

Data: Toruń, 22/04, 2017

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5

Wpłynęło dn. 8.05.2017
Wydział Fizyki
działan / Sekcja ds. pracowniczych
podpis 

RECENZJA rozprawy doktorskiej

Mgr Macieja Jasińskiego

pt.

“Oddziaływanie syntetycznych oligomerów z rybosomowym RNA”

W dość powszechnej opinii cząsteczki RNA były pierwszymi samopowielającymi się biopolimerami i są załącznikiem fenomenu życia. Rybosomy, maszyny molekularne przeznaczone do produkcji białek, w znacznej części składają się z RNA. Budowa rybosomów prokariotycznych i eukariotycznych, chociaż podobna, jest jednak w szczegółach odmienna. Różnice w budowie biochemicznej i przestrzennej rybosomów są podstawą skutecznego działania wielu antybiotyków – hamowanie czy zaburzanie syntezy białek w bakteriach nie powoduje dewastacji w komórkach leczonych ludzi czy zwierząt. Rozwiązanie struktury przestrzennej rybosomu (rok 2000, m.cz. ok. 3 mln Da) było wielkim osiągnięciem, godnym nagrody Nobla (rok 2009), ponieważ dało impuls do wielu nowych badań, m. in. racjonalnego poszukiwania nowych leków. Ponieważ bakterie uodparniają się szybko na znane antybiotyki, a istotnie nowych antybiotyków niemal się nie wprowadza na rynek, istnieje potrzeba poszukiwania alternatywnych metod leczenia. Poszukuje się selektywnych substancji skutecznie blokujących lub modyfikujących działanie rybosomu prokariotycznego, bez silnego powinowactwa do rybosomów eukariotycznych. Obiecujące zastosowania medyczne mają modyfikowane oligonukleotydy i oligomery peptydowego kwasu nukleinowego (PNA) odkrytego przez P. Nielsena w 1991 r. Związki te teoretycznie mogą łączyć się z RNA obecnym w rybosomach i pełnić tym samym ważne funkcje regulatorowe, w tym przydatne w zwalczaniu bakterii czy leczeniu chorób. Oligomerów można wymyślać bardzo wiele, ale nie wszystkie konstrukty będą przydatne. Jak wspomniałem, duże znaczenie mają np. oligomery selektywnie wiążące się do prokariotycznego RNA, zaś nie łączące się z eukariotycznym RNA. Przedmiotem badań mgr Macieja Jasińskiego, zaprezentowanych w przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej, były właśnie takie układy molekularne. Autor zbadał oddziaływanie szeregu syntetycznych oligomerów 2'-O-metylowanego RNA oraz oligomerów

PNA z modelowymi rRNA prokariotycznym i eukariotycznym, stosując dwie grupy metod – fizyki doświadczalnej i modelowania komputerowego. Tematyka prowadzonych prac jest bardzo nowoczesna, pomysł badań nowatorski, postawiony problem trudny i ambitny, zaś zarówno samo zagadnienie jak i podejście badawcze lokują się w obszarze fizyki molekularnej układów o znaczeniu biologicznym. Temat rozprawy bardzo dobrze charakteryzuje jej zawartość.

Praca doktorska (nauki fizyczne, dyscyplina fizyka) została przygotowana w Laboratorium Maszyn BioMolekularnych CeNT (UW) i w IFD Wydziału Fizyki UW, pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Trylskiej oraz prof. dr. hab. Ryszarda Stolarskiego. Zasadnicza rozprawa ma 144 strony, obszerne dodatki (A i B) mają ok. 50 stron, Dodatek B to napisana po angielsku instrukcja do programu MINT autorstwa Anny Górskiej, Macieja Jasińskiego i Joanny Trylskiej. Układ pracy jest troszkę nietypowy, bowiem podzielona jest ona na 18 rozdziałów (niekiedy b. krótkich) pogrupowanych w 5 zasadniczych części. Układ ten jest logiczny i prawidłowy, z punktu widzenia prezentacji tematyki i wyników rozprawę czyta się bardzo dobrze. Starannie sporządzona bibliografia obejmuje 207 pozycji. W rozdziale 3, str. 21 przedstawiony jest ogólny cel pracy („zbadać potencjał syntetycznych oligonukleotydów jako inhibitorów procesu translacji u bakterii”) oraz 4 cele szczegółowe. Po zapoznaniu się z zawartością pracy mogę stwierdzić, że cele te zostały w znacznej mierze osiągnięte, tam gdzie eksperymenty nie przyniosły spodziewanych wstępnie efektów, doktorant podaje prawdopodobne wyjaśnienie takich obserwacji.

