



UNIwersytet Gdański



Prof. UG, dr hab. Jacek Piosik
 Pracownia Biofizyki
 MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

Gdańsk, dnia 11 lutego 2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr Dominiki Jankowskiej zatytułowanej: "Zastosowanie metod obliczeniowych w badaniach bakteryjnych białek TraR i AiiO"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Symulacji Układów Biomolekularnych pod kierunkiem Prof. UG, dr hab. Rajmunda Kaźmierkiewicza. Przedmiotem badań mgr Jankowskiej były wybrane elementy mechanizmu blokowania systemu sygnalizatora zagęszczenia (QS, quorum sensing). Autorka do analiz wybrała możliwą inhibicję białka TraR z bakterii *Agrobacterium tumefaciens* przez plumbaginę i 3-chloroplumbaginę. Drugim celem naukowych dociekań Autorki był enzym AiiO z bakterii *Ochrobactrum sp.* posiadający aktywność hydrolitycznego niszczenia cząsteczek sygnałowych laktonu N-acyl-L-homoseryny (AHL), co prowadzić może do wyciszenia mechanizmu zagęszczenia (quorum quenching, QQ).

W latach 60-tych ub. wieku zapoczątkowano badania nad bioluminescencją żyjących w środowisku morskim bakterii gatunku *Vibrio fischeri*. Zauważono, że zdolność bioluminescencji hodowli bakteryjnej ściśle powiązana jest z jej gęstością. Okryto, że bakterie *V. fischeri* indukowane są cząsteczkami laktonu N-3-oksyoheksanoil-L-homoseryny (OHHL), co w konsekwencji powoduje transkrypcję genów odpowiedzialnych za bioluminescencję – *luxI* i *luxR*. Zjawisko to (QS) występuje szczególnie intensywnie w przypadku, gdy bakterie *V. fischeri* żyją w symbiozie z morskimi zwierzętami kolonizując ich organy świetlne i jest ono związane bezpośrednio z wysokim stężeniem cząsteczek sygnałowych OHHL. *Agrobacterium tumefaciens*, Gram-ujemny gatunek bakterii będący patogenem roślinnym, posiada nieco inny system komunikacji QS oparty na białkach TraI i TraR. Białko TraI odpowiedzialne jest za syntezę cząsteczek sygnałowych – laktonu N-3-hydroksyoheksanoil-L-homoseryny (OOHL) – odpowiednika OHHL u *V. fischeri*. Białko TraR jest natomiast aktywatorem transkrypcji zależnym od cząsteczek sygnałowych OOHL. W jego strukturze można wyróżnić dwie istotne domeny funkcjonalne: wiążącą DNA w rejonie C-końca oraz odpowiedzialną za wiązanie cząsteczek sygnałowych w rejonie N-końca. Mechanizm działania białka TraR opiera się na

wiązaniu przez jego nieaktywny monomer cząsteczki sygnałowej, utworzeniu dimeru TraR, co umożliwia jego wiązanie do DNA w rejonie regulonu *tra* (*tra* box) i transkrypcję genów *tra*. Jedną z możliwości zakłócenia tego procesu jest wiązanie białka TraR z inhibitorem. W niniejszej pracy do sprawdzenia takiego wiązania zostały wykorzystane produkowane przez muchówkę amerykańską, znane są ze swoich właściwości przeciwmalarycznych, przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych, naftochinony: plumbagina i 3-chloroplumbagina.

Innym mechanizmem blokowania QS jest wyciszanie jego sygnalizacji (QQ). Biorą w nim udział enzymy degradujące cząsteczki AHL, na przykład acylazy lub laktonazy. Produkty hydrolizy tych enzymów tracą zdolność wiązania się do receptorów AHL, co w konsekwencji prowadzi do blokowania mechanizmu QS. Pochodzące z Gram-ujemnych bakterii *Ochrobactrum sp.* białko AiiO zostało zidentyfikowane przez dwa niezależne zespoły badawcze. Jeden z nich (S. Jafra, R. Czajkowski i wsp.) wskazał, iż białko to ma aktywność acylazy. Drugi zespół badawczy (G.Y. Mei i wsp.) wskazał natomiast, iż AiiO ma aktywność laktonazy. Określenie struktury przestrzennej oraz oddziaływań białka AiiO z wybranymi cząsteczkami sygnałowymi było drugim celem niniejszej pracy.

