

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng
Wydział Fizyki
Uniwersytet Warszawski
oraz
Pracownia Bioinformatyki
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Warszawa

Warszawa, 17.05.2017

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Oddziaływanie syntetycznych oligomerów z rybosomowym RNA

Autor rozprawy: Mgr Maciej Jasiński
Promotorzy rozprawy: Dr hab. Joanna Trylska, prof. UW
oraz Prof. dr hab. Ryszard Stolarski

Rozprawa doktorska mgr Jasińskiego została zrealizowana w ramach Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Doktoranckich Uniwersytetu Warszawskiego w zakresie nauk matematyczno-przyrodniczych i wykonana w Laboratorium Maszyn Molekularnych, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, kierowanym przez dr hab. Joannę Trylską, prof. UW.

Przedmiotem badań eksperymentalnych oraz obliczeniowych były oddziaływania syntetycznych oligomerów RNA z rybosomowym RNA. Zastosowane zostały metody spektroskopii fluorescencyjnej oraz pomiary kalorymetryczne (ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*), jak również metody symulacyjne dynamiki molekularnej.

Metody spektroskopii fluorescencyjnej pokazują m.in. czy badane obiekty molekularne oddziałują ze sobą, pomiary kalorymetryczne ITC pozwalają na wyznaczenie energii swobodnej oddziaływania badanych molekularnych obiektów, obydwie metody eksperymentalne pośrednio lub bezpośrednio pozwalają na wyznaczenie stałych równowag tworzenia się kompleksów molekularnych, a zastosowane metody teoretyczne pozwalają na pogłębioną interpretację wyników doświadczalnych - w szczególności oszacowanie energii swobodnej oddziaływania oraz interpretację strukturalnych i dynamicznych cech tworzących się kompleksów. Uzyskane wyniki badań z wykorzystaniem metod biofizyki i fizyki molekularnej zostały wykorzystane do sformułowania wniosków o charakterze biologicznym.

Tematyka rozprawy mieści się w szerszym nurcie współczesnych badań biofizyki w których algorytmika i metody obliczeniowe stały się istotną metodologią badania struktury i funkcji złożonych układów biomolekularnych.

Obiektami badań w tej rozprawie był rybosomowy RNA oraz syntetyczne analogi kwasów nukleinowych, w tym PNA (peptydowy kwas nukleinowy) oraz 2'-O-metylowane RNA.

Celem pracy było:

- scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych modeli rRNA, o sekwencjach prokariotycznych i eukariotycznych tzw. rybosomowego miejsca A, obejmującego domenę wiązania się antybiotyków aminoglikozydowych,
- sprawdzenie czy oligomery 2'-O-Me RNA mogą wiązać się w sposób specyficzny z modelem rRNA bakteryjnego miejsca A, jednocześnie nie tworząc stabilnych kompleksów z modelem eukariotycznym,
- zbadanie możliwości wykorzystania metod dynamiki molekularnej do przewidywania struktury i stabilności kompleksów PNA z RNA,
- oraz jako niezależny wątek badań stworzenie aplikacji komputerowej do strukturalnej analizy wyników symulacji MD.

W strukturze rybosomu, w miejscu łączenia się dużej i małej podjednostki, znajdują się trzy miejsca oddziaływania z tRNA: miejsce A, przez które wchodzi aminoacylo-tRNA, miejsce P, gdzie tworzy się peptydylo-tRNA, oraz miejsce E, przez które tRNA opuszcza rybosom po oddaniu aminokwasu. W pracy Doktorant skoncentrował swoje badania na miejscu A.

Wybór podyktowany był m.in. faktem, że miejsce A, znajdujące się w rRNA podjednostki 30S rybosomów bakteryjnych, jest podstawowym miejscem wiązania się antybiotyków z grupy aminoglikozydów. Należy podkreślić, że organizmy eukariotyczne i prokariotyczne różnią się sekwencją rRNA w pobliżu miejsca A. Działanie tej klasy antybiotyków takich jak: neomycyna, paromomycyna czy gentamycyna polegają głównie na zaburzeniu procesu translacji u bakterii.

