

Autoreferat

1 Imię i nazwisko

Piotr Setny

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- **doktor nauk fizycznych** – Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, grudzień 2008, rozprawa doktorska pt. *Badanie oddziaływań hydrofobowych metodami symulacji komputerowych*, dyplom z wyróżnieniem,
- **magister fizyki** – Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, wrzesień 2003, praca magisterska pt. *Badanie różnic i podobieństw w oddziaływaniach kinazy CK2 z cząsteczkami ATP i GTP metodami dynamiki molekularnej*, dyplom z wyróżnieniem,
- **lekarz** – Warszawski Uniwersytet Medyczny, czerwiec 2001.

3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **od 07.2013** Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski, adiunkt naukowy,
- **08.2009 – 06.2013** Technische Universität München, Niemcy, staż podoktorski,
- **01.2009 – 07.2009** University of California, San Diego, USA, staż podoktorski,
- **10.2003 – 12.2008** Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego, Uniwersytet Warszawski, starszy referent inżynierjno techniczny.

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Modelowanie i analiza efektów hydratacyjnych w układach biomolekularnych

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

- H1 Riccardo Baron*, **Piotr Setny***, J. Andrew McCammon, (*równy udział w pracy)
Water in Cavity-Ligand Recognition
J. Am. Chem. Soc., 2010, 132:12091,
- H2 **Piotr Setny***, Riccardo Baron*, J. Andrew McCammon, (*równy udział w pracy)
How Can Hydrophobic Association Be Enthalpy Driven?
J. Chem. Theory and Comp., 2010, 6:2866,
- H3 **Piotr Setny**, Peter Kekenes-Huskey, Riccardo Baron, J. Andrew McCammon, Joachim Dzubiella,
Solvent fluctuations in hydrophobic cavity-ligand binding kinetics
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013, 110:1194,
- H4 **Piotr Setny**, Anita Dudek,
Explicit Solvent Hydration Benchmark for Proteins With Application to the PBSA Method,
J. Chem. Theory and Comp., 2017, 13:2762,
- H5 **Piotr Setny**, Martin Zacharias,
Hydration in Discrete Water. A Mean Field, Cellular Automata Based Approach to Calculating Hydration Free Energies,
J. Phys. Chem. B., 2010, 114:8667,
- H6 **Piotr Setny**,
Hydration in Discrete Water (II): From Neutral to Charged Solutes,
J. Phys Chem. B, 2015, 119:5970,
- H7 **Piotr Setny**,
Prediction of water binding to protein hydration sites with discrete, semi-explicit solvent model,
J. Chem. Theory and Comp., 2015, 11:5961,
- H8 **Piotr Setny**, Marta D. Wiśniewska,
A water mediated conformational preselection mechanism in substrate binding cooperativity to Protein Kinase A
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2018, *in press*, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720024115>.

4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1 Wprowadzenie

Woda w układach biomolekularnych. Woda w stanie ciekłym wydaje się być niezbędna dla istnienia wszelkich znanych nam form życia. Tradycyjnie środowisko wodne postrzegane jest jednak jako pasywny ośrodek, stanowiący jedynie tło dla zawieszonych w nim molekuł realizujących procesy życiowe. Tymczasem, wraz z rozwojem wiedzy o mechanizmach funkcjonowania organizmów na poziomie atomowym woda jawi się jako element mający niezwykle istotny wpływ na strukturę, dynamikę, a tym samym i funkcję cząsteczek biologicznych [1].

Istotna rola wody w układach biomolekularnych manifestuje się na wielu poziomach organizacji czasowo-przestrzennej, począwszy od mezoskopowej fazy ciekłej, poprzez częściowo ustrukturyzowane warstwy hydratacyjne, aż po specyficznie umiejscowione pojedyncze molekuły.

a) Jako ciekły ośrodek tworzony przez niewielkie i silnie ze sobą oddziałujące polarne cząsteczki, woda prowadzi do powstawania tzw. efektów hydrofobowych [2]. Są one odpowiedzialne między innymi za tworzenie się obiektów supramolekularnych takich jak błony biologiczne, formowanie się struktur trzeciorzędowych białek, bądź specyficzne oddziaływania międzycząsteczkowe. b) Dzięki trwałemu momentowi dipolowemu cząsteczek woda jest ośrodkiem o wysokiej stałej dielektrycznej [3]. Ogranicza to dominującą rolę efektów elektrostatycznych w oddziaływaniach zanurzonych w niej molekuł i sprawia, że interakcje pomiędzy nimi są wypadkową wielu efektów fizycznych, umożliwiając funkcjonowanie skomplikowanych mechanizmów molekularnych i ich subtelną regulację. c) Tworząc wzajemne wiązania wodorowe cząsteczki wody mają zdolność formowania dynamicznych, lokalnych struktur otaczających rozpuszczone objekty [4]. Obecność takich warstw hydratacyjnych dodatkowo moduluje oddziaływania pomiędzy molekułami w wodzie w sposób zależny od ich rozmiaru, topografii powierzchni oraz ładunku. Efekty tego typu są istotne między innymi dla oddziaływania makromolekuł z jonami, w tym również selektywnego przewodnictwa jonów przez kanały śródbłonowe, dynamiki zmian konformacyjnych, czy kinetyki procesów asocjacji. d) Pojedyncze cząsteczki wody wbudowane w sieć wiązań wodorowych wewnątrz struktur makromolekularnych przyczyniają się do ich stabilizacji oraz pośredniczą w specyficznych interakcjach z innymi molekułami [5]. Ich obecność ma szczególne znaczenie praktyczne dla szybko rozwijającej się dziedziny tzw. racjonalnego projektowania leków w oparciu znajomość struktury receptora, gdyż uwzględnienie efektów termodynamicznych i sterycznych związanych z cząsteczkami wody w miejscu wiążącym jest niezbędne dla opracowania właściwej struktury liganda. Ponadto, e) cząsteczki wody biorą udział w reakcjach enzymatycznych, pośredniczą w przewodzeniu protonów (mechanizm Grotthussa) oraz transporcie substancji przez białkowe kanały przezbłonowe [1].

Pomimo, iż obecnie zdajemy sobie sprawę z mnogości oraz istotnej roli efektów, w które zaangażowana jest woda w układach biologicznych, w wielu przypadkach ich dokładne zbadanie, zrozumienie, a wreszcie ujęcie w model dostarczający ilościowych predykcji, wciąż pozostaje na horyzoncie współczesnych badań. Poza złożonością i różnorodnością tych zjawisk, jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest fakt, że dysponujemy ograniczonym zakresem metod eksperymentalnych pozwalających na uzyskanie jednocześnie rozdzielczości przestrzennej i czasowej niezbędnych do śledzenia struktury oraz dynamiki grupy cząsteczek wody pełniących wyodrębnioną rolę w układzie biomolekularnym [6]. Z jednej strony metody oparte na krystalografii i wykorzystujące promienie rentgenowskie bądź dyfrakcję neutronów umożliwiają zobrazowanie pojedynczych, silnie związanych cząsteczek wody w obrębie struktur makromolekularnych, ale nie pozwalają zaobserwować wody w rejonach gdzie ma ona bardziej dynamiczną, częściowo zdeorganizowaną strukturę. Z drugiej strony, metody spektroskopowe, na przykład w terahercowym zakresie promieniowania elektromagnetycznego [7], pozwalają wnioskować o dynamice i rozmiarach warstw hydratacyjnych otaczających makromolekuły, jednak nie są w stanie dostarczyć informacji o szczegółach ich struktury przestrzennej. Odrębnym problemem jest również ocena efektów termodynamicznych wynikających z udziału środowiska wodnego w procesach biomolekularnych. Metody eksperymentalne pozwalają na pomiar parametrów termodynamicznych charakteryzujących układ jako całość, zwykle bez możliwości bezpośredniego wnioskowania o wkładach poszczególnych jego elementów.

