



Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Obarę „Badanie oddziaływania niekanonicznych form telomerowych fragmentów DNA z nanorurkami węglowymi przy zastosowaniu metod dynamiki molekularnej”

Rozprawa doktorska „Badanie oddziaływania niekanonicznych form telomerowych fragmentów DNA z nanorurkami węglowymi przy zastosowaniu metod dynamiki molekularnej” została przygotowana przez mgr Patrycję Obarę pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasz Pańczyka oraz dr. Pawła Wolskiego w INSTYTUCIE KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI im. Jerzego Habera POLSKIEJ AKADEMII NAUK w Krakowie.

Celem pracy było zbadanie właściwości struktur utworzonych w wyniku oddziaływania niekanonicznych form DNA z nanorurkami węglowymi. Główną metodą badawczą były symulacje dynamiką molekularną wykonane z wykorzystaniem dostępnych pakietów symulacyjnych. Rozważane w pracy zagadnienie badawcze jest interesujące z poznawczego punktu widzenia ale może mieć także potencjalnie praktyczne zastosowania, na przykład przy stabilizacji fragmentów kwasów nukleinowych w szczepionkach.

Praca składa się z dziewięciu rozdziałów, podsumowania oraz bibliografii. Cztery pierwsze rozdziały tworzą wstęp, w którym opisano w sposób encyklopedyczny niekanoniczne formy DNA, oddziaływania niekanonicznych form DNA ze ligandami, nanorurki węglowe oraz metody badawcze stosowane w pracy. W rozdziale piątym przedstawiono motywacje do przeprowadzenia badań zaprezentowanych w pracy oraz określono co jest celem pracy. W rozdziałach od szóstego do dziewiątego opisane zostały przeprowadzone badania. W rozdziale dziesiątym podsumowane zostały przeprowadzone badania oraz przedstawione wynikające z nich wnioski.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej opisane w czterech rozdziałach dotyczyły czterech różnych zagadnień o rosnącym stopniu złożoności badanych układów. Pierwszy problem dotyczył analizy stabilności niekanonicznych form DNA (imotif, G-quadruples) w obecności jonów sodu i chloru oraz wody modelowanej przez potencjał TIP3P w środowisku kwaśnym i obojętnym. Stosując wymuszone rozwijanie metodą sterowanej dynamiki molekularnej próbowano zidentyfikować możliwe stabilne konfiguracje badanego układu. Jako miarę stabilności rozwijanych struktur stosowano pracę wykonaną w trakcie tego procesu w funkcji średniego kwadratowego odchylenia od zoptymalizowanej struktury nie poddanej żadnym zewnętrznym oddziaływaniom. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że wartość pH ma duży wpływ na stabilność struktury i-motif. Ponadto stwierdzono, że idealna struktura G-quadruplex słabiej stabilizuje strukturę i-motif niż jej rozwinięta forma.

Drugim badanym problemem było analizowanie oddziaływań struktury i-motif z nanorurkami węglowymi o różnych średnicach i chiralności, funkcjonalizowanych na końcach grupami aminowymi lub resztami zawierającymi guaninę. Celem tych badań było zrozumienie mechanizmu stabilizowania struktury i-motif oddziałującej z nanorurką węglową. Zbadano czy istnieje optymalne położenie struktury i-motif na powierzchni nanorurki oraz deformacje tej struktury stosując jako miarę odkształcenia średnie kwadratowe odchylenie od struktury początkowej. Podjęto również próbę oszacowania zmiany energii swobodnej powstałej w wyniku wymuszonego odrywania struktury i-motif od powierzchni nanorurki. Badano dwie formy struktury i-motif, protonowaną i nieprotonowaną. Wyniki symulacji sugerowały, że oddziaływania nanorurek węglowych ze strukturą i-motif nie prowadzą do jej stabilizacji. Stwierdzono,



że w wyniku silnej adsorpcji struktury i-motif na nanorurkach węglowych dochodzi do degradacji przestrzennej tych struktur.

Trzeci badany modelowy układ był najbardziej złożony i prawdopodobnie istotny ze względu na jego potencjalne znaczenie w układach biologicznych. Układ ten składał się z struktur i-motif oraz G-quadruplex wstawionych w podwójną helisę DNA. Zbadano oddziaływania takiej złożonej struktury z nanorurkami węglowymi o różnej chiralności. Do końców nanorurek przyłączono grupy guaninowe. Ze względu na złożoność badanego układu zastosowano uproszczoną metodę symulacyjną rigid-body replika exchange w celu szybszego otrzymania konfiguracji początkowych. Zbadano również stabilność struktury i-motif przez obliczenie pracy wykonanej podczas wymuszonego rozwijania metodą sterowanej dynamiki molekularnej. Wyniki symulacji nie wskazują, że nanorurki węglowe w środowisku obojętnym stabilizują strukturę i-motif.

Komplementarne do badań prowadzonych metodą dynamiki molekularnej było badanie protonacji telomerowych fragmentów DNA przez karboksylowane nanorurki węglowe. W tym celu przeprowadzono obliczenia metodami mechaniki kwantowej układów będących mniejszymi fragmentami badanych struktur. Zastosowano metodę wymuszonej optymalizacji geometrii. Przeprowadzone obliczenia wskazują, że mechanizm bezpośredniego przeniesienia protonów z grup karboksylowych do cytozyn jest mało prawdopodobny.