Spośród takich znanych modyfikowanych oligonukleotydów jak MP, CNA, PMO, 2'OMeRNA oraz PNA, Autor rozprawy skoncentrował swoje badania na 2'OMeRNA oraz PNA.

Praca o objętości 199 stron napisana jest w języku polskim. Początek rozprawy rozpoczyna się jej streszczeniem. Cała praca podzielona jest na V części oznaczonych cyframi łacińskimi oraz na 18 rozdziałów ponumerowanych cyframi arabskimi. Część I zawiera przegląd literaturowy dotyczący badanych kwasów nukleinowych, formułuje również cel pracy i motywację badań. Część II poświęcony jest przeglądowi zastosowanym metodom teoretycznym i doświadczalnym. Część III zawiera opis strukturalny i funkcjonalny aplikacji

MINT do analizy struktur kwasów nukleinowych pochodzących z symulacji metodami MD. Część IV poświęcony jest badaniom oddziaływań 2'O-Me-RNA z modelami rRNA. Rozdział V poświęcony jest oddziaływaniom PNA z rybosomowym RNA. Praca kończy się bibliografią zawierającą 207 pozycji. Części III, IV i V zawierają też podsumowania uzyskanych wyników. Poza tym praca zawiera dodatki, w tym program do analizy krzywych procesów topnienia kwasów nukleinowych w języku angielskim oraz anglojęzyczna instrukcja programu MINT.

Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej bazują na dwóch publikacjach i jednej w przygotowaniu do druku:

1. M.Kulik, AM Goral, M. Jasiński, PM Domaniak, J Trylska, *Electrostatic Interactions in Aminoglycoside-RNA Complexes* 2015, Biophys. J. 108 (3), 655-665.
2. A. Gorska, M. Jasinski, J. Trylska *MINT: Software to Identify Motifs and Short-range Interactions in Trajectories of Nucleic Acids* 2015, Nucleic Acids Res. 43 (17):e114.
3. M. Jasiński, M. Kulik, M. Wojciechowska, R. Stolarski, J. Trylska *Interactions of 2'O-methyl Oligoribonucleotides with the Models of the 30S subunit A-site*, w przygotowaniu,

jak również trzech ustnych wystąpieniach na międzynarodowych konferencjach i kilkunastu doniesień w postaci plakatów.

Istotnym osiągnięciem Autora rozprawy było stworzenie we współpracy z mgr Anną Górską podstaw programu MINT (*Motif Identifier for Nucleic Acid Trajectory*) do analizy wyników symulacji kwasów nukleinowych metodami dynamiki molekularnej, w tym analizy strukturalnej (m.in. klasteryzacja motywów strukturalnych) oraz analizy energetycznej (m.in. szacowania energii *stacking'u* między nukleotydami, czego np. nie zawierają programy analizy struktur rozwinięte wcześniej w innych zespołach badawczych). Program akceptuje większość formatów danych, może realizować *post-processing* w sposób zrównoleglony na wielu procesorach. Stworzone środowisko MINT zostało wykorzystane w analizie wyników MD dla badanych w rozprawie układów oraz udostępnione na serwerze: <http://mint.cent.uw.edu.pl/>.

W badaniach eksperymentalnych i symulacyjnych Autor rozprawy scharakteryzował prokariotyczne oraz eukariotyczne rybosomowe miejsce A. Sprawdził także czy oligomery 2'O-Me RNA mogą wiązać się specyficznie z modelem rRNA bakteryjnego miejsca A, jednocześnie nie tworząc stabilnych kompleksów z modelem eukariotycznym. Badania w szczególności pokazały, że aby zapewnić brak oddziaływań oligomerów z modelem eukariotycznym, konieczne są co najmniej trzy niedopasowania w sekwencji oligomeru względem sekwencji eukariotycznego rRNA.

Zbadał wreszcie możliwość przewidywania i porównania struktury oraz analizy stabilności kompleksów PNA:PNA, PNA:RNA w porównaniu z RNA:RNA. Wyniki symulacji MD z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM dawały racjonalne wyniki, zawodziły jednak w przypadku pola siłowego AMBER. Autor rozprawy kontynuuje ten wątek badań w pracowni prof. Michaela Feiga na Michigan State University.

