



Poznań, 25.02. 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Małgorzaty Katarzyny Cabaj

z tytułu

Intermolecular interactions of protonated nucleobases in the crystalline state

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Cabaj przygotowana została pod kierunkiem dr hab. Pauliny Dominiak na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Dotyczy ona oddziaływań międzycząsteczkowych zasad nukleinowych oraz ich modyfikowanych analogów, przy czym Doktorantka skupia swoją uwagę przede wszystkim na protonowanych formach tych cząsteczek w fazie krystalicznej. Te ważne z punktu widzenia biologii małe cząsteczki chemiczne są znaczącym elementem budowy kwasów nukleinowych i pełnią istotną rolę w żywych organizmach. Szczególnie ważna dla ich funkcji jest zdolność tworzenia par zasad poprzez wiązania wodorowe. W odróżnieniu od DNA, w którym dominują kanoniczne pary zasad odkryte przez Watsona-Cricka, w znacznie bogatszym pod względem strukturalnym i funkcyjnym RNA parowanie zasad jest dużo bardziej różnorodne. Częstotliwość występowania poszczególnych typów par zasad w RNA, jak również ich trwałość, były wielokrotnie przedmiotem wcześniejszych badań i analiz, głównie w oparciu o struktury makromolekuł w kryształach jak i symulacje kwantowo-mechaniczne. Ale, jak zauważa Doktorantka, wszystkie te analizy, choć bardzo cenne, obarczone są pewnymi wadami. Na przykład w analizach opartych o struktury kryształów zawierających cząsteczki RNA problemem jest ustalenie położenia atomów wodoru, a co za tym idzie również ładunku nukleozasady, a wiadomo, że czynniki takie jak tautomeria, protonowanie zasad czy, ogólniej mówiąc, rozkład ładunku w cząsteczkach mogą modulować ich oddziaływania międzycząsteczkowe, wpływając w ten sposób na funkcje biologiczne makrocząsteczek. W związku z tym, pani mgr Cabaj zaproponowała inne podejście do analizy różnorodnych typów par zasad i częstości ich występowania, a mianowicie wykorzystanie w tej analizie struktur kryształów organicznych związków małych cząsteczkowych zdeponowanych w Cambridge Structural Database (CSD). Zdając sobie sprawę, że takie podejście ma również swoje ograniczenia, jako jego istotne zalety uznała znacznie bardziej rzetelną informację dotyczącą stanu

protonacji nukleozasad oraz ogromną liczbę struktur zapewniającą wiarygodność przeprowadzonej statystyki. Ponadto brak więzów narzuconych przez szkielet fosforanowo-cukrowy w analizowanych strukturach mógł doprowadzić do odpowiedzi na pytanie czy częstość występowania poszczególnych typów par zasad jest efektem struktury kwasu nukleinowego czy też wynika z właściwości samej zasady nukleinowej. Głównym ograniczeniem zaproponowanej metody był fakt, iż analizę par zasad trzeba było ograniczyć do par utworzonych przez te same nukleozasady, tzw. homopar zasad, dopuszczając jedynie różnice w ich ładunku elektrycznym, gdyż okazało się że liczba struktur w bazie CSD zawierających w jednym kryształu różne nukleozasady jest niewystarczająca dla wiarygodnej statystyki.

Poza przedstawionym powyżej ujęciem czysto statystycznym, Doktorantka postanowiła podejść do zagadnienia wpływu protonowania na oddziaływania międzycząsteczkowe nukleozasad również na drodze eksperymentalnej krystalizując odpowiednie związki i dokonując dogłębnej analizy oddziaływań międzycząsteczkowych w otrzymanych kryształach. Stąd też w rozprawie mgr Cabaj pojawia się drugi wątek, bardziej szczegółowy, który znakomicie ilustruje bogaty warsztat badawczy Doktorantki. W tej części pracy Doktorantka przedstawia badania strukturalne kryształów dwóch niezwykle ciekawych hydratów azotanu hipoksantyny, heterocyklicznej zasady azotowej stosunkowo rzadko występującej w DNA i RNA.