Modelowanie efektów hydratacyjnych. Metodą pozwalającą na bezpośrednią analizę efektów hydratacyjnych są symulacje komputerowe wykorzystujące pełnoatomową reprezentację zarówno badanego układu molekularnego jak i środowiska wodnego [8]. Dzięki systematycznemu przyrostowi dostępnych mocy obliczeniowych, stosując opis oparty na klasycznej mechanice molekularnej, możliwe jest w wybranych przypadkach uzyskanie zadowalającego próbkowania przestrzeni konfiguracyjnej układu złożonego z kilkudziesięciu tysięcy atomów [9]. Taka wielkość

układu odpowiada na przykład średniej wielkości białku otoczonemu warstwą wody o grubości kilkunasu Å. Ogromną zaletą symulacji komputerowych jest możliwość prowadzenia ich również dla wyidealizowanych układów modelowych, co pozwala skupić się na wybranych aspektach badanych zjawisk, ułatwiając ich analizę i opis na gruncie teoretycznym. W połączeniu z metodami fizyki statystycznej symulacje komputerowe układów molekularnych umożliwiają wyznaczenie zmian energii swobodnej w funkcji zadanego parametru jak również oszacowanie wkładów entalpowych i entropowych [10]. Przy odpowiednim dobraniu warunków symulacji pozwala to na porównanie wyników z danymi eksperymentalnymi, dając również unikalną możliwość interpretacji rzeczywistych pomiarów w oparciu o pełen obraz ewolucji układu w rozdzielczości atomowej. Generując konfiguracje badanego układu przy wykorzystaniu algorytmów dynamiki molekularnej można także uzyskać wgląd w parametry dynamiczne takie jak czasy relaksacji cząsteczek wody w wybranych lokalizacjach bądź, na razie dla prostych układów modelowych, wpływ środowiska wodnego na kinetykę asocjacji.

Typowe symulacje komputerowe oparte na klasycznej mechanice molekularnej nie uwzględniają potencjalnie istotnych efektów związanych z kwantową naturą materii, w szczególności polaryzowalności elektronowej. Pomimo to, przy realnie dostępnych mocach obliczeniowych wydają się zapewniać wystarczający kompromis pomiędzy dokładnością reprezentacji układu, a możliwością wydajnego próbkowania jego stanów. Pozostają one zatem metodą z wyboru do badania układów biomolekularnych przy uwzględnieniu możliwie szerokiego zakresu efektów hydratacyjnych.

W praktycznych zastosowaniach, na przykład w dziedzinie komputerowo wspomaganego projektowania leków, symulacje wykorzystujące pełnoatomową reprezentację środowiska wodnego są jednak zbyt kosztowne obliczeniowo. Uzasadnia to rozwijanie metod uproszczonych, które dla zadanej konfiguracji badanych molekuł pozwalają oszacować uśredniony efekt ich oddziaływania z otaczającymi cząsteczkami wody, wyrażony jako energia swobodna hydratacji [11]. Typowym przyjmowanym tu założeniem jest, że środowisko wodne można przybliżyć poprzez jednorodny ośrodek o wysokiej stałej dielektrycznej, odgraniczony poprzez odpowiednio zdefiniowaną powierzchnię graniczną od przestrzeni o niskiej stałej dielektrycznej, zajmowanej przez atomy zanurzonej molekule. Pozwala to na przedstawienie energii swobodnej hydratacji jako sumy: a) wkładu elektrostatycznego, odpowiadającego za energię swobodną ładunków cząstkowych molekule w polu reakcji ośrodka dielektrycznego, oraz b) wkładu niepolarnego, opisującego pracę potrzebną na wytworzenie powierzchni granicznej wokół molekule pozbawionej ładunków cząstkowych. W kontekście zastosowań odnoszących się do układów biomolekularnych popularnym sposobem ujęcia zagadnienia elektrostatycznego jest iteracyjne rozwiązanie równania Poissona-Boltzmanna (PB) [12], bądź wykorzystanie przybliżonego, analitycznego rozwiązania dostarczanego przez uogólniony model Borna (ang. *generalized Born model*, GB) [13]. Człon niepolarny szacuje się zwykle jako liniowo zależny do pola powierzchni granicznej (ang. *surface area*, SA), zakładając pewną wartość stałej proporcjonalności pełniącej rolę mikroskopowego napięcia powierzchniowego [14].

Dokładność uproszczonych modeli środowiska wodnego w zakresie obliczeń energii swobodnych hydratacji małych molekuł, na przykład cząsteczek lekopodobnych, jest zadowalająca [15], jednakże brak jest wiarygodnych danych pozwalających w sposób bezpośredni zweryfikować jakość przewidywań dla makromolekuł takich jak białka. Manifestacją tego jest fakt, że obok szeregu sukcesów obserwuje się również wiele sytuacji, kiedy wyniki uzyskane z wykorzystaniem modeli uproszczonych są w sposób jakościowy niezgodne z danymi doświadczalnymi lub wynikami modeli pełnoatomowych [16, 17, 18]. Poza problemem wynikającym z dążenia do oszacowania energii swobodnych hydratacji układu na podstawie ograniczonej liczby konformacji, składa się na to szereg fundamentalnych ograniczeń natury fizycznej:

- a) Powierzchnie graniczne, zarówno oddzielające obszary o różnych wartościach stałej

dielektrycznej jak i służąca do oszacowania wkładu niepolarnego, są tworzone w oparciu o model geometryczny zdefiniowany na podstawie zadeklarowanych promieni atomowych badanej molekuly. Ich przebieg jest zatem nieczuły na właściwości fizykochemiczne otoczenia molekularnego i nie uwzględnia przesunięć mogących wynikać z obecności lokalnie silnego pola elektrycznego lub tzw. efektów wysuszenia, w wyniku których cząsteczki wody wypychane są ze sterycznie dostępnych obszarów o wysokiej hydrofobowości [19].

- b) Polaryzacja pierwszej warstwy hydratacyjnej zachodzi w sposób odmienny niż polaryzacja czystego ośrodka, gdyż zależy również od lokalnego upakowania cząsteczek wody oraz konfiguracji wiązań wodorowych wymuszonej przez obecność zanurzonej molekuly [20].
- c) W swoich klasycznych wersjach modele uproszczone nie odzwierciedlają różnic hydratacji ładunków dodatnich i ujemnych wynikających z asymetrycznego rozkładu ładunku w cząsteczce wody [21].
- d) Modele uproszczone nie są w stanie przewidzieć ani tym bardziej uwzględnić obecności izolowanych cząsteczek wody wewnątrz struktur makromolekularnych.
- e) Praca potrzebna na wytworzenie wnęki o rozmiarach molekularnych w środowisku wodnym (cząłon niepolarny) nie jest w rzeczywistości liniowo proporcjonalna do pola jej powierzchni. Stopień proporcjonalności zależy od promienia krzywizny powierzchni (dla małych obiektów, o średnicy do kilku Å, praca skaluje się wraz z objętością, co jest efektem entropowym, odmiennym od makroskopowej pracy objętościowej), jak również od gęstości upakowania i rodzaju atomów molekuly [2].

Eliminacja wymienionych ograniczeń najbardziej popularnych metod uproszczonych była i jest przedmiotem intensywnych wysiłków badawczych. Skupiają się one między innymi na optymalizacji parametrów atomowych (promieni, ładunków cząstkowych), sposobie definicji powierzchni granicznej [22], kwestii asymetrii hydratacji przeciwnych ładunków [23], bądź sposobie obliczania wkładów niepolarnych [24]. Równolegle obserwuje się rozwój alternatywnych podejść do modelowania efektów hydratacyjnych, wśród których warto wymienić model polaryzowalnych dipoli [25], modele oparte na zastosowaniu teorii funkcjonału gęstości [26], czy metody bazujące na połączeniu symulacji pełnoatomowych z analizą efektów termodynamicznych na podstawie uzyskanego rozkładu gęstości wody [27]. Istotnym problemem jest kwestia przewidywania obecności izolowanych cząsteczek wody wewnątrz struktur makromolekularnych oraz oceny efektu termodynamicznego ich związania. Większość dostępnych tu metod jest niestety albo zbyt kosztowna obliczeniowo albo zbyt niedokładna dla zapewnienia ilościowo poprawnych wyników, co sprawia, że możliwość ich zastosowania w praktycznie istotnych zagadnieniach takich jak na przykład ocena oddziaływania ligandów z receptorami molekularnymi jest ograniczona.

