



Prof. dr hab. Maciej Kozak

Poznań, 5 czerwca 2019 r

Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM
oraz Środowiskowe Laboratorium Badań SAXS
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Golona

“Rozszerzenie na oddziaływania z kationami metali oraz wprowadzenie algorytmów optymalizacji globalnej do gruboziarnistego modelu NARES-2P kwasów nukleinowych”

Pomimo, iż od kilku dziesięcioleci są znane i intensywnie rozwijane techniki modelowania struktur makrocząsteczek biologicznych, równolegle rosną także możliwości obliczeniowe komputerów oraz powiększają się repozytoria danych strukturalnych to nadal predykcja w pełni realistycznych modeli strukturalnych tych cząsteczek napotyka na trudności. W przypadku modelowania struktur kwasów nukleinowych nadal aktualnym problemem jest uwzględnienie oddziaływania z jonami metali. Polianiony jakimi są kwasy nukleinowe w warunkach fizjologicznych stabilizowane są oddziaływaniami z jonami sodu, potasu, magnezu itp. Oddziaływania te wpływają na przyjmowanie przez cząsteczki DNA czy RNA odpowiednich konformacji. Sukcesywnie prowadzone prace eksperymentalne obejmujące analizy strukturalne różnych form kwasów nukleinowych pozwoliły zidentyfikować szereg istotnych fizjologicznie struktur przestrzennych kwasów nukleinowych i ich kompleksów. Dlatego wybór obszaru badań, który był realizowany przez mgr. Łukasza Golona w ramach rozprawy doktorskiej, uważam za bardzo trafny. Zaproponowane przez niego rozszerzenie pola NARES-2P o możliwości symulacji z wykorzystaniem kationów w formie jawnej stanowi kolejny etap rozwoju tego bardzo użytecznego gruboziarnistego pola siłowego. Uzyskane przez niego

wyniki z pewnością pozwolą rozszerzyć możliwości modelowania struktur kwasów nukleinowych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Łukasza Golona pt. "Rozszerzenie na oddziaływanie z kationami metali oraz wprowadzenie algorytmów optymalizacji globalnej do gruboziarnistego modelu NARES-2P kwasów nukleinowych" przygotowana została w Pracowni Modelowania Molekularnego w Katedrze Chemii Teoretycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką promotorską dr hab. Adama Sieradzana.

Praca zredagowana została w formie klasycznego manuskryptu liczącego 129 stron. Podzielona została na siedem rozdziałów. W pierwszym z nich Autor zamieścił szczegółowy wykaz stosowanych w pracy skrótów. W kolejnym rozdziale mgr Golon sformułował cel pracy, podzielony na dwa szczegółowe cele etapowe:

- rozszerzenie pola siłowego NARES-2P o możliwości symulacji z wykorzystaniem kationów w formie jawnej,
- wprowadzenie do symulacji struktur przestrzennych kwasów nukleinowych wraz z polem siłowym NARES-2P algorytmu globalnej minimalizacji energii potencjalnej metodą wyżarzania przestrzeni konformacyjnej.

W trzecim rozdziale, który podzielony został na dwie części, zawarł opis teoretyczny obiektów badań (kwasów nukleinowych) i metodyki. Pierwsza część licząca 22 strony obejmuje zestawienie obecnej wiedzy na temat budowy kwasów nukleinowych. Szczegółowo przedstawiony został przegląd znanych struktur kwasów nukleinowych, począwszy od klasycznych form A, B czy Z-DNA po struktury typu *i*-DNA czy G-kwadrupleksy. Autor pochylił się także nad tak ważnymi kompleksami kwasów nukleinowych z białkami jakimi są rybosomy oraz syntetycznymi strukturami wzorowanymi na DNA czy RNA. Część ta zwieńczona została krótkim podrozdziałem zawierającym przegląd podstawowych metod eksperymentalnych stosowanych w badaniach struktury kwasów nukleinowych. W drugiej części rozdziału trzeciego mgr Golon opisał metody teoretyczne stosowane w badaniu kwasów nukleinowych. Metody te przedstawione zostały w czterech podrozdziałach, w których Autor na najpierw omawia metody molekularnej chemii kwantowej, skupiając się między innymi na metodach DFT, Hartree-Focka czy metodach półempirycznych. W dalszej części omówione jest także pełnoatomowe pole siłowe oraz gruboziarniste pola siłowe, w tym będące obiektem niniejszej rozprawy pole NARES-2P.

