

Raport dotyczący pracy doktorskiej

Nazwisko i imię Doktorantki: Agata Raczyńska [sic!]

Tytuł pracy doktorskiej: Biodégradation de polymères synthétiques à l'aide d'enzymes

W oryginale tytuł w języku francuskim, tłumaczenie na polski z angielskiego według informacji na stronie <https://theses.fr/s255832?domaine=theses>: Biodegradacja polimerów syntetycznych z wykorzystaniem enzymów]

Doctorat de l'Université de Toulouse, délivré en co-tutelle avec Silesian University of Technology

Promotorzy: Isabelle Andre i Artur Góra

Istotność i oryginalność:

Praca magisterska przedstawiona przez Panią Agatę Raczyńską, zatytułowana „Biodégradation de polymères synthétiques à l'aide d'enzymes” [tytuł oryg. „Biodegradacja polimerów syntetycznych z wykorzystaniem enzymów”] jest wysoce istotna i oryginalna, wnosząc wkład w naukowe i techniczne aspekty związane z biodegradacją polimerów syntetycznych. Opiera się na aktualnym stanie wiedzy w tej dziedzinie i wcześniejszych pracach prowadzonych przez promotora i zespół badawczy. Kreatywne i innowacyjne koncepcje zaproponowane w pracy doktorskiej są bardzo obiecujące dla rozwoju tej dziedziny i są dobrze dostosowane do aktualnych wyzwań naukowych.

Spójność celów i hipotez:

Cele i hipotezy rozprawy są jasno określone i dobrze skonstruowane, charakteryzując się solidnymi podstawami logicznymi. Skutecznie ukierunkowują badania na osiągnięcie oczekiwanych rezultatów. Wnioski wyciągnięte z badań są spójne z uzyskanymi danymi, wykazując solidne zrozumienie ich celów i metodologii.

Organizacja i zasoby:

Praca jest doskonale zorganizowana, z wyraźnym powiązaniem dostępnych zasobów– w tym czasu, metodologii i narzędzi - z proponowanymi celami. Zastosowanie metody naukowej jest przemyślane, co zwiększa solidność projektu badawczego i jego wyników.

Wyniki i wkład w wiedzę naukową

Wyniki uzyskane w rozprawie wnoszą znaczący wkład do wiedzy naukowej w dziedzinie biodegradacji polimerów. Praca odnosi się do ważnych problemów i hipotez, a wyniki oferują cenne spostrzeżenia, które przyczyniają się do dalszego zrozumienia, nie tylko w tym konkretnym obszarze, ale także w pokrewnych dziedzinach nauki.

Krytyczne myślenie i dyskusja

Praca magisterska wykazuje się solidnym krytycznym myśleniem, a Kandydatka w przemyślany sposób analizuje temat i porównuje swoje odkrycia z wynikami wcześniejszych badań dostępnych w literaturze. Część pracy zawierająca dyskusję odzwierciedla głębokie zrozumienie i dobrze uzasadnione podejście do interpretacji wyników, podkreślając dojrzałość intelektualną Kandydatki.

Bibliografia i słownictwo techniczne

Praca magisterska doskonale wykorzystuje aktualną literaturę naukową. Bibliografia jest obszerna i dobrze dobrana, odzwierciedlając aktualny stan badań. Kandydatka stosuje również precyzyjne i odpowiednie słownictwo techniczne, dbając o to, aby treść była zarówno dokładna, jak i przejrzysta.

Język, pisownia i prezentacja

Język użyty w pracy jest jasny, precyzyjny i profesjonalny. Pisownia i gramatyka są bezbłędne, co zwiększa czytelność i jakość tekstu. Struktura pracy jest dokładnie zgodna ze spisem treści, a tabele i rysunki są wysokiej jakości, zapewniając wyraźne wizualne wsparcie dla wyników badań.