Cel naukowy pracy. Celem naukowym badań, których wyniki opisano w prezentowanym cyklu publikacji, było pogłębienie istniejącej wiedzy w zakresie oddziaływania środowiska wodnego z biomolekułami jak również opracowanie nowej metody modelowania efektów hydratacyjnych. Uzyskane wyniki obejmują: a) analizę wpływu efektów hydratacyjnych na parametry termodynamiczne oraz kinetyczne procesu asocjacji obiektów o wklęsłej powierzchni reprezentujących wyidealizowane modele miejsca wiążącego z modelowym ligandem przy wykorzystaniu symulacji dynamiki molekularnej (prace **H1** – **H3**), b) porównanie odwzorowania energii swobodnych hydratacji białek przez pełnoatomowe i uproszczone modele środowiska wodnego (praca **H4**), c) nowe podejście do modelowania efektów hydratacyjnych w układach biomolekularnych, pozwalające na uniknięcie podstawowych problemów popularnych metod

uproszczonych przy zachowaniu ich wysokiej wydajności obliczeniowej (prace **H5 – H7**), d) analizę roli specyficznie zlokalizowanych cząsteczek wody w strukturze podjednostki katalitycznej kinazy białkowej A dla kooperatywnego wiązania substratów (praca **H8**).

4.3.2 Specyficzne aspekty efektów hydratacyjnych w układach biomolekularnych

Pierwsza część cyklu publikacji poświęcona jest analizie roli efektów hydratacyjnych w procesie asocjacji, w modelowych układach ligand-receptor. Uproszczony model miejsca wiążącego receptora biomolekularnego reprezentowany był przez półkulistą wnękę o promieniu $\sim 8 \text{ \AA}$ i ścianach zbudowanych z materiału o właściwościach odpowiadających parafinie. Jego mniej lub bardziej hydrofobowy charakter regulowany był poprzez wielkość punktowego ładunku zlokalizowanego na dnie wnęki. Ligandy reprezentowane były przez sferyczne obiekty o parametrach oddziaływania cząsteczki metanu i różnych wartościach ładunku całkowitego. Wykorzystanie symulacji dynamiki molekularnej z pełnoatomową reprezentacją środowiska wodnego umożliwiło wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu wiązania wraz z wyodrębnieniem wkładów wynikających z obecności cząsteczek wody, jak również zbadanie wpływu fluktuacji wody w rejonie hydrofobowego miejsca wiążącego na kinetykę asocjacji. Według wiedzy autora badania te stanowią pierwszą próbę wnikliwej analizy efektów hydratacyjnych dla procesu asocjacji z udziałem miejsc wiążących o wklęsłej topografii i różnorodnych właściwościach elektrostatycznych. Prowadzone wcześniej prace skupiały się na badaniu oddziaływań modelowych obiektów o generalnie wypukłym kształcie, co ograniczało możliwość wyciągania wniosków bezpośrednio odnoszących się do procesów wiązania ligandów do miejsc wiążących receptora.

W pracy **H1** opisano potencjały średniej siły oraz ich człony entalpowe i entropowe dla procesu wiązania w siedmiu wersjach układu receptor-ligand różniących się rozkładem i wielkością ładunków. Pokazano, że zmiany energii swobodnej hydratacji układów zachodzące podczas asocjacji dają podobnego rzędu wkłady do energii swobodnych wiązania co bezpośrednio oddziaływania pomiędzy miejscem wiążącym i ligandem. Co więcej zademonstrowano, że udział efektów hydratacyjnych nie sprowadza się jedynie do skalowania oddziaływań obecnych w próżni, lecz niejednokrotnie zmienia w sposób jakościowy efekt termodynamiczny procesu asocjacji. Przykładem może być słabsze wiązanie obserwowane w układzie, w którym receptor i ligand obdarzone były przeciwnymi ładunkami, niż w układzie całkowicie neutralnym. W tym pierwszym przypadku bowiem, sprzyjająca wiązaniu duża zmiana energii elektrostatycznej okazała się być prawie całkowicie równoważona przez koszt dehydratacji ładunków podczas tworzenia kompleksu. W drugim przypadku natomiast, stosunkowo słabe oddziaływania dyspersyjne pomiędzy ligandem i receptorem wzmacniane były przez efekty hydrofobowe, które odpowiadały za główną część energii swobodnej wiązania. Inna interesująca obserwacja wynika z porównania układów, w których ładunek obecny był tylko na jednym z oddziałujących obiektów. Zamiana jego lokalizacji z głębi miejsca wiążącego na centrum ligandu, okazała się prowadzić do zmiany bilansu termodynamicznego asocjacji z korzystnego na niekorzystny, pomimo, że nie wpłynęła na energię potencjalną oddziaływania liganda z receptorem. Efekt ten okazał się być wynikiem zależnego od lokalizacji sposobu dehydratacji ładunku podczas tworzenia kompleksu. Kolejny ciekawy wniosek związany był z analizą zmian entropii i entalpii podczas wiązania. Analiza ta pokazała, że energie swobodne asocjacji układów różniących się znakiem całkowitego ładunku mogą być sumą zupełnie różnych wkładów entropowych i entalpowych, wynikających z odmiennej struktury wody wokół ładunków dodatnich i ujemnych.

Szczególnie intrygujące okazały się być parametry termodynamiczne w całkowicie neutralnym, hydrofobowym układzie, których analiza została szczegółowo przedstawiona w pracy **H2**. Zgodnie z przewidywaniami opartymi na dotychczasowych badaniach asocjacji w układach hydrofobowych, translokacja ligandu z obszaru środowiska wodnego do miejsca wiążącego

związana była z obniżeniem energii swobodnej układu. Niespodziewanie jednak, w kontekście ogólnej wiedzy wskazującej, że siłą napędową oddziaływań hydrofobowych są efekty entropowe, zmiana ta była zdominowana przez obniżenie entalpii, przy jednocześnie niekorzystnym wkładzie entropowym. Analiza zmian wkładów do potencjału średniej siły w funkcji położenia ligandu względem miejsca wiążącego wykazała, że niekorzystne dla procesu wiązania obniżenie entropii nastąpiło jednocześnie z wystąpieniem tzw. zjawiska wysuszenia. Polega ono na kolektywnej ucieczce cząsteczek wody z wnęki hydrofobowej przy przekroczeniu przez zbliżający się ligand pewnej odległości granicznej. Obniżenie entropii układu wytłumaczono w pracy **H2** zauważając, że przy braku ligandu gęstość wody w rozważanej wnęce hydrofobowej podlega znaczącym fluktuacjom, odpowiadającym cykлом spontanicznego zwilżania-wysuszenia, które w obecności ligandu zostają stłumione. Co istotne, samo zjawisko wysuszenia wnęki nie wiąże się ze zmianą energii swobodnej układu: niekorzystny efekt entropowy jest bowiem idealnie kompensowany przez obniżenie entalpii wynikające z nawiązania dodatkowych oddziaływań przez cząsteczki wody opuszczające wnękę z resztą rozpuszczalnika. Efekt wysuszenia determinuje jednak charakter całego procesu asocjacji jako napędzanego obniżeniem entalpii, gdyż dehydratacja ligandu odpowiadająca za właściwą zmianę energii swobodnej wiąże się ze stosunkowo niewielkimi wkładem entalpowym i entropowym.

