

**Recenzja**  
**pracy doktorskiej mgra Marcina Augustyniaka**  
**pt.: „Molecular modeling of complexes of PrkC protein kinase with possible endogenous targets of phosphorylation activity”**

Praca doktorska mgra Marcina Augustyniaka została wykonana na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Rajmunda Kaźmierkiewicza prof. UG oraz prof. dr hab. Michała Obuchowskiego. Głównym celem pracy, zdefiniowanym w rozdziale drugim, było zbudowanie modelu molekularnego (komputerowego) bakteryjnej serynowo-treoninowej kinazy białkowej PrkC w kompleksie z jej endogennym substratem, jaką jest cyklicznie permutowana GTPaza CpgA. Praca wykonana została z użyciem metod komputerowego modelowania molekularnego.

Do budowy kompleksu użyto modelowej (przewidzianej) struktury kinazy oraz rozwiązanej metodą dyfrakcji rentgenowskiej struktury CpgA. Modelową strukturę kinazy stanowiła fosforylowana katalityczna wewnątrzkomórkowa domena białka PrkC skompleksowana z ATP (pPAM); ta struktura została wcześniej wymodelowana i jej opis znajduje w dwóch z cytowanych publikacjach (w rozprawie jest tylko drobne, trudne do znalezienia, odniesienie do tego faktu). W strukturze krystalicznej CpgA (kod PDB, 1T9H) brakowało 19-aminokwasowego odcinka łańcucha peptydowego między resztą 186, a 206. Budowany kompleks musiał spełniać warunek odpowiedniej konfiguracji atomów biorących udział w procesie fosforylacji substratu.

Pierwszym krokiem w realizacji celu pracy było przewidzenie przebiegu brakującego w zbiorze pdb fragmentu łańcucha peptydowego CpgA. Po uzupełnieniu brakującego fragmentu struktury, doktorant użył konwencjonalnych metod sztywnego dokowania i klastrowania struktur, by zadokować substrat do domeny katalitycznej kinazy, a następnie przeprowadzić selekcję wygenerowanych struktur, które oceniał w oparciu o opracowaną przez siebie „*objective function, OF*”. Przed rozpoczęciem dokowania, ze struktury pPAM usunięty został katalityczny jon  $Mg^{2+}$  skompleksowany z ATP. Dalszym obliczeniom poddane były wyselekcjonowane kompleksy albo bez jonu  $Mg^{2+}$ , albo z jonem wprowadzonym do tego

samego miejsca, w którego został usunięty. Te kompleksy poddano klasycznej symulacji dynamiki molekularne.

Wskazanymi w badaniach eksperymentalnych miejscami fosforylacji CpgA przez PrkC są Thr166, Thr192 i Ser226, jednakże w procesie dokowania i selekcji, wskazane zostały Ser11, Ser251 oraz Thr205, jako potencjalne miejsca fosforylacji, czyli przewidziane reszty aminokwasowe nie pokrywały się ze wskazanymi eksperymentalnie. Wśród przewidzianych przez program DISPHOS i serwer NetPhos miejsc fosforylacji CpgA jest wskazana eksperymentalnie Ser226, ale brakuje reszt wskazanych w procesie dokowania.

Przeprowadzone 5-ns klasyczne symulacje MD na kompleksach z jodem  $Mg^{2+}$  i bez, nie zagwarantowały liniowego ustawienia odpowiednich atomów ATP, CpgA i PrkC umożliwiającego przeniesienie grupy  $\gamma$ -fosforanowej z ATP na substrat. Wskazały jednak, że obecność  $Mg^{2+}$  jest konieczna dla aktywności enzymatycznej PrkC.

