

Gdańsk, dnia 22.11.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgra Hunga Van Nguyena

**pt. „SARS-CoV-2: Antibodies and effect of non-structural proteins on
protein synthesis in human ribosomes”**

Wirus SARS-CoV-2 należy do grupy koronawirusów, które wywołują choroby układu oddechowego o różnym stopniu zagrożenia i uciążliwości. Po raz pierwszy pojawił się w Wuhan w Chinach w roku 2019. Dość późno zdano sobie sprawę z zagrożeń dla globalnej kondycji zdrowotnej ludzkości, które ze sobą niesie, przede wszystkim z powodu bardzo wysokiej zaraźliwości i letalności na poziomie 5% co według WHO jest bardzo poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Zaraźliwość oraz letalność nowego patogenu spowodowały pojawienie się pandemii COVID-19, skutkującej w większości krajów ogólnonarodową kwarantanną. Poniesione z powodu tego powodu koszty społeczne i gospodarcze są cały czas wręcz niemożliwe nawet do zgrubnego oszacowania.

Dzięki postępom biochemii, biofizyki i bioinformatyki, w tym metod modelowania struktur i oddziaływań białek, które dokonały się w ciągu ostatnich dziesięcioleci stosunkowo szybko opracowano i wprowadzono szczepionki. Tym niemniej wirus cały czas ewoluuje przede wszystkim zwiększając swą zaraźliwość, jakkolwiek nowe warianty (szczególnie Omikron) charakteryzują się nieporównanie mniejszą letalnością w stosunku do oryginalnego, przez co stały się one raczej uciążliwe a nie bardzo groźne. Jednak nawet lekkie przejście choroby może, nawet po miesiącach czy latach, skutkować niespodziewanymi dolegliwościami serca, układu krążenia, układu oddechowego, czy układu nerwowego, w szczególności defektami pamięci (tzw. mgła covidowa). Dlatego pełne poznanie biochemii wirusa SARS-CoV-2 oraz możliwości blokowania zakażenia i wstrzymania jego namnażania, jeżeli zakażenie już nastąpiło, pozostaje i pozostanie zapewne jeszcze długo jednym z priorytetów biochemii, biofizyki i nauk medycznych. Metody modelowania molekularnego mają w tych badaniach niepodważalne znaczenie, z uwagi na ich szybkość a przez to możliwość przebadania tysięcy wariantów, stosunkowo niski koszt, a przede wszystkim to, że umożliwiają zrozumienie poszczególnych etapów działania wirusa i racjonalne projektowanie przeciwdziałań. W te badania wpisuje się rozprawa doktorska Pana mgra Hunga Van Nguyena, wykonana w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem światowej sławy specjalisty w dziedzinie modelowania białek i ich oddziaływań na różnym poziomie uszczegółowienia (gruboziarnistym i pełnoatomowym), profesora Mai Suana Li.

Preambułę rozprawy doktorskiej stanowią deklaracja Kandydata, w której oświadcza on, że sam wykonał pracę i że pracę wykonywał w celu uzyskania stopnia doktora, streszczenie w języku angielskim, streszczenie w języku polskim, wykaz licencji, na podstawie których Autor zamieszczał swoje opublikowane prace stanowiące materiał rozprawy, podziękowania, spis treści, spis rysunków, spis tabel oraz wykaz skrótów używanych w tekście rozprawy. Tekst rozprawy składa się z pięciu numerowanych rozdziałów, z których dwa pierwsze, odpowiednio wstęp i metody obliczeniowe omawiają podstawy biochemii wirusa i stosowane w pracy narzędzia badawcze. Kolejne dwa rozdziały dotyczą wyników. W rozdziale piątym omówione są wnioski z badań i plany na przyszłość. Rozprawę kończy wykaz odnośników literaturowych, składający się z 320 pozycji. Z wyjątkiem polskiego streszczenia, rozprawa jest napisana w języku angielskim.

Podstawą rozprawy są 3 publikacje, których Kandydat jest pierwszym autorem, w tym jedynym oprócz swojego promotora autorem dwóch publikacji. Prace te zostały opublikowane w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach naukowych: pierwsza i trzecia w *J. Phys. Chem. B* a druga w *Sci. Rep.* Z zestawienia publikacji Kandydata podanego w preambule rozprawy wynika ponadto, że opublikował on łącznie 12 prac i z wyjątkiem jednej jest ich pierwszym autorem. Taki dorobek publikacyjny przed uzyskaniem stopnia doktora należy uznać za wybitny.

