

Report on Ph.D. thesis  
of  
Ing. Ondřej Kroutil

**“Molecular modeling of biomolecules – surface interactions”**

The dissertation of Ing. Ondřej Kroutil is a valuable contribution to the study of interactions between biomolecules and surfaces which are relevant in many areas - from technological applications to prebiotic chemistry. The whole work represents very suitable combination of various computational methods used to shed light on this subject.

The thesis document consists of ~50 pages organized in five main chapters. Both published and unpublished data are combined to give an overall picture of author's achievements. The first chapter - introduction - familiarizes reader with studied biomolecules and used methods. The second chapter is devoted to surfaces (i.e. Graphene, Mercury, Quartz[101] and Rutile[110]) and describes an impressive effort that was spent to gain reliable force-field parameters. There are included unpublished results of many MD simulations that convincingly demonstrate quality of force constants. The third chapter presents results (again mostly unpublished) of MD simulations of physisorption of oxalate dianions and nucleic acid building blocks on Rutile(110) and Quartz(101) surfaces. The fourth chapter shows results of MD simulations of chemisorption of nucleic acids on a grapheme surface and peptides on a mercury surface. Then conclusions follow. The thesis text is comprehensive and well-organized – just sub-chapters 3.2. and 3.3. should be interchanged to connect together the oxalate story. The dissertation itself, as far as I can judge, is written in good and understandable English. Its graphical lay-out is appended with nice instructive pictures.

The main results are as follows:

- Regarding oxalate, it was shown that despite its high negative charge the dianion occupies similar positions as structured waters above the rutile surface.
- Further, remarkably different adsorption patterns of four nucleobases on grapheme were revealed with a help of bivariate plots.
- Study of DNA on a grapheme surface outlined the role of surface charge on DNA adsorption and found notable differences in single stranded- and double stranded-DNA adsorption. While in double stranded-DNA electrostatic forces between charged surface and double stranded-DNA backbone play major role, in single stranded-DNA stacking interactions can compete with electrostatic forces.
- Ability of peptides with particular composition to act like proton wires was confirmed in combined experimental and ab initio study. Subsequent classical MD study focused on a detailed analysis of chemisorbed peptides. While peptides with neutral histidines were found to be rather insensitive to different surface charge, peptides with protonated histidines showed greater sensitivity.

I appreciate effort, flexibility, creativity and thoroughness that were paid to the selection, optimization and development of force fields. Many different approaches were applied - AIMD (Oxalate), Natural Bond Orbital method (Quartz surface), Restrained ElectroStatic Potential method (nucleic acids building blocks) etc. Force fields were chosen correctly also for ions and nucleic acids to prevent a co-crystallization of ions and/or instabilities in double helical structures during long MD runs.

It is evident without any doubts that Ing. Ondřej Kroutil masters wide range of advanced modeling techniques (CMD, AIMD) using many different software packages (AMBER, GROMACS, CP2K, Gaussian, Turbomole etc). He knows to suitably apply them to get valuable data. The scientific results are of major interest and substantially contribute to the knowledge of interactions between biomolecules and surfaces. There are enclosed three papers (with IF > 4) and one manuscript. Another two or three papers could appear soon, if we take into account the amount of unpublished data. Moreover, Ing. Ondřej Kroutil is the first author of two other highly impacted papers concerning computer modeling of biomolecules. These papers were not included into the thesis due to (maybe a little bit exaggerated) care about the purity of its storyline.

In my opinion, the work certainly fulfils the requirements for Ph.D. thesis, and I recommend it for the defense.

Prague 9<sup>th</sup> September 2016

*Barvík*  
RNDr. Ivan Barvík, PhD.  
*Institute of Physics*  
*Faculty of Mathematics and Physics*  
*Charles University, Prague*

Questions:

1) Technical questions:

- Did you produce MD simulations using a workstation or by means of Linux clusters in a supercomputing center? Exclusively CPU or even GPU were used?
- Which MD simulations have been carried out using software package GROMACS and which by means of AMBER?
- Which force field was used for MD simulations of peptides?

