



Warszawa, dn. 22.06.2017

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. Moniki Świniarskiej, pt.**

**Model obliczeniowy molekularnego mechanizmu**  
**aktywności typu half-the-sites syntazy tymidylanowej**

Rozprawa jest napisana po angielsku i liczy 132 strony. Obejmuje 272 odnośniki literaturowe, co wskazuje na duży wkład Doktorantki w wyszukanie i uporządkowanie tych prac. Rozprawa jest oparta na dwu publikacjach Doktorantki: jedna w *Biopolymers* w 2010 roku i druga w *Computational Biology Journal* w 2015. Doktorantka jest pierwszym i drugim autorem kolejno w tych publikacjach co dowodzi dużego wkładu pracy włożonego w otrzymanie i analizę wyników.

Rozprawa nie ma charakteru klasycznej rozprawy doktorskiej z podziałem na Wstęp, Metody, Wyniki i Dyskusję, a jest odzwierciedleniem wyników otrzymanych i opublikowanych w ww. publikacjach, dlatego dysertacja ta jest podzielona na 3 główne rozdziały: wstęp literaturowy, omówienie wyników pierwszej publikacji, i odpowiednio drugiej publikacji. Jest także podany spis rycin zamieszczonych w dysertacji, ale brakuje spisu używanych skrótów, których w tej rozprawie jest sporo. Brak także odnośnika do rys. 2.8. Poza tym wstęp czyta się z przyjemnością i jest on bardzo dobrym źródłem wiedzy na temat syntazy tymidylanowej oraz problemów związanych ze zrozumieniem niektórych aspektów mechanizmu katalitycznego tego białka.

We wstępie literaturowym liczącym 20 stron i zatytułowanym „Syntaza Tymidylanowa” (po ang.), Doktorantka omawia właściwości i strukturę tego białka, mechanizm katalityczny, w wyniku którego zachodzi metylacja dUMP i powstaje dTMP - nukleotyd tymidynowy, oraz przedstawia szereg inhibitorów tego białka, które są stosowane



jako leki przeciwnowotworowe. Inhibitory te zostały podzielone na bezpośrednie (blokują miejsce aktywne w syntazie tymidylanowej) oraz pośrednie (blokują inny enzym – reduktazę kwasu dihydrofoliowego – który dostarcza kofaktora do syntazy tymidylanowej). Doktorantka omówiła, wraz z podaniem ich działania oraz struktur chemicznych, 7 związków będących inhibitorami bezpośrednimi, oraz 5 inhibitorów pośrednich. Syntaza tymidylanowa działa jako dimer, a oba miejsca aktywne są utworzone z aminokwasów obu monomerów. Zostało także stwierdzone, że kataliza zachodzi na raz tylko w jednym miejscu aktywnym. Taki mechanizm aktywności białka został nazwany *half-the-sites* i wyjaśnieniu tego mechanizmu, tj. stworzeniu jego modelu teoretycznego, jest poświęcona ta rozprawa.

Po wstępie literaturowym Doktorantka przedstawia wyniki pierwszej publikacji w rozbudowanym rozdziale zatytułowanym „*Segmental motions*”. Na rozdział ten składa się wstęp dotyczący obliczania drgań normalnych białka, opis metod: *Elastic Network Model* oraz *Rotations-Translations of Blocks*, opis otrzymanych wyników wraz z ich dyskusją, oraz podsumowanie. Drgania normalne dimeru syntazy tymidylanowej zostały wygenerowane w programie ElNemo. Doktorantka skupiła się na drganiach normalnych o niskich częstościach, czyli najwolniejszych, bowiem opisują one kolektywny ruch wielu aminokwasów i obejmują zwykle całe białko. Metoda *Elastic Network Model* jest przybliżona bowiem opiera się tylko na węglach C<sub>alfa</sub> powiązanych siłami harmonicznymi, ale jest w stanie szybko dostarczyć wartościowych informacji o możliwych ruchach całego białka. Do obliczeń wybrano strukturę krystaliczną 2TSR z bazy *Protein Data Bank*, która jest dimerem dimerów tego białka. W wyniku dokonanych obliczeń i ich analizy dla dimeru A-B oraz C-D Doktorantka stwierdza, że istnieją symetryczne i asymetryczne mody drgań normalnych, ale modów asymetrycznych jest więcej (odpowiednio 7 symetrycznych i 9 asymetrycznych). Mody symetryczne jednakowo zmieniają kształt miejsca aktywnego w obu monomerach syntazy tymidylanowej, natomiast w modach asymetrycznych zachodzi przeciwstawna zmiana, czyli zwiększanie objętości jednego miejsca kosztem drugiego. Wnioski te zostały poparte obliczeniami SASA (*solvent accessible surface area*) oraz zmianami odległości pomiędzy poszczególnymi resztami z miejsca aktywnego. Przy opisie zmian odległości między aminokwasami posługiwano się różnymi parami tych aminokwasów do charakterystyki poszczególnych modów drgań normalnych, co utrudnia bezpośrednio porównywanie ich ze sobą, lecz zapewne chodziło o pokazanie ruchów najbardziej znaczących w danym modzie.

