

Wrocław, 3.07.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Kotulska  
Politechnika Wrocławska  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
Katedra Inżynierii Biomedycznej

**Recenzja rozprawy doktorskiej: mgr Beaty Niklas**  
**“Neurotoxic ligands interactions with insects membrane proteins”**

**1. Charakterystyka rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Beaty Niklas powstała w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Nowaka. Drugim promotorem rozprawy był prof. Bruno Lapiéd. Rozprawa wpisuje się w obszar badań z dziedziny biofizyki i bioinformatyki, ma charakter teoretyczno-obliczeniowy, wykorzystujący metody symulacji dynamiki molekularnej.

Praca doktorska jest oparta na 3 opublikowanych artykułach, z których ostatni został przyjęty do druku w trakcie przygotowania niniejszej recenzji. We wszystkich publikacjach wchodzących do rozprawy Doktorantka jest pierwszym autorem. Dwa artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie *Molecules (MDPI)*, a jeden w *Journal of Biological Macromolecules (MDPI)*. Artykuły opatrzone zostały krótkim przewodnikiem po ich zawartości oraz podsumowaniem najważniejszych wyników, napisanymi w języku angielskim. Praca zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim, listę skrótów oraz 90 pozycji bibliograficznych, odnoszących się do przewodnika. Dołączone są też oświadczenia współautorów publikacji o ich wkładzie w przeprowadzone badania.

**2. Problem badawczy i jego znaczenie**

Autorka zajęła się problematyką działania insektycydów i repelentów, analizując mechanizmy ich oddziaływania z owadziimi receptorami i proponując też własne oryginalne rozwiązanie, częściowo oparte na znanych już molekułach o własnościach fotoaktywnych. Tematyka badań jest bardzo aktualna i istotna, zarówno poznawczo, jak i aplikacyjnie. Wiele gatunków owadów stanowi zagrożenie dla przemysłowych upraw roślin, inne mogą przyczyniać się do roznoszenia chorób wśród ludzi. Stosowane środki owadobójcze i repelenty nie zawsze są skuteczne, niektóre z nich mogą też negatywnie oddziaływać na organizm człowieka. W wielu

przypadkach nie są znane szczegółowe mechanizmy ich oddziaływania z docelowymi receptorami, co m.in. utrudnia opracowanie ich ulepszonych wersji. Bardzo istotne i groźne w skutkach może być też podobieństwo wielu receptorów owadzych do ich ludzkich odpowiedników, co może powodować, że środki te nie są selektywne i oddziałują również na człowieka. Wyniki badań takich jak te, które zaprezentowała w swojej rozprawie doktorskiej p. Beata Niklas mogą znacząco rozszerzyć nasze rozumienie mechanizmów i konsekwencji interakcji z organizmami żywymi ligandów stosowanych w walce z owadami.

### **3. Ocena przedstawionej rozprawy**

Na wstępie chciałabym zaznaczyć, że nie jestem specjalistką w obszarze metod dynamiki molekularnej, na której opiera się część obliczeniowa rozprawy. Nie mogę więc ocenić szczegółów technicznych zastosowanej metody, jedynie koncepcję badań i krytyczną analizę uzyskanych wyników, zakładając, że same obliczenia zostały wykonane prawidłowo, a wszystkie konieczne założenia były spełnione. Mam przekonanie, że tak było, biorąc pod uwagę zespół, w którym pracowała doktorantka i osobę jej Promotora, który jest ekspertem w metodach dynamiki molekularnej. Moje wnioski dotyczą więc tylko założeń pracy i uzyskanych wyników oraz wyciągniętych z nich wniosków.

Rozprawę otwiera artykuł, który analizuje działanie neurotoksycznych ligandów stosowanych jako środki przeciwko owadom, oddziałujących z receptorami muskarynowymi, zaangażowanymi w rozpoznawanie bodźców zapachowych. Doktorantka opisuje przeprowadzoną symulację molekularną w poszukiwaniu dokładnych miejsc dokowania liganda, zmian konformacyjnych receptora oraz dokładnego mechanizmu działania przeciwko owadom. Autorka proponuje hipotetyczną ścieżkę propagacji sygnału strukturalnego generowanego przez allosteryczne oddziaływania białka z ligandem i analizuje różnice w oddziaływaniach z receptorem owadzym i receptorem ludzkim. Ponadto, proponuje nowy typ środka przeciwko owadom, który mógłby być przełączany sygnałem świetlnym, dzięki włączeniu w jego strukturę cząsteczki fotoaktywnej.