Zanim przejdę do ustosunkowania się do wyników przedstawionych przez Doktorantkę w rozprawie chciałabym krótko omówić jej stronę formalną i edytorską. Przyznam, że objętość liczącej ponad 300 stron rozprawy na początku nieźle mnie przeraziła, ale gdy już zabrałam się za jej czytanie moje obawy okazały się bezpodstawne - duża liczba stron wynikała z dołączonego do pracy załącznika ze szczegółowymi wynikami badań jak również zamieszczenia kopii trzech publikacji będących efektem tej pracy doktorskiej. Rozprawa mgr Małgorzaty Cabaj napisana została w języku angielskim. Jej podstawowa część licząca około 160 stron ma dość typowy układ, a więc zaczyna się od wstępu wprowadzającego czytelnika w tematykę rozprawy jak również zapoznaje go z metodyką prowadzonych badań. Muszę dodać, że ta część pokazuje, że mgr Cabaj nie tylko doskonale orientuje w zagadnieniach związanych z uprawianą tematyką badawczą, ale również że ma ona stosunkowo rzadko spotykaną zdolność do popularyzacji nauki. Po wstępie literaturowym zamieszczony został wyraźnie sformułowany cel pracy a po nim dwa rozdziały zawierające wyniki i ich dyskusję. Pierwszy z rozdziałów dotyczy analizy częstotliwości występowania różnych par nukleozasad a drugi badań strukturalnych hydratów azotanu hypoksantyny. Pracę kończą ogólne wnioski oraz spis literatury liczący 151 pozycji. Do pracy dołączone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim, CV doktorantki oraz, jak wcześniej wspomniałam, załącznik ze szczegółowymi wynikami oraz kopie trzech publikacji Doktorantki.

Rozprawę czyta się bardzo dobrze, jej układ jest logiczny, nie ma w niej rzeczy zbędnych. Praca zawiera starannie przemyślane rysunki i tabele umożliwiające łatwe śledzenie treści rozprawy i wywodów Doktorantki. Dodam jeszcze, że mimo, iż materiał pracy doktorskiej został już w ogromnej

części opublikowany, rozprawa mgr Cabaj nie jest jedynie komentarzem do publikacji lecz stanowi odrębną pracę, którą można czytać niezależnie od publikacji. Prace te zostały opublikowane w dobrych i prestiżowych specjalistycznych czasopismach naukowych takich jak Nucleic Acid Research (IF=11,50), Crystal Growth and Design (IF=4,09) i Acta Crystallographica Sect. C (IF=1,09) a mgr Cabaj jest w nich pierwszym autorem,

Powróćmy jednak do badań przeprowadzonych przez Doktorantkę w ramach jej pracy doktorskiej. Wątek pierwszy, bardziej ogólny, dotyczy analizy tendencji nukleozasad takich jak adenina, guanina, tymina, uracyl, cytozyna i hipoksantyna do tworzenia tzw. homopar zasad przez wiązania wodorowe. Analizie poddane zostały struktury kryształów zdeponowane w bazie CSD zawierające wymienione nukleozasady, przy czym wykluczone zostały takie przypadki, w których nukleozasadach pojawiły się podstawniki inne niż atomy wodoru, z wyjątkiem podstawnika przy N1 w pirymidynach i N9 w purynach, gdzie dopuszczone zostało również podstawienie atomem węgla w miejscu wiązania glikozydowego. Następnie w tak wyodrębnionych strukturach kryształów poszukano par zasad, które spełniały zdefiniowane przez Doktorantkę kryteria odnośnie liczby i geometrii wiązań wodorowych oraz kąta dwuściennego między związanymi zasadami. Dodam, że wśród wiązań wodorowych uwzględniono również takie oddziaływania, w których udział brała grupa C-H. Efektem tej pracy było stworzenie atlasu homopar zasad nukleinowych znalezionych w bazie CSD. W celu sprawnego omówienia wyników zaproponowano nowy, bardzo ciekawy moim zdaniem, schemat nazewnictwa par zasad, którego ogromną zaletą jest jego ogólność. Mam nadzieję, że doczeka się on w najbliższym czasie szerokiego stosowania przez badaczy zajmujących się strukturą kwasów nukleinowych. W sporządzonym atlasie pary zasad zostały pogrupowane w zależności od tworzącej je zasady. Następnie dla danej nukleozasady przeprowadzono analizę par zasad w zależności od jej ładunku oraz wyznaczono średnie wartości parametrów opisujących geometrię wiązań wodorowych w tych parach. Oddzielnie przeprowadzono analizę homopar dla nukleozasad podstawionych przy wiązaniu glikozydowym by móc je porównać z homoparami występującymi w RNA. Zestawienie to pokazało, że najczęściej obserwowane homopary zasad w kryształach małych cząsteczek są też najczęściej spotykanymi homoparami w kryształach RNA, chociaż częstość ich występowania może być nieco różna.

