

Prof. dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Kraków.

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Seksja ds. pracowniczych
Wpłynęło dn. 31.03.15
podpis 
Kraków, marzec 2015.

Recenzja
pracy doktorskiej mgr Joanny Paneckiej
pt.: „Dynamical properties of the ribosomal decoding site and its complexes with
antibiotics”

Problemem współczesnej medycyny jest nabywana przez bakterie oporność na coraz nowsze antybiotyki. Istotną przyczyną oporności nabytej są mechanizmy horyzontalnego transferu materiału genetycznego między komórkami bakteryjnymi, co uniemożliwia stosowanie skutecznych leków na dane choroby bakteryjne przez dłuższy czas. Konieczne jest więc poszukiwanie i opracowywanie nowych sposobów unieszkodliwiania lub eliminacji chorobotwórczych bakterii z ludzkiego, czy zwierzęcego organizmu. W tych poszukiwaniach coraz szersze zastosowania mają komputerowe metody modelowania molekularnego. Umożliwiają one szczegółowe poznanie własności strukturalno-dynamicznych docelowego miejsca działania potencjalnych związków antybakteryjnych oraz mechanizmów ich działania na poziomie molekularnym. Ten wgląd w mechanizmy oraz uzyskany ilościowy opis dynamiki oddziaływań pomiędzy badanym związkiem i biocząsteczką będącą celem związku, a także zależności energetycznych tych oddziaływań dają pełny, wysoce prawdopodobny opis zdarzeń w miejscu działania związku. Dzięki temu uzyskujemy niezbędną wiedzę o modelowanym procesie oraz jego zrozumienie, co między innymi umożliwia przewidzenie wpływu modyfikacji chemicznej potencjalnego leku na poprawę jego selektywności i skuteczności, a tym samym na projektowanie efektywnych leków.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Joanny Paneckiej wpisuje się w nurt badań nad nowymi związkami antybakteryjnymi. Jej problematyka jest następstwem długofalowych imponujących badań komputerowych nad rybosomami prowadzonych przez prof. Joannę Trylską, promotora rozprawy. Te badania, kontynuowane w niniejszej pracy, pozwalają na szczegółowe poznanie struktury i dynamiki tych złożonych układów, co z kolei umożliwia zaplanowanie i prowadzenie badań nad związkami o własnościach antybakteryjnych, które zaburzają funkcjonowanie bakteryjnych rybosomów.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Paneckiej jest oparta na sześciu artykułach, z czego cztery były już opublikowane w momencie składania pracy, dalszy był wysłany do druku, ale został w międzyczasie opublikowany (Biochimie 112:96-110, 2015), a jeden jest w przygotowaniu

do druku. Jest to bardzo dobry dorobek, jak na młodą doktorantkę. Cztery z opublikowanych już artykułów ukazały się w czasopismach o rankingu Q1 (wg aktualnego SJR) a jeden w materiałach prestiżowej konferencji, co znaczy, że każdy z nich był pozytywnie oceniony przez co najmniej dwóch kompetentnych recenzentów. Można więc przyjąć, że merytoryczna strona publikacji i opartej na nich rozprawy jest bez zarzutu. Rolą recenzenta jest jednak wnikliwa ocena całości rozprawy, na którą składa się sześć głównych rozdziałów poprzedzonych wyjaśnieniem motywacji prowadzenia opisanych w rozprawie badań, a także skrótową prezentacją zawartości każdego z tych rozdziałów oraz rozdział siódmy podsumowujący opisane badania i wskazujący ich dalsze perspektywy.