Mimo iż opisane w pracy **H2** efekty rozważane były na podstawie modelowego układu, ich zrozumienie ma istotne znaczenie praktyczne. Wraz z rozwojem metod obliczeniowych i eksperymentalnych obszary hydrofobowe wypełnione przez cząsteczki wody o wysokiej dynamice, które nie tworzą stabilnych struktur, a zatem charakteryzują się potencjalnie o wysoką wyjściową entropią, obserwowane są w coraz większej liczbie układów makromolekularnych. Dehydratacja takich właśnie obszarów, na przykład podczas wiązania niepolarnych ligandów, zdaje się faktycznie prowadzić do wystąpienia, specyficznej z termodynamicznego punktu widzenia, formy efektów hydrofobowych związanych z korzystną zmianą entalpii i niekorzystnym wkładem entropowym.

Wspomniane powyżej cykle spontanicznego zwilżania-wysuszenia w obszarze wnęki hydrofobowej okazały się mieć interesujący wpływ na kinetykę procesu asocjacji, co przedstawione zostało w pracy **H3**. Zaobserwowano, że średni czas asocjacji w układzie hydrofobowym wyznaczony na podstawie symulacji dynamiki molekularnej z pełnoatomową reprezentacją środowiska wodnego był o około 100 ps dłuższy niż uzyskany na podstawie symulacji dynamiki brownowskiej ligandu w odpowiednim dla układu potencjale średniej siły i przy założeniu stałej wartości współczynnika dyfuzji, odpowiadającej ruchowi ligandu w czystej wodzie. Był to efekt niespodziewany, ponieważ z uwagi na występowanie zjawiska wysuszenia wnęki w symulacjach dynamiki molekularnej zakładano raczej przyspieszenie procesu asocjacji względem układu podlegającego dynamice brownowskiej. Bliższa analiza wskazała, że efekty hydrodynamiczne związane z obecnością fluktuującego rozpuszczalnika odpowiedzialne są za lokalne pojawienie się działających na ligand sił o znacznie dłuższym czasie autokorelacji niż siły determinujące ruch dyfuzyjny w czystej wodzie. W rejonie wejścia do miejsca wiążącego, gdzie amplituda fluktuacji gęstości wody była największa, prowadziło to do kilkukrotnego ($\sim 6\times$) zwiększenia efektywnego współczynnika tarcia translacyjnego dla ruchu ligandu, odpowiadającego za spowolnienie asocjacji. Obserwacje opisane w pracy **H3** dotyczą słabo wcześniej znanego, dynamicznego aspektu efektów hydratacyjnych związanych z procesami wysuszenia, który może mieć istotne znaczenie dla modulacji kinetyki wiązania w układach biomolekularnych. Prace nad jego dalszym badaniem oraz opracowaniem odnośnego modelu teoretycznego podjęte zostały w ramach trwającej do chwili obecnej współpracy z grupą badawczą prof. Joachima Dzubielli z Helmholtz Zentrum w Berlinie (publikacje **A4** – **A5**).

4.3.3 Odwzorowanie efektów hydratacyjnych w symulacjach komputerowych

Wyniki przedstawione w pracach **H1** – **H2** zdają się potwierdzać istotną, nietrywialną rolę środowiska wodnego w kształtowaniu krajobrazu energii swobodnej układów biomolekularnych.

Zasadne jest w tym świetle pytanie na ile dokładny i konsystentny jest opis efektów hydratacyjnych uzyskiwany w ramach dostępnych metod modelowania komputerowego. Eksperymentalne wartości energii swobodnych hydratacji znane są dla wielu małych, na przykład lekopodobnych cząsteczek chemicznych. W tym przypadku ich oszacowanie, zarówno przy wykorzystaniu pełnoatomowej reprezentacji środowiska wodnego jak i metod uproszczonych, było przedmiotem wielu badań, przynosząc wiedzę co do spodziewanej dokładności opisu teoretycznego oraz świadomość jego różnorodnych ograniczeń. W przypadku dużych cząsteczek biologicznych takich jak białka lub kwasy nukleinowe brak jest natomiast danych doświadczalnych nadających się do bezpośredniego, ilościowego porównania z wynikami obliczeń. Sprawia to, iż wiedza dotycząca dokładności odwzorowania efektów hydratacyjnych z ich udziałem opiera się jedynie na pośrednich przesłankach oraz założeniu, że parametry modeli wykorzystywane dla małych cząsteczek można z powodzeniem stosować w opisie makromolekuł.

Próbie weryfikacji tych założeń opisano w pracy **H4**. Przedstawia ona wyniki obliczeń zmian energii swobodnej hydratacji pomiędzy różnymi konformacjami dla pięciu różnorodnych białek. Obliczenia te wykonano na podstawie symulacji dynamiki molekularnej niezależnie dla dwóch popularnych modeli wody: TIP3P i SPC/E, jak również przy użyciu ciągłego modelu rozpuszczalnika opartego o rozwiązanie równania Poissona i człon niepolarny proporcjonalny do rozmiarów molekuly (poła powierzchni lub objętości). Uzyskane wyniki wskazują, że rozbieżności pomiędzy dwoma modelami pełnoatomowymi są znacząco mniejsze niż pomiędzy nimi, a modelem ciągłym. Średnia kwadratowa różnic uzyskanych wyników w tym drugim przypadku była pięciokrotnie większa, osiągając ponad 10 kcal/mol. Co znamienne, rozbieżności wyników we wszystkich przypadkach skalowały się zgodnie z rozmiarami rozważanych struktur, a nie z wielkością zmian energii swobodnych hydratacji pomiędzy ich poszczególnymi konformacjami. Sugeruje to, iż źródłem niezgodności jest raczej odwzorowanie lokalnych zjawisk zachodzących w pierwszej warstwie hydratacyjnej (jej obszar i stopień komplikacji rosną wraz z rozmiarem obiektów), niż opis globalnych efektów elektrostatycznych wynikających z polaryzacji całości ośrodka wodnego (dla mniejszych białek nawet zmiany energii swobodnych hydratacji rzędu 100 kcal/mol, zdominowane przez efekty elektrostatyczne, były odwzorowywane konsystentnie przez wszystkie modele).

Przyjęte jako referencyjne wielkości zmian energii swobodnych hydratacji uzyskane w oparciu o symulacje pełnoatomowe zostały też wykorzystane do zbadania uniwersalności parametrów metody PBSA takich jak stała dielektryczna molekuly, sposób definicji powierzchni granicznej bądź efektywne napięcie powierzchniowe dla różnych układów. Uzyskane wyniki wskazują, na trudność doboru uniwersalnie optymalnych parametrów. Co więcej, ilustrują one brak prostej przenaszalności parametryzacji modelu dla małych cząsteczek chemicznych (reprezentowanych na potrzeby pracy przez pojedyncze aminokwasy) na struktury białkowe. W przypadku makromolekuł, skomplikowana topografia powierzchni oraz obecność rozległego wnętrza niedostępnego dla wody sprawiają, że zakres użytecznych definicji powierzchni granicznej oraz odpowiadających im wartości stałej dielektrycznych stają się ograniczone w stosunku do wartości dających prawidłowe wyniki dla małych cząsteczek. W szczególności, pokazano niezasadność wykorzystania popularnej definicji powierzchni granicznej opartej o powierzchnię van der Waalsa na potrzeby obliczeń członu elektrostatycznego w przypadku makromolekuł.

Istotnym problemem okazała się być dokładność reprezentacji efektów niepolarnych w modelu uproszczonym. Na podstawie symulacji wykorzystujących opis pełnoatomowy zaobserwowano, że towarzyszące zmianom konformacyjnym białek efekty hydratacyjne mogą angażować wkłady niepolarne rzędu kilkudziesięciu kcal/mol. W kilku przypadkach to właśnie ich niedokładne oszacowanie było przyczyną znaczącej niezgodności przewidywań modelu uproszczonego z wynikami symulacji. Uwypukla to problem braku dobrych metod opisu efektów niepolarnych w uproszczonych modelach środowiska wodnego, co może stanowić podstawowy czynnik

ograniczający dokładność tego typu modeli w odniesieniu do makromolekuł. Co istotne, problem ten pozostaje wciąż słabo rozpoznany, gdyż w przypadku małych cząsteczek typowo rozważanych w kontekście parametryzacji i oceny dokładności uproszczonych modeli środowiska wodnego, wkłady niepolarne do energii swobodnej hydratacji są generalnie niewielkie w porównaniu do elektrostatycznych i ich oszacowanie nawet z dużym błędem względnym nie pogarsza znacząco jakości ostatecznych wyników.