Przedstawię ocenę kolejnych części rozprawy i uwagi merytoryczne na ich temat. Drobne uwagi formalne znajdują w dalszej części recenzji.

Część I (Kwasy nukleinowe i ich analogi, 21 stron) zawiera 3 rozdziały, w których Autor opisuje bardzo zwięźle naturalne kwasy nukleinowe oraz nieco szerzej ich syntetyczne analogi: PNA oraz 2'-O-metylowane RNA. Najważniejszym fragmentem tej części jest opis wcześniejszych badań oddziaływań syntetycznych oligonukleotydów z rRNA świadczący o b. dobrej orientacji doktoranta w historii badań i piśmiennictwie poświęconym temu problemowi. W tej części rozprawy pojawia się stosowany wielokrotnie w dalszych fragmentach termin „oddziaływanie stackingowe” (str. 11) na opis oddziaływania typu π - π równolegle zorientowanych zasad. W rozprawie nie ma głębszego uzasadnienia wyboru tego właśnie określenia na angielskie „stacking interactions” – w polskim piśmiennictwie spotyka się zarówno „oddziaływanie warstwowe”, „stekingowe”, a w Bydgoszczy część specjalistów od DNA lansuje termin „oddziaływanie boczne”. Byłbym ciekaw, czy doktorant zbadał czy np. PTChem lub inne

towarzystwa naukowe rekomendują jakiś termin jako obowiązujący w języku polskim. Mnie osobiście pisownia „stackingowe” raczej razi. Poza wycinkowym przeglądem literatury ta część nie zawiera oryginalnych wyników naukowych.

Część II (Metody, 28 stron) ma również charakter przeglądowy. Opisane są podstawowe metody obliczeniowe (mechanika molekularna, dynamika molekularna (MD), technika wymiany replik oraz problemy analizy trajektorii MD) oraz metody doświadczalne (spektroskopia UV-VIS, izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC), spektroskopia fluorescencyjna, spektroskopia żelowa) stosowane podczas przygotowywania rozprawy. Opis metod teoretycznych, chociaż bardzo rudymenarny, jest poprawny. Na uwagę zasługuje krytyczna dyskusja jakości pól siłowych w kontekście właściwego opisu struktury kwasów nukleinowych, zwłaszcza w symulacjach o długości setek nanosekund. Drobną nieścisłość zauważyłem na stronie 27 – Autor pisze, iż sumowanie Ewalda „znacznie przyspiesza obliczenia wykonywane dla oddziaływań niewiążących”, podczas gdy w praktyce stosowanie takiego sumowania może nawet wydłużyć obliczenia. Główną motywacją stosowania sumowania Ewalda jest jednak ściśle potraktowanie oddziaływań elektrostatycznych (oddziaływania niewiążące typu VdW nie są obliczane w tej metodzie). Opis podstaw techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (5.2.1) nie jest perfekcyjnie ścisły – na stronie 45 Autor pisze, że „bezpośrednim wynikiem pomiaru ICT jest funkcja energii od czasu”, podczas gdy bezpośrednio rejestrowana jest zależność mocy od czasu. Całkuje się właśnie taką krzywą, nb. poprawnie pokazaną na rys. 5.5A, a nie jak podano na stronie 45 „krzywą energii”. Należy zauważyć, że w rozdziale 5 znajduje się informacja o napisanym samodzielnie przez doktoranta programem narzędziowym (skrypt w Pythonie) do interaktywnej obróbki wyników pomiarów wykonywanych spektrofotometrem Nicolet Evolution 300, zgodnych z analizą potrzebną do wyznaczania parametrów termodynamicznych kwasów nukleinowych. Dobrze, że program powstał, plik z instrukcją został załączony do rozprawy w formie Dodatku A, szkoda, że nie ma programu załączonego „in extenso” np. w formie CD. Nie znalazłem informacji czy program jest szerzej udostępniony. Sądzę, że inne osoby wykonujące podobne projekty miałyby pożytek z tego narzędzia i jest to konkretny wkład doktoranta w ulepszenie metody badawczej.

