

AUTOREFERAT

PODPIS ZAUFANY

RAFAŁ
ŚLUSARZ
31.03.2023 22:30:18 [GMT+2]Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym**I. IMIĘ I NAZWISKO**

Rafał Ślusarz

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE

– Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- doktor nauk chemicznych w zakresie chemii,
 - Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2004 r.,
 - rozprawa pt.: *Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G*
- magister chemii,
 - Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 1999 r.

III. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

- 01.04.2001 – 31.08.2003, starszy technik, Wydział Chemii UG
- 01.09.2003 – 31.08.2004, asystent I rok, Wydział Chemii UG
- 01.09.2004 – 31.10.2006, administrator lokalnej sieci komputerowej, W. Chemii UG
- 01.11.2006 – obecnie, adiunkt, Wydział Chemii UG

Opis przebiegu mojej kariery zawodowej zawarłem w punkcie **VII.** niniejszego Autoreferatu, poniżej.

IV. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.)

PRACE STANOWIĄCE CYKL POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH, ZGODNIE Z ART. 219 UST. 1. PKT. 2B USTAWY

- H01:** Ślusarz, M. J., Sikorska, E., Ślusarz, R., Ciarkowski, J., *Molecular Docking-Based Study of Vasopressin Analogues Modified at Positions 2 and 3 with N-Methylphenylalanine: Influence on Receptor-Bound Conformations and Interactions with Vasopressin and Oxytocin Receptors*, J. Med. Chem. 49 (2006) 2463–2469
- H02:** Ślusarz, M. J., Ślusarz, R., Ciarkowski, J., *Molecular dynamics simulation of human neurohypophyseal hormone receptors complexed with oxytocin—modeling of an activated state*, J. Pept. Sci. 12 (2006) 171–179
- H03:** Ślusarz, M. J., Gieldoń, A., Ślusarz, R., Ciarkowski, J., *Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors—molecular dynamics study of the activated receptor–vasopressin–Gα systems*, J. Pept. Sci. 12 (2006) 180–189
- H04:** Ślusarz, M. J., Ślusarz, R., Ciarkowski, J., *Investigation of mechanism of desmopressin binding in vasopressin V2 receptor versus vasopressin V1a and oxytocin receptors: Molecular dynamics simulation of the agonist-bound state in the membrane–aqueous system*, Biopolymers 81 (2006) 321–338
- H05:** Ślusarz, R., Sikorska, E., Ślusarz, M. J., *Theoretical Study on Interactions of Bicyclic Vasopressin Analogues with Human Neurohypophyseal Hormone Receptors*, QSAR Comb. Sci. 27 (2008) 834–840
- H06:** Ślusarz, R., Ślusarz, M. J., *An Influence of the Aromatic Side Chains Conformations in Positions 2 and 3 of Vasopressin Analogs on Interactions with Vasopressin and Oxytocin Receptors*, QSAR Comb. Sci. 28 (2009) 1166–1175
- H07:** Ślusarz, M.J., Ślusarz, R., Ciarkowski, J., *Molecular dynamics study of the internal water molecules in vasopressin and oxytocin receptors*, Prot. Pept. Lett., 16 (2009), 342–350
- H08:** Ślusarz, R., Ślusarz, M. J., Samaszko, J., Madaj, J., *Conformational changes of peptidoglycan fragments during their interactions with vancomycin*, Cent. Eur. J. Chem. 9 (2011) 422–431
- H09:** Ślusarz, R., Szulc, M., Madaj, J., *Molecular modeling of Gram-positive bacteria peptidoglycan layer, selected glycopeptide antibiotics and vancomycin derivatives modified with sugar moieties*, Carbohydr. Res. 389 (2014) 154–164
- H10:** Ślusarz, R., Samaszko-Fiertek, J., Dmochowska, B., Madaj, J., *Molecular dynamics study on the influence of C-terminal sugar substitution on dynamics and conformation of vancomycin derivatives*, J. Carbohydr. Chem. 36 (2017) 45–58
- H11:** Dmochowska, B., Pellowska-Januszek, L., Samaszko-Fiertek, J., Ślusarz, R., Wakiec, R., Madaj, J., *Efficient synthesis and antifungal investigation of nucleosides' quaternary ammonium salt derivatives*, Turk. J. Chem. 43 (2019) 157–171

- H12:** Dmochowska, B., Ślusarz, R., Chojnacki, J., Samaszko-Fiertek, J., Madaj, J., *The Quaternization Reaction of 5-O-Sulfonates of Methyl 2,3-o-Isopropylidene-β-D-Ribofuranoside with Selected Heterocyclic and Aliphatic Amines*, *Molecules* 25 (2020) 2161
- H13:** Ślusarz, R., Dmochowska, B., Samaszko-Fiertek, J., Brzozowski, K., Madaj, J., *NMR and MD Analysis of the Bonding Interaction of Vancomycin with Muramyl Pentapeptide*, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 1146
- H14:** Ślusarz, R., Lubecka, E.A., Czaplowski, C., Liwo, A., *Improvements and new functionalities of UNRES server for coarse-grained modeling of protein structure, dynamics, and interactions*, *Front. Mol. Biosci.* 9 (2022) 1071428

Zastosowanie nowych metod modelowania małowcząsteczkowych ligandów i ocena ich aktywności w układach biologicznych

INFORMACJE WSTĘPNE

Oddziaływania międzycząsteczkowe w układach biologicznych są kluczowe dla funkcjonowania każdej żywej komórki. Umożliwiają tworzenie złożonych układów cząsteczek, zapewniają trwałość układów biologicznych, a z drugiej strony umożliwiają ich dynamiczne dostosowywanie się do otoczenia. Modyfikacja struktury dowolnej biomolekuły prowadzi do zmiany jej właściwości fizykochemicznych i w konsekwencji do zmiany jej aktywności biologicznej [1]. Możliwe jest zatem zaprojektowanie lub zmodyfikowanie struktury cząsteczki, lub całego układu oddziałujących molekuł w taki sposób, aby uzyskać pożądany efekt biologiczny [2].

Chcąc przewidzieć lub odtwarzając oddziaływania występujące w układach biologicznych, możemy zastosować symulacje ich zachowania na jednym z trzech podstawowych poziomów teorii. Jeżeli modelowany układ jest relatywnie mały (składa się z kilku lub kilkunastu atomów), to do symulowania jego zachowań możemy użyć bezpośrednio metod kwantowo-mechanicznych, symulując zachowanie całego układu (**H11–12**) lub możemy symulować zaledwie jego część (na przykład w celu jego sparametryzowania, np. w pracach **H01–10** i **H13**). W przypadku układów nieco większych, liczących powyżej kilkunastu lub kilkudziesięciu atomów, z powodzeniem można użyć metod półempirycznych i symulować z ich użyciem zachowanie struktur II-rzędowych (jak na przykład we wszystkich pracach cyklu poza **H12** i **H14**). W skrajnym przypadku, kiedy chcemy zbadać zachowanie dynamiczne lub oddziaływania większych struktur (liczących powyżej kilkuset reszt aminokwasowych), zwłaszcza w większych skalach czasowych (rzędu milisekund), możemy zastosować podejście jeszcze dalej idące i potraktować części tych struktur jako odrębne jednostki, uśrednione fragmenty. Modelowanie takich właśnie jednostek

bądź fragmentów będzie o wiele bardziej wydajne pod względem czasu symulacji, jak i łatwości analizy, ale wyniki będą się odnosiły do całych fragmentów (łańcuchów lub wyodrębnionych grup), nie zaś do pojedynczych atomów je tworzących. Podejście tego typu pozbawia nas możliwości wskazania konkretnych atomów (lub grup funkcyjnych) odpowiadających za konkretne oddziaływania (co jest definicją tego poziomu teorii, mowa bowiem o podejściu i o polach gruboziarnistych). Z tego powodu nie korzystałem z tego typu pól, a jedynie wykorzystałem ich założenia w ujęciu pełnoatomowym (**H09–11, H14**). Należałoby tu wspomnieć o jeszcze jednym, najniżej rozdzielczym modelu (i odpowiadających mu polach sił), a mianowicie o modelu ciągłym, który znajduje zastosowanie w układach o praktycznie dowolnej wielkości. Korzystałem z niego podczas badań realizowanych podczas przygotowywania **H06** i **H11** – wyłącznie do symulowania obecności rozpuszczalnika (konkretnie: wody) i tylko dlatego, że celem tych akurat symulacji nie było badanie oddziaływań z udziałem środowiska.

Takie wieloskalowe podejście umożliwia uzyskanie wyników na najwyższym możliwym poziomie dokładności z jednoczesnym umożliwieniem zbadania wzajemnego oddziaływania zarówno małych cząsteczkowych ligandów (opisywanych przeze mnie we wszystkich pracach cyklu), jak i wielkich, złożonych cząsteczek lub układów cząsteczek, w relatywnie dużych skalach czasowych oraz z wyjściem z bezpiecznej metodologicznie strefy oceny zmian lokalnych.

Cykl publikacji stanowiący moje osiągnięcie naukowe prezentuje założenia, metody i wnioski wynikające z modelowania oddziaływań występujących pomiędzy małych cząsteczkowymi ligandami a cząsteczkami chemicznymi o różnej wielkości. Ligandy te występują jako związki endogenne w organizmach żywych (**H02–03, H07–10, H13**), lub są substancjami egzogennymi, których struktury zostały zmodyfikowane, dzięki czemu są lub mogą być stosowane jako leki (**H01, H04–06, H09–10**) lub jako czynniki zwalczające patogenne mikroorganizmy (**H11–12**).

Pierwsza część cyklu prac stanowiącego moje osiągnięcie habilitacyjne (**H01–07**), opisuje badania związane z hormonami podwzgórza – argininową wazopresyną (hormonem antydiuretycznym) oraz oksytocyną (neuroprzebieżnikiem powiązany z akcją porodową, laktacją i zachowaniami społecznymi). Ich oddziaływanie z właściwymi receptorami było także porównane do oddziaływań ligandów zmodyfikowanych – część ich struktury (np. pojedyncze reszty aminokwasowe) były zastępowane innymi. W omawianych pracach część prezentowanych modyfikacji struktury tych dwóch hormonów została zastosowana już na etapie syntezy tych związków i miała na celu zwiększenie ich aktywności lub wymuszenie selektywności w ich działaniu. W swoich badaniach skupiłem się na tym, jak owe

modyfikacje wpływają na oddziaływanie z receptorem, czy modyfikacje są korzystne i wywołują zamierzone efekty biologiczne, oraz jakie jeszcze inne modyfikacje struktury cząsteczki przyczyniłyby się do otrzymania cząsteczek o pożądanej aktywności.

Druga część cyklu (**H08–10, H13**) są to prace dotyczące wankomycyny, antybiotyku glikoproteinowego naturalnego pochodzenia. Oddziaływanie wankomycyny z naturalnym (lub o zmutowanej sekwencji aminokwasowej) fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich decyduje o poprawnym rozpoznawaniu i blokowaniu syntezy peptydoglikanu warunkując bakteriostatyczne działanie tego antybiotyku. Modelując oddziaływania wankomycyny z peptydoglikanem, skupiłem się zarówno na samym mechanizmie tego wiązania, jak i na możliwościach wykorzystania innych grup funkcyjnych, aby doprowadzić do wzmocnienia lub uzupełnienia wyrugowanych oddziaływań. Opisałem i zaproponowałem takie modyfikacje struktury wankomycyny, które zgodnie z wynikami przeprowadzonych przeze mnie badań, prowadzą lub mogą prowadzić do przełamania oporności wypracowanej ewolucyjnie przez bakterie niewrażliwe na wankomycynę. Większość przedstawianych tu zmian strukturalnych stanowią moje własne propozycje – ich potencjalna skuteczność jest omawiana w opisywanych pracach. Praca **H09** zawiera także opis modelowania dwóch modeli ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz opis symulacji MD i preferowanych konformacji trzech antybiotyków glikoproteinowych: wankomycyny, telawancyny i oritawancyny.

W przypadku prac **H11** i **H12** przedmiotem moich badań były czwartorzędowe sole amoniowe, pochodne nukleozydów o potencjalnym działaniu przeciwgrzybiczym, zaś praca **H14** scala moje doświadczenia zdobyte podczas wykonywanego wcześniej modelowania rozumianego jako samodzielne przygotowywanie modelowanych struktur oraz prowadzenie symulacji z wykorzystaniem różnorodnych narzędzi – gotowych, jak i przygotowanych samodzielnie na potrzeby konkretnych zadań lub wykorzystywanych w powtarzaniu opracowanych samodzielnie algorytmów postępowania.

Przedstawiony tu cykl prac opisuje spójny zestaw rozwiązań technicznych, metodologicznych i merytorycznych wykorzystujących modelowanie molekularne do badania oddziaływań i zmienności konformacyjnej małowcząsteczkowych ligandów występujących w układach biologicznych o określonych właściwościach. Wskazuję w nim, jak można zastosować lub zmodyfikować znane narzędzia i metody, aby w nowatorski sposób zbadać i cenić oddziaływania występujące w układach biomolekuł.

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA

Dysponując ugruntowanym warsztatem pracy oraz wiedzą i danymi z zakresu aktywacji receptorów z rodziny GPCR [3–4], moim pierwszym i podstawowym zadaniem, które z biegiem czasu doprowadziło do wyodrębnienia niniejszego osiągnięcia naukowego, było przygotowanie pełnoatomowych modeli receptorów hormonów neuroprzysadkowych: wazopresyny (receptorów $V_{1a}R$ i $V_{2}R$) oraz oksytocyny (OTR), opierając ich konstrukcję o receptor rodopsyny wołowej w formie nieaktywnej [5]. Zadanie to zostało zrealizowane w ramach działań prowadzących do opublikowania pracy **H01**. Celem tej pracy było określenie wpływu modyfikacji wprowadzonych w argininowej wazopresynie (AVP: CYFQNCPRG) polegających na podstawieniu 2. i 3. reszty w sekwencji N-metylofenyloalaniną w konfiguracjach D i/lub L oraz określenie, jak takie podstawienia wpływają przede wszystkim na konformację samego hormonu, ale także na rodzaj i jakość wiązania tego typu analogów AVP do oddziałujących z nimi receptorów oraz czy możliwe jest uzyskanie zmian konformacyjnych receptorów sugerujących przyjmowanie przez nie form aktywnych.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował także pełną parametryzację wszystkich niestandardowych, z punktu widzenia baz danych pakietu Amber [6], reszt aminokwasowych, czyli przede wszystkim N-metylofenyloalanin o konfiguracjach D i L. Parametryzacja ta obejmowała przygotowanie pełnej geometrii nowych reszt aminokwasowych, czyli ustalenie długości wiązań pomiędzy poszczególnymi atomami, wartości kątów walencyjnych i torsyjnych oraz wartości ładunków punktowych związanych ze wszystkimi atomami nowoparametryzowanych reszt. Długości wiązań oraz typy atomów wykorzystanych podczas konstrukcji nowych reszt zostały dobrane z wykorzystaniem interpolacji ich wartości i typów atomów istniejących już w bazach pakietu Amber, zaś ładunki związane z poszczególnymi atomami zostały przeze mnie ustalone z wykorzystaniem programu Gamess [7] oraz protokołu RESP [8–9]. Komplet parametrów został następnie wykorzystany do skonstruowania trójwymiarowych, pełnych modeli analogów wazopresyny o sekwencjach: [D-MePhe^{2,3}]AVP, [D-MePhe²,MePhe³]AVP, [MePhe²,D-MePhe³]AVP oraz [MePhe^{2,3}]AVP, w konformacjach zgodnych z dostarczonymi przez współautorów **H01** eksperymentalnymi danymi strukturalnymi (były to dane pozyskane metodami spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego dla struktur, których synteza została opisana wcześniej [10]).

Przygotowane w ten sposób analogi AVP zostały poddane dokowaniu molekularnemu w kieszeniach przygotowanych receptorów (każdy analog w każdym receptorze) z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock z użyciem algorytmu genetycznego [11–12],

który w przeciwieństwie do wykorzystywanych wcześniej w naszym zespole [13] algorytmów statystycznych [14] zapewnił o wiele więcej poprawnych (zgodnych ze stanem wiedzy) oraz korzystnych energetycznie wyników dokowania. Moim wkładem w przygotowanie tej części badań opisanych później w **H01** było zaplanowanie i przygotowanie protokołu wizualizacji położenia analogów AVP w kieszeniach receptorów oraz nałożenie na siebie zadokowanych struktur w celu porównania ich konformacji przed i po dokowaniu. Wykorzystałem do tego przygotowany przez siebie zestaw skryptów powłoki generujących pliki wejściowe do większości popularnych programów wizualizacyjnych (jak wykorzystywany do przygotowania tej pracy Sybyl [15], czy uniwersalne narzędzie pomocnicze RasMol [16]).

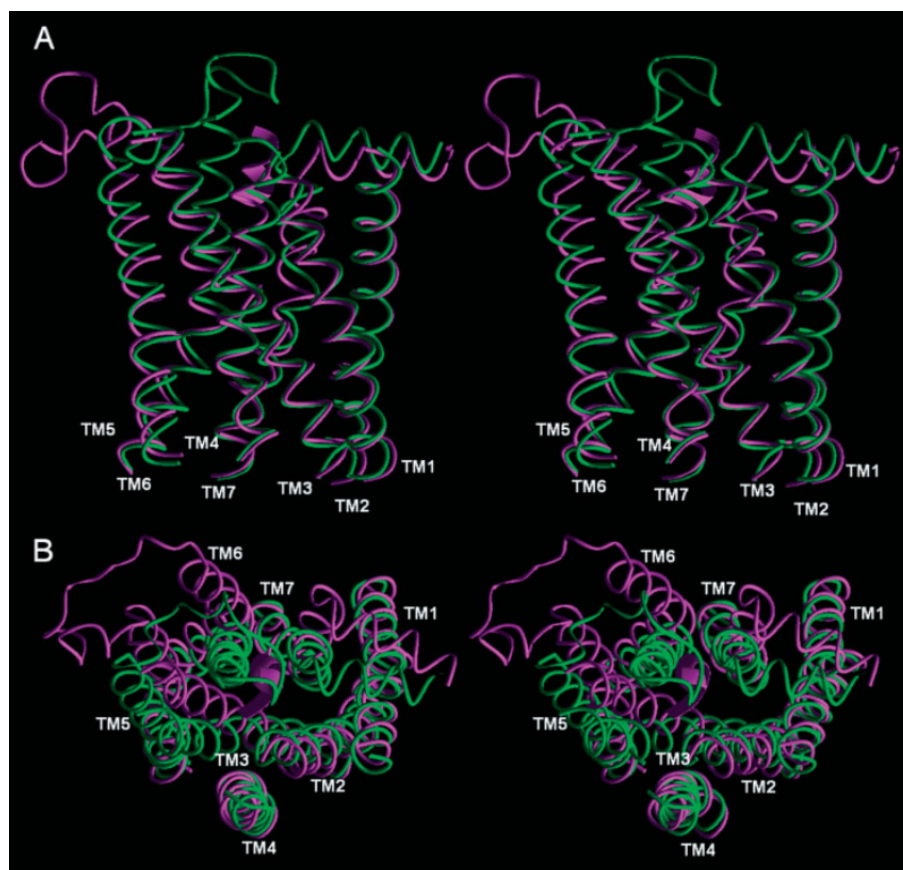
Po dokowaniu analogów AVP do wiążących je receptorów, optymalizacji geometrii kompleksów, minimalizacji ich energii oraz arbitralnym wyborze najkorzystniejszych energetycznie kompleksów, zostało wykonane sterowane wyżarzanie ze schładzaniem (CSA) [17–19] wybranych kompleksów, opis oraz dogłębna dyskusja uzyskanych wyników.

