

**Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński**  
Katedra Technologii Leków i Biochemii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska  
Ul. Narutowicza 11/12  
80-233 Gdańsk, Polska  
Tel.: (58) 347 15 96  
e-mail: chemmbag@pg.edu.pl



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

---

Gdańsk 24.01.2025

**Recenzja pracy doktorskiej  
Mgr. Nishita Mandal**

**Tytuł:**

**Spojrzenie na molekularny mechanizm leżący u podstaw rzadkich procesów transportowych w enzymach z ukrytymi miejscami aktywnymi**

Przedstawiona do recenzji praca stanowi przedstawienie i omówienie wyników badań prowadzonych przez mgr. Nishita Mandal na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu w Zakładzie Ekspresji Genów Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM. Promotorem pracy jest dr hab. Jan Berezovsky, prof. UAM. Praca jest przedstawiona w formie zbioru czterech publikacji (w tym jednego preprintu) opatrzonej wstępem i omówieniem wyników. Praca została przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Omawiając tematykę pracy należy podkreślić, że jest ona bardzo ciekawa i stosunkowo nowatorska. Badanie bowiem struktury białek i ich dynamiki jest wciąż ważnym obszarem biologii molekularnej i strukturalnej. W szczególności tematyka pracy obejmuje zagadnienia dynamiki białek enzymatycznych, które posiadają centra aktywne zagłębione wewnątrz i do których dostęp jest możliwy poprzez tworzące się tunele. Występowanie takich tuneli transportujących substraty do i produkty na zewnątrz białka jest wciąż mało poznane. Tworzenie tych tuneli jest procesem dynamicznym, a same tunele są bardzo często strukturami przejściowymi. Z tego też względu metody badań strukturalnych (typu np. X-ray, cryo-EM) nie są w stanie poprawnie opisywać tego typu stanów i jedynie metody symulacji molekularnych typu dynamika molekularna (w różnych formach) mogą opisywać tworzenie takich przejściowych tuneli. Praca Doktorantki stosuje takie metody i w dodatku wykracza poza klasyczną dynamikę molekularną, która ze względu na ograniczenia czasowe nie jest w stanie uchwycić zdarzeń rzadkich typu otwieranie/zamykanie tunelu.

Celem nadrzędnym pracy było przebadanie układów białkowych tworzących tunele wewnątrz swojej struktury przy użyciu odmian dynamiki molekularnej dających lepsze próbkowanie struktury w celu głównie przetestowania metod pod tym kątem. Przy czym cel nadrzędny nie został jasno zdefiniowany w pracy. Doktorantka natomiast wymieniła trzy cele szczegółowe, które niejako stanowią drogę do tego celu nadrzędnego. Wśród tych celów jest rozwijanie metodologii, testowanie jej i zastosowanie do kilku układów białkowych dehalogenazy oraz innych enzymów z klasy EC1-3.

Cel pracy został zrealizowany. W rozwoju metod Doktorantka uczestniczyła jako jeden z członków większego zespołu promotora. Zastosowanie zaś przyspieszonej dynamiki molekularnej aMD i gaussowskiej GaMD dla halogenazy i jej mutantów oraz innych enzymów jako modeli do testowania przyniosło ciekawe wyniki w postaci obserwacji różnych tworzonych tuneli, które wcześniej były trudne do analizy za pomocą klasycznej dynamiki molekularnej. Doktorantka również testowała metody przyspieszonej dynamiki molekularnej i stosowała je dla kilku enzymów klasy EC1-3. W każdym przypadku obserwowane było powstawanie szeregu tuneli przejściowych, których znaczenie wymaga dalszej pogłębionej analizy również doświadczalnej. Zatem pod względem naukowym praca przynosi nowości naukowe oraz rozwój metodologii i wysoko oceniam jej poziom merytoryczny, tym bardziej, że część wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach.

Co do układu pracy to jest to układ zawierający streszczenie, abstrakt, cele pracy, niewielki wstęp, omówienie i podsumowanie wyników oraz przedstawienie perspektyw tych badań. Do tej części pracy dołączony jest też spis literatury (73 pozycje) jak również wszystkie cztery publikacje. Na końcu pracy znajduje się lista oświadczeń współautorów wszystkich czterech prac, którzy w sposób poprawny definiują swoje udziały. Analizując ten aspekt pracy mogę stwierdzić, że udział Doktorantki we wszystkich publikacjach został jasno zdefiniowany i jest on znaczący. Zwłaszcza w pracy metodycznej (pierwsza praca) jest to dobrze podane, gdyż każdy z współautorów miał swoje zadanie, które rozdzielone zostało na suplementy o różnych numerach.