Konkretne, istotne aspekty uzasadniające dotychczasowe oceny

Raport przedstawiony przez Agatę Raczyńską w celu uzyskania stopnia doktora na Uniwersytecie w Tuluzie [Université de Toulouse], pod wspólną opieką naukową [en co-tutelle] z Politechniką Śląską, można uznać za wybitny ze względu na wiele aspektów. Jak zaznaczono powyżej, praca wykonana w ostatnich latach przez Kandydatkę jest oryginalna i prezentuje wysoki stopień innowacyjności. Cele zostały dobrze zaplanowane, a działania i zadania do wykonania były zgodne z oczekiwanymi rezultatami. W szczególności doktorat dotyczy enzymu kutynazy z [bakterii] *Thermobifida fusca* (TfCut2) i jego potencjału do degradacji poliuretanu (PUR), wykorzystując Impranil DLN jako modelowy substrat do badania aktywności katalitycznej enzymu. Badanie łączy długą listę technik obliczeniowych i eksperymentalnych (Rosetta docking, symulacje dynamiki molekularnej, analizy ProLIF, obliczenia MM-GBSA, wraz z testami aktywności enzymu, pomiarami termostabilności i eksperymentalną [spektroskopią] NMR). Symulacje dokowania molekularnego i dynamiki ujawniły krytyczne reszty kluczowe dla zdolności TfCut2 do wiązania Impranilu DLN, podczas gdy narzędzia do projektowania białek i metody analizy ewolucyjnej (projektowanie Rosetta, FoldX, HotSpotWizard i analiza MSA) zostały wykorzystane do zaprojektowania mutacji mających na celu zwiększenie wydajności enzymu. Eksperymentalna walidacja mutantów zidentyfikowała trzy warianty jednopunktowe - G62A, T61V i T207D - które wykazały znacznie zwiększone tempo degradacji, przy czym G62A osiągnął ponad dwukrotną poprawę w stosunku do enzymu typu dzikiego. T207D zwiększył również wydajność produkcji, co dodatkowo podkreśla potencjał racjonalnej inżynierii enzymatycznej w celu zwiększenia wydajności katalitycznej degradacji PUR.

Pomimo wyzwań związanych z heterogenicznością struktur PUR i produktów ich degradacji, niniejsze badanie ustala ramy dla dostosowania kutynaz do degradacji syntetycznych polimerów. Odkrycia oferują cenny wgląd w wiązanie substratów, potencjalne etapy ograniczające szybkość i przyczyniają się do opracowania zrównoważonych rozwiązań w zakresie recyklingu polimerów i rekultywacji odpadów z tworzyw sztucznych.

Wreszcie, warto zauważyć, że kilka badań zgłoszonych przez Kandydatkę zostało opublikowanych w prestiżowych czasopismach, takich jak *Faraday Discussions* (wyd. 60, nr 76, 2024, 10431-10438). Jej doświadczenie i aktualna wiedza w tej dziedzinie były kluczowe w przygotowaniu obszernego rozdziału 2, którego część została opublikowana jako przegląd enzymów degradujących PUR w *Biotechnology Advances* (wyd. 77, 2024, 1-19). Kandydatka jest wymieniona jako pierwsza autorka w obu publikacjach, co podkreśla jej znaczący wkład. Ponadto warto zauważyć, że Pani Raczyńska aktywnie uczestniczyła w kilku międzynarodowych konferencjach.