W rozdziale czwartym Autor na 31 stronach przedstawił wyniki uzyskane w ramach wykonanej pracy doktorskiej. W pierwszej części tego rozdziału przedstawione zostały wyniki procedur obliczania i wprowadzenia do pola siłowego NARES-2P potencjałów oddziaływania

nukleozyd-kation oraz ich walidacji. Autor skupił się na naturalnie występujących deoksynukleozydach i ich oddziaływaniach z jonami sodu i potasu – kationami stabilizującymi struktury G-kwadrupleksów. W drugiej części tego rozdziału mgr Golon przedstawił wyniki badań własnych obejmujących implementację metody CSA i pola siłowego NARES-2P do predykcji wybranych struktur kwasów nukleinowych (ryboprzełącznika PreQ1-II dwoinki zapalenia płuc, dupleksu DNA d(CG)₃₀, 42 nukleotydowego łańcucha RNA z ludzkiego SK7 snRNA, 17-nukleotydowego łańcucha RNA z końca 3' genomu wirusa żółtej febry, dimeru kasety A z sekwencji ludzkiego centromeru i kompleksu dwóch nici DNA (CG)₃₂ i (CG)₂₈). Testy walidacji wypadły pozytywnie i wykazały, że połączenie metody CSA i pola NARES-2P pozwala na predykcję struktur przestrzennych DNA i RNA stosunkowo niewielkim kosztem obliczeniowym.

Rozdział piąty poświęcony jest zwięzłemu podsumowaniu uzyskanych wyników, gdzie między innymi podkreślone zostało wprowadzenie przez Autora do pola NARES-2P nowych potencjałów oddziaływania kationów z nukleozydami oparte o potencjał siły średniej. Zgadzam się z Autorem, że wprowadzenie tych dwóch narzędzi jest istotnym krokiem w rozwoju narzędzi bioinformatycznych zdolnych do efektywnego modelowania takich struktur jak G-kwadrupleksy.

W rozdziale szóstym zebrane zostały pozycje literaturowe zacytowane przez mgr. Golona w dysertacji. Wykaz ten jest obszerny i obejmuje 176 pozycji literaturowych. Literatura została dobrze dobrana i w pełni ilustruje omawiane w pracy zagadnienia.

W rozdziale siódmym Doktorant zawarł skrypt podprogramu *ecat_nucl*, zestawienie dorobku naukowego, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz reprint współautorskiej publikacji zawierającej wyniki zaprezentowane w doktoracie.

Tematyka badań zrealizowanych przez Doktoranta, jak już wspomniałem we wstępie jest interesująca, oryginalna i w mojej ocenie bardzo trafnie wybrana. Krótko podsumowując realizację przedstawionych przez mgr. Golona celów pracy stwierdzam, że z powodzeniem udało mu się je zrealizować. Nie mam również zastrzeżeń merytorycznych do wykorzystanej w pracy metodyki badań. Uważam, że uzyskane wyniki są cenne i wnoszą istotny wkład do rozwoju metod modelowania struktur przestrzennych kwasów nukleinowych w oparciu o gruboziarniste pola siłowe.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w rozprawie zaliczam efektywne rozbudowanie pola siłowego NAREP-2P o oddziaływania kation-nukleozyd oraz zaimplementowanie wraz z rozbudowanym polem NARES-2P algorytmu globalnej minimalizacji energii metodą CSA. Potwierdziły to wykonane testy symulacji modeli strukturalnych kwasów nukleinowych.