W opisie sond fluorescencyjnych stosowanych do badań DNA mogłaby się pojawić informacja o sondach interkalujących typu bromek etydyny czy o szeroko stosowanych fluorescencyjnych barwnikach cyjaninowych Cy3 i Cy5. Podobnie w opisie elektroforezy (str. 50) warto byłoby wśród czynników wpływających na prędkość migracji molekuł wymienić masę cząsteczkową.

Część III rozprawy (rozdziały 6-8 , 25 str.) poświęcona jest programowi MINT przeznaczonego do analizy struktur kwasów nukleinowych. Wydawać by się mogło, że w XXI wieku, zważywszy na fundamentalne znaczenie kwasów nukleinowych w nauce oraz wielki rozwój metod bioinformatycznych, programy analizujące „wszystkie” aspekty struktur kwasów nukleinowych powinny być łatwo dostępne. Programów jest faktycznie wiele, jednak żaden z dostępnych w momencie realizacji badań doktoranta nie miał funkcjonalności pozwalającej na analizę dynamiki motywów drugorzędowych i jednocześnie oddziaływań „stakingowych”. Pan mgr Maciej Jasiński taki program napisał (MINT), opublikował (wraz z J. Trylską i A. Górską) w b. dobrym czasopiśmie (NAR) opis tego programu i wykorzystał go w swoich badaniach. Tę część rozprawy oceniam wysoko, ze względu na jej znaczenie, zawartość merytoryczną, a przede wszystkim za oryginalny wkład w tworzenie narzędzi badawczych. Zagadnienia badania oligomerów blokujących rybosom są ważne i ciekawe, jednak nie mają takiego kalibru ogólności jak program do wydajnej i wygodnej analizy wyników trajektorii MD. Obecnie jest już konkurencyjny w pewnym stopniu produkt - program DSSR opracowany w USA - jednak potrzeba kilku lat by ocenić, które narzędzie będzie bardziej popularne wśród tak licznych grup badających obliczeniowo dynamikę kwasów nukleinowych. Programem MINT można analizować zarówno DNA jak i RNA, pojedyncze struktury jak i fragmenty trajektorii MD. Można dokonywać nim oryginalnej analizy energetycznej oddziaływania zasad jak i klasteryzacji struktur drugorzędowych. Cenną cechą programu jest dodanie parametrów 107 niestandardowych, a występujących naturalnie nukleozydów. Wyniki można wygodnie wizualizować korzystając z programów zewnętrznych, np. *Chimera*. Nie ma potrzeby w recenzji opisywania licznych funkcjonalności programu. W rozprawie opisane są one w języku angielskim w obszernym Dodatku B (50 stron, 3 autorów) jak i w rozdziale 6 stanowiącym w znacznym stopniu tłumaczenie obszernych fragmentów Dodatku B. Pozytywne jest to, że program zaimplementowano w postaci serwera www dostępnego dla wszystkich chętnych. Wydajność programu MINT dla niewielkich struktur jest b. dobra, dla większych czas działania (nawet w trybie równoległym) może uniemożliwiać masowe analizy, przynajmniej na serwerze CENT UW. Rozdział 7, zatytułowany jest „MINT funkcjonalność”(a pewnie powinien być raczej nazwany „MINT – opis funkcjonalności”) jest napisany jasno, z dobrymi przykładami i klarownymi ilustracjami. Nie znalazłem jednak uzasadnienia dlaczego przyjęto taki, a nie inny (jest ich wiele) sposób klasteryzacji struktur. Pewnym drobnym mankamentem jest też brak informacji (str. 68), które konkretnie wersje parametrów pól siłowych AMBER i CHARMM są używane do obliczeń energii oddziaływań nukleotydów. Warto byłoby też w części 7.4 wspomnieć, że np. metylowane nukleozydy są b. ważne w epigenetyce, fakt ten dodatkowo uzasadnia konieczność tworzenia programów typu MINT.

