

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Tytuł : „Rozszerzenie na oddziaływania z kationami metali oraz wprowadzenie algorytmów optymalizacji globalnej do gruboziarnistego modelu NARES-2P kwasów nukleinowych” Autor: mgr Łukasz Golon

Wykonana: Uniwersytet Gdański - Katedra Chemii Teoretycznej - Pracownia Modelowania Molekularnego.

Promotor: dr hab. Adam K. Sieradzan.

Praca doktorska przedstawiona do oceny omawia rozszerzenie modelu gruboziarnistego stosowanego od lat do celów analizy strukturalnej białek do zastosowań dla analizy strukturalnej kwasów nukleinowych polegające na uwzględnieniu w tym polu także obecności kationów metali oraz na wprowadzeniu procedury CSA (w założeniu Conformational Space Annealing), która prowadzi do określenia struktury wg mechanizmu globalnej optymalizacji. Praca wpisuje się w tematykę rozwijaną przez grupę badawczą Katedry Chemii Teoretycznej Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie od lat model ten wdrażany jest do analizy struktur białkowych. Praca doktorska stanowi więc kolejny krok rozszerzania stosowania modelu gruboziarnistego do bio-molekuł.

Doktorant omawia program NARES-2P (wersja UNRES dotyczy analiz strukturalnych białek), który w modelu gruboziarnistym dotyczy zagadnień strukturalnych kwasów nukleinowych.

Autor rozpoczyna pracę doktorską od omówienia celów badań. Dotyczą one wprowadzenia do modelu NARES-2P możliwości zapisu jawnego obecności kationów metali, których oddziaływanie z kwasami nukleinowymi ma istotne znaczenie dla tworzenia struktur obserwowanych w niciach telomerów. W dziedzinie rozwoju możliwości obliczeniowych programu NARES-2P Autor testuje wprowadzenie algorytmu globalnej minimalizacji energii potencjalnej metodą CSA (ang. Conformational Space Annealing - wyżarzanie przestrzeni konformacyjnej). Wprowadzanie udoskonalonych technik optymalizacji poprzez skrócenie czasu obliczeń umożliwia rozszerzanie rozmiarów analizowanych obiektów.

Część teoretyczna pracy omawia budowę kwasów nukleinowych zwracając uwagę na ich skład, ale też na obecność różnych konformerów strukturalnych. Autor omawia też typy oddziaływań, w jakie wchodzi poszczególne nukleotydy zwracając uwagę na ich stabilność. Omawiając struktury nici kwasów nukleinowych Autor rozważa ich drugo- i trzecio-rzędową strukturę wprowadzając do dyskusji też struktury RNA włączając też omówienie struktury rybosomu. Opis dotyczy też form mRNA, tRNA oraz rRNA.

Zagadnienia strukturalne nie mogą być odizolowane od eksperymentalnych technik analiz strukturalnych, które Autor przedstawia w rozdziale 3.1.4. wymieniając głównie techniki oparte na krystalografii (promieniowanie X) oraz metodach bazujących na NMR. W kolejnym etapie Autor omawia metody teoretyczne bazujące głównie na technikach stosowanych w chemii kwantowej oraz mechaniki molekularnej (w tym symulacje dynamiki molekularnej). Opis narzędzi jakimi posługuje się chemia kwantowa jest dość obszerny i dokładny. Po nim następuje omówienie pełno-atomowych pól siłowych, po których zaprezentowany zostaje model gruboziarnisty. Opis tego modelu podany jest z dokładnością zapisu poszczególnych przekształceń wynikających z uproszczeń, jakie ten model wprowadza. W konsekwencji podany zostaje zapis pola siłowego (równanie 3.29), gdzie w postaci jawnej zapisane zostają typy oddziaływań, które to pole uwzględnia. Szczegółowa prezentacja poszczególnych składników pola siłowego podana jest za pomocą równań 3.30-3.40.

W rozdziale 3.2.4. zawarta jest dyskusja bardzo ważnego zagadnienia próbkowania przestrzeni konformacyjnej. Procedura ta jest niezmiernie ważna ze względu na bardzo dużą liczbę stopni swobody w układzie, jakim jest zestaw powiązanych ze sobą nukleotydów. Omawiając warsztat roboczy Autor przedstawia metody Monte Carlo, zasady dotyczące symulacji dynamiki molekularnej zwracając uwagę na technikę polegającą na wymianie replik w procedurze dla symulacji w różnych temperaturach oraz metodę wyżarzania.

