



Warszawa, 2022-01-26

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Macieja Janickiego pt.: „Identyfikacja potencjalnych inhibitorów fosfatazy białkowej typu 2C grupa A z Arabidopsis z wykorzystaniem metod bioinformatycznych i biochemicznych”

Oceniana rozprawa doktorska wykonana została na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików. Rozprawa ma tradycyjny układ. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, suplement i spis literatury. Uzupełniona została także listą skrótów, spisem treści, wykazem rycin i wykazem tabel. Rozprawa liczy 147 stron i napisana została po polsku. Praca przygotowana została dość starannie ale zawiera drobną liczbę nieścisłości i błędów, z których większość zostanie wymieniona poniżej, w trakcie omawiania poszczególnych części rozprawy.

Praca ma znaczenie zarówno poznawcze jak i może być potencjalnie aplikacyjne, co zostało przekonująco uzasadnione w części wstępnej. Specyficznym celem pracy było zidentyfikowanie inhibitorów fosfatazy ABI1, jednego z enzymów szlaku sygnałowego ABA. Dalekosiężnym celem pracy jest poznanie możliwości wykorzystania drobnocząsteczkowych związków chemicznych do modulacji aktywności szlaku ABA w celu przeciwdziałania negatywnym skutkom stresu na wzrost i wydajność roślin. Badania przeprowadzono w kilku etapach wykorzystując dwa uzupełniające się podejścia badawcze, modelowanie *in silico* w celu wytypowania drobnocząsteczkowych związków potencjalnie zdolnych do inhibicji aktywności fosfatazy ABI1 oraz eksperymentalną weryfikację wpływu wytypowanych inhibitorów na aktywność fosfatazy ABI1 i innych wybranych fosfataz.

Wstęp podzielony został na pięć części, w których doktorant stopniowo wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Pierwszą część wstępu rozpoczyna ogólne omówienie grupy białek zwierzęcych i roślinnych sklasyfikowanych jako fosfatazy białkowe, po czym następuje nieco dokładniejsze omówienie rodziny PP2C, do której należy fosfataza ABI1 a następnie dokładny opis struktury i funkcji tej konkretnej fosfatazy. Zrozumienie struktury i funkcji ABI1 ułatwiają liczne rysunki. W drugiej części wstępu krótko omówiony jest szlak sygnalizacji ABA.

Informacje podane w tej części dopełniają dwa rysunki prezentujące kolejno strukturę chemiczną tego związku oraz schemat szlaku sygnalizacji ABA. Następnie poznajemy molekularne mechanizmy inhibicji fosfatazy ABI1 przez PYL1 – jeden z receptorów ABA oraz detale kompleksów PYL1-ABA, PYL1-ABA-ABI1 oraz ABI1-SnRK2.6, które są ilustrowane za pomocą kolorowych rysunków opracowanych przez doktoranta na bazie dostępnych krystalograficznych struktur białek i kompleksów. W kolejnych częściach omówione są strukturalne analogi ABA oraz znane inhibitory fosfataz białkowych. Fosfatazy uczestniczące w przekazywaniu sygnału ABA w roślinach należą do rodziny A grupy PP2C. Nie są znane żadne silne oraz specyficzne inhibitory fosfataz roślinnych z grupy PP2C a ze względu na różnice w topologii domeny katalitycznej roślinnych i zwierzęcych białek z rodziny PP2C, inhibitory fosfataz zwierzęcych nie blokują aktywności fosfataz roślinnych. Jest to istotna informacja uzasadniająca podjęcie tego tematu przez doktoranta. Układ wstępu jest dobrze przemyślany a podane informacje są wystarczające do zrozumienia głównych założeń i celu pracy. Cytowana literatura jest adekwatna i zawiera zarówno pozycje starsze jak i najnowsze. Rysunki, w tym wszystkie detale modeli strukturalnych, są w większości opracowaniami własnymi doktoranta.

Poniżej przedstawiam kilka uwag krytycznych do wstępu.

- 1) Pierwsze i drugie zdanie wstępu są niespójne i wprowadzają czytelnika w błąd. W pierwszym zdaniu autor pisze o fosforylacji przeprowadzanej przez kinazy białkowe. W drugim o fosfatazach przeprowadzających defosforylację a nie, co wynika z kontekstu, za reakcję fosforylacji białek. To oczywiście niezręczność sformułowania a nie niewiedza doktoranta.
- 2) Brak kilkakrotnie wymienianej w tekście pozycji Marczak i in. 2020 w spisie literatury.
- 3) Zdanie na stronie 22 (linia 5-7 od góry) sugeruje, że ABI1 bezpośrednio kieruje syntazy ACC do degradacji. Wydaje mi się, że jest to zbyt mocno powiedziane i takich dowodów nie ma. Proszę ten problem wyjaśnić w trakcie obrony.
- 4) Rys.16: brak pełnych nazw związków; skróty nie są rozwinięte ani w legendzie do figury ani w tekście; nie ma ich także na liście skrótów
- 5) We wstępie (str. 17) pojawia się skrót RMSD, który nie był wcześniej wyjaśniony. Rozszerzenie skrótu pojawia się poniżej w metodach (str. 55). Zaznaczam także, że ten skrót nie pojawia się w spisie skrótów. Generalnie, spis skrótów jest bardzo niekompletny.