Najważniejsze jednak z punktu widzenia postawionego celu rozprawy było przeanalizowanie wpływu protonowania zasad na ich parowanie. Po pierwsze Doktorantka stwierdziła, że częstotliwość pojawiania się par zasad, w których jedna lub obie zasady są protonowane, odpowiada wartościom pKa dla ich iminowego atomu azotu. Najwięcej protonowanych zasad obserwowano dla cytozyny, następnie adeniny i najmniej dla guaniny. W przypadku adeniny protonowanie zachodziło głównie na atomie azotu N1, jednak znaleziono również przypadki, w których proton przyłączony był do N7 lub N3. Dla guaniny, gdzie mamy dwa iminowe atomy azotu występowała wyłącznie forma z protonem przyłączonym do N7. Obecność lub brak protonu w określonym miejscu zasady ma wpływ na oddziaływania, w których może ona uczestniczyć. W przypadku adeniny przyłączenie protonu do N1,

a więc do akceptora wiązania wodorowego na krawędzi Watsona-Cricka, spowodowało praktycznie wyłączenie tej krawędzi z tworzenia par zasad. W przypadku cytozyny protonowanie N3 w jednej czy obydwu zasadach nie wprowadza tak ogromnych różnic, gdyż tak jak dla obojętnej zasady możliwe jest nadal parowanie przez krawędzie Watsona-Cricka bez drastycznych zmian w geometrii pary. Z kolei w przypadku guaniny, gdzie konfiguracja donorów i akceptorów wiązania wodorowego jest inna na każdej z trzech krawędzi nukleozasady, zmiana sposobu protonowania nie wyklucza tworzenia większości par możliwych dla obojętnej guaniny. Dla guaniny wyłonił się obraz, w którym nieprotonowana podstawiona na N9 zasada preferuje parowanie się w taki sam sposób jak protonowana wolna zasada.

Próba oszacowania obecności lub braku ładunku w parze zasad na długość scalających je wiązań wodorowych, w przypadkach gdy analizowana próba była wystarczająco duża, nie pokazała statystycznie istotnych różnic w geometrii tych oddziaływań. Również podejście mające na celu skorelowanie energii par zasad z częstością ich występowania w kryształach nie doprowadziło do żadnych istotnych konkluzji. Ustalono, że proces parowania zasad w kryształach jest procesem złożonym i na jego przebieg wpływ muszą mieć również inne czynniki, włączając w to obecność innych cząsteczek, oddziaływania inne niż wiązania wodorowe czy też dążność cząsteczek do tworzenia struktur wyżej wymiarowych. Poza stwierdzeniem i wyjaśnieniem pewnych ogólnych trendów dla wszystkich analizowanych nukleozasad, w przeprowadzonej analizie pojawiło się szereg odrębnych przypadków, które trzeba było rozważyć osobno.