Zestaw opisanych narzędzi z powodzeniem zastosowany przez Autora prowadzi do uzyskania wyników obliczeń, które zaprezentowane są w części zatytułowanej Wyniki. Prezentacja w tej części pracy omawia kolejno: Badania oddziaływań DNA z kationami jednowartościowymi (rozdział 4.1) oraz Zastosowanie metody CSA i pola siłowego NARES2P do przewidywania struktury kwasów nukleinowych (rozdział 4.2).

Rozdział 5 to krótka prezentacja Wniosków, które sprowadzają się do stwierdzenia poprawności uzyskiwanych za pomocą nowo wprowadzonych potencjałów struktur DNA, które wymagają oddziaływań z kationami do zachowania stabilności, takich jak G-kwadrupleksy.

Autor stwierdza też, że wprowadzone przez Niego techniki wyżarzania pozwalają przewidzieć 3D strukturę DNA lub RNA w znacznie krótszym czasie.

Zawartość pracy poparta jest 176-oma pozycjami cytowanej literatury.

Wyniki uzyskane przez Pana Łukasza Golona zostały zawarte w 6-ciu publikacjach oraz były prezentowane na 7-miu konferencjach. Pan Łukasz Golon kierował pięcioma grantami BMN.

Oceniając pracę doktorską Pana mgra Łukasza Golona należy wskazać bardzo wnikliwe badania ukierunkowane na parametryzację pola siłowego NARES-2P w postaci modyfikacji parametrów opisujących nukleozydy bez uwzględnienia obecności jonów. Wymagało to uzgodnienia modelowych funkcji analitycznych dla potencjałów średniej siły oraz implementację wystandaryzowanych potencjałów w kodzie programu UNRES 4. Ważny etap tej analizy stanowiła walidacja oddziaływania nukleozyd-kation przy nowym zestawie parametrów. Obliczenia w tej części przeprowadzono dla wszystkich czterech nukleozydów uwzględniając obecność jonów Na^+ oraz K^+ .

Po przeprowadzonej walidacji – tę część pracy uważam za najbardziej zasługująca na uwagę i docenienie – wykonano obliczenia dla G-kwadrupleksów telomerowych. Przeprowadzono analizę porównawczą ze względu na każdy nukleotyd oraz ze względu na obecność odpowiedniego jonu. Graficzna prezentacja wyników analizy porównawczej (Fig.4.2) w połączeniu z wynikami zawartymi w Tab. 4.2 jest czytelnie zrównoważona. Wyniki uzyskane dla struktur G-kwadrupleksu, G-tripleksu oraz mini-hantla oraz pomiary różnic pomiędzy geometrią struktur dostępnych w PDB uzasadniają stwierdzenie o powodzeniu przeprowadzonego eksperymentu *in silico*. Dodatkowo analiza RMSD w zależności od zastosowanej procedury obliczeniowej czyni analizę dogłębną a przez to w dużym stopniu uwiarygadniającą zastosowany model jako satysfakcjonujący.

Drugi temat podjęty przez Doktoranta to implementacja metody CSA do programu NARES-2P. Operacja ta stanowi przeniesienie zastosowania tej metody wcześniej dla obliczeń struktur białek. Technika wyżarzania przestrzeni konformacyjnej przyniosła korzystne skutki w obliczeniach białek, stąd słuszne założenie, że spełni też oczekiwania w odniesieniu do przewidywania struktur kwasów nukleinowych. Opis operacji prowadzący do wprowadzania mutacji strukturalnych opisany jest dokładnie i ciekawie, aczkolwiek wskazane było by wprowadzenie rysunku wskazującego omawiane wartości parametrów geometrycznych. Odpowiedni rysunek jest obecny w części Materiały i Metody (Rysunek 3/13). Odwołanie się jednak do tak odległej grafiki czyni studiowanie treści pracy dość trudnym. Można by np. wprowadzić nie powtórkę tego samego rysunku, ale jego wersję jeszcze bardziej uproszczoną. Część obliczeniowa jest bogata w liczne przykłady testujące – jak na przykład wykonanie obliczeń dla różnych strukturalnie fragmentów, różnej długości łańcucha a także różnych zestawów łańcuchów o zróżnicowanej liczbie nukleozydów. Liczba wersji testujących jest duża, co gwarantuje wiarygodność uzyskanych wyników. Wyniki te prezentowane są w

bardzo czytelny sposób. Zwraca uwagę bardzo trafny dobór prezentacji graficznej, która nie jest przesadna i jej informacyjny charakter dzięki temu jest bardzo wysoki.