Rozprawę Pani mgr Dominiki Jankowskiej stanowi książka licząca 179 stron formatu A4 wraz z nośnikiem CD zawierającym pliki z wynikami obliczeń. Układ pracy jest dość typowy dla tego rodzaju opracowań, a najbardziej zauważalną różnicą jest połączenie wyników i dyskusji w jeden rozdział – „Wyniki i dyskusja”.

Opracowanie zaopatrzone jest w szczegółowy „Spis treści” oraz „Wykaz stosowanych skrótów”. Szczególnie ten drugi jest bardzo przydatny w trakcie lektury pracy ze względu na bardzo dużą liczbę stosowanych skrótów – jest ich dokładnie 30. Kolejnym 2,5 stronicowym rozdziałem jest „Streszczenie”, w którym w sposób zwięzły Doktorantka opisuje swoją pracę. Ta część pracy nie budzi żadnych wątpliwości – napisana jest w sposób poprawny.

Zawarty na 22 stronach „Wstęp” dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, którą zainteresowała się Doktorantka. Napisany jest w sposób ciekawy i opatrzone 74 odnośnikami literaturowymi. Pani mgr Jankowska w sposób umiejętny łączy tutaj opis mechanizmu komunikacji międzybakteryjnej (QS) i jego możliwej inhibicji wraz z mechanizmem jego wyciszenia (QQ). W tym rozdziale zabrakło jednak opisu wykorzystywanych w dalszych etapach pracy inhibitorów białka TraR – plumbaginy i 3-chloroplumbaginy. Opis obydwu związków zawarty natomiast jest po raz pierwszy, dość niefortunnie, w „Wynikach i dyskusji”. Doktorantka wykorzystwała również do opisu problematyki badawczej oryginalne jak i zmodyfikowane ryciny z opublikowanych artykułów naukowych – w prezentowanej pracy opisane są jako rysunki.



Zazwyczaj autor tego rodzaju pracy zastanawia się czy stosować ryciny oryginalne, pomimo iż zawierają często opisy w języku angielskim, czy też modyfikować je np. poprzez stosowanie zapisów w języku polskim. W przypadku ocenianej pracy występują zarówno jedne jak i drugie. Zdaniem piszącego te słowa lepiej byłoby zachować tutaj konsekwencję i stosować albo oryginalne, albo zmodyfikowane ryciny – z większym naciskiem jednak na te drugie. Wysokiej jakości i bardzo poglądowe są natomiast ryciny Autorki niniejszej pracy doktorskiej. Najlepszym przykładem tak dobrze opracowanej ryciny jest rys.1.15 przedstawiający triadę katalityczną enzymu AiiO. Pani mgr Jankowska w tej części pracy przedstawia również struktury cząsteczek AHL w formie tabeli. Zwyczajowo tytuły tabeli umieszcza się nad nią, w przeciwieństwie do metodologii użytej w tym opracowaniu. Znalazł się także w tej części pracy językowy lapsus, który zmuszony jestem opisać. Otóż na stronie 11 Autorka pisze o badaniach nad bioluminescencją „bakterii wodnych”. A czy są jakieś znane bakterie nie wymagające do życia wody? Innym drobnym mankamentem są bardzo częste, dodam zbyt częste, błędy literowe. Najbardziej kuriozalnym jest, cytuję słowo w brzmieniu oryginalnym: „unek”, zapewne od rysunek. Uwadze recenzenta nie uszedł też błąd w opisie nazwy gatunkowej *Vibrio fischeri*, w tym wypadku jednak konsekwentnie powielany przez Autorkę w dalszych częściach pracy.