Pierwszy rozdział, Wstęp, zawiera informacje dotyczące RNA, podstawowych oddziaływań w obrębie tych cząsteczek, procesu syntezy białek w rybosomach ze szczególnym naciskiem na jego dokładność i wydajność. Omówione są też różnice strukturalne rybosomów bakteryjnych i ludzkich. Informacje te podane są w sposób zrozumiały i stanowią dobre źródło wiedzy. Doktorantka przedstawiła tam też podstawy terapii antysensowej, co jest niezbędnym wprowadzeniem w zagadnienie omawiane w dalszych częściach rozprawy. Tutaj, doktorantka definiuje związek, który będzie badać w pracy; jest to lek z grupy aminoglikozydów o dobrze poznanych własnościach, paromomycyna. Jego działanie antybakteryjne jest szczególnie skuteczne przeciw bakteriom Gram-ujemnym, dlatego, jako modelowy organizm, w badaniach wybrano *Escherichia coli*.

Drugi rozdział, Metodologia, zgodnie z tytułem, zawiera opis metod obliczeniowych stosowanych w pracy z komentarzami, które świadczą o gruntowym rozumieniu przez doktorantkę fizycznych podstaw stosowanych metod, ich ograniczeń oraz konsekwencji ich użycia. W badaniach użyto oprogramowania oraz pola siłowego Amber, uzupełnionego o brakujące parametry. Układy symulacyjne, w kolejności opisu, były zbudowane z istotnych fragmentów rybosomu *E. coli*, z „dziką” formą białka S12 (WT), a także jego dwoma mutantami (K42A i R53A), bez i z zadokowaną cząsteczką paromomycyny oraz zbudowane na podstawie struktur krystalicznych dupleksów RNA zawierających dwa równoważne miejsce A, nazwane odpowiednio S1 i S2, rybosomu bakteryjnego (PDB: 3BNL), ludzkiego cytoplazmatycznego (PDB: 2FQN) oraz ludzkiego mitochondrialnego (PDB: 3BNN) i dwóch mutantów tego ostatniego (PDB: 3BNP i 3BNS). Budowa układów symulacyjnych została szczegółowo opisana.

Antybiotyki z grupy aminoglikozydów mają niepożądane dla człowieka działania uboczne, które wynikają z ich ograniczonej specyficzności i selektywności względem pożądanego celu, jakim jest miejsce A rybosomu bakteryjnego. W celu zwiększenia specyficzności i

selektywności tych antybiotyków, proponuje się ich kowalencyjne związanie z modyfikowanymi oligonukleotydami i wykorzystanie strategii antysensowej. W pracy rozważana jest modyfikacja paromomycyny poprzez połączenie jej z peptydowym kwasem nukleinowym (*peptide nucleic acid*, PNA) lub 2'-O-metylowanym RNA (2'OMeRNA). Zanim jednak do takiego związania paromomycyny z oligonukleotydami dojdzie, należy szczegółowo poznać własności tych ostatnich. Doktorantka zbadała i porównała dynamiczne struktury szeregu różnych ich modyfikacji o sekwencjach komplementarnych do fragmentu rRNA znajdującego się w okolicy miejsca A rybosomu bakteryjnego. Te badania, szczegółowo opisane w rozdziale trzecim, dały bardzo ciekawe i znaczące wyniki. Przeprowadzone obliczenia wyjaśniły, dlaczego helikalna konformacja metylowanego RNA szybciej łączy się z RNA niż inna konformacja i inne oligomery oraz jakie i gdzie umieszczone podstawniki będą wpływać na preferowane konformacje i giętkość badanych oligomerów – te informacje mogą posłużyć do opracowania skuteczniejszych związków antysensowych. Uważam, że gdyby ta praca doktorska kończyła się na tym rozdziale byłaby już bardzo dobrą rozprawą.

Ogólnym celem badań obejmujących również te opisane w doktoracie jest zaproponowanie modyfikacji chemicznej antybiotyków z grupy aminoglikozydów, tak, aby zwiększyć ich specyficzność. Niezbędnym krokiem dla osiągnięcia tego celu jest wyjaśnienie przyczyn ich obecnej ograniczonej specyficzności. Aby wyjaśnić te przyczyny, doktorantka poświęciła dużą część pracy na badania porównawcze miejsca A rybosomów bakteryjnego oraz ludzkiego cytoplazmatycznego i mitochondrialnego. W rozdziale czwartym porównała dynamikę miejsca A w bakteryjnym i ludzkim cytoplazmatycznym rybosomie. Badania metodami komputerowymi ludzkiego cytoplazmatycznego rybosomu zostały wykonane po raz pierwszy, są więc nowatorskie. Doktorantka przeprowadziła szereg symulacji dynamiki molekularnej i bardzo dokładnie przeanalizowała ich wyniki. Określiła wpływ różnic strukturalnych miejsc A obu rybosomów na dynamikę kluczowych zasad w miejscu S1 i S2; wyjaśniła też, dlaczego rozkłady gęstości wody oraz jonów jednowartościowych w miejscach A obu rybosomów są podobne. Stosując dynamikę ze wzmocnionym próbkowaniem doktorantka wykazała, iż bariery energetyczne dla przeskoków węzłowych adenin A1492 i A1493 w miejscach A rybosomu bakteryjnego są wyższe niż ludzkiego. Nieco wcześniej przedstawiony wynik symulacji dynamiki wskazywał, że stabilność pary zasad A1408:A1493 jest wyższa w ludzkim niż bakteryjnym rybosomie, co wpływa na wyższą dokładność procesu translacji. Z drugiej strony, niższe bariery i większa ruchliwość adenin A1492 i A1493 nie prowadzi do wyższej dokładności dekodowania informacji zawartej w mRNA – tę pozorną sprzeczność doktorantka tłumaczy ograniczeniem badań jedynie do miejsca A rybosomu –

jego nie-uwzględnione fragmenty mają niewątpliwy wpływ na wierność odczytu informacji z mRNA. Rozkłady gęstości wody i jonów względem miejsc A w rybosomie bakteryjnym i cytoplazmatycznym ludzkim wskazują potencjalne miejsca zakotwiczenia aminoglikozydowych antybiotyków w tych regionach, a ich podobieństwo może świadczyć o podobieństwie wiązania antybiotyków przez oba rybosomy, co koreluje z ich słabą wybiórczością.

Dalsze badania porównawcze były prowadzone na rybosomie ludzkim mitochondrialnym i bakteryjnym (*E. coli*). Doktorantka zaobserwowała, że łańcuch rRNA w badanym modelu miejsca A mitochondrialnego rybosomu ma wyraźnie różny motyw strukturalny w porównaniu do pozostałych modeli. Ten motyw, który może występować dla różnych sekwencji RNA, zidentyfikowała jako skręt S typu 2 (S-turn2). Aby wyjaśnić, co powoduje, że ten motyw pojawia się w miejscu A mitochondrialnego rybosomu, w rozdziale piątym doktorantka szczegółowo przebadła własności strukturalno-dynamiczne tego miejsca. Porównanie tych własności we wszystkich badanych układach pozwoliło na skorelowanie obecności S-turn2 w miejscu A z oddziaływaniami między parami zasad, które są różne w bakteryjnym i mitochondrialnym rybosomie. S-turn2 okazał się stabilnym motywem. W wariacie, w którym S-turn2 nie występuje w miejscu A mitochondrialnego rybosomu, dynamika tego miejsca jest taka jak w bakteryjnym rybosomie. Analiza własności S-turn2 umożliwiła przedyskutowanie jego prawdopodobnych funkcji w ludzkim mitochondrialnym rybosomie oraz wpływu tych własności na odczyt informacji z mRNA, a także umożliwiła rozważania na temat silniejszego wiązania aminoglikozydów do miejsca A bez motywu S-turn2.

