

Dr hab. inż. Maciej Bagiński, prof. nadzw. PG

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

Ul. Narutowicza 11/12

80-233 Gdańsk, Polska

Tel.: (58) 347 15 96

Fax: (+48) (58) 347 11 44

e-mail: chemmbag@pg.gda.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk, 22.01.2016

**Recenzja pracy doktorskiej
Mgr Dominiki Jankowskiej**

Pt.:

**Zastosowanie metod obliczeniowych w badaniach
bakteryjnych białek TraR i AiiO**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi przedstawienie, omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr Dominikę Jankowską pod kierunkiem Dr hab. Rajmunda Kaźmierkiewicza, prof. UG w Pracowni Symulacji Układów Biomolekularnych, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii (UG i GUM). Jak wynika z tekstu pracy powstała ona również w częściowej współpracy z Pracownią Biologicznej Ochrony Roślin (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii), kierowaną przez prof. dr hab. Sylwię Jafre. Zespół Prof. Kaźmierkiewicza od lat zajmuje się zastosowaniem metod obliczeniowych chemii do badania różnych zagadnień biologicznych. W przypadku tej konkretnej pracy było to zastosowanie metod modelowania molekularnego do badania białek istotnych z punktu widzenia sygnalizacji między bakteriami, a w szczególności odpowiedzialnych za mechanizm sygnalizatora zagęszczania (ang. quorum sensing). Celem nadrzędnym pracy było poznanie właściwości molekularnych obu badanych białek TraR i AiiO oraz mechanizmu oddziaływania z nimi ligandów, zarówno tych naturalnych jak i potencjalnych inhibitorów. Zrozumienie tego mechanizmu mogłoby bowiem skutkować opracowaniem związków, które jako skuteczne inhibitory mogłyby zablokować działania mechanizmu sygnalizatora zagęszczania i kontrolowanej przez niego ekspresji genów, a w konsekwencji przeszkadzać zwiększonemu namnażaniu się bakterii i np. uniemożliwiać tworzenie biofilmów bakteryjnych, tak trudnych do zwalczania klasycznymi terapiami przeciwbakteryjnymi.

Prowadzone przez Doktorantkę badania mieszczą się w szeroko pojętym obszarze badań z jednej strony podstawowych (poznanie właściwości molekularnych białek), a z drugiej aplikacyjnych (badanie konkretnych inhibitorów) tak zwanej ang. "medicinal chemistry". Zwłaszcza badania podstawowe procesów komunikacji między bakteriami w odniesieniu do możliwości przeciwdziałania powstawaniu biofilmów bakteryjnych jest bardzo wartościowe. Praca ma też pewien wymiar doświadczalny, gdyż korzysta bezpośrednio z

danych doświadczalnych zarówno co do struktur białek jak i ich właściwości katalitycznych. Ze względu zaś na zastosowania metodyczne można powiedzieć, że przedstawiana praca mieści się w stosunkowo nowym głównym trendzie ang. "medicinal chemistry" - określanym jako komputerowo wspomagane badanie celów molekularnych i projektowanie czy też opracowywanie nowych inhibitorów.

Na szczególne podkreślenie zasługuje element nowości naukowej zaprezentowany w pracy. Otóż autorka w ramach badania właściwości molekularnych białka TraR pokazała jak mogą oddziaływać różne ligandy z tym białkiem w tym ligandy będące jego inhibitorami plumbagina i 3-chloroplumbagina. W przypadku badań właściwości molekularnych białka AiiO ten element nowości naukowej jest jeszcze większy ponieważ Doktorantka badała mechanizm katalizy tych białek i wskazała, że hydroliza laktonowa cząsteczek sygnałowych AHL (laktony N-acylo-L-homoseryny) jest dominującym mechanizmem destrukcji tych ligandów.