Logiczną konsekwencją przeprowadzonych w **H01** badań było zastosowanie szablonu konstrukcji receptorów $V_{1a}R$, V_2R oraz OTR opartych na aktywnej formie rodopsyny wołowej [4]. Modelowanie molekularne prowadzące do uzyskania aktywnej formy rodopsyny (RD) było częścią mojej rozprawy doktorskiej. Posiadany model jej aktywnej formy stanowił doskonałą bazę do konstrukcji dowolnych receptorów hormonów neuroprzysadkowych ze względu na ich wysoką homologię sekwencyjną, zwłaszcza w helikalnych odcinkach błonowych [20–26]. Dzięki temu zostały przygotowane dwie kolejne prace wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego: **H02** i **H03**.

W celu przygotowania modeli aktywnych form receptorów $V_{1a}R$, V_2R i OTR , nałożyłem ich sekwencje na szablon aktywnej formy RD. W tej części prac porównałem konformacje skonstruowanych receptorów hormonów neuroprzysadkowych przed i po przygotowaniu ich form aktywnych (Rysunek 1).

Do modelowanych układów (w obydwu pracach: **H02** i **H03**) zostały też przeze mnie wprowadzone dwa dodatkowe elementy: podjednostka α białka G (G_α) oraz uwodniona dwuwarstwa lipidowa (model POPC), opisana niżej.

Aktywacja receptorów należących do rodziny GPCR (receptorów wiążących białka G) z definicji przebiega z wiązaniem tychże białek do receptorów od strony komórkowej. Po uzyskaniu formy aktywnej dowolnego receptora tej rodziny, podczas jego wykorzystania w symulacjach, należy zadbać o utrzymanie tejże formy poprzez zapewnienie wiązania z choćby minimalnym reprezentantem tego trimerycznego białka. Zdecydowałem się na



Rysunek 1: Stereodiagramy aktywowanego modelu OTR (purpurowy) nałożone na strukturę nieaktywnego OTR (zielony). Panel A – widok z boku, równoległe do błony komórkowej; panel B – widok od strony cytozolowej. Segment C-końcowy podjednostki G_{α} jest przedstawiony jako wstęga. Źródło: H02, Figure 2.

użycie wyłącznie C-końcowych peptydów samej jednostki G_{α} , ponieważ wiadome było, że tak mały fragment białka G w zupełności wystarczy do utrzymania całego receptora w formie aktywnej [27–28]. Peptydy, o których mowa, są C-końcowymi fragmentami $G_{\alpha}(382–394)$ dla V_2R oraz $Gq/11_{\alpha}(347–359)$ dla $V_{1a}R$ i OTR. Fragmenty te zostały przeze mnie zadokowane w miejscu i według wytycznych pochodzących z danych literaturowych [29–30], oraz uzyskanych wcześniej wyników modelowania podobnych układów [31].

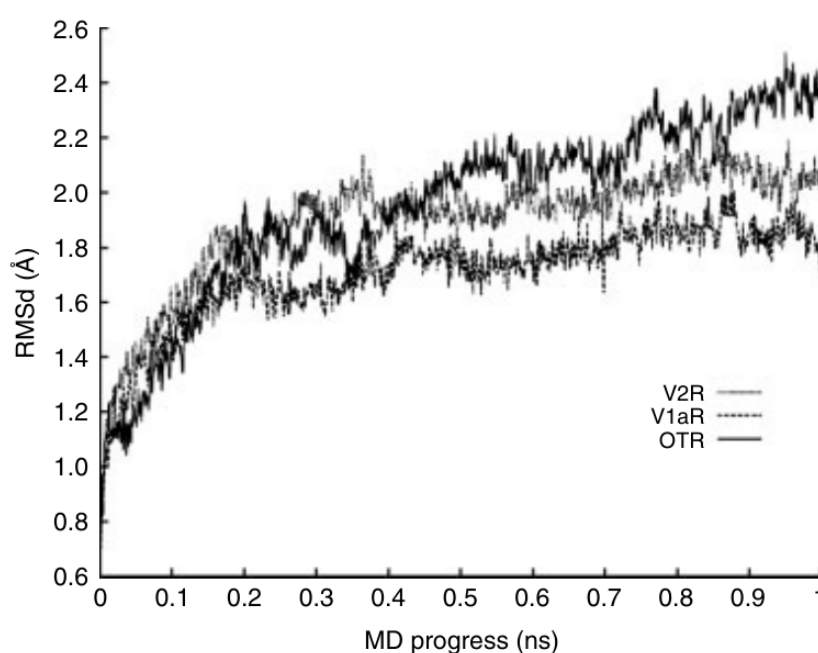
W badaniach opisanych w pracy **H02**, jak i **H03**, przygotowałem pełnoatomowe modele naturalnych ligandów wiązanych przez modelowane receptory. Była to oksytocyna (OT: CYIQNCPLG, wykorzystana w pracy **H02**) oraz AVP (w przypadku pracy **H03**). Są to ligandy endogenne, wiązane w organizmach żywych przez modelowane receptory. Celem tych prac było nie tylko badanie wiązania samych hormonów, lecz także zmian konformacyjnych aktywnych form $V_{1a}R$, V_2R i OTR po związaniu ich z naturalnymi ligandami. AVP i OT zbudowane są ze standardowych reszt aminokwasowych, które są obecne w bazach programów obliczeniowych, natomiast występujący w nich mostek disiarczkowy wymagał parametryzacji przed modelowaniem. Parametryzację wykonałem

w ramach prac wstępnych.

Przygotowane ligandy zostały zadokowane w wiążących je receptorach, poddane optymalizacji geometrii i CSA, a następnie, na podstawie kryteriów energetycznych, zostało wyselekcjonowanych dwanaście kompleksów receptor–ligand (po dwa kompleksy OT w receptorach V_{1a}R, V₂R i OTR w **H02** oraz po dwa kompleksy AVP w receptorach V_{1a}R, V₂R i OTR w **H03**). Kompleksy te zostały następnie zanurzone w uwodnionej dwuwarstwie lipidowej i poddane dynamice molekularnej (MD). To właśnie podejście stanowi *novum* i rozwinięcie metodologii stosowanej w badaniach prowadzących do **H01**.

Dodanie do układu symulacyjnego warstwy lipidowej, skonstruowanej z powtarzających się 120-tu cząsteczek 1-palmitoilo-2-oleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholin (POPC) ułożonych w dwóch warstwach [32–33] pozwoliło na stopniowe, acz pełne uwolnienie więzów pozycyjnych nałożonych na pozycje atomów C_α reszt aminokwasowych receptorów. Dwuwarstwa lipidowa została otoczona cząsteczkami wody (model symulacyjny TIP3P [34]), zaś całe periodyczne pudła symulacyjne, zostały zbilansowane elektrycznie z użyciem przeciwjonów (anionów chlorkowych).

Po przeprowadzonej w warunkach stałego ciśnienia i temperatury symulacji MD oraz po wyborze korzystniejszych energetycznie kompleksów (spośród odpowiadających sobie par kompleksów) została przeprowadzona pełna analiza oddziaływań pomiędzy ligandami a receptorami w badanych kompleksach. W tej części realizacji prac przeprowadziłem dodatkowo pełną analizę i dyskusję zmian konformacyjnych receptorów podczas symulacji MD (została ona przeze mnie zaprezentowana np. na wykresie Rysunek 2).



Rysunek 2: Reprezentacja zmian RMSd obserwowanych podczas symulacji MD.
Źródło: H03, Figure 3.

	V2R	V1aR	OTR	Reference
AVP(IU/mg)	465	412	17	28
OT(IU/mg)	5	5	450	28
dAVP(IU/mg)	1745 ± 385	346 ± 13	—	114
DAVP(IU/mg)	253 ± 44	1.1 ± 0.04	—	114
dDAVP(IU/mg)	1200 ± 126	0.39 ± 0.2	—	31

Tabela 1: Aktywność biologiczna AVP, OT, dAVP, DAVP i dDAVP w stosunku do odpowiednich receptorów.

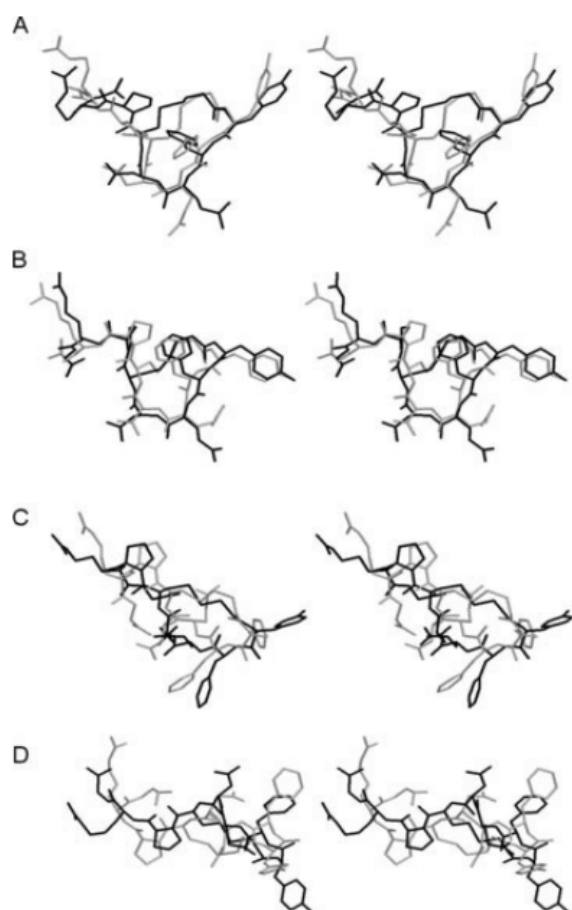
Źródło: H04, Table I.

Wnioski wynikające z identyfikacji konkretnych reszt aminokwasowych tworzących kieszeń wiążącą receptorów hormonów neuroprzysadkowych oraz częściowo współpraca naukowa z Ferring Research Institute, San Diego, USA, posiadającym ówczesnie patent na desmopresynę (dDAVP: [1-deamino, 8-D]AVP), zaowocowały badaniami opracowanymi w **H04**. W ramach tych właśnie badań przestudiowałem mechanizm wiązania dDAVP z V₂R w porównaniu z wiązaniem z V_{1a}R i OTR, przy czym bardzo istotne okazały się wyniki zebrane wcześniej w **H02**, zwłaszcza te opisujące najsilniej konserwatywne reszty zidentyfikowane w receptorze V₂R.

Desmopresyna jest bardzo silnym i selektywnym agonistą V₂R (Tabela 1). Ligand ten stanowił doskonałe narzędzie identyfikacji reszt aminokwasowych receptorów, które są lub mogą być zaangażowane w oddziaływania z endogennymi lub egzogennymi agonistami lub antagonistami.

W przygotowaniu układów symulacyjnych użyłem standardowo wykorzystywanych przeze mnie wcześniej procedur parametryzacji, zaś jako szablonu do przestrzennej konstrukcji dDAVP użyłem struktury kwasu presynowego [35]. Receptory zostały przygotowane w sposób analogiczny do opisywanego w **H02** i **H03** z zastosowaniem tych samych reprezentantów podjednostek α białek G (G_{s α} dla V₂R oraz Gq/11 α dla V_{1a}R i OTR).

Po przygotowaniu przeze mnie pełnoatomowych modeli dDAVP oraz V_{1a}R, V₂R i OTR wraz z odpowiednimi podjednostkami G α , zoptymalizowaniu ich geometrii i zminimalizowaniu energii, ligand został wielokrotnie zadokowany do receptorów, uzyskane kompleksy zostały poddane procedurze CSA, a następnie, spośród wszystkich kompleksów, zostały wybrane po dwa najkorzystniejsze energetycznie. Wybrane kompleksy zostały umieszczone w uwodnionej dwuwarstwie lipidowej (model POPC), zbilansowane przeciwjonami do neutralizacji ładunku elektrycznego i poddane symulacji MD w warunkach stałej temperatury i ciśnienia. Spośród par kompleksów receptor–ligand zostały wybrane po jednym i poddane analizie oddziaływań oraz analizie zmian konformacyjnych receptorów. W przypadku kompleksów z V₂R niestety w żadnym z dwóch symulowanych układów nie



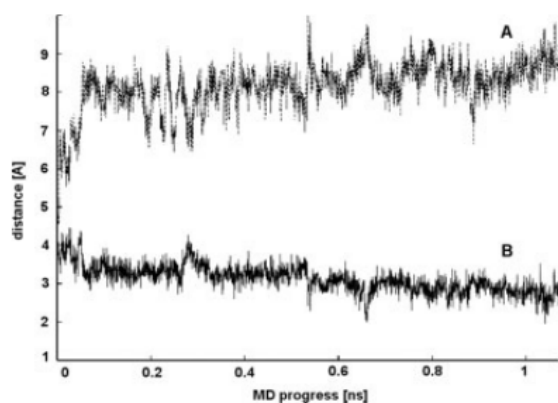
Rysunek 3: Stereodiagramy nałożenia dDAVP przed (szary) i po (czarny) MD. A) i B) to dwa kompleksy w V2R, C) V1aR, D) OTR. Źródło: H04, Figure 3.

oddziaływanie, a następnie umożliwić analizę jego wkładu do puli wszystkich oznaczonych oddziaływań pomiędzy ligandem a receptorem.

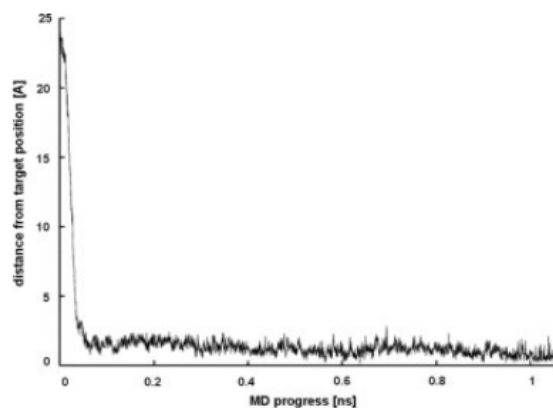
W tej części badań prowadzących do **H04**, przeprowadziłem analizę zmian konformacji dDAVP w trakcie symulacji MD łącznie z porównaniem stanów przed i po dynamice (Rysunek 3). Przygotowałem także analizę trwałości wiązania D-Arg⁸-D103 (Rysunek 4) oraz analizę położenia cząsteczek wody w przebiegu symulacji MD (Rysunek 5).

Przeprowadzono identyfikację wszystkich utworzonych po symulacji MD i końcowych optymalizacjach oddziaływań dDAVP z receptorami oraz receptorów z podjednostkami G_α. Po raz pierwszy świadomie i celowo zwróciliśmy także uwagę na położenia cząsteczek wody, które dodane jako warstwa zewnętrzna, po obydwu stronach symulowanej błony komórkowej, wskutek symulacji MD znajdowały drogę do kieszeni receptorów i często pośredniczyły w wiązaniu podjednostek G_α, ale także stabilizowały położenia samych helis – wiążąc i usztywniając ich względne odległości w części wewnątrzkomórkowej (Rysunek 6). Zaobserwowaliśmy tu, że oddziaływania tworzone z pośrednictwem cząsteczek wody bezpośrednio wpływają na przestrzenną organizację części wewnątrzkomórkowych helis

udało się uzyskać oczekiwanego oddziaływania z resztą D103 receptora która, wg badań eksperymentalnych, jest kluczowa dla wiązania dDAVP [36] mimo że pochodzi z pętli (zewnątrzkomórkowej), a nie z domeny przezbłonowej (helikalnego obszaru błonowego receptora). Z tego właśnie powodu, położenie liganda zostało ręcznie zmodyfikowane poprzez przesunięcie go osiowo w kierunku pętli zewnątrzkomórkowych tak, aby znalazł się w okolicach pierwszej pętli zewnątrzkomórkowej. Kompleks został następnie zrelaksowany z użyciem procedury CSA, a następnie została wznowiona symulacja MD na czas 1 ns. Zabieg ten w zupełności wystarczył, aby uzyskać oczekiwany efekt i poprawnie odtworzyć oznaczone eksperymentalnie



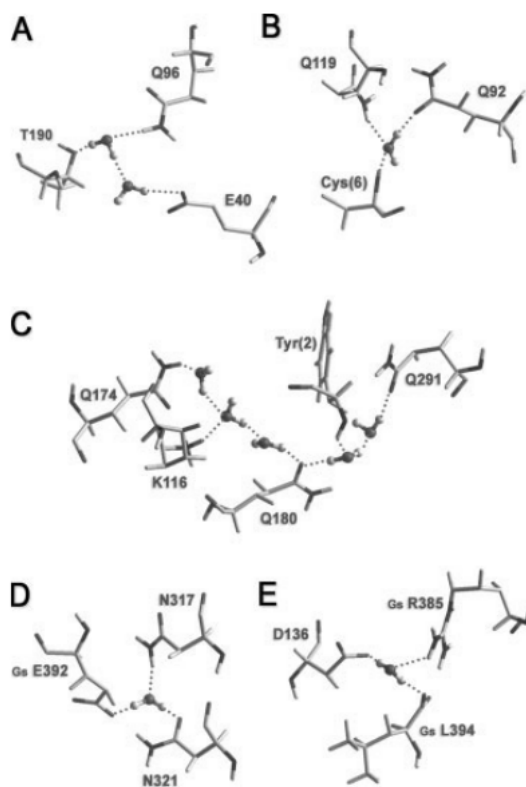
Rysunek 4: Zmiany odległości pomiędzy resztami W2.64 i 99, zakłócającymi mostek solny D-Arg-D103. Źródło: H04, Figure 6.



Rysunek 5: Przykładowa ścieżka ucieczki cząsteczki wody z warstwy solwatacyjnej (odległość od miejsca początkowego). Źródło: H04, Figure 8.