Jako bardzo istotny i cenny naukowo uważam dokładny opis procedur koniecznych do wprowadzenia do obliczeń obecności jonów. Jest to zagadnienie trudne z punktu widzenia chemii kwantowej. Wymagania stawiane procedurom uwzględniającym obecność jonów są bardzo rygorystyczne. Detaliczne przedstawienie wszystkich etapów tej procedury z jednej strony dogłębnie wyjaśnia to zagadnienie (Rozdział 4.1.). Z drugiej zaś sugeruje bardzo dokładne przygotowanie Doktoranta do działalności w tej dziedzinie. Moje pytanie dotyczy możliwości uogólnienia uzyskanych wniosków. Czy opracowana parametryzacja ogranicza się tylko do omawianych jonów, czy może być ekstrapolowana na inne jony np. o innym ładunku. W jakim stopniu procedura tutaj zastosowana nosi cechy specyficznej? Które z etapów wymagałyby istotnych zmian w przypadku innych pól siłowych?

Jako cenny wkład Doktoranta uważam próbę wprowadzenia procedury CSA do pola siłowego NARES-2P (Rozdział 4.2). Wrażliwość metody na pH środowiska, które Doktorant traktuje jako niepowodzenie w odtworzeniu struktury przestrzennej (str. 100), wskazuje na wysoką wrażliwość zastosowanego modelu na warunki zewnętrzne. Wprowadzenie tej procedury do analiz strukturalnych kwasów nukleinowych (NARES-2P) rozszerza znacząco możliwości aplikacyjne tego programu. Czy w przypadku rozpatrywania układu dupleksu DNA o jednakowej długości nici i kompleksu dwóch nici o zróżnicowanej długości nici potrzebna jest niezależna parametryzacja, czy problem sprowadza się jedynie do potrzeby konstrukcji odmiennej liczby konformacji startowych.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska wnosi istotny wkład w rozwijanie technik numerycznych adresowanych do badań strukturalnych kwasów nukleinowych. Obszar badawczy stanowiący obiekt analizy jest wielkiej wagi ze względu na potrzebę opracowania narzędzi, które poza celami poznawczymi rokuje szerokie zastosowanie w projektowaniu leków oraz terapii zindywidualizowanej.

Pan mgr Łukasz Golon wykazał w pracy doktorskiej bardzo dobre przygotowanie i wysoką fachowość w przeprowadzaniu badań w dziedzinie analiz strukturalnych kwasów nukleinowych. Realizacja zadań objętych pracą doktorską czyni Go specjalistą w dziedzinie niezmiernie ważnej i potrzebnej.

Uwagi krytyczne sprowadzają się właściwie do dwóch pozycji. Jedna z nich została już podana wcześniej.

Druga dotyczy zbyt długiego zdania na stronie 62 – zdanie o długości długość 4-rech linijek.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że badania przedstawione w pracy doktorskiej mają zastosowanie w dziedzinie medycyny w tym w rozwijaniu terapii zindywidualizowanej w szczególności. Pełny zestaw narzędzi dla analizy sekwencji kwasów nukleinowych, ich struktur, symulacji procesu translacji w tym w szczególności procesu fałdowania białek do symulacji aktywności biologicznej białek umożliwi w przyszłości szybkie opracowanie terapii dla każdego pacjenta w skali indywidualnej. Jak długo zestaw ten nie jest kompletny, techniki te nie mogą być stosowane na dużą skalę. Praca dotyczy ważnego przed-translacyjnego etapu procesu określanego jako dogmat biologiczny, a który stanowi istotę procesów życiowych.

Konsekwentne rozwijanie technik symulacji procesów biologicznych przez Ośrodek Uniwersytetu Gdańskiego stanowi cenny przykład prowadzący do znaczącego udziału w rozwoju tej dyscypliny naukowej oraz w przyszłe zastosowania praktyczne. Dlatego uzyskane przez mgra Łukasza Golona wyniki oraz zdobyte doświadczenie mają istotne znaczenie dla rozwoju nauki dzisiaj jak i dla rozwoju nauki jutra.

Biorąc pod uwagę bardzo rzetelny wkład w realizację zadań, opublikowanie wyników w 6-ciu publikacjach w okresie od 2014 do 2018 w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym oraz liczby udział w konferencjach a także kierowanie licznymi grantami stwierdzam, że praca doktorska jak i dorobek mgra Łukasza Golona spełnia warunki stawiane w sytuacji ubiegania się o stopień doktora. Pracę oceniam jako bardzo dobrą.

Wnoszę więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgra Łukasza Golona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Irena Roterman-Konieczna

Kraków 4.czerwca 2019