Chcąc uzyskać zbiór możliwie wiarygodnych danych referencyjnych dla zmian energii swobodnych hydratacji białek w oparciu o symulacje pełnoatomowego ośrodka wodnego, opracowano metodę reestymacji parametrów termodynamicznych. Pozwala ona na udokładnienie wyników w przypadku, gdy reprezentują one zbiór zmian wartości parametru będącego funkcją stanu, wyznaczonych dla procesów układających się w zamknięty cykl termodynamiczny. Reestymacja odbywa się dzięki nałożeniu więzu wynikającego z właściwości funkcji stanu i wymuszającego sumowanie się wyników obejmujących zamknięty cykl termodynamiczny do zera, przy jednoczesnej minimalizacji ich odstępstw od wartości początkowych, uwzględniając jako wagi oryginalne niepewności każdej z początkowych wartości. Rezultatem jest zbiór wyników obarczonych mniejszymi niż oryginalne niepewnościami, które w sposób prawidłowy realizują kryterium cyklu termodynamicznego. Choć omawianą metodę wprowadzono na potrzeby badań przeprowadzonych w pracy **H4**, ma ona zastosowanie dla dowolnego zbioru danych termodynamicznych spełniających warunki wyjściowe.

Innym ponadstandardowym aspektem metodologicznym wykorzystanym w pracy **H4** było oszacowanie poprawek dla uzyskanych na podstawie symulacji pełnoatomowych wartości zmian energii swobodnych hydratacji, wynikających z faktu wykorzystania periodycznych warunków brzegowych. Pokazano, że poprawki tego typu, choć pomijane w większości prac, mogą sięgać nawet kilku kcal/mol. Co za tym idzie, ich uwzględnienie jest niezbędne do prawidłowego porównania wyników symulacji pełnoatomowych prowadzonych w periodycznych warunkach brzegowych z danymi doświadczalnymi lub z przewidywaniami metod uproszczonych, z reguły zakładających brak periodyczności.

4.3.4 Dyskretny model środowiska wodnego

Świadomość ograniczeń dostępnych modeli uproszczonych środowiska wodnego skłania do poszukiwania nowych rozwiązań. Propozycję takiego rozwiązania przedstawiono w pracach **H5 – H7**. Jest ono oparte na dyskretniej reprezentacji środowiska wodnego, rozpiętej na sieci sześcienniej przestrzennie centrowanej (ang. *body centered cubic lattice*, BCC). W modelu zakłada się, że węzły sieci mogą być zajęte przez cząsteczkę wody lub puste. Zajętość każdego węzła jest funkcją lokalnego nadmiarowego potencjału chemicznego, który zależy od efektywnego oddziaływania z podlegającą hydratacji biomolekułą oraz pozostałą częścią środowiska wodnego. Jest ono obliczane dla różnych orientacji umieszczonego w węźle próbnika reprezentującego cząsteczkę wody. Energia jego oddziaływania z molekułą, dla której prowadzone są obliczenia, opisywana jest przy wykorzystaniu elementów klasycznego pola siłowego: potencjałów Lennarda-Jonesa oraz elektrostatycznego. Oddziaływanie z resztą środowiska wodnego przybliżone jest przez efektywne wiązania wodorowe, których realizacja zależy od zajętości wybranych otaczających węzłów sieci. Wykorzystywana jest tu struktura sieci BCC, pozwalająca uwzględnić tetraedryczną w przybliżeniu geometrię czterech wiązań wodorowych, w których może uczestniczyć pojedyncza cząsteczka wody.

Dla zadanej konformacji molekuly podlegającej hydratacji rozkład wolnych i zajętych węzłów sieci oraz odpowiadająca mu energia swobodna hydratacji molekuly wyznaczone są w sposób iteracyjny. Stan początkowy układu odpowiada całkowicie zajętej sieci. Jego ewolucja polega na usuwaniu wody z węzłów, dla których wartość nadmiarowego potencjału chemicznego przy bieżącej konfiguracji sieci jest wyższa od zadanej wartości granicznej. Proces ten jest

kontynuowany do momentu uzyskania stałej dystrybucji wody na sieci.

Założenia teoretyczne oraz wstępna parametryzacja modelu na podstawie wyznaczonych eksperymentalnie energii swobodnych hydratacji dla 156 cząsteczek lekopodobnych przedstawione zostały w pracy **H5**. Pokazano w niej, że wykorzystując jedynie 6 podlegających dopasowaniu parametrów model jest w stanie dostarczyć energii swobodnej hydratacji dla 16 cząsteczek stanowiących niezależny zbiór testowy z dokładnością podobną do obliczeń opartych o symulacje z pełnoatomową reprezentacją środowiska wodnego. Warto podkreślić, że proponowany model jest wolny od typowych ograniczeń standardowych uproszczonych modeli środowiska wodnego wspomnianych w sekcji 4.3.1. W szczególności, nie bazuje on na geometrycznie zdefiniowanej powierzchni granicznej pomiędzy wnętrzem molekuly, a obszarem rozpuszczalnika. Rozkład wody w obecności molekuly podlegającej hydratacji jest wynikiem obliczeń, co daje możliwość uwzględnienia efektów wysuszenia. W kontekście struktur białek manifestują się one między innymi obecnością wnęk i kieszeni hydrofobowych, które, mimo rozmiarów zdolnych do pomieszczenia cząsteczek wody, pozostają puste. Zdolność modelu do ich różnicowania od podobnych topograficznie obszarów hydrofilowych, wypełnionych przez tzw. zlokalizowane cząsteczki wody została zasygnalizowana w pracy **H5** i rozwinięta w późniejszej pracy **H7** (patrz niżej). Proponowany model nie wymaga również wprowadzenia arbitralnie zdefiniowanej wartości współczynnika napięcia powierzchniowego w celu oszacowania wielkości wkładów niepolarnych. Co ciekawe, mimo iż odwzorowanie skalowania się efektów niepolarnych wraz z rozmiarem podlegającego hydratacji obiektu nie było przedmiotem parametryzacji, model okazał się odwzorowywać zmienność efektywnego współczynnika napięcia powierzchniowego wody w funkcji promienia krzywizny hydratowanej powierzchni zgodnie z przewidywaniami teorii SPT (ang. *Scaled Particle Theory*).

Dalszy rozwój modelu opisano w pracy **H6**. Obejmował on: a) udoskonalenie opisu pierwszej warstwy hydratacyjnej pozwalające na wykluczenie jednego z 6 parametrów fitowalnych, b) wprowadzenie analitycznych poprawek dla oddziaływań elektrostatycznych i dyspersyjnych ze względu na skończony rozmiar sieci oraz c) reparametryzację modelu na nowym zbiorze treningowym, obejmującym 153 molekuly (w tym 33 jony jedno i wieloatomowe) o znanych wartościach energii swobodnej hydratacji. Posługując się zbiorem testowym 533 małych molekuł (w tym 11 jonów) pokazano, że model przy podobnej wydajności obliczeniowej do metody PBSA osiąga lepsze wyniki przewidywań energii swobodnej hydratacji, w szczególności dla cząsteczek naładowanych.

W badaniach opisanych w ramach pracy **H7** skupiono się na wykorzystaniu unikalnej zdolności modelu do przewidywania rozkładu przestrzennego wody w otoczeniu biomolekuly podlegającej hydratacji. Przedstawiono metodę, dzięki której, na podstawie dystrybucji zajętych komórek sieci BCC, możliwe jest wyznaczenie najbardziej prawdopodobnych pozycji poszczególnych cząsteczek wody oraz oszacowanie ich energii swobodnych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku makromolekuł biologicznych oraz ich kompleksów, zawierających wiele cząsteczek wody związanych w izolowanych miejscach hydratacyjnych. Ustalenie ich obecności oraz powinowactwa jest niezbędne do prawidłowego modelowania tego typu układów i, ze względów praktycznych (na przykład w zakresie komputerowo wspomaganego projektowania leków), wydajne rozwiązania w tym zakresie są wciąż poszukiwane.

