



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Chemii

Prof. dr hab. Maciej Kubicki

Poznań, 11 lipca 2019

Zakład Krystalografii

Wydział Chemii UAM

Recenzja

rozprawy doktorskiej przedstawionej przez p. mgr Annę Marię Goral

Pani mgr Anna Maria Goral przedstawiła Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego rozprawę doktorską, wykonaną pod kierunkiem profesorów Krzysztofa Woźniaka i Janusza Bujnickiego, zatytułowaną *Zastosowanie banku asferycznych pseudoatomów w badaniach oddziaływań elektrostatycznych palców cynkowych z DNA*.

Praca jest klasyczną dysertacją, zbudowaną w tradycyjny sposób. Po określeniu celu projektu i wykazie stosowanych skrótów następuje „Wprowadzenie”, które w istocie wprowadza w tematykę badań oraz pokazuje znaczenie podjętych w ramach tej pracy wysiłków. Dalej Autorka w kompetentny sposób przedstawia metodologię i podstawy teoretyczne konstrukcji i zastosowania Banku Pseudoatomów Uniwersytetu w Buffalo (UBDB; coraz bardziej zasadny zdaje się postulat zmiany nazwy na UB&WDB), a także podstawy stosowanej statystyki. Wszystko to razem zajmuje 40 stron, a kolejne 50 poświęconych jest clou pracy, czyli wynikom i ich analizie, po czym następuje interesujący (może trochę związany z obecnymi zainteresowaniami Pani Goral?) rozdział zatytułowany „Potencjał do zastosowania w praktyce”, wreszcie „Zakończenie”, dobrze skonstruowana bibliografia i 5 załączników (nowe typy atomowe, analiza topologiczna

związku modelowego, pełna tabela energii oddziaływania elektrostatycznego dla związku modelowego, lista unikalnych kombinacji kluczowych reszt aminokwasowych i zasad nukleotydowych, przeanalizowanych w rozprawie i opis skryptów używanych do obliczeń).

Pani Goral definiuje cel swojej pracy jako „próbę ilościowego opisu oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy DNA a (...) palcami cynkowymi”. W tym celu chciała, po pierwsze, potwierdzić opisany model oddziaływań, a po wtóre zbadać, czy energia oddziaływania elektrostatycznego obliczona dla takiego modelu umożliwia przewidywanie rozpoznawanej przez białko sekwencji DNA. Do obliczeń p. Goral postanowiła użyć wspomnianego wyżej modelu asferycznych pseudoatomów, a to w celu stosowania modelu dokładniejszego od opartego na ładunkach punktowych.

Pomijając pewną niezręczność sformułowania (bo czym właściwie jest „ilościowy opis oddziaływań”?), cel wydaje się ambitny i osiągalny zarazem, i obydwie te aspekty p. Goral wykorzystała.

Próby precyzyjnej modyfikacji genomu są coraz ważniejsze w zastosowaniach terapeutycznych. Coś, co niedawno jeszcze zdawało się rodzajem science fiction – manipulacja na poziomie pojedynczych zmian w kodzie genetycznym – dzięki rozwojowi technologii staje się niemal codziennym narzędziem w laboratoriach biologii molekularnej. Z trzech najczęściej stosowanych metod: TALEN, CRISPR i ZF, Autorka wybrała do szczegółowego zbadania tę ostatnią, zresztą bardzo zgrabnie przedstawiając jej niewątpliwe zalety. W tej części p. Goral udanie łączy pewną popularność wykładu ze szczegółowymi danymi dotyczącymi wybranej metody. Co prawda nie znalazłem informacji dlaczego palce są cynkowe (to znaczy, po co tam ten cynk musi być i czy naprawdę musi), ale czyta się to z przyjemnością. W tej części pojawia się też bardzo pomysłowy sposób numeracji oddziaływań i konstrukcji prezentacji wyników.