W części IV (40 str. , 5 rozdz.) rozprawy opisane są oryginalne wyniki własne doktoranta związane z badaniami oddziaływań oligonukleotydów 2'-O-Me-RNA z modelowymi fragmentami miejsca A rRNA rybosomów bakteryjnych i ludzkich. Celem pomiarów spektroskopowych i symulacji MD było sprawdzenie, który z trzech wybranych oligonukleotydów 2'-O-Me-RNA wiąże się dobrze z bakteryjnym rRNA, nie wiążąc się przy tym w eukariotycznym rRNA. Ważnym i oryginalnym aspektem badań była konfrontacja wyników symulacji z własnymi wynikami doświadczalnymi. Autor rozprawy szczegółowo dyskutuje nukleotyd U1498 z rRNA, który pozycjonuje mRNA w trakcie translacji, a którego mutacja w bakteriach powoduje lekooporność na antybiotyk hygromycynę B. Punktem wyjścia do badań była znana struktura fragmentu bakteryjnego rRNA, ale eukariotyczny model był robiony „ręcznie” poprzez wprowadzenie określonych mutacji w 6 pozycjach (na ok. 21 zasad fragmentu). Pewnie nie pewniejszego na tym etapie badań nie można było zastosować, musimy zatem pamiętać, że wnioski strukturalne, zwłaszcza MD, w odniesieniu do eukariotycznego rRNA są obarczone niepewnością, co do jakości struktury modelowej. Z lektury rozdziału wynika, że doktorant zdawał sobie sprawę z tego rodzaju ograniczenia, formułując wnioski odpowiednio ostrożnie. Dodatkowym źródłem komplikacji była konieczność wprowadzenia do modelu dodatkowych „flankujących” 4 par zasad z każdego końca, po to by możliwe były badania w roztworach określonych dupleksów rRNA. Część IV zawiera obszerne, nowe wyniki doświadczalne i teoretyczne. Sam plan badań jest bardzo logicznie i pomysłowo ustawiony, wyniki opisane na ogół starannie i systematycznie, analiza wyników i dyskusja są krytyczne i na wysokim poziomie. Wykonanie tych badań, w mojej ocenie, wymagało wielkiego nakładu systematycznej pracy doświadczalnej i bardzo dobrego opanowania warsztatu obliczeń MD. Główne rezultaty są ciekawe: jeden z 3 badanych oligonukleotydów 2'-O-Me-RNA (nr 1489) oddziałuje wyjątkowo silnie z modelami prokariotycznego rRNA, zaś nie oddziałuje z modelem eukariotycznym. Co ciekawe, wyniki te są zgodne z oczekiwaniami, ponieważ ten właśnie związek ma 100 % kompatybilność z prokariotycznym rRNA, a aż 3 niedopasowania do eukariotycznego RNA. Zatem tego typu oligomery powinny być testowane jako potencjalne inhibitory syntezy białek bakteryjnych. Analiza wyników zaprezentowanych w części IV pokazuje ponadto, że zaproponowany w doktoracie model eukariotycznego miejsca A ma w swojej sekwencji dwa miejsca wiązania antybiotyków aminoglikozydowych (paromomycyny i hygromycyny B). Może zatem posłużyć do testowania (zarówno doświadczalnego jak i opartego na modelowaniu) nowych pochodnych antybiotyków. Wcześniej takiego modelu nie było w literaturze i opracowanie go i przetestowanie jest niewątpliwie dużym osiągnięciem doktoranta.