2) Regarding Quartz surface - partial atomic charges were derived using ChelpG and Natural Bond Orbital methods as implemented in the Gaussian 03 program. Are you thinking about some alternative approaches that would be closer to the way how force fields for biomolecules were derived? I.e. RESP which was incidentally used here to derive partial charges for nucleobases? Alternatively, existing force constants for Silica (Lopes et al., J. Phys. Chem. B 110 (2006) 2782-2792) could be used as a starting point and forcefield CHARMM could be extended using the Force Field Toolkit (Mayne et al., J. Comp. Chem. 34 (2013) 2757-2770), which enables creation of input files for QM calculations as well as subsequent fitting of force constants?

3) Bivariate plots in Figure 3-5 indicate orientation of adsorbed nucleobases. These results are precisely described in the text. Yet it puts too high demands on my imagination. Please, show explicit pictures illustrating the orientation of nucleobases.

4) Papers OK5, OK6 were not attached to the dissertation. What are the main results of these papers?

# Oponentský posudek disertační práce

## *Molecular modeling of biomolecules – surface interactions*

Autor práce: **Ing. Ondřej Kroutil**  
Školitel: doc. RNDr. Milan Předota, Ph.D.

Oponent: RNDr. Jan Jirsák, Ph.D.

Ing. Kroutil se ve své doktorské disertaci zabývá chováním biologicky významných molekul v kapalně fázi na imobilním fázovém rozhraní. Vybrané systémy studuje metodami molekulárního modelování a teoretické chemie. Téma je aktuální – volba systémů vyplývá z potřeb aplikovaného výzkumu a z principů moderních bioanalytických metod.

Práce sestává z cca 50 stran hlavního textu a čtyř příložených článků, které jsou k dnešnímu datu již všechny publikovány v impaktovaných časopisech (včetně posledního, čtvrtého, který je k disertaci přiložen ještě ve formě nerecenzovaného rukopisu). Doktorand je hlavním autorem dvou příložených prací, u ostatních je spoluautorem. Články představují v podstatě nezávislé studie spadající do zvolené problematiky. Hlavní text shrnuje jak závěry příložených článků, tak další, dosud nepublikované, výsledky autora.

Předložená práce je sepsána přehledně a věcně. Kladně hodnotím zejména kvalitní rešerši (nakolik mohu posoudit jako badatel, který se přímo biomolekulami nezabývá) a snahu o vzájemné porovnání výsledků dílčích studií. Práce je na dobré jazykové úrovni, pouze s občasnými odchylkami od standardní angličtiny a ustálených typografických pravidel. Po stylistické stránce mám výtku pouze k první větě závěru – zmínka o autorově úsilí se něco naučit podle mého skromného názoru do vědecké práce nepatří. Domnívám se, že by práci slušel seznam symbolů a zkratk.

Po odborné stránce je práce na vysoké úrovni. Autor si vzhledem ke zkoumaným problémům klade relevantní otázky a vhodnými metodami na ně nalézá odpovědi. Z výběru použitých metod a z následné interpretace dat je patrné, že pro autora je prioritou hledání pravdy i za cenu větší náročnosti zvoleného postupu. Své teoretické závěry autor poctivě konfrontuje s výsledky experimentů. Jeho interdisciplinární rozhled jej nenechává spočinout v „modelářské bublině“ samoučelného generování dat.

Považuji zde za vhodné upozornit, že rovnice (2-1) platí pouze pro elektrické pole mezi dvěma deskami s nábojovou hustotou  $\sigma$  a  $-\sigma$ . Pro jeden nabitý povrch je potřebná nábojová hustota odpovídající stejné intenzitě pole dvojnásobná. V tabulce 2-3 je nicméně převod nábojové hustoty na intenzitu pole proveden správně. Věcnou výhradu mám k hodnotám elektrického napětí ve studii s povrchem Hg. Uvádět napětí takto spočítané z intenzity vnějšího pole považuji za poněkud zavádějící. Tento bod bych rád diskutoval v rámci obhajoby, viz odpovídající otázka níže.

**Na základě výše uvedených skutečností se domnívám, že předkládané dílo Ing. Ondřeje Kroutila splňuje požadavky kladené na doktorskou disertaci, a práci proto doporučuji k obhajobě.**

**Otázky pro obhajobu:**

1. Ve stati zabývající se peptidy na povrchu rtuti jste vyjadřoval sílu vnějšího pole pomocí „aplikovaného“ elektrického napětí mezi rtuťovými povrchy. Opravdu Vámi uvedené hodnoty v simulaci odpovídají rozdílu elektrických potenciálů použitých kovových povrchů? Je možno toto napětí nějak vztáhnout ke skutečnému napětí měřenému mezi elektrodami v příslušných experimentech?
2. Máte nějaké opodstatnění pro chemickou vazbu mezi povrchem rtuti a peptidovým řetězcem? Z článku [OK3] není patrné, že by se v systému předpokládala chemisorpce.

