



Dr hab. Maciej Kubicki, prof. UAM

Poznań, 29 grudnia 2013

Zakład Krystalografii

Wydział Chemii UAM

Recenzja

rozprawy doktorskiej przedstawionej przez p. magistra Pawła Drożdżala

Pan mgr Paweł Drożdżal przedstawił rozprawę doktorską zatytułowaną „Badania strukturalne kompleksów Z-DNA oraz hybrydy RNA:DNA z kationami organicznymi i nieorganicznymi”.

Temat podjęty przez Doktoranta wpisuje się w nurt badań mających na celu zrozumienie roli, jaką w funkcjach biologicznych kwasów nukleinowych, występujących w formach polianionowych, pełnią kationy metali lub poliamin w rodzaju putrescyny, spermidyny i sperminy. Autor postanowił zbadać struktury kilku kompleksów zawierających kwas nukleinowy, poliaminę i kationy metali używając do tego celu metod strukturalnej analizy rentgenowskich. Jak się okazało, uzyskał dane o wyjątkowej rozdzielczości.

Praca składa się z tradycyjnych głównych części: części literaturowej, opisu materiałów i metod badawczych - tu opis procedur doświadczalnych - wyniki i dyskusji, oprócz tego Autor opisuje cel pracy, podsumowanie i podaje bibliografię. Dodatkowo na początku pracy Autor podaje wykaz stosowanych skrótów, do pracy dołączono też kopie trzech publikacji związanych z rozprawą, których p. Drożdżal jest współautorem. W sumie jest to 137 stron porządnie zredagowanego tekstu i starannie wykonanych rysunków.

Praca zaczyna się od krótkiego wstępu, po którym następuje rozbudowany, ponad czterdziestostronicowy opis stanu wiedzy w zakresie ogólnie mówiąc struktur kwasów nukleinowych i oddziaływań tych kwasów z organicznymi i nieorganicznymi kationami. Przyznaję chętnie, że z dużą przyjemnością czytałem tę część i wdzięczny jestem Autorowi, że nie poddał się coraz częściej zauważalnemu pędowi ku lapidarności. Dzięki temu – dla mnie przynajmniej – część ta ma walor małej monografii, dobrze i ciekawie napisanej, a ograniczonej świadomie do zagadnień, które będą istotne w dalszej części pracy: parametrów opisujących konformację kwasów nukleinowych, wzajemnych relacji między różnymi formami tych kwasów i wreszcie ich oddziaływań z poliaminami i kationami metali. Warto podkreślić szczególny nacisk na po pierwsze precyzyjne określenie konformacji cząsteczki kwasu, a po drugie na kluczową dla dużej części pracy formę Z-DNA. Autor zebrał (w tabeli 8) dane dla około sześćdziesięciu dotychczas określonych struktur kryształów Z-DNA z kationami metali i poliamin, i to nie tylko zdeponowanych w PDB, ale też tych, które zostały tylko opisane w literaturze.

Po tym wprowadzeniu p. Drożdżał sformułował cel swojej pracy, który określił jako badania doświadczalne z wykorzystaniem metodologii krystalograficznej kompleksów Z-DNA z putrescyną, oraz z poliaminą i metalem oraz zbadanie struktury hybrydy RNA:DNA zawierającej większość sekwencji polipurynowej wirusa HIV w układzie z kationami organicznymi i nieorganicznymi.

Następuje teraz opis technik i metod użytych podczas badań, jest on na tyle zwięzły, że nie nuży, a na tyle dokładny, że umożliwia ocenę jakości badań i ewentualne ich powtórzenie. Autor słusznie najwięcej uwagi poświęca w tym fragmencie szczegółowemu opisowi metod krystalizacji, bo trzeba przyznać, że wyniki świadczą o tym, że ma i talent, i wiedzę w tym zakresie.