Nie zauważyłem, aby w streszczeniu lub we wstępie były wprost sformułowane cele pracy, jakkolwiek z tytułu i streszczenia można się domyślić, że celami było zbadanie wiązania wybranych przeciwciał przez białko kolca różnych wariantów wirusa oraz zbadanie wiązania białka NSP1 wirusa z rybosomem 40S.

Trzy publikacje będące podstawą rozprawy są w zamieszczone w jej tekście w całości: dwie pierwsze w rozdziale 3 a ostatnia w rozdziale 4. Każdy z tych dwóch rozdziałów rozpoczyna zwięzłe omówienie wyników oraz abstrakt publikacji. Każda publikacja jest poprzedzona oświadczeniem Kandydata i oświadczeniami współautorów dotyczących roli i wkładu w ich powstawanie. Z oświadczeń tych jednoznacznie wynika, że wkład Kandydata był dominujący. Należy nadmienić, że wszystkie trzy publikacje zostały poddane bardzo ostrej ocenie przez anonimowych recenzentów przed ich opublikowaniem, zatem ich wartość merytoryczna, a przez to wartość merytoryczna rozprawy, nie podlega dyskusji.

W pierwszym podrozdziale wstępu Kandydat omawia budowę wirusa SARS-CoV-2, następnie, w podrozdziale drugim, jego białka strukturalne, białka niestrukturalne (które służą do modyfikacji biochemii zaatakowanej komórki) oraz białka dostępne, których rolą jest głównie uniknięcie układu odpornościowego żywiciela. W podrozdziale trzecim omawia cykl życiowy wirusa SARS-CoV-2. Podrozdział czwarty jest poświęcony wariantom wirusa. W podrozdziale piątym omawia stosowane obecnie leki przeciwwirusowe oraz mechanizmy ich działania a w podrozdziale siódmym wpływ wirusa SARS-CoV-2 na biosyntezę białek. Wstęp jest napisany bardzo jasno i stanowi cenne podsumowanie wiedzy o wirusie SARS-CoV-2; uważam, że



mógłby służyć jako materiał artykułu przeglądowego. Do tej części rozprawy mam tylko następujące drobne uwagi:

1. Rozdział 1.2.1, pierwszy akapit (góra strony 3): nie wymieniono zgięć, które są bardzo ważnymi elementami struktury drugorzędowej i nie wspomniano o strukturze naddrugorzędowej. Podano w tym akapicie opis budowy chemicznej aminokwasów ale należałoby również wspomnieć o tworzeniu wiązania peptydowego i zdefiniować chiralność.
2. Rozdział 1.2.2, rys. 1.3 (str. 7): NSP4 nie ma na rys. 1.3; czy to białko nie ma struktury? Wygląda na to, że to białko jest częścią struktury 8YAX, rozwiązanej metodą CryoEM.
3. Pierwszy akapit rozdziału 1.4 (str. 12): Tekst sugeruje, że wszystkie warianty wymagające uwagi (VOC) są zarówno wysoce zaraźliwe, jak i mają porównywalną śmiertelność. Tymczasem między wariantami Delta i Omikron występuje pod tym względem zróżnicowanie: ten ostatni jest bardzo wysoce zaraźliwy ale wykazuje znacznie mniejszą śmiertelność (zob. np. *The Lancet Regional Health – Europe*, **38**, 100855, doi: 10.1016/j.lanepe.2024.100855).
4. Rozdział 1.7, str 20, wiersze 8-10 od dołu: nie wiadomo czy przełączenie dotyczy reszt Glu158/Gln158 i Glu159/Gln159 w białku NSP1 czy 40S.

W rozdziale 2, zatytułowanym „Metody obliczeniowe”, Kandydat omawia metodologię. W podrozdziale pierwszym jest omówiona metoda dynamiki molekularnej oraz pola siłowe, zarówno pełnoatomowe jak i gruboziarniste. Z kolei w podrozdziale trzecim omawia eksperymentalne i teoretyczne metody szacowania energii swobodnej wiązania ligandu do białka, spośród tych drugich głównie metodę sterowanej dynamiki molekularnej, metodę próbkowania parasolowego połączoną z metodą ważonych histogramów oraz metodę „alchemiczną”. Z powodu wyodrębnienia metod eksperymentalnych jako podsekcji, tytuł całego rozdziału 2 jest trochę mylący, ponieważ nie traktuje on tylko o metodach obliczeniowych.