Po wstępie przedstawiony został **cel projektu doktorskiego**. Nie mam zastrzeżeń do tej części. Następna część pracy to **Materiały i metody**, która zawiera bardzo szczegółowy opis narzędzi bioinformatycznych, baz i bibliotek związków chemicznych i ligandów oraz struktur białek. Doktorant szczegółowo opisał szereg metod *in silico*, w tym dokowanie molekularne, które jest kluczową metodą tej pracy, sposób grupowania ligandów oraz symulację dynamiki

molekularnej struktur białko-inhibitor. Ostatnia metoda służy do określenia stabilności tych struktur. Ponieważ nie jestem bioinformatykiem trudno jest mi ocenić poprawność merytoryczną tych opisów. Metody te stosowane były z użyciem istniejących narzędzi bioinformatycznych ale ustawienie odpowiednich parametrów w stosowanych programach (szczegóły podano w Suplemencie), prawidłowe zinterpretowanie wyników analiz oraz ich wizualizacja wymagają profesjonalnej wiedzy i nie mogą być dobrze wykonane bez odpowiedniego przygotowania i zdobycia wystarczającego zasobu wiadomości. Nie znam opisywanych programów i wstrzymuję się od oceny czy przedstawiony opis metodologiczny jest wystarczający do powtórzenia tych badań i ewentualnego zweryfikowania wyników. Zakładam, że prawidłowość użycia narzędzi *in silico* przez autora broni się sama, ponieważ związki wytypowane w trakcie tych analiz zostały potem pozytywnie zweryfikowane *in vitro*, w części biochemicznej. Po opisie metod bioinformatycznych następuje opis metod eksperymentalnych. W moim przekonaniu są to opisy wystarczająco dokładne i podające szczegółowe instrukcje umożliwiające przeprowadzenie omawianych doświadczeń w dowolnym laboratorium.

Do tej części mam tylko drobną uwagę krytyczną. Tytuł Tabeli 3 należałoby zmienić na „Lista plazmidów...” lub „Lista konstruktów plazmidowych...”, ponieważ stosowanie przez autora określenie „wektor” na konstrukty plazmidowe uzyskane na bazie komercyjnie dostępnych wektorów plazmidowych jest mylące i nieprecyzyjne.

Kolejna część to **Wyniki**, które są najbardziej istotną częścią rozprawy doktorskiej. Doktorant przeprowadził trzy serie eksperymentów. W serii pierwszej wykorzystał strukturę krystalograficzną kompleksu ABI1-ABA-PYL1 do wirtualnego przeszukania dwóch bibliotek związków chemicznych w celu wytypowania cząsteczek potencjalnie oddziałujących z resztami aminokwasowymi w białku ABI1 pełniącymi kluczową rolę w wiązaniu receptora ABA (PYL1) czyli kwasem glutaminowym w poz. 142, glicyną w poz. 180 i tryptofanem w poz. 300. Pięć związków mogących wiązać się z tymi aminokwasami zostały wyselekcjonowane metodą dokowania molekularnego. Związki te następnie zweryfikowano *in vitro* pod względem zdolności do hamowania aktywności fosfatazowej rekombinowanego białka ABI1. Badane związki hamowały aktywność fosfatazy w zakresie 10-45%. Nie był to wynik zadowalający. Wobec tego postanowiono powtórzyć procedurę po rozszerzeniu miejsca wiązania przeszukiwanych ligandów w taki sposób, aby uwzględniony był zarówno obszar wiązania receptora PYL1 jak i kinazy SnRK2.6. Proponowaną lokalizację rozszerzonego miejsca wiązania potencjalnych inhibitorów zweryfikowano wstępnie poprzez molekularne dokowanie możliwych substratów reakcji defosforylacji oraz produktu reakcji. Następnie zastosowano kilkuetapową procedurę *in silico* badania przesiewowego związków z baz danych. Kończącym etapem była eliminacja ligandów,