Niektóre aspekty pracy wymagają dodatkowego komentarza. Wstęp jest bardzo obszerny ale czasami bardzo ogólny. Na przykład informacje o zastosowaniach nanorurek nie wiążą się bezpośrednio z tematem pracy. Opis metod badawczych jest bardzo powierzchowny, sprowadza się głównie do podania nazw pakietów symulacyjnych stosowanych do prowadzenia obliczeń. Stwierdzenie, że „parametry mikroskopowe są dzięki zastosowaniu mechaniki klasycznej przetwarzane na dane makroskopowe takie jak energia, ciśnienie” jest co najmniej niefortunne.

W pracy często informacje o sposobie obliczeń numerycznych są przedstawiane opisowo bez podawania odpowiednich wzorów matematycznych. Na przykład, na stronie 69 jest napisane „Rmsd obliczono po wykonaniu optymalnego obrotu $U^x_i(t) \rightarrow x_i^{ref}$, który najlepiej nakłada współrzędne $x_i(t)$ na zbiór współrzędnych odniesienia x_i^{ref} .” Nie jest podane jak zdefiniowana jest funkcja $U^x_i(t)$. Jak zostało zdefiniowane kryterium optymalności?

Na stronie 73 napisano „Obecność komplementarnego łańcucha bogatego w guaninę z utworzonym Gq wymaga pokonania bariery energii swobodnej rzędu 70 kJ mol^{-1} w celu rozwinięcia i-motifu do formy spinki do włosów.” Jak została wyznaczona wartość energii swobodnej 70 kJ mol^{-1} ?

Na stronie 75 napisano: „Na Rys. 6.5. przedstawiono pracę związaną z siłami generowanymi przez liniowo narastający (ze stałą prędkością 1.25 \AA ns^{-1}) rmsd”. Nie jest jasne co oznacza sformułowanie „liniowo narastający rmsd”. Jak taki proces jest generowany w symulacjach komputerowych?

Na stronie 76, na Rys. 6.5 przedstawiona jest praca wykonana w celu wymuszonego rozwinięcia struktury G-quaruplex. Jak formuła matematyczna została użyta do obliczenia tej pracy. Na stronie 79, na Rys. 6.7 przedstawiono szare krzywe opisane jako „wcześniejsze wyniki”. Które „wcześniejsze wyniki” są przedstawione jako szare krzywe? Poniżej napisano „Zamiast tego użyto tylko trzech niezależnych trajektorii, a otrzymany wynik nazwano potencjałem średniej siły, pmf.” Czy pmf zdefiniowany w ten sposób jest tożsamy z dobrze znanym i zdefiniowanym pojęciem potencjału średniej siły (potential of mean force).

Na stronie 113 w tabeli 8.1 podane są energie oddziaływań. Jakie są granice błędów wynikające z obliczeń numerycznych? W przypadku podawania wyników symulacji komputerowych powinien być podany zakres błędów obliczeniowego.



Na stronie 97 napisano, że „Zbieżność energii swobodnej wyznaczona tą metodą nie jest jednak zadowalająca ze względu na uśrednienie wykładnicze.” Co jest rozumiane przez zbieżność energii swobodnej oraz jak sposób uśredniania może wpływać na dokładność wyniku? Czy dokładność nie zależy głównie od ilości trajektorii wziętych do obliczeń ?

Na stronie 120 napisano „aby uzyskać bardziej powtarzalne wyniki, takie jak potencjał średniej siły (energii swobodnej), konieczne jest wykładnicze uśrednienie tych krzywych”. Nie jest jasne co oznacza „wykładnicze uśrednienie krzywych”. Jakie wzory matematyczne zostały zastosowane?

Na stronie 123 jest napisane „nanorurki są w stanie selektywnie atakować swoją końcówką części DNA”. Nie jest jasne jaki proces fizyczny jest określany przez „atakowanie”. Poniżej stwierdzono, że „pogorszenie iM przy neutralnym pH jest w pewnym momencie utrudnione”. Nie jest jasne co oznacza sformułowanie „pogorszenie iM”.

Na stronie 125 napisano „generowanie topologii pola siłowego było różne”. Nie jest jasne co rozumie się przez topologię pola siłowego.

W pracy często używa się słów dystans i interakcje. Czy jest jakieś uzasadnienie aby nie stosować odległość i oddziaływania, czy jest to jedynie wynikiem kalki językowej z angielskiego. Mniej istotna pomyłka w podpisie w Rys. 7.8 „dystnas” zamiast „dystans”.

Podsumowując, mgr Obara przedstawiła interesujący zagadnienie naukowe dotyczące oddziaływań nanorurek węglowych z telomerycznymi strukturami DNA. Zaproponowała odpowiednie metody badawcze pozwalająca na analizę zjawisk fizycznych zachodzących w badanym układzie. Przeprowadziła szereg symulacji komputerowych metodą dynamiki molekularnej. Z otrzymanych wyników obliczeń numerycznych wyciągnęła odpowiednie wnioski istotne z poznawczego punktu widzenia. Opanowała podstawową wiedzę z zakresu właściwości fizykochemicznych kwasów nukleinowych oraz metodologii prowadzenia symulacji komputerowych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi praca mgr Patrycji Obary spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Patrycji Obary do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Prof. dr hab. Wojciech Gózdź