Rozdział metodologiczny jest w większości napisany wyczerpująco i dobrze omawia stosowaną teorię. Mam następujące uwagi:

1. Część rozdziału 2 o polach siłowych jest znacznie bardziej rozbudowana niż część poświęcona dynamice molekularnej, która jest moim zdaniem zbyt skrótowa. Przede wszystkim należałoby wspomnieć o tym, że rozpuszczalnik może być traktowany albo w sposób dyskretny (np. modele TIP3P, TIP4P i SPCE wody) lub ciągły, aż do włączenia go do efektywnych potencjałów włącznie. Kandydat stosował oba podejścia. Dyskretnie modele wody stosował zarówno w obliczeniach pełnoatomowych, jak i gruboziarnistych w modelu MARTINI, natomiast model ciągły, z włączeniem oddziaływań z udziałem wody do potencjałów gruboziarnistych, w obliczeniach z użyciem uproszczonego modelu opartego o reprezentację łańcucha polipeptydowego poprzez atomy węgla α .



2. Nawiązując do poprzedniego punktu, użycie dynamiki Langevina jest niezbędne tylko wtedy, gdy używa się modeli niejawnych rozpuszczalnika. W takim przypadku wprowadzenie nie-konserwatywnych sił tarcia i stochastycznych jest jedyną możliwością uwzględnienia wpływu rozpuszczalnika na dynamikę układu. Dodatkowo, zbilansowane na mocy twierdzenia o fluktuacji-dyssypacji siły tarcia i siły stochastyczne utrzymują średnią temperaturę układu. Z lektury sekcji 2.1.1 można odnieść wrażenie, że równania ruchu Langevina stosuje się w każdym przypadku. Owszem, zaleca się takie postępowanie jako najbardziej skuteczne narzędzie termostatowania w symulacjach z dyskretną reprezentacją rozpuszczalnika ale należałoby to wyraźnie zaznaczyć. W pracy 1 Kandydat pisze jednak, że stosował algorytm v-rescale Parinello-Rahmana do utrzymywania temperatury i ciśnienia. Poza tym wykonuje się również symulacje mikrokanoniczne, gdzie zachowywana jest energia całkowita układu a nie średnia temperatura i wtedy siły tarcia i siły stochastyczne nie występują w równaniach ruchu.
3. Mam pewne wątpliwości do ostatniego składnika w równaniu 4 w sekcji 2.1.2: wygląda na to, że oddziaływaniom „nienatynnym” (tj. między resztami nie tworzącymi w strukturze natynnej kontaktów) odpowiada minimum energii. Być może dobiera się odpowiednio małą głębokość studni potencjału ϵ_{ij}^{NN} , jednak brak jest takiego wyjaśnienia. W przeciwieństwie do stwierdzenia na str. 23, linie 1 i 2 od dołu, nie wydaje się żeby ϵ_{ij}^{NN} można było określić na podstawie średnich wartości promieni reszt; można tak obliczyć tylko σ_{ij} .
4. Równanie 12 na str. 29 wydaje się niezgodne z równaniem 9 na stałą dysocjacji, powinno chyba być $\Delta G_{bind} = k_B T \ln K_d$, gdzie K_d jest stałą dysocjacji (daną równaniem 9). Drugi wkład w równaniu 12 wygląda na całkowanie po stanach niezwiązanych, natomiast w całości brakuje stężenia wolnego liganda, które można wyrazić przez stężenie całkowite liganda i całkę po objętości (równanie 10).

