

Recenzja
pracy doktorskiej mgr Julii Berdychowskiej
pt.: „Wykorzystanie metod modelowania komputerowego
do poprawy właściwości katalitycznych enzymu biotechnologicznego Hydrataza
Nitrylowa”

Praca doktorska mgr Julii Berdychowskiej jest dopełnieniem badań dra hab. Łukasza Peplowskiego nad komputerowym projektowaniem wariantu enzymu hydratazy nitrylowej, który skuteczniej pełniłby rolę katalizatora przy przemysłowej produkcji akrylamidu, niż enzymy natywne otrzymywane wprost z bakterii. W odpowiedzi na to biotechnologiczne zapotrzebowanie, Doktorantka zbudowała szereg komputerowych modeli różnych wariantów strukturalnych hydratazy nitrylowej, przeprowadziła żmudne analizy wygenerowanych modeli i krytycznie oceniła otrzymane wyniki. Przy budowie modeli korzystała zarówno z rozwiązanych jak i przewidzianych struktur białka.

Rozprawa doktorska Julii Berdychowskiej podzielona jest na 8 rozdziałów, z czego trzy to Wyniki. Poniżej omówię krótko zawartość pierwszych czterech rozdziałów, następnie podsumuję główne wyniki badań i płynące z nich wnioski zaprezentowane w rozdziałach Wyniki.

Rozdział 1. Wstęp

Po krótkim wprowadzeniu podkreślającym rolę biotechnologii, a szczególnie modyfikowanych enzymów, w „czystej” produkcji, Doktorantka przechodzi do opisu hydratazy nitrylowej (NHaza), enzymu, który jest obiektem Jej pracy. Najczęściej NHaza jest dimerem dwóch podjednostek α i β . Centrum aktywne białka znajduje się w podjednostce α , w którym związany jest jon metalu, niehemowe żelazo lub kobalt. NHaza jest aktywna jako tetramer; katalizuje reakcję, w której z nitrylu powstaje amid, jednak przebieg reakcji nie jest do końca poznany.

NHaza, która jest syntetyzowana przez bakterie, znalazła szerokie zastosowania w przemyśle do produkcji akrylamidu. Wykorzystanie naturalnego białka w produkcji jest jednak ograniczone przez jego niedostateczną stabilność. Brak stabilności enzymu można eliminować wprowadzając modyfikacje do jego struktury pierwszorzędowej. Wpływ modyfikacji na właściwości enzymu są badane w grupie prof. Wiesława Nowaka metodami komputerowymi, a we współpracującym Key Laboratory of Industrial Biotechnology w Chinach, metodami biochemicznymi.

W badaniach opisanych w pracy użyto NHazy pochodzących z trzech bakterii – struktury przestrzenne dwóch zostały rozwiązane metodami krystalograficznymi (pdb:1IRE i 3QXE), struktura jednej jeszcze nie. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo opisuje własności strukturalne i enzymatyczne hydratazy nitrylowej oraz omawia trzy zaproponowane mechanizmy reakcji enzymatycznej.

Rozdział 2. Cel prezentowanych badań. Układ pracy

Celem ogólnym pracy doktorskiej mgr Julii Berdychowskiej jest, cyt.: „lepsze poznanie struktury i dynamiki hydratazy nitrylowej przy pomocy metod komputerowego modelowania dynamiki”.

To lepsze poznanie ma dać odpowiedź na trzy pytania:

(A) Jak podnieść aktywność katalityczną NHazy?

(B) Co decyduje o termostabilności NHazy? Jak ją poprawić?

(C) Dlaczego NHaza stosowana w procesach przemysłowych traci swoją aktywność, gdy rośnie stężenie produktów (czyli amidów) w roztworze?

Rozdział 3. Metody modelowania i opis protokołów obliczeń

Główną metodą użytą w badaniach jest symulacje dynamiki molekularnej (MD). Do symulacji posłużył program NAMD oraz pole siłowe CHARMM27. Doktorantka opisuje pobieżnie podstawy metody oraz różne moduły oprogramowania, które wykorzystała do analiz trajektorii oraz przewidywania lub modyfikacji struktury białek.

