



Poznań, 2023-02-15

## RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Obary

pt.: „**Badanie oddziaływania niekanonicznych form telomerowych fragmentów DNA z nanorurkami węglowymi przy zastosowaniu metod dynamiki molekularnej**”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Patrycji Obary została wykonana w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN w Krakowie, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tomasza Pańczyka oraz dr Pawła Wolskiego, pełniącego rolę promotora pomocniczego. Badania zawarte w niniejszej pracy powstały w wyniku realizacji projektu badawczego zatytułowanego „Badania oddziaływania nanorurek węglowych z telomerycznym DNA przy użyciu metod dynamiki molekularnej” (tj. grantu NCN nr 2017/27/B/ST4/00108) i kierowanego przez Promotora, prof. dr hab. Tomasza Pańczyka.

Celem rozprawy sformułowanym przez Doktorantkę było zbadanie z zastosowaniem modelowania molekularnego oraz częściowo obliczeń kwantowo-chemicznych oddziaływań pomiędzy jednościennymi nanorurkami węglowymi a drugorzędowymi strukturami DNA tj. G-kwadrupleks oraz i-motywy tworzącymi się na fragmentach telomerowego DNA. Cele szczegółowe obejmowały m.in.: (1) określenie warunków stabilności termodynamicznej struktury G-kwadrupleksu oraz i-motywu; (2) analizę procesu adsorpcji oraz desorpcji struktury i-motywu na/z powierzchni nanorurki, w zależności od stanu jego protonacji oraz chiralności i rodzaju grupy funkcyjnej przyłączonej do nanorurki węglowej; (3) analizę stabilności oraz sposobu oddziaływań z nanorurkami węglowymi w przypadku, gdy struktura i-motywu jest utworzona w większym fragmencie dupleksu telomerowego DNA; (4) zbadanie przy użyciu obliczeń kwantowo-chemicznych możliwości protonacji cytozyn poprzez

przeniesienie protonu z grupy karboksylowej, przyłączonej do nanorurki na atomu azotu w pierścieniu cytozyny.

#### *Ocena pracy*

Z formalnego punktu oceniana praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy z podziałem na 10 głównych rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim (summary) oraz wykazem stosowanych skrótów. Część teoretyczna obejmuje rozdziały 1-4, rozdział 5 omawia cele pracy, wyniki zawarte są w rozdziałach 6-9, rozdział 10 stanowi podsumowanie. Pracę kończy spis cytowanej literatury obejmujący 289 pozycji. Praca została napisana w języku polskim i obejmuje 170 stron, na których łącznie zamieszczono 35 rysunków oraz 4 tabele. Uważam, że cała praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim.

W części literaturowej, Autorka zapoznaje Czytelnika z drugorzędowymi strukturami DNA – poczynając od powszechnie znanej helisy DNA typu B, poprzez struktury A-DNA oraz Z-DNA, dalej struktury trójniciowe aż po struktury czteroniciowe, które są obiektem badań w ramach niniejszej rozprawy. W dalszej kolejności omówiony jest rozwój badań nad ligandami stabilizującymi G-kwadrupleksy DNA w kontekście projektowania leków przeciwnowotworowych oraz biorących udział w regulacji ekspresji genów. Autorka słusznie zauważyła, że ten nurt badań objął także i-motywy, co wyniknęło z faktu, iż grupa Christa i Dingera udowodniła, że tego typu struktury mogą się tworzyć *in vivo* w jądrach ludzkich komórek. Do tej pory ilość ligandów selektywnie oddziałujących z i-motywami lub indukujących powstawanie tej struktury jest ciągle ograniczona. Nie dziwi zatem fakt, że obiektem zainteresowań Doktorantki stały się karboksylowane jednościenne nanorurki węglowe (*ang.*: Carbon Nanotubes, CNTs), które jako nieliczne wywołują tworzenie się składanie się telomerowego i-motywu. W kolejnym rozdziale, Czytelnik może zapoznać się z aspektami budowy CNTs oraz ich charakterystycznymi właściwościami (m.in. toksycznością), które wpływają na ich potencjalne zastosowanie. W tym rozdziale znajdują się też informacje na temat sposobów funkcjonalizacji tych struktur, ich wykorzystania do celów bioanalitycznych i diagnostycznych, czy też terapeutycznych. Ze względu na



udowodnione selektywne interakcje z i-motywwem, CNTs jawią się jako potencjalne sondy do badań nad funkcją biologiczną tej struktury DNA. Co więcej, w dostępnej literaturze brakuje szczegółowych opracowań skupiających się na zrozumieniu mechanizmu oddziaływania pomiędzy nanorurkami węglowymi a fragmentami telomerowego DNA, zawierającego czteroniciowe struktury tj. i-motyww oraz G-kwadrupeks. To wszystko stało się podstawą i motywacją do badań zawartych w niniejszej dysertacji. W ramach części teoretycznej, mgr Patrycja Obara umieściła też rozdział opisujący metodykę badań, w tym podstawy dynamiki molekularnej oraz informacje na temat pól siłowych tj. empiryczne pole siłowe w postaci potencjału AIREBO oraz klasyczne pole siłowe AMBER.

