



Warszawa, dn. 18.08.2019

Prof. dr hab. Sławomir Filipek,
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski,
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
Tel. 22-55-26405,
E-mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Anny Marii Goral, pt.

Zastosowanie banku asferycznych pseudoatomów w badaniach oddziaływań elektrostatycznych palców cynkowych z DNA

Rozprawa jest napisana w języku polskim i liczy 125 stron razem z załącznikami. Obejmuje 101 odnośników literaturowych, z czego 1/3 z ostatnich 10 lat co wskazuje na dobre rozeznanie w najnowszych publikacjach z wybranego zakresu badawczego. Autorka jest współautorką 5-ciu publikacji naukowych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym ale niniejsza rozprawa nie jest oparta na żadnej z nich. Rozprawa zawiera nowe dane naukowe, które być może zostaną opublikowane. Rozprawa jest skomponowana według klasycznego schematu rozprawy doktorskiej z podziałem na Wstęp, Metody, Wyniki i Dyskusję. Dodany jest jeszcze czwarty rozdział: Potencjał do zastosowania w praktyce. Celem niniejszej rozprawy było przedstawienie ilościowego opisu oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy DNA a domenami palców cynkowych z białek rozpoznających sekwencję DNA, dlatego we Wstępie Autorka opisuje różnorodne białka służące do tego celu a wykorzystywane obecnie do edycji genomu. W szczególności opisywane są nukleazy z motywem palców cynkowych z rodziny Cys2His2, w których ligandami jonu cynku są dwie cysteiny i dwie histydyny. Opisany jest także szczegółowo model oddziaływań palców cynkowych z DNA, z nicią główną i komplementarną, omówiona jest specyficzność oddziaływania z DNA, a także możliwość projektowania nowych palców cynkowych do rozpoznawania dowolnej sekwencji DNA. To wszystko na zaledwie 8-miu stronach Wstępu co wskazuje na bardzo dobrą znajomość tej tematyki i wybranie samych niezbędnych



informacji aby właściwie opisać badane zagadnienie. Autorka skupiła się w rozprawie na oddziaływaniach elektrostatycznych, niemniej jednak byłoby dobrze omówić we Wstępie także pozostałe oddziaływania i wiązania, w szczególności wiązania wodorowe, występujące licznie w interfejsie palca cynkowe-DNA. Nie wyjaśniono także dlaczego numerowanie reszt helisy palca cynkowego zaczyna się od -1 skoro z Rys. 1.4 wynika, że ta reszta powinna mieć numer 0. Wtedy numery oddziałujących reszt byłyby 0-2-3-6 co jest zgodne z kolejnością reszt w tej helisie.

Rozdział Metodologia i podstawy teoretyczne jest dłuższy niż Wstęp i liczy 17 stron. Zawiera informacje o Banku Pseudoatomów Uniwersytetu w Buffalo (UBDB) do którego Autorka dodała sześć nowych typów pseudoatomów, specyficznych dla palców cynkowych. Rozdział ten zawiera także krótkie opisy metod obliczeniowych stosowanych w niniejszej rozprawie tj. metody Hartree-Focka oraz metody DFT. Opisane jest także obliczanie energii oddziaływania elektrostatycznego na podstawie przybliżenia multipolowego. W rozprawie wykorzystano osiem struktur z bazy Protein Data Bank (PDB) zawierających kompleksy palca cynkowe-DNA do wstępnej analizy oddziaływań elektrostatycznych, i kolejnych 16 kompleksów do pogłębionej analizy tych oddziaływań. W Metodologii umieszczono także szczegółowy opis przygotowania struktur kompleksów do obliczeń kwantowo-chemicznych czyli wybrania właściwego reprezentatywnego fragmentu i jego odpowiedniej modyfikacji, oraz także, w końcowej części Metodologii, opisano zastosowane proste parametry statystyczne takie jak odchylenie standardowe i RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Rys. 2.1 z tego rozdziału jest podpisany „przykładowe pseudoatomy” jednak w rzeczywistości przedstawia asferyczne potencjały elektrostatyczne tych atomów. Nie wyjaśniono także jaki kolor odpowiada jakim potencjałom. Na str. 30 opisano sposoby skalowania ładunku dla grupy atomów, np. aminokwasów. Jednym z nich było skalowanie proporcjonalne do parametru SIGPV, który to sposób Autorka wybrała do dalszych obliczeń. Niestety, nie wyjaśniono co to jest za parametr. Nie ma go także w wykazie skrótów. Wykaz skrótów nie jest także posortowany alfabetycznie. Autorka przyjęła dla dalszych obliczeń, że cysteiny koordynujące jon cynku mają ładunki formalne ujemne co jest założeniem prawidłowym. Wobec tego cały model palca cynkowego, złożony z czterech reszt aminokwasowych, ma ładunek 0. Autorka zwraca szczególną uwagę na właściwy rozkład ładunku na poszczególnych atomach bowiem ładunek formalny +2 na jonie cynku jest neutralizowany poprzez efekty przeniesienia ładunku i silne efekty polaryzacyjne. Ponadto cząsteczka DNA



ma silny ładunek ujemny i nawet małe błędy w rozkładzie ładunku na palcu cynkowym mogą generować duże błędy w obliczanych energiach oddziaływania elektrostatycznego.

