

**Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Marcina Augustyniaka pod tytułem:  
“Molecular modeling of complexes of PrkC protein kinase with possible  
endogenous targets of phosphorylation activity”.**

Kinazy białkowe to grupa kinaz, których substratami są białka. Enzymy te przeprowadzają reakcję fosforylacji cząsteczki specyficznego dla danej kinazy białka. Fosforylacja zwykle prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki białka i w konsekwencji do zmiany jego aktywności, zdolności do wiązania się z innymi białkami albo przemieszczenia cząsteczki w obrębie komórki. Do 30% białek podlega regulacji na tej drodze; w tym większość szlaków metabolicznych komórki, zwłaszcza sygnalizacyjnych, angażuje enzymy z grupy kinaz białkowych. W ludzkim genomie zidentyfikowano kilkaset genów kodujących sekwencje aminokwasowe kinaz białkowych stanowią one około 2% wszystkich genów. Funkcja kinaz białkowych podlega wielostopniowej regulacji, również angażującej kinazy i fosfatazy białkowe; fosforylacja białka kinazy może zwiększać albo zmniejszać jej aktywność. Białka aktywatorowe lub inhibitorowe przez przyłączanie się do domen regulatorowych kinaz również wpływają na ich aktywność. Niektóre kinazy posiadają domenę regulatorową, którą same mogą fosforylować, jest to tzw. autofosforylacja albo *cis*-fosforylacja.

W zależności od rodzaju reszty aminokwasowej, na którą przenoszona jest grupa fosforanowa, kinazy białkowe dzielimy na dwie rodziny: kinaz serynowo-treoninowych, fosforylujących reszty treoninowe albo serynowe oraz kinaz tyrozynowych, fosforylujących reszty tyrozynowe białek. Pewna liczba kinaz należy do obu tych grup tzw. dual specificity kinases.

Dys-regulacja aktywności kinaz jest częstą przyczyną chorób, zwłaszcza nowotworowych. Dzięki postępowi wiedzy o roli kinaz w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów w warunkach zdrowia i patologii opracowano nowe terapie; kilka leków będących inhibitorami kinaz białkowych jest już dopuszczonych do leczenia, inne leki są w stadium prób klinicznych.

Wszystko to o czym wspomniałem powyżej wskazuje na duże teoretyczne i praktyczne znaczenie podjętej przez mgr Marcina Augustyniaka tematyki.

Promotorem przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest Profesor UG dr hab. Rajmund Kaźmierkiewicz z Pracowni Symulacji Układów Biomolekularnych MWB, znawca biochemii kinazy PrkC a promotorem pomocniczym Profesor dr hab. Michał Obuchowski z Zakładu Bakteriologii Molekularnej MWB, specjalizujący się w badaniach substratów tej kinazy oraz ich roli w regulacji procesów komórkowych. Praca została wykonana w Pracowni Symulacji Układów Bio-molekularnych MWB.



Przesłana do recenzji rozprawa przedstawia wyniki badań poświęconych modelom kompleksów  $\text{PrkCc} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP} \cdot \text{CpgA}$ . W badanych modelach PrkCc jest fragmentem katalitycznym enzymu PrkC pochodzącym z *B. subtilis* który był w latach ubiegłych modelowany przez Mgr Pawła Gruszczyńskiego w ramach jego rozprawy doktorskiej której miałem przyjemność być recenzentem. Struktura i funkcja PrkC wykazuje homologię do receptora TGF- $\beta$ . Drugi składnik białkowy modelowanego kompleksu CpgA lub YolQ według starszej symboliki to cyklicznie permutowana GTPaza o znanej strukturze krystalograficznej (kod PDB: 1T9H) która jest endogennym substratem kinazy PrkC u *B. subtilis*.

Recenzowana rozprawa doktorska jest bardzo dobrze napisana w języku angielskim na 123 stronach i ma klasyczny układ. Rozważania autora poparte są 239-oma świetnie dobranymi pozycjami bibliograficznymi, 50-cioma rysunkami (częściowo w zbyt małej skali!) oraz 20-toma tabelami. Niestety korekta końcowego manuskryptu jest nie staranna, gdyż jako dyslektyk znalazłem w nim 118 błędów!

