



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii

dr hab. Dominik Gront, prof UW
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii



Warszawa,
dnia 24 marca 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej

„Wykorzystanie metod modelowania komputerowego do poprawy właściwości katalitycznych enzymu biotechnologicznego Hydrataza Nitrylowa”

złożonej przez panią magister Julię Berdychowską.

Enzymy odgrywają kluczową rolę w biotechnologii i przemyśle, umożliwiając przeprowadzanie reakcji chemicznych w warunkach łagodnych, z wysoką specyficznością i efektywnością. Ich zastosowanie obejmuje szeroki zakres sektorów, w tym przemysł farmaceutyczny, spożywczy, chemiczny oraz ochronę środowiska. W produkcji leków enzymy pozwalają na stereoselektywną syntezę związków bioaktywnych, w przemyśle spożywczym przyczyniają się do poprawy smaku, tekstury i trwałości produktów, a w procesach bioremediacji wspomagają degradację zanieczyszczeń organicznych. Dynamiczny rozwój biotechnologii umożliwia projektowanie i modyfikację enzymów, co zwiększa ich stabilność oraz dostosowanie do specyficznych warunków technologicznych. Z tego względu badania nad enzymami i ich zastosowaniami mają istotne znaczenie zarówno dla nauki, jak i dla rozwoju nowoczesnych technologii przemysłowych. Naturalnie enzymy funkcjonują w roztworach wodnych, gdzie ich struktura i aktywność są stabilizowane przez oddziaływania z cząsteczkami wody. Jednak w wielu procesach technologicznych, takich jak synteza leków, produkcja biopaliw czy modyfikacja polimerów, stosuje się rozpuszczalniki organiczne o różnym stopniu polarności, które mogą denaturować enzymy lub obniżać ich aktywność. Z tego względu konieczne jest opracowanie strategii stabilizacji enzymów, takich jak immobilizacja, inżynieria białek czy modyfikacje chemiczne, aby zwiększyć ich odporność na działanie rozpuszczalników organicznych. Badania w tym zakresie mają kluczowe znaczenie dla poszerzenia możliwości wykorzystania enzymów w syntezach organicznych i procesach biotechnologicznych, które wymagają specyficznych warunków reakcyjnych.

Rozprawa doktorska, którą miałem przyjemność recenzować, została napisana w języku polskim i składa się z siedmiu rozdziałów, poprzedzonych spisem treści, a także wykazem często używanych skrótów. We „Wstępie” autorka nakreśla szerokie tło tematyczne rozprawy, wprowadzając czytelnika w zagadnienia związane ze strukturą, aktywnością i specyficznością enzymu hydratazy nitrylowej (NHazy) oraz jego znaczenia w przemyśle. Kolejny, bardzo krótki, bo niespełna dwustronicowy rozdział, wymienia trzy cele badawcze, które obrała autorka: (a) podniesienie aktywności katalitycznej NHazy, (b) poprawienie termostabilności tego enzymu, oraz (c) zbadanie, dlaczego enzym traci swoją aktywność, gdy rośnie stężenie produktów. W kolejnej części opisano metodykę pracy: algorytm dynamiki molekularnej, oraz inne metody obliczeniowe, które posłużyły do analizy wyników. W rozdziale tym czytelnik odnajdzie również protokoły symulacji prze-

prorowadzonych przez doktorantkę. Opisy te są dość dokładne, choć w mojej ocenie powinny się tam również znaleźć rozmiary skrzynek symulacji, a także liczby poszczególnych indywiduów chemicznych, np. jonów czy cząsteczek wody. Następna część to przegląd tematyki zachowania się enzymów o znaczeniu biotechnologicznym w rozpuszczalnikach niewodnych. Po tym rozdziale następują trzy rozdziały dedykowane trzem oddzielnym problemom badawczym, postawionym przez doktorantkę. Ostatecznie czytelnik przechodzi do listy publikacji, wymieniającej dwie prace mgr Berdychowskiej, powstałe w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej oraz trzy jej wcześniejsze artykuły. Pracę kończy dodatek, poświęcony technikaliom związanym z wyznaczaniem kanałów w białkach oraz bibliografia.

Rozprawa doktorska jako całość prezentuje się dobrze: jej konstrukcja jest przemyślana i spójna. Trzy postawione przez autorkę cele są ze sobą ściśle powiązane i zdecydowanie stanowią ważny problem badawczy. Sporo wątpliwości budzi jednak język pracy oraz graficzne opracowanie wyników. Czytelnik napotka całe akapity zbudowane wyłącznie ze zdań pojedynczych. Udział zdań złożonych, chociażby tak często wykorzystywanych w tekstach naukowych zdań przydawkowych, jest w moim odczuciu zbyt mały. Błędy składniowe, dość liczne w pracy, niekiedy zmieniają sens merytoryczny, jak na przykład fragment („*nawet ograniczone czasowe modelowanie*” na str. 30), który zapewne dotyczy modelowania ewolucji układu w krótkim przedziale czasowym. W pracy zauważyłem także błąd ortograficzny („*zwarzywszy na dość luźną strukturę tetrameru*” na str. 72). Autorka nie uniknęła przejęzyczeń („*amidy wywołują jakieś aminy konformacyjne*”, str. 110) a także wyrażen żargonowych, jak na przykład termin „*kros-korelacja*”, zapewne mając na myśli korelację krzyżową. Wielki słownik języka polskiego (wydanie internetowe) nie zna także terminu „*ekwilibracja*”, choć w polskojęzycznym internecie wyraz ten powszechnie stosuje się w znaczeniu korekty zgryzu, a więc zabiegu polegającego na zmianie kształtu zębów, wypełnień oraz uzupełnień protetycznych. Wiele do życzenia pozostawiają również ilustracje. Czcionka w podpisach osi większości wykresów jest tak mała, że trudno odczytać wartości liczbowe. Wizualizacje struktur enzymu również są mało czytelne.

Powyższe uwagi mają jednakże jedynie charakter edytorski i nie powinny przesłaniać ogólnego obrazu badań pani mgr Berdychowskiej. Doktorantka podjęła trzy, ściśle powiązane ze sobą tematy badawcze, które w sumie mają ogromny potencjał wdrożeniowy. Pierwszy problem dotyczył poprawienia aktywności NHazy. Problem ten rozwiązywano, sprawdzając jednopunktowe mutacje w sekwencji enzymu. Szczególnie korzystna okazała się mutacja L48D. W swojej pracy autorka przeanalizowała wpływ mutacji na strukturę białka. Obliczenia metodą dynamiki molekularnej pokazały, że rzeczona mutacja faktycznie ma znaczący wpływ na kształt i objętość kieszeni enzymu. Autorce udało się zatem wyjaśnić jej rolę, choć spostrzeżenie, że w oparciu o symulacje MD można zaprojektować warianty enzymu o polepszonych właściwościach fizykochemicznych, jest w mojej ocenie nieco zbyt daleko idące ze względu na wysoki koszt obliczeniowy takiego podejścia.

Kolejne rozpatrywane w pracy zagadnienie to poprawa termostabilności NHazy poprzez kowalencyjne połączenie jednostek α i β w jeden łańcuch aminokwasowy. Rozwiązanie to niewątpliwie obniża entropię stanu nieustrukturyzowanego białka i tym samym wpływa na ΔG jego fałdowania. Podobnie jak w poprzednim przypadku, autorka przeanalizowała wyniki symulacji dynamiki molekularnej i wskazała kilka czynników, które tłumaczą dane eksperymentalne. Wyniki

tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules*.

Ostatnie postawione w pracy pytanie to dlaczego aktywność NHazy spada przy rosnącym stężeniu amidów. Autorka sformułowała cztery możliwe hipotezy, przy czym sprawdziła dwie z nich. Według pierwszej reorganizacja struktury przestrzennej enzymu pociąga za sobą zmianę geometrii centrum aktywnego. Druga zaś sugeruje, że produkt reakcji - akryloamid - gromadzi się w kanałach oraz przy powierzchni białka, utrudniając dalszy bieg reakcji. Przetestowanie pozostałych dwóch hipotez, a więc efekt równowagi termodynamicznej oraz katalizowana akryloamidem denaturacja NHazy, było poza zasięgiem doktorantki. Pani mgr Berdychowska zbadała oddziaływanie zarówno akryloamidu, jak i akrylonitrylu z powierzchnią białka, wykazała również, że molekuły akryloamidu wpływają w pewnym stopniu na czwartorzędową strukturę enzymu, zwłaszcza na jego podjednostki β . Dodatkowo zauważyła, że grupy boczne aminokwasów tworzących kanały wewnątrz NHazy mogą preferować molekuły akrylonitrylu.

Podsumowując swoje spostrzeżenie, autorka nadmienia, że „Dokładniejsze zbadanie tej zależności to ciekawy temat przyszłych modelowań.”. W istocie większość symulacji opisanych w pracy wymaga powtórzenia w celu zebrania lepszej statystyki. W mojej ocenie 500ns nie jest okresem wystarczającym; czas ten należałoby istotnie wydłużyć. Autorka jest świadoma tego problemu i wspomina o tym kilkakrotnie w swojej rozprawie. Niemniej, typowa mikrosekundowa symulacja białka globalnego w jawnym rozpuszczalniku zajmuje około dwóch tygodni czasu rzeczywistego, a typowy doktorat trwa cztery lata. Dostęp do zasobów obliczeniowych nie powinien być przeszkodą, skoro infrastruktura PLGrid przyznaje granty obliczeniowe w wymiarze kilku lat czasu procesora. Zbyt krótkie symulacje nie tylko wpływają na opis ilościowy, lecz także wprowadzają potencjalne ryzyko błędnego jakościowego opisu badanego układu.

W swojej pracy doktorantka opisała szereg różnic pomiędzy łańcuchami AC oraz BD tetrameru NHazy, które zaobserwowała, analizując wyniki symulacji. Każdy z tych dwóch dimerów jednak składa się z jednego łańcucha typu α i jednego β a struktura całego tetrameru wydaje się symetryczna. Czy istnieją zatem jakieś strukturalne różnice pomiędzy tymi jednostkami? Jeżeli nie, to jaki może być powód ich odmiennego zachowania w trakcie symulacji?

Podsumowując, w toku swoich badań doktorantka wykonała szereg symulacji metodą dynamiki molekularnej, a następnie dokładnie przeanalizowała uzyskane wyniki. Rezultaty tych prac zostały opisane w dwóch publikacjach naukowych, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka osiągnęła wyznaczone cele a jej rozprawa zawiera oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. W mojej ocenie zatem przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn.zm.). Wnioskuję zatem o dopuszczenie pani magister Julii Berdychowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Dominik Gront, prof. UW

Podpisany elektronicznie przez
minik Gront; Uniwersytet Warszaw
24.03.2025
23:23:37 +01'00'