7. září 2016 v Ústí nad Labem



RNDr. Jan Jirsák, Ph.D.

### Posudek disertační práce

**Název:** Molecular modeling of biomolecules – surface interactions

**Autor:** Ing. Ondřej Kroutil

Předložená disertační práce je zaměřena na využití počítačových simulací ke studiu interakcí vybraných molekul s povrchy, což je s ohledem na omezené možnosti experimentálních technik, téma značně aktuální. Mezi studované povrchy student zařadil grafen, rtuť, křemen (101), a rutil (110). Mezi molekuly interagující s povrchy pak různě protonované formy oxalátu, nukleobáze, nukleové kyseliny a peptidy. Zvolenými simulačními technikami byly hlavně klasické a *ab initio* molekulárně dynamické simulace s plně atomovým rozlišením, které student doplňoval kvantově chemickými výpočty. Oceňuji, že student tyto techniky nejenom konzumoval, ale byl je schopen dále rozšiřovat vytvářením vlastních parametrizací silových polí.

Výsledky relevantní k předložené disertační práci student publikoval jako spoluautor ve třech publikacích přijatých do impaktovaných časopisů (IF 2014: 4,8; 4,5; 4.1) a dále v jedné odeslané publikaci. U dvou těchto publikací je student prvním autorem. Dále je spoluautorem dalších dvou publikací, které nejsou v disertační práci komentovány. V samotné disertační práci je pak souhrn výsledků, které zatím nebyly publikovány a po dopracování mohou posloužit jako základ pro další publikace.

Práce je psaná čtivým anglickým jazykem, který jen v některých částech bylo těžké sledovat (např. část popisující metodu CPS). Po grafické stránce se práce nevyvíjí podle dnešního standardu, v některých částech by však stálo použít obrázky větší nebo klást větší důraz na jejich rozlišení (např. Figure 1-4, dále obrázky z publikací, výtka se týká tištěné práce). Oceňuji použití plných názvů článků v citacích. Nelíbí se mi však způsob odkazování pomocí jména a roku, který je spíše běžný v biologicky orientovaných časopisech než v práci z oblasti biofyziky, nehledě na to, že se k odkazování v příložených publikacích používají právě číselné indexy. Disertační práce v rozsahu čítajícím 138 stran se skládá ze dvou hlavních částí. V první části o rozsahu cca 54 stran je stručný úvod do problematiky, přehled simulačních technik, popis studovaných systémů, souhrn dosažených výsledků včetně nepublikovaných dat a závěr. V druhé části jsou pak uvedeny jednotlivé publikace.

S ohledem na délku textu, se student nevyvaroval chybám, např.: str. 15, Table 2-1: v tabulce není nic zeleného; str. 18, Table 2-2: chybějící konec popisku tabulky; str. 25: „double-ξ“ (ksí) má být „double-ζ“ (zéta); str. 29: „consisted of and equilibration“; str. 118: asi chybná definice torzního úhlu “H-O-O-C torsion angle (hydroxyl)” má být “H-O-C-C torsion angle (hydroxyl)“, apod.

V úvodní části student shrnuje současné poznatky k studovaným systémům a použitým simulačním technikám. V této části bych ocenil, kdyby se student více zaměřil na oblasti, které nejsou příliš popsány ve standardních učebnicích, např. na *ab initio* simulace, které student popsal velmi stručně, kdežto správný popis vzniku peptidické vazby, který je možné nalézt již ve středoškolských učebnicích, student uvedl na obrázku Figure 1-4b zcela špatně. Uvedený produkt má totiž k peptidu velmi daleko.

