



Warszawa, dn. 24.10.2016

Prof. dr hab. Sławomir Filipek,
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski,
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
Tel. 22-55-26405,
E-mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Katarzyny Kulczyckiej-Mierzejewskiej, pt.

**Investigation of interactions of lincosamides with bacterial ribosome
using computational modelling methods**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska ma charakter klasycznej rozprawy i obejmuje 146 stron wraz z załącznikiem zawierającym dane techniczne dotyczące przeprowadzonych badań. Praca jest oparta na dwu publikacjach w *Journal of Molecular Modeling* (opublikowanych w 2012 i 2016) oraz jednej publikacji w przygotowaniu. We wszystkich tych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na duży wkład pracy włożonej w otrzymanie i zanalizowanie otrzymanych wyników. Wstęp literaturowy pracy doktorskiej, podzielony na część biologiczną i metodologiczną, liczy 32 strony, opis przygotowania struktur do symulacji 15 stron, Wyniki podzielone na 4 etapy zakończone osobnymi konkluzjami 56 stron, oraz sumaryczne konkluzje wraz z planem przyszłych badań 4 strony. W tekście pracy zamieszczono 56 ilustracji, 27 tabel, oraz wykaz skrótów. Bibliografia obejmuje 126 pozycji. Praca została napisana w języku angielskim przy praktycznie bezbłędnym słownictwie.

W części literaturowej dotyczącej układów biologicznych doktorantka przedstawia specyficzną klasę antybiotyków, linkosamidów, dla których prowadziła badania. Jest to mała grupa antybiotyków zawierająca trzy związki: linkomycyna, klindamycyna oraz pirlimycyna. Wobec rosnącej oporności bakterii na stosowane antybiotyki ważne jest poszukiwanie nowych związków na bazie substancji naturalnych (jak np. linkomycyna) lub syntetycznych. Z tych trzech związków, klindamycyna posiadająca najlepsze własności farmakokinetyczne jest najszerszej stosowana, i właśnie na tym związku skupiła się doktorantka w swoich badaniach. Szkoda, że we Wstępie nie omówiono, lub choćby nie wspomniano, o innych antybiotykach, działających podobnie do linkosamidów, czyli blokujących rybosom



bakteryjny. Ciekawe byłoby porównanie ich struktur, wielkości, niektórych własności fizykochemicznych, miejsc wiązania w rybosomie oraz szybkości rozwoju lekooporności dla poszczególnych grup antybiotyków.

W części Metodologicznej doktorantka omawia metody teoretyczne stosowane do modelowania małych związków chemicznych oraz dużych układów biologicznych. Począwszy od metod *ab initio* i DFT (*Density Functional Theory*) omówiona także została metoda AIM (*Atoms in Molecules*) Badera (niestety bez ilustracji przedstawiającej punkty krytyczne gradientu gęstości elektronowej) oraz metody oparte na klasycznym polu sił działających między atomami czyli Mechanika i Dynamika Molekularna. Doktorantka omówiła wkłady poszczególnych rodzajów oddziaływań do pola siłowego oraz szczególną uwagę skupiła na omówieniu hybrydowej metody QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*), która umożliwia kwantowe obliczenia dla centralnej części badanego układu podczas gdy reszta tego układu jest traktowana klasycznie. Omówiono także w skrócie metody analizy danych z symulacji dynamiki molekularnej. Niedociągnięcia: rys. 2.7 z rozdziału 2.3.7 jest kopią rys. 2.2 z poprzedniego podrozdziału. W drugiej części wzoru 2.36 na RDF (*Radial Distribution Function*) powinno być R^3 zamiast dR^3 bo definiuje sferę. W obu wzorach na str. 40 brak opisu znaków Σ .

W następnym rozdziale Doktorantka przedstawia metody stosowane w badaniach własnych. W szczególności wykonano optymalizację struktury wszystkich trzech linkosamidów w próżni i rozpuszczalniku ciągłym, a dla klindamycyny przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej: samego liganda metodą kwantową QMD w próżni 60 ps oraz klasyczną FAMD (*full-atom MD*) w środowisku wodnym przez 100 ns. Następnie, wykonano symulacje z rybosomem: bez liganda oraz z ligandem WT (dziki typ rybosomu) i MUT (mutacja rybosomu - nieopisana w tym rozdziale) metodami QM/MM 50 ps i FAMD 100 ns. Dla każdej z tych symulacji stosowano 3-4 powtórzenia aby uzyskane wyniki były statystycznie wiarygodne. Opisano także jakie analizy zostały zastosowane do otrzymanych wyników oraz jakich programów użyto: metody DFT w programie CP2K dla dynamiki kwantowej oraz QM/MM, natomiast pole siłowe typu AMBER w programie NAMD dla dynamiki klasycznej. Startowa struktura rybosomu ze związaną klindamycyną została wzięta ze struktury krystalicznej, kod 4V7V z bazy PDB (*Protein Data Bank*). Na str. 42 podano numerację atomów dla kąta torsyjnego C15-C16-N2-C19, natomiast na rys. 3.5 w tym samym rozdziale jest inna numeracja atomów. Dopiero w następnym rozdziale Wyniki na rys. 4.1 przedstawiono tę numerację. W całej pracy funkcjonują te dwie równoległe numeracje



ponieważ w obu publikacjach w *Journal of Molecular Modeling* inaczej ponumerowano atomy, a w pracy doktorskiej nie ujednotoczono tej numeracji, co utrudnia czytanie. Symulacje przeprowadzono na fragmencie rybosomu zawartym wewnątrz sfery o promieniu 20 Å wokół molekuly klindamycyny. Obszar ten zawierał zarówno łańcuchy RNA jak i białkowe. Po dodaniu molekuł wody w modelu TIP3P badany układ zawierał ok. 90,000 atomów w pudle periodycznym. Układ do symulacji kwantowych był mniejszy i zawierał 18,000 atomów z czego 138 atomów było liczonych kwantowo. Wielkość układu jest adekwatna do przeprowadzonych badań.