Z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić uwagi krytyczne, które nasunęły mi się podczas lektury manuskryptu. Podkreślam jednak, że nie obniżają one pozytywnego odbioru całości rozprawy.

- Na rysunku 3.2 (strona 14) autor przedstawił konformację C2'-endo i C3'-endo reszty pentozy. Jednak sposób prezentacji w oparciu o model kulowy jest w mojej ocenie mało czytelny. Dużo lepsza byłaby standardowa reprezentacja struktury w postaci klasycznego rysunku szkieletowego lub rysunek stereo.
- Podobne zastrzeżenie z mojej strony budzi rysunek 3.3 (strona 15) przedstawiający konformery *syn* i *anti* na przykładzie 2'-deoksyguanozyny. W mojej ocenie warto byłoby zmanifestowanie też na tych rysunkach odpowiednich kątów torsyjnych.
- Po lekturze części teoretycznej odniosłem wrażenie, że nieco po macoszemu potraktowane jest omówienie struktur znanych kompleksów kwasów nukleinowych z jonami metali. Co prawda w manuskrypcie pojawiają się informacje o strukturze G-kwadrupleksu DNA w kompleksie z jonami potasu (rysunek 3.8), ale w mojej ocenie Autor mógłby więcej miejsca poświęcić systematycznemu przeglądowi tego typu struktur (czy motywów strukturalnych) zdeponowanych w bazie PDB w tym także struktur z jonami dwuwartościowymi (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} itp.).
- Autor w niekonsekwentny sposób wprowadza tłumaczenia angielskich sformułowań używanych w pracy, raz używając oryginalnej nazwy i jej tłumaczenia w nawiasie innym razem odwrotnie.
Przykładowo na stronie 61 pojawia się sformułowanie „*Równanie to zostało dopasowane do PMF obliczonego z symulacji umbrella sampling (ang. próbkowanie pod parasolem) ...*”. Na tej samej stronie z kolei w zdaniu „*W dalszych badaniach wykorzystano metodę największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood Estimation – MLE) ...*”. Sprawia to wrażenie, że tekst nie został do końca ujednolicony podczas edycji manuskryptu.
- W tekście pojawiają się też niekiedy błędy edytorskie (tzw. literówki), które umknęły korekcie autorskiej, jednak nie wpływają negatywnie na pozytywny odbiór pracy.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Praca zredagowana została z klasycznym podziałem na część teoretyczną i część obejmującą prezentację oraz omówienie uzyskanych wyników. Nietypowe jest w mojej ocenie zamieszczenie streszczenia pracy (zarówno wersji polskiej jak i angielskiej) w ostatnim rozdziale pracy. Zwykle streszczenie (i anglojęzyczny *abstract*) powinny znaleźć się na początku pracy, na końcu powinno znajdować się raczej podsumowanie (jak również anglojęzyczne *summary*). Zawarte w pracy ilustracje zostały starannie przygotowane i są w większości informatywne i przejrzyste. Manuskrypt napisany został poprawnym językiem fachowym,



wspomniane wcześniej błędy edytorskie (literówki) są raczej nieliczne i nie obniżają dobrej oceny pracy.

Podsumowanie

W podsumowaniu chcę podkreślić, że mgr Łukasz Golon uzyskał bardzo interesujące wyniki obejmujące zarówno modyfikację pola siłowego jak i implementację algorytmu globalnej minimalizacji energii metodą CSA. W mojej ocenie jego warsztat badawczy zaprezentowany w pracy oraz przedstawiona interpretacja i krytyczna dyskusja uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta. Warto także podkreślić zarówno dobry dorobek publikacyjny (6 prac) oraz fakt, że zaprezentowane w pracy wyniki zostały już opublikowane.

Niniejszym stwierdzam więc, że dysertacja autorstwa mgr. Łukasza Golona spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora oraz wymagania zwyczajowe. Przedkładam tedy wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Łukasza Golona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.