

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Seksja ds. pracowniczych
Wpłynęło dn. 5.03.2015
podpis

Dr Krystyna Zakrzewska
Directeur de Recherche
Bases Moléculaires et Structurales
des Systèmes Infectieux
Université Lyon 1 / CNRS UMR 5086, IBCP

Lyon, 2 marca 2015 r.

Rada Wydziału Fizyki
Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Pasteura 5
02-093 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Paneckiej pt.
"Dynamical properties of the ribosomal decoding site and its
complexes with antibiotics"

Celem pracy doktorskiej mgr Joanny Paneckiej jest ulepszenie kontroli chemicznej procesu translacji poprzez lepsze poznanie własności dynamicznych cząsteczek biorących udział w tym procesie. Kontrola chemiczna translacji polega na "zablokowaniu" dwóch adenozyń w miejscu A rybosomowego RNA na zewnątrz helisy, by zmniejszyć w ten sposób specyficzność oddziaływań kodon-antykodeon, co prowadzi do wprowadzenia nieprawidłowego aminokwasu i aborcję translacji. Tego rodzaju technika, przy użyciu aminoglykozydów, używana jest w praktyce klinicznej, ale prowadzi niestety do poważnych skutków ubocznych z powodu wiązania się antybiotyków nie tylko do bakteryjnego rRNA, ale również do ludzkiego. Dlatego potrzebne jest zwiększenie specyficzności wiązania antybiotyków. Innym sposobem kontroli translacji jest technika "antisens", polegająca na użyciu zmodyfikowanego łańcucha RNA, komplementarnego do miejsca A. Możliwe byłoby również połączenie obu technik przez kowalencyjne związanie antybiotyku i zmodyfikowanego RNA, by zwiększyć w ten sposób siłę wiązania nowej cząsteczki do miejsca A i zwiększyć jej odporność na degradację enzymatyczną. Pierwszym etapem tworzenia takiego układu jest poznanie własności strukturalnych i dynamicznych wszystkich aktorów biorących udział w procesie translacji – i temu zagadnieniu jest poświęcona praca doktorska mgr Paneckiej.

Badania zostały przeprowadzone zaawansowanymi metodami dynamiki molekularnej i reprezentują ogromny wysiłek obliczeniowy. Symulacje dynamiczne wykonano w reprezentacji pełnoatomowej. W niektórych symulacjach stosowane były zaawansowane techniki, jak wymiana replik i wymiana replik z potencjałem obciążającym.

Rozprawa liczy siedem rozdziałów, z których dwa pierwsze stanowią wprowadzenie i dają opis mechanizmu translacji i metod symulacji numerycznych. Wyniki badań przedstawione są w rozdziałach 3-6, ułożonych kolejno według wielkości badanego

układu. Rozdział siódmy zawiera podsumowanie pracy i wnioski do przyszłych badań.

Praca charakteryzuje się bardzo obszernymi testami ustawień symulacji w funkcji pola siłowego i parametryzacji jonów. Szczególnie cenne jest porównanie pola sił AMBER parm99 i jego nowszej wersji parmbsc0c_{OL3}. Wykazano, że nowa wersja pola sił prowadzi do usztywnienia cząsteczki RNA. Szczególnie cenne są testy z różnymi parametrami i stężeniem jonów. Wpływ jonów na konformacje i własności dynamiczne kwasów nukleinowych jest tematem aktywnie dyskutowanym od paru lat.

W rozdziale trzecim autorka opisuje badania jednoniciowych oligomerów, RNA i 2'- OMeRNA i trzech typów PNA (łańcuch cukrowofosforanowy zastąpiony jest przez łańcuch peptydowy). Symulacja jednoniciowych oligomerów jest szczególnie trudna ze względu na ich dużą giętkość i wymaga bardzo długich symulacji. Aby zwiększyć dostępną przestrzeń konformacyjną, Pani Panecka użyła dwóch punktów startowych do symulacji: konformacji rozciągniętej oraz helikalnej. Otrzymane trajektorie zostały bardzo dokładnie zanalizowane, ze względu na ilość skupień konformacyjnych, świadczących o giętkości danego oligomeru, giętkość szkieletu, ruchliwość zasad, ich oddziaływania warstwowe, oddziaływanie z rozpuszczalnikiem i jonami. Autorka wnioskuje, że dzięki użyciu odpowiednio umieszczonych grup metylowych lub seryny (w przypadku PNA) można modulować zachowanie się oligomeru tak, aby otrzymać konformację optymalnie wiążącą rRNA.

Analiza przeprowadzonych symulacji wykazała również, że konformacja początkowa ma duży wpływ na trajektorię, oligomery startujące z konformacji helikalnej wykazują większą tendencję do jej zachowania. Ogólnie, PNA jest bardziej giętki niż RNA. Metylacja O2' usztywnia natomiast oligomer i np. w przypadku 2'OMeRNA, startującego z konformacji helikalnej, pozostaje ona zachowana przez cały czas symulacji.

Rozdział czwarty opisuje symulacje modelowych fragmentów bakteryjnego i ludzkiego cytoplazmatycznego rRNA, zawierającego 2 miejsca A. Aby przyspieszyć stabilizację energetyczną układów, symulacje zostały również przeprowadzone przy użyciu wymiany replik, klasycznej oraz z dodatkiem potencjału obciążającego. Użycie wymiany replik pozwoliło autorce otrzymać konformacje z najważniejszymi dla procesu kompleksowania mRNA i tRNA adenozydami, A1492 i A1493, w położeniu ekstrahelikalnym, i uzyskać profile energii swobodnej w funkcji ich orientacji, wskazujące na różnice w zachowaniu się układu bakteryjnego i ludzkiego cytoplazmatycznego. Pierwsze próby symulacji przy użyciu nowszego wariantu wymiany replik, z dodatkiem potencjału, trochę rozczarowały, nie zwiększając populacji stanów zewnętrznych. Mgr Panecka proponuje dalszą pracę nad parametryzacją tej metody.