Przyczyną braku korzystnej konfiguracji atomów w symulowanych strukturach mogą być niedoskonałości metodyczne badań, takie jak: (1) zbyt krótkie symulacje MD, co jest łatwe do poprawienia; (2) niepoprawny opis oddziaływań niewiązących. Wyliczając parametry klasycznej symulacji MD (strona 41), doktorant, stwierdza: „*I have used 1 fs step length, 12Å cutoff for nonbonded interactions calculation, and SHAKE algorithm ...*”. Jednakże, badany układ zawierał naładowane reszty aminokwasowe oraz jony – symulacje MD takiego układu, by poprawnie odwzorować oddziaływania niewiązące, wymagają użycia metody Ewalda. W doktoracie nie ma mowy o zastosowaniu sumowaniu Ewalda. Z nazwy modułu oraz użytego modelu wody, można się domyślać, że w przypadku przyspieszonej dynamiki molekularnej została użyta ta metoda, ale też nie jest to w sposób jawny powiedziane. Jeśli rzeczywiście doktorant nie użył metody Ewalda w klasycznej symulacji, to, jak wskazują opisane w literaturze testy, otrzymał układ w stanie częściowo zamrożonym, więc wyniki tej części badań nie są miarodajne.

W pracy brakuje też informacji jak zostały sparametryzowane jony  $Mg^{2+}$ .

W dalszej części pracy doktorant wykorzystał założenie, że kompleksy białkowe tworzą się z cząsteczek w konformacjach występujących w roztworze, niekoniecznie o najniższej energii. Osiągnięcie stanu stabilnego kompleksu może mieć miejsce już po połączeniu się obu cząsteczek białka w następstwie ich zmian konformacyjnych. Stosując przyspieszoną dynamikę molekularną, umożliwiającą przeskanowanie dostępnej przestrzeni konformacyjnej dla cząsteczki białka, doktorant wygenerował bardzo wiele stanów konformacyjnych enzymu i substratu. Dla każdej z cząsteczek, podobne struktury pogrupował w klastry, a następnie, stosując sztywne dokowanie, z wybranych przedstawicieli klastrów utworzył kompleksy.

Kryterium wyboru kompleksów do dalszej analizy było takie samo jak w poprzedniej części pracy, tj. odpowiednia konfiguracja atomów biorących udział w procesie fosforylacji substratu. W sumie otrzymał 979 struktur kompleksu.

W mojej ocenie analiza 979 struktur kompleksu jest absolutnie niepraktycznym przedsięwzięciem. Zastanawiam się, czy użycie innych metod niż symulacja MD nie byłoby efektywniejsze w poszukiwaniu „idealnego” kompleksu. Na przykład, czy nie lepsze byłoby użycie metody symulowanego wyżarzania do optymalizacji wstępnie zbudowanego kompleksu, albo metody wymiany replik (*replica exchange*), która znacznie skuteczniej przeszukuje przestrzeń konformacyjną i daje szansę na znalezienie globalnego minimum układu? Wprawdzie doktorant wspomina w Dyskusji, że symulowane wyżarzanie było w literaturze stosowane do uściślenia struktur kompleksów białkowych, ale odrzuca je, wraz z innymi możliwymi do zastosowania metodami, jako nie-generujące nowych oddziaływań międzycząsteczkowych. Możliwe, że symulowane wyżarzanie nie zmieni wzajemnego ułożenia cząsteczek w kompleksie, ale na pewno umożliwi znalezienie korzystniejszych oddziaływań międzyatomowych przez zmiany wzajemnej geometrii grup.

Ciekawe jest też zagadnienie udziału cząsteczek wody w stabilizacji kompleksu. Rozumiem, że w czasie sztywnego dokowania cząsteczki wody są nieobecne, ale czy w czasie symulacji MD cząsteczki wody nie są w stanie dostać się do powierzchni styku obu białek? Przy zastosowaniu metody wymiany replik, udział wody w stabilizacji kompleksu mógłby być jednoznacznie określony.