Oczywiście nawet najlepiej napisany rozdział w doktoracie można skrytykować i wydobyć w nim słabsze miejsca. Tutaj pewien mój krytycyzm wywołała dyskusja różnic w stabilności termodynamicznej kompleksów (ΔH) wynikająca z porównania pomiarów spektroskopowych i ICT. Mam wrażenie, że doktorant wykonał pewien unik: zauważył, że wyznaczone wielkości fizyczne są odmienne (str. 86, -18.2 i -14.1 kcal/mol dla spektroskopii oraz odpowiednio -10.0 i -9.5 kcal/mol dla ICT), jednak dyskusję przyczyny tej rozbieżności „załatwił” poprzez odesłanie czytelnika do części literaturowej, gdzie zawarte są pewne ogólne rozważania na temat możliwych przyczyn (bez podania ilościowych przykładów) takich różnic. Ciekawe jestem jaka byłaby opinia doktoranta na temat podanych w tabelach (np. tabeli 10.1) błędów wyznaczonych doświadczalnie wielkości termodynamicznych, czy nie są one jednak zaniżone? Wówczas różnice nie byłyby tak „dramatyczne”.

W części IV, którą też oceniam wysoko, zamieszczono szereg doskonałej jakości rysunków struktur molekularnych, prezentacja tych danych nie jest trywialna i w mojej ocenie materiał graficzny podnosi wartość doktoratu i świadczy o talencie dydaktycznym autora.

Materiał zgromadzony w częściach I-IV jest tak obszerny, że wystarczyłby na przyzwoity doktorat. Jest jednak i część V (22 strony, 4 rozdziały) poświęcona oryginalnym badaniom oddziaływania PNA z rRNA. Badane były 3 układy – kompleksy PNA-RNA, RNA-RNA oraz PNA-PNA – metodą spektroskopii UV (ocena stabilności termicznej) oraz metodą MD z wymianą replik. Część doświadczalna budzi pewien niedosyt: zmierzono co prawda zależności udziału struktur dwuniciowych od temperatury, określono z krzywych topnienia temperatury przejścia i stwierdzono rosnącą stabilność termiczną w porządku PNA:RNA < RNA:RNA < PNA:PNA, jednak nie wyznaczono żadnych parametrów termodynamicznych. Dyskusja wyników doświadczalnych jest b. ograniczona. Znacznie lepiej wyglądają symulacje komputerowe tych układów. Doktorant wykonał obliczenia REMD korzystając z pola Amber99 oraz poprawionego pola AMber99 OI3. Nowsze pole poprawnie opisuje struktury w długiej skali czasowej (~100ns) oraz poprawnie oddaje względną trwałość kompleksów. Jest to ważna obserwacja metodologiczna, ułatwiająca wybór metody badawczej w innych podobnych projektach. Symulacje prowadzono w rosnących temperaturach (300-400K) oczekując dysocjacji kompleksów. Dysocjacji w symulacjach MD jednak nie zaobserwowano. Powstał za to obszerny materiał „empiryczny”, pokazujący jak zmienia się dynamika tych ciekawych oligomerów w funkcji temperatury. Ciekawe są też obserwacje trendów w oddziaływaniach „stagingowych” tych układów modelowych (najmniejsze w PNA:PNA, największe w RNA:RNA). Autor badań wysuwa hipotezę, że brak dysocjacji obserwowany w REMD może być spowodowany zbyt krótką skalą czasową symulacji, może dopiero trajektorie o długości kilku mikrosekund przyniosłyby oczekiwany rozpad termiczny kompleksu. Moim zdaniem podejście

do problemu termicznej dysocjacji zaprezentowane w tej części doktoratu było jednak zbyt optymistyczne. Pola siłowe typu CHARMM czy AMBER są zoptymalizowane na struktury równowagowe. W MD bardzo rzadko udaje się poprawnie przewidzieć ilościowo przejścia fazowe. Model wody – poprawny fizycznie we wszystkich aspektach – nie istnieje. Woda w 400 K przy normalnym ciśnieniu powinna zamienić się w stan gazowy (para wodna) – a nie zamienia się. Próbkowanie trajektorii co 3.5 K jest bardzo gęste, a nawet zbędnie gęste (Tab16.2). Skoki na teoretycznie gładkich wykresach z Rys. 16.4 świadczą, że faktycznie omawiane symulacje nie były w pełni zbieżne. Niezależnie od „negatywnego” rezultatu z modelowania opisanego w części V uważam, że zgromadzone wyniki są „informatywne”, próby takich obliczeń należało wykonać, informacje o jakości pól siłowych są nowe i ważne, a wyniki doktoranta przyczynią się do ulepszenia metodologii symulacji przejść konformacyjnych w kompleksach PNA i RNA. Być może planowany staż podoktorski przyniesie panu Jasińskiemu okazję do poprawienia metodologii obliczeniowej i da wyniki zgodne z obserwacjami doświadczalnymi. Życzę Mu tego, ponieważ tematyka tych badań jest ważna zarówno praktycznie jak i z przyczyn czysto poznawczych.