Autorka analizuje zarówno podobieństwa, jak i różnice w dynamice obu układów, bakteryjnego i ludzkiego cytoplazmatycznego rRNA, przy czym bardziej interesujące są różnice. I tak, analiza wskazuje, że ludzkie cytoplazmatyczne

miejsce A jest bardziej dynamiczne, bardziej ruchliwe. Ruchy adenozyń A1492 i A1493 są mniej uporządkowane; w konformacji intrahelikajnej para A1493:A1408 jest mniej stabilna w przypadku bakterii niż jej ludzki odpowiednik A1493:G1408. W przypadku ludzkiego miejsca A zostało zaobserwowane częste częściowe wyrzucanie poza helisę A1492, stabilizowane przez oddziaływanie szkieletu A1492 z G1408. W sumie, symulacje obu układów ujawniły raczej podobieństwa ich własności dynamicznych niż różnice i nie pozwoliły wyjaśnić znanego z eksperymentu faktu, że dokładność translacji (decoding) jest wyższa u ssaków niż u bakterii. Symulacje sugerują raczej wniosek przeciwny.

Symulacje ludzkiego cytoplazmatycznego fragmentu rRNA z miejscem A zostały uzupełnione symulacjami mitochondrialnego rRNA i jego mutantu A1490G. Najważniejszym wynikiem jest analiza stabilności nowej konformacji szkieletu miejsca A, S-zakrętu2 (S-turn2) i jego roli jako molekularnego przełącznika (molecular switch). W pracy wywnioskowano, że nieobecność tej struktury w bakteryjnym miejscu A wynika z jego kanonicznych wiązań wodorowych, a jej obecność w mitochondrialnym rRNA ze specyficznych ale niekanonicznych wiązań. Dynamika mutantu A1490G przypomina dynamikę bakteryjnego miejsca A.

Następnym, ostatnim etapem pracy doktorskiej były symulacje bakteryjnego miejsca A, z włączeniem jego rybosomowego otoczenia, helisy H44 i H69 i białka S12. Uwzględnione zostały również mutacje punktowe w białku S12: K42A i R53A oraz kompleksy z paromomycyną. Symulacje pokazały, że oddziaływania z K43 z białka S12 i z A1913 z helisy 69 zmniejszają ruchliwość adenozyń 1492 i 1493 w stosunku do układów modelowych, opisanych w rozdziale czwartym. W symulacjach układu natywnego oddziaływanie K43-A1492 stabilizuje pozycję ekstrahelikajną obu adenozyń, 1492 i 1493, zwiększając dzięki temu prawdopodobieństwo kompleksowania tRNA. Analiza trajektorii pokazała, że mutacje w białku S12 prowadzą do zwiększonej ruchliwości tych adenozyń. W układzie z natywnym S12 ich konformacje tworzyły siedem skupień, w przypadku mutantów ilość skupień wzrosła do co najmniej 15. O ile w układzie natywnym obie adenozyne pozostały w konformacji ekstrahelikajnej, to w obu mutantach jedna z adenozyń była w wyrzuceniu rRNA. Otrzymane charakterystyki zgadzają się z obserwowaną większą rozdzielczością rybosomów z mutacjami w białku S12 i wyjaśniają ich molekularny mechanizm.

Różnice w zachowaniu się systemu natywnego i zmutowanego były również obserwowane w przypadku kompleksów z paromomycyną. Wiązanie paromomycyny osłabia oddziaływania K43-A1492, ważne w układzie natywnym. Zgodnie z przewidywaniami wpływ paromomycyny na układy zmutowane w S12 był mniejszy, co zgadza się ze znaną odpornością hiperaktywnych mutantów na aminoglikozydy.

W przedstawionej pracy doktorskiej mgr Panecka wykazała, że doskonale opanowała zarówno temat od strony biologicznej, jak i metody obliczeniowe, dobrze dobrane do celu badań. Symulacje są bardzo dokładnie i wszechstronnie zanalizowane przy użyciu różnych technik, od analizy konformacyjnej do metod

bioinformatycznych. Dane strukturalne są skonfrontowane z konformacjami występującymi w strukturach znanych z krystalografii; konsultowane są również banki danych sekwencyjnych. Na każdym etapie symulacji wyniki analizy są zestawiane z dostępnymi danymi eksperymentalnymi, co pozwoliło na zaproponowanie mechanizmów strukturalnych, wyjaśniających wyniki badań eksperymentalnych. Należy też podkreślić krytyczny stosunek autorki do używanych metod i podawanie, gdzie trzeba, słabych punktów przeprowadzonych obliczeń.

Praca doktorska napisana jest po angielsku, co zwiększy jej czytelność w międzynarodowym środowisku chemii obliczeniowej, pozwalając na wykorzystanie przez specjalistów wyników dużej ilości testów parametrów symulacji.

Wyniki badań zostały opublikowane w trzech artykułach w czasopismach o wysokim „impact factor” i w aktach prestiżowego kongresu TACC-2012. Kolejna publikacja została przyjęta do druku, a następna jest przygotowywana. W tych wszystkich publikacjach mgr Panecka jest pierwszym autorem. Prace były również prezentowane na 11 międzynarodowych konferencjach w kraju i za granicą.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Joanny Paneckiej świadczy o naukowej dojrzałości autorki.

Równocześnie stwierdzam, że zaprezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Paneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