Układ pracy:

Praca ma prawie klasyczny układ stosowany w tego typu pracach doktorskich i zawiera na początku streszczenie (ale tylko w j. polskim), po którym umieszczony jest wstęp teoretyczny. Po wstępie przedstawiony jest cel pracy. Dalej autorka przedstawia rozdział metodyczny - Materiały i metody, który zawiera także specjalny podrozdział na temat stosowanego oprogramowania. Po metodach znajduje się rozdział zawierający wyniki i ich dyskusję. Szkoda, że rozdział ten nie zawiera na końcu wyodrębnionego podsumowania, które jest rozbite i znajduje się niejako w kawałkach w różnych miejscach tego rozdziału przy okazji omawiania konkretnych wyników. Na końcu praca zawiera spis literatury, spis rysunków i tabel. Przegląd literaturowy obejmuje 170 pozycji, zarówno odniesień do źródłowych prac metodycznych jak i prac związanych z tematyką pracy pochodzących z ostatniej dekady. Spis literatury zawiera także sporo odniesień do internetowych stron domowych z oprogramowaniem co w tego typu pracy jest zrozumiałe - wiele bowiem wyspecjalizowanych obliczeń związanych najczęściej z przygotowywaniem danych/modeli czy też ich analizą odbywa się przez sieć internetową na publicznych serwerach. Warto też nadmienić, że bardzo wartościowym elementem pracy są materiały uzupełniające dołączone na płycie CD. W tego typu pracach w zakresie modelowania molekularnego pozwala to na sięgnięcie do danych źródłowych, a nawet pozwala czytelnikowi obejrzeć w sposób aktywny badane systemy.

Negatywnym elementem związanym z układem pracy jest brak wyodrębnionego spisu osiągnięć Doktorantki, czy to w postaci publikacji czy też doniesień konferencyjnych, realizacji grantów itp.

Na pozytywne odnotowanie zasługuje część teoretyczna, która stanowi w przystępny sposób przedstawione wprowadzenie do tematyki badawczej pracy jak też opis właściwości strukturalnych i funkcjonalnych białek i grup związków badanych przez autorkę. Rozdział metodyczny również zasługuje na pochwałę, ze względu na kompaktowe przedstawienie wszystkich aspektów obliczeniowych - różne metody obliczeniowe i technicznych włączając w to postępowanie numeryczne. W rozdziale tym dobrze opisane jest przygotowanie wszystkich modeli użytych w obliczeniach. Jest to ważny element pracy, gdyż właściwe przygotowanie modeli jest kluczowe w modelowaniu molekularnym. Założenia i cel pracy zostały przedstawione dość przejrzysto, chociaż należy odnotować, iż rozdział poświęcony celowi pracy właściwie przedstawia jedynie zakres pracy, a w mniejszym stopniu założenia i cel dalekosiężny. Ten ostatni trochę wynika z opisu badanych systemów w części teoretycznej i we wstępie do rozdziału z wynikami. Część teoretyczna pracy pozwala też przygotować czytelnika do zrozumienia zagadnień przedstawianych w części wynikowej. Warto tu też podkreślić, iż ze względu na to, że tematyka pracy doktorskiej była, jak należy przypuszczać, nowa dla Doktorantki wykonała Ona poważny wysiłek w przygotowanie szeroko rozumianej

części teoretycznej. W całej pracy znajduje się też bardzo wiele odniesień do literatury co wskazuje na obszerną wiedzę Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Przegląd literaturowy i analiza danych w dziedzinie objętej badaniami jest wnikliwa i związana z poszczególnymi zagadnieniami podejmowanymi w pracy doktorskiej.

Uwagi i komentarze ogólne:

Na początku warto zaznaczyć, że praca jest dość dobrze napisana od strony narracyjnej i edytorskiej. Bardzo to ułatwia czytanie i podążanie za poszczególnymi elementami pracy. Praca zawiera z jednej strony aspekty obejmujące opracowanie nowych modeli do symulacji, same symulacje i analizę ich wyników, a z drugiej aspekty porównania otrzymanych wyników z wynikami eksperymentalnymi. Ten ostatni element jest bardzo wartościowy, gdyż eksperyment numeryczny, mimo iż jest co raz bardziej wiarygodny i istotny we współczesnej nauce to w większości wypadków jest konfrontowany czy też sprawdzany eksperymentalnie. Praca niejako składa się z dwóch części badawczych każda związana z danym białkiem.

