



## Recenzja rozprawy doktorskiej Urszuli Budniak

“Characterization of intermolecular interactions of nucleobases and other nucleic acid components in small molecule crystals and in protein-RNA complexes with the use of the UBDB databank”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska powstała w grupie Modelowania Gęstości Elektronowej (Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego). Promotorem pracy doktorskiej jest prof. dr hab. Paulina Dominiak.

Jednym z najważniejszych współczesnych wyzwań na styku chemii i biologii jest zrozumienie podstawowych mechanizmów, które regulują oddziaływania biomakromolekuł z innymi cząsteczkami chemicznymi. Ma to szczególne znaczenie zarówno dla projektowania nowych substancji biologicznie aktywnych, jak i dla poszerzenia wiedzy na temat procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Podstawowym narzędziem umożliwiającym wgląd w te procesy są metody obliczeniowe. Jednak precyzyjne określenie sposobu wiązania oraz obliczenie energii oddziaływania międzycząsteczkowego jest dużym wyzwaniem ze względu na stopień skomplikowania tych procesów. O ile metody chemii kwantowej świetnie sprawdzają się przy przewidywaniu podstawowych właściwości prostych cząsteczek chemicznych, to w przypadku biomakromolekuł brakuje odpowiednich zasobów obliczeniowych do efektywnego przeprowadzenia takich analiz. Problem dodatkowo komplikuje duża labilność konformacyjna biomolekuł oraz wynikająca z niej mnogość lokalnych minimów energetycznych. Metody mechaniki i dynamiki molekularnej są z powodzeniem od lat stosowane w tym obszarze, jednak dokładne określenie energii oddziaływania nie jest możliwe ze względu na ograniczenia fizyki klasycznej. Remedium stanowią metody hybrydowe/alternatywne takie jak opisana w niniejszej rozprawie doktorskiej metoda UBDB-EP/MM. W metodzie tej gęstość elektronowa cząsteczki jest rekonstruowana z odpowiednich parametrów gęstości elektronowych zdeponowanych w banku asferycznych pseudoatomów UBDB, a oddziaływanie elektrostatyczne jest obliczane metodą EP/MM.

Metoda EP/MM łączy dokładne obliczanie energii oddziaływania elektrostatycznego (EP) dla bliskich odległości, z energią obliczaną w sposób mniej dokładny wykorzystując przybliżenie momentów multipolowych typu Buckingham dla odległości dalszych – podejście to jest podobne jak wykorzystywane w metodzie QM/MM.

Zaprezentowana rozprawa doktorska wpisuje się zatem w obecne trendy poszukiwania bardziej dokładnych metod opisu zachowania i oddziaływań molekuł i biolakromolekuł. Głównym celem pracy było określenie energii oddziaływań elektrostatycznych białek z rodziny IFIT z kwasami rybonukleinowymi (RNA). Gęstość elektronowa została zrekonstruowana wykorzystując bank asferycznych pseudoatomów UBDB, natomiast energia elektrostatycznego oddziaływania międzycząsteczkowego została obliczona metodą EP/MM. Autorka wykonała również szereg obliczeń oraz analizę gęstości elektronowych w wybranych kryształach molekularnych, a pracę uzupełnia analiza porównawcza odnosząca się do eksperymentalnych wartości stałych wiązania IFIT-RNA.

Część literaturową przygotowano na podstawie 116 publikacji naukowych. Cytowane publikacje są ściśle powiązane z tematyką pracy. W części wprowadzenia Autorka przedstawia kolejno model multipolowy Hansena-Coppensa stosowany w opisie gęstości elektronowej układu, koncepcję banków pseudoatomów i ich rodzaje, oraz metodę EP/MM w obliczeniu energii oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy molekułami. Niestety metoda EP/MM została opisana w sposób pobieżny. Autorka rekompensuje te braki podając kilka przykładów zastosowania metody UBDB-EP/MM, choć analiza ta powinna zostać wzbogacona o konkretne dane liczbowe, które mogłoby uwzględnić porównanie energii oddziaływań uzyskiwanych różnymi metodami lub korelację z eksperymentalnymi wartościami stałych wiązania. Taka analiza dodatkowo podkreśliłaby uniwersalność i efektywność stosowanej metody przy jej stosunkowo niskim koszcie. W następnej części wstępu przywołane zostają podstawowe informacje dotyczące zasad azotowych, budowy RNA oraz funkcji białek z rodziny IFIT. Należy podkreślić, że białka IFIT pełnią istotną rolę w procesach obrony komórki przed obcym materiałem genetycznym. Wiązanie IFIT z wirusowym RNA skutecznie blokuje jego wnikanie do jądra komórkowego i dalszą replikację. Jak wykazano eksperymentalnie, mechanizm rozpoznania opiera się na tworzeniu silnego oddziaływania z 5' końcem RNA wirusowego, które różni się od RNA ludzkiego. Określenie oddziaływania białek IFIT z fragmentem RNA jest zatem kluczowe w zrozumieniu tych mechanizmów i dalszego projektowania leków przeciwwirusowych. Uzasadnia to konieczność podjęcia badań w tym kierunku.