Poza omówioną powyżej analizą statystyczną, Doktorantka zastosowała również podejście eksperymentalne poprzez wyznaczenie metodą rentgenowskiej analizy strukturalnej struktur kryształów zawierających protonowane nukleozasady i szczegółową analizę tych struktur pod kątem oddziaływań międzycząsteczkowych z wykorzystaniem metod chemii kwantowej. W swojej rozprawie przedstawia bardzo szczegółową analizę kryształów dwóch substancji, monohydratu azotanu hipoksantyny (Hx1) oraz formalnie trójwodnego diazotanu hipoksantyny (Hx2). Używam określenia formalnie, gdyż badania wykazały, że w kryształach tych obok cząsteczek wody obecny jest również jon oksoniowy. Okazało się, że w żadnym z badanych kryształów jony hipoksantyny nie tworzyły par przez wiązania wodorowe. Struktura kryształów Hx1 w temperaturze pokojowej była opublikowana już wcześniej jednakże praca Doktorantki ogromnie poszerzyła naszą wiedzę o właściwościach tej substancji oraz relacjach między właściwościami a strukturą. Temperaturowe badania rentgenograficzne przeprowadzone w zakresie temperatur od 20 do 285 K pokazały, że w kryształach Hx1 wraz z obniżaniem temperatury zachodzi przemiana fazowa, której towarzyszy zbliżenie kryształu oraz że w fazie niskotemperaturowej Hx1 ma ujemny współczynnik rozszerzalności cieplnej w jednym z kierunków w kryształach. Należy podkreślić, że wszystkie te zjawiska Doktorantka analizuje i wyjaśnia w sposób przekonujący w oparciu o informację strukturalną. Pani mgr Cabaj okazała się bardzo czujną obserwatorką, gdyż w procesie krystalizacji azotanu hipoksantyny, podczas stosunkowo szybkiego odparowania roztworu, spostrzegła pojawienie

się nowej, nietrwałej formy kryształów, które okazały się nową substancją oznaczoną jako Hx2 i, co ciekawe, silnie powiązaną strukturalnie z Hx1. Mianowicie Hx1 składa się z planarnych warstw zbudowanych z połączonych wiązaniami wodorowymi kationów hipoksantyny, jonów azotanowych oraz cząsteczek wody. W fazie wysokotemperaturowej cząsteczki te zajmują położenia szczególne na płaszczyźnie lustrzanej, natomiast w fazie niskotemperaturowej symetria ta zanika. W przypadku Hx2, poza warstwą o budowie analogicznej jak w Hx1, pojawia się dodatkowy typ obojętnej pod względem elektrycznym warstwy, o tych samych wektorach translacji, zbudowany przez jon azotanowy oraz tzw. kation Zundela $H_5O_2^+$. Jest to bardzo ciekawy przypadek strukturalny, który dał Doktorance możliwość przeanalizowania zmian oddziaływań kationu hipoksantyniowego nie tylko wraz ze zmianą temperatury ale również w nieco zmienionym otoczeniu. Dla porównania oddziaływań w kryształach tych dwóch substancji w temperaturze około 100 K Doktoranka wykorzystała powierzchnie Hirshfelda. Przeprowadzona analiza pokazała, że mimo obecności dodatkowej warstwy w Hx2, struktury wykazują duże podobieństwo.