Jak już wspomniałam, Doktorantka wyróżniła 4 szczegółowe cele swojej pracy, a wyniki ich dotyczące wraz z informacjami na temat symulacji poszczególnych badanych układów są umieszczone w rozdziałach od 6 do 9. Po zapoznaniu się z tymi rozdziałami, uważam, że Doktorantka zrealizowała cele rozprawy. I tak, Pani mgr Obara potwierdziła, że rozwijanie i-motywwu jest zdecydowanie łatwiejsze w pH neutralnym i dodatkowo wykazała, że w warunkach obojętnego pH obecność częściowo rozwiniętego G-kwadrupeksu na nici komplementarnej do tej z i-motywwem zwiększa stabilność tegoż i-motywwu w neutralnym pH. Następnie Doktorantka analizowała oddziaływanie i-motywwu z jednościnnymi nanorurkami (CNT) i wykazała, że złożona struktura i-motywwu (zwana protonowanym iMp) adsorbuje na powierzchni nanorurki w orientacji „dolnej” (tzn. jego końce 3' i 5' oraz zasada A11 są skierowane w kierunku powierzchni CNT) a nie poprzez wąski czy mały rowek tej struktury. Ponadto wykazano, że cyt. „jednościenne CNTs nie mogą bezpośrednio stabilizować struktur nieprotonowanego iM z powodu prostych oddziaływań fizycznych, wynikających ze specyficznego kształtu CNTs.” Czy można używać określenia „nieprotonowany i-motyww” jeżeli podstawowym elementem budulcowym i-motywwu jest półprotonowana para cytozyna-cytozyna (C:C+) a brak protonowania na azocie N(3) jednej z cytozyn w dalszej konsekwencji uniemożliwia ukształtowanie szkieletu tej struktury? Przyznam, że rozwinięty i-motyww (i pozbawiony protonów na azotach N(3) cytozyn) jawi mi się jako nieuporządkowany kłębek statystyczny (*ang.* random coil) – proszę o komentarz.

Wracając do otrzymanych wyników, Doktorantka sugeruje, że w przypadku wąskich nanorurek możliwe jest owinięcie łańcucha iM wokół nanorurek CNT. Wydaje się, że ten wynik zaprzecza doniesieniom literaturowym, iż przestrzenna struktura i-motywu jest stabilizowana w fizjologicznym pH poprzez interakcję z grupami karboksylowymi na powierzchni jednościennych CNTs. Dlatego w kolejnym kroku, mgr Obara próbuje zrozumieć mechanizm tych oddziaływań, ale już w przypadku, gdy i-motyw jest utworzony w duplesie telomerowego DNA. Tutaj na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka musiała zaproponować podejście pozwalające szybko uzyskać struktury, które są znacznie bliższe konfiguracjom termodynamicznie optymalnym niż te, otrzymane z bardzo długich obliczeń standardową dynamiką molekularną. Dzięki zaproponowanej procedurze obliczeniowej odkryto, że analizowany fragment iG (i-motyw + G-kwadrupeks) tworzy strukturę przestrzenną w kształcie litery V z niekanonicznymi fragmentami znajdującymi się na ostrzu kształtu tej litery, zaś nanorurki węglowe są zwykle umieszczone pomiędzy jej ramionami. Ponadto wykazano, że w przypadku nanorurek sfunkcjonalizowanych na końcach guaninami, obecność tych heterocyklicznych zasad sprawia, że nanorurki są w stanie selektywnie atakować swoją końcówką G-kwadrupeks oraz i-motyw; zaś brak guanin na końcówkach nanorurek prowadzi do swobodnego ruchu iG po powierzchni CNT. Stwierdzono też, że analizowane nanorurki węglowe nie stabilizują przestrzennej struktury i-motywu w warunkach neutralnego pH. Tutaj nasuwa się pytanie, czy sfunkcjonalizowanie nanorurek innymi heterocyklicznymi nukleozasadami (np. adeniną czy też cytozyną) wywołałoby analogiczny efekt?