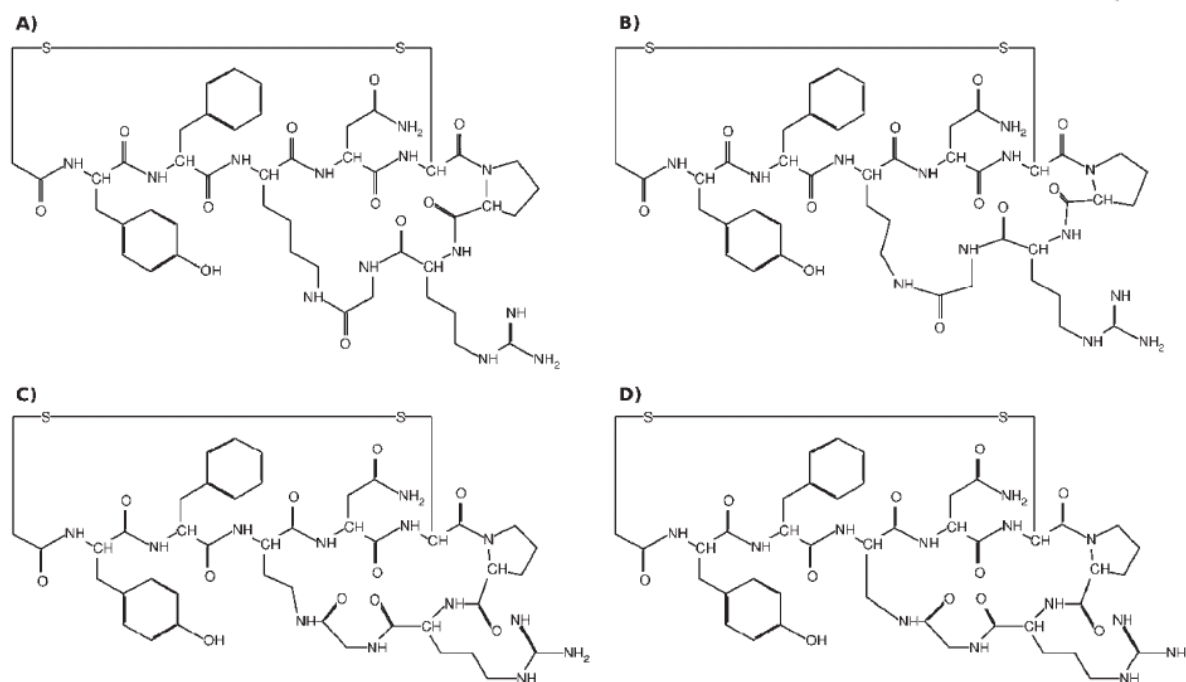
przezbłonowych. W konsekwencji wpływają także na ułożenie helis w błonie, co z kolei powoduje dopasowanie ich części zewnątrzkomórkowych. Ta sekwencja dopasowań wpływa więc bezpośrednio także na ułożenie przestrzenne pętli zewnątrzkomórkowych. Te właśnie wnioski i obserwacje mają ogromne znaczenie dla symulacji GPCR w ogóle i doskonale obrazują poprawność przeprowadzonego modelowania, jak i szeroko rozumianą intuicję chemiczną w tym zakresie.

Symulacje kompleksów zbudowanych z wykorzystaniem receptorów hormonów



Rysunek 6: Repräsentacja oddziaływania receptor-ligand za pośrednictwem cząsteczek wody. Źródło: H04, Figure 9.

neuroprzysadkowych w formach bez aktywacji było naturalną konsekwencją wykorzystania doświadczenia zdobytego w badaniach opisanych w **H04** i stanowiły doskonały wstęp do późniejszej pracy porównawczej **H07**. W pracach tych (**H05** i **H06**) wykonałem modelowanie zsyntezowanych wcześniej [10, 37] wybranych analogów AVP, w których wprowadzona została dodatkowa cyklizacja 4–9 (przedstawiona na rysunku Rysunek 7) i podstawienia kwasem merkaptopropionowym (Mpa), ornityną (Orn), kwasem diaminomasłowym (Dab), diaminopropionowym (Dap) – w **H05**, oraz podstawienia kwasem 2-amino-2-indanokarboksylowym (Aic), Mpa lub D-Arg – w przypadku **H06**. Dodatkowa cyklizacja (**H05**)



Rysunek 7: Struktura analogów AVP; panel A: cyklo-(4-9)-[Mpa¹, Lys⁴]AVP (analog 1); panel B: cyklo-(4-9)-[Mpa¹, Orn⁴]AVP (analog 2); panel C: cyklo-(4-9)-[Mpa¹, Dab⁴]AVP (analog 3); panel D: cyklo-(4-9)-[Mpa¹, Dap⁴]AVP (analog 4). Źródło: H05, Figure 1.

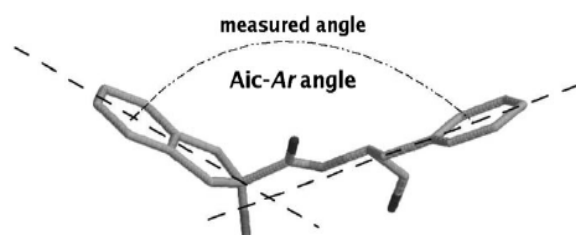
lub podstawienie resztami o wielkim, aromatycznym łańcuchu bocznym (**H06**) stanowiły duże wyzwanie symulacyjne, ponieważ tak znaczące modyfikacje struktury AVP jednoznacznie determinują możliwości oddziaływania nowych analogów ze ściśle przecież określonymi możliwościami oddziaływania z odpowiednimi receptorami. Przygotowany przeze mnie plan pracy musiał więc uwzględniać nie tylko ograniczoną zmienność konformacyjną nowych analogów AVP, ale także wystąpienie możliwych niekorzystnych oddziaływań lub zawał wynikających z wprowadzenia do sekwencji AVP reszty Aic w drugiej, lub trzeciej pozycji.

W procesie badań prowadzących do **H05** i **H06** zaplanowałem cały proces naukowy oraz przygotowałem samodzielnie wszystkie modele opisywanych analogów AVP (4 w **H05** oraz 9 w **H06**), co obejmowało pełną parametryzację niestandardowych reszt: Mpa, Orn, Dab, Dap, Aic (ten: z wykorzystaniem danych strukturalnych z bazy CSDS [38]) oraz D-Arg (w tym ostatnim przypadku nie trzeba było przygotowywać jedynie ładunków punktowych; wykorzystałem oryginalne ładunki pochodzące z argininy o konfiguracji L) oraz parametryzację samego mostkowania 4–9 analogów opisywanych w **H05**. Wprowadzenie w **H06** reszty o wielkim, aromatycznym łańcuchy bocznym (Aic) w bezpośrednim sąsiedztwie innej, aromatycznej reszty aminokwasowej (trzecia w sekwencji: Phe (analogi 1–6), lub Tyr (analogi 7–9)) musiało bezpośrednio wpływać na konformację całego, zmodyfikowanego pierścienia presynowego, stąd w pracy tej została przeze mnie postawiona hipoteza o usztywnianiu zgięcia pierścienia właśnie w tym obszarze. Przygotowałem także

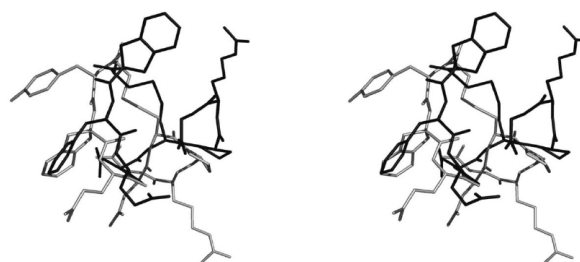
pełnoatomowe modele receptorów $V_{1a}R$, V_2R i OTR, przeprowadziłem relaksacje i optymalizacje wszystkich cząsteczek, które później, na drodze wykonanego przeze mnie dokowania molekularnego zostały złożone w kompleksy symulacyjne. W obydwu pracach dokowania zostały przeprowadzone wielokrotnie (po 100 razy dla każdego z czterech analogów AVP w każdym z trzech receptorów w przypadku **H05** oraz po 30 razy dla każdego z dziewięciu analogów AVP w każdym z trzech receptorów w przypadku **H06**).

Proces symulacji obejmował relaksację przygotowanych przez dokowanie kompleksów, z wykorzystaniem algorytmu CSA. W badaniach prowadzących do **H05**, wybór kompleksów zakwalifikowanych do tego etapu poprzedzony był analizą jakości zadokowanych kompleksów. Analiza ta polegała na ocenie położenia liganda zadokowanego w kieszeni wiążącej każdego receptora (ograniczenie położenia do samej kieszeni) oraz spełnienia zaplanowanych kryteriów energetycznych (żaden z wyliczonych komponentów energetycznych nie mógł być niższy niż odpowiadający mu komponent w przypadku 96% innych zadokowanych ligandów; wartość dobrana wg oceny własnej). Następnie wszystkie zakwalifikowane kompleksy zostały poddane optymalizacji geometrii i minimalizacji energii w polu sił Amber *ff99* [39] w celu półautomatycznego wyeliminowania wszystkich tych kompleksów, w których zadokowane ligandy były w jakikolwiek sposób przeplecione przez łańcuchy boczne reszt receptora lub nie były wystarczająco związane z receptorem, aby prosta minimalizacja energii takich kompleksów nie spowodowała ich oddzielenia od ustalonych dokowaniem pozycji w kieszeniach bez znalezienia korzystniejszych energetycznie położań. W przypadku badań prowadzących do **H06** nie miała miejsca eliminacja kompleksów oparta na kryterium komponentów energetycznych, ale także tu optymalizacja geometrii i minimalizacja energii pozwoliły na zmniejszenie liczby kompleksów skierowanych do CSA. Także w tej pracy zastosowałem dodatkowe podejście analityczne. Przed CSA, a także po nim, przeprowadziłem podział ligandów na rodziny konformacji wg kryterium podobieństwa odchylenia miary RMS przeprowadzony w zestawie narzędzi MMTSB [40]. Analiza tego typu ilościowo określa preferencje wiązania określonych ligandów w kieszeniach wykorzystanych receptorów i umożliwia łatwy wybór reprezentantów każdego kompleksu do dalszych symulacji lub końcowych ocen jakości wiązania danego typu liganda z wybranym receptorem.

W przypadku obydwu tych prac została przeprowadzona pełna analiza zidentyfikowanych oddziaływań oraz analiza porównawcza jakości wiązania poszczególnych ligandów. W przypadku badań prowadzących do **H06** istotnym problemem było jednak zachowanie się konformacyjne całego zmodyfikowanego pierścienia presynowego skorelowane ze zmianami kątów ϕ , ψ a przede wszystkim ω sąsiadujących ze sobą reszt o



Rysunek 8: Kąt Aic-Ar. Ar oznacza resztę Phe (w analogach 1-6) lub Tyr (w analogach 7-9). Źródło: H06, Figure 2.



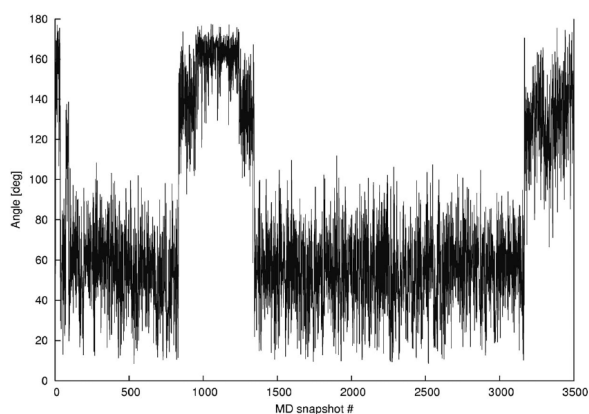
Rysunek 9: Stereoreprezentacja nałożenia analogu 1 (czarny) na analog 7 (szary) po 5,3 ns MD. Źródło: H06, Figure 4.

aromatycznych łańcuchach bocznych (reszt 2. i 3.) wszystkich modelowanych analogów AVP. W celu łatwej identyfikacji preferencji konformacyjnych tego obszaru ligandów zaproponowałem test preferencji konformacyjnych oparty na pomiarze i analizie względnych położenia pierścieni aromatycznych obydwu ocenianych tu pozycjach sekwencji. Zaproponowałem tu pomiar wirtualnego kąta walencyjnego tworzonego pomiędzy pierścieniami aromatycznymi w taki sposób, aby ocena wartości samego tego kąta jednoznacznie obrazowała względne położenia całych łańcuchów bocznych, a przez to także zachowanie łańcucha głównego w obszarze reszt aminokwasowych 2. i 3. (Rysunek 8). Okazało się, że pomysł jest tak skuteczny, że proste porównanie miar oznaczanego kąta pozwala na jednoznaczne zróżnicowanie porównawcze analogów o podobnych preferencjach konformacyjnych, uzasadnienie wystąpienia (lub jego braku) wyprostowanych (rozłożonych przestrzennie liniowo) fragmentów początkowych (N-końcowych) wszystkich ligandów, a przez to możliwość wystąpienia (lub jego brak) oczekiwanych wiązań i oddziaływań w kieszeniach wiążących je receptorów (co jest widoczne na rysunku Rysunek 9 i w tabeli Tabela 2) potwierdzonych doskonałą korelacją z wynikami farmakologicznych badań eksperymentalnych [41–45].

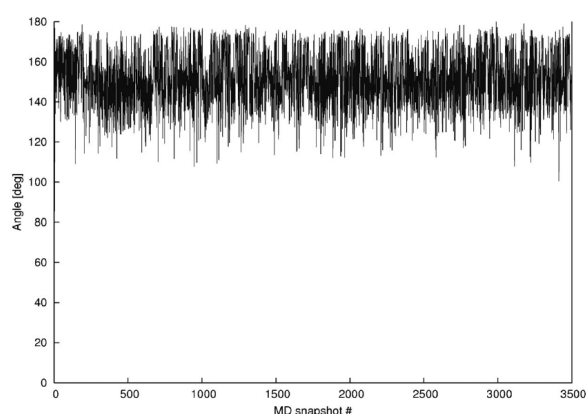
Aby zrozumieć zmiany konformacyjne badanych analogów AVP, dwa z nich (reprezentujące dwie odmienne grupy) zostały podane symulacji MD w wodzie, w modelu ciągłym rozpuszczalnika [46] w czasie symulacji 3,5 ns. Analiza, którą następnie przeprowadziłem,

	Below 120 deg.	Above 120 deg.
OTR	58	212
V1R	74	196
V2R	55	215
Analog 1	2	88
Analog 2	1	89
Analog 3	3	87
Analog 4	1	89
Analog 5	2	88
Analog 6	1	89
Analog 7	64	26
Analog 8	54	36
Analog 9	59	31

Tabela 2: Rozkład wirtualnych kątów walencyjnych Aic-Ar w zależności od receptora i analogu. Źródło: H06, Table 4.



Rysunek 10: Zmiana wartości wirtualnego kąta walencyjnego Aic-Ar podczas symulacji MD analogu 7. Źródło: H06, Figure 6.



Rysunek 11: Zmiana wartości wirtualnego kąta walencyjnego Aic-Ar podczas symulacji MD analogu 1. Źródło: H06, Figure 5.

potwierdziła, że obydwa wybrane analogi (*analog 1* i *analog 7*) rzeczywiście mogą poprawnie reprezentować grupy o podobnych właściwościach i preferencjach konformacyjnych (odpowiednio grupę analogów 1–6 oraz 7–9). Preferując one konkretne, powtarzalne konformacje makropierścieni (Rysunek 9), a także utrzymują konsekwentnie oznaczone wcześniej miary wirtualnych kątów pomiędzy resztami aromatycznymi łańcuchów bocznych reszt w pozycjach 2. i 3. (Rysunek 10 oraz Rysunek 11).

Obserwacje dotyczące zachowania się i roli cząsteczek wody, które pośredniczą w oddziaływaniach pomiędzy ligandem a receptorem oraz fragmentem białka G a receptorem, zostały zostały częściowo omówione w pracy **H04**.

Podobne obserwacje poczyniliśmy już podczas realizacji prac **H02**, **H03** i **H05**, a także trzech starszych, niewchodzących w skład niniejszego osiągnięcia (pozycje **b06**, **b09** i **a01** na dołączonym do Wniosku **Wykazie osiągnięć (Załącznik 4a)**). Samo zagadnienie oddziaływań tworzonych za pośrednictwem cząsteczek wody wydało się nam na tyle interesujące i ważne, że zdecydowaliśmy się na przeprowadzenie dodatkowych symulacji zachowania układów i ich analizę pod tym właśnie kątem.

Moją rolą w przygotowaniu układów symulacyjnych była konstrukcja modeli przestrzennych samych receptorów $V_{1a}R$, V_2R i OTR, zoptymalizowanie ich geometrii i minimalizacja energii. Aby łatwo można było porównywać zachowanie się cząsteczek wody w symulacjach pustych (niezwiązanych z żadnymi ligandami) receptorów z symulacjami prowadzonymi z zadokowanymi AVP lub OT, wykorzystałem receptory zbudowane wcześniej przeze mnie, oparte na nieaktywnej formie RD [5], o odpowiednio zmutowanej sekwencji, aby uzyskać poprawne sekwencje $V_{1a}R$, V_2R i OTR. Podałem je relaksacji z wykorzystaniem protokołu CSA i krótkiej (500 ps) dynamice, a następnie minimalizacji energii w polu sił Amber *ff99*. Ligandy (AVP i OT) zostały przeze mnie przygotowane

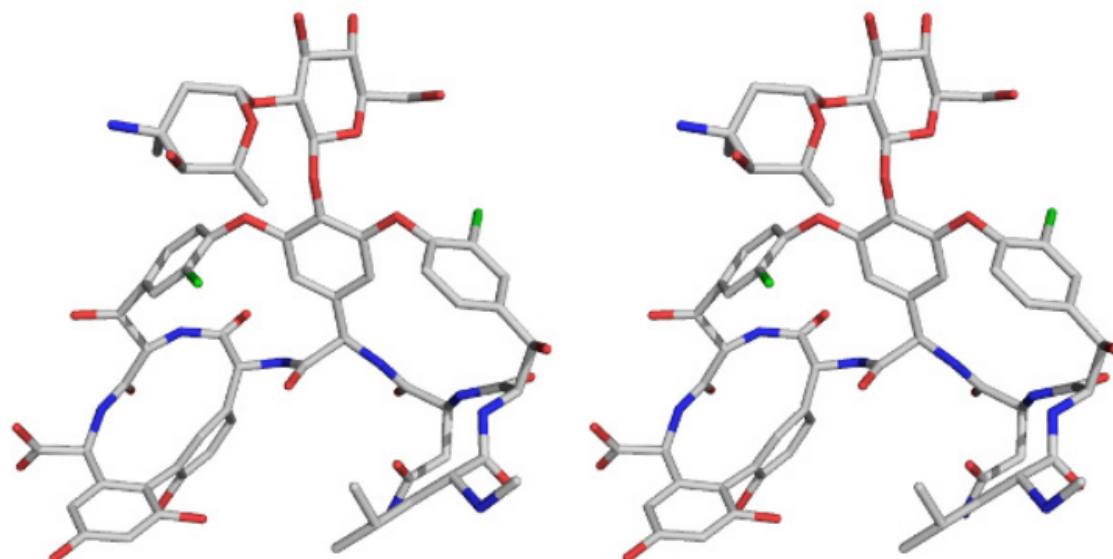
Wat. OTR	Energy [kcal/mol]	Wat. V1aR	Energy [kcal/mol]	Wat. V2R	Energy [kcal/mol]
1116	-6.3±6.5	2599	-9.5±2.4	2767	-17.2±3.6
1546	-7.1±5.1	2873	-3.2±2.7	2783	-16.6±2.2
1679	-13.2±3.9	3456	-2.4±2.6	3039	-13.1±2.5
2213	-11.0±2.9	3565	-18.8±3.9	3304	-14.5±4.0
2374	-8.3±3.0	3852	-16.7±3.2	3569	-15.0±2.6
2671	-4.3±4.5	3853	-1.7±2.4	3830	-16.2±3.0
2770	-2.8±1.9	4160	-11.5±2.5	3863	-12.7±5.6
2874	-6.4±3.5	4274	-16.8±3.1	3882	-13.9±2.6
2893	-12.7±6.1	4894	-18.6±6.8	4094	-17.1±2.4
3213	-9.9±3.7	6277	-14.4±6.2	4095	-20.5±2.3
3255	-26.8±3.9	7078	-1.5±1.1	4173	-20.1±2.5
3851	-15.0±3.6			5083	-10.7±2.8
4012	-8.8±6.9				

Tabela 3: Energie oddziaływań pomiędzy cząsteczkami wody a resztami aminokwasowymi kieszeni wiążących receptorów. Źródło: H07, Table 2.

z wykorzystaniem procedur opisanych poprzednio, a następnie zrelaksowane z wykorzystaniem protokołu CSA, jednak bez stosowania wiązań pozycyjnych [17].