„Cele pracy” są kolejnym, krótkim ale niezwykle istotnym rozdziałem. Jak już wspominałem na wstępie, Doktorantka postawiła sobie za cele zbadanie możliwości wiązania się plumbaginy i jej pochodnej do białka TraR i przez to blokowania jego funkcji. Drugim celem było badanie struktury białka AiiO, określenie jego oddziaływań z wybranymi cząsteczkami sygnałowymi oraz charakteru reakcji katalizowanej przez ten enzym. „Cele pracy” zostały opisane precyzyjnie i logicznie. Do realizacji celów swojej pracy wybrała szeroką gamę metod modelowania molekularnego i technik obliczeniowych, jak np.: dokowanie molekularne, dynamika molekularna, analiza oddziaływań z wodą procedurą Water-Swap, czy też symulacji hybrydowej łączącej techniki kwantowe i klasyczną dynamikę molekularną QM/MM.

„Materiały i metody” są imponującym, bo liczącym 37 stron maszynopisu, kolejnym rozdziałem ocenianej pracy doktorskiej. Metodologia opisana jest bardzo precyzyjnie. W wyczerpujący sposób przedstawione są kolejne kroki i algorytmy obliczeń oraz symulacji molekularnych. Dodatkowo Autorka przedstawia sposoby analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Równie precyzyjnie opisane jest wykorzystywane w trakcie pracy oprogramowanie (21 pozycji!) oraz używany do obliczeń sprzęt komputerowy (zarówno stacje robocze jak i klastry obliczeniowe). Nie mniej jednak w tej części pracy znowu dostrzec można, podobnie jak we „Wstępie”, drobne błędy literowe (sporo!) i niekonsekwencję w przedstawianiu rycin oraz tabeli 2.1. Dodatkowo Autorka przedstawia kilka równań matematycznych, które zazwyczaj opisuje się kolejnymi numerami w celu łatwiejszego odniesienia się do właściwego równania. W tej pracy brakuje



takiej numeracji równań matematycznych, aczkolwiek tłumaczyć to można nienawiązaniem do przedstawionych równań poza tym rozdziałem, w dalszych częściach pracy.

Najobszerniejszą częścią pracy doktorskiej Pani mgr Dominiki Jankowskiej jest liczący 77 stron maszynopisu rozdział „Wyniki i dyskusja”. Rozpoczyna on się od opisu roli plumbaginy i 3-chloroplumbaginy w potencjalnej inhibicji receptora białka TraR. Doktorantka pokrótce przedstawia właściwości omawianych związków oraz wyniki badań eksperymentalnych ich działania wobec szczepu bakterii *Agrobacterium tumefaciens* opublikowanych w pracy doktorskiej dr A. Szpiter. I jak już wcześniej wspominałem, brakuje takiego choćby krótkiego wprowadzenia o właściwościach plumbaginy i jej pochodnej we „Wstępie” omawianej pracy. Następnie Autorka wykorzystując metodę dokowania molekularnego opartego o oprogramowanie AutoDock4.2 bada możliwości wiązania przez białko TraR cząsteczek plumbaginy, 3-chloroplumbaginy, naturalnego liganda w/w białka OOHL oraz związków referencyjnych: droseronu i patuliny. Uzyskane wyniki wykazały, że naturalny ligand białka TraR wiąże się z optymalną energią wiązania wynoszącą -5,83 kcal/mol (średnio -4,45 kcal/mol). Doktorantka wykazała, że również plumbagina i jej pochodna mogą wiązać się do centrum aktywnego białka TraR ze średnią energią swobodną wiązania równą odpowiednio -3,03 i -3,76 kcal/mol. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że obydwie pochodne oddziałują z miejscem aktywnym białka TraR zawsze z ujemną wartością swobodnej energii wiązania, co interpretować można jako wiązanie preferowane termodynamicznie. Kolejnym etapem dociekań Doktorantki było sprawdzenie potencjalnego oddziaływania plumbaginy i jej pochodnej z powierzchnią dimeru białka TraR (drobna uwaga: czy tytuł tego podrozdziału jest właściwy?). Wynikiem tego badania było ustalenie miejsc wiązania ligandów oraz wartości energii swobodnych wiązania. W tym przypadku doktorantka wykazała, że 3-chloroplumbagina wiąże się z niższą średnią energią swobodną wiązania niż plumbagina, odpowiednio -3,21 i -2,78 kcal/mol. Również w tym wypadku Autorka nie zauważyła dodatnich wartości energii swobodnej wiązania. Dodatkowo Doktorantka wykazała możliwość wiązania obydwu ligandów z motywami HTH dimeru TraR odpowiedzialnymi za bezpośrednie wiązanie białka TraR z DNA. Wykazała w ten sposób, że wiązanie obydwu związków z powierzchnią dimeru TraR może prowadzić do potencjalnej dezaktywacji transkrypcji genów znajdujących się pod kontrolą systemu TraI/TraR. Wyniki swoich badań Pani mgr Jankowska zestawia z badaniami eksperymentalnymi przeprowadzonymi przez cytowaną poprzednio dr A. Szpiter. Wyniki eksperymentalne nie potwierdziły jednak, iż plumbagina i 3-chloroplumbagina mogą przyczynić się do braku wiązania białka TraR do DNA. W podsumowaniu tego etapu pracy Doktorantka wskazuje, że zarówno plumbagina jak i 3-chloroplumbagina mogą konkurować o miejsce aktywne z naturalnym ligandem białka TraR. Doktorantka proponuje nawet schemat eksperymentu, który byłby pomocny w poznaniu tego mechanizmu. Nie do końca jest dla mnie



jasne czy został on ostatecznie przeprowadzony (przez kogo?), czy też nie? Według Niej uzyskane dotychczas wyniki wykluczają jednak bezpośredni wpływ plumbaginy i jej pochodnej na mechanizm QS poprzez wiązanie tych związków do białka TraR. Zdaniem piszącego te słowa plumbagina i jej pochodna zostały wybrane do tak subtelnej inhibicji białka TraR dość niefortunnie. Otóż wiadomym jest (A. Kawiak *et.al.*, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, 223(3): 267-276 (doi: 10.1016/j.taap.2007.05.018)), że plumbagina może oddziaływać bezpośrednio na białka poprzez generowanie reaktywnych form tlenu. Jest też niezwykle prawdopodobne, iż te wolne reaktywne formy tlenu mogą oddziaływać prawdopodobnie ze wszystkimi napotkanymi makrocząsteczkami chemicznymi. I moim zdaniem, bardziej prawdopodobne jest iż plumbagina i jej pochodna działają na wiele białek i przez to szlaków metabolicznych bakterii, w ostateczności prowadząc do śmierci komórki. Oczywiście, można by próbować analizę wpływu tych związków na mechanizm QS ale w stężeniach podprogowych dla ich efektów bakteriobójczych. Tylko czy wtedy plumbagina i jej pochodna mogłyby konkurować z cząsteczkami sygnałowymi o miejsce aktywne enzymu? Prosiłbym Doktorantkę o przedyskutowanie tych wątpliwości podczas publicznej obrony pracy.