Wyniki uzyskiwane przy pomocy rozwijanego modelu hydratacyjnego porównano z referencyjnymi wartościami energii swobodnych wiązania cząsteczek wody do wybranych miejsc hydratacyjnych, wyznaczonymi w oparciu o rachunek perturbacyjny i tzw. metodę podwójnego odsprężania (ang. *double decoupling method*), na podstawie symulacji wykorzystujących pełnoatomową reprezentację środowiska wodnego. Pokazano, że dokładność modelu w zakresie przewidywania zajętości sterycznie dostępnych dla wody wnęk w obrębie struktur białek (tj. prawdopodobieństwo prawidłowego rozróżnienia pomiędzy rzeczywiście zajęta lub pustą wnęką) wynosi ponad 90%, a wyniki ilościowe energii swobodnych wiązania cząsteczek wody pozostają w dobrej zgod-

ności z danymi referencyjnymi (średnia kwadratowa różnica energii swobodnych wiązania wody w 48 potencjalnych miejscach hydratacyjnych ~ 2 kcal/mol).

4.3.5 Efekty wynikające z obecności specyficznie związanych cząsteczek wody.

Struktury makromolekuł zawierają izolowane cząsteczki wody, związane w specyficznych miejscach hydratacyjnych. Powtarzalność występowania takich miejsc hydratacyjnych w spokrewnionych ewolucyjnie białkach nasuwa pytanie co do ewentualnej roli funkcjonalnej związanych w nich cząsteczek wody.

W ramach realizowanego pod moim kierownictwem grantu Sonata omówiony powyżej model hydratacyjny (prace **H5** – **H7**) został wykorzystany do systematycznej analizy lokalizacji izolowanych cząsteczek wody związanych w strukturach krystalicznych podjednostek katalitycznych kinaz białkowych. 13 miejsc hydratacyjnych, których umiejscowienie okazało się być uniwersalnie zachowane w strukturach reprezentujących różne podrodziny kinaz, zostało wytypowanych do dalszych badań pod kątem potencjalnej roli funkcjonalnej znajdujących się w nich cząsteczek wody. Szczególnie interesujące okazały się być wyniki dotyczące dwóch miejsc hydratacyjnych, których umiejscowienie sugerowało możliwy udział w modulowaniu oddziaływania podjednostki katalitycznej z substratami. Na podstawie symulacji dynamiki molekularnej kinazy białkowej A (ang. *protein kinase A*, PKA) pokazano w pracy **H8**, że znajdujące się w nich cząsteczki wody są istotne dla występowania scharakteryzowanego w badaniach eksperymentalnych tej kinazy kooperatywnego wiązania ATP oraz substratu peptydowego. Cząsteczka wody zajmująca jedno ze wspomnianych miejsc hydratacyjnych (miejsce A) okazała się uczestniczyć w sieci specyficznych wiązań wodorowych. Za jej pośrednictwem efekt lokalnej zmiany konformacyjnej aminokwasu biorącego udział w wiązaniu ATP przekazywany jest do miejsca wiążącego substrat peptydowy, promując jego konformację korzystnie oddziałującą z tym substratem. Z kolei tworząca dynamiczną strukturę grupa cząsteczek wody w drugim, większym miejscu hydratacyjnym (miejsce B), jest niezbędna dla zapewnienia dużej zmienności konformacyjnej segmentu wiążącego substrat peptydowy, umożliwiając jej precyzyjną modulację przez wspomniany wyżej sygnał allosteryczny. Przeprowadzone symulacje pozwoliły także zbadać mechanizm, za pośrednictwem którego scharakteryzowana doświadczalnie mutacja tyrozyny 204 w PKA na alaninę (Y204A) prowadzi do zniesienia kooperatywności wiązania substratów. Uzyskane wyniki sugerują, że mutacja ta, powodując zaburzenie fluktuacji wody w miejscu B, ogranicza zmienność konformacyjną segmentu wiążącego substrat peptydowy, czyniąc go niepodatnym na modulację allosteryczną. Wyniki te stanowią przykład zdający się potwierdzać potencjalnie istotną rolę funkcjonalną wybranych cząsteczek wody związanych w strukturach makromolekularnych, wskazując na ciekawy, słabo jeszcze zbadany aspekt efektów hydratacyjnych.

4.3.6 Wykorzystanie wyników

Praktyczne wykorzystanie uzyskanych wyników przewidziane jest w odniesieniu do dyskretnego modelu środowiska wodnego. W chwili obecnej model zaimplementowany jest w postaci programu komputerowego w języku C. Program, dostępny dla użytkowników zewnętrznych, umożliwia obliczenia energii swobodnych hydratacji bimolekuł opisanych standardowym, pełnoatomowym polem siłowym, jak również wyznaczanie dystrybucji i energii swobodnych otaczających (i związanych) cząsteczek wody. Dzięki zrównolegleniu kodu umożliwiającemu wydajne wykonywanie obliczeń na współczesnych procesorach wielordzeniowych obliczenia dla średniej wielkości białka (~ 250 aminokwasów) trwają kilka minut.

Aktywnie rozwijany jest również serwis internetowy (dostępny pod adresem: <https://gsolvate.biomod.cent.uw.edu.pl>) korzystający z możliwości ww. programu. Pozwala on użytkownikom na przesłanie własnej struktury biomolekuły, na przykład w postaci pliku w formacie pdb (Protein Databank), i zdalne wykonanie obliczeń. W najbliższym czasie przewidziane

jest poszerzenie możliwości serwisu o generowanie deskryptorów powierzchni molekularnej odzwierciedlających lokalne powinowactwo do cząsteczek wody. Tego typu deskryptory mogą mieć zastosowanie na przykład do typowania obszarów powierzchni białka zaangażowanych w tworzenie kompleksów z innymi białkami. Ukończenie prac nad serwisem oraz udokumentowanie jego możliwości w postaci publikacji planowane jest na rok 2018.

5 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1 Efekty hydrofobowe przebiegające ze zjawiskiem wysuszenia

Badania nad efektami hydrofobowymi były tematem mojej pracy doktorskiej, wykonywanej pod opieką dr. hab. Macieja Gellera. W ramach tych badań opracowałem model hydrofobowych miejsc wiążących w receptorach białkowych pod postacią półkulistych wnęk o rozmiarach subnanometrowych osadzonych w materiale o właściwościach odpowiadających parafinie. Wykorzystując symulacje komputerowe z pełnoatomową reprezentacją środowiska wodnego, scharakteryzowałem właściwości wody w pobliżu wklęsłych powierzchni miejsc wiążących. Pokazałem (praca **A1**), że woda nie tworzy tu warstw hydratacyjnych o wyraźnej strukturze lecz raczej zdeorganizowaną strefę graniczną przypominającą przejście pomiędzy fazą ciekłą i gazową. Co więcej, kolektywne zachowanie cząsteczek wody prowadzi do nasilonych fluktuacji stanu wypełnienia wnęk, tj. ich naprzemiennego wysuszenia i zwilżania.

W dalszym toku pracy, analizując efekty hydratacyjne towarzyszące asocjacji wnęk z modelowym ligandem, reprezentowanym przez obiekt o właściwościach cząsteczki metanu, zaobserwowałem, że przy pewnej krytycznej odległości ligandu od miejsca wiążącego dochodzi do permanentnego wysuszenia wnęk (praca **A2**). Następuje ono pomimo, iż obszar pomiędzy oddziałującymi partnerami jest nadal sterycznie dostępny dla cząsteczek wody i jest związane z pojawieniem się średniej siły sprzyjającej asocjacji, stanowiąc model kolapsu hydrofobowego. Analiza wyznaczonych na podstawie symulacji potencjałów średniej siły dla oddziaływania wnęk z ligandem (prace **A2** i **A3**) doprowadziła do wniosku, iż asocjacja, której towarzyszą zjawiska wysuszenia, może zachodzić bez barier energii swobodnej. Jest to wynik istotnie różny od uzyskiwanych wcześniej dla układów hydrofobowych, których rozmiary i geometria nie prowadzą do wystąpienia zjawiska wysuszenia, i dla których typowo obserwuje się barierę energii swobodnej związaną z koniecznością przerwania ciągłości warstw hydratacyjnych podczas asocjacji.