Część metodologiczna składa się z trzech oddzielnych fragmentów. Pierwszy z nich opisuje konstrukcję Banku Pseudoatomów Uniwersytetu w Buffalo (UBDB). Wydaje się, że obecnie nikt na świecie nie wie więcej o tej bazie danych niż grupa warszawska, nic więc dziwnego, że część ta jest napisana bardzo kompetentnie. Niemniej nasunęło mi się kilka pytań do Autorki:

1. Autorka kilka razy pisze o modelu „ciągłego” rozkładu gęstości elektronowej: co przez to rozumie? Czy precyzyjny matematyczny termin, czy pojęcie bardziej intuicyjne?
2. Co dokładnie oznacza „znormalizowanie harmonik sferycznych do gęstości elektronowej”?
3. Pojawia się termin „otoczenia topologicznego innych atomów”. Znowu: czy jest to nawiązanie do działu matematyki, czy też nieco rozmyte pojęcie oznaczające kształt? Mówiąc prościej: czy słowo „topologiczne” jest tu potrzebne?
4. Skąd się biorą tensory oddziaływania (str. 31)?

Dalej Autorka prezentuje struktury, które wybrała do analizy. Nie znalazłem niestety jasno sformułowanych kryteriów wyboru: w jaki sposób wybrano strukturę wiodącą, jak powstała Kontrola Pozytywna? Sugestie dotyczące tego wyboru pojawiają się później w pracy, ale chyba dobrze byłoby umieścić kryteria właśnie tutaj.

Na końcu prezentowane są używane w pracy statystyki opisowe. Wydaje się, że pojęcie średniej arytmetycznej jako „miejsca największej koncentracji wyników” nie jest w pełni poprawne, wyobraźmy sobie na przykład serię wyników 2, 4, 2, 4, 2, 4, 2, 4. Pojawiają się też dwa pojęcia odchylenia standardowego, z których wybrany został jeden – dlaczego właśnie ten (dla populacji)?

Jeszcze RMSD – brakuje mi informacji, w jaki sposób nakładane są na siebie cząsteczki, to znaczy, jakie współrzędne są używane we wzorze.

Wyniki rozpoczyna opis rozbudowy bazy UBDB o nowe typy atomowe. Poszerza to możliwości stosowania tej bazy i jest ważnym osiągnięciem metodologicznym, sześć nowych typów atomów zostało w kompetentny sposób zdefiniowanych i dodanych do bazy. Widać tu staranność Autorki – testuje np. różne możliwości atomowych czynników strukturalnych i porównuje wyniki z referencyjną funkcją falową. Różnice nie są specjalnie duże, ale Autorka przekonująco uzasadniła swój wybór.

Wątpliwości wzbudza we mnie wyjaśnienie rozbieżności między obserwowanymi i obliczonymi wartościami kątów S-Zn-S (w PDB 112(12)°, w strukturach uzyskanych

w wyniku obliczeń kwantowomechanicznych ok. 135°). Po pierwsze – odchylenie standardowe dla struktur z PDB jest tak duże, że w zasadzie każda wartość obliczona będzie się mieściła w przedziale ± 3 sigma. Podobne zresztą wyniki dostaje się w wyniku analizy bazy struktur małych cząsteczek, CSD. Znalazłem około 20 struktur z atomem Zn skoordynowanym do dwóch atomów azotu i dwóch atomów siarki pomiędzy którymi nie ma połączenia: wartości rzeczonego kąta znajdują się w przedziale $105 - 130^\circ$ i trudno znaleźć korelację między obecnością/brakiem kontaktu $H \cdots S$ a wartością kąta S-Zn-S. Może więc ten parametr jest tak „miękki”, że najrozmaitsze oddziaływania w sieci kryształu mogą w tak znaczący sposób wpływać na jego wartość?

Kolejne rozdziały stanowią opis głównych osiągnięć pracy, mianowicie obliczenia energii elektrostatycznych oddziaływań pomiędzy domenami palców cynkowych a rozpoznawanymi przez nie sekwencjami DNA.

Najpierw Autorka zoptymalizowała metodę obliczania energii oddziaływania elektrostatycznego przez wzięcie pod uwagę dominującego wpływu oddziaływań z ujemnie naładowanymi fosforanami, a to poprzez użycie do obliczeń jedynie zasad nukleotydowych. Pozwoliło to na zauważenie niewielkich efektów, a także na pomysłowe określenie przedziału „szumu”, energii oddziaływań niespecyficznych.