Rozdział 4. Przegląd wyników modelowania enzymów biotechnologicznych w rozpuszczalnikach niewodnych

Ten rozdział poświęcony jest przeglądowi literatury opisującej badania komputerowe białek enzymatycznych o własnościach biotechnologicznych, a szczególnie wpływu rozpuszczalnika na te enzymy.

Rozdział 5. Analiza wyników symulacji dla Problemu A: poprawa aktywności

Wyniki oraz rysunki tego rozdziału zostały opublikowane w pracy, której Doktorantka jest współautorem [22, Guo J. *et al.*, Int. J. Biol. Macromol., 2022].

Celem badań opisanych w pracy oryginalnej było znalezienie takiego wariantu NHazy, który byłby odporny na wysoką temperaturę oraz posiadał wysoką aktywność katalityczną. Konieczność znalezienia takiego wariantu wynikała z warunków przebiegu przemysłowego procesu katalizy z udziałem tego enzymu. Badania eksperymentalne wykazały, że NHaza z termofilnych bakterii (StNHasa) jest termostabilna w temperaturach do 60° C, jednak jej aktywność enzymatyczna jest niska. Ponadto, struktura przestrzenna białka nie była znana. Aby przeprowadzić badania

komputerowe umożliwiające wyjaśnienie, jak modyfikacja w strukturze enzymu wpływa na poprawę jego aktywności katalitycznej, Doktorantka

1. zbudowała model homologiczny StNHazy, wykorzystując program SwissModel oraz rozwiązaną strukturę przestrzenną wzorca o identyfikatorze PDB 3VYH,
2. w podjednostce β modelu homologicznego wymieniła leucynę 48 znajdującą się w tunelu prowadzącym do centrum aktywnego enzymu, na kwas asparaginowy (Leu48Asp),
3. dla tego wariantu oraz dla białka dzikiego przeprowadziła symulacje MD,
4. na podstawie wygenerowanych trajektorii, wyjaśniła atomowo-molekularne podstawy wykazanej eksperymentalnie większej aktywności katalitycznej białka zmutowanego niż dzikiego.

Rozdział 6. Analiza wyników symulacji dla Problemu B: poprawa termostabilności

Większość wyników oraz rysunków tego rozdziału zostały opublikowane w pracy, której Doktorantka jest współautorem [20, Guo J. *et al.*, Int. J. Biol. Macromol., 2021].

Tetramer $\alpha\beta\beta\alpha$, który jest aktywną enzymatycznie formą NHazy, rozpada się pod wpływem temperatury. Temperatura rozpadu zależy od pochodzenia białka i jest w przedziale 20-60°C. W tej części pracy Doktorantka sprawdzała, jak połączenie linkerem podjednostek α i β w tetramerze PpNHazy o rozwiązanej strukturze 3D (PDB: 3QXE), poprawia jego stabilność i aktywność. Przeprowadzona eksperymentalnie selekcja linkerów wytypowała trzy, nazwane A8, B8 i C8. Na tej podstawie, Doktorantka

1. zbudowała modele komputerowy wariantów tetrameru z linkerami A8, B8 i C8 (warianty A8, B8 i C8),
2. ustaliła, że oddziaływania międzyatomowe w wariantcie A8 są liczniejsze niż w pozostałych wariantach, co wyjaśniało jego większą termostabilność,
3. dla wariantu A8 i białka dzikiego przeprowadziła symulacje MD,
4. przeprowadziła analizy wygenerowanych trajektorii i wyznaczyła szereg parametrów strukturalnych i fizykochemicznych, z których wynikało jednoznacznie, że tetramer białka, którego podjednostki α i β każdego z dimerów są połączone linkerami A8, jest stabilniejszy strukturalnie i termicznie niż białko dzikie.

Analizy, które nie były opublikowane w pracy [20], wykazały większą stabilność struktur drugorzędowych podjednostek wariantu A8 niż białka dzikiego.

Rozdział 7. Analiza wyników symulacji: Badanie przyczyn Problemu C czyli spadku aktywności przy rosnącym stężeniu amidów

Wyniki przedstawione w tym rozdziale nie były opublikowane przez Doktorantkę.

W trakcie katalizowanego NHazą procesu produkcji amidów, stężenie produktu w roztworze wzrasta, co powoduje spadek aktywności enzymu. Dla wyjaśnienia przyczyn tego spadku, Doktorantka użyła metod komputerowych by zbadać jak produkt katalizy NHazy wpływa na jej własności. Do badań wybrała PtNHazę o rozwiązanej strukturze przestrzennej (Kod PDB: 1IRE). W kolejnych krokach,

1. przeprowadziła szereg 500-ns symulacji MD tetrameru, dimerów i podjednostek NHazy w wodzie oraz w roztworach zawierających akrylamid (ACA) i akrylonitryl (ACN) w różnych stężeniach.
2. dla każdego układu wyznaczyła szereg użytecznych i stosunkowo łatwych (m. in RMSD, RMSF, SASA) oraz stosunkowo trudniejszych (analiza drgań normalnych, oddziaływania ligand-białko) do uzyskania czy analizy, parametrów,
3. przeprowadziła wnikliwą analizę wyników i na jej podstawie określiła jak wzrost stężenia produktu katalizy w roztworze wpływa na strukturę tetrameru, dimerów i podjednostek oraz na centrum aktywne.

Konkluzje z tej części badań można podsumować następująco:

1. przy rosnących stężeniach produktu struktura podjednostki α NHazy jest stabilniejsza niż podjednostki β ,
2. wpływ produktu na dynamikę podjednostki α jest mniejszy niż na podjednostkę β ,
3. produkt wpływa na rozluźnienie struktury dimeru $\alpha\beta$; im większe stężenie produktu, tym większe rozluźnienie,
4. kontakt pomiędzy podjednostkami w dimerze nie jest stały, ale podlega fluktuacjom.
5. wzrost stężenia produktów (amidów) nie ma wpływu na centrum aktywne i jego najbliższe otoczenie.

W mojej ocenie, najciekawsza część pracy dotyczy analizy kanałów, którymi ligandy ACA i ACN dostają się do centrum aktywnego białka (Roz. 7.10, 7.11, 7.12) oraz analiza zapełnienia kanałów przez ligandy (Roz. 7.15). Wyniki uzyskane przez Doktorantkę można podsumować następująco:

1. liczba kanałów nie jest stała – ulega zmianie w trakcie symulacji,
2. reszty tworzące kanały zmieniają się – możliwe, że wraz ze zmianą stężenia produktu (amidów),
3. w wyższych stężeniach produktu, struktura NHazy ulega rozluźnieniu,
4. kanały w białku są preferencyjnie obsadzone przez nitryle (ACN), choć amidy (ACA) stanowią większość ligandów w roztworze; można przyjąć że jest to cyt.: „zgodne z funkcją fizjologiczną tego enzymu, który w bakteriach pobiera właśnie nitryle, a po hydratacji wyrzuca amidy.”

Badania mgr Julii Berdychowskiej opisane w rozprawie doktorskiej są badaniami podstawowymi, ale odpowiadającymi na zapotrzebowanie przemysłu związanego z produkcją związków amidowych. Badanie własności enzymu metodami klasycznego modelowania molekularnego jest pewnym wyzwaniem, gdyż metoda nie pozwala na modelowanie reakcji chemicznych. Jednak badania nad NHazą prowadzone są we współpracy z grupą eksperymentalną, która wprowadza modyfikacje do struktury enzymu i sprawdza ich potencjalną użyteczność przemysłową. Dzięki temu, grupa komputerowa dostaje do badań już wyselekcjonowane eksperymentalnie warianty enzymu. Zadaniem grupy jest wyjaśnienie, dlaczego te warianty mają własności korzystniejsze do zastosowań przemysłowych niż natywny enzym. Innymi słowy, korzystając z atomowej rozdzielczości metod modelowania molekularnego, badania komputerowe wskazały jakie są podstawowe przyczyny skuteczności wprowadzonych eksperymentalnie modyfikacji struktury enzymu.

Na szczególne podkreślenie zasługuje ogrom pracy jaki Doktorantka włożyła w opisane w rozprawie badania oraz jakość ilustracji. Niestety, te ostatnie nie zawsze są dostatecznie wyczerpująco opisane. Można wyrazić pewien żal, że w badaniach opisanych w Rozdz. 6 nie użyto białka zbudowanego w Rozdz. 5. Ale sekwencja czasowa badań była taka, że najpierw poprawiano termostabilność PpNHazy przez połączenie linkerami podjednostek α i β (Rozdz. 6), a później zbudowano model StNHasy pochodzącej z termofilnych bakterii (Rozdz. 5).

