

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng
Wydział Fizyki
oraz Centrum Uczenia Maszynowego
Uniwersytet Warszawski
e-mail: Bogdan.Lesyng@fuw.edu.pl

Warszawa, 25.06.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Neurotoxic ligands interactions with insects membrane proteins

w języku polskim

(Oddziaływania neurotoksycznych ligandów z białkami błonowymi owadów)

Autorka rozprawy: Mgr Beata Niklas
Promotorzy rozprawy: Prof. Bruno Lapied (University of Angers, Francja)
Prof. dr hab. Wiesław Nowak (Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu)

Przedmiotem badań rozprawy jest analiza molekularnych oddziaływań pomiędzy wybranymi ligandami neurotoksycznymi a reprezentantami dwóch klas białek: receptorami muskarynowymi oraz kanałami sodowymi bramkowanymi napięciem (różnicą potencjału elektrostatycznego). Należy zwrócić uwagę, że te dwie klasy białek są rozpowszechnione w wielu organizmach żywych. Receptory muskarynowe są receptorami białkowymi sprzężonymi z białkiem G, zaangażowanymi w funkcjonowanie przywspółczulnego układu nerwowego kręgowców, ale występują również u niektórych bezkręgowców, w tym owadów. Receptory muskarynowe reagują np. na acetylocholinę - neuroprzekaźnik, który jest również zaangażowany w odporność na środki owadobójcze. Jeżeli chodzi o receptory muskarynowe u komarów i innych owadów to są one m.in. odpowiedzialne za rozpoznawanie bodźców węchowych.

Natomiast kanały sodowe bramkowane napięciem (*Voltage-Gated Sodium Channels*, VGSC) są niezbędne do generowania i propagacji potencjałów czynnościowych w neuronach. Są również celem kilku klas insektycydów, takich jak DDT (*dichlorodiphenyltrichloroethane*), pyretroidy i insektycydy blokujące kanały sodowe jak SCBI (*Sodium Channel Blocker Insecticide*). Te insektycydy zakłócają normalne funkcjonowanie VGSC albo stabilizując stan otwarty (DDT i pyretroidy), albo blokując pory (SCBI) kanału. VGSC owadów różnią się od VGSC ssaków pod względem struktury, funkcji i wrażliwości na insektycydy.

Komary i inne owady przenoszą szereg groźnych chorób, w tym malarię, dengę czy żółtą febrę a coraz większy zasięg ich występowania w związku ze zmianami klimatycznymi stanowi powiększające się zagrożenie. Niektóre owady niszczą również rolnictwo, co stanowi wyzwanie w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego. Dlatego konieczne jest poznanie molekularnych mechanizmów działania dostępnych neurotoksyn i odporności na nie w celu opracowania nowych metod zwalczania wybranych owadów.

W swoich badaniach Autorka zastosowała metody biofizyki teoretycznej i obliczeniowej, metody bioinformatyczne, a we współpracy z prof. Bruno Lapied'em z University of Angers i dr Mileną Jankowską z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK wykorzystywała również analizę danych elektrofizjologicznych. Wyniki przedstawione są w trzech artykułach zawartych w rozprawie doktorskiej, stanowiących podstawową część rozprawy:

- B. Niklas, B. Lapied and W. Nowak, *In Search of Synergistic Insect Repellents: Modeling of Muscarinic GPCR Interactions with Classical and Bitopic Photoactive Ligands*, *Molecules*, 2022, 27 (10), 3280; IF = 4.93
- B. Niklas, M. Jankowska, D. Gordon, L. Beress, M. Stankiewicz and W. Nowak, *Interactions of Sea Anemone Toxins with Insect Sodium Channel_Insights from Electrophysiology and Molecular Docking Studies*, *Molecules* 2021, 26(5), 1302; IF = 4.93.
- B. Niklas, J. Rydzewski, B. Lapied and W. Nowak, *Toward overcoming pyrethroid resistance in mosquito control: the role of sodium channel blocker insecticides*, *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(12), 10334; IF=6.21 (w pracy doktorskiej praca cytowana jest jako wysłana do druku, ale sprawdziłem że jest już opublikowana <https://doi.org/10.3390/ijms241210334/>)

Z wszystkich oświadczeń współautorów wynika, że mgr Niklas jeżeli chodzi o modelowanie i prace obliczeniowe odgrywała w tych pracach dominującą rolę. Prace poprzedzone są dobrym wstępem przeglądu aktualnego stanu badań oraz opisem stosowanych metod do których należą:

- modelowanie homologiczne sekwencji badanych białek,
- zastosowanie metod mechaniki i dynamiki molekularnej
- molekularny docking ligandów oraz
- symulacje profili energii swobodnej z wykorzystaniem metod wzmocnionego próbkowania rzadkich molekularnych zdarzeń.

Przechodząc do analizy uzyskanych przez Autorkę rozprawy wyników należy zwrócić uwagę, że w publikacji #1 wykorzystując komputerowe symulacje dokowania i dynamiki molekularnej

w skali setek nanosekund, opisała allosteryczne szlaki propagacji sygnału strukturalnego w receptorze muskarynowym. Wiązanie liganda indukuje allosteryczną ścieżkę zmian konformacyjnych. Zbudowane w ramach tych badań modele białek owadzych, a także model błony komórkowej, w której są one zakotwiczone, umożliwiły zbadanie różnic w działaniu ligandów na receptory ludzkie i owadzie, co ma kluczowe znaczenie przy projektowaniu selektywnych inhibitorów.

W publikacji #2 porównała wiązanie czterech toksyn peptydowych z ukwiałów do bramkowanego napięciem kanału sodowego karalucha *Periplaneta americana*. Wyniki modelowania molekularnego są zgodne z eksperymentami elektrofizjologicznymi. Lepsze zrozumienie procesu szybkiej inaktywacji i jego hamowania przez neurotoksyny może potencjalnie przyczynić się do opracowania selektywnych insektycydów, a także np. nowych leków przeciwbólowych. Ponadto w oparciu o analizę ścieżek dysocjacji insektycydu DCJW (N-decarbomethoxyllated JW062) blokującego kanał sodowy, zidentyfikowała jego drogę wejścia do wnętrza kanału komara.

W publikacji #3 wyjaśniła również rolę mutacji powodującej oporność na tę klasę neurotoksyn. Najczęściej stosowane insektycydy tracą skuteczność ze względu na rosnącą oporność patogennych owadów. Kanały sodowe VGSC i białka błonowe odpowiedzialne za fazę depolaryzacji potencjału czynnościowego, są celem wielu neurotoksyn, w tym pyretroidów i insektycydów SCBI (*Sodium Channel Blocker Insecticide*) blokujących kanały sodowe. Zmniejszona czułość białka docelowego z powodu mutacji punktowych zagraża zwalczaniu malarii za pomocą pyretroidów. Chociaż SCBIsy takie jak indoksakarb i metaflumizon są stosowane w rolnictwie, okazują się być również obiecującymi kandydatami do zwalczania komarów. Dlatego pilnie potrzebne jest dogłębne zrozumienie molekularnych mechanizmów działania SCBIsów, aby przełamać oporność i zatrzymać przenoszenie chorób. Wykonując złożone symulacje MD stwierdziła, że mutacja F1852T (fenyloalanina 1852 treonina) ma kluczowe znaczenie w ograniczaniu dostępu SCBIsów do ich miejsca wiązania. Wyniki wyjaśniają rolę tej mutacji występującej u odpornych owadów oraz zwiększoną toksyczność DCJW w porównaniu np. z jego większym związkiem macierzystym, indoksakarbem. Wskazała również reszty aminokwasowe które przyczyniają się zarówno do wiązania zarówno SCBI, jak i nieestrowego piretroidu etofenproksu, a zatem mogą być zaangażowane w oporność krzyżową miejsca docelowego.

Bardzo wysoko oceniam jakość i ważność uzyskanych przez Autorkę rozprawy wyników. Niemniej mam kilka krytycznych uwag. W szczególności w podpisie do rysunku nr 1 publikacji #1 czytamy: „(c) Structures of classical M1 agonists – acetylcholine, atropine, BQCA modulator and DEET and IR3535 repellents.” Na obrazku nie ma atropiny jest natomiast muskaryna. Struktury atropiny i muskaryny są bardzo różne. Sądzę, że w podpisie

powinna pojawić się muskaryna. Pewien niedosyt budzi też brak szczegółowych informacji na temat procedur parametryzacji potencjałów oddziaływania badanych ligandów, jak również jaką metodę zastosowano do określenia stanów protonacji reszt aminokwasowych badanych białek, np. wirtualnego miareczkowania - co może mieć istotne znaczenie dla jakości wyników szczególnie dlatego, że niektóre z ligandów występują w postaci kationów. Zakładam, że doświadczeni promotorzy właściwie zadbali o „*quality control*” wyników symulacji.

Podsumowując, zarówno rozprawa jak i dorobek publikacyjny dowodzą, że mgr Beata Niklas ma dobrą ogólną wiedzę w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, i potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe w wykorzystaniem metod biofizyki molekularnej i obliczeniowej. Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Beaty Niklas stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie nauk fizycznych. Recenzowane dzieło spełnia ustawowe (tj. ustawa – ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami)) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr Beaty Niklas do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.

Niezależnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy. Wyniki zastały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach. Na szczególną pochwałę zasługują te elementy badań które wyjaśniają rolę mutacji powodujących oporność na badaną klasę neurotoksyn. Najczęściej stosowane insektycydy tracą bowiem skuteczność ze względu na rosnącą odporność chorobotwórczych owadów i wiedza na ten temat jest niezbędna dla prowadzenia dalszych, racjonalnych badań nad nową generacją neurotoksyn, które jednocześnie nie będą szkodliwe dla innych organizmów, w tym ssaków i ludzi.



Prof. dr hab. Bogdan Lesyng