Bo właśnie pojawiają się imponujące wyniki badań doświadczalnych. Autor opisuje uzyskanie danych dyfrakcyjnych dla pięciu substancji: czterech kompleksów heksameru Z-DNA o sekwencji d(CGCGCG) z kationami Spm^{4+} Mn^{2+} , Spm^{4+} Zn^{2+} , Put^{2+} K^+ i Cr^{3+} oraz hybrydy RNA:DNA z Mg^{2+} . Jakość uzyskanych danych w przynajmniej dwóch przypadkach jest rewelacyjna, w tej kategorii są to jedne z najlepszych danych jakie kiedykolwiek uzyskano. W przypadku kompleksu z manganem oznacza to rozdzielczość 0.75\AA co samo w sobie jest wielkim osiągnięciem, na dodatek w ostatnim zakresie rozdzielczości wciąż są dane o średniej wartości $I/\sigma(I)$ równej 8 i wartości R_{merge} 6%, a

dla kompleksu z potasem odpowiednie wartości są jeszcze lepsze: rozdzielczość 0.71Å, $I/\sigma(I)$ 8.74 i R_{merge} 5.9%. Te wyniki budzą szacunek... oraz skłaniają do oczywistego pytania: czy podjęto/podejmuje się/planuje się podjąć próby uzyskania jeszcze lepszych danych? Bo z przedstawionych statystyk wynika, że potencjał oczywiście w tych kryształach jest... Dane uzyskane dla kompleksów z cynkiem (0.87Å) i chromu (1.00Å) są również znakomite, ale wydaje się, że dla tych kryształów uzyskano wszystko, co można było uzyskać.

Autor dość pobieżnie opisuje procedurę udokładniania struktur, uznając widocznie – i w zasadzie słusznie – że była ona w miarę standardowa. Niemniej kilka pytań mi się nasunęło:

Po pierwsze, dlaczego nawet w przypadku bardzo dobrych danych nie podjęto próby modelowania choćby części atomów wodoru cząsteczek wody? Można chyba było pokusić się o to dla dobrze określonych atomów tlenu, modelując sieć wiązań wodorowych.

Po drugie, chętnie usłyszę więcej szczegółów o udokładnianiu pełnomacierzowym, bez więzów, z wszystkimi refleksami, mającym na celu uzyskanie odchyleń standardowych. Czy jest to udokładnianie typu DAMP 0?

Po trzecie, na jakiej podstawie określano czynniki obsadzenia dla fragmentów nieuporządkowanych? Czy były one udokładniane? A jak to wyglądało dla cząsteczek wody? Z tymi ostatnimi mam zresztą kłopot związany z ich liczeniem. Np. dla kompleksu Mn w tabeli 12 mamy 92 atomy tlenu z wody, a na stronach 77 i 78 dowiadujemy się o 88 cząsteczkach wody, których obsadzenia sumują się do 77.5. Dla kompleksu Zn odpowiednie wartości wynoszą 75 (tabela) oraz 77 i 62,1. W tabeli 12 dodatkowo – w linii „liczba atomów” – nie pojawiają się atomy organicznego kationu. Pojawiają się one za to np. w zestawieniu średnich wartości równoważnych czynników B. Dlaczego?

Nie mogę się nie zapytać o ostatnie mapy resztkowej gęstości elektronowej w przypadku najlepszych danych (Mn, a także K) – czy pojawiała się resztkowa gęstość na wiązaniach?

Wreszcie zaczyna się część pracy, opisująca wyniki. O jakości naukowej rezultatów może świadczyć fakt, że część wyników została niedawno (2012 i 2013) opublikowana w dwóch artykułach, które ukazały się w Acta Cryst. Part D – czasopismo

to może pochwalić się czynnikiem wpływu 14.1, a poza tym jak dotąd czasopisma Międzynarodowej Unii Krystalograficznej cieszą się zasłużoną reputacją bardzo wysokich wymagań formalnych, jakie trzeba spełnić, żeby tam publikować. Trochę mnie to zwalnia z oceny jakości wyników...

Głównym wynikiem pracy jest – możliwa dzięki znakomitym danym – szczegółowa analiza geometrii cząsteczek kwasu, ich oddziaływań w sieciach kryształów (co może dawać wskazówki na temat oddziaływań w warunkach biologicznych), miejsc i rodzajów koordynacji kationów metali. Autor był w stanie opisywać niewielkie zmiany w parametrach opisujących konformację kwasów i potwierdzić postulowaną wcześniej sporą labilność helisy, wpływ otoczenia i stabilizowanie konformacji wiązaniami wodorowymi. Warto podkreślić, że część badań – związanych z kompleksem hybrydy DNA:RNA – wiąże się z postulowaną rolą dupleksów DNA:RNA o sekwencji polipurynowej z wirusa HIV-1 w oddziaływaniach z enzymem odwrotnej transkryptazy tego wirusa.