Dla kryształów Hx1 Doktoranka przeprowadziła bardziej zaawansowaną analizę oddziaływań międzycząsteczkowych opartą na geometrii oddziaływań oraz obliczeniach energii elektrostatycznej i całkowitej dla dimerów, przy czym przez dimer rozumie się tutaj parę utworzoną przez dwie odrębne cząsteczki (naładowane lub neutralne) w kryształach. Obliczenia energii dla dimerów przeprowadziła w oparciu o trzy zestawy parametrów geometrycznych, a mianowicie a) wyznaczone poprzez udokładnianie struktury w oparciu o model niezależnych atomów (model IAM), b) wyznaczone poprzez udokładnianie struktury w oparciu o bank asferycznych atomów (model TAAM) oraz c) zoptymalizowane metodami periodycznego DFT (model pDFT). Jest to ten fragment badań, który nie został jeszcze opublikowany, a który wymagał od Doktorantki sporego nakładu pracy, gdyż obliczenia trzeba było przeprowadzić dla około 100 dimerów. Najbardziej ogólne wnioski wyciągnięte na bazie tych obliczeń dotyczą zmian energii elektrostatycznej i energii całkowitej dimerów ze zmianą temperatury w przypadku braku lub obecności wiązań wodorowych. W pierwszym przypadku, zarówno dla modelu TAAM jak i pDFT, obydwa typy energii zmieniały się stopniowo z temperaturą i pozostawały w ścisłej zależności ze zmianami odległości środków ciężkości molekuł tworzących dimer. W drugim przypadku, dla dimerów połączonych wiązaniem wodorowym, na różnice w obliczonych energiach oddziaływań duży wpływ miał sposób wyznaczania położenia atomów wodoru, różny dla każdego modelu. Jak zaznacza Doktoranka, obrazuje to ogromny wpływ proces lokalizacji atomów wodoru na wyniki obliczeń energii.

Czas dokonać pewnego podsumowania bo lista osiągnięć naukowych wynikających z przeprowadzonych przez panią mgr Cabaj badań jest spora. Pozwolę sobie wymienić tu skrótowo te, które w moim odczuciu są najważniejsze:

- zaproponowanie nowego, bardzo ogólnego schematu nazewnictwa par zasad,

- stworzenie atlasu homopar zasad nukleinowych w oparciu o bazę CSD i analiza częstości ich występowania,
- pokazanie, że najczęściej spotykane homopary nukleozasad w bazie CSD również należą do najczęściej występujących w kryształach RNA,
- stwierdzenie pewnych ogólnych trendów w parowaniu się protonowanych form adeniny, guaniny i cytozyny,
- otrzymanie kryształów i przeprowadzenie bardzo wszechstronnych badań strukturalnych dla dwóch różnych form hydratowanych azotanów hipoksantyny,
- dla przypadku monohydratu azotanu hipoksantyny, objaśnienie na bazie zaawansowanych badań strukturalnych takich procesów jak zależna od temperatury przemiana fazowa, zbliżenie kryształu oraz występowania ujemnego współczynnika rozszerzalności cieplnej dla fazy niskotemperaturowej.

Jako recenzent pracy starałam się znaleźć w niej pewne skazy, wychodząc z założenia, że nikt nie jest doskonały. Te skazy to kilka niedociągnięć edytorskich, które spostrzegłam podczas jej czytania. Na przykład w pracy pojawiają się trzy niezbyt spójne określenia dotyczące zdefiniowania pojęcia 'zasada azotowa nukleotydów' (strony 9, 11 i 309). Na rysunku 3.14f mamy parę zasad oznaczoną jako UU_fHS_(41)(52), podczas gdy na rysunku 3.7 tego typu pary brakuje – prawdopodobnie opisana jest ona tam jako UU_fWH(14)(25). Czy może to oznaczać, że we wprowadzonej nomenklaturze par zasad jest pewna niejednoznaczność? Rysunek 3.16 dotyczy cytozyny a nie, jak podano, adeniny. W podpisie pod rys. 4.10 pojawiła się niewłaściwa informacja wynikająca prawdopodobnie ze skopiowania podpisu pod rys. 4.11. Na str. 114 na początku drugiego akapitu zamiast O1 powinno być O3, natomiast na stronie 126 pomyłono oś a* z osią c*. Zauważyłam również, że w odnośniku 90 brak informacji, że cytowana praca pochodzi z Methods in Enzymology. Są to oczywiście drobne skazy, które nie mają żadnego wpływu na bardzo pozytywną ocenę całej recenzowanej rozprawy.