Wynik ten zainicjował późniejsze badania nad wpływem zjawiska wysuszenia i towarzyszącego mu zniesienia bariery energii swobodnej na kinetykę procesu wiązania (patrz praca **H3** opisana powyżej). Badania te są kontynuowane do chwili obecnej w grupie prof. Joachima Dzubielli z Helmholtz Zentrum Berlin, z moim udziałem jako współpracownika (prace **A4** – **A5**).

- A1** P. Setny, M. Geller, *Water properties inside nanoscopic hydrophobic pocket studied by computer simulations*. J. Chem. Phys., 2006, 125:144717,
- A2** P. Setny, *Water properties and potential of mean force for hydrophobic interactions of methane and nanoscopic pockets studied by computer simulations*. J. Chem. Phys., 2007, 127:54505,
- A3** P. Setny, *Hydrophobic interactions between methane and a nanoscopic pocket: three dimensional distribution of potential of mean force revealed by computer simulations*. J. Chem. Phys., 2008, 128:125105,
- A4** R. G. Weiss, P. Setny, J. Dzubiella, *Solvent Fluctuations Induce Non-Markovian Kinetics in Hydrophobic Pocket-Ligand Binding*. J. Phys. Chem. B, 2016, 120:8127,
- A5** R. G. Weiss, P. Setny, J. Dzubiella, *Principles for Tuning Hydrophobic Ligand–Receptor Binding Kinetics*. J. Chem. Theory Comput., 2017, 13:3012.

5.2 Wariacyjny model efektów hydratacyjnych

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki odnoszące się do efektów wysuszenia w procesie wiązania pomiędzy wnękami hydrofobowymi i modelowym ligandem doprowadziły do nawiązania współpracy z grupą badawczą prof. J. Andrew McCammona z University of California, San Diego. Opracowany przeze mnie układ został wykorzystany do parametryzacji uproszczonego, wariacyjnego modelu środowiska wodnego (ang. *Variational Implicit Solvent Model*, VISM), w którym energia swobodna hydratacji zdefiniowana jest jako funkcjonal powierzchni granicznej oddzielającej rozważaną molekułę od obszaru jednorodnego rozpuszczalnika. Przebieg powierzchni granicznej ustalany jest w procesie minimalizacji energii swobodnej hydratacji, biorąc pod uwagę człony opisujące oddziaływania steryczne i dyspersyjne pomiędzy atomami podlegającej hydratacji molekuły i obszarem rozpuszczalnika oraz pracę potrzebną na wytworzenie powierzchni granicznej z uwzględnieniem jej lokalnej krzywizny. Wykorzystując VISM do opisu modelowego układu receptor-ligand pokazaliśmy (prace **B1** i **B2**), że jest on w stanie odtworzyć efekty wysuszenia. Pozostając w zgodzie z wynikami symulacji pełnoatomowych, model wskazał dwa lokalne minima energii swobodnej hydratacji miejsca wiążącego odpowiadające pustej i wypełnionej przez rozpuszczalnik wnęce hydrofobowej, jak również był w stanie przewidzieć całkowite wysuszenie wnęki w miarę przybliżania się do niej ligandu. Moja rola w tym projekcie polegała na przeprowadzeniu dodatkowych symulacji dynamiki molekularnej mających na celu udokładnienie i pogłębienie obserwacji zgromadzonych w trakcie pracy doktorskiej, jak również na udziale w parametryzacji modelu VISM i interpretacji uzyskanych dzięki niemu wyników.

B1 P. Setny, Z. Wang, L.-T. Cheng, B. Li, J. A. McCammon, J. Dzubiella, *Dewetting-Controlled Binding of Ligands to Hydrophobic Pockets*. Phys. Rev. Lett., 2009, 103:187801,

B2 L.-T. Cheng, Z. Wang, P. Setny, J. Dzubiella, B. Li, J. A. McCammon, *Interfaces and hydrophobic interactions in receptor-ligand systems: A level-set variational implicit solvent approach*. J. Chem. Phys., 2009, 131:144102.

5.3 Modelowanie oddziaływań pomiędzy białkami i kwasami nukleinowymi

Główna tematyka badań prowadzonych przeze mnie w trakcie stażu podoktorskiego w grupie prof. Martina Zachariasia w Technische Universität München, skupiała się na rozwijaniu metod przewidywania struktur kompleksów białek z kwasami nukleinowymi. W ramach poszerzania funkcjonalności rozwijanego w grupie prof. Zachariasia programu ATTRACT, służącego do dokowania białek, zaprojektowałem oraz sparametryzowałem statystyczny potencjał gruboziarnisty opisujący oddziaływania pomiędzy aminokwasami i nukleotydami. Proces parametryzacji potencjału oraz efekty zastosowania go do dokowania białek do RNA i DNA zostały opisane odpowiednio w pracach **C1** i **C2**. Ponadto, dążąc do uwzględnienia zmian konformacyjnych zachodzących w makromolekułach podczas tworzenia kompleksów rozważyłem możliwość stosowania modeli sieci elastycznych do uzyskania opisu globalnych zmian konformacyjnych cząsteczek kwasów nukleinowych. Modele tego typu są powszechnie wykorzystywane dla struktur białkowych jednak ze względu na specyficzną architekturę kwasów nukleinowych szczegóły ich implementacji oraz poprawność uzyskiwanych wyników w odniesieniu do tej grupy makromolekuł pozostawały słabo zbadane. W pracy **C3** rozważyłem szereg wariantów modeli sieci elastycznych dla RNA i DNA oraz przeprowadziłem analizę ich funkcjonowania, co pozwoliło na zasugerowanie możliwie optymalnego rozmieszczenia centrów oddziaływań oraz definicji stałych siłowych potencjałów harmonicznych. Opracowane przeze mnie metody znalazły zastosowanie w modelowaniu kompleksu polimerazy RNA z 6S RNA prowadzonym we współpracy z grupą doświadczalną (praca **C4**).

C1 P. Setny, M. Zacharias, *A coarse-grained force field for Protein-RNA docking*. Nucleic Acids Res., 2011, 39:9118,

- C2** P. Setny, R. P. Bahadur, M. Zacharias, *Protein-DNA docking with a coarse-grained force field*. BMC Bioinformatics, 2012, 13:228,
- C3** P. Setny, M. Zacharias, *Elastic Network Models of Nucleic Acids Flexibility*. J. Chem. Theory Comput., 2013, 9:5460,
- C4** B. Steuten, P. Setny, M. Zacharias, R. Wagner, *Mapping the spatial neighbourhood of the regulatory 6S RNA bound to Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme*. J. Mol. Biol, 2013, 425:3649.

5.4 Badanie oddziaływań ligand-receptor i komputerowo wspomagane projektowanie leków

Wykorzystanie symulacji komputerowych do wyznaczania energii swobodnych oddziaływania ligandów z receptorem było przedmiotem mojej pracy magisterskiej prowadzonej pod opieką dr. hab. Macieja Gellera. W pracy tej, wykorzystując rachunek perturbacyjny pokazano, że mechanizm podwójnej specyficzności kinazy CK2 w stosunku do substratu będącego donorem reszty fosforanowej możliwy jest dzięki obecności cząsteczek wody w miejscu wiążącym. Wytworzenie równocennych, specyficznych oddziaływań z dwoma różnymi ligandami, okazało się być możliwe dzięki rearanżacji utrzymywanej przez nie sieci wiązań wodorowych (praca **D1**).