Kolejne dwa artykuły skupiają się na możliwości zmiany funkcjonowania kanału sodowego bramkowanego napięciowo za pomocą toksyn naturalnie występujących w przyrodzie, takich jak zmiany w charakterystyce inaktywacji kanału i prawdopodobnym blokowaniu wnętrza kanału. Wyniki modelowania zostały zweryfikowane za pomocą eksperymentu elektrofizjologicznego, który potwierdził hipotetyczny mechanizm i efekty badanych interakcji. Zauważono też powinowactwo mechanizmów oddziaływania

insektycydów i lokalnych środków przeciwbólowych, jak również wyjaśniono efekt mutacji, która prowadzi do odporności owadów na badane środki przeciw owadom.

Wyniki badań przedstawione przez doktorantkę i jej współautorów są interesujące i wyznaczają dalsze kierunki rozwoju w dziedzinie repelentów i insektycydów. Chciałabym jednak zadać parę pytań i poprosić o komentarze dotyczące poniższych kwestii:

- Dlaczego w swoich badaniach Autorka wykorzystywała homologiczne modelowanie struktury receptorów. Czy model homologiczny, który podczas symulacji z oddziałującym ligandem ulegał dalszym zmianom konformacyjnym, był wystarczający? Czy autorka sprawdziła jak bardzo różniłyby się ścieżki zmian strukturalnych, gdyby początkowy model pochodził z modelowania za pomocą narzędzia AlphaFold? To pytanie jest dla mnie szczególnie istotne z uwagi na modelowane różnice w oddziaływaniu owadziej i ludzkiej wersji receptora, przy czym modelowanie homologiczne wychodziło właśnie od wersji ludzkiej.

- Jak bardzo różnią się struktury obu receptorów, zarówno w kontekście ich sekwencji, jak i strukturalnie, np. wyrażone za pomocą RMSD lub innej powszechnie stosowanej miary? W jakim obszarze białka te różnice się szczególnie uwydatniają i za co te obszary odpowiadają funkcjonalnie? Czy różnice w oddziaływaniu ligandów z receptorami były wynikiem istotnych, czy raczej subtelnych różnic strukturalnych pomiędzy tymi białkami? Warto byłoby we wstępie do pracy przedstawić takie zestawienie.

- Zastanowiło mnie zdanie umieszczone na str. 21 przewodnika, w którym Doktorantka wspomina o wysoko-rozdzielczej strukturze krystalicznej, przy czym rozdzielczość ta jest na poziomie 3,5 Å. Obecnie oczekuje się znacznie bardziej dokładnych struktur i są one już powszechnie dostępne. Czy w przypadku białek modelowanych przez Autorkę jest inaczej?

- W odniesieniu do artykułu pierwszego, zabrakło mi bardziej dogłębnej analizy potencjalnego wykorzystania przełącznika fotoaktywnego. Warto byłoby przedyskutować różnice konformacyjne, które wskazywałyby na inne działanie receptora owadziego połączonego z aktywną i nieaktywną formą liganda, i zysk w działaniach przeciwko owadom. Jak szybka i jak rozległa byłaby reakcja receptora na zmianę stanu przełącznika? Jaki rodzaj sygnału świetlnego należałoby doprowadzić do receptora (długość fali świetlnej, moc) i czy byłoby to łatwe technicznie? Czy Autorka rozważała taki eksperyment in-vitro, na przykład we współpracy z zespołem, z którym współpracowała przy weryfikacji metodami eksperymentu elektrofizjologicznego swoich wyników modelowania?

- W swoich analizach Autorka używa parametru RRCS. Dobrze byłoby go dokładniej opisać w przewodniku po pracach i przeprowadzić dyskusję związaną z zaletami i wadami jego

użycia. W pracy wspomniane są ograniczenia związane z jego ewolucją w czasie. Czy można byłoby szerzej skomentować te problemy?

Moje uwagi, przedstawione powyżej nie umniejszają naukowego poziomu pracy jako całości, stanowią tylko część dyskusyjną do zaprezentowanej pracy.

#### **4. Podsumowanie**

Stwierdzam, że mgr Beata Niklas zaprezentowała poziom wiedzy, który odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Przedstawiła rozprawę doktorską rozwiązującą aktualny problem naukowy, która przyczyni się do rozwoju reprezentowanej dyscypliny naukowej. Rozprawa zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a kandydatka wykazała, że zarówno posiada ogólną wiedzę teoretyczną, jak i umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Autorka wykazała się umiejętnością współtworzenia publikacji naukowych oraz pozyskiwania grantów badawczych (w tym przypadku Preludium).

Biorąc pod uwagę omówione powyżej elementy oceny, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. 2022 r. poz. 574 z późn. zm.) w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Niniejszym, wnioskuję o dopuszczenie autorki do kolejnych etapów przewodu doktorskiego oraz do publicznej obrony przedstawionej rozprawy.

Małgorzata Kotulska