Opracowanie wyników jest bardzo solidne. Na szczególną pochwałę zasługuje komplementarna realizacja badań eksperymentalnych i teoretycznych. Uzyskane wyniki mogą w szczególności stanowić solidną podstawę do racjonalnej modyfikacji istniejących antybakteryjnych antybiotyków lub projektowania nowych.

Mam wszakże również kilka uwag dyskusyjnych lub krytycznych.

Co do samej struktury rozprawy - zawiera ona w sobie kilka wątków badawczych, które wiążą się dość luźno w spójną całość. W szczególności rozprawa nie zawiera ogólnego podsumowania rozprawy. Niemniej chciałbym podkreślić, że poszczególne podsumowania części badawczych są wykonane bardzo sumiennie i w sumie całość uzyskanych wyników ma istotną wartość naukową.

W części teoretycznej Autor rozprawy omawiając metody dynamiki molekularnej jako reprezentatywny przedstawił konwencjonalny algorytm Verleta. Algorytm ten ma w większym stopniu znaczenie edukacyjne niż praktyczne. Najczęściej stosuje się symplektyczne algorytmy MD, takie jak prędkościowy Verlet (*Velocity Verlet*) lub algorytm żabiego skoku (*Leap-Frog*). Przypuszczam, że w symulacjach tak naprawdę stosowany był jeden z tych algorytmów, bo są one dostępne w wykorzystywanych przez Autora pracy pakietach symulacyjnych.

Należy zwrócić uwagę, że symulacje metodami mechaniki i/lub dynamiki molekularnej kwasów nukleinowych są trudniejsze od tych realizowanych dla białek. Wynika to m.in. stąd, że w przypadku kwasów nukleinowych mamy na ogół do czynienia z silniejszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi niż ma to miejsce w przypadku białek, które to oddziaływania są głównie generowane przez zdeprotonowane grupy fosforanowe. W symulacjach grupy te ekranowane są z wykorzystaniem kationów, lub w przypadku modeli typu uśrednionego pola reakcji otaczającego środowiska ich efektywny ładunek jest silnie redukowany. Kłopot mogą stanowić też końcowe grupy fosforanowe, które mogą występować w dwóch stanach ładunkowych: -1 lub -2. Pytanie jak traktowane w symulacjach były oddziaływania elektrostatyczne i czy np. brak stabilności niektórych układów z wykorzystaniem parametrów pola siłowego Amber nie wynikał ze zbyt przybliżonego traktowania tych oddziaływań? Być może wirtualne miareczkowanie badanych układów z

wykorzystaniem modelu równania Poissona-Boltzmanna mogłoby doprowadzić do większej stabilności tych kompleksów ?

Jeżeli chodzi o aplikację MINT to wydaje mi się, że do analizy struktury oligo-RNA lub ich dupleksów przydałaby się również analiza przestrzennego przebiegu nici wynikająca z opisu geometrii jednowymiarowych krzywych w przestrzeni 3D, np. opis krzywizny i torsji parametryzowane długością łuku. Takiej opcji chyba nie ma w tym pakiecie. Czy Autor myślał może o takiej analizie struktury ?

Jak już wspominałem wcześniej, dobrze że w MINTcie analizowane są oddziaływania *stacking'owe*, chciałbym wszakże zwrócić uwagę, że konwencjonalne oddziaływania VdW występujące w stosowanych polach siłowych tylko częściowo reprodukuja energię korelacji występującą pomiędzy równoległymi zasadami kwasów nukleinowych. To może też być częściową przyczyną w badaniach teoretycznych niedostateczną stabilnością niektórych badanych kompleksów. Byłbym zainteresowany opinią Autora czy próbował rozwiązywać w/w problemy lub ewentualnie jak docelowo widzi rozwiązanie tych problemów ?

Trochę szkoda, że Autor rozprawy nie dostrzegł pierwszych, liczących się w świecie prac dotyczących struktury i aktywności biologicznej modyfikowanych oligonukleotydów, w tym modyfikowanych w pozycji 2', pochodzących z polskiej szkoły biofizyki molekularnej prof. Davida Shugara, patrz m.in.