W przypadku białka TraR, które odpowiedzialne jest za wiązanie się do DNA i uruchamianie mechanizmu ekspresji genów badania Doktorantki wskazały miejsca wiążące oryginalnej cząsteczki sygnałowej OOHL i związków będących inhibitorami. Jednocześnie w badaniach tych wykazała Ona, co zostało potwierdzone eksperymentalnie, że miejscami tymi nie mogą być miejsca wiązania tego białka do DNA, ani też inne miejsca na powierzchni białka. Jedyne najbardziej prawdopodobne miejsce wiążące to to, do którego wiąże się oryginalna cząsteczka sygnałowa. Wyniki tych badań są o tyle wartościowe, że w przyszłości mogą być podstawą do projektowania nowych inhibitorów białka TraR.

W przypadku białka AiiO Doktorantka początkowo starała się ustalić strukturę trójwymiarową tego białka w oparciu o różne metody dedykowane tak zwanemu "zwijaniu białek". Przy czym zastosowana główna metoda ang. threading (metoda I-TASSER) pozwoliła Doktorantce otrzymać dość dobry model białka, który został skonfrontowany z danymi eksperymentalnymi, jakie stały się dostępne w czasie realizacji pracy doktorskiej. Mimo otrzymania dość dobrego modelu teoretycznego dalsze badania Doktorantka prowadziła w oparciu o strukturę eksperymentalną. Modelowanie tego białka za pomocą dynamiki molekularnej pozwoliły ustalić położenia ligandów w obrębie centrum aktywnego tego enzymu. W konsekwencji dało to podstawy do symulacji metodami QM/MM dwóch alternatywnych procesów hydrolizy - laktonową i acylową. Ta pierwsza okazała się dominująca ze względu na aspekty energetyczne i strukturalne.

Warto też nadmienić, że porównanie wyników modelowań teoretycznych z wynikami eksperymentalnymi nadaje niejako charakter multidyscyplinarnej pracy. Biorąc pod uwagę realizację celu pracy to właściwie ten cel został osiągnięty. Opracowano modele teoretyczne i wykonano dla nich symulacje, które przyniosły wiedzę o naturze działania badanych białek na poziomie molekularnym. Do tego aspektu pracy i takiego przedstawienia wyników nie mam jako recenzent zastrzeżeń. Ze względu na to, że Doktorantka nie przedstawiła swojego dorobku literaturowego (nie znalazłem go również w bazach danych) można mieć zatem jedynie nadzieję, że otrzymane wyniki zostaną wkrótce opublikowane w specjalistycznych czasopismach.

Z obowiązku recenzenta jednak chciałbym zwrócić uwagę, że czasami czytając pracę nie w pełni byłem usatysfakcjonowany, gdyż tekst nie zawierał wystarczającego opisu lub zawierał taki, który nie był w pełni zrozumiały. Stąd też poniżej przedstawiam szereg uwag mniej lub bardziej szczegółowych wymagających komentarza.

Uwagi i komentarze szczegółowe:

1. Na stronie 21 w odniesieniu do łańcucha bocznego cząsteczek AHL napisano, że może on występować w formie nasyconej, a powinno być chyba "nienasyconej".

2. W celu pracy str. 33 mówi się o obliczeniowym określeniu zdolności wiązania substancji do miejsca wiążącego w białku TraR. Jest to dość niejasne, gdyż w sumie chodziło o ustalenie potencjalnych miejsc wiążących dla tego białka.
3. W pracy na str. 34 używa się niepoprawnych zwrotów typu "odkrywanie struktury", czy też "pozyskanie modelu". Bardziej poprawne terminy to ustalanie struktury i budowa modelu.
4. W opisie dokowania molekularnego na str. 40 mowa jest jedynie o wymogu energetycznym, a pominięty został wymóg geometryczny. Również w tym opisie nie do końca podano, czy uwzględniano w trakcie dokowania, zwłaszcza oryginalnej cząsteczki sygnalizacyjnej OOHL, rotacje wszystkich wiązań mogących rotować (zastosowanie tak zwanej ang. flexible docking) w ligandzie i sąsiednich resztach aminokwasowych.
5. Na str. 43, jak również w celu pracy, Doktorantka pisze iż planuje poszukiwać innych miejsc wiązania cząsteczki inhibitorów do białka TraR - w sumie nie wiadomo dlaczego takie miejsca miałyby występować i jaka byłaby ich rola. Mówienie bowiem jedynie cytując: "... czy przypadkiem nie mają innego miejsca oddziaływania z nim" nie jest wyjaśnieniem.
6. Do wzoru na str. 47 nie ma klasycznego wyjaśnienia użytych w nim symboli.
7. Na stronie 49 użyto określenia macierz A i nie wyjaśniono o jaką macierz chodzi.
8. Przygotowanie modelu białka powinno zawierać określenie stanu zjonizowania reszt aminokwasowych w oparciu o obliczenia tak zwanych przesunięć pKa. Na str. 50 mowa jest jedynie o histydynach, a co z pozostałymi aminokwasami?
9. Na stronie 50 Doktorantka wspomina, że dodała brakujące parametry pola siłowego dla ligandu. Skąd pochodzą te parametry i na ile są spójne z zastosowanym polem siłowym Amber 12.
10. Na str. 51 użyto dość nieprecyzyjnie określenia, że algorytm SHAKE ma zastosowanie do atomów wodoru bez zaznaczenia, że chodzi jedynie o atomy niepolarne wodorów połączone z atomami węgla.
11. Na str. 52 chyba błędnie podano, że jednocześnie stosowano zespół kanoniczny stałego ciśnienia i objętości w dynamice molekularnej.
12. Z opisu postępowania m.in. Rys. 2.14 w symulacji reakcji enzymatycznej metodami QM/MM nie do końca jest jasne czy jedynie pojedyncze atomy ulegały przesunięciu w celu osiągnięcia stanu przejściowego czy też odpowiednie reszty aminokwasowe, posiadające zaangażowane grupy funkcyjne również ulegały przesunięciu.
13. Porównanie wyników dla dokowania cząsteczki droseron z plumbaginą i 3-chloroplumbaginą (opis na str. 87) wskazuje, że niestety ale wartości energii potrafią być zwodnicze w tego typu dokowaniach. Czy Doktorantka może wyjaśnić dlaczego mimo podobnych wartości energii wiązania droseron nie oddziałuje z białkiem TraR?
14. Porównując teoretyczny model białka AiiO z białkiem AidH (Rozdział 5.2), to ostatnie następnie było użyte w symulacjach dynamiką molekularną. Doktorantka nie

pokazała/przedstawiła centrum aktywnego oby modeli. W szczególności nie porównała Ona przestrzennej lokalizacji triady katalitycznej w centrum aktywnym obu białek. Doktorantka przystępując do pracy nie mogła spodziewać się, że model doświadczalny białka AiiO będzie dostępny w czasie realizacji doktoratu, zatem model centrum aktywnego wypracowany teoretycznie byłby wtedy podstawą symulacji procesu katalizy. A zatem czy model teoretyczny tego centrum jest podobny do tego eksperymentalnego w sensie geometrycznym?

Uwagi edytorskie:

1. W pracy natknąłem się na szereg literówek i urwanych wyrazów, m.in. w podpisach pod rysunkami.
2. Kolejność pojawiania się niektórych rysunków została zaburzona. Te o numeracji niższej pojawiały się w tekście później.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych uwag krytycznych przedstawionych powyżej, z których część ma jedynie charakter dyskusji naukowej lub uwag korekcyjnych, dobrze oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę Pani mgr Dominiki Jankowskiej pt.: „Zastosowanie metod obliczeniowych w badaniach bakteryjnych białek TraR i AiiO”. Zwłaszcza ciekawa tematyka jak też i złożony i wieloraki aparat metodyczny użyty do symulacji skomplikowanych modeli zasługuje na uznanie. Sama też praca stanowi dokumentację oryginalnych badań prowadzonych przez Doktorantkę, o wysokich walorach naukowych. Wyniki Jej prac na pewno są publikowalne i należy mieć nadzieję, że wkrótce zostaną opublikowane w formie artykułów naukowych. Wyniki te w przyszłości mogą też być użyte do projektowania inhibitorów, zwłaszcza białka TraR.

Moim zdaniem praca doktorska Pani Dominiki Jankowskiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w Art. 13 Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorantka posiada dużą wiedzę teoretyczną w dziedzinie modelowania molekularnego oraz wykazuje dojrzałość naukową w krytycznym analizowaniu wyników. W toku realizacji pracy wykazała Ona również umiejętność samodzielnego prowadzenia złożonych badań numerycznych (m.in. w trakcie stażu naukowego w Wielkiej Brytanii) i analizy wyników tych symulacji. Z podanych wyżej względów wnioskuję do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marcin Bagieński