Od wczesnych lat studiów magisterskich na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego jednym z istotnych tematów moich zainteresowań jest komputerowo wspomagane projektowanie leków (ang. *Computer Aided Drug Design, CADD*). Pracując w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego UW zajmowałem się koordynacją licencji krajowych na oprogramowanie stosowane w tej dziedzinie oraz udzielałem pomocy merytorycznej jego użytkownikom. Owocem zebranych doświadczeń jest opracowany przeze mnie przegląd metod CADD, dostępny na stronach internetowych ICM UW (https://kdm.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_lekow). W ramach prac badawczych w tym zakresie byłem zaangażowany jako doktorant w projekcie prowadzonym pod kierownictwem prof. Bogdana Lesynga mając na celu opracowanie ligandów dla kinaz białkowych z rodziny JAK. W późniejszym okresie współpracowałem z prof. Joanną Trylską w ramach projektu poświęconego oddziaływaniu miejsca wiążącego A w rybosomie z antybiotykami aminoglikozydowymi (prace **D2** i **D3**).

- D1** P. Setny, M. Geller, *Refinement of X-ray data on dual cosubstrate specificity of CK2 kinase by free energy calculations based on molecular dynamics simulation*. Proteins, 2005, 58:511,
- D2** J. Romanowska, P. Setny, J. Trylska, *Molecular dynamics study of the ribosomal A-site*. J. Phys. Chem. B, 2008, 112:15227,
- D3** P. Setny, J. Trylska, *Search for novel aminoglycosides by combining fragment-based virtual screening and 3D-QSAR scoring*. J. Chem. Inf. Model., 2009, 49:390.

5.5 Oddziaływanie peptydu fuzyjnego wirusa grypy z błoną lipidową

Projekt ten realizowany jest w ramach współpracy z grupą doświadczalną dr. Remigiusza Worchy z Polskiej Akademii Nauk. Moją rolą jest wykorzystanie metod modelowania komputerowego do interpretacji danych eksperymentalnych w oparciu o reprezentowany w rozdzielczości atomowej model peptydu fuzyjnego wirusa grypy w podwójnej błonie lipidowej. Prace prowadzone są w oparciu o symulacje dynamiki molekularnej, przy wykorzystaniu metody wymiany kopii badanego układu symulowanych w różnych temperaturach (ang. *replica exchange molecular dynamics, REMD*). W ich ramach zbadałem wpływ różnych konfiguracji peptydu na stopień uporządkowania

błony, jak również scharakteryzowałem wpływ jego trzech specyficznych aminokwasów oraz grupy N-końcowej na podniesienie zdolności do zaburzenia struktury dwuwarstwy lipidowej (prace **E1**, **E2**). Obecne badania koncentrują się na roli zawartego w błonie cholesterolu dla funkcji peptydu fuzyjnego.

E1 R. Worch, J. Krupa, A. Filipek, A. Szymaniec, P. Setny, *Three conserved C-terminal residues of influenza fusion peptide alter its behavior at the membrane interface*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2017, 1861:97,

E2 R. Worch, A. Dudek, J. Krupa, A. Szymaniec, P. Setny, *Charged N-terminus of Influenza Fusion Peptide Facilitates Membrane Fusion*. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19:578.

Literatura

- [1] P. Ball, Water is an active matrix of life for cell and molecular biology, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, 201703781 (2017).
- [2] D. Chandler, Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly., *Nature* **437**(7059), 640 (2005).
- [3] A. Warshel, J. Åqvist, Electrostatic energy and macromolecular function, *Annu. Rev. Biophys. ...* **20**, 267 (1991).
- [4] V. Helms, Protein dynamics tightly connected to the dynamics of surrounding and internal water molecules., *Chemphyschem* **8**(1), 23 (2007).
- [5] S. Park, J. G. Saven, Statistical and molecular dynamics studies of buried waters in globular proteins., *Proteins* **60**(3), 450 (2005).
- [6] M. Levitt, B. H. Park, Water: now you see it, now you don't., *Structure* **1**(4), 223 (1993).
- [7] V. Conti Nibali, M. Havenith, New insights into the role of water in biological function: Terahertz absorption spectroscopy and molecular dynamics simulations studies of the solvation dynamics of biomolecules, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12800 (2014).
- [8] M. P. Allen, D. J. Tildesley, Computer Simulation of Liquids, *Liq. Oxford Univ. Press. New York* **18**(195), 385 (1987).
- [9] A. C. Pan, T. M. Weinreich, S. Piana-Agostinetti, D. E. Shaw, Demonstrating an order-of-magnitude sampling enhancement in molecular dynamics simulations of complex protein systems, *J. Chem. Theory Comput.* p. acs.jctc.5b00913 (2016).
- [10] A. Pohorille, C. Jarzynski, C. Chipot, Good practices in free-energy calculations., *J. Phys. Chem. B* **114**(32), 10235 (2010).
- [11] B. Roux, T. Simonson, Implicit solvent models., *Biophys. Chem.* **78**(1-2), 1 (1999).
- [12] K. A. Sharp, B. Honig, Calculating total electrostatic energies with the nonlinear Poisson-Boltzmann equation, *J. Phys. Chem.* **94**, 7684 (1990).
- [13] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127 (1990).

- [14] R. M. Levy, L. Y. Zhang, E. Gallicchio, A. K. Felts, On the nonpolar hydration free energy of proteins: surface area and continuum solvent models for the solute-solvent interaction energy, *J. Am. Chem. Soc.* **125**(31), 9523 (2003).
- [15] D. L. Mobley, K. L. Wymer, N. M. Lim, J. P. Guthrie, Blind prediction of solvation free energies from the SAMPL4 challenge, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **28**(3), 135 (2014).
- [16] R. Zhou, B. J. Berne, Can a continuum solvent model reproduce the free energy landscape of a beta -hairpin folding in water?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(20), 12777 (2002).
- [17] D. A. Pearlman, Evaluating the molecular mechanics poisson-boltzmann surface area free energy method using a congeneric series of ligands to p38 MAP kinase, *J. Med. Chem.* **48**(24), 7796 (2005).
- [18] A. Cumberworth, J. M. Bui, J. Gsponer, Free energies of solvation in the context of protein folding: Implications for implicit and explicit solvent models, *J. Comput. Chem.* **37**, 629 (2016).
- [19] L. Wang, B. J. Berne, R. A. Friesner, Ligand binding to protein-binding pockets with wet and dry regions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(4), 1326 (2011).
- [20] H. S. Muddana, N. V. Sapra, A. T. Fenley, M. K. Gilson, The electrostatic response of water to neutral polar solutes: implications for continuum solvent modeling, *J. Chem. Phys.* **138**(22), 224504 (2013).
- [21] D. L. Mobley, J. R. Baker, A. E. Barber, C. J. Fennell, K. A. Dill, Charge asymmetries in hydration of polar solutes, *J. Phys. Chem. B* **112**(8), 2405 (2008).
- [22] Grant J. Andrew, A smooth permittivity function for Poisson-Boltzmann solvation methods, *J. Comput. Chem.* **22**(6), 608 (2001).
- [23] E. O. Purisima, T. Sulea, Restoring charge asymmetry in continuum electrostatics calculations of hydration free energies, *J. Phys. Chem. B* **113**(24), 8206 (2009).
- [24] J. A. Wagoner, N. A. Baker, Assessing implicit models for nonpolar mean solvation forces: the importance of dispersion and volume terms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**(22), 8331 (2006).
- [25] J. Florián, A. Warshel, Langevin Dipoles Model for ab Initio Calculations of Chemical Processes in Solution: Parametrization and Application to Hydration Free Energies of Neutral and Ionic Solutes and Conformational Analysis in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B* **101**(28), 5583 (1997).
- [26] A. Kovalenko, F. Hirata, Three-dimensional density profiles of water in contact with a solute of arbitrary shape: a RISM approach, *Chem. Phys. Lett.* **290**(1-3), 237 (1998).
- [27] T. Lazaridis, Inhomogeneous Fluid Approach to Solvation Thermodynamics. 1. Theory, *J. Phys. Chem. B* **102**, 3531 (1998).

28.03.2018