Z tak przygotowanych komponentów zostały następnie skompletowane pełne układy symulacyjne: receptory V_{1aR}, V_{2R} i OTR puste (niezwiązane z żadnymi ligandami), ale także te same receptory z zadokowanymi, odpowiednimi ligandami (ich agonistami: AVP w V_{1aR} i V_{2R} oraz OT w OTR). Zostały one umieszczone w dwuwarstwie lipidowej (model POPC), zbilansowane przeciwjonami do neutralizacji ładunku układu i otoczone warstwą wody – wszystko to z zachowaniem periodyczności układów. Układy (6 kompleksów) zostały poddane symulacji MD w ciągu 1 ns symulacji, a następnie poddane pełnej analizie położenia i tworzenia wiązań z udziałem cząsteczek wody. Moje zadanie w tej części realizacji badań prowadzących do H07 polegało na zaplanowaniu i przeprowadzeniu protokołu postępowania, który pozwalał na ocenę lub pomiar jakości oddziaływań samych cząsteczek wody, lub z ich udziałem, wyrażonych jako energia takich oddziaływań. Zadanie to zrealizowałem przygotowując własne skrypty służące do identyfikacji zaangażowanych w wiązania cząsteczek wody oraz moduł *anal* pochodzący z pakietu Amber [6]. Energie oddziaływań obliczyłem jako sumę oddziaływań elektrostatycznych i van der Waalsa stosując promień odcięcia równy 9 Å, zaś uzyskane wyniki przedstawiłem w tabeli (Tabela 3).

Wybierane dotychczas przeze mnie narzędzia oraz metody badania oddziaływań w układach białkowych okazały się na tyle skuteczne, że postanowiłem zastosować je także do oceny jakości oddziaływań w układach cukrowych i glikoproteinowych. W ten sposób przygotowałem prace H08–H10 i częściowo pracę H13. We wszystkich tych przypadkach



Rysunek 12: Stereoreprezentacja cząsteczki wankomycyny. Źródło: H08, Figure 1.

nadal mamy do czynienia z układem oddziałującym typu receptor–ligand, przy czym „receptorem” można nazwać C-końcowy pentapeptyd peptydoglikanu (PG) reprezentujący ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich, zaś „ligandem” jest tu cząsteczka wankomycyny (Van) – glikoproteinowego antybiotyku. Co prawda Van (o liczbie atomów poniżej 150) jest większa od pentapeptydu (o liczbie atomów w przedziale 300–800), jednak to właśnie Van jest cząsteczką „poszukującą” właściwego dopasowania i to ona zbliża się do miejsca, w którym może nastąpić jej wiązanie. Peptydoglikan (rozumiany jako ściana komórkowa) jest zdecydowanie większy od Van jednak, analogicznie do par „hormony naoprzysadkowe–GPCR”, modyfikować możemy tylko tę cząsteczkę, na którą mamy jakikolwiek wpływ, a więc ligand, którym w tym przypadku jest Van.

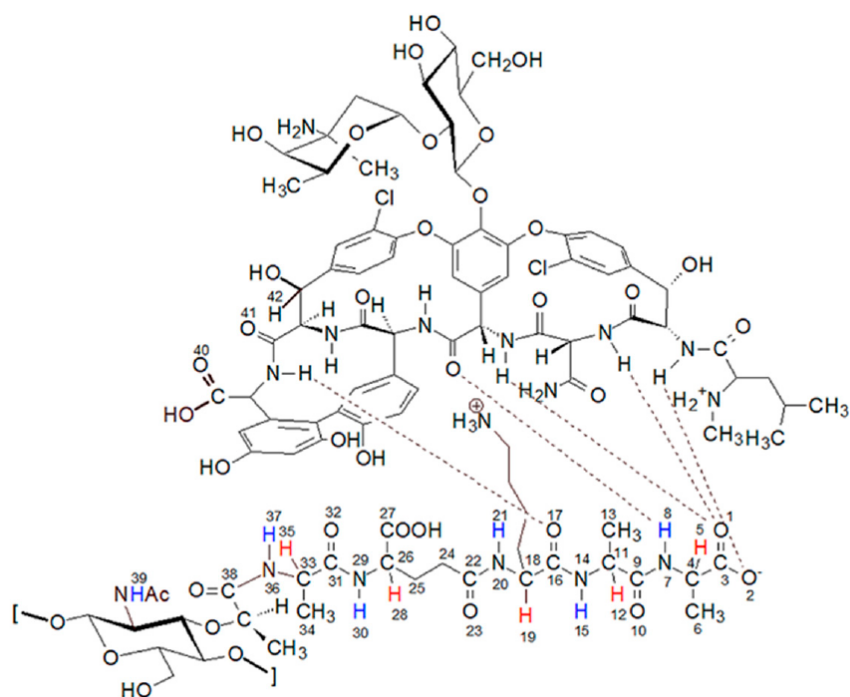
Modelowanie zachowań dynamicznych Van jest o tyle trudne, że wymaga specjalnego potraktowania tej cząsteczki jako całości, mimo że składa się z dwóch części o zróżnicowanych właściwościach i w konsekwencji różnych pod względem wymagań stawianych wykorzystywanym polom siłowym. Części te, to makrocykl zbudowany z reszt Gly (także podstawianych łańcuchem bocznym w postaci Phe), reszt Tyr (dodatkowo podstawionych atomami Cl), reszt Asp i Leu (także metylowanych), zaś z drugiej strony dwucukier zbudowany z wankozaminy i D-glukozy (Rysunek 12). Taka budowa cząsteczki wymaga zastosowania parametryzacji obejmującej zarówno ugrupowania białkowe, jak i cukrowe. Osiągnąłem to łącząc parametry pól *glycam04* [47–48] i *ff03* [49] w pakiecie Amber [50]. Przedtem jednak samą Van musiałem w pełni sparametryzować. Ładunki punktowe pozyskałem używając oprogramowania Gamess [7] i korzystając z protokołu RESP [9] w pakiecie Amber. Po wprowadzeniu tych niestandardowych parametrów do bazy

parametrów pakietu Amber, możliwe było wykonanie obliczeń dotyczących oddziaływań symulowanych przez mnie układów.

Według mojego planu pierwsze symulacje oddziaływań pomiędzy Van a pentapeptydem reprezentującym PG ściany komórkowej bakterii (Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-D-Ala) musiały dotyczyć układu niezmodyfikowanego żadnymi podstawieniami ani mutacjami sekwencji. Jest to symulacja bazowa, do której później można odnosić wyniki kolejnych symulacji i tylko w ten sposób można poprawnie wyciągać jakiegokolwiek wnioski dotyczące wpływu danej modyfikacji na jakość oddziaływania. W badaniach prowadzących do **H08** zastosowałem pentapeptydy o sekwencjach: (1) Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-D-Ala, (2) Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-D-Lac, (3) Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-D-Ser, (4) Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-Ala, (5) Ala-D-Glu-Lys-Ala-D-Ala oraz (6) Ala-D-Glu-Lys-Ala-Ala (modyfikacje te dotyczyły podstawienia dwóch C-końcowych reszt D-Ala resztami Ala w konfiguracji L oraz resztą D-Lac i/lub D-Ser) oraz niezmienioną strukturę Van. W przypadku badań prowadzących do **H13**, pentapeptyd był dodatkowo podstawiony kwasem muraminowym (Mur) na N-końcu, nie był jednak modyfikowany w części C-końcowej, lub był modyfikowany z użyciem reszty D-Ser (w pracy **H13** używane są wtedy oznaczenia odpowiednio MPP-D-Ala lub MPP-D-Ser). Zastosowanie Mur dodatkowo upodabniało skonstruowany pentapeptyd do PG, choć nie było to konieczne, ze względu na potwierdzone działanie samego pentapeptydu jako wystarczającego substytutu całej struktury PG [52–54].

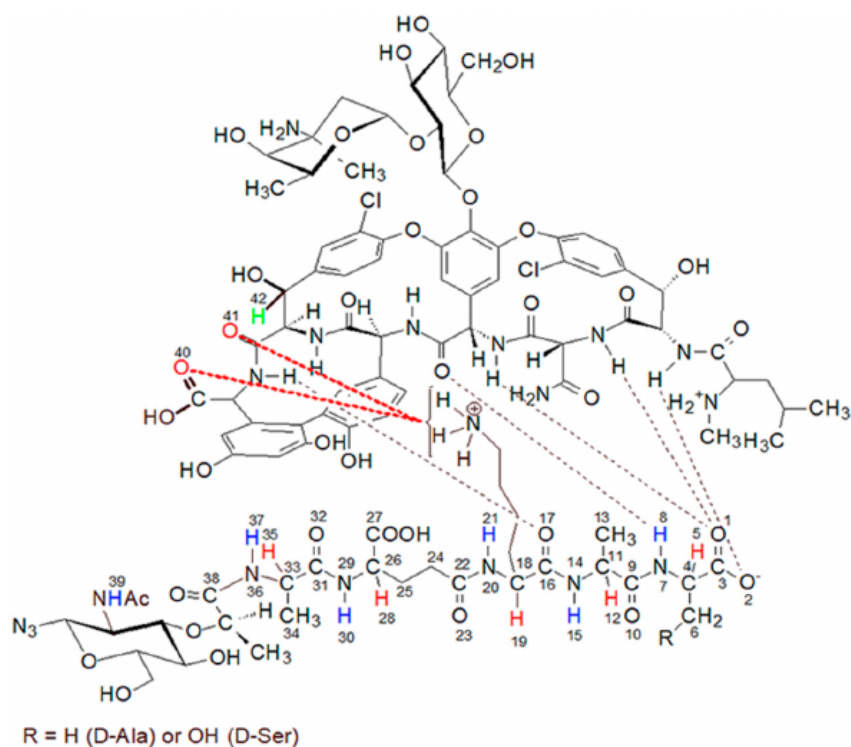
Celem przeprowadzonego w **H08** modelowania było sprawdzenie, w jaki sposób modyfikacje struktury PG wpływają na moc wiązania Van. Niezbędne więc było takie przygotowanie kompleksów startowych, aby jak najdokładniej odzwierciedlały one stan wyjściowy – stan, w jakim znajduje się aktywny kompleks Van z PG ściany komórkowej, którego postać jest znana z wyników badań rentgenostrukturalnych [52–54]. Kompleks taki został przeze mnie zilustrowany na grafice (Rysunek 13).

Sześć reprezentantów PG (5 modyfikowanych i 1 natywny) zostało przeze mnie sparametryzowanych, ich geometrie zostały zoptymalizowane przez zminimalizowanie energii w polu sił $f\theta 3$, a następnie wstępnie zadokowanych w miejscu wyznaczonym przez natywny kompleks Van–pentapeptyd. Kompleks taki dostępny jest w bazie RCSB PDB (rcsb.org [55]) pod oznaczeniem 1FVM [56]. Następnie przeprowadziłem krótką, wstępną symulację MD tak przygotowanych kompleksów z utrzymaniem stałych odległości wyznaczonych przez 5 wiązań wodorowych obecnych w kompleksie natywnym. Takie wzajemne dopasowanie się oddziałujących indywiduów pozwoliło na wyeliminowanie niebezpieczeństwa oddysocjowania oddziałujących cząsteczek wskutek naprężeń strukturalnych, nie zaś wskutek zbyt słabego lub niemożliwego do utrzymania oddziaływania



Rysunek 13: Miejsca wiązania PG do Van. Źródło: H13, Figure 1.

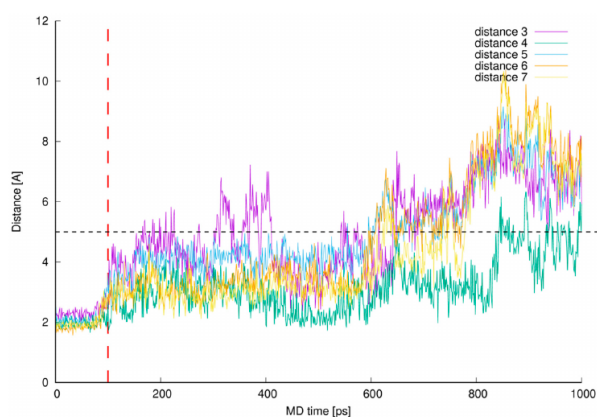
między nimi. Tego typu podejście metodologiczne uzależnia modelowanie molekularne od dostępnych wyników badań eksperymentalnych, które nie mogą być pominięte w żadnych rozważaniach teoretycznych. Po stopniowym uwolnieniu więzów nałożonych na tworzone w kompleksie Van–PG wiązania wodorowych, przeprowadziłem swobodną symulację MD wszystkich kompleksów w wodzie modelowanej jako środowisko ciągłe [57–58]. Po symulacji MD przeprowadziłem analizę energii wiązania wszystkich kompleksów z zastosowaniem algorytmu MM/PBSA [59], dzięki czemu mogłem przeanalizować energię swobodną samego oddziaływania pomiędzy PG a Van bez konieczności uwzględniania rodzaju modyfikacji PG. Oceeniłem także zachodzące w czasie symulacji MD zmiany konformacyjne zarówno PG, jak i Van. Dodatkowo oceniłem ilościowo tworzone i utrzymywane oddziaływania pomiędzy PG a poszczególnymi częściami Van. Części te, to osobno rozpatrywana część cukrowa, a także N-koniec i C-koniec Van. O ile kryterium energetyczne (obliczone energie swobodne wiązania PG do Van) okazały się nieróżnicujące ze względu na swoje podobieństwo (po uśrednieniu po całej trajektorii), to liczba tworzonych w trakcie symulacji MD bezpośrednich oddziaływań okazały się dobrym parametrem różnicującym jakość wiązania w symulowanych kompleksach. W ocenie samych symulacji zaproponowałem obszary i rodzaje modyfikacji Van, które mogłyby podnieść jej skuteczność w leczeniu infekcji wywołanych przez enterokoki odporne na leczenie wankomycyną (VRE), ponieważ to u nich właśnie występują mutacje PG opisane i wykorzystane przeze mnie w pracy **H08**.



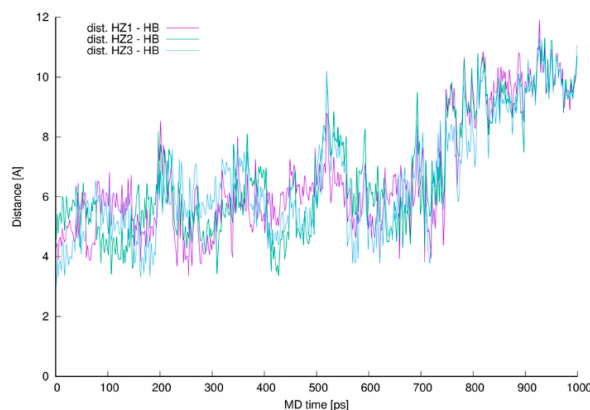
Rysunek 14: Oddziaływania w kompleksie MPP-D-Ala-Van. Postulowane oddziaływanie z łańcuchem bocznym Lys oznaczone zostało kolorem czerwonym. Źródło: H13, Figure 9.

Nieco inne podejście zastosowałem podczas badań opisanych w pracy **H13**. Dysponowałem tu wynikami opublikowanymi przeze mnie wcześniejszej w pracy **H09**, na podstawie których mogłem stwierdzić, że łańcuch boczny Lys należącej do PG (w pracy **H13** był to muramylopentapeptyd, MPP) może bezpośrednio oddziaływać z C-końcową częścią Van (Rysunek 14). W badaniach realizowanych w ramach **H13** oddziaływanie to zostało potwierdzone zarówno eksperymentalnie (z użyciem technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) MPP i Van w roztworze będącym mieszaniną H₂O i D₂O), jak i na drodze przeprowadzonych przeze mnie symulacji zachowań dynamicznych kompleksów Van–MPP-D-Ala i Van–MPP-D-Ser.

Zaplanowałem procedurę weryfikacji hipotezy o tworzeniu wiązania pomiędzy Lys i karbonyłowymi atomami tlenu C-końcowego fragmentu Van. Aby zrealizować ten, cel opracowałem i zastosowałem protokół stopniowego uwalniania ograniczeń nałożonych na odległości utrzymywane początkowo w celu dopasowania wzajemnych położeń i konformacji Van i MPP. Po ich całkowitym zniesieniu przeprowadziłem swobodną symulację MD w pudle periodycznym wypełnionym cząsteczkami wody (model TIP3P) pudle periodycznym z nadmiarową warstwą wody o grubości 10 Å w każdą stronę, licząc od najbardziej wysuniętego atomu w stanie początkowym kompleksu, z promieniem odcięcia obliczeń wkładów oddziaływań niewiążących równym 9 Å.



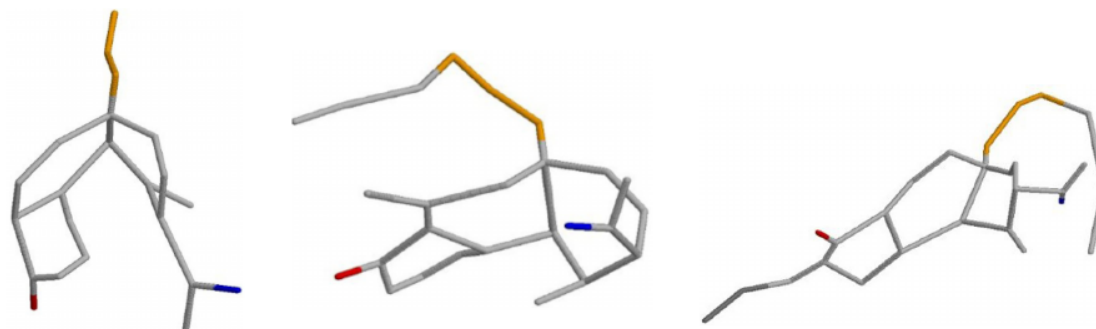
Rysunek 15: Zmiana długości wiązań wodorowych w kompleksie PG-Van. Źródło: H13, Figure 11.



Rysunek 16: Długości postulowanych, dodatkowych wiązań Van-Lys. Źródło: H13, Figure 12.

Po symulacji MD przeprowadziłem pełną analizę odległości pomiędzy tworzącymi wiązania wodorowe parami atomów – zarówno dla wiązań tworzonych natywnie w kompleksach Van-MPP (Rysunek 15), jak i w przypadku dodatkowych oddziaływań, zaobserwowanych podczas prowadzonych badań (Rysunek 16). Oddziaływania te są obecne pomiędzy karbonyłowymi atomami tlenu C-końca wankomycyny (oraz dodatkowo protonem HB (42) Van) a łańcuchem bocznym Lys. Zauważyłem też doskonałą zbieżność wyników NMR z wynikami przeprowadzonych symulacji MD oraz zaprezentowałem przykładowy, pełnoatomowy kompleks Van-MPP-D-Ala spełniający wszystkie eksperymentalne kryteria jego utworzenia.