Podkreślenia wymaga bardzo jasna i przemyślana forma prezentacji wyników, zarówno tabele jak i systematyka oddziaływań bardzo pomagają w analizie sporej ilości danych. Autorka szczegółowo analizuje kanoniczne oddziaływania kluczowych reszt aminokwasowych

i rozpoznawanych przez nie zasad nukleinowych, opisując po kolei każde z czterech takich oddziaływań. Na koniec podobnie rozpatruje najważniejsze oddziaływania niekanoniczne.

Mój niepokój wzbudzają zerowe wartości odchyłeń standardowych (np. s. 83: -3 i -21 kcal mol, średnia -12(0))?

W podsumowaniu Autorka zbiera najważniejsze swoje wyniki, postulując także możliwości aplikacyjne metody. Gdyby rzeczywiście udało się usprawnić proces projektowania specyficznych nukleaz palców cynkowych rozpoznających zadaną sekwencję DNA, postęp w stosowaniu tej metody byłby olbrzymi, bo obniżyłyby się

dramatycznie koszty badań. Bardzo podoba mi się ten rozdział, zatytułowany „Potencjał do zastosowania w praktyce”, bo p. Goral wychodzi poza rytualne wzmiankowanie dużych możliwości aplikacyjnych, ale wskazuje drogę i środki potrzebne do ewentualnych zastosowań.

W bardzo udanym *Zakończeniu* w sposób zwięzły i konkretny na czterech stronach znajdujemy najważniejsze wyniki pracy, podzielone na kolejne etapy. Jest to dobrze napisane

i może być inspirujące do dalszych badań. Ponieważ Autorka w tej części jasno i precyzyjnie opisała najważniejsze wyniki swoich badań, czuję się zwolniony z powtarzania tego, bo albo napisałbym gorzej, albo musiałbym przepisać sformułowania p. Goral.

Niestety muszę także dodać – z tak zwanego recenzenckiego obowiązku – że ostateczna redakcja pracy jest dość kiepska. Sporo jest błędów składniowych, literówek, pojawia się żargon – wszystko wygląda trochę tak, jakby Autorka spieszyła się, żeby pracę oddać.

Dalece niekompletna lista poniżej:

- s. 16, l. 9d – duża zamiast duża
- s. 23, podpis pod rys. – tlenu zamiast tlen
- s. 35, przedostatnie zdanie
- s. 38 l. 11d, – „we wzajemnych położeniu”, l. 7d – „teoninowej”,
- s. 44 l. 2 – „uproszczonym model”,
- s. 49 l. 1. „w kompleksach palce cynkowe z DNA”
- s. 50 l. 6 „ujemny ładunek okazał się tak silny”
- s. 51 – „tetraedrycznie skoordynowany cynk”
- s. 54 – „reszt rgininowych”
- s. 55 – „utwierdziło mnie w poprawności...”
- s. 56 – „wpływa zmienności”

i tak dalej. To są drobiazgi, to prawda, ale trochę zakłócają przyjemność lektury dobrze napisanej pracy. Nie podoba mi się też stosowanie skrótu „i wsp.” W pracach dwuautorskich (Hansen i wsp., Kohn i wsp., itd.)

Nie umniejsza to w sposób znaczący jakości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Autorka potrafiła połączyć metody krystalografii może już kwantowej z biologią molekularną i w efekcie uzyskała nietrywialne wyniki, na dodatek mogące wpłynąć na poprawę jakości naszego życia (albo naszych dzieci). Praca jest przemyślana od początku do końca, co jest jeszcze ważniejsze w kontekście podziękowań dla Promotorów - gratulacje dla obu Panów! - „za umożliwienie mi swobodnych poszukiwań tematu badawczego” (niestety, w pracy jest „tematu badawczemu” ☹...), konsekwentnie zrealizowana, wyniki są starannie przeanalizowane i zwizualizowane.

Na koniec jeszcze o jednej rzeczy, która mnie ujęła: to „kolor jagodowy”, używany do odniesień do rysunków, tabel i wzorów.

Podsumowując:

Na podstawie szczegółowej analizy rozprawy zatytułowanej „Zastosowanie banku asferycznych pseudoatomów w badaniach oddziaływań elektrostatycznych palców cynkowych z DNA” stwierdzam, że rozprawa ta spełnia bez zastrzeżeń wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Wnoszę tym samym o dopuszczenie Pani mgr Anny Marii Goral do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Kucharska