Uwagi i pytania do ewentualnej dalszej dyskusji z Kandydatką podczas egzaminu w celu rozwiania wątpliwości recenzenta i/lub potwierdzenia dojrzałości intelektualnej Kandydatki:

- 1) Kandydatka wspomina, że na podstawie przeglądu literatury dotyczącej enzymów degradujących PUR, przeprowadzonego w połowie [r.akad.] 2020/2021 r., zidentyfikowała kutynazę z bakterii *Thermobifida fusca* (TfCut2), której aktywność degradująca PUR - testowana na substratach, w tym Impranilu DLN - została zbadana przez Schmidta i in. [bibl. poz. 20], jako najbardziej obiecujący enzym w tym czasie do dalszych badań i przeprojektowania. Zastanawiam się, czy Kandydatka wybrałaby to samo początkowe białko rusztowania i ten sam model PUR, gdyby praca doktorska miała rozpocząć się dzisiaj?
- 2) Proponowany holistyczny ciąg enzymatycznej degradacji poliestrowego PUR (str. 20, Rys. 3) wygląda obiecująco. Jednak z technicznego punktu widzenia - w jaki sposób należy obsługiwać różne enzymy degradujące? tj. enzymy wspomagane, reaktor systemowy w trakcie przepływu, fuzje enzymów, inne [zagadnienia]?
- 3) Praca przedstawia ogólne mechanizmy degradacji, w których pośredniczą dwie możliwe triady katalityczne w miejscu aktywnym hydrolaz serynowych (strona 38). Chociaż mechanizm ten jest rzeczywiście akceptowany, czy jest możliwe, że niektóre etapy mogą zachodzić w sposób skoordynowany? Czy katalityczna seryna jest aktywowana, a atak nukleofilowy zachodzi jednocześnie? Czy te mechanistyczne szczegóły są istotne dla przyszłych wytycznych w projektowaniu białek?
- 4) Wspomniano, że „podejścia obliczeniowe można ogólnie sklasyfikować jako oparte na strukturze, oparte na sekwencji i oparte na danych pochodzących z uczenia maszynowego”, a następnie opisano te różne podejścia. Czy mutacje zlokalizowane daleko od miejsca aktywnego można przewidzieć na podstawie trzech wspomnianych podejść? Czy są one istotne?