Na str. 34 i 35 użyto słowa „nieporządki” w szczególności w zdaniu „nieporządki będące zjawiskiem fizycznym”. Wydaje mi się, że lepszym określeniem byłoby „nieuporządkowanie struktury” ale być może słowo „nieporządki” ma oddzielne znaczenie. Na str. 38 podano, że do obliczania RMSD par reszta aminokwasowa-zasada nukleotydoma użyto programu HCPM. Nie podano jednak w jaki sposób ten program to robi a w szczególności w jaki sposób jest wykonywane nakładanie badanych fragmentów struktur. Również na tej samej stronie napisano: „Dla reszty argininowej, posiadającej dwa atomy azotu, które mogą być donorami atomów wodoru ...”. W rzeczywistości ta reszta zawiera 3 takie atomy azotu ale środkowy atom CZ dla obliczania odległości do tego łańcucha bocznego został wybrany właściwie. Z kolei na str. 39 podano w tabeli nazwy atomów aminokwasów użytych dla obliczania odległości do tych łańcuchów bocznych - niestety nie zilustrowano tego na rysunkach przedstawiających te aminokwasy, w związku z tym czytelnik może nie wiedzieć o które atomy chodzi.

Rozdział Wyniki liczy 51 stron i rozpoczyna się od przedstawienia modelowej cząsteczki palca cynkowego zawierającej uproszczone aminokwasy cysteiny i histydyny połączone z jonem cynku. W szczególności te aminokwasy nie zawierają atomu węgla C α i atomów z wiązania peptydowego. Jest to jednak przybliżenie dopuszczalne bowiem Autorka posługuje się obliczeniami kwantowo-chemicznymi i rozmiar układu ma decydujące znaczenie dla wykonania obliczeń w rozsądnym czasie, tym bardziej że Autorka przetestowała różnorodne bazy funkcyjne dla obu metod kwantowych, tj. metody Hartree-Focka oraz DFT, wykonując optymalizację geometrii modelowego układu. We wszystkich jednak przypadkach otrzymano zbyt dużą wartość kąta S-Zn-S w stosunku do struktur krystalicznych o około 20 stopni. Wyjaśnienie tego zjawiska podano w załączniku nr 2. Szkoda jednak, że nie w głównym tekście bowiem to wyjaśnienie zajęło tylko jedną stronę, a mianowicie przyczyną rozbieżności były słabe oddziaływania pomiędzy modelowymi aminokwasami, a jest interesującym przykładem jak powinno się wyjaśniać rozbieżności pomiędzy modelem a eksperymentem, a to jest szczególnie ważne w pracy naukowca. W modelu pominięto cząsteczki wody ale prawdopodobnie nie wpłynęłyby one na poprawę wartości tego kąta, szczególnie, że oddziałują one z innymi aminokwasami, niż te koordynujące jon cynku, w strukturze krystalicznej. Optymalizację geometrii można także



wykonywać z więzami, unieruchamiając niektóre atomy np. C β z reszty cysteinowej oraz C γ z reszty histydynowej obecne w modelu (lub C β dla bardziej dokładnego modelu ze str. 48), co zapobiegłoby nieprawidłowym oddziaływaniom pomiędzy aminokwasami - być może taka procedura jest dozwolona przy dodawaniu nowych atomów do banku atomów asferycznych.