Wspomniany brak stabilizacji i-motywu przez nanorurki węglowe sfunkcjonalizowane guaninami doprowadził Doktorantkę do postawienia wniosku, że „obserwowana w literaturze indukcja tworzenia iM w wyniku oddziaływań z karboksylowanymi jednościennymi CNT nie jest bezpośrednio związana ze szczególną geometrią nanorurek węglowych”, lecz prawdopodobnie wynika z przeniesienia protonów z grup funkcyjnych CNT na cytozyny i utworzenia stabilnych par C:C<sup>+</sup>. Celem weryfikacji tej hipotezy, mgr Obara wykonała symulacje obliczeniowe, które wykazały, że taki proces nie jest możliwy ani w przypadku

nanorurek z przyłączonymi grupami karboksylowymi na ścianie bocznej, ani też na końcach CNT. Jako ostateczne wytłumaczenie sposobu indukowania/stabilizacji i-motywu w pH obojętnym przez CNT, Doktorantka przyjęła, że nanorurki mogą lokalnie obniżać pH przez dysocjację grup karboksylowych i w konsekwencji wywoływać utworzenie półprotonowanych par cytozyn (C:C+) i dalej formowanie się szkieletu i-motywu. Ta informacja jest bardzo istotna w kontekście projektowania kolejnych ligandów mogących indukować/stabilizować czteroniciową strukturę i-motywu.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam ładunek merytoryczny ocenianej pracy oraz sposób ilustracji wyników. Szkoda jedynie, że na rysunku 6.1., przedstawiającym schemat analizowanych struktur i-motywu oraz G-kwadupleksu, ta ostatnia struktura nie jest narysowana w topologii hybrydowej. W pracy praktycznie nie spotyka się błędów stylistycznych ani literówek, jedynie w tekście występują niekiedy tzw. sieroty czyli pojedyncze litery znajdujące się w ostatnim miejscu w wersie. Uważam, że Autorka używając nazw czteroniciowych form DNA powinna zapisywać je całkowicie po polsku a nie częściowo po angielsku tzn. Autorka pisze „G-quadupleks” zamiast „G-kwadupleks”, to samo dotyczy i-motywu tzn. Autorka pisze tę nazwę z literą „f” na końcu (i-motif) zamiast z literą „w” (i-motyw). Nie rozumiem, a właściwie nie pasuje mi określenie „triada cytozynowa”, jeżeli elementem budulcowym i-motywu są interkalujące pary zasad cytozyna:cytozyna protonowana (C:C+), zaś określenie triada kojarzy mi się w pierwszej kolejności z elementami budowy struktur trójniciowych.

W rozprawie doktorskiej brak jest informacji na temat działalności naukowej Doktorantki, a przede wszystkim na temat tego, czy wyniki badań zostały już opublikowane. Jednakże, z dostarczonych mi materiałów wynika, że Pani Patrycja Obara (wcześniej Wojtoń) jest współautorką 4 publikacji oraz brała udział w 12 konferencjach naukowych, w tym połowa to konferencje międzynarodowe.

Podsumowując należy stwierdzić, że znalezionych błędów i uchybień jest niewiele i że w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy. Przedstawiono w niej wartościowe wyniki, które będą pomocne w dalszym projektowaniu ligandów rozpoznających



i oddziałujących ze strukturą i-motywu, a prawdopodobnie też w zrozumieniu działania mechanizmów komórkowych, w które zaangażowane są miejsca promotorowe genów, zawierające nici bogate w cytozyny i guaniny czyli zdolne do tworzenia struktur czteroniciowych tj. i-motywy oraz G-kwadrupleksy.

*Wniosek końcowy*

W mojej opinii praca Pani mgr Patrycji Obary spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wobec tego wnioskuję o dopuszczenie mgr Patrycji Obary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, o czym świadczą publikacje w czasopismach tj. *Biophysical Chemistry* (IF 3,6), *Journal of Physical Chemistry B* (IF 3,4) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF 6,2) wnioskuję do Rady Naukowej IKiFB PAN w Krakowie o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Patrycji Obary. Wniosek ten wynika też z faktu, iż w literaturze praktycznie nie ma prac obliczeniowych poświęconych zrozumieniu mechanizmu tworzenia się czteroniciowych i-motywów w lokalnie rozwiniętym dupleksie DNA czyli w obecności zwiniętego lub niezłożonego G-kwadrupleksu na komplementarnej nici, w warunkach fizjologicznego pH. Co więcej, wyjaśnienie sposobu oddziaływania/stabilizacji struktury i-motywu przez ligandy (tutaj zastosowano jeden z nielicznie selektywnych tj. CNT) jest istotne w kontekście projektowania czy też dostarczania leków przeciwnowotworowych.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Dembska, prof. UAM