Moje ogólne wrażenie dotyczące dyskusji wyników jest bardzo pozytywne. Autor spokojnie, szczegółowo opisuje struktury cząsteczek i kryształów nie pomijając chyba żadnego istotnego aspektu. Powtórzę to, co pisałem niedawno w innej recenzji – widać dobrą szkołę...

Niemniej o kilka szczegółów chciałbym dopytać.

Rozpocznę prośbą o pewne wyjaśnienie. Informacje na ten temat są w różnych miejscach pracy, ale chciałbym się dowiedzieć wprost jaki jest stopień izostrukuralności struktur krystalizujących w grupie $P2_12_12_1$ z bardzo podobnymi parametrami komórki elementarnej. Czy np. ułożenie DNA jest podobne, czy też identyczność symetrii i podobieństwo komórek elementarnych ma inne przyczyny?

Druga uwaga, wyniki np. w Tabeli 22 i 23 są opatrzone odchyleniami standardowymi, natomiast w tekście (np. str. 69) te same wyniki są nie dość, że bez odchyłeń, to jeszcze mają jedno miejsce dziesiętne więcej. Tak samo wątpię w dwie znaczące cyfry dziesiętne np. dla parametru *inclination* (np. s. 67). W ogóle, wartości w tekście często są pozbawione odchyłeń standardowych, które w przypadku tak dobrych wyników, powalających na obliczanie odchyłeń standardowych współrzędnych, mogłyby zostać obliczone.

Na stronie 74 przy okazji opisu struktury kompleksu z kationami Zn pojawia się anion chlorkowy, o którym wcześniej nie znalazłem wzmianki. W jaki sposób go zidentyfikowano?

Na str. 77 Autor pisze o wiązaniu wodorowym O...N o długości 2.29(6)Å – ta wartość jest szalenie krótka. Jak można uzasadnić tak krótki kontakt? Tym bardziej, że parę stron dalej (s. 80) Autor poddaje w wątpliwość racjonalność krótszego co prawda wiązania wodorowego o długości 2.16Å.

Tych kilka uwag, wynikających w dużej mierze z chęci znalezienia czegokolwiek, o co mógłbym zapytać, w żaden sposób nie zmniejsza wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy. Pan mgr Drożdżał wykonał dużą i co ważne skuteczną pracę doświadczalną, poparł ją wiedzą i uzyskał naprawdę wartościowe wyniki. To jest praca dojrzałego naukowca.

Muszę podkreślić staranność edytorską pracy. Oczywiście, błędy niezauważone w korekcie można znaleźć, kilka przykładowych wymieniam powyżej, ale są to po pierwsze drobne, a po drugie nieliczne usterki, które nie wpływają na ogólną przyjemność czytania tej pracy.

Przykładowe usterki: s. 1, l.2 dodatkowe „i”, s. 2 l.7 dodatkowe „a”, s. 7 l. 2 „pod względem kątów torsyjnych”, s. 10 l. 3 Japonia, s. 22 55 – 80°, średnia -62°, s. 26 ll. 7-10 nieporadny styl, s. 28 l. 1 „Domeny”, s. 39 l. 5 „amiokompleksów”, s. 54 i in. „cząsteczki” itd.

Rysunki w pracy są starannie przygotowane i pełnią ważną rolę, wspierając rozumowanie Autora. Może ułatwiłoby mi ocenę jakości wyników zamieszczenie części z rysunków struktur w obrazie elipsoid drgań termicznych. Również bibliografia jest bogata i moim zdaniem wyczerpująca, to 218 pozycji starannie wybranych i dobrze opisanych pozycji literaturowych.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie Pana magistra Pawła Drożdżała do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na znaczenie naukowe wyników potwierdzone świetnymi publikacjami, składam wniosek, aby Rada Wydziału

Chemii UAM w określony przez siebie sposób rozpatrzyła wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy.

Maay Al