Ve výsledkové části jsou shrnuty jak publikované tak i nepublikované výsledky. Bohužel pro pochopení nepublikovaných výsledků není většinou v této části uveden relevantní popis použitých metod. Presentované výsledky tak nejsou zcela reprodukovatelné, což tuto část práce značně diskvalifikuje. Dále mi v některých částech uniká vlastní kontext, proč byly dané simulace prováděny. K této části mám následující připomínky a dotazy:

Nejkontroverznější část práce se týká simulací systémů obsahující oxalátový anion. Např. na Figure 3-3 je uvedena hodnota  $g(r)$  pro párovou interakci mezi oxalátovým atomem kyslíku a sodíkovým kationtem. Tato hodnota je nenulová i v simulaci pomocí *ab initio* molekulové dynamiky, která však byla podle popisu uvedeného v metodách (str. 26 a 99) provedená bez přítomnosti protiiontů (byl použit uniformní náboj distribuovaný přes simulační box). V popisu klasické molekulové dynamiky také nejsou uvedeny žádné informace o tom, že by systémy měly obsahovat kationty nebo anionty.

1. Co tedy student v této části skutečně simuloval?
2. Jaké parametry použil pro popis  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v klasické molekulové dynamice?

Z kvantově chemických výpočtů plyne, že optimální konformace oxalátového aniontu odpovídá struktuře, která má hodnotu torzního úhlu (O-C-C-O) přesně  $90^\circ$  (Figure 2, str. 117). U tohoto systému dále student uvádí, že v *ab initio* simulacích pozoroval volnou rotaci okolo vazby C-C a to přibližně každých 12 ps (str. 26 a 102). Tomuto tvrzení však neodpovídá časový průběh torzního úhlu (O-C-C-O) uvedeného v grafu Figure 4 (str. 119), což student dále stvrdil uvedením průměrné hodnoty  $77,5 \pm 8,4^\circ$  v textu pro simulaci ve vakuu. Časový průběh pak dále neodpovídá histogramu Figure 5 (str. 120).

3. Může student vysvětlit, jak přesně měřil hodnotu dihedrálního úhlu uvedeného v grafu Figure 4 a proč jeho střední hodnota pro simulaci ve vakuu neodpovídá nalezenému minimu z kvantově mechanických výpočtů (Figure 2)?

V kapitole 4.2 (str. 36) je studován oligopeptid chemisorbovaný na rtuťovou plochu přes kovalentní vazbu Hg-S. Tento oligopeptid obsahuje kaskádu histidinových residuí v takovém uspořádání, které může usnadňovat transfer protonů podél oligopeptidového skeletu.

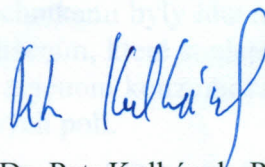
4. Jaké pohnutky vedly studenta k studiu uvedeného systému, který však neodpovídá experimentálnímu uspořádání v publikované práci OK3, kde použitý peptid neobsahoval terminální cystein a k chemisorpci tak nemohlo dojít?
5. V molekulárně dynamických simulacích se student zaměřil pouze na dva krajní stavy a to systém, kdy všechny histidiny byly neutrální a pak na systém, kdy byly plně protonovány. Jaká protonace však ve skutečnosti bude odpovídat experimentálním podmínkám?
6. Je možné z výsledků experimentální metody CPS usoudit, zdali se studovaný oligopeptid skutečně chová jako protonový „drát“?

V kapitole 3.2 a 4 je při studiu fyzisorpce a chemisorbce studovaných biomolekul použito velmi komplikované uspořádání simulovaných systémů, kdy jsou použity celkem čtyři vrstvy v periodických okrajových podmínkách, vrstva materiálu se studovaným povrchem (a případně kovalentně ukotvená studovaná biomolekula), voda (a případně studovaná biomolekula), jiná vrstva materiálu a vakuum.

7. Jaké důvody vedly studenta k zvolení uvedeného upořádání?
8. Jakým způsobem byla zajištěna správná hustota vrstvy obsahující vodu?

Závěrem musím konstatovat, že student v předložené disertační práci prokázal, že je schopen se orientovat v široké oblasti počítačových simulací a tyto simulační techniky využít ke studiu vlastností anorganických, organických a bimolekulárních systémů a hlavně jejich kombinací, což je oblast, která není stále dobře prozkoumána, a získané výsledky, které rozšiřují poznání v této oblasti, byl schopen publikovat v recenzovaných časopisech. **Práci proto doporučuji k obhajobě.**

V Brně 12. září 2016



RNDr. Petr Kulhánek, Ph.D.  
Středoevropský technologický institut  
Masarykova univerzita  
Kamenice 753/5  
625 00 Brno