Wspomniane wcześniej wyniki dotyczące oddziaływań fragmentu C-końcowego Van zostały przedyskutowane w ramach **H09**. W pracy tej zaproponowałem 5 różnych podstawień C-końca Van (3 łańcuchowe i 2 cykliczne heksozy) tworzących kompleksy z natywnym, C-końcowym pentapeptydem PG. W wyniku przeprowadzonego przeze mnie modelowania (parametryzacje, optymalizacje, MD) oraz analizy odległości i odchyleń RMSd, wskazałem najkorzystniejsze (z punktu widzenia wzmacniania oddziaływań z PG) modyfikacje struktury Van oraz przedyskutowałem rolę samego fragmentu C-końcowego Van w wiązaniu PG. W pracy tej zawarłem także opis konstrukcji, optymalizacji i pełnej dynamiki trzech innych antybiotyków glikoproteinowych: wankomycyny, orytawancyny [60–61] i telawancyny [62–63]. Oprócz analizy zmian energii oraz zmian konformacyjnych modelowanych antybiotyków podczas symulacji MD przeprowadziłem także ich podział na rodziny według kryterium podobieństwa konformacji, jaką przyjęły podczas 1,2 ns symulacji MD w periodycznym, sześciennym pudle o krawędzi 60 Å wypełnionym cząsteczkami wody. Wyniki dotyczące rodzin konformacji zaprezentowałem w nowatorski sposób, a mianowicie dokonałem uproszczenia strukturalnego modelowanych cząsteczek w taki sposób, że uwidocznione

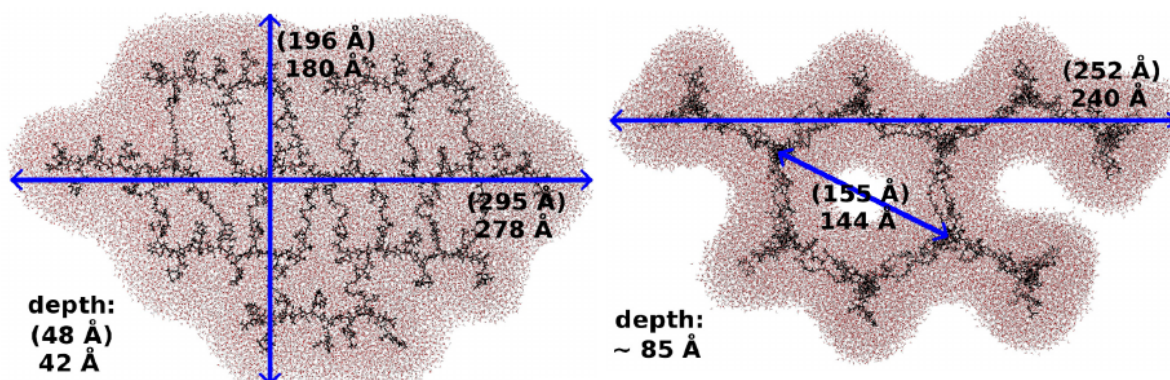


Rysunek 17: Wizualizacja uproszczenia struktur, kolejno: wankomycyny, oritawancyny i telawancyny. Na podstawie: H09, Figures 18-20.

zostały jedynie ogólne zarysy samych cząsteczek, bez uwzględniania położenia poszczególnych atomów je budujących (Rysunek 17). Był to zabieg, który umożliwił przedstawienie każdej z cząsteczek w reprezentacji pośredniej, pomiędzy reprezentacją pełnoatomową a reprezentacją stosowaną w ujęciu reszt uśrednionych (ang.: *united residues*). Umożliwia to łatwiejszy odbiór prezentowanych wyników i zachęca czytelnika do sięgnięcia także do suplementu (dodatku do samej publikacji) w celu zilustrowania omawianych wyników modelowania.

Najważniejszą częścią omawianej pracy jest modelowanie i ocena oddziaływań dwóch różnych, mocno rozbudowanych modeli samej ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Modele ściany komórkowej zostały skonstruowane na podstawie dwóch zestawów zupełnie odmiennych przesłanek eksperymentalnych i przedstawiały dwa zupełnie różne podejścia do problemu. Model warstwowy (ang.: *layered*) zakładał ułożenie łańcuchów cukrowych tworzących ścianę równoległe z jej kierunkiem [64–67], zaś model klatkowy (ang.: *scaffold*) zakładał ich ułożenie prostopadle do tworzonej ściany [68–72]. Jakościowo (biorąc pod uwagę skład ściany w obydwu modelach) nie różniły się one od siebie, jednak ułożenie w przestrzeni powtarzających się jednostek dwucukru GlcNAc-MurNAc (Glc – glukozamina) oraz peptydów łączących łańcuchy cukrowe, stanowi fundamentalną różnicę w sposobie asocjacji i wiązania absolutnie wszystkich cząsteczek wiążących się z taką ścianą komórkową.

W pracy **H09** przedstawiłem krok po kroku proces planowania i konstrukcji obydwu modeli: od wykorzystanych parametrów i pól siłowych, przez konstrukcję poszczególnych cegiełek składowych i w końcu całych łańcuchów złożonych ostatecznie w pełne modele ścian. Obydwa modele zostały uzupełnione okalającą je warstwą wodną, która niestety nie mogła tworzyć periodycznego pudła – ze względu na gigantyczne rozmiary układów (Rysunek 18). Zastosowałem otoczkę solwatacyjną siłowo utrzymywaną w odległości



Rysunek 18: Rozmiary modeli ściany komórkowej: layered (po lewej) i scaffold (po prawej). Na podstawie: H09, Figures 7-8.

20 Å od peptydoglikanu (według procedury *SolvateShell* pakietu Amber [73]). Okazała się ona wystarczającą symulacją nieskończonego środowiska zewnętrznego i nie wpływała na zachowanie eksponowanych części PG. Te łańcuchy glikanowe PG, które stanowiły krawędź modelu, nie zostały przez mnie połączone kolejnymi mostkami peptydowymi [74–75], przez co były o wiele bardziej narażone na zaginanie i deformacje, niż te łańcuchy glikanowe, które znalazły się w środku modelu. Dyskutując o tym w pracy, zwróciłem uwagę na to, że można rozwiązać ten problem wprowadzając warunki periodyczne obejmujące sam peptydoglikan, a nie tylko otaczające go środowisko wodne (jak robiłem to w przypadku badań opisywanych w **H02–04**, **H07**, **H10** czy **H13**). W ten sposób skrajnie ułożone łańcuchy glikanowe także byłyby mostkowane peptydami, przy czym peptyd mostkujący kierowałby się wzdłuż jednej z osi układu współrzędnych, równoległej do powierzchni ściany komórkowej i prostopadłej do eksponowanego łańcucha glikanowego i uczestniczył w mostkowaniu odpowiedniego łańcucha glikanowego po przeciwnej stronie modelu. Konstrukcja układu tego typu jest technicznie wykonalna, jednak modelowanie przeprowadzone w ramach badań opisanych w **H09** udowodniło, że podejście bez tworzenia układu periodycznego jest wystarczające.

O ile wyniki symulacji MD były fizycznie poprawne, istotne i interesujące z punktu widzenia badania zachowania się samego PG, to jednak obnażyły ówczesnie ciągle zbyt małe możliwości obliczeniowe wykorzystywanych ośrodków obliczeniowych (obliczenia były prowadzone w CI TASK, w którym to ośrodku pozyskałem granty obliczeniowe wykorzystywane w znakomitej większości przygotowywanych przeze mnie prac). Innym powodem, przez który porzuciłem ideę kontynuacji modelowania tych lub podobnych modeli ścian komórkowych, była zbyt duża szczegółowość zastosowanych modeli. Skoro nadrzędnym celem przygotowania modeli ściany komórkowej, w ramach badań prowadzących do przygotowania **H09**, było późniejsze zastosowanie ich w określeniu oddziaływania z wybranymi antybiotykami glikoproteinowymi, w szczególności z Van, to nie

było istotne, jak owe modele zachowują się dynamicznie w swoim „wnętrzu” (z dała od krawędzi układu). Dokowanie i oddziaływanie, w każdym z modeli i tak odbywałoby się na powierzchni tak symulowanej ściany, a więc uzasadnionym byłoby wymodelowanie jej w reprezentacji gruboziarnistej, uśrednionych reszt lub co najmniej uśrednionych łańcuchów. Tego typu podejście wymaga jednak całościowego przygotowania środowiska obliczeniowego, uwzględniającego symulacje wieloskalowe. Rozwijające się ciągle możliwości obliczeniowe z umożliwiają obecnie tego typu obliczenia, jednak ich wdrożenie w ośrodkach obliczeniowych jest dość problematyczne, z powodu złożoności zagadnienia i specyfiki ich realizacji. Zupełnie niedawno nawiązałem związaną z tym właśnie zagadnieniem współpracę z CI TASK, konsultując dla tego ośrodka merytoryczne potrzeby i możliwości badaczy borykających się z ograniczeniami metodologiczno-sprzętowymi w obliczeniach wykorzystujących wiele poziomów dokładności (precyzji) obliczeń. Wydaje się, że dzięki temu już w tym roku obliczenia wieloskalowe będą łatwiej dostępne do zastosowania w tym właśnie ośrodku obliczeniowym.

Modelowanie zachowań dynamicznych antybiotyków glikoproteinowych o podobnym do Van mechanizmie działania, jednak o odmiennej od siebie strukturze (**H09**), podsunęło mi pomysł na takie modyfikacje struktury Van, aby wykorzystać znane zalety mechanizmu działania tych antybiotyków, a wynikające z obecności w topologii ich cząsteczek elementów, których nie ma w wankomycynie. Postawiłem hipotezę o tym, że podstawienie Van dodatkowym, alifatycznym łańcuchem węglowym części cukrowej (jak w telawancynie) oraz dodanie do C-końca Van jednostek cukrowych powinno ułatwić tworzenie korzystnych oddziaływań z PG. W orytawancynie dodatkowa jednostka 4-epi-wankozaminy dołączana jest w niewielkim oddaleniu od C-końca, zaś dwucukier podstawiony jest wielką, hydrofobową grupą N-4-(4-chlorofenyl)benzylową, a C-koniec telawancyny jest fosforylowany, jednak wyniki uzyskane w **H09** zachęcały do wykorzystania właśnie monosacharydów na C-końcu i prostego łańcucha węglowego na dwucukrze.

Opracowałem więc plan konstrukcji serii nowych analogów Van podstawianych na C-końcu 1-amino-1-deoksy-D-glucitolem lub 2-acetamido-2-deoksy- β -D-galaktopiranozyloaminą, bezpośrednio lub w oddaleniu o dwa lub cztery długości wiązania (odpowiednio: bez lub z użyciem łącznika alifatycznego jedno- lub trójwęglowego) oraz z dodatkowym łańcuchem dekanowym (lub bez niego) łączonym bezpośrednio z wankozaminą – we wszystkich możliwych kombinacjach opisanych w tabeli (Tabela 4) oraz przedstawionych na rysunku **Figure 1** w publikacji **H10**, a także samej, niepodstawianej Van jako układu odniesienia.

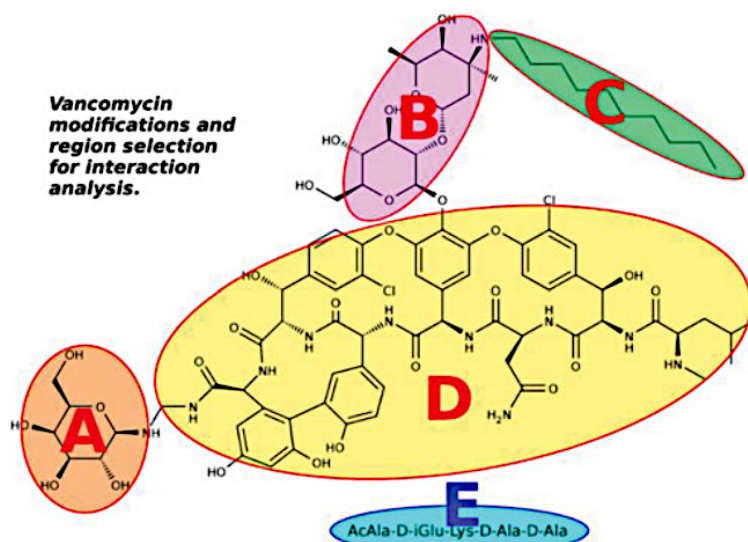
Derivative No	Linear ^a	Cyclic ^b	Chain ^c	Direct ^d	1C ^e	3C ^f
1	+				+	
2	+		+			+
3	+					+
4	+		+		+	
5	+		+	+		
6		+		+		
7		+	+	+		
8		+	+		+	
9		+				+
10		+	+			+
11	+			+		
12			+			
13		+			+	
14	-	-	-	-	-	-

Tabela 4: Tabela modyfikacji Van. "Plus" oznacza zastosowanie danej modyfikacji. Źródło: H10, Table 1.

W pracy **H10** opisałem pełen proces parametryzacji wszystkich niestandardowych fragmentów przygotowywanych układów łącznie z opisem wprowadzania ich do baz danych pakietu Amber [73], dla pól *ff03* [49] oraz *glycam06* [76], aby kolejni badacze mogli z nich łatwo korzystać, budując podobne strukturalnie układy.

Prace wstępne obejmowały także przygotowanie natywnego reprezentanta PG, dokowanie do niego Van w miejscu standardowego wiązania [77], periodyzację w sześciennym pudle wodnym oraz wstępne optymalizacje i uwalnianie więzów nałożonych na odległości pomiędzy komponentami kompleksów. Następnie przeprowadziłem 5 ns symulacji MD z próbkowaniem stanu układu co 1 ps (w sumie po 5 000 zrzutów stanu układu dla każdego z 14 kompleksów). Wyniki symulacji zostały następnie wykorzystane do oszacowania energii swobodnych wiązania PG do analogów Van z wykorzystaniem metody MM/GBSA [59, 78], zaś trajektorie wybranych, najkorzystniejszych energetycznie kompleksów, zostały poddane podziałowi na rodziny z zastosowaniem algorytmu *AverageLink* [79].

Do oceny wyników wszystkich przeprowadzonych symulacji zastosowałem podejście, którego koncept opracowałem podczas współpracy dotyczącej rozwoju pakietu UNRES (unres.pl [80]). Potraktowałem bowiem całe fragmenty Van, powiązane lub wydzielone topologicznie, jako niezależne od siebie obiekty, który można traktować odrębnie, niezależnie od pozostałych, tak samo wydzielonych fragmentów (Rysunek 19). Dzięki takiemu podejściu byłem w stanie opracować i zrealizować protokół jednoznacznej analizy zachowań dynamicznych i wzajemnego oddziaływania poszczególnych rejonów modyfikowanej Van. Analizy takiej dokonałem pod kątem utrzymania, formowania lub zaniku oddziaływań w trakcie symulacji MD. Pozwoliło to porównać poszczególne kompleksy oraz ocenić wpływ



Rysunek 19: Rejony centrów mas poszczególnych fragmentów Van. Źródło: H10, Figure 2 oraz Graphical Abstract.

konkretnych modyfikacji Van na wiązanie jej do PG, a przez to skuteczność takich, a nie innych, zaproponowanych przeze mnie modyfikacji jej struktury.

Wyniki zaprezentowane przede wszystkim w postaci jedno-znacznych wykresów obrazujących odległość wprowadzonych modyfikantów od PG, ale także inne, zastosowane odległości kontrolne oraz wykresy zmian konformacji Van oraz PG, przedstawione zostały w postaci 58 rysunków, z czego zdecydowana większość trafiła do materiałów dodatkowych (*Supplemental Material*; w **Załączniku 8**, zawierającym treści publikacji stanowiących opisywane Osiągnięcie, zostały one dodane do pozycji **H10**). Udało mi się jednoznacznie wskazać najlepszą propozycję modyfikacji Van. Okazał się nią analog oznaczony w **H10** numerem „13”, w którym zastosowałem podstawienie C-końca cukrem cyklicznym, połączonym z Van łącznikiem jednowęglowym, bez dodatkowego łańcucha alifatycznego na dwucukrze Van. Łącznik o tej właśnie długości okazał się (energetycznie) najkorzystniejszy z punktu widzenia możliwości tworzenia oddziaływań pomiędzy Van a PG z tego względu, że dłuższy łącznik zawsze zawsze swobodę konformacyjną podstawnika C-końca do tego stopnia, że statystycznie znacząco ograniczał pulę konformacji spełniających kryterium fizycznego zbliżenia podstawionego C-końca do PG. Z drugiej strony, połączenie bezpośrednie (bez łącznika węglowego), nie zapewniało wystarczającej długości podstawienia C-końca, dzięki której możliwe było zbliżenie tego podstawnika do PG.

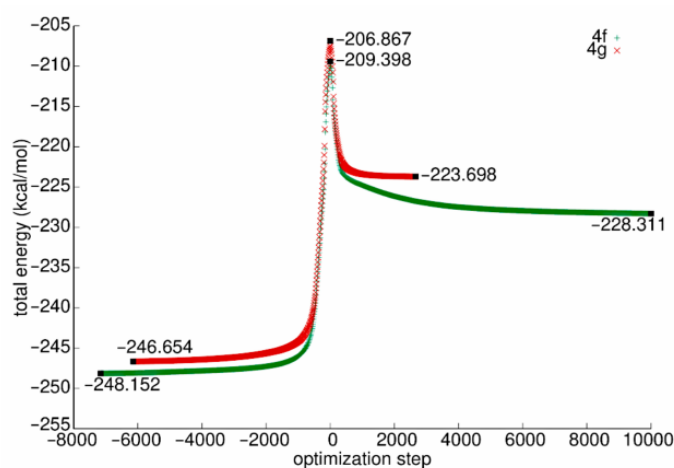
Wskazałem także inne, korzystne podstawienia oraz przedyskutowałem ich wady i zalety z punktu widzenia zarówno łatwości dostosowania struktur Van i PG, ale także pod względem możliwych wkładów energetycznych, zwłaszcza pod kątem energii swobodnych tworzonych w symulowanych układach oddziaływań.

Kolejnym zagadnieniem, w którym zastosowałem metody obliczeniowe i modelowanie wzajemnych oddziaływań była ocena energetyki ścieżki reakcji chemicznych. Niestety nie jest możliwe poprawne zasymulowanie procesu tworzenia się z substratów nowego związku chemicznego, wykorzystując do tego zestaw narzędzi bazujących na fizycznym opisie ich aktualnego stanu. W empirycznych polach sił mamy do czynienia z wiązaniami chemicznymi zdefiniowanymi *a priori*, nie jest więc możliwa ich modyfikacja (rozrywanie ani też tworzenie) w sposób dynamiczny – jako wynik prowadzonego modelowania. Podczas symulowania MD jesteśmy w stanie obserwować powstawanie lub zanikanie oddziaływań o charakterze elektrostatycznym, które są bezpośrednią konsekwencją zbliżenia lub oddalenia atomów lub grup atomów. Nie jest jednak możliwe wymodelowanie przegrupowania lub tworzenia wiązania pomiędzy odpowiednimi do tego atomami między innymi z tego względu, że ładunki przypisane konkretnym atomom są w tych polach obserwablane (wartościami przypisanymi atomom występującym w konkretnych konfiguracjach i otoczeniu), zaś wiązania pomiędzy atomami tworzącymi konkretne grupy (np. reszty aminokwasowe) są im właściwe, stałe i utrzymywane zdefiniowanym w danym polu nakładem energii.

Chcąc numerycznie wyjaśnić uzyskaną eksperymentalnie niższą wydajność reakcji syntezy pochodnych chinolinowych i izochinolinowych w reakcji czwartorzędowania metylo-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo- β -D-rybofuranozydu (**H12**), musiałem zasymulować przebieg tej syntezy. Nie mogłem tego jednak wykonać w polach półempirycznych.