które mogłyby działać jako analogi ABA i które mogłyby wiązać się do receptora ABA a następnie wytypowanie najbardziej obiecujących związków na podstawie analiz porównawczych. Efektem zastosowanej procedury było wytypowanie 12 związków, których potencjał do hamowania aktywności fosfatazy ABI1 został następnie sprawdzony eksperymentalnie w reakcji *in vitro*. Dwa spośród nich hamowały aktywność ABI1 najsilniej, odpowiednio o 95% i 71%. Te dwa związki zostały wybrane do oceny stabilności ich wiązania do ABI1 metodą symulacji dynamiki molekularnej. Na podstawie symulacji zaproponowano, że jeden z ligandów jest stabilny, natomiast druga cząsteczka zmienia orientację w kieszeni katalitycznej białka ABI1 ale pomimo zmiany położenia znajduje się ciągle w obrębie proponowanego miejsca wiązania i dlatego skutecznie e blokować dostęp potencjalnego substratu. W trzecim podejściu do wytypowania *in silico* potencjalnych inhibitorów aktywności fosfatazowej ABI1 użyto kolejnej optymalizacji ich możliwych miejsc wiązania do białka ABI1. Analiza komputerowa pozwoliła na wyodrębnienie w strukturze ABI1 miejsc wiązania pętli z białek PYL1 oraz SnRK2.6. Miejsca te znajdowały się w obrębie kieszeni katalitycznej ale nie były tożsame z miejscem wiązania użytym w poprzednim eksperymencie dokowania molekularnego *in silico*. Wszystkie trzy miejsca użyto do przeszukiwania baz zawierających ligandy, które mogą naśladować oddziaływania białko-białko. Wytypowano 13 spośród wyselekcjonowanych związków do dalszych analiz; ich potencjał do hamowania aktywności fosfatazy ABI1 został sprawdzony w reakcji *in vitro*. Najwyższy zaobserwowany potencjał hamujący wynosił 49-42%. Kolejna metoda bioinformaatyczna, symulacja dynamiki molekularnej wykazała, że dwa najsilniejsze inhibitory tworzą stabilne kompleksy z ABI1.

Następnie podjęto próbę określenia mechanizmu działania najsilniejszych inhibitorów czyli cząsteczek wytypowanych w wyniku drugiego podejścia, hamujących aktywność fosfatazy o 95% i 71%. Wprowadzenie mutacji w resztach aminokwasowych wytypowanych jako kluczowe w wiązaniu analizowanych ligandów skutkowało obniżeniem wrażliwości zmutowanych wariantów białka ABI1 na te inhibitory. Ponadto, przetestowano selektywność obu inhibitorów poprzez sprawdzenie ich potencjału do inhibicji aktywności innych fosfataz białkowych. Zaobserwowano, że silniejszy inhibitor ABI1 hamuje w podobnym stopniu aktywność ABI2 oraz w znacznie mniejszym stopniu fosfatazy z innej grupy niż PP2C typu A. Poziom hamowania aktywności ABI2 przez drugi inhibitor był znacznie niższy, wskazując na jego dużą specyficzność do ABI1.

Problemy dotyczące tej części ocenianej rozprawy:

- 1) Rys. 21: Brak rozszerzenia skrótu BS pokazanego w legendzie graficznej w podpisie do rysunku lub w tekście dotyczącym tej figury. Podobny problem dotyczy także Rys. 25.

- 2) Niezgoda danych dotyczących stopnia hamowania aktywności fosfatazy przez dwa najbardziej aktywne związki pokazanych na Rys. 23 i omówionych na stronie 80. Poza tym, nie podano stężeń badanych związków.
- 3) Przydatność wyników pokazanych na Rys. 30 do wyselekcjonowania 12 związków do dalszych analiz nie została jasno wyjaśniona. Może należałoby zaznaczyć na tym rysunku ich lokalizację w obrębie wykresu.
- 4) Informacje dotyczące potencjalnych inhibitorów wybranych w trakcie trzeciego podejścia in silico są bardzo mało precyzyjne. Nie podano, w wyniku dokowania do którego z trzech miejsc wyselekcjonowane zostały ligandy użyte w teście hamowania aktywności fosfatazowej, którego wyniki pokazano na Rys. 41.

Dyskusja została przeprowadzona umiejętnie, co świadczy o dojrzałości naukowej autora oraz zrozumieniu znaczenia uzyskanych wyników. Dodatkowo, w dyskusji omówiono wyniki z wieloautorskiej publikacji z 2020 r., w której doktorant jest pierwszym autorem. Nie mam krytycznych uwag ani do sposobu przeprowadzenia dyskusji ani do wniosków zamieszczonych po dyskusji.

W podsumowaniu stwierdzam, że **praca spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim** i stanowi nie tylko oryginalne rozwiązanie problemu naukowego ale także cechuje się umiejętnym połączeniem badań in silico i prac eksperymentalnych. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr. inż. Macieja Janickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę fakt umiejętnego połączenia badań bioinformatycznych i biochemicznych w ramach tego doktoratu oraz fakt opublikowania (jako pierwszy autor) dużej części wyników wchodzących w skład rozprawy w dobrym czasopiśmie naukowym, **wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.**

Prof. dr hab. Agnieszka Sirko