Kolejnym etapem rozważań Doktorantki było białko AiiO odpowiedzialne za hydrolizę cząsteczek sygnałowych AHL. Pierwszym, zaprezentowanym wynikiem tej części pracy był model strukturalny samego białka uzyskany poprzez obliczenia znanej z GenBank sekwencji za pomocą oprogramowania I-TASSER. Uzyskany model strukturalny potwierdzony został procedurą ProQ i MOLProbity. Następnie korzystając z siedmiu (!) różnych metod Doktorantka wyznaczyła miejsca wiążące substrat. Ukoronowaniem prac nad modelem strukturalnym AiiO było porównanie go z modelem krystalograficznym białka AidH izolowanego przez zespół chiński. Należy tutaj wspomnieć, że badania przeprowadzone przez Panią mgr Jankowską bazowały na sekwencji białka AiiO pochodzącego ze szczepu *Ochrobactrum sp.* A44, natomiast model krystalograficzny opracowany przez A. Gao i wsp. oparty był na sekwencji białka AidH ze szczepu *Ochrobactrum sp.* T63. Chciałbym podkreślić docieklivość Autorki, która nie zadowolili się jedynie wynikami porównania sekwencji samego białka (sekwencje identyczne w 96%) ale również porównała sekwencje genów je kodujących, uzyskując zgodność na poziomie 90%. Porównanie obydwu struktur wykazało nie mniej jednak różnice, ale Doktorantka uznała, moim zdaniem słusznie, że to model teoretyczny przez Nią opracowany będzie wykorzystany w dalszym etapie pracy polegającym na dokowaniu do modelu białka AiiO wybranych 10 cząsteczek sygnałowych AHL różniących się długością łańcucha węglowego, a także posiadaniem lub nieposiadaniem tlenu karbonylowego w pozycji 3. Na podstawie szczegółowej analizy struktury zadokowanych cząsteczek AHL w miejscu aktywnym białka AiiO Doktorantka postawiła hipotezę o aktywności acylazy, proponowanej przez zespół polski, bądź laktonazy, proponowanej przez zespół chiński, wobec cząsteczek sygnałowych. Wykonując symulacje dynamiki molekularnej Autorka wyznaczyła najbardziej prawdopodobne stany konformacyjne



badanych kompleksów AiiO-cząsteczka AHL, które stały się danymi początkowymi do symulacji hybrydowej łączącej techniki kwantowe i klasyczną dynamikę molekularną QM/MM. Wykorzystując technikę symulacji QM/MM mgr Jankowska porównała aktywność AiiO względem wybranych cząsteczek AHL jako laktonazy i acylazy, wykazując, iż mechanizm działania AiiO jako acylazy jest bardzo niekorzystny energetycznie. Wskazywałoby to na duże prawdopodobieństwo, że enzym AiiO ma aktywność laktonazy. Tezę tę Doktorantka potwierdza porównaniem energii (jakiej?) obydwu procesów wynoszących dla aktywności laktonazy $\Delta E \approx 17$ kcal/mol, zaś dla aktywności acylazy $\Delta E \approx 60$ kcal/mol. Generalnie w niniejszym opracowaniu Doktorantka używa symbolu ΔE do opisu zmian energii lub wiązania liganda. W biochemii bardzo często do opisu termodynamiki procesu stosuje się porównanie wartości energii swobodnej Gibbsa w warunkach standardowych (ΔG^0), która zależy również od parametrów stężeniowych substratów. Mam prośbę do Doktorantki o komentarz, czy wymienione powyżej parametry termodynamiczne można ze sobą bezpośrednio porównywać? Jaka jest zależność pomiędzy stosowaną w tej pracy zmianą energii - ΔE a entalpią swobodną Gibbsa (ΔG)? Po wtóre, czy oby na pewno można całkowicie wykluczyć aktywność acylazy enzymu AiiO w kontekście danych doświadczalnych? Jak można by było ostatecznie rozwiązać ten problem naukowy? Ostatnim elementem rozdziału „Wyników i dyskusji” była analiza oddziaływania białka z ligandem w środowisku rozpuszczalnika metodą Water-Swap. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na znaczenie rozpuszczalnika, w tym wypadku wody, do oceny energii swobodnej opisywanych reakcji, a także istotną rolę tlenu karbonylowego w cząsteczkach AHL. Chciałbym podkreślić, że zastosowanie tej metody uważam za niezwykle nowatorskie. Moim zdaniem, pozwala ona na symulację różnych procesów biochemicznych w środowisku wodnym. Rola rozpuszczalnika w takich procesach jest niezwykle istotna, a efekty energetyczne wiązania z rozpuszczalnikiem są często porównywalne a nawet większe niż efekty energetyczne oddziaływania liganda z białkiem.