Strona merytoryczna pracy nie budzi zastrzeżeń, ale tekst pozostawia trochę do życzenia. Wprowadzając rozdziały wprowadzające czyta się dobrze i dużym zainteresowaniem, to rozdziały opisujące wyniki mają sporo potknięć językowych, zapewne po części wynikających z dość bezpośredniego tłumaczenia z angielskiego (Rozdz. 5 i 6). Wygląda też, że Rozdz. 7 był pisany w pośpiechu – tam jest najwięcej potknięć. Szkoda, że wyniki opisane w Rozdz. 7 nie są jeszcze opublikowane. Szkoda też, że Doktorantka nie zrobiła ilustracji pokazujących wnętrza kanałów K1 i K2 – zobaczenie jak one wyglądają „od środka” byłoby bardzo interesujące.

Poniżej spisałam przykładowe potknięcia i błędy znalezione w tekście rozprawy:

Błędy językowe:

„nie było wiedzy na temat”; „zamienili tą helisę” zamiast „tę helisę”; „jest bardziej stabilna” zamiast „stabilniejsza”; „po okresie ekwilibracji” – po polsku to byłoby „równoważenia” (wg. Internetu, ekwilibracja to korekta zgryzu); „... utrata aktywności w wysokich stężeniach przynajmniej częściowo może mieć ten sam czynnik jak w przypadku utraty aktywności w wysokiej temperaturze.” – nie jest to poprawne zdanie; „ilość kontaktów” zamiast „liczba kontaktów”; „zwiększony kontakt”?; „nie przyniosła zauważenia”?; „...jeśli amidy wywołują

jakieś aminy konformacyjne czy strukturalne to...”?; Str. 96. „miejsca, które potencjalnie mogą ... dezaktywować enzym,”?

Błędy edytorskie:

na końcu tytułu nie daje się kropki; równanie Langevina, wzór 3.2 – opis: v – prędkość, Γ – współczynnik tarcia – V we wzorze to nie prędkość (v), ale potencjał (V), współczynnik tarcia to γ , a nie Γ – czynnik stochastyczny; rozdział 4 (Metody) pomyłony z rozdziałem 3; pomyłki w odniesieniach w tekście do rysunków; Rys. 7.29 jest b. mało czytelny.

Błędy merytoryczne:

1. p. 36 „kąty pomiędzy atomami”;
2. jak energia elektrostatyczna była liczona? Doktorantka pisze: „Do struktur (białek) zostały dodane otoczki wodne o rozmiarze co najmniej 10 Å w każdą stronę”, a „oddziaływania elektrostatyczne zostały obliczone za pomocą metody sumowania Ewalda”. Sumowanie Ewalda wymaga periodyczności układu, a białko otoczone warstwą wody nie jest układem spełniającym warunki periodyczności,
3. podpis pod rysunkami 7.2, 7.3, 7.4 „w stosunku do minimalnej struktury” – co to jest?

Rysunek 7.31. W opisie brakuje informacji, że objętość to sumaryczna objętość wszystkich sfer w kanale. Myślę, że do czytelnika lepiej przemawiałaby informacja, ile cząsteczek wody zmieści się w kanale, wiedząc, że objętość cząsteczki wody to 30 Å³.

Zauważone przez mnie pomyłki i błędy w pracy nie są związane z wykonanymi badaniami, analizą wyników i ich interpretacją. Uważam, że zarówno wykonanie jak i opracowanie oraz wnioski płynące z badań są na bardzo wysokim poziomie i świadczą o rzetelności pracy Doktorantki i Jej analitycznego podejścia do otrzymanych wyników.

Przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską pt., „Wykorzystanie metod modelowania komputerowego do poprawy właściwości katalitycznych enzymu biotechnologicznego Hydrataza Nitrylowa” uważam za bardzo dobrą i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Julii Berdychowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, gdyż spełnia wszystkie wymagania ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.