Rozdział 3, opisujący pierwszą część badań własnych oraz ich wyniki, jest poświęcony wiązaniu przeciwciał REGN10933 oraz REGN10987 do białka kolca SARS-CoV-2 (pierwsza publikacja) oraz badaniom nad powstrzymującym działaniem nanociała H11-H4, przeciwciała CR3022 oraz ich kombinacji na warianty Alfa, Kappa i Delta wirusa. W pierwszej z tych prac Kandydat wykorzystał dwie metody obliczeniowe: metodę sterowanej dynamiki molekularnej w pełnoatomowym polu siłowym CHARMM oraz metodę próbkowania parasolowego z przetwarzaniem wyników metodą ważonych histogramów, z użyciem uproszczonego modelu gruboziarnistego opartego na reprezentacji C α . Stwierdził, że kompleks REGN10933 wiąże się z wiążącą receptor domeną białka kolca silniej niż REGN10987, natomiast ich kombinacja wiąże się najsilniej, jak również, że wiązanie REGN10933 ma głównie charakter elektrostatyczny, natomiast oddziaływania van der Waalsa mają dominujący udział w wiązaniu REGN10933. Stwierdził również, że wiązanie jest znacznie osłabione w przypadku białka kolca z wariantu Omikron wirusa.

Podobnie jak w pracy pierwszej, w drugiej pracy Kandydat wykorzystał metodę sterowanej dynamiki molekularnej w polu siłowym CHARMM do badania procesu wiązania/dysocjacji nanociała H11-H4 oraz przeciwciała CR3022. Natomiast do badania wiązania metodą próbkowania parasolowego/ważonych histogramów użył pola MARTINI. Stwierdził, że CR3022 wiąże się silniej niż H11-H4, natomiast najsilniej wiąże się ich kombinacja. Otrzymane energie swobodne wiązania są częściowo zgodne z danymi eksperymentalnymi, które zresztą są rozbieżne w zależności od źródła.

W toku lektury tego rozdziału nasunęły mi się następujące uwagi:

1. Dlaczego w pracy 1 był stosowany model gruboziarnisty $C\alpha$ a w pracy 2 MARTINI?
2. Praca 2: Czy oszacowano błędy wyznaczonych metodą próbkowania parasolowego stałych wiązania? Otrzymane dla obu ligandów wartości są dość bliskie sobie (-19.8 kcal/mol dla H11-H4 i -21.4 kcal/mol dla CR3022)?

Rozdział 4, zawierający pracę 3, opisuje badania Kandydata nad wpływem niestrukturalnego białka 1 (NSP1) SARS-CoV-2 na biosyntezę białka, dokładnie jego wiązania do rybosomu 40S, który to proces zatrzymuje translację mRNA. Kandydat użył tutaj metodę sterowanej dynamiki molekularnej w pełnoatomowym polu siłowym AMBER99SB oraz metodę „alchemiczną” w gruboziarnistym polu siłowym MARTINI. Stwierdził, że białko NSP1 skutecznie wiąże się do rybosomu 40S a kompleks rybosomu 40S z NSP1 wiąże się silniej z mRNA niż sam rybosom, co może skutecznie blokować translację. Kandydat określił również oddziaływania odpowiedzialne za wiązanie NSP1 do rybosomu 40S.

W toku lektury rozdziału 4 nasunęły mi się następujące uwagi:

1. Jaką metodę używano do konwersji struktury gruboziarnistej (model MARTINI) do struktury pełnoatomowej na etapie przygotowywania pełnoatomowych symulacji SMD?
2. Str. 89 (str. 7039 w publikacji 3), 6 wiersz od góry po prawej: Podana wartość energii oddziaływania Gly180 z mRNA jest nierealistyczna (160.6 kcal/mol) i nie zgadza się z tą, którą można odczytać z rys. 2B w publikacji. Może powinno być 1.6 kcal/mol?

Oprócz wymienionych już uwag merytorycznych, mam następujące drobne uwagi redakcyjne:

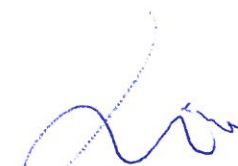
1. Na stronie iv w linii 4 od dołu jest literówka („Rozdział”).
2. Skrót w wykazie nie są uszeregowane alfabetycznie, co utrudnia ich wyszukiwanie.
3. Rozdział 2.1, przedostatni wiersz 1 akapitu (str. 21): chyba „...force fields, **which** are simplified energy expressions...” (pominięto „, which”).