- 5) Najwyraźniej dostępne miejsce wiązania („powierzchnia”) TfCut2 pozwala mu na interakcję z różnymi substratami, co musi być zaletą dla wiązania próbek PUR. Czy uważa Pani, że inne architektury, takie jak „kieszeń” lub „studnia” (jak opisano w rozdziale 2) mogą stanowić jakąkolwiek przewagę?
- 6) Głównym celem rozdziału 4 jest zidentyfikowanie kluczowych determinantów molekularnych w TfCut2, które przyczyniają się do rozpoznawania i wiązania PUR, zgodnie z jego mechanizmem hydrolizy. Pomysł polega na wybraniu ramek symulacji MD [dynamiki molekularnej], które przechwytyują produktywnie konfiguracje i analizie kluczowych interakcji. Czy jednak te produktywnie „migawki” są wystarczająco stabilne, aby można je było uznać za reprezentatywne? Jeśli nie są one stabilne (znacznie wypełnione w miarę progresji MD), w jaki sposób możemy uzyskać wiarygodne informacje z tych przejściowych struktur?
- 7) Aby zbadać różne pozycje wiązania ligandu, przeprowadzono próbkowanie konformacyjne za pomocą pakietu Confab w Open Babel (1.1.0). Zastanawiam się, dlaczego po prostu nie użyć oprogramowania do dokowania, aby wybrać najbardziej obiecujące struktury pokazujące 4 możliwe pozycje, a następnie zbadać konformacje za pomocą MD?
- 8) W związku z poprzednim komentarzem, czy analiza wyników interfejsu jest bardziej wiarygodna/istotna niż inne możliwe parametry, które można uzyskać z symulacji MD?
- 9) Krystalograficzny układ cząsteczek wody obecny w początkowej strukturze PDB (4CG1) został zachowany podczas tworzenia modelu. Nie twierdząc, że jest to błędne, czy jest możliwe, że niektóre [cząsteczki] wody były obecne w strukturze PDB w wyniku procesu krystalizacji, nie będąc istotnymi dla stanu aktywnego białka w roztworze?
- 10) Dla każdego symulowanego układu wykonano dziesięć powtórzeń po 50 ns, w sumie 500 ns symulacji MD. Czy jest to lepsze, gorsze czy równoważne z długimi [symulacjami] 500 ns MD? W jaki sposób monitoruje Pani [symulację] MD, aby potwierdzić, że układy osiągają stan równowagi?
- 11) Dlaczego ważne było potwierdzenie struktury Impranilu DLN za pomocą [spektroskopii] NMR? Czy struktura Impranilu DLN nie została już opisana?
- 12) Bardzo interesujące jest wykorzystanie 4 kutynaz: TfCut2 z Thermobifida fusca, LCC, Tcur0390 i Tcur1278. Jaki jest finalny cel tej strategii dla ostatecznego przeprojektowania tej pierwszej?
- 13) Obliczone energie interfejsu i energie całkowite dla wybranych pozycji zostały wymienione w Tabeli 4. Jednakże, biorąc pod uwagę niepewność związaną z raportowanymi danymi pochodzącymi z narzędzi dokowania, czy nie byłoby bardziej istotne lub prostsze raportowanie jedynie wolnych energii wiązania i danych geometrycznych obliczonych później na wyższym poziomie z symulacji MD?
- 14) Podczas raportowania wartości RMSD zależnych od czasu, należy określić, które atomy zostały użyte do obliczeń. Czy jest to istotne?
- 15) Jak wspomniano w rozprawie doktorskiej, wiązanie nienaturalnych substratów do miejsca aktywnego enzymu jest kluczowym etapem, aby kataliza mogła mieć miejsce. W związku z tym konieczna jest analiza, taka jak ta wyprowadzona z wykresów na Rys. 24-29. Czy jest możliwe, że dłuższe trajektorie dałyby inne wyniki?
- 16) Ostatnim celem pracy jest przeprojektowanie miejsca wiązania substratu TfCut2 w celu zwiększenia jego rozpoznawania i wiązania Impranilu DLN, na podstawie informacji uzyskanych z analizy kluczowych reszt wiążących zaangażowanych w interakcje białko:substrat, jak doskonale podsumowano na Rys. 38. Czy to możliwe, że mutacje daleko od miejsca wiązania mogą mieć znaczący wpływ na poprawę wydajności enzymu? Czy to możliwe, że aktywność enzymu można zwiększyć nie tylko poprzez wprowadzenie mutacji zwiększających energię wiązania, ale także stabilizujących kolejne etapy chemiczne? Czy nie identyfikuje Pani gorących punktów aminokwasów, które znajdują się daleko od miejsca aktywnego (tj. tych, które wpływają na elastyczność białka)?
- 17) Jaki jest błąd związany z obliczeniami FoldX różnicy energii ($\Delta\Delta G$) między mutantem a enzymem typu dzikiego? A co z wynikami $\Delta\Delta G$ Rosetty?
- 18) Jeśli chodzi o obliczenia FoldX, ujemne wartości $\Delta\Delta G$ wskazują, że mutacja może stabilizować białko, podczas gdy wartości dodatnie sugerują potencjalną destabilizację. Czy oznacza to, że istnieją możliwe mutacje w enzymie typu dzikiego, które dodatkowo stabilizują enzym, który ewoluował przez miliony lat? Czy też wyniki te odnoszą się do kompleksu enzym:Impranil?
- 19) Jak podobne są przewidywania uzyskane z obliczeń FoldX i MSA w porównaniu z tymi [uzyskanymi] z obliczeniowego projektowania białek przy użyciu algorytmu genetycznego? Jeśli się nie mylę, istnieją pewne rozbieżności (tj. patrz Tabela 8). Czy może Pani zracjonalizować ich pochodzenie?