Najprostszym rozwiązaniem tej niemożności jest zastosowanie pól i metod uniezależnionych od predefiniowanych połączeń pomiędzy atomami i obliczenie wkładów energetycznych substratów, stanu (kompleksu) przejściowego i produktów modelowanej reakcji chemicznej. Wymaga to oczywiście dodatkowych optymalizacji wszystkich stanów pośrednich oraz samych kompleksów wszystkich trzech wskazanych stanów, jednak

dysponując takim kompletem danych (Rysunek 20) można już podjąć dyskusję dotyczącą korzyści energetycznych poszczególnych, modelowanych procesów. Takie właśnie podejście zastosowałem w **H12**, gdzie moim narzędziem stał się program *mopac* [81], w którym wykorzystałem Hamiltonian PM6 [82]



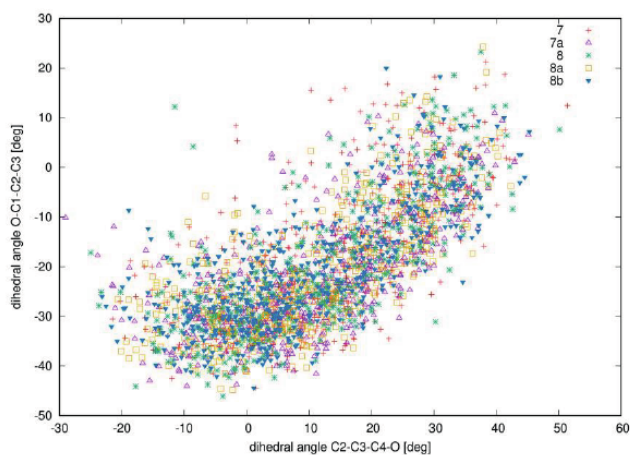
aby wyjaśnić różnicę pomiędzy, reaktywnością czwartorzędowania Rysunek 20: Zmiana energii całkowitej poszczególnych składników układu podczas symulacji procesu syntezy wybranych produktów. Źródło: H12, Figure 2.

wspomnianych już pochodnych chinolinowych i izochinolinowych. Otrzymane wyniki były zgodne z przewidywaniami (wynikającymi z prostego porównania usytuowania w pierścieniu, biorącego udział w tworzeniu wiązania atomu azotu) i pozwoliły na numeryczne uzasadnienie o wiele niższej wydajności reakcji prowadzącej do uzyskania pochodnej chinolinowej, w porównaniu do pochodnej izochinolinowej (w pracy **H12** oznaczanych odpowiednio jako produkty **4g** i **4f**).

Metoda ta nie pozwoliła jednak na wskazanie różnic w dynamice substratów. Aby przeanalizować zachowanie całego układu, musiałem zastosować takie metody modelowania, aby możliwe było zróżnicowanie preferencji konformacyjnych substratów i/lub możliwości eksponowania, lub zasłaniania/ekranowania miejsc, w których dochodzi do ich łączenia.

Podejście tego typu zastosowałem w badaniach, których wynikiem była praca **H11**. Użyłem dodatkowo pola *gaff* [83], aby dla symulowanych części składowych układów w ten sposób chociaż trochę uniezależnić typy atomów zastosowanych przez oprogramowanie Amber od ich dalszego otoczenia chemicznego. Symulowaniu zachowań dynamicznych poddałem 6 pochodnych tosyłowych tymidyny i 5 pochodnych tosyłowych urydyny (były to odpowiednio związki **1–6** oraz **7**, **7a**, **8**, **8a** i **8b** wg oznaczeń **H11**, **Scheme 1–2**) w wodzie modelowanej jako rozpuszczalnik w modelu ciągłym [84] przez czas symulacji 10 ns.

Do analizy konformacyjnej zastosowałem opracowany i wykorzystany przeze mnie poprzednio (**H09–10**) algorytm oceny odległości pomiędzy oddziałującymi obiektami, traktujący oddziałujące części jako odrębne, niezależne i zarazem uśredniające wszystkie, składające się na nie atomy. Wykorzystałem także analizę wirtualnych kątów walencyjnych (zdefiniowanych jako kąt zawarty pomiędzy atomami C5, C4 oraz środkiem ciężkości pierścienia furanozowego) oraz kątów torsyjnych mierzonych na pierścieniach cukrowych (O-C1-C2-C3 oraz C2-C3-C4-O). Analiza samych wartości oraz skupienia tych wartości (Rysunek 21) pozwoliła wskazać preferowane konformacje pierścienia cukrowego we wszystkich symulowanych układach łącznie ze zróżnicowaniem na grupy zależne od rodzaju pochodnych (oznaczyłem inne preferowane konformacje i wartości mierzonych kątów dla grupy **1–6** oraz inne dla grupy związków **7–8b**).



Rysunek 21: Analiza skupień kąta kontrolnego. Źródło: H11, Figure 4.

Dla porównania zbieżności metod i możliwości wyodrębnienia preferowanych różnic konformacyjnych lub wprost reaktywności w ramach grupy związków **7–8b**, przeprowadziłem także obliczenie ciepła tworzenia oraz całkowitych entalpii i entropii zarówno substratów, jak i produktów badanych w reakcji syntezy czwartorzędowych soli amoniowych (**H11**). Wyniki uzyskane w tym modelowaniu nie pozwoliły jednak na udzielenie prostej odpowiedzi, dlaczego syntezy produktów **7a**, **8a** i **8b** nie zaszły z oczekiwaną wydajnością.

Ostatnia praca w tym cyklu nieco inaczej podchodzi do zagadnienia modelowania oddziaływań w układach związanych z biomolekułami i wynikającymi z niego zmianami struktury modelowanych układów. Jest to praca **H14**, w której zebrałem doświadczenia zarówno samodzielnego przygotowywania procedur numerycznych (przede wszystkim w **H01**, **H05–07** i **H09**), jak i skryptów przetwarzających uzyskiwane wyniki (we wszystkich pracach cyklu, poza **H12**).

Praca **H14** opisuje modyfikacje publicznie dostępnego serwera obliczeniowego (<https://unres-server.chem.ug.edu.pl>), będącym graficznym interfejsem pakietu UNRES [80]. Serwer ten, upubliczniony w 2018 roku [85], został w 2022 roku wzbogacony przede mną o możliwość wykonywania symulacji z wykorzystaniem danych eksperymentalnych: NMR [86–87], Xlink [88–89] oraz SAXS [90]. Dodana została także nowa wersja pola gruboziarnistego pola sił [91–92], możliwość prowadzenia symulacji podobnych do dokowania molekularnego [93] oraz zaimplementowane zostały wszystkie optymalizacje kodu pakietu UNRES, przygotowane pod względem lepszego wykorzystania pamięci operacyjnej i szybkości działania samego pakietu [94].

Moim wkładem w przygotowanie i publikację **H14** była przede wszystkim konceptualizacja oraz koordynacja prac prowadzących do implementacji nowych funkcjonalności serwera, oraz sama ich implementacja. Samodzielnie nie rozwijam kodu źródłowego oprogramowania UNRES, jednak od momentu uzyskania stopnia doktora uczestniczę w pracach zespołu zajmującego się tym oprogramowaniem i jego wykorzystaniem oraz na bieżąco śledzę rozwój jego kodu źródłowego. Dzięki temu mogłem precyzyjnie zaplanować jakiego rodzaju modyfikacje i aktualizacje należy dodać do serwera publicznego, aby możliwościami odpowiadał bieżącej wersji pakietu UNRES.

Moim dodatkowym wkładem było także zaprogramowanie tej części interfejsu serwera, która obsługuje wprowadzanie i weryfikację danych eksperymentalnych wspierających obliczenia, integracja ich z istniejącymi już elementami interaktywnymi interfejsu oraz przetestowanie wszystkich wprowadzonych modyfikacji. W ten sposób cały serwer został

zaktualizowany do obsługi najnowszych wersji pola sił oraz do obsługi wszystkich możliwości samego pakietu UNRES, zaś użytkownicy serwera zyskali możliwość graficznego dodania do swoich obliczeń posiłkowych danych strukturalnych.

WKŁAD POSZCZEGÓLNYCH ELEMENTÓW OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO W ROZWÓJ DYSCYPLINY

W przypadku **H01** moim niewątpliwym wkładem w rozwój dyscypliny były przede wszystkim upublicznione, pełne parametry strukturalne nowych analogów AVP, łącznie z ich preferowanymi konformacjami w stanie niezwiązany oraz po związaniu ich w kieszeniach właściwych receptorów, oraz trójwymiarowe modele trzech receptorów hormonów neuroprzysadkowych, skonstruowanych na podstawie struktury rodopsyny wołowej poznanej w rozdzielczości wyższej, niż jakiegokolwiek dotychczas dostępne.

Prace **H02** i **H03** stanowiły przełom w stanie wiedzy na temat konformacji receptorów hormonów neuroprzysadkowych w formie aktywnej i do zeszłego roku stanowiły najwcześniejsze odniesienie w badaniach porównawczych tychże form i receptorów rodziny GPCR w ogóle. Dopiero w zeszłym roku opublikowane zostały pierwsze, oznaczone technikami mikroskopii elektronowej, struktury aktywne receptorów w formach aktywnych w kompleksach z odpowiednimi ligandami: 7BB6/7BB7, 7KH0 i 7DW9 dla kompleksu V_2R –AVP– G_α ; 7RYC, 7QVM dla kompleksu OTR–OT– G_α (oznaczenia według RCSB PDB). Jednak to właśnie nasz zespół po raz pierwszy zaproponował konkretne, pełnoatomowe reprezentacje i publicznie dostępne modele receptorów o prawdopodobnie najbardziej zbliżonej strukturze (trzeciorzędowej, a nawet czwartorzędowej – biorąc pod uwagę obecność podjednostki G_α w układzie symulacyjnym) do rzeczywistych form aktywnych tych receptorów. Publikacja omawianych w **H02** i **H03** wyników dała jednoznaczną odpowiedź na pytanie o ułożenie przestrzenne, a także na pytania o oddziaływania pomiędzy naturalnie związanymi ligandami a kieszeniami wiążących je receptorów w formie aktywnej. Taka wiedza stanowi absolutną podstawę, bez której nie jest możliwe skuteczne zaproponowanie takich modyfikacji struktury naturalnych hormonów, aby uzyskać ich analogi bioaktywne w co najmniej takim samym stopniu, jak AVP czy OT.

Oprócz samego upublicznienia pełnoatomowej struktury zrelaksowanej oraz związanej z wybranymi receptorami konformacji desmopresyny pełnoatomowych, nieistniejących wcześniej modeli kompleksów receptorów hormonów neuroprzysadkowych z zadokowanymi agonistami i antagonistami oraz stabilizującymi te kompleksy reprezentantami białek G, niewątpliwym, znaczącym wkładem pracy **H04** w rozwój dyscypliny jest obserwacja i wniosek o warunkowaniu kształtu i położenia pętli zewnątrzkomórkowych receptorów

GPCR jako konsekwencji organizacji przestrzennej ich części wewnątrzkomórkowej, w szczególności o roli wody w tym procesie.

Motorem rozwoju dyscypliny, dotyczącym przygotowanych prac **H05** i **H06**, jest pełnoatomowa struktura trzynastu nowych ligandów, analogów AVP, zarówno w stanie wolnym (niezwiązanym), jak i związanym z receptorami $V_{1a}R$, V_2R oraz OTR. Nowe narzędzie analityczne wynikające z nowego, zaproponowanego przeze mnie algorytmu postępowania, może ułatwić bardzo precyzyjne oszacowanie preferowanych konformacji całych makropierścieni jeszcze przed przeprowadzeniem modelowania ich zachowań dynamicznych. Dodatkowo, zaprezentowana w **H06** analiza długiej symulacji MD pokazuje, że konformacje preferowane, nawet w środowisku rozpuszczalnika symulowanego jako medium ciągłe, doskonale przekłada się na konformacje preferowane w stanie związanym z receptorem. Tego typu dowody, odniesione do wyników badań eksperymentalnych, nie dość, że są niezbędne, to dodatkowo uwiarygadniają stosowane metody obliczeniowe i zastosowane narzędzia.

Dzięki pracy **H07** możliwe było bezpośrednie porównanie organizacji przestrzennej odpowiadających sobie receptorów związanych z agonistami lub bez nich w układach zbliżonych do tych występujących w naturze, a więc receptorów bezpośrednio zanurzonych w błonie komórkowej. Przygotowane przeze mnie narzędzia i protokoły do wyznaczania energii pochodzącej z oddziaływania receptorów i/lub ligandów z cząsteczkami rozpuszczalnika są uniwersalne i możliwe do zastosowania także w innych układach symulacyjnych. Dzięki ich uniwersalności można je zastosować także w rozwijanych wcześniej modułach analitycznych pakietu Amber jak na przykład *mdanal* [6] lub późniejszych – jak *carnal* [50]. Zebrane zostały także wnioski wynikające z obserwacji położeń i roli samych cząsteczek wody w odniesieniu do ich roli w wiązaniu ligandów lub stabilizacji struktur wyższych rzędów w układach wielocząsteczkowych. Opisane zostały także pełnoatomowe struktury wybranych receptorów hormonów neuroprzysadkowych umieszczonych w adekwatnym modelu błony komórkowej i otoczone wodą. Do tej pory nie były dostępne żadne tego typu modele receptorów pozbawione ligandów.

W przypadku **H08** osiągnięciem takim jest udowodnienie, z precyzją na poziomie atomu, niekorzystnego wpływu mutacji peptydoglikanu na skuteczność działania wankomycyny, zróżnicowanie wpływu modyfikacji na osłabienie działania antybiotyku oraz zaproponowanie modyfikacji (podstawień) wankomycyny, które mogłyby przeciwdziałać osłabieniu jej działania.

Niewątpliwym osiągnięciem i kamieniem węgielnym w modelowaniu molekularnym bakteryjnych ścian komórkowych są same modele przygotowane w ramach prac nad **H09**.

Pełnoatomowe reprezentacje usieciowanego peptydoglikanu, który w symulacjach wykazał stabilność struktury, stanowi bogate źródło informacji topologicznych i jest pierwszym i prawdopodobnie jedynym takim modelem pełnoatomowym, sparametryzowanym dla klasycznego pola sił Amber i to w dwóch, różnych modelach przestrzennych: warstwowym i klatkowym. Przygotowanie i upublicznienie tych modeli uważam za swoje szczególnie ważne osiągnięcie naukowe.

W **H09** przedstawiłem także mechanizm tworzenia dodatkowych oddziaływań pomiędzy zmodyfikowaną wankomycyną i peptydoglikanem oraz wyjaśniłem powody różnic aktywności trzech antybiotyków glikoproteinowych – wankomycyny, orytawancyny i telawancyny.

Dzięki pracom prowadzonym w ramach realizacji **H10** opublikowałem pełną bibliotekę modyfikowanych struktur wankomycyny oraz udostępniłem komplet parametrów do popularnych pól siłowych, dzięki którym możliwe jest odtworzenie lub rozwinięcie przedstawionych przeze mnie prac dotyczących opisu zachowań dynamicznych i oddziaływań występujących w kompleksach Van–PG. Dzięki temu umożliwiłem skuteczne przewidywanie aktywności biologicznej konkretnych analogów Van. Badania te stały się inspiracją dla jednego z zespołów naukowych z Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research do syntezy kilku wybranych analogów Van. Potwierdziłem także brak negatywnego wpływu podstawienia dwucukru Van hydrofobowym łańcuchem węglowym oraz wskazałem sposób, w jaki wpływa ono na rozpoznawanie i wiązanie ze ścianą komórki bakteryjnej. Jest szczególnie ważne z punktu widzenia planowania takich modyfikacji Van, które ułatwią asocjację analogów Van na powierzchni ściany komórkowej lub ich dimeryzację.

Mimo braku prostej odpowiedzi na pytanie o przyczyny różnego przebiegu syntezy niektórych czwartorzędowych soli amoniowych i tak uważam, że prace **H11** i **H12** wniosły znaczący wkład w rozwój reprezentowanej przez nie dyscypliny, ponieważ wyniki w nich prezentowane dowodzą, że zmiany konformacyjne pierścieni cukrowych doskonale odzwierciedlają możliwość eksponowania lub ograniczania dostępu do atomów, lub fragmentów struktur bezpośrednio biorących udział w syntezie. Prace te oferują także gotowe narzędzie do przewidywania skuteczności syntez w złożonych układach zawierających pierścienie furanozowe (ale przecież nie tylko) oraz wskazują, że oznaczenie różnic w wysokości bariery energetycznej jest możliwe niezależnie od rodzaju układów i może (lub powinno) być stosowane przed syntezą.

Olbrzymim osiągnięciem, a także krokiem milowym w rozwoju nauk o życiu jest w przypadku **H13** spójne, zarówno eksperymentalne, jak i przeprowadzone z użyciem technik chemii obliczeniowej, potwierdzenie występowania nieopisywanych wcześniej oddziaływań

angażujących rozległy obszar C-końcowy wankomycyny i jeden z łańcuchów bocznych pentapeptydu reprezentującego peptydoglikan ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich.

Mój wkład w rozwój dziedziny w przypadku **H14** jest doskonale „widoczny” i dostępny *online*, ponieważ zmodyfikowany dzięki pracom nad **H14** serwer UNRES jest publicznie dostępną usługą, z której każdy badacz wykorzystujący gruboziarniste pola siłowe może nieodpłatnie skorzystać, a stosując się do niewielkich ograniczeń (jak na przykład do konieczności bezpośredniego wykorzystania uzyskanych na serwerze wyników – bez możliwości ich archiwizacji po stronie serwera), nawet bez rejestrowania się w tej usłudze. Zmodyfikowany przeze mnie serwer pracuje z najnowszym dostępnym, rozwijanym na bieżąco, polem sił i umożliwia korzystanie w swoich obliczeniach z danych eksperymentalnych we wszystkich najpopularniejszych i standaryzowanych formatach wejściowych.