W tab. 4.1 w rozdziale Wyniki podano, że przedstawione tam parametry geometryczne dotyczą optymalnych struktur trzech linkosamidów. W rzeczywistości (jak podano w rozdz. 3), podane kąty torsyjne odpowiadają kątom doświadczalnym i nie podlegały optymalizacji. Doktorantka wykonała skan energii potencjalnej klindamycyny obracając kąt C15-C16-N2-C19 co 10°. Uzyskane dwa minima energii 0° i 180° nie odpowiadają doświadczalnemu konformerowi A (-47°) ani konformerowi B (119°) co nie zostało skomentowane. W podpisie do tych skanów jest niezrozumiałe zdanie „in the both clindamycin conformer A”. Prawdopodobnie wyraz *both* jest zbędny. Skany energii dla konformeru A i B są różne co wydaje się dziwne biorąc pod uwagę to, że pozostałe parametry geometryczne były optymalizowane. Różne są także wysokości obu minimów dla 0° i 180°.

Przy omawianiu geometrii obu konformerów A i B klindamycyny na rys. 4.5 zaznaczone zostały punkty krytyczne typu (3, +1) nieomówione wcześniej. Brak także porównania ich wartości dla obu konformerów i wpływu na stabilność, chociaż zostały one przedstawione w tab. 4.4. Na str. 66-67: „*common hydrogen bonds*” w odniesieniu do CH \cdots OC oraz „*atypical hydrogen bonds*” w odniesieniu do OH \cdots X (X = O, Cl). Wydaje mi się, że jest odwrotnie i typowe wiązanie wodorowe to układ OH \cdots O, jako że jest silnie spolaryzowane, natomiast wiązania C-H są słabo spolaryzowane. Na rys. 4.16 pokazano histogramy wartości SASA (*solvent accessible solvent area*) dla symulacji klindamycyny w wodzie w metodzie QM/MM i FAMD. Maksima obu wykresów różnią się o ok. 5 Å². Prawdopodobnie jest to nieistotna różnica w porównaniu do wartości maksimum SASA 642±11 Å², tym niemniej test t-Studenta powinien być przeprowadzony aby stwierdzić czy ta różnica maksimów SASA jest statystycznie istotna.

Na rys. 4.24 pokazano z kolei histogramy wartości kąta C4-C7-N1-C10 (lub wg. alternatywnej numeracji C15-C16-N2-C19). Dla symulacji WT-CLY otrzymano trzy różne maksima wartości tych kątów. Tutaj także można zastosować test t-Studenta, czy te różnice są



statystycznie istotne zwłaszcza, że rozkład tych kątów jest bardzo szeroki. Przy omawianiu miejsca wiązania klindamycyny w rybosomie, na rys. 4.25 zastosowano niewłaściwą numerację zasad, np. A2015 zamiast A2058. Z kolei na rys. 4.26 i 4.27 nie zaznaczono reszty A2058, która wiąże się bezpośrednio z ligandem i dodatkowo jest mutowana, oraz reszty A2059. Zrobiono to dopiero na rys. 4.29. Na str. 95 opisano wiązanie liganda z rybosomem bez mutacji: „A2058:O6···CLY:O4” – natomiast adenina nie zawiera atomów tlenu. Być może chodziło o oddziaływanie A2059:N6···CLY:O4 jak to wynika z rys. 4.30 struktura po lewej stronie.

W sumie Doktorantka wykonała bardzo wiele różnorodnych symulacji zarówno samej klindamycyny jak i związanej z fragmentem rybosomu. Uzyskane wyniki wskazują, że jest istotna różnica w wiązaniu liganda do zmutowanego rybosomu i takie wiązanie jest nawet silniejsze niż w rybosomie bez mutacji. Wobec tego Doktorantka stawia hipotezę, że zmiana ułożenia sąsiednich zasad nukleinowych powoduje zmniejszenie kanału, którym ligand wchodzi do miejsca wiążącego, co skutkuje brakiem wiązania. Dobrze byłoby to zweryfikować np. przeciągając ligand przez ten otwór dla obu rybosomów stosując zewnętrzną siłę w metodzie SMD (*Steered Molecular Dynamics*). Badane efekty wymagały długich czasów symulacji dlatego klasyczne pełno-atomowe symulacje okazały się bardziej wydajne od symulacji QM/MM pozwalając na uzyskanie symulacji dłuższych o ok. 3 rzędy wielkości pomimo użycia większej liczby atomów w badanym układzie.

Podsumowując, rozprawa jest napisana poprawnym językiem naukowym i zawiera wiele wartościowych i opublikowanych wyników, natomiast wyniki symulacji z rybosomem są w fazie pisania manuskryptu. Wybór metod i krytyczna interpretacja uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki a wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają jednak znaczącej wartości naukowej dysertacji oraz znakomitego przygotowania merytorycznego. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wnioski do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Katarzyny Kulczyckiej-Mierzejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sławomir Filipek