Cele jak i zadania, które postawiono Doktorantce, lub też te które ona sama sobie wyznaczyła, były bardzo ambitne. Do ich realizacji niezbędna była szeroka i zaawansowana wiedza oraz wszechstronne umiejętności eksperymentalne i obliczeniowe, gdyż w rozprawie pojawia się szeroki wachlarz zagadnień związanych z biologią strukturalną, krytalografią, fizyką kryształów oraz chemią kwantową. Rozprawa udowadnia, że mgr Małgorzata Cabaj taką wiedzą i takimi umiejętnościami dysponuje. Zapewniły one wysoki poziom prowadzonych badań i w efekcie umożliwiły opublikowanie wyników w bardzo dobrych czasopismach. To co zwróciło moją uwagę to fakt, że Doktorantka dąży każde zagadnienie napotkane w badaniach bardzo głęboko a wnioski z badań

formuluje ostrożnie, dopiero po znalezieniu dla nich szerszego poparcia. Wskazuje to na jej dużą dojrzałość naukową.

Ze względów formalnych stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Cabaj spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. 'Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce' i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Cabaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w oparciu o argumenty, które przedstawiłam powyżej i dodatkowo sformułowane w oddzielnym piśmie, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy zgodnie ze zwyczajami na Uniwersytecie Warszawskim.

Małgorzata Gdaniś



Poznań, 26.02. 2021 r.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Katarzyny Cabaj zatytułowanej 'Intermolecular interactions of protonated nucleobases in the crystalline state'

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Cabaj porusza podstawowe zagadnienie związane ze strukturą kwasów nukleinowych dotyczące wpływu protonacji zasad nukleinowych na ich oddziaływania międzycząsteczkowe. Problem ten Doktorantka analizuje na dwóch płaszczyznach wykorzystując różnorodną gamę narzędzi naukowych. Przeprowadza analizę statystyczną tworzenia par zasad w kryształach małych cząsteczek w oparciu o bazę CSD i zestawia swoje wyniki z podobnymi analizami dla kryształów RNA. Ta część pracy opublikowana została w prestiżowym specjalistycznym czasopiśmie 'Nucleic Acid Research'. Podejmuje również badania eksperymentalne, których celem jest wyznaczenie struktury kryształów zawierających protonowane zasady nukleinowe w celu analizy oddziaływań międzycząsteczkowych w tych kryształach z wykorzystaniem zaawansowanych metod rentgenowskiej analizy strukturalnej oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych. W ostateczności skupia się na dwóch substancjach zawierających protonowaną modyfikowaną zasadę nukleinową, hipoksantynę, i przeprowadza dla nich dogłębną analizę oddziaływań co pozwala wyjaśnić na gruncie strukturalnym zjawiska i procesy zaobserwowane w tych kryształach. Ta część rozprawy opublikowana została już w dwóch pracach zamieszczonych w specjalistycznych czasopismach Cryst. Growth Des. oraz w Acta Cryst. C lecz z pewnością zawarty w niej materiał będzie przedmiotem jeszcze kolejnej publikacji.

Rozprawa pani mgr Małgorzaty Cabaj to kawał solidnej pod każdym względem pracy naukowej. Jej realizacja wymagała od Doktorantki wiedzy w wielu dziedzinach oraz wszechstronnych umiejętności eksperymentalnych i obliczeniowych. To co zwróciło moją uwagę to fakt, że Doktorantka podchodzi do każdego napotkanego w badaniach zagadnienia bardzo dogłębnie a wnioski formułuje ostrożnie rozważając zawsze wszystkie fakty przemawiające za jak i przeciw. Wskazuje to na jej dużą dojrzałość naukową.

W mojej opinii zarówno recenzowana rozprawa jak i jej autorka pani mgr Małgorzata Cabaj zasługują na wyróżnienie.

Maria Gdaniec