Najważniejsze wyniki uzyskane przez Kandydata można podsumować następująco:

1. Zbadał metodą sterowanej dynamiki molekularnej oraz próbkowania parasolowego wiązanie przeciwciał REGN10933 oraz REGN10987 do domeny wiążącej receptor białka kolca wirusa SARS-CoV-2 i zidentyfikował typy oddziaływań odpowiedzialnych za wiązanie. Pokazał również, że kombinacja obu przeciwciał wiąże się znacznie silniej

- niż każde z osoba. Pokazał też, że ich efektywność jest znacząco mniejsza w przypadku wariantu Omikron, co zgadza się z wynikami doświadczeń.
2. Zbadał wiązanie kombinacji nanociała H11-H4 oraz przeciwciała CRC3022 i pokazał, że taka kombinacja wiąże się skuteczniej niż każdy z komponentów. Zidentyfikował typy oddziaływań odpowiedzialne za wiązanie. Pokazał, że przeciwciała CRC3022 jest obiecującym kandydatem na lek przeciwko oryginalnemu wirusowi SARS-CoV-2, natomiast nanociała H11-H4 powinno być skuteczne przeciwko wariantom Alfa, Kappa i Delta, co jest zgodne z eksperymentem.
 3. Zbadał oddziaływanie pomiędzy mRNA z rybosomem 40S w obecności i nieobecności białka NSP1 z SARS-CoV-2 i pokazał, że mRNA silniej wiąże się z kompleksem rybosomu 40S z NSP1 niż z samym 40S, co może blokować proces translacji, w zgodzie z eksperymentem. Pokazał, że w wiązaniu dominują oddziaływania elektrostatyczne.

Rozprawę doktorską oraz dorobek Pana mgra Hunga Van Nguyena oceniam bardzo wysoko. Każdy z uzyskanych wyników wymieniony w podsumowaniu powyżej stanowi nowość naukową. Wyniki badań w wysokim stopniu zgadzają się z wynikami eksperymentów. Kandydat wykonał ogromną pracę rozwiązując nietrywialne problemy obliczeniowe a uzyskane przezeń wyniki nie tylko umożliwiają lepsze poznanie biochemii różnorodnych wariantów wirusa SARS-CoV-2 ale, dzięki wskazaniu ważnych dla wiązania z przeciwciałami i nanociałami regionów i oddziaływań, mogą przyczynić się do opracowania nowych skutecznych szczepionek i leków. Uwagi krytyczne zawarte w mojej recenzji, z których część ma charakter dyskusyjny, nie umniejszają wartości rozprawy. Rozprawa spełnia bez żadnych wątpliwości wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych. Dlatego stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizyki PAN o dopuszczenie Pana mgra Hunga Van Nguyena do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wybitny charakter badań i ważność uzyskanych wyników, czego wymiernym efektem jest ich opublikowanie w prestiżowych czasopismach naukowych oraz dominujący wkład Kandydata do każdej z trzech publikacji składających się na rozprawę doktorską i jego pozostały znakomity dorobek, wnoszę ponadto o wyróżnienie rozprawy. Uzasadnienie wyróżnienia załączam.



Prof. dr hab. Józef Adam Liwo

Gdańsk, dnia 22.11.2024

Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej

Pana mgra Hunga Van Nguyena

pt. „SARS-CoV-2: Antibodies and effect of non-structural proteins on protein synthesis in human ribosomes”

Rozprawa doktorska Pana mgra Hunga Van Nguyena obejmuje dwa bardzo ważne problemy związane ze zwalczaniem choroby wywołanej przez różne warianty wirusa SARS-CoV-2, który cały czas pozostaje ogólnoswiatowym problemem zdrowia publicznego: wiązanie białka kolca wirusa z przeciwciałami i nanociałami oraz wpływ jego białek niestrukturalnych na translację. Kandydat wykonał ogromną pracę rozwiązując nietrywialne problemy obliczeniowe. Uzyskane przezeń wyniki są bardzo ważne i stanowią nowość naukową, czemu dałem wyraz w mojej recenzji. Materiał rozprawy został opublikowany w prestiżowych czasopismach naukowych w postaci trzech publikacji, których Kandydat jest pierwszym autorem a jego wkład do każdej z nich jest dominujący. Całkowity dorobek Kandydata stanowi 12 publikacji w prestiżowych czasopismach naukowych, przy czym jest on pierwszym autorem 11 z nich. Jest to dorobek wybitny, biorąc pod uwagę wczesny etap jego kariery naukowej. W związku z powyższym, wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgra Hunga Van Nguyena, o które wniosłem w recenzji, jest moim zdaniem w pełni uzasadnione.



Prof. dr hab. Józef Adam Liwo