

Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na ocenie obliczeniowej i projektowaniu nowych wariantów TfCut2 do degradacji poliuretanu (PUR), jednego z głównych czynników przyczyniających się do powstawania odpadów z tworzyw sztucznych. Praca jest podzielona na kilka rozdziałów, które koncentrują się na opracowaniu ciągów obliczeniowych dla: (1) generowania dokładnych modeli struktury enzym-polimer oraz do badania i charakteryzowania jej dynamiki, stabilności i aktywności katalitycznej, a także (2) do projektowania nowych ulepszonych wariantów o wyższej aktywności degradacji PUR. Imponująca liczba technik i algorytmów została połączona, aby sprostać tak trudnemu tematowi. W rozprawie przedstawiono kilka wariantów, które wykazują nieco wyższą aktywność katalityczną w porównaniu z typem dzikim, co może służyć jako podstawa do dalszej ewolucji.

Praca jest dobrze napisana i zawiera wiele różnych szczegółów na temat badanego enzymu i polimeru, a także metodologii i przeprowadzonych testów eksperymentalnych. Z mojego punktu widzenia przedstawiona praca jest doskonała.

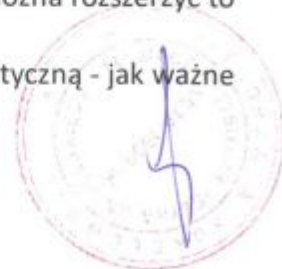
Mam kilka uwag i pytań do dalszej dyskusji, które podsumowuję poniżej.

Uwagi ogólne/pytania:

1. W rozdziale 1 wspomniano, że badania obliczeniowe testują oddziaływania pojedynczych cząsteczek w izolacji, podczas gdy wyniki eksperymentalne reprezentują uśredniony widok wielu cząsteczek w różnych stanach konformacyjnych. W jaki sposób dane [symulacji] MD mogą być powiązane z obserwacjami eksperymentalnymi? Czy mogłaby Pani zaproponować jakieś strategie, aby złagodzić ten punkt?
2. Jedną z wielu przeszkód w badaniu enzymów degradujących plastik jest model obliczeniowy używany do naśladowania plastiku, w Pani przypadku użyto Impranilu DLN, którego struktura jednak nie jest znana. Jak zbudować odpowiedni model PUR/plastiku? Skąd Pani wie, że taki model jest poprawny? Jest to również omówione w rozdziale 4 (patrz poniżej).
3. Na Rysunku 7 przedstawiono reszty miejsc aktywnych Ser-His-Asp i Ser-(cis)Ser-Lys. Jaki powinien być stan protonacji Lys76 dla katalizy? W jaki sposób Lys76 bezpośrednio wiąże się z substratem? Czy mogłaby Pani również skomentować różnice w resztach dziury oksyanionowej?
4. Kluczowym punktem dla reaktywności jest obecność cząsteczek wody. Biorąc pod uwagę doświadczenie grupy w analizie wody, jakie jest najlepsze rusztowanie (z trzech typów omawianych enzymów, Tabela 2 i Rys. 5) dla: umożliwienia wiązania polimeru, przy jednoczesnym zapewnieniu obecności wody katalitycznej? Jak to ocenić obliczeniowo?

Rozdział 4: Rozdział ten koncentruje się na charakterystyce obliczeniowej TfCut2, generowaniu odpowiedniego modelu dla Impranilu DLN oraz interakcji enzym-polimer.

5. Aby ocenić najlepszy model PUR/kompleks enzymu, użyła Pani modułu Rosetta relax, a następnie przefiltrowała je na podstawie wyniku interfejsu i wyniku całkowitego (w RU). Jak dobre są uzyskane pozycje pod względem katalizy (odległość katalityczna i odległości oksyanionowe)? Czy można je najpierw przefiltrować według odległości katalitycznych, a następnie przefiltrować według terminów energetycznych Rosetty? Czy można rozszerzyć to podejście do modelowania niektórych półproduktów reakcji?
6. Związane z 5. Kluczowe odległości użyte w badaniu obejmują triadę katalityczną - jak ważne jest prawidłowe rozmieszczenie reszt dziury oksyanionowej?



7. Schemat filtrowania pozycji MD został użyty do znalezienia katalitycznie kompetentnych pozycji. Czy ten schemat filtrowania może zostać użyty do projektowania i oceny nowych enzymów? Czy te przefiltrowane ramki są używane do analizy ProLif i MM-GBSA?
8. Pozycjonowanie jonów Ca^{2+} w strukturze TfCut2 w celu przeprowadzenia symulacji MD jest kwestią kluczową. Użyła Pani protokołu opartego na 10 replikach 50 ns MD z jonami Ca^{2+} umieszczonymi w czterech domniemanych miejscach zidentyfikowanych w danych rentgenowskich. Czy sprawdziła Pani i porównała wyniki z AF3?

Rozdział 5: W tym rozdziale opracowano ramy obliczeniowe do generowania nowych, ulepszonych wariantów TfCut2 dla Impranilu DLN.

9. Czy dziewięć pozycji zidentyfikowanych w miejscu wiązania jako potencjalne miejsca mutacji może wpływać na dynamikę konformacyjną enzymu? Czy zna Pani jakieś strategie charakteryzowania dynamiki konformacyjnej enzymu i potencjalnych miejsc konformacyjnie istotnych?
10. Funkcja przystosowania zastosowana w algorytmie genetycznym została zaprojektowana w celu optymalizacji powinowactwa wiązania. Jak dobra jest ta funkcja przystosowania w przypadku katalizy?
11. Wybór najlepszych kandydatów do testów eksperymentalnych jest zawsze problematyczny, a na koniec wybór ten został starannie przeprowadzony poprzez oględziny, ocenę interakcji hydrofobowych, analizę MSA itp. Czy ten ranking i selekcja mogłyby zostać przeprowadzone w oparciu o ocenę odległości katalitycznych dla katalizy? Kluczowym punktem jest elastyczność i zawartość wody - czy można ocenić wpływ mutacji na zawartość wody?

Rozdział 6: Rozdział ten koncentruje się na ocenie zarówno obliczeniowej, jak i eksperymentalnej proponowanych mutantów TfCut2, racjonalnie zaprojektowanych w poprzednim rozdziale.

12. Trzy z 25 wariantów wykazywały podobną aktywność typu dzikiego, podczas gdy 3 wykazały lepszą wydajność. Protokół projektowania opierał się na poprawie powinowactwa wiązania - co by Pani zmieniła, gdyby musiała Pani zacząć od nowa? Czy poszukiwanie lepszego powinowactwa wiązania może sprzyjać inhibicji substratu lub produktu?
13. Co ciekawe, dwie z badanych mutacji (T61V i G62A) sąsiadują bezpośrednio (+1 lub +2) z dziurą oksyanionową Y60. Czy mutacje te mogą wpływać na reorganizację dziury oksyanionowej?
14. W związku z 13, T207D sąsiaduje z katalitycznym H208 i znajduje się blisko katalitycznego D176. Czy ta substytucja może również wpływać na pozycjonowanie katalitycznej cząsteczki wody? Wspomniano, że T207D może również przyczyniać się do uwalniania produktu, czy ma Pani dowody eksperymentalne/komputerowe na taką obserwację?

[dane podpisu cyfrowego]

Cyfrowo podpisane przez

Silvia Osuna Oliveras – DNI 40440800S (TCAT)

Data: 2025.02.03

16:21:00 +01'00'

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 070/2025.