Zanim przystąpię do omówienia metod oraz wyników modelowania zastosowanych przez doktoranta chciałbym w tym miejscu scharakteryzować problemy przed którymi stał autor rozprawy.

1. Wielkość badanego układu.

Badany kompleks składa się z dwu cząsteczek białka czyli 562 reszt aminokwasowych (PrkCc 264 reszty i CpgA 298 reszt), kompleksu  $\text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP}$ , 19 kationów  $\text{Mg}^{2+}$ , anionu  $\text{Cl}^-$ , oraz 30470 modelowych cząsteczek wody typu TIP3P. Daje to układ złożony z  $\sim 100000$  atomów lub pseudo-atomów! Energia tego układu zależy od około 300000 zmiennych.

2. Wymagany czas symulacji.

Białka są cząsteczkami elastycznymi znajdującymi się w stanie ciągłego ruchu ich fragmentów. Najszybsze ruchy w białkach to wibracje atomów i rotacje grup metylowych zachodzące w czasie od  $10^{-15}$  do  $10^{-11}$  s (ruchy te są prawie zupełnie nie interesujące z punktu widzenia studiów nad działaniem enzymu ale istotnie zużywające czas procesorów w trakcie symulacji). Fluktuacje konformacyjne w strukturze domen zachodzą jedynie lokalnie w czasie  $10^{-12}$  do  $10^{-3}$  s (ligandy mogą powodować lokalne uporządkowanie lub zwinięcie się fragmentu białka). Dozwolone przejścia pomiędzy różnymi rodzajami zwinięcia zachodzą niezwykle rzadko w czasie  $10^{-9}$  do  $10^3$  s.

Zatem zastosowanie klasycznej dynamiki molekularnej c-MD z czasami symulacji  $\sim 10^{-3}$  s do badania kompleksów  $\text{PrkCc} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP} \cdot \text{CpgA}$  wymagałyby posłużenia się komputerem opartym na kwantowej superpozycji stanów, czyli technice przyszłości obecnie znajdującej się w fazie wstępnych eksperymentów a nie poważnych zastosowań!

W zaistniałej sytuacji mgr Marcin Augustyniak podjął następujące decyzje:

1. Zdecydował się na zastosowanie tzw. przyspieszonej dynamiki molekularnej (a-MD, ang. accelerated molecular dynamics) co uczyniło próbkowanie przestrzeni konformacyjnej badanych kompleksów osiągalnym, w niemalże wyczerpującym



stopniu, za wyjściową przyjmując konformację niskoenergetyczną, bliską naturalnie występującej w roztworze.

2. Do bezpośrednich obliczeń postanowił wykorzystać postęp w projektowaniu układów GPU oraz ich oprogramowanie wykorzystujące znaczne możliwości obliczeniowe takich układów w obliczeniach a-MD.
3. Zdobył grant na wyposażenie Pracowni Symulacji Układów Bio-molekularnych MWB, w wyspecjalizowaną stację roboczą pracującą pod kontrolą 64-bitowego systemu Linux Ubuntu 14.04 LTS z sześć-o rdzeniowym procesorem Intel Core i7 970 3.2GHz, wyposażoną w 12 GB pamięć RAM oraz dwie wydajne karty graficzne, NVIDIA Tesla C2075 i NVIDIA GeForce GTX 580, oraz w pakiet programu Amber16 wykorzystujący przyspieszenia dostępne dzięki GPU.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej mgr Marcin Augustyniak proponuje realistyczny i w pełni wykonalny protokół przewidywania i modelowania kompleksów białkowych wykorzystujący model selekcji konformacyjnej i przesunięć populacyjnych rozpoznania molekularnego i oddziaływań między-białkowych poprzez:

1. Próbkowanie przestrzeni konformacyjnej oddzielnych proto-merów.
2. Wyznaczenie ich rozróżnialnych konformacji.
3. Wzajemne dokowanie kombinacji tak uzyskanych konformacji.
4. Szczegółową obróbkę i analizę wybranych struktur.

Doktorant zastosował powyższe podejście do PrkCc i CpgA poprzez próbkowanie ich przestrzeni konformacyjnej oddzielnie za pomocą symulacji a-MD które przeprowadził wykorzystując implementację programu pmemd dla układów GPU (pmemd.cuda) wchodzącego w skład pakietu Amber16. Konformacje obu proto-merów wyznaczał on poprzez analizę klastrową ich trajektorii. Prawdopodobne struktury kompleksów doktorant generował poprzez sztywne dokowanie uzyskanych wcześniej konformacji w możliwych do przyjęcia kombinacjach, przeszukując dane w poszukiwaniu możliwie optymalnych relacji przestrzennych substratu, kompleksu  $Mg^{2+}$  · ATP, oraz kluczowych reszt enzymu. Jako fundamentalne kryterium oceny i selekcji kompleksów, doktorant przyjął ograniczenia geometryczne podyktowane typowym dla większości eukariotycznych kinaz białkowych mechanizmem transferu grupy fosforanowej, tzn. mechanizmem: dysocjacyjnym, bezpośrednim, o liniowym uszeregowaniu atomów fosforu oraz obu atomów tlenu (atakującego i odchodzącego), z odwróceniem konfiguracji przenoszonego atomu fosforu ugrupowania fosforanowego.

Wyniki uzyskane przez doktoranta można podsumować następująco:

1. Protokół modelowania oddziaływań między-białkowych zaproponowany w rozprawie doktorskiej mgr Marcina Augustyniaka wydaje się być realistyczny i w pełni wykonalny w oparciu o procedury a-MD realizowane w oparciu o rozwiązania sprzętowe GPU.

2. Z racji próbkowania przestrzeni konformacyjnej oddzielnych proto-merów a nie całego kompleksu możemy spodziewać się „fałszywie negatywnych” rezultatów w przypadkach gdy pewne wysoko energetyczne konformacje enzymu i/lub substratu charakteryzują się porównywalnie dużą energią wiązania w kompleksie. Tego typu cecha zaproponowanego przez doktoranta protokołu jest nazywana w inżynierii podejściem „konserwatywnym” a zatem nie generującym „fałszywie pozytywnych” wyników!
3. Z powyższej przyczyny biochemicy doświadczalni powinni poważnie potraktować sugestię autora dotyczącą preferowanego miejsca fosforylacji w białku CpgA jako Ser227 a nie Ser226 jak twierdzi Absalon i współpracownicy.
4. Podobnie należało by eksperymentalnie zweryfikować przewidziane przez doktoranta miejsce preferowanej fosforylacji treoniny jako Thr205 a nie raportowane dotychczas Thr166.

### Wnioski

Stosownie do Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, recenzja powinna zawierać ocenę, czy rozprawa doktorska odpowiada warunkom *Ustawy z dn. 14 marca 2003r o stopniach i tytule naukowym* oraz czy dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

W chwili powstania tej recenzji, rozprawa doktorska jest jedyną publikacją naukową jej autora, gdyż zgodnie z obowiązującymi w Polsce przepisami, jej treść musi być upubliczniona i poddana krytyce co najmniej dwu recenzentów przed jej publiczną obroną. Ponieważ rozprawa napisana została w języku angielskim z należytą uwagą i troską więc można się spodziewać również międzynarodowych jej czytelników. Przeprowadzone w rozprawie wywody są jasne i w pełni zrozumiałe dla czytającego, nie znajduje w niej żadnych błędów logicznych lub formalnych oprócz typograficznych. A zatem rozprawa jest dla mnie dostatecznym dowodem, że mgr Marcin Augustyniak jest należycie przygotowany do samodzielnego prowadzenia wymagających wysokich kwalifikacji badań naukowych jako doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

W mojej opinii wyniki przedstawione w pracy są prawidłowe, nowe i interesujące. Ponadto sądzę, że wyniki wzbudzą należyte zainteresowanie międzynarodowe wśród specjalistów pracujących w dziedzinie dynamiki procesów bio-chemicznych z uwzględnieniem różnych skali czasu.

Podsumowując powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania formalne oraz zwyczajowe i rekomenduję nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia Panu mgr Marcinowi Augustyniakowi.

Aleksander Herman