Podsumowując, część pracy „Wyniki i dyskusja” napisana jest w sposób niezwykle interesujący. Pani mgr Jankowska wykorzystwała szereg skomplikowanych metod obliczeniowych do uzyskania satysfakcjonujących wyników. Co więcej, każda procedura była przemyślana pod kątem jej doboru i doboru warunków wstępnych obliczeń. Wskazuje to na niezwykle logiczny tok rozumowania Doktorantki – wyniki jednego eksperymentu obliczeniowego skutkowałą podjęciem się kolejnego zadania, które miało na celu doprecyzować uzyskane uprzednio wyniki. Świadczy o samodzielności i dojrzałości naukowej Autorki niniejszej rozprawy. Jednakże pełniąc rolę recenzenta zmuszony jestem dodać, że również w tej części pracy występuje sporo błędów literowych. Poza tym na stronie 135 można znaleźć niefortunny skrót myślowy, że wiązanie wodorowe wykształca się między dwoma atomami tlenu (gdzie miejsce na atom wodoru?) – choć sytuację ratuje fakt, że jeden z wymienionych atomów tlenu należy do grupy hydroksylowej.



Kolejna część ocenianej rozprawy doktorskiej to „Literatura”. Zawiera ona spis 170 odnośników zarówno do opublikowanych artykułów jak i stron internetowych. Dobór literatury jest poprawny. Mam jedynie dwie drobne uwagi. Jedna dotyczy cytowanych linków – warto podać czas ostatniego dostępu do adresu. Druga dotyczy opisu pozycji nr 5 – niejasne jest czy praca została opublikowana w maju 1980 roku czy też w 1981 roku. Ostatnie części pracy stanowią wykazy rysunków, tabel i szczegółowy opis zawartości płyty CD wraz z sugerowanym oprogramowaniem do przeglądania zamieszczonych plików.

Reasumując, uważam że Pani mgr Dominika Jankowska przedstawiła do oceny interesującą i metodycznie nowatorską pracę. Zaprezentowała w niej po raz pierwszy możliwość wiązania plumbaginy i jej pochodnej do białka TraR, choć dość niefortunnie, moim zdaniem, dobrała analizowaną cząsteczkę inhibitora. W swojej pracy przedstawiła również optymalną strukturę enzymu AiiO oraz badała dwie możliwe drogi jego aktywności. Ta część pracy pozostawia jednak niedosyt. Warto byłoby, moim zdaniem, kontynuować te badania, zarówno teoretyczne jak i we współpracy naukowej doświadczalne. Szkoda również, że Autorka nie pokusiła się o opublikowanie choć części swoich wyników w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, przynajmniej w kontekście stosowania nowatorskiej metodyki obliczeniowej. Nie mniej jednak wykazała się dużym nakładem pracy, samodzielnością i dociekliwością naukową, a także logiką działania. Trafnie analizowała wyniki i wyciągała z nich optymalne wnioski. Oczywiście, w tak obszernych opracowaniach trudno uchronić się przed pomyłkami czy drobnymi błędami edycyjnymi. Te które wymieniłem nie mają jednak istotnego wpływu na wysoką ocenę niniejszej pracy doktorskiej. Moim zdaniem, Doktorantka udowodniła tym samym, iż zasługuje na możliwość uzyskania stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę powyższe, jestem głęboko przekonany, że oceniana **rozprawa doktorska bez żadnych wątpliwości spełnia wymagania obowiązującej ustawy o tytule i stopniach naukowych**. Dlatego też zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed o dopuszczenie mgr Dominiki Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