Poniżej przedstawiam listę drobnych problemów redakcyjnych zauważonych w rozprawie:

str. 83 – do jakiej objętości analitu (komora ITC) dodawano te 2 mikrolitrowe nastrzyki (b) jaki model wody był stosowany w MD? Jaka duża skrzynka? (c) str 84 – jak długie były właściwe symulacje? Jak gęsto zapisywano ramki?

str. 39 – w prawie Lamberta-Bera jeśli c jest stężeniem molowym to epsilon nazywa się molowym, a nie (jak podano w pracy) molarnym współczynnikiem absorpcji.

str. 41 i następne – stosowany jest termin „ładunki negatywne” i „ładunki pozytywne” – takich ładunków w fizyce nie ma, są ujemne i dodatnie.

str. 41 – stackingujace zasady nukleinowe – żargon.

str. 43 - we wzorze 5.13 zamiast S powinno być ΔS .

str. 50 – „zjawiska” → zjawiskami.

str. 51 – „wykorzystanie” → wykorzystaniem.

str. 79 - 2'-O-Me-RNA → 2'-O-Me-RNA.

str. 89 – „klasteryzacja metodą gromos” - ? istnieje taka metoda klasteryzacji? (oraz str. 117).

str. 96 – suma oddziaływań prokariotycznego -271 kcal/mol, a eukariotycznego 263 kcal/mol plus? Czy nie zabrakło znaku minus?

Str. 100, rys. 1.2.b i c - ?? intensywność?? fluorescencji → natężenie fluorescencji; „stosunek nici” ?? → stosunek stężeń nici?; (a) „frakcja” → frakcja

Bibliografia – w pozycjach [21], [22], [24], [101] , [110], [116], [127], [147] występują usterki formatowania.

KONKLUZJA

Przedłożona mi od recenzji rozprawa zawiera nowe, obszerne i wartościowe wyniki. Stosowane metody są znane w literaturze, jednak postawione problemy są ważne i oryginalne. Autor wykazał skutecznie umiejętność prowadzenia badań typowo fizycznych (spektroskopia UV-VIS, ICT, programowanie) i biofizycznych (modelowanie komputerowe, spektroskopia żelowa), zarówno podstawowymi metodami doświadczalnymi jak i przy pomocy eksperymentów komputerowych. Sposób prezentacji problemów, metod i wyników oraz ich interpretacja są bardzo dobre. Owoc pracy doktoranta (i dwojga innych współpracowników) tj. poważne narzędzie bioinformatyczne MINT został opublikowany w prestiżowym czasopiśmie międzynarodowym o wysokim IF (NAR). Dodatkowo doktorant jest współautorem poważnej publikacji w Biophys. J. Wyniki zawarte w doktoracie były prezentowane na konferencjach międzynarodowych. Znalezione drobne usterki nie podważają wartości rozprawy.

Resumując, stwierdzam, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje znakomitą orientację kandydata w dziedzinie modelowania komputerowego RNA i wybranych metod doświadczalnych dowodząc też umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Spełnia ona wszelkie kryteria ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk fizycznych, dyscyplinie fizyka, wnosząc zatem o dopuszczenie mgr. Macieja Jasińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na twórcze połączenie metodologii badań doświadczalnych i teoretycznych, mocno interdyscyplinarny charakter badań, znaczenie rezultatów dla racjonalnego projektowania leków, uzyskanie unikatowych wyników nt. oddziaływania oligonukleotydów z RNA - co stanowi wybitne osiągnięcie naukowe, częściowo opublikowane w prestiżowym czasopiśmie (*Nucleic Acids Research*), wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jasińskiego wg panujących na Wydziale zwyczajów.

W. Nowak