LITERATURA

1. Hansch, Corwin. and Fujita, Toshio. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **J. Am. Chem. Soc.** 86 (1964) 1616–1626. DOI: 10.1021/ja01062a035
2. Ślusarz, M. J., Ślusarz, R. and Ciarkowski, J. Investigation of mechanism of desmopressin binding in vasopressin V2 receptor versus vasopressin V1a and oxytocin receptors: Molecular dynamics simulation of the agonist-bound state in the membrane–aqueous system. **Biopolymers** 81 (2006) 321–338. DOI: 10.1002/bip.20420, niniejsze cytowanie stanowi pozycję **H04** w Załączniku 4a
3. Ciarkowski, J., Drabik, P., Giełdoń, A., Kaźmierkiewicz, R. and Ślusarz, R. Signal transmission via G protein-coupled receptors in the light of rhodopsin structure determination. **Acta Biochim. Pol.** 48 (2001) 1203–1207, niniejsze cytowanie stanowi pozycję **b04** w Załączniku 4a
4. Ślusarz, R., Ślusarz, M. J., Lammek, B. and Ciarkowski, J. Molecular Modeling of Meta II Rhodopsin. **QSAR Comb. Sci.** 25 (2006) 105–113. DOI: 10.1002/qsar.200430920, niniejsze cytowanie stanowi pozycję **a05** w Załączniku 4a
5. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. **Science** 289 (2000) 739–745. DOI: 10.1126/science.289.5480.739
6. Case, D. A., Pearlman, D. A., Caldwell, J. W., Cheatham, T. E., Wang, J., Ross, W. S., Simmerling, C. L., Darden, T. A., Merz, K. M., Stanton, R. V., Cheng, A., Vincent, J. J., Crowley, M., Tsui, V., Gohlke, H., Radmer, R., Duan, Y., Pitera, J., Massova, I., Seibel, G. L., Singh, U. C., Weiner, P. and Kollman, P. A. AMBER 7. **Univ. Calif. San Franc.**
7. Schmidt, M. W., Baldrige, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S., Windus, T. L., Dupuis, M. and Montgomery Jr, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. **J. Comput. Chem.** 14 (1993) 1347–1363. DOI: 10.1002/jcc.540141112
8. Cieplak, P., Cornell, W. D., Bayly, C. and Kollman, P. A. Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins. **J. Comput. Chem.** 16 (1995) 1357–1377. DOI: 10.1002/jcc.540161106
9. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. and Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. **J. Phys. Chem.** 97 (1993) 10269–10280. DOI: 10.1021/j100142a004
10. Kowalczyk, W., Derdowska, I., Dawidowska, O., Prahl, A., Hartrodt, B., Neubert, K., Slaninová, J. and Lammek, B. Analogues of arginine vasopressin modified in the N-terminal part of the molecule with

- enantiomers of N-methylphenylalanine. **J. Pept. Res.** 63 (2004) 420–425. DOI: 10.1111/j.1399-3011.2004.00140.x
11. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comput. Chem.** 19 (1998) 1639–1662. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
 12. Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of autodock. **J. Mol. Recognit.** 9 (1996) 1–5. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1352(199601)9:1<1::AID-JMR241>3.0.CO;2-6
 13. Gieldoń, A., Kaźmierkiewicz, R., Ślusarz, R. and Ciarkowski, J. Molecular modeling of interactions of the non-peptide antagonist YM087 with the human vasopressin V1a, V2 receptors and with oxytocin receptors. **J. Comput. Aided Mol. Des.** 15 (2001) 1085–1104. DOI: 10.1023/A:1015905822671, niniejsze cytowanie stanowi pozycję b03 w Załączniku 4a
 14. Solis, F. J. and Wets, R. J.-B. Minimization by Random Search Techniques. **Math. Oper. Res.** 6 (1981) 19–30. DOI: 10.1287/moor.6.1.19
 15. Sybyl 6.8, Tripos Inc. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144.
 16. Bernstein, H. J. Recent changes to RasMol, recombining the variants. **Trends Biochem. Sci.** 25 (2000) 453–455. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01606-6
 17. Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. and Vecchi, M. P. Optimization by Simulated Annealing. **Science** 220 (1983) 671–680. DOI: 10.1126/science.220.4598.671
 18. Clore, G. M., Nilges, M., Brünger, A. T., Karplus, M. and Gronenborn, A. M. A comparison of the restrained molecular dynamics and distance geometry methods for determining three-dimensional structures of proteins on the basis of interproton distances. **FEBS Lett.** 213 (1987) 269–277. DOI: 10.1016/0014-5793(87)81504-1
 19. Saunders, M., Houk, K. N., Wu, Y. D., Still, W. C., Lipton, M., Chang, G. and Guida, W. C. Conformations of cycloheptadecane. A comparison of methods for conformational searching. **J. Am. Chem. Soc.** 112 (1990) 1419–1427. DOI: 10.1021/ja00160a020
 20. Hakak, Y., Shrestha, D., Goegel, M. C., Behan, D. P. and Chalmers, D. T. Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. **FEBS Lett.** 550 (2003) 11–17. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00762-2
 21. Sakmar, T. P. Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. **Curr. Opin. Cell Biol.** 14 (2002) 189–195. DOI: 10.1016/S0955-0674(02)00306-X
 22. Mirzadegan, T., Benkö, G., Filipek, S. and Palczewski, K. Sequence Analyses of G-Protein-Coupled Receptors: Similarities to Rhodopsin. **Biochemistry** 42 (2003) 2759–2767. DOI: 10.1021/bi027224+
 23. Dowell, S. J. and Brown, A. J. Yeast Assays for G-Protein-Coupled Receptors. **Receptors Channels** 8 (2002) 343–352. DOI: 10.3109/10606820214647
 24. Meng, E. C. and Bourne, H. R. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? **Trends Pharmacol. Sci.** 22 (2001) 587–593. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01825-3
 25. Hunyady, L., Vauquelin, G. and Vanderheyden, P. Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. **Trends Pharmacol. Sci.** 24 (2003) 81–86. DOI: 10.1016/S0165-6147(02)00050-0
 26. Ballesteros, J. A., Shi, L. and Javitch, J. A. Structural Mimicry in G Protein-Coupled Receptors: Implications of the High-Resolution Structure of Rhodopsin for Structure-Function Analysis of Rhodopsin-Like Receptors. **Mol. Pharmacol.** 60 (2001) 1–19. DOI: 10.1124/mol.60.1.1
 27. Koenig, B. W. Structure and Orientation of Ligands Bound to Membrane Proteins Are Reflected by Residual Dipolar Couplings in Solution NMR Measurements. **ChemBioChem** 3 (2002) 975–980. DOI: 10.1002/1439-7633(20021004)3:10<975::AID-CBIC975>3.0.CO;2-Y
 28. Kisselev, O. G., Kao, J., Ponder, J. W., Fann, Y. C., Gautam, N. and Marshall, G. R. Light-activated rhodopsin induces structural binding motif in G protein α subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95 (1998) 4270–4275. DOI: 10.1073/pnas.95.8.4270

29. Janz, J. M. and Farrens, D. L. Rhodopsin Activation Exposes a Key Hydrophobic Binding Site for the Transducin α -Subunit C Terminus *. **J. Biol. Chem.** 279 (2004) 29767–29773. DOI: 10.1074/jbc.M402567200
30. Koenig, B. W., Kontaxis, G., Mitchell, D. C., Louis, J. M., Litman, B. J. and Bax, A. Structure and Orientation of a G Protein Fragment in the Receptor Bound State from Residual Dipolar Couplings. **J. Mol. Biol.** 322 (2002) 441–461. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00745-3
31. Ślusarz, R. and Ciarkowski, J. Interaction of class A G protein-coupled receptors with G proteins. **Acta Biochim. Pol.** 51 (2004) 129–136. DOI: 10.18388/abp.2004_3604, niniejsze cytowanie stanowi pozycję b08 w Załączniku 4a
32. Murzyn, K., Róg, T., Jezierski, G., Takaoka, Y. and Pasenkiewicz-Gierula, M. Effects of Phospholipid Unsaturation on the Membrane/Water Interface: A Molecular Simulation Study. **Biophys. J.** 81 (2001) 170–183. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75689-5
33. Pasenkiewicz-Gierula, M., Murzyn, K., Róg, T. and Czaplowski, C. Molecular dynamics simulation studies of lipid bilayer systems. **Acta Biochim. Pol.** 47 (2000) 601–611. DOI: 10.18388/abp.2000_3982
34. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. and Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J. Chem. Phys.** 79 (1983) 926–935. DOI: 10.1063/1.445869
35. Langs, D. A., Smith, G. D., Stezowski, J. J. and Hughes, R. E. Structure of Pressinoic Acid: The Cyclic Moiety of Vasopressin. **Science** 232 (1986) 1240–1242. DOI: 10.1126/science.3704648
36. Ufer, E., Postina, R., Gorbulev, V. and Fahrenholz, F. An extracellular residue determines the agonist specificity of V2 vasopressin receptors. **FEBS Lett.** 362 (1995) 19–23. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00150-8
37. Kowalczyk, W., Sobolewski, D., Prah, A., Derdowska, I., Borovičková, L., Slaninová, J. and Lammek, B. The Effects of N-Terminal Part Modification of Arginine Vasopressin Analogues with 2-Aminoindane-2-carboxylic Acid: A Highly Potent V2 Agonist. **J. Med. Chem.** 50 (2007) 2926–2929. DOI: 10.1021/jm070174s
38. Allen, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallogr. B** 58 (2002) 380–388. DOI: 10.1107/S0108768102003890
39. Wang, J., Cieplak, P. and Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? **J. Comput. Chem.** 21 (2000) 1049–1074. DOI: 10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F
40. Feig, M., Karanicolas, J. and Brooks, C. L. MMTSB Tool Set: enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology. **J. Mol. Graph. Model.** 22 (2004) 377–395. DOI: 10.1016/j.jmgm.2003.12.005
41. Lammek, B., Czaja, M., Derdowska, I., Rekowski, P., Trzeciak, H. i., Sikora, P., Szkróbka, W., Stojko, R. and Kupryszewski, G. Influence of L-naphthylalanine in position 3 of AVP and its analogues on their pharmacological properties. **J. Pept. Res.** 49 (1997) 261–268. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1997.tb00885.x
42. Jastrzębska, B., Derdowska, I., Kowalczyk, W., Machova, A., Slaninová, J. and Lammek, B. Influence of 1-aminocyclohexane-1-carboxylic acid in position 2 or 3 of AVP and its analogues on their pharmacological properties. **J. Pept. Res.** 62 (2003) 70–77. DOI: 10.1034/j.1399-3011.2003.00069.x
43. Kowalczyk, W., Prah, A., Dawidowska, O., Derdowska, I., Sobolewski, D., Hartrodt, B., Neubert, K., Slaninová, J. and Lammek, B. The influence of 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid at position 2 or 3 of AVP and its analogues on their pharmacological properties. **J. Pept. Sci.** 11 (2005) 584–588. DOI: 10.1002/psc.656
44. Derdowska, I., Prah, A., Kowalczyk, W., Janecki, M., Melhem, S., Trzeciak, H. I. and Lammek, B. Influence of enantiomers of 1-naphthylalanine in position 2 of VAVP and dVAVP on their pharmacological properties. **Eur. J. Med. Chem.** 40 (2005) 63–68. DOI: 10.1016/j.ejmech.2004.09.011
45. Łempicka, E., Derdowska, I., Kowalczyk, W., Dawidowska, O., Prah, A., Janecki, M., Jasiński, T., Trzeciak, H. I. and Lammek, B. Analogues of arginine vasopressin modified in position 2 and 3 with conformationally constrained dipeptide fragments. **J. Pept. Sci.** 11 (2005) 91–96. DOI: 10.1002/psc.600

46. Mongan, J., Simmerling, C., McCammon, J. A., Case, D. A. and Onufriev, A. Generalized Born Model with a Simple, Robust Molecular Volume Correction. **J. Chem. Theory Comput.** 3 (2007) 156–169. DOI: 10.1021/ct600085e
47. Basma, M., Sundara, S., Calgan, D., Vernali, T. and Woods, R. J. Solvated ensemble averaging in the calculation of partial atomic charges. **J. Comput. Chem.** 22 (2001) 1125–1137. DOI: 10.1002/jcc.1072
48. Kirschner, K. N. and Woods, R. J. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 98 (2001) 10541–10545. DOI: 10.1073/pnas.191362798
49. Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J. and Kollman, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. **J. Comput. Chem.** 24 (2003) 1999–2012. DOI: 10.1002/jcc.10349
50. Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, D. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Matthews, D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S. and Kollman, P. A. AMBER 9. **Univ. Calif. San Franc.**
51. Perkins, H. R. Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. **Biochem. J.** 111 (1969) 195–205. DOI: 10.1042/bj1110195
52. Barna, J. C. and Williams, D. H. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. **Annu. Rev. Microbiol.** 38 (1984) 339–357. DOI: 10.1146/annurev.mi.38.100184.002011
53. Kannan, R., Harris, C. M., Harris, T. M., Waltho, J. P., Skelton, N. J. and Williams, D. H. Function of the amino sugar and N-terminal amino acid of the antibiotic vancomycin in its complexation with cell wall peptides. **J. Am. Chem. Soc.** 110 (1988) 2946–2953. DOI: 10.1021/ja00217a042
54. Waltho, J. P., Williams, D. H., Stone, D. J. M. and Skelton, N. J. Intramolecular determinants of conformation and mobility within the antibiotic vancomycin. **J. Am. Chem. Soc.** 110 (1988) 5638–5643. DOI: 10.1021/ja00225a009
55. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.** 28 (2000) 235–242. DOI: 10.1093/nar/28.1.235
56. Nitnai, Y., Kikuchi, T., Kakoi, K., Hanamaki, S., Fujisawa, I. and Aoki, K. Crystal Structures of the Complexes between Vancomycin and Cell-Wall Precursor Analogs. **J. Mol. Biol.** 385 (2009) 1422–1432. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.026
57. Tsui, V. and Case, D. A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. **Biopolymers** 56 (2000) 275–291. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)56:4<275::AID-BIP10024>3.0.CO;2-E
58. Sosa, C. P., Hewitt, T., Lee, M. R. and Case, D. A. Vectorization of the generalized Born model for molecular dynamics on shared-memory computers. **J. Mol. Struct. THEOCHEM** 549 (2001) 193–201. DOI: 10.1016/S0166-1280(01)00497-3
59. Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A. and Cheatham, T. E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. **Acc. Chem. Res.** 33 (2000) 889–897. DOI: 10.1021/ar000033j
60. Zhanel, G. G., Schweizer, F. and Karlowsky, J. A. Oritavancin: Mechanism of Action. **Clin. Infect. Dis.** 54 (2012) S214–S219. DOI: 10.1093/cid/cir920
61. Allen, N. From Vancomycin to Oritavancin: The Discovery and Development of a Novel Lipoglycopeptide Antibiotic. **Anti-Infect. Agents Med. Chem.** 9 (2010) 23–47. DOI: 10.2174/187152110790886745
62. Chang, M. H., Kish, T. D. and Fung, H. B. Telavancin: a lipoglycopeptide antimicrobial for the treatment of complicated skin and skin structure infections caused by gram-positive bacteria in adults. **Clin. Ther.** 32 (2010) 2160–2185. DOI: 10.1016/S0149-2918(11)00020-8

63. Lin, G., Pankuch, G. A., Appelbaum, P. C. and Kosowska-Shick, K. Activity of telavancin compared to other agents against coagulase-negative staphylococci with different resistotypes by time kill. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 73 (2012) 287–289. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.003
64. Demchick, P. and Koch, A. L. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 178 (1996) 768–773.
65. Höltje, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR** 62 (1998) 181–203.
66. Labischinski, H., Barnickel, G., Naumann, D. and Keller, P. Conformational and topological aspects of the three-dimensional architecture of bacterial peptidoglycan. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** 136A (1985) 45–50.
67. Pink, D., Moeller, J., Quinn, B., Jericho, M. and Beveridge, T. On the architecture of the gram-negative bacterial murein sacculus. **J. Bacteriol.** 182 (2000) 5925–5930.
68. Dmitriev, B. A., Ehlers, S. and Rietschel, E. T. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. **Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)** 187 (1999) 173–181.
69. Dmitriev, B. A., Toukach, F. V., Schaper, K.-J., Holst, O., Rietschel, E. T. and Ehlers, S. Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. **J. Bacteriol.** 185 (2003) 3458–3468.
70. Dmitriev, B. A., Toukach, F. V., Holst, O., Rietschel, E. T. and Ehlers, S. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. **J. Bacteriol.** 186 (2004) 7141–7148. DOI: 10.1128/JB.186.21.7141-7148.2004
71. Dmitriev, B., Toukach, F. and Ehlers, S. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. **Trends Microbiol.** 13 (2005) 569–574. DOI: 10.1016/j.tim.2005.10.001
72. Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L. and Mobashery, S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 103 (2006) 4404–4409. DOI: 10.1073/pnas.0510182103
73. Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Goetz, A. W., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R. M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A. and Kollman, P. A. AMBER 12. **Univ. Calif. San Franc.**
74. Vollmer, W. and Seligman, S. J. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. **Trends Microbiol.** 18 (2010) 59–66. DOI: 10.1016/j.tim.2009.12.004
75. Kern, T., Giffard, M., Hediger, S., Amoroso, A., Giustini, C., Bui, N. K., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W. and Simorre, J.-P. Dynamics characterization of fully hydrated bacterial cell walls by solid-state NMR: evidence for cooperative binding of metal ions. **J. Am. Chem. Soc.** 132 (2010) 10911–10919. DOI: 10.1021/ja104533w
76. Kirschner, K. N., Yongye, A. B., Tschampel, S. M., González-Outeiriño, J., Daniels, C. R., Foley, B. L. and Woods, R. J. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. **Carbohydrates. J. Comput. Chem.** 29 (2008) 622–655. DOI: 10.1002/jcc.20820
77. Williams, D. H. and Bardsley, B. The Vancomycin Group of Antibiotics and the Fight against Resistant Bacteria. **Angew. Chem. Int. Ed.** 38 (1999) 1172–1193. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990503)38:9<1172::AID-ANIE1172>3.0.CO;2-C
78. Reyes, C. M. and Kollman, P. A. Structure and thermodynamics of RNA-protein binding: using molecular dynamics and free energy analyses to calculate the free energies of binding and conformational change. **J. Mol. Biol.** 297 (2000) 1145–1158. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3629
79. Jayaram, B., Sprous, D. and Beveridge, D. L. Solvation Free Energy of Biomacromolecules: Parameters for a Modified Generalized Born Model Consistent with the AMBER Force Field. **J. Phys. Chem. B** 102 (1998) 9571–9576. DOI: 10.1021/jp982007x
80. Liwo, A., Baranowski, M., Czaplewski, C., Gołaś, E., He, Y., Jagieła, D., Krupa, P., Maciejczyk, M., Makowski, M., Mozolewska, M. A., Niadzvedtski, A., Ołdziej, S., Scheraga, H. A., Sieradzan, A. K., Ślusarz, R., Wirecki, T., Yin, Y. and Zaborowski, B. A unified coarse-grained model of biological

- macromolecules based on mean-field multipole–multipole interactions. **J. Mol. Model.** 20 (2014) 2306. DOI: 10.1007/s00894-014-2306-5, niniejsze cytowanie stanowi pozycję a12 w Załączniku 4a
81. Stewart, J. J. P. MOPAC2016.
82. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.** 13 (2007) 1173–1213. DOI: 10.1007/s00894-007-0233-4
83. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. and Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. **J. Comput. Chem.** 25 (2004) 1157–1174. DOI: 10.1002/jcc.20035
84. Onufriev, A., Bashford, D. and Case, D. A. Modification of the Generalized Born Model Suitable for Macromolecules. **J. Phys. Chem. B** 104 (2000) 3712–3720. DOI: 10.1021/jp994072s
85. Czaplewski, C., Karczyńska, A., Sieradzan, A. K. and Liwo, A. UNRES server for physics-based coarse-grained simulations and prediction of protein structure, dynamics and thermodynamics. **Nucleic Acids Res.** 46 (2018) W304–W309. DOI: 10.1093/nar/gky328
86. Lubecka, E. A. and Liwo, A. ESCASA: Analytical estimation of atomic coordinates from coarse-grained geometry for nuclear-magnetic-resonance-assisted protein structure modeling. I. Backbone and H β protons. **J. Comput. Chem.** 42 (2021) 1579–1589. DOI: 10.1002/jcc.26695
87. Lubecka, E. A. and Liwo, A. A coarse-grained approach to NMR-data-assisted modeling of protein structures. **J. Comput. Chem.** 43 (2022) 2047–2059. DOI: 10.1002/jcc.27003
88. Fajardo, J. E., Shrestha, R., Gil, N., Belsom, A., Crivelli, S. N., Czaplewski, C., Fidelis, K., Grudin, S., Karasikov, M., Karczyńska, A. S., Kryshtafovych, A., Leitner, A., Liwo, A., Lubecka, E. A., Monastyrsky, B., Pagès, G., Rappsilber, J., Sieradzan, A. K., Sikorska, C., Trabjerg, E. and Fiser, A. Assessment of chemical-crosslink-assisted protein structure modeling in CASP13. **Proteins Struct. Funct. Bioinforma.** 87 (2019) 1283–1297. DOI: 10.1002/prot.25816
89. Kogut, M., Gong, Z., Tang, C. and Liwo, A. Pseudopotentials for coarse-grained cross-link-assisted modeling of protein structures. **J. Comput. Chem.** 42 (2021) 2054–2067. DOI: 10.1002/jcc.26736
90. Karczyńska, A. S., Mozolewska, M. A., Krupa, P., Giełdoń, A., Liwo, A. and Czaplewski, C. Prediction of protein structure with the coarse-grained UNRES force field assisted by small X-ray scattering data and knowledge-based information. **Proteins Struct. Funct. Bioinforma.** 86 (2018) 228–239. DOI: 10.1002/prot.25421
91. Sieradzan, A. K. and Jakubowski, R. Introduction of steered molecular dynamics into UNRES coarse-grained simulations package. **J. Comput. Chem.** 38 (2017) 553–562. DOI: 10.1002/jcc.24685
92. Liwo, A., Czaplewski, C., Sieradzan, A. K., Lubecka, E. A., Lipska, A. G., Golon, Ł., Karczyńska, A., Krupa, P., Mozolewska, M. A., Makowski, M., Ganzynkiewicz, R., Giełdoń, A. and Maciejczyk, M. Chapter Two - Scale-consistent approach to the derivation of coarse-grained force fields for simulating structure, dynamics, and thermodynamics of biopolymers. In: Strodel B, Barz B (eds) **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.** Academic Press, pp 73–122
93. Krupa, P., Karczyńska, A. S., Mozolewska, M. A., Liwo, A. and Czaplewski, C. UNRES-Dock—protein–protein and peptide–protein docking by coarse-grained replica-exchange MD simulations. **Bioinformatics** 37 (2021) 1613–1615. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa897
94. Sieradzan, A. K., Sans-Duñó, J., Lubecka, E. A., Czaplewski, C., Lipska, A. G., Leszczyński, H., Ocetkiewicz, K. M., Proficz, J., Czarnul, P., Krawczyk, H. and Liwo, A. Optimization of parallel implementation of UNRES package for coarse-grained simulations to treat large proteins. **J. Comput. Chem.** 44 (2023) 602–625. DOI: 10.1002/jcc.27026

V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Pisemne oświadczenia kierowników zespołów, z którymi współpracowałem, dołączam w **Załączniku 6**.