1. SWIERKOWSKI,W; SZER,W; SHUGAR,D Some properties of poly-ribothymidylic acid, co-polymers of uridylic and ribothymidylic acids, and their 1:1 complexes with polyadenylic acid. *Biochem. Z.* 342, 429-435. 1965,
2. ZMUDZKA,B; JANION,C; SHUGAR,D Poly 2'-O-methylcytidylic acid and the role of the 2'-hydroxyl in polynucleotide structure. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 37, 895-901. 1969,
3. JANION,C; ZMUDZKA,B; SHUGAR,D The preparation of 2'-O-methylcytidine-5'-mono and pyrophosphate, and poly-2'-O- methylcytidylic acid. *Acta Biochim. Pol.* 17, 31-40., 1970,
4. ZMUDZKA,B; SHUGAR,D Role of 2'-hydroxyl in polynucleotide conformation: poly 2'-O-methyluridylic acid. *Acta Biochim. Pol.* 18, 321-337. 1971,
5. RABCZENKO,A; SHUGAR,D Studies on conformation of nucleosides, dinucleoside monophosphates and homopolynucleotides containing uracil and thymine base residues, and ribose, deoxyribose or 2'-O-methylribose. *Acta Biochim. Pol.* 18, 387-402. 1971,
6. DE CLERCQ,E; ZMUDZKA,B; SHUGAR,D Antiviral activity of polynucleotides: role of 2'-hydroxyl and pyrimidine-5-methyl. *FEBS Lett.* 24, 137-140. 1972 .
7. KUSMIEREK,JT; KIELANOWSKA,M; SHUGAR,D Preparation and stability of the helical form of poly 2'-O-ethyluridylic acid. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 53, 406-412. 1973.

Ta niedoskonałość nie wpływa na wartość merytoryczną pracy, warto jednak pamiętać że tematyka oligonukleotydów, w tym takich pochodnych jak 2'-O-metylo było rozwinięta w Warszawie znacznie przed innymi badaniami tego typu w wiodących ośrodkach naukowych na świecie.

W pracy dostrzegłem też trochę niedoskonałości edytorskich, takich jak podawanie tytułów czasopism czasami rozpoczynając każdy wyraz z dużej litery, a czasami tylko pierwszy wyraz. Generalnie jednak pod względem edytorskim praca wykonana jest bardzo solidnie.

Mgr Jasiński uczestniczył w czterech projektach naukowych finansowanych przez MNiSW, FNP oraz NCN. Był też kierownikiem dwóch projektów popularyzatorskich finansowanych z Europejskiego Funduszu Społecznego. Odbił też miesięczny staż w University of Virginia, Charlottesville, USA, pod opieką prof. Camerona. Obecnie realizuje 6-cio miesięczny staż w pracowni prof. Michaela Feiga w Michigan State University.

Za osiągnięcia w pracy badawczej mgr Jasiński uzyskał kilka nagród, w tym Polskiego Towarzystwa Bioinformatycznego za najlepszą pracę magisterską w roku 2011.

Należy też podkreślić, że mgr Jasiński prowadził zajęcia dydaktyczne na Wydziałach Fizyki i Chemii, m.in. „Fizyka – laboratorium”, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski (45 h), „Pracownia biofizyki dla zaawansowanych”, ćwiczenie laboratoryjne dla studentów III roku, kierunku „Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”, jak również pomiary właściwości termodynamicznych kwasów nukleinowych przy pomocy spektroskopii UV, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski (263 h). Uczestniczył też w cyklu wykładów dla nauczycieli szkół podstawowych, wygłaszanych w ramach projektu szkoleniowego (Ekspedycje Ekspertów) organizowanego przez Fundację Uniwersytet Dzieci.

Biorąc pod uwagę osiągnięcia Autora uzyskane w pracy doktorskiej jak i całokształt jego pracy naukowej i dydaktycznej uważam że mgr Jasiński jest doświadczonym pracownikiem naukowym.

W podsumowaniu chciałbym stwierdzić, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jej Autor wykazuje wysoką wiedzę w dziedzinie biofizyki i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa spełnia wszelkie kryteria ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim i w związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr. Macieja Jasińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng