

Review on the PhD manuscript of Marta Kulik.

4th January 2016.

Christian Jelsch

Directeur de Recherches CNRS

CRM2 Université de Lorraine - Faculté des Sciences et Technologies

Laboratoire Cristallographie Résonance Magnétique et Modélisations

BP 70239 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex France

Title of the manuscript.

Interactions of aminoglycoside antibiotics with ribosomal RNA and riboswitches

Aminoglycosides are a well-known class of antibiotics, commonly used against serious Gram-negative bacterial infections. The PhD thesis presents several molecular dynamics simulations on three aminoglycoside-binding RNA structures: A-site, Helix 69 and N1 riboswitch. The first two occur naturally in bacteria. The synthetic riboswitch N1, by binding different aminoglycosides allows controlling the expression of genes, for example in yeast.

The A-site, is located in the small ribosomal subunit and plays a major role in the decoding process, in which the information from messenger RNA is analyzed and a correct transfer RNA, carrying amino acids, is incorporated.

Helix 69 is a part of the bridge joining small and large subunits of the ribosome. Aminoglycosides attached at this site interfere with the association process of the ribosomal subunits.

Antibiotics loose efficiency due to mutations resulting in bacterial resistance. New modifications for more potent aminoglycosides are proposed within the study.

The first introduction chapter is a bibliographical review on ribosome and aminoglycosides.

The second chapter describes and explains the computational and experimental tools employed: molecular simulation, Uv-VIS spectroscopy, Circular dichroism and calorimetry.

The third, fourth and fifth chapters reports the simulation and experimental results on the bacterial ribosomal A-site, Helix 69 and on the aminoglycoside riboswitch, respectively.

The sixth chapter give a final conclusion and perspective on the studies.

Additional information includes some tables of results, figures and bibliographic references.

General remark. In the bibliographic introduction part, a review of the different ribosome structures would have been pertinent. Ribosome structures are of *Haloarcula marismortui* (Steitz group), of *Staphylococcus aureus* (Yusupov, Yonath) of *Saccharomyces cerevisiae* (Yusupov), *Thermus*

thermophilus (Yusupov), *Deinococcus radiodurans* (Yonath), eukaryotic parasite *Leishmania* (Yonath), mammalian *Oryctolagus cuniculus* (Ramakrishna), *Kluyveromyces lactis* (Ramakrishna) etc...

The general review of aminoglycosides antibiotics targeting ribosomes and on resistance issues could have been longer and more exhaustive in the manuscript.

Page 6, L18. "Aminoglycosides also exhibit bactericidal properties, whereas many other antibacterial agents are limited to bacteriostatic action only."

Remark: the widely used Beta-lactam compounds are considered as bactericidal as the peptidoglycan membrane is altered.

Page 8, L9. "The only exception to this rule is the 3-amino group (group attached to carbon atom number 3, according to the numbering scheme given in Figure 1.1) in the 2-DOS ring whose pKa in amikacin and aminoglycosides from neomycin family is 6.7 (28) and 5.7 (29), respectively.

Question: why is the pKa smaller for the NH_3^+ group at that position and in these molecules ?

Page 11, Figure 1.4. Question: What is the structural folding of PNA oligomers? (single and double strand ?).

Page 23, L7. "is currently a intensively exploited" : typographic error in this sentence.

Page 34. The replica exchange molecular dynamics (REMD) method is not explained enough.

Page 50, L1. "Thus, the green kanamycin is the one bound non-specifically."

Question: Explain what makes the difference between specific and non-specific binding ?

Is there a different behavior observed in molecular dynamics?

Page 59, Figure 3.8. The scatterplots show interesting correlations between several descriptors and free energy of binding.

Page 60, L3. "Aminoglycoside binding to RNA is salt and pH-dependent, so any comparison needs to be treated with caution as we are not able to reproduce these effects in the computational study. " Can't salt be reproduced in simulation, by explicit inclusion of ions in the solvent or by altering the dielectric value ?

Page 61, Table 3.5. The Table would be more illustrative if some data were also shown as a scatterplot, for example E_{elec} vs MIC (log-scale).

Page 61 line N-13. "the electrostatic energy is very low" for negative numbers, "low" may not be the most appropriate adjective. Does low here mean, strongly negative, large in magnitude ?

Page 61, line N-12. "The exceptions here are kanamycin and neamine, which MICs are very small, but the interaction energies are less negative".

In Table 3.5 AKN but not neamine seems to be an exception.

Page 65, Fig. 3.11. There are many similar colors. Graphic need to be improved.

Page 66. Line N-14 "Most of them is." Typographic error.

Page 70. Modified aminoglycosides are suggested to have a better binding (Fig. 3.14).

Is there an on-going collaboration with a medicinal chemistry group to synthesize the proposed compounds.

Page 74. Line N-17 " that have a higher overall electrostatic energy"

Replace "have" by "has"

Page 108. Line N-7. Results are presented in Figure A12. The figure number is not in accordance with figure numbering in the manuscript.

Page 108. MD and REMD simulations in Fig. 5.5. What is the time scale of the MD and REMD simulations. How many replicas of simulations are performed in REMD ?

Page 111. Line 2. "in 311K" : replace by "at 311K".

Page 123. Line N-4. "the new NMR structures of the N1 riboswitch complexed with paromomycin and ribostamycin were recently published."

Are the simulations in accordance with the experimental structures ?

The Solution NMR-structure of the neomycin sensing riboswitch RNA bound to paromomycin (pdb code 2mxs, RNA, 2015) shows that there is only one ammonium group out of five forming a salt bridge with phosphate oxygen atoms. How many salt bridges are there observed for the different complexes as a function of number of ammonium groups ?

Page 127. Line 9. The bacteria with mutation U1406A/C tend to show higher relative resistance to aminoglycosides with higher interaction energies.

Is this sentence correct ? Wouldn't higher interaction energy mean more affinity and higher antimicrobial activity for the aminoglycosides ?

Page 127. Line 11. The cell-penetrating peptide slightly decreases its binding potency towards the target. Have smaller peptides than (KFF)3K the ability to increase cell penetration ?

General question : does the molecular dynamics simulation reproduce well the multiple structures retrieved by NMR ? (same rmsd for atoms ?)

The PhD student has four accepted publications and one submitted and one in preparation. She gave six oral presentations and has participated in 20 conferences or microsytosia with many poster presentations. The quality of the research and the quantity of results obtained are both very good.

The manuscript is, in general, written with great care, with good illustrations and is scientifically sound, rigorous, with a small amount of errors and easy to understand. Therefore the manuscript demonstrates that Marta Kulik has surely achieved valuable research work and results of good quality to be qualified to defend her PhD thesis.

Date : 04th January 2016.

Dr. Christian Jelsch

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jelsch', with a long horizontal line underneath it.

Recenzja rozprawy doktorskiej Marty Kulik.

4 stycznia 2016.

Christian Jelsch

Directeur de Recherches CNRS

CRM2 Université de Lorraine - Faculté des Sciences et Technologies

Laboratoire Cristallographie Résonance Magnétique et Modélisations

BP 70239 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex France

Tytuł rozprawy.

Interactions of aminoglycoside antibiotics with ribosomal RNA and riboswitches

Aminoglikozydy są dobrze znaną klasą antybiotyków, powszechnie używanych przeciwko poważnym infekcjom bakteriami Gram-ujemnymi. Praca doktorska prezentuje szereg symulacji dynamiki molekularnej trzech struktur RNA, wiążących aminoglikozydy: miejsca A, Helisy 69 i ryboprzełącznika N1. Pierwsze dwie struktury występują naturalnie u bakterii. Syntetyczny ryboprzełącznik N1, poprzez wiązanie różnych aminoglikozydów, pozwala na kontrolowanie ekspresji genów, na przykład u drożdży.

Miejsce A jest zlokalizowane w małej podjednostce rybosomu i odgrywa ważną rolę w procesie dekodowania, w którym analizowana jest informacja z matrycowego RNA i właściwe transferowe RNA, niosące aminokwasy, jest wbudowywane.

Helisa 69 jest częścią mostka łączącego małą i dużą podjednostkę rybosomu. Aminoglikozydy, przyłączone w tym miejscu, zakłócają proces asocjacji podjednostek rybosomu.

Antybiotyki tracą swoją skuteczność wskutek mutacji powodujących oporność bakteryjną. W wyniku badań zaproponowano nowe modyfikacje aminoglikozydów w celu poprawy ich powinowactwa.

Pierwszy rozdział zawierający wstęp jest bibliograficznym opisem rybosomu i aminoglikozydów.

W drugim rozdziale opisane są i wyjaśnione wykorzystywane obliczeniowe i doświadczalne narzędzia: symulacje molekularne, spektroskopia Uv-VIS, dichroizm kołowy i kalorymetria.

W trzecim, czwartym i piątym rozdziale omówione są wyniki obliczeń i doświadczeń kolejno na bakteryjnym rybosomowym miejscu A, Helisie 69 i aminoglikozydowym ryboprzełączniku.

Szósty rozdział zawiera podsumowanie oraz perspektywy badań.

Dodatkowe informacje obejmują kilka tabel z wynikami, rysunkami oraz odnośniki bibliograficzne.

Uwaga ogólna. We wstępnej części pracy, przegląd różnych struktur rybosomu byłby na miejscu. Struktury rybosomu otrzymano dla *Haloarcula marismortui* (grupa Steitz'a), *Staphylococcus aureus* (Yusupov, Yonath), *Saccharomyces cerevisiae* (Yusupov), *Thermus thermophilus* (Yusupov),

Deinococcus radiodurans (Yonath), eukariotycznego pasożyta *Leishmania* (Yonath), ssaka *Oryctolagus cuniculus* (Ramakrishna), *Kluyveromyces lactis* (Ramakrishna) itd...

Ogólny przegląd antybiotyków aminoglikozydowych celujących w rybosom i na temat oporności w manuskrypcie mógłby być dłuższy i bardziej wyczerpujący.

Strona 6. L18. "Aminoglikozydy także wykazują właściwości bakteriobójcze, podczas gdy wiele innych środków antibakteryjnych ogranicza się do działania bakteriostatycznego."

Uwaga: szeroko stosowane związki Beta-laktamowe są uważane za bakteriobójcze, ze względu na to, że naruszają ścianę peptydoglikanową.

Strona 8. L9. "Jedynym wyjątkiem od tej reguły jest grupa 3-aminowa (grupa połączona z atomem węgla numer 3, zgodnie ze schematem numerowania podanym na Rysunku 1.1) w pierścieniu 2-DOS, której pKa dla amikacyny i aminoglikozydów z rodziny neomycyny wynosi odpowiednio 6.7 (28) i 5.7 (29)."

Pytanie: dlaczego pKa dla grupy NH_3^+ w tej pozycji jest mniejsze dla podanych cząsteczek?

Strona 11, Rysunek 1.4. Pytanie: Jak wygląda strukturalne związanie się oligomerów PNA? (pojedynczych i podwójnych nici?)

Strona 23, L7. "is currently a intensively exploited" : błąd typograficzny.

Strona 34. Metoda dynamiki molekularnej z wymianą replik (REMD) nie jest dostatecznie wyjaśniona.

Strona 50. L1. "Zatem, zielona kanamycyna jest tą, związaną niespecyficznie."

Pytanie: Wyjaśnij, na czym polega różnica pomiędzy specyficznym i niespecyficznym wiązaniem? Czy jest różnica w zachowaniu, obserwowana w dynamice molekularnej?

Strona 59, Rysunek 3.8. Wykresy punktowe pokazują interesujące korelacje pomiędzy kilkoma deskryptorami a energią swobodną wiązania.

Strona 60, L3. "Wiązanie aminoglikozydów do RNA jest zależne od soli i odczynu pH, zatem każde porównanie musi być traktowane ostrożnie, ponieważ nie jesteśmy w stanie odtworzyć tych warunków w obliczeniach." Czy sól nie może być odtworzona w symulacjach za pomocą umieszczenia jonów w rozpuszczalniku lub zmieniania stałej dielektrycznej?

Strona 61, Tabela 3.5. Tabela byłaby bardziej czytelna, gdyby niektóre dane również pokazano jako wykres punktowy, na przykład E_{elec} vs MIC (w skali logarytmicznej).

Strona 61 linia N-13. "energia elektrostatyczna jest bardzo niska" dla liczb ujemnych, "niska" może nie być najodpowiedniejszym przymiotnikiem. Czy niska tutaj oznacza bardzo ujemną, o dużej wielkości?

Strona 61, linia N-12. "Wyjątkami tutaj są kanamycyna i neamina, których MIC są bardzo małe, ale energie oddziaływania mniej negatywne".

W Tabeli 3.5 AKN ale nie neamina wygląda na wyjątek.

Strona 65, Rys. 3.11. Jest wiele podobnych kolorów. Rysunek powinien być poprawiony.

Strona 66. Linia N-14 "Most of them is." Błąd typograficzny.

Strona 70. Sugeruje się, że modyfikowane aminoglikozydy lepiej się wiążą (Rys. 3.14).

Czy jest obecnie zawiązana współpraca z grupą chemii medycznej, aby zsyntetyzować zaproponowane związki.

Strona 74. Linia N-17 " that have a higher overall electrostatic energy"

Zastąpić "have" słowem "has"

Strona 108. Linia N-7. Wyniki są przedstawione na Rysunku A12. Numer rysunku nie zgadza się z numeracją w manuskrypcie.

Strona 108. Symulacje MD i REMD na Rys. 5.5. Jaka jest skala czasowa symulacji MD i REMD. Ile kopii systemu zastosowano w REMD?

Strona 111. Linia 2. "in 311K" : zastąpić "at 311K".

Strona 123. Linia N-4. "nowe struktury NMR rybobprzełącznika w kompleksach z paromomycyną i rybostamycyną, zostały niedawno opublikowane." Czy symulacje są zgodne ze strukturami doświadczalnymi?

Struktura NMR w fazie ciekłej rybobprzełącznika reagującego na neomycynę, związanego z paromomycyną (kod pdb 2mxx, RNA, 2015) pokazuje, że tylko jedna grupa aminowa spośród pięciu tworzy mostek solny z tlenami z grupy fosforanowej. Ile mostków solnych jest obserwowanych w różnych kompleksach, jako funkcja liczby grup aminowych?

Strona 127. Linia 9. Bakterie z mutacją U1406A/C pokazują wyższą względną oporność na aminoglikozydy wraz z wyższymi energiami oddziaływania.

Czy to zdanie jest poprawne? Czy wyższe energie oddziaływania nie oznaczałyby wyższego powinowactwa i wyższej aktywności antybakteryjnej dla aminoglikozydów?

Strona 127. Linia 11. Peptyd penetrujący komórki lekko obniża sprawność wiązania do celu. Czy peptydy mniejsze niż (KFF)3K posiadają zdolność do zwiększania wnikania do komórek?

Pytanie ogólne: czy symulacje dynamiki molekularnej są w stanie dobrze odtworzyć struktury otrzymane w NMR? (takie same rmsd dla atomów?)

Doktorantka ma cztery zaakceptowane publikacje, jedną wysłaną i jedną w przygotowaniu. Zaprezentowała sześć prezentacji ustnych i uczestniczyła w 20 konferencjach lub mikrosymposiumach z wieloma prezentacjami posterów. Zarówno jakość badań jak i ilość otrzymanych wyników są bardzo dobre.

Rozprawa jest, w ogólności, napisana z wielką dbałością, zawiera dobre ilustracje, brzmi naukowo, jest wnikliwa, z małą ilością błędów i jest łatwa do zrozumienia. Z tego względu, rozprawa pokazuje, że Marta Kulik z pewnością wykonała cenną pracę badawczą i uzyskała dobrej jakości wyniki, które pozwalają jej na obronę pracy doktorskiej.