- W latach 2014-2018 współpracowałem naukowo z zespołem Gia Maisuradze, Baker Laboratory, Department of Chemistry & Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, USA. Współpraca ta zaowocowała współautorskim rozdziałem w monografii naukowej (pozycja **r02** w punkcie **II.2** „Wykazu osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”, **Załącznik 4a** (określanym dalej jako „Wykaz”).

- Współpraca z zespołem Jooyoung Lee, Korean Institute for Advanced Study, Seoul, Republika Korei, zaowocowała współautorskimi publikacjami **a27** i **a32** opisanymi w punkcie **II.4** „Wykazu” oraz wymianą doświadczeń związanych z organizacją kolejnych konferencjach „Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches” organizowanych naprzemiennie w Polsce i w Korei od roku 2015). Współpraca ta trwa od roku 2014.

- Moja aktywność naukowa dotycząca wykorzystania oprogramowania UNRES w pracach zespołu Silvii Crivelli, Lawrence Berkeley Lab, Department of Computer Science, University of California, Davis, USA, zaowocowała członkostwem w grupach konkursowych WeFold kierowanych przez Panią Profesor w eksperymentach „Community Wide Experiment on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction” (CASP), w edycjach 11-13 oraz współautorską publikacją **a30** opisaną w punkcie **II.4** „Wykazu”. Współpraca ta trwa od roku 2014.

- Moja istotna aktywność naukowa w zespole Yi He, pracującego ówczesnie w Baker Laboratory of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, USA, afiliowanego obecnie w University of New Mexico, Albuquerque, USA, dotyczyła rozwoju, upowszechniania i wykorzystania oprogramowania UNRES. Współpraca ta zaowocowała współautorstwem rozdziału monografii opisanego w punkcie **II.2** „Wykazu” jako pozycja **r02** oraz współautorstwem publikacji **a10**, **a12**, **a19** oraz **a26** opisanych w punkcie **II.4** „Wykazu”. Współpraca ta trwa od roku 2013.

- Moja aktywność naukowa w zespole tworzonym przez Jayantę Haldar, New Chemistry Unit and School of Advanced Materials, **Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research**, Jakkur Bangalore, Indie, oraz mojej osoby, nie zaowocowała jeszcze wspólnymi publikacjami, jednak współpraca ta dostarczyła zespołowi prof. Haldara istotnych danych strukturalnych, które pozwoliły na syntezę wybranych analogów wankomycyny mi zaś na zaprojektowanie możliwych do uzyskania na drodze syntezy pochodnych wankomycyny (opisanych częściowo, między innymi, w publikacji **H10** (punkt **I.2** „Wykazu”). Zebrane dane zostaną opublikowane w przygotowywanej wspólnie publikacji naukowej. Współpraca ta została zawiązana w maju 2014 roku i trwa nadal.

- W Centrum Informatycznym Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej przy **Politechnice Gdańskiej**, w zeszłym roku zostałem konsultantem-ekspertem w zakresie konsultacji merytorycznych i udziale w tworzeniu systemów informatycznych w ramach ogólnopolskiego projektu PIONIER-LAB – Krajowa Platforma Integracji Infrastruktur Badawczych z Ekosystemami Innowacji. Konsultacje dotyczą obliczeń wieloskalowych w chemii i biochemii. Dział KDM CI TASK reprezentuje Rafał Tylman i to właśnie jego oświadczenie o naszej współpracy znalazło się w **Załączniku 6**, na stronie 9.

VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ

- Od roku 2000 prowadziłem 26 przedmiotów (w tym 15 rodzajów wykładów, 22 rodzaje ćwiczeń laboratoryjnych i 1 ćwiczenia audytoryjne) na studiach dziennych stacjonarnych, na wszystkich trzech stopniach edukacji wyższej, z czego 9 przedmiotów było w pełni realizowanych metodami nauczania na odległość oraz cztery kolejne w trybie *blended learning*; wszystkie zakończyły się pozytywnym przyjęciem komisji ewaluacyjnych i oceniających; 17 spośród tych przedmiotów było w całości moimi przedmiotami autorskimi.

Zastosowane w spisie prowadzonych przedmiotów, poniżej, oznaczenia:

W – wykład, L – ćw. laboratoryjne, A – ćw. audytoryjne

Technologia Informatyczna: L

Technologia Informatyczna Ochrony Środowiska: L

Wstęp do Informatyki: W, przedmiot autorski, studia podyplomowe

Opiekun Szkolnej Pracowni Komputerowej: L, przedmiot autorski, studia podyplomowe

Sieci, Internet, Multimedia: L, studia podyplomowe

Programy Użytkowe: L, studia podyplomowe

Administracja Systemami Operacyjnymi: W, L, przedmiot autorski

Chemia Teoretyczna II: A

Systemy Operacyjne I: W, L, przedmiot autorski

Systemy Operacyjne II: W, L, *e-learning*, przedmiot autorski

Modelowanie i Symulacje: L
Systemy Operacyjne i Programy Użytkowe I: W, L, *blended learning*, przedmiot autorski
Systemy Operacyjne i Programy Użytkowe II: W, L, *e-learning*, przedmiot autorski
Modelowanie Molekularne: L
Programy Użytkowe i Administracja Systemami Oper. 1: W, L, *blended learning*, przedmiot autorski
Programy Użytkowe i Administracja Systemami Oper. 2: W, L, *e-learning*, przedmiot autorski
Chemia Organiczna: L
Synteza Związków Biologicznie Czynnych: L
Tworzenie i Własność Materiałów Informatycznych: W, L, *e-learning*, przedmiot autorski
Grafika Molekularna: W, *e-learning*, przedmiot autorski
Wstęp do Grafiki Molekularnej: W, *e-learning*, przedmiot autorski
Wstęp do Modelowania Molekularnego: W, L, *blended learning*, przedmiot autorski
Metody Opisu i Udostępniania Danych i Wyników: W, L *e-learning*, przedmiot autorski
Usługi Sieciowe: W, L, *e-learning*, przedmiot autorski
Usługi Sieciowe: L, *e-learning*, przedmiot autorski
Technologia Informatyczna w Chemii: W, L, *blended learning*, przedmiot autorski

Wymiar i tryb prowadzonych przedmiotów znajdują się na stronie <https://rafal.slusarz.edu.pl/dydaktyka>

- Przeprowadziłem 4 przedmioty na studiach podyplomowych dla nauczycieli, współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu Państwa; spośród nich: moje dwa autorskie przedmioty składały się z wykładu (*Wstęp do Informatyki*) i ćwiczeń laboratoryjnych (*Opiekun Szkolnej Pracowni Komputerowej*); w dwóch pozostałych przedmiotach (*Programy Użytkowe* oraz *Sieci, Internet, Multimedia*) – jedynie prowadziłem ćwiczenia laboratoryjne; odbyły się dwie edycje tych studiów (2006-2008). Przedmioty te ująłem na pełnej liście prowadzonych przedmiotów, w punkcie poprzednim, powyżej.

- Przygotowałem i przeprowadziłem 2 kursy zewnętrzne (dla uczestników spoza UG; obydwie kursy odbyły się *online*), jeden z nich (*Molekuły portret własny*) został przeprowadzony w ramach projektu strategicznego „Zdolni z Pomorza” (EFS, UE, Urząd Marszałkowski, 2020), drugi (*Kurs Gimp*) miał charakter otwarty, bez podziału na semestry (w latach 2011-2013 uczestniczyło w nim średnio 6 osób rocznie); zostały doskonale ocenione w ewaluacjach.

- Przygotowałem 3 skrypty do ćwiczeń:
 - 1 do ćw. laboratoryjnych – samodzielnie (Techn. Inf. w Chemii),
 - 1 do ćw laboratoryjnych – współautorsko (Techn. Inf.),
 - 1 do ćw. audytoryjnych – współautorsko (Chemia Teoret.)

- Pełne teksty ćwiczeń dla studentów wszystkich wymienionych wyżej przedmiotów oraz skrypty i komplet materiałów dydaktycznych do wszystkich przedmiotów autorskich

(wymienione wyżej) były przeze mnie udostępnione w portalu internetowym Podyplomowego Studium Informatyki przy Wydziale Chemii UG <http://psi.chem.univ.gda.pl>, zostały przeze mnie opublikowane na stronie domowej Wydziału Chemii UG <http://www.chem.univ.gda.pl> (obecnie <https://chemia.ug.edu.pl>), w Portalu Edukacyjnym UG MESTWIN <https://pe.ug.edu.pl>, lub (nowsze/aktualnie prowadzone przedmioty) na stronie <https://rafal.slusarz.edu.pl>

- Opracowałem i udostępniłem osobom upoważnionym skrypty powłoki do zarządzania kontami studentów odbywających dydaktykę w pracowniach TI Wydziału Chemii UG oraz od roku 1999 do dziś administruję pracowniami TI i serwerem studenckim EtOH; współadministruję domeną etoh.chem.ug.edu.pl utrzymywaną w ramach usługi G Suite (dawniej: Google Apps dla Szkół i Uczelni).

- Wygłosiłem 3 wykłady popularnonaukowe w ramach Dni Otwartych Wydziału Chemii UG i wydarzeń popularyzujących naukę na UG.

- W ramach popularyzacji nauki (poza Dniami Otwartymi WCh UG) w ciągu 2 lat przeprowadziłem serię (60 godzin) warsztatów/ćwiczeń laboratoryjnych (z zakresu chemii ogólnej i organicznej) dla młodzieży szkół podstawowych i ponadpodstawowych, 2021-2022.

- Uzyskałem 2 certyfikaty rozwoju kompetencji dydaktycznych (UJ, Kraków, obydwie w 2022 r.).

- Uzyskałem certyfikat e-nauczyciela przyznany przez Stowarzyszenie E-learningu Akademickiego, SEA, Warszawa, 2013; ten i dwa poprzednio wymienione certyfikaty dostępne są na stronie <https://rafal.slusarz.edu.pl/certyfikaty>

- 7-krotnie uczestniczyłem w organizacji Bałtyckiego Festiwalu Nauki na UG (2011-2017), corocznie w organizacji Dni Otwartych Wydziału Chemii UG (od 2005), czterokrotnie uczestniczyłem w pracach Komitetu Organizacyjnego *Polish-Korean Conference on Protein Folding* (co 2 lata od 2016 r.) oraz przygotowałem strony tych konferencji: <https://pkc.ug.edu.pl>, (poprzednio: <http://pkc2016.ug.edu.pl> oraz <http://pkc2018.ug.edu.pl>), łącznie z formularzami rejestracji i obsługi zgłoszeń.

- Zaprojektowałem, wykonałem oraz obecnie administruję portalem internetowym <https://unres.pl> służącym zarówno prezentacji i upublicznieniu pakietu obliczeniowego UNRES, ale także jako platforma przygotowawcza w kolejnych edycjach eksperymentów *Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction* (CASP). Strona, oprócz opisów i dokumentacji UNRES zawiera także formularze rezerwacji i tabele opisu wszystkich celów (w znaczeniu poszczególnych makromolekuł będących podmiotem eksperymentów) kolejnych edycji CASP. Zawiera wielopoziomowy mechanizm autoryzacji użytkowników i udostępnienia im treści na podstawie uprawnień i poziomu dostępu.

- Byłem członkiem:

- Rady Programowej ds. E-learningu UG (2012-2020)
- Rektorskiej Komisji ds. Hotelu Asystenckich UG (2008-2012)
- Rady Wydziału Chemii UG (2005-2008)
- Zespołu ds. Internetowej Rejestracji Kandydatów UG (2007)
- Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Chemii UG (2005-2007)

- Uczestniczyłem w przygotowaniu i prowadzeniu części zajęć w ramach projektów finansowanych z funduszy strukturalnych i Funduszu Spójności (Międzywydziałowe interdyscyplinarne studia doktoranckie Chemia z Fizyką realizowane w Uniwersytecie Gdańskim, POWER, CHEM-FIZ).

VII. INNE INFORMACJE, WAŻNE PUNKTU WIDZENIA WNIOSKODAWCY, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ

PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ

(uzupełnienie informacji o dotychczasowym zatrudnieniu, *vide* p. III., powyżej)

Swoją karierę zawodową rozpocząłem w roku 1999, kończąc z wyróżnieniem, rok przed czasem, jednolite studia magisterskie na Wydziale Chemii (WCh) Uniwersytetu Gdańskiego. Jeszcze podczas studiów doktoranckich (1999–2004) zostałem zatrudniony na posadzie technicznej na WCh (2001–2003), a później na okres jednego roku jako asystent w Katedrze Syntezy Organicznej. Przez cały ten czas, zarówno podczas zatrudnienia technicznego, jak i naukowo-dydaktycznego, prowadziłem zajęcia na studiach I. i II. stopnia na kierunkach Chemia i Ochrona Środowiska, oraz aktywnie uczestniczyłem w badaniach naukowych zarówno swojej macierzystej Katedry, jak i Katedry Chemii Teoretycznej. Dzięki aktywności w tej ostatniej, udało mi się nawiązać współpracę z prof. H. Scheragą z Cornell

University, a później z innymi zespołami z tego samego ośrodka i ośrodków zajmujących się podobną tematyką badań. W tym samym czasie byłem wykonawcą w dwóch krajowych i jednym międzynarodowym projekcie. W rozliczeniu tego ostatniego (FIRCA, pozycja **pa01** w p. **II. 9.** „Wykazu”) zostałem wyróżniony.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych (2004) podjąłem kolejne zatrudnienie na posadzie technicznej (do 2006) i oprócz rozwoju naukowego, związanego z chemią *in silico* peptydów (w zespole prof. Bernarda Lammka), białek (w zespole prof. Jerzego Ciarkowskiego), gruboziarnistych pól siłowych (w zespole prof. Adama Liwo), oraz prowadzenia zajęć na wszystkich trzech stopniach studiów, rozwijałem także swoje umiejętności informatyczne, zarówno od strony programistycznej (prowadząc stronę *www* WCh, oraz studiów podyplomowych), jak i technicznej (z racji obowiązków służbowych zajmowałem się całością infrastruktury sieciowej na WCh). Wtedy właśnie opracowałem i wdrożyłem działające do przeniesienia WCh do nowej lokalizacji (2013) rozwiązania technologiczne, o których wspominam w p. **III. 4.** „Wykazu”.

Od roku 2006 jestem zatrudniony na posadzie adiunkta w Katedrze Chemii Organicznej i oprócz kontynuacji badań nad peptydami, białkami i zastosowaniem gruboziarnistych pól siłowych, zająłem się także układami cukrowymi i glikoproteinowymi pod ówczesnym kierownictwem prof. Andrzeja Wiśniewskiego. Ten właśnie temat z czasem stał się głównym nurtem mojego naukowego zainteresowania.

OTRZYMANE NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

- 1999: otrzymałem nagrodę *Procter & Gamble* dla *Najlepszego Absolwenta Uczelni Wyższych w Polsce*,
- 2003: otrzymałem Nagrodę Ministra Edukacji i Sportu, zespołową,
- 2005: otrzymałem wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Chemicznego za *Najlepszą Rozprawę Doktorską z Dziedziny Chemii, wśród rozpraw obronionych w 2004 roku*
- 2005: zostałem wyróżniony w rozliczeniu projektu *A simplified potential for protein folding simulations*, wspieranego przez *Fogarty International Research Collaboration Award*,
- 2006: otrzymałem indywidualną Nagrodę Rektora UG (za *osiągnięcia i rozwój w pracy zawodowej*),
- 2017: zostałem powołany na stanowisko prezesa *Klubu Absolwentów Wydziału Chemii UG* (nadal piastuję ten urząd),
- 2020 i 2022: dwukrotnie otrzymałem zespołową Nagrodę Rektora UG.

PLANY ROZWOJU NAUKOWEGO

W zeszłym roku nawiązałem współpracę naukową z prof. Ewą Siedlecką zajmującą się m.in. imidazoliowymi i pyrolidyniowymi cieczami jonowymi w układach z etanolem, glikolem, gliceryną i mannitolem. Korzystając ze swojego doświadczenia w modelowaniu układów cukrowych oraz parametryzowaniu układów nietypowych uważam, że realizacja takiego właśnie tematu będzie owocowała znaczącymi wynikami, a może nawet odkryciami.

Zainteresowałem się także materiałami porowatymi MOF (ang.: Metal-Organic Framework), które można wykorzystać do dostarczania modelowanej wcześniej przeze mnie Van bezpośrednio do zainfekowanych tkanek, eliminując w ten sposób jej niekorzystne, ogólnoustrojowe działanie. Tego typu tematykę chciałbym rozwijać we własnym zespole, którego zrąb zawiązuje się już w mojej Katedrze.