Pierwsza część badań własnych poświęcona została analizie gęstości elektronowej oraz energii kohezji w kryształach molekularnych podstawowych zasad azotowych (izocytozyna,

DAP) oraz chlorowodoru izoguaniny. Autorka wykorzystała bank UBDB w celu rekonstrukcji gęstości elektronowej w strukturach tych układów. Następnie wykonała analizę topologicznego rozkładu gęstości elektronowej oraz przeprowadziła odpowiednie obliczenia teoretyczne zarówno dla całych sieci krystalicznych (w periodycznych warunkach brzegowych) jak i dla wybranych motywów strukturalnych. Badania te stanowiły preludeum do dalszej części pracy.

Kolejne rozdziały dotyczą badania energii oddziaływań pomiędzy białkiem IFIT1 lub IFIT5 a fragmentem RNA wykorzystując zaproponowaną metodę UBDB-EP/MM. W pierwszej kolejności Autorka musiała uzupełnić bank UBDB o parametry multipolowe dla nowych pseudoatomów (m. in. kationu magnezu). Następnie Autorka przechodzi do części właściwej badań opisując kompleksy IFIT5-RNA. Jak słusznie wskazuje Autorka, na oddziaływanie elektrostatyczne kluczowy wpływ ma ładunek oraz jego rozkład w miejscu oddziaływania, zaś mniejsze znaczenie ma sama sekwencja RNA. Autorka w sposób bardzo dokładny analizuje oddziaływania poszczególnych reszt aminokwasów z fragmentem RNA, tym samym ustalając które fragmenty białka są odpowiedzialne za wiązanie RNA. Co więcej, obliczone wartości zostały zestawione z wyznaczonymi przez Autorkę wartościami stałych wiązań białko-RNA. Autorka przeprowadziła również bardzo istotną analizę wpływu mutacji białka na wiązanie z RNA. W tym miejscu uwidacznia się siła stosowanego modelu obliczania energii oddziaływania elektrostatycznego EP/MM, który uwzględnia penetrację chmur gęstości elektronowych oddziałujących fragmentów biomakromolekuł. Autorka wykazuje również, które mutacje mogą mieć wpływ na zwiększenie bądź zmniejszenie siły wiązania białko-RNA.

W dalszej części badań własnych Autorka analizuje wpływ budowy 5' końca RNA na jego oddziaływanie z białkiem IFIT1. Rozważono również wpływ konfiguracji (*syn/anti*) zasady azotowej oraz formy tautomerycznej 7-metyloguanozyny, jak również całkowitego ładunku RNA. Następnie Autorka porównuje efekt wiązania białek IFIT1 oraz IFIT5 z fragmentami RNA dyskutując udział energii oddziaływania w obszarze wiązania, wpływ sekwencji białka, ładunku, jak również ewentualnej obecności kationu magnezu na całkowitą energię oddziaływania białko-kwas rybonukleinowy. W finalnej części pracy dokonuje kompleksowego porównania uzyskanych wyników zestawiając je ze zmierzonymi eksperymentalnie wartościami stałych wiązania białko-RNA. Zgodnie z uzyskanymi wynikami obliczeniowymi białko IFIT1 preferencyjnie wiąże się z fragmentem pppRNA, podczas gdy rezultaty eksperymentalne wskazują że stała wiązania jest większa w kompleksie z cap- oraz cap0-RNA. Zgadza się z Autorką, że różnice te mogą wynikać z nieprawidłowo określonego całkowitego ładunku układu oraz nieuwzględnienia wpływu cząsteczek wody. Czy i ewentualnie w jaki sposób można byłoby zaadresować te problemy na gruncie obliczeń

teoretycznych? Czy efekt obecności licznych cząsteczek wody w pobliżu miejsca wiązania będzie miał duży wpływ na sam proces wiązania i czy wpływ ten dałoby się oszacować? Czy inne kationy (np. kation sodowy – obecny w jednej z analizowanych struktur z bazy PDB) mogą brać aktywny udział w procesie wiązania? Czy uwzględnienie efektów dynamicznych (np. stosując metody dynamiki molekularnej) mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji na temat zachowania tego układu?