W kolejnym rozdziale, poświęconym denaturacji syntazy tymidylanowej, Doktorantka przedstawia wyniki opublikowane w swojej drugiej pracy. Dotyczą one wpływu mocznika



oraz chlorku guanidyny na deformację struktury tego enzymu w wyniku procesu denaturacji. Rozdział ten również jest podzielony na wstęp dotyczący denaturacji różnych białek i metod jej badania, opisie własnych metod oraz podsumowanie. Do zbadania procesu denaturacji syntazy tymidylanowej Doktorantka posłużyła się pełnoatomową dynamiką molekularną w programie NAMD 2.8 w polu siłowym CHARMM22. Zastosowano sześciennie pudła periodyczne o boku 8 nm zawierające dimery A-B i C-D tego enzymu oraz ponad 8000 cząsteczek wody i ponad 2000 cząsteczek mocznika, co odpowiada stężeniu 8 M. Dla chlorku guanidyny zastosowano niższe, 6 M stężenie. Wykonano symulacje 300 ns i przedłużono je do 600 ns lub 750 ns w zależności od badanego układu, tj. dla roztworu wodnego oraz dla dwu czynników denaturujących. Przydatna tutaj byłaby sumaryczna informacja, np. w formie tabeli, jak długie symulacje przeprowadzono, dla jakich układów i ile powtórzeń wykonano. W symulacjach wykorzystano tylko białko bez ligandów, zatem nie można było prześledzić wpływu np. inhibitora na stabilność białka w wodzie lub odporność na któryś z czynników denaturujących.

Symulacje rzędu 1  $\mu$ s pozwoliły na zaobserwowanie początkowych etapów procesu denaturacji białka, co Doktorantka pokazała za pomocą wykresów RMSD (*root mean square displacement*) dla całego białka, oraz RMSF (*root mean square fluctuations*) dla poszczególnych reszt aminokwasowych. Z analizy przeprowadzonych trajektorii Doktorantka wykonała także wykresy promienia gyracji tego enzymu, zmiany położenia poszczególnych aminokwasów na wykresie Ramachandrana pokazującym obszary  $\alpha$ -helikalne i  $\beta$ -karkowe, oraz wykres zmian struktury II-rzędowej białka w czasie dla poszczególnych aminokwasów. We wszystkich wykonanych symulacjach zmiany strukturalne nie były zbyt duże. Najbardziej mobilne i podatne na denaturację okazały się reszty 90-150 w pobliżu miejsca aktywnego. W symulacjach z użyciem mocznika zmiany strukturalne w białku okazały się większe niż z użyciem chlorku guanidyny, co jest sprzeczne z wynikami doświadczalnymi, a nie zostało odpowiednio przedyskutowane, jakie czynniki mogły mieć wpływ na taki wynik symulacji.

Rozwijanie białka zachodziło niesymetrycznie i w większym stopniu dotyczyło jednego monomeru co pośrednio wspiera hipotezę o mechanizmie *half-the-site* syntazy tymidylanowej. Jako potencjalne wyjaśnienie mechanizmu *half-the-site* brane są pod uwagę allosteryczne oddziaływania pomiędzy obydwojema miejscami aktywnymi w dimerze, zatem analiza kros-korelacji (*cross-correlation*) na podstawie symulacji dynamiki molekularnej mogłaby dostarczyć informacji, które aminokwasy, nawet te znajdujące się daleko od siebie, poruszają się w tym samym kierunku (*correlated movements*) lub w przeciwnym kierunku



(*anti-correlated movements*). Taka analiza byłaby dużo dokładniejsza od przeprowadzonych obliczeń metodą *Elastic Network Model*, gdzie wykorzystuje się prosty model harmoniczny całego białka. Kolejną analizą, która mogłaby być przeprowadzona w celu uwidocznienia kolektywnych zmian struktury białka jest *Correlation Network Analysis* (korelacyjna analiza sieci oddziaływań), którą można także zastosować do przeprowadzonych wcześniej symulacji dynamiki molekularnej.

Podsumowując, rozprawa jest napisana bardzo dobrym językiem naukowym oraz znakomitym językiem angielskim. Wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy oraz bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Doktorantki. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia zatem 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 wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Moniki Świniarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sławomir Filipek