Jak podaję powyżej bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską i otrzymane wyniki, ale z obowiązku recenzenta muszę przedstawić pewne uwagi krytyczne czy też postawić pytania, na które nie znalazłem satysfakcjonującej odpowiedzi w pracy.

Uwagi ogólne:

1. Na str. 18 gdzie Doktorantka zaczyna omawiać wyniki m.in. dla różnych mutantów modelowego systemu LinB w sumie nie wiadomo dlaczego akurat ten system został wybrany ani dlaczego te jego mutanty są reprezentatywne. W pracy w czasopiśmie JCIM, również jest to słabo opisane. Czy zatem można prosić Doktorantkę o bardziej biologicznie istotną informację co do wyboru modeli.
2. Na str. 20 Doktorantka omawia tworzenie się rzadkich tuneli (przejściowych) jako wynik obliczeń i próbkowania struktury za pomocą przyspieszonej dynamiki molekularnej, ale w sumie nie odnosi się do naturalnego tworzenia tych tuneli. Nie podaje jakie są naturalne tak zwane „driving forces” aby takie kanały powstawały, zwłaszcza jak służą transportowi substratów czy produktów. Jaki jest naturalny mechanizm bramkowania funkcji tych kanałów?
3. Na str. 22 mowa jest o utworzeniu tunelu bocznego ST ale tutaj również o potencjalnej funkcji biologicznej tego tunelu niewiele się dyskutuje.
4. Na str. 26 Doktorantka podaje, że używała zarówno oprogramowania GROMACS jak i AMBER. Czy użycie dwóch różnych pól siłowych mogło mieć wpływ na różnicę w wynikach? Czy były możliwe jakieś porównywania czy wyniki zależą od pola siłowego?
5. Na str. 28 Doktorantka przy omawianiu wyników dla enzymów z grup EC1-3 wspomina, że niektóre zauważone tunele mogą być „false positive”. Jest to poważny problem. Czy tylko doświadczalnie (o ile w ogóle) można to zweryfikować, czy też może jakieś inne parametry mogą być miarą tego czy dany tunel jest artefaktem? Ten sam problem jest również wzmiankowany w konkluzji rozprawy na str. 29 i w ostatniej pracy w preprintcie.
6. Na str. 4 Suplementu 7 do pracy w Bioinformatics omawiane są mutacje w pozycji Tryptophan 140. Czy doktorantka może coś więcej powiedzieć jak te mutacje są wybierane od strony biologicznej? Czy są one racjonalnie planowane w celu badania mechanizmu działania enzymu, czy raczej kiedyś zostały przypadkowo odkryte?

Uwagi szczegółowe i edytorskie:

1. Na str. 19 rys. 4 przedstawia panel prawy, który nie jest jasny jak należy go interpretować (wygląda to jak obciążenia struktury). Legenda pod rysunkiem powinna być bardziej objaśniająca.
2. Na str. 25 niefortunnie Doktorantka używa słownictwa: zamiast „atomic definition” powinno raczej być „atomic representation”, powinno być „Nowadays”, czy też wzmiankując „protein mechanism” powinno być podane jaki mechanizm.
3. Uwaga taka formalna. W Ustawie 2.0 nie ma podanych informacji, gdzie prace wchodzące w skład doktoratu muszą być opublikowane. Określają to uchwały rad dyscyplin czy senatów na danej uczelni. Dobrą jednak praktyką pro jakościową jest włączanie prac już opublikowanych w czasopismach, a nie w formie preprintu. W tym co prawda przypadku preprint jest bardzo wartościową pracą i na pewno zostanie przyjęty do druku. Doktorantka ma może wiedzę w jakiej redakcji został złożony?

**Podsumowanie:**

Pomimo moich pewnych uwag krytyczno-dyskusyjnych przedstawionych powyżej uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest wysoce ciekawa i osiągnięcie Doktorantki jest bardzo znaczące. Wkład jej badań w rozwój nowych metod przyspieszonej dynamiki molekularnej w celu badania stanów przejściowych i rzadkich typu tunele w białkach jest znaczący, a praca zawiera duży ładunek nowości naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych UAM o dopuszczenie Pani **Mgr. Nishita Mandal** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

