszczególnych

stanów protonacyjnych molekuły) i metodą Monte Carlo w przestrzeni stanów protonacyjnych. Opracowana metodologia pozwoliła wykazać i zilustrować wpływ, jaki swoboda wymiany protonów z otoczeniem wywiera na konformację i dynamikę molekuł (związków organicznych i małych peptydów) (6-10).

Modelowanie molekularne i eksperymenty NMR

11. Nowakowski, M.; Długosz, M.; Taraszewska, J.; Wójcik, J. *"Complexation of aminoglutethimide with native and modified cyclodextrins"*, Journal of Physical Organic Chemistry, 2009, 22, 948-953

12. Wojtkielewicz, A.; Długosz, M.; Maj, J.; Morzycki, J. W.; Nowakowski, M.; Renkiewicz, J.; Strnad, M.; Swaczynova, J.; Wilczewska, A. Z.; Wójcik, J. *"New analogues of the potent cytotoxic saponin OSW-1"*, Journal of Medicinal Chemistry, 2007, 50, 3667-3673

W trakcie pracy w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN brałem udział w badaniach wykorzystujących metody modelowania molekularnego jako techniki komplementarne do eksperymentów NMR. Przedmiotem moich badań, wykorzystujących metody mechaniki kwantowej i klasycznej dynamiki molekularnej, były właściwości strukturalnych kompleksów molekuł leków z chiralnymi selektorami (11) oraz analiza preferencji konformacyjnych związków organicznych o potencjale terapeutycznym (12).

Badania asocjacji molekuł metodami dynamiki brownowskiej

13. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M.; Trylska, J. *"Association of aminoglycosidic antibiotics with the ribosomal A-site studied with Brownian dynamics"*, Journal of Chemical Theory and Computation, 2008, 4, 549-559

14. Długosz, M.; Trylska, J. *"Aminoglycoside association pathways with the 30S ribosomal subunit"*, Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113, 7322-7330

15. Długosz, M.; Huber, G. A.; McCammon, J. A.; Trylska, J. "Brownian dynamics study of the association between the 70S ribosome and the elongation factor G", *Biopolymers*, 2011, 95, 616-627

16. Grant, B. J.; Gheorghe, D.; Zheng, W.; Alonso, M.; Huber, G.; Długosz, M.; McCammon, J. A.; Cross, R. A. "Electrostatically biased binding of kinesin to microtubules", *PLOS Biology*, 2011, 9, e1001207

W trakcie stażu podoktorskiego zajmowałem się badaniami asocjacji antybiotyków aminoglikozydowych (13, 14) i czynników białkowych (czynnik elongacyjny G) (15) z rybosomem bakteryjnym, wykorzystując technikę dynamiki brownowskiej. Zastosowanie tej metody umożliwiło oszacowanie stałych szybkości dyfuzyjnej asocjacji molekuł, pozwoliło przewidzieć możliwe miejsca wiązania antybiotyków i strukturę nieznanych kompleksów molekularnych oraz opisać mechanizm i ścieżki asocjacji. W ramach współpracy z grupą prof. McCammona (University of California at San Diego) brałem także udział w badaniach wykorzystujących metodę dynamiki brownowskiej do symulacji oddziaływań białek motorycznych z mikrotubulami (16).

Badania agregacji białek metodami klasycznej dynamiki molekularnej

17. Długosz, M.; Trylska, J. "Secondary structures of native and pathogenic huntingtin N-terminal fragments", *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115, 11597–11608

Jeden z kilku projektów jakimi zajmowałem się w trakcie stażu podoktorskiego poświęcony był procesowi agregacji białka huntingtyny, który towarzyszy neurodegeneracyjnej chorobie Huntingtona. W trakcie badań wykorzystywałem metody dynamiki molekularnej w celu przewidzenia/określenia preferencji strukturalnych N-terminalnych fragmentów huntingtyny, zawierających sekwencje glutaminy o długościach spotykanych w natywnym białku i w jego patogennym wariantcie (17). Przewidziana dzięki symulacjom struktura N-terminalnego fragmentu huntingtyny, w którym długość sekwencji glutaminowej odpowiada długości sekwencji występującej w natywnym białku jest zgodna z krystalograficzną strukturą pierwszego exonu huntingtyny, opublikowana

w trakcie powstawania pracy. Struktura fragmentu z wydłużoną sekwencją glutaminową jest zgodna z zaproponowanym przez innych autorów modelem agregacji, w którym pośredniczy pierwsze 17 aminokwasów huntingtyny (17).

Określanie podobieństwa białek na podstawie ich właściwości fizykochemicznych

18. Długosz, M.; Trylska, J. *“Electrostatic similarity of proteins: application of 3D spherical harmonic decomposition”*, Journal of Chemical Physics, 2008, 129, 015103

Problem porównywania różnych właściwości fizykochemicznych biomolekuł i ich klasyfikacji na podstawie tych właściwości pojawia się w badaniach kompleksów molekularnych, projektowaniu leków czy też próbach tworzenia molekularnych baz danych. Oprócz porównywania składu chemicznego molekuł, pojawia się także potrzeba porównania ich kształtów, generowanych przez nie potencjałów elektrostatycznych, właściwości ich powierzchni. Tego rodzaju porównanie nie jest jednak jednoznaczne, jeśli wymaga uzgodnienia orientacji molekuł. W trakcie stażu podoktorskiego opracowałem metodę porównywania właściwości molekuł (kształtów, generowanych potencjałów elektrostatycznych, właściwości hydrofobowych), która dzięki wykorzystaniu deskryptorów niezmienniczych ze względu na rotacje nie wymaga uzgadniania orientacji porównywanych obiektów (18).

Wpływ pH na kinetykę dyfuzyjnej asocjacji białek

19. Długosz, M.; Antosiewicz, J. M.; Trylska, J. *“pH-dependent association of proteins. The test case of monoclonal antibody HyHEL-5 and its antigen hen egg white lysozyme”*, Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113, 15662-15669

Zależne od pH równowagi protonacyjne molekuł białek determinują zarówno lokalny rozkład ładunków w molekułach, jak i ich całkowity ładunek. W konsekwencji pH wpływa nie tylko na strukturę i dynamikę pojedynczych molekuł, ale także na ich

oddziaływania z innymi molekułami i kinetykę tworzenia kompleksów molekularnych. Akty protonacji i deprotonacji grup miareczkowlanych towarzyszące wiązaniu molekuł powodują, że stała szybkości asocjacji może zmieniać się w zależności od pH roztworu. W swoich badaniach poświęconych zagadnieniu zależnej od pH szybkości asocjacji białek wykorzystałem model kompleksu przejściowego, który pozwala wyznaczać dyfuzyjne stałe szybkości asocjacji oddziałujących molekuł. Model ten został jednak zmodyfikowany tak, aby obliczenia elektrostatycznej energii oddziaływania asocjujących molekuł uwzględniały w sposób bezpośredni pH roztworu oraz fakt, że w zadanym pH molekuły próbują z różnym prawdopodobieństwem wiele stanów protonacyjnych i że prawdopodobieństwa stanów protonacyjnych molekuł mogą ulec zmianie pod wpływem oddziaływania z partnerem wiązania. Jako układ testowy wykorzystany został kompleks białek HyHEL5 i HEWL. Na jego przykładzie pokazano, że modyfikacje wprowadzone do modelu kompleksu przejściowego pozwalają uzyskać znacznie lepszą zgodność jakościową z danymi eksperymentalnymi niż podejście tradycyjne, które uwzględnia pH przez założenie stałych stanów protonacyjnych asocjujących molekuł (19).

Maciej Długosz