- 20) W rozprawie wspomniano, że „Koncentrując się na miejscu wiązania enzymu, dążymy do osiągnięcia bardziej wydajnej degradacji substratu polimerowego”. Zgadza się. Jednak zgodnie z zasadą Sabatiera (dla katalizy heterogenicznej), silna stabilizacja kompleksu katalizator:substrat „zatrzymałaby” katalizatory. Czy może Pani omówić tę kwestię?
- 21) Walidacja obliczeniowa proponowanych wariantów TfCut2 opierała się na podobnych symulacjach jak w przypadku typu dzikiego (10 replik po 50 ns). Czy jest możliwe, że zmutowany enzym wymagałby dłuższej [symulacji] MD, aby osiągnąć równowagę dynamiczną? W tym momencie muszę się mylić, ponieważ zgodnie z Rys. 46, nowe [symulacje] MD zostały uruchomione na 500 ns, lub wykresy po prostu dodają 10 replik po 50 ns. Jako drobna uwaga - trudno jest przeanalizować szczegółowo ten rysunek, zawierający 24 pojedyncze mutanty, 5 mutantów wielokrotnych i typ dziki. Również jako drobna uwaga - podpis pod Rys. 50 nie opisuje paneli C i D.
- 22) W odniesieniu do walidacji obliczeniowej - czy monitorowano również kluczowe odległości określające względną pozycję Impranilu w stosunku do białka? Czy wiązanie $\Delta\Delta G$ zostało obliczone za pomocą MM/PBSA dla któregośkolwiek z najbardziej obiecujących wariantów (tj. T61V, G62A, T207D)?
- 23) W związku z poprzednim komentarzem - zastanawiam się, czy trzy proponowane mutacje, które są umiejscowione w miejscu aktywnym (w pobliżu dziury oksyanionowej lub bardzo blisko reszt katalitycznych, takich jak His208), mogą wpływać nie tylko na wiązanie Impranilu, ale także na kolejne etapy chemiczne.
- 24) W Rozdziale 6 stwierdzono, że niezwiększona wydajność katalityczna proponowanych wariantów sugeruje, że wiązanie ligandu nie jest etapem ograniczającym szybkość degradacji Impranilu DLN. Zamiast tego inne czynniki, takie jak stabilność strukturalna, właściwości powierzchniowe lub dynamika miejsca aktywnego, mogą odgrywać bardziej krytyczną rolę w określaniu wydajności enzymu. Czy to możliwe, że etapy chemiczne były etapem ograniczającym szybkość? Jeśli się nie mylę, jest to zasugerowane w rozdziale „Wnioski”, gdzie wspomina się, że dodatkowymi czynnikami, które mogą przyczynić się do degradacji PUR, może być liczba obrotów enzymu.
- 25) Wreszcie, godny uwagi jest ostatni rozdział poświęcony ograniczeniom obecnego badania i przyszłym perspektywom. Zastanawiam się, czy którekolwiek z ograniczeń można uznać za bardziej znaczące niż inne i jakie proponowane przyszłe kierunki są uważane za najbardziej obiecujące. W związku z tym, czy proponowane połączenie trzech udanych mutacji jednopunktowych jest bardzo wymagającym zadaniem, skoro protokół został już ustalony zgodnie z niniejszą rozprawą?

Podpisano przez:

[dane podpisu cyfrowego] Vicent Moliner Ibáñez 2025.02.04 12:36:04 +01'00'

Profesor Dr Vicent Moliner

www.biocomp.uji.es

Instytut Zaawansowanych Materiałów [Institute of Advanced Materials] (INAM)

Uniwersytet Jaume I

12006 Castellón

Hiszpania

Ja, Małgorzata Sokołowska, tłumacz przysięgły języka angielskiego w Gliwicach, nr wpisu na listę tłumaczy przysięgłych TP/1509/05. Poświadczam zgodność niniejszego tłumaczenia z okazanym mi plikiem pdf sporządzonym w języku angielskim.
Gliwice, dnia 17 lutego 2025 r. Repertorium nr 069/2025.