Jeżeli chodzi o strukturę rozprawy, to została podzielona na kilka rozdziałów według ogólnie przyjętego schematu. Są to kolejno abstrakt, wprowadzenie literaturowe, cel pracy, metodologia pomiarów, prezentacja i dyskusja wyników oraz podsumowanie. Praca została napisana w języku angielskim. Jest ona zrozumiała dla czytelnika, dyskusja jest płynna, nie dopatrzyłem się istotnych błędów językowych. W pracy pojawiają się drobne błędy oraz literówki. Z obowiązku recenzenta podaję kilka przykładów:

1. Strona 24. “Analogues if”
2. Strona 20. Stosowane symbole S6618 oraz JSCH-200519 nie zostały wyjaśnione (jak rozumiem jest to rodzina białek).
3. Strona 26. Nie spotkałem się wcześniej z określeniem „swapped tautomers”. Bezpieczniej jest mówić o izomerach.
4. Strona 32. Figure 6D. Przedstawione wykresy nie zostały opisane. Nie jest jasne jakie wartości figurują na osiach ( $F_{norm}$  – czy jest to znormalizowana fluorescencja – ale liczona jako intensywność pasma, czy jego całość?), czemu odpowiadają 3 krzywe na lewym wykresie Figure6D. W dyskusji brakuje również porównania dokładności różnych metod wyznaczania stałych wiązań. Jaka jest dokładność stosowanej metody MST?
5. Strona 40. “3.3.2 Electrostatic properties calculations od IFIT1.”
6. Strona 45. Grupa przestrzenna P21/c. Nieprawidłowe formatowanie. Problem z formatowaniem pojawia się również w kilku innych miejscach (np. Tabela 4).
7. W licznych miejscach w tekście pojawiają się drobne literówki w nazwie białka IFIT.
8. Strona 110. Format symbolu stałej wiązania  $K_D$  jest w kilku miejscach nieprawidłowy.
9. Zauważyłem pewną niekonsekwencję w stosowaniu jednostek energii, które raz podawane są w kcal/mol, w innych miejscach w kJ/mol.

10. Dyskusja dotycząca wpływu form ketonowej i enolowej w 7-metyloguanozynie oraz konfiguracji *syn-anti* zasad azotowych w nukleotydzie na energię wiązania powinna zostać wsparta odpowiednimi schematami lub rysunkami.

Wszystkie te uwagi mają drugorzędne znaczenie i nie wpływają na dobry odbiór pracy.

Podsumowując, zaprezentowana rozprawa doktorska jest dziełem o istotnych walorach poznawczych oraz aplikacyjnych. Cel przedstawionej pracy został jasno określony, wszystkie eksperymenty zostały prawidłowo przeprowadzone. Na ich podstawie zostały wyciągnięte prawidłowe wnioski. Autorka nadała szerszy kontekst swoim badaniom, z jednej strony podkreślając znaczenie różnych czynników związanych ze stosowanym modelem opisu gęstości elektronowej układu jak również konieczności stosowania bardziej dokładnych metod przy obliczaniu energii oddziaływania elektrostatycznego, z drugiej pokazując praktyczne zastosowanie modelu w badaniach oddziaływań pomiędzy biolakromolekułami. Identyfikacja aminokwasów odpowiedzialnych za wiązanie z RNA ma również istotne znaczenie przy rozpatrywaniu ewentualnych mutacji, a wykorzystywany przez Autorkę model UBDB-EP/MM jest odpowiednim narzędziem opisu ilościowego. Na podstawie uzyskanych wyników ukazały się dwa artykuły naukowe opublikowane w dwóch dobrych czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym *The Journal of Physical Chemistry B* (2022) oraz *Acta Crystallographica Section C* (2018). Praca dotycząca badania oddziaływań białko IFIT1 – RNA jest na etapie złożenia do czasopisma. Warto również podkreślić, że Pani Urszula Budniak była kierownikiem grantu NCN Preludium 11 pt. „Określenie wpływu modyfikacji 5' końca RNA oraz sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej na energię oddziaływań elektrostatycznych białek IFIT z RNA”. Projekt ten ściśle związany był z tematyką doktoratu.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, przedstawiona przez Panią Urszulę Budniak rozprawa doktorska pt. „Characterization of intermolecular interactions of nucleobases and other nucleic acid components in small molecule crystals and in protein-RNA complexes with the use of the UBDB databank” spełnia wszystkie warunki niezbędne do nadania stopnia naukowego doktora stawiane przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz 595 z późn. zm.) oraz ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (tekst jednolity: Dz.U. 2022 r., poz. 574 z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie Pani Urszuli Budniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.