

Data: Toruń, 1 grudnia, 2024

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak

Instytut Fizyki

Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5

(wiesiek@umk.pl)

**RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr. Hung Van Nguyena**

pt.

“SARS-CoV-2:Przeciwciała i wpływ niestrukturalizowanych białek na syntezę białek w ludzkich rybosomach”

Rozprawa doktorska, którą przeczytałem z dużym zainteresowaniem, przypomniała mi o stale czyhającym niebezpieczeństwie: przygasającej pandemii wirusa SARS-CoV-2. Przetrwaliśmy rok 2020 i lata późniejsze, przetrwaliśmy „lockdown”, ale nie wszystkim było to dane – miliony ludzi na świecie padły ofiarą wirusa, którego pochodzenia do dzisiaj nie wiemy. Zasadniczo w Polsce mamy odporność populacyjną, ale nie można wykluczyć ataków kolejnych wariantów SARS, które tę odporność mogą przełamać. Sytuacja jest „frontowa” i muszę z satysfakcją stwierdzić, że recenzowana praca doktorska dotyczy niezwykle aktualnej, ważnej społecznie i naukowo tematyki – jak oddziałują białka związane z infekcją wirusową. Wybór tego problemu uważam za bardzo zasadny i trafny. Doktorant zastosował metody biofizyczne modelowania komputerowego białek do zbadania aspektów mechanicznych dwóch poważnych problemów biologiczno-medycznych (a) jak przeciwciała oddziałują z białkiem S powłoki wirusa oraz (b) jak jedno z białek wirusa – NSP1 – blokuje ludzki rybosom ułatwiając wirusowi SARS-CoV-2 infekcję. Cieszy mnie to, że fizycy potrafią tak szybko dać wymierny wkład w rozumienie fundamentalnych procesów zachodzących w komórce związanych z niezwykle groźną chorobą.

Po lekturze rozprawy i zapoznaniu się z publikacjami składającymi się na nią stwierdzam, że cele badawcze