Na str. 43 przy podawaniu średnich wartości kątów podano w nawiasach liczby – prawdopodobnie jest to liczba zmierzonych wartości użytych do uśrednienia ale nie jest to wyjaśnione. Dobrze byłoby podawać przy wartościach średnich także wartości odchylenia standardowego. Na kolejnej stronie użyto nieprawidłowo słowa reszta cytozynowa zamiast reszta cysteinowa bo chodziło o aminokwas a nie o zasadę nukleinową. Taka sama zamiana nazw jest zastosowana w załączniku nr 2. Na str. 45 Autorka opisuje trzy modele dla wyboru czynnika rozpraszania dla cynku. Dla konfiguracji (Ar) 4s⁰3d¹⁰ powinno być „neutralny czynnik rozpraszania dla jonu cynku” zamiast dla atomu cynku bowiem konfiguracja wskazuje na jon Zn²⁺. Autorka dodaje, że czwarta kombinacja, tj. jonowy czynnik rozpraszania i nieobsadzony orbital 4s nie miałyby logicznego sensu - prośba o uzasadnienie. Na str. 47 podano obliczone wartości zintegrowane: ρ , $\nabla^2\rho$ oraz eliptyczność. Brak wyjaśnienia tych pojęć oraz brak ich opisu w Metodologii. Na tej samej stronie podano także obliczone zintegrowane ładunki dla Zn, S oraz N. Zapewne chodzi o ładunki punktowe zlokalizowane na tych atomach ale nie jest to wyjaśnione. Nie podano także w Metodologii jaka była procedura ich wyznaczania. Na str. 51 i dalszych pojawia się określenie Prawo Kulomba. Powinno być jednak Prawo Coulomba bowiem w j. polskim nazwiska zapisuje się w wersji oryginalnej. Na str. 52 jest odniesienie do Rys. 3.3.6; nie ma takiego rysunku – zapewne chodziło o Rys. 3.6.

W dalszym ciągu Wyników Autorka przedstawia obliczenia wartości energii oddziaływania elektrostatycznego dla kluczowych i niekluczowych reszt aminokwasowych z palców cynkowych oddziałujących z DNA. Autorka słusznie przyjmuje, że obliczony zakres wartości dla oddziaływań reszt niekluczowych od -9 do +6 kcal/mol można potraktować jako tło, aby w ten sposób wyróżnić oddziaływania kluczowe. Ponieważ reszty kluczowe z palców cynkowych tworzą wiązania wodorowe z DNA, dobrze byłoby oszacować jaki wpływ na energie oddziaływania ma zaniedbanie tych wiązań i skupienie się tylko na oddziaływaniach elektrostatycznych. Na str. 60 jest odniesienie do rozdziału 2.4.2 – również brak takiego rozdziału. Oprócz oddziaływań wynikających z modelu kanonicznego oddziaływań palców



cynkowych z DNA Autorka analizuje także tzw. oddziaływania satelitarne dalekozasięgowe. Jest to prawidłowe podejście, bowiem przekraczają one poziom tła a mogą się przyczyniać do modyfikacji specyficzności palców cynkowych. Stosunkowo dużo uwagi Autorka poświęciła przenoszalności energii oddziaływania elektrostatycznego analizując 9 unikalnych kombinacji palców cynkowych i DNA z kompleksów krystalicznych, otrzymując ważny wynik, że wartości energii oddziaływania elektrostatycznego dla danej pary aminokwas-zasada nukleinowa są porównywalne i niezależne od sąsiedztwa innych aminokwasów, niezależnie od tego czy są to oddziaływania kanoniczne czy niekanoniczne czyli satelitarne. Rozdział Wyniki kończy się opisem poszczególnych oddziaływań kanonicznych i niekanonicznych wraz z podaniem wartości oddziaływania elektrostatycznego oraz graficznym przedstawieniem tych oddziaływań co daje dobre wyobrażenie czytelnikowi o różnorodności i specyficzności różnych oddziaływań w palcach cynkowych.

W Podsumowaniu Autorka jeszcze raz skrótowo opisuje oddziaływania występujące pomiędzy palcami cynkowymi a DNA porównując energie oddziaływania elektrostatycznego. Znaczny wpływ na te energie ma wzajemna orientacja przestrzenna grup funkcyjnych a zastosowanie banku asferycznych atomów może dać dodatkowe korzyści w postaci zwiększenia dokładności obliczanych energii, a co za tym idzie dokładności rozpoznawania specyficznej sekwencji DNA. Ewentualne zastosowanie opisaney metody w praktyce jest jeszcze przedwczesne bowiem wymaga weryfikacji na dużej liczbie par palec cynkowy-DNA. Autorka podaje jednak potencjalną procedurę weryfikacji w rozdziale Potencjał do zastosowania w praktyce.

Podsumowując, rozprawa jest napisana bardzo dobrym językiem naukowym, jest zwięzła i logiczna oraz ma duży potencjał aplikacyjny. Białka z palcami cynkowymi mogą być wykorzystane do edycji genomu a niedawna praca Persikov i współpr. z roku 2015 opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* pokazuje, że metoda wykorzystująca parametry empiryczne oraz uczenie maszynowe osiągnęła dokładność predykcji powyżej 85 %. Być może metoda proponowana przez Autorkę okaże się jeszcze lepsza. Wymienione w niniejszej recenzji nieliczne niedociągnięcia nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy oraz dobrego przygotowania merytorycznego Autorki. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia zatem warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wniosek



do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Anny Marii Goral do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

S. Filipiek

Sławomir Filipiek