W ostatnim głównym rozdziale opisane są badania fragmentów rybosomu bakteryjnego otaczających miejsca A, prowadzone w celu wykazania wpływu naturalnego otoczenia na dynamikę tego miejsca. Badano też wpływ mutacji białka S12 na tę dynamikę. W tych badaniach, głównym obiektem obserwacji były dwie kluczowe adeniny A1492 i A1493 w miejscu A. Zgodnie z oczekiwaniami, otoczenie rybosomu wpływa na dynamikę, oddziaływania i zachowanie konformacyjne A1492 i A1493. Również mutacje w białku S12 mają na nie wpływ. Badany był też efekt związanej cząsteczki paromomycyny na zachowanie A1492 i A1493. We fragmencie rybosomu z białkiem dzikim, antybiotyk osłabia wiązanie wodorowe między łańcuchem bocznym lizyny (K43) w S12 a A1492. To wiązanie ogranicza ruchliwość obu adenin, co przypuszczalnie hamuje ich przeskoki i w efekcie sprzyja dokładności procesu translacji; z kolei jego osłabienie przez antybiotyk zaburza proces

translacji. W badanych mutantach S12, paromomycyna nie osłabiała wiązania K43...A1492, tym samym nie wpływała na proces translacji.

Ostatni rozdział – Podsumowanie i perspektywy dalszych badań – jest skromną oceną doktorantki własnych osiągnięć. Doktorantka jest świadoma ograniczeń metodologii, jakiej użyła w badaniach i przestrzega czytelników przed bezkrytycznym stosunkiem do wyników swoich badań. Dalsze perspektywy badań dotyczą możliwych chemicznych modyfikacji stosowanych leków, tak by zwiększyć ich selektywność i ograniczyć ich działania uboczne.

W pracy trudno jest znaleźć „słabe punkty”. Jedynym moim zarzutem jest pewna niespójność między akcentami w rozdziale Motywacja a faktyczną treścią rozprawy. W moim odczuciu, główny nacisk w Motywacji postawiony jest na lek, a w pracy na cel działania leku. Oczywiście jest, że bez szczegółowej znajomości własności fizyko-chemicznych miejsca działania leku, nie można racjonalnie zaprojektować skuteczniejszych jego wariantów, więc wspomniana niespójność jest pozorna. Z punktu widzenia edytorskiego, znalazłam jedno urwane zdanie (str. 86) pozostawione przez pomyłkę oraz kilka zbędnych powtórzeń w tekście w rozdziale Metodologia. Uważam też, że praca napisana jest za małą czcionką – do czytania jej musiałam wkładać dwie pary okularów. Nie czuję się na siłach by oceniać poprawność języka angielskiego, w którym napisana jest praca, ale w trakcie czytania tekstu nie uderzył mnie jednak żaden błąd językowy.

Praca napisana jest bardzo systematycznie i jest bardzo starannie ilustrowana. Te ilustracje są ładne i bogate w informacje i dobrze uzupełniają opisy słowne zamieszczone w tekście. W recenzji trudno wymienić wszystkie wyniki, jakie doktorantka umieściła w rozprawie. Jest ich bardzo wiele, więc podsumowałam tylko niektóre z nich. Na koniec chciałam podkreślić, że uzyskanie metodami komputerowymi wiarygodnych wyników dla tak złożonych biologicznych układów jak opisane w tej pracy wymagało od doktorantki zrozumienia istoty kilku dyscyplin naukowych, począwszy od klasycznej i kwantowej fizyki, a skończywszy na biologii molekularnej i genetyce. To zrozumienie młoda doktorantka rozwinęła dzięki własnym zaletom, ale też dzięki temu, że pracowała w bardzo dobrym zespole, gdzie bez wątpienia interakcja między doktorantem i promotorem jest silna i częsta.

Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym wymaga, aby rozprawa doktorska stanowiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazywała ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktoranta. Doktorant z nawiązką wykazała się wymaganymi zaletami. Wnoszę więc do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Joanny Paneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z względu

na wielkie zaangażowanie mgr Joanny Paneckiej w przeprowadzenie i bardzo staranne opisanie badań, ich bardzo wysoki poziom naukowy oraz szybkie publikowanie wyników, wnoszę też o wyróżnienie Jej pracy doktorskiej i o ile to możliwe, nagrodzenie doktorantki.

Masculina Gerula