Innym nurtującym mnie zagadnieniem jest wskazanie treoniny 205 (Thr205), jako najprawdopodobniejszego miejsca fosforylacji CpgA. Thr205 jest ostatnią „domodelowaną” resztą brakującą w zbiorze pdb fragmentu łańcucha peptydowego CpgA. Czy doktorant nie zauważył „niebezpiecznego związku” między tymi faktami? Zrekonstruowana struktura CpgA była optymalizowana jedynie algorytmami gradientowymi, bez przeprowadzania pełnej walidacji struktury, przynajmniej nie ma o tym wzmianki w pracy, a to nie budzi zaufania. Dziwi też regularna struktura przestrzenna tego fragmentu – raczej należałoby spodziewać się czegoś przeciwnego.

W zasadzie, praca pozostawia niedosyt – upraszczając sprawę, celem doktoratu było zbudowanie takiego kompleksu  $\text{PrkCc} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP} \cdot \text{CpgA}$ , w którym spełniona jest geometria umożliwiająca fosforylację jednej z reszt CpgA przez PrkC. Jednak dopiero faktyczna fosforylacja odpowiedniej reszty CpgA dałaby czytelnikowi pełną satysfakcję. Czy doktorant rozważał zastosowanie hybrydowej metody *quantum mechanics/molecular mechanics* (QM/MD) do przeprowadzenia reakcji fosforylacji? Otrzymałby wtedy bezpośrednie

potwierdzenie poprawności wskazanego miejsca fosforylacji substratu. Nie wiem, czy metodę hybrydową dałoby się zastosować do badanego układu, ale taka możliwość powinna być przedyskutowana w rozprawie.

Sama rozprawa doktorska, pomimo, że jest ciekawie napisana, nie jest łatwa do czytania – doktorant zakłada, że czytający ma porównywalną z nim wiedzę, co nie koniecznie jest prawdą. Przez to, pewne zagadnienia, czy pojęcia nie są klarownie wyjaśnione; szczególnie trudno było mi się zorientować w szczegółach struktury domeny katalitycznej PrkC – raz nazywanej PrkCc, raz pPAM. Niektóre skróty używane w tekście nie są wykazane na liście skrótów, zdania w tekście są zawile i jest w nich trochę literówek. Wspaniałe są natomiast ilustracje – niezwykle starannie wykonane i świetnie dobrane. Niestety, w większości przypadków podpisy pod nimi są niewystraszające.

W oparciu o przedstawioną mi do recenzji rozprawę, oceniam, że doktorant włożył dużo pracy i wysiłku w realizację swojej pracy doktorskiej. Jednak wkład pracy i wysiłek wydają się nieproporcjonalnie duże do otrzymanych rezultatów, co sam doktorant dość pesymistycznie stwierdza w Dyskusji. Do końca nie jest też jasne, jaki jest cel prowadzonych badań – czy wskazanie innych miejsc fosforylacji CpgA niż te wykazane eksperymentalnie, czy też (raczej nieudane) potwierdzenie wyników eksperymentalnych.

Podsumowanie i wniosek końcowy: Rozprawa doktorska ma stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktoranta. W trakcie pracy nad doktoratem, mgr Marcin Augustyniak przeprowadził bardzo wiele obliczeń i analiz, wykorzystał szereg dostępnych programów komputerowych i innych narzędzi obliczeniowych umożliwiających mu rozwiązanie kolejnych szczegółowych problemów badawczych. Opracował też własny algorytm oceny struktur kompleksu, nazwany „*objective function, OF*”, do wyselekcjonowania najbardziej obiecujących struktur kompleksu PrkC-CpgA do ich dalszej analizy. Niewątpliwie, doktorant wykazał dużą biegłość w korzystaniu z warsztatu obliczeniowej biologii strukturalnej, co zasługuje na pochwałę. Jednak sama rozprawa doktorska nie dostarcza rozwiązania konkretnego problemu badawczego, dostarcza natomiast użytecznych informacji umożliwiających kontynuowanie badań i jest pewnym „rozpoznanem przedpola”. Pomimo to uważam, że praca doktorska mgra Marcina Augustyniaka marginalnie spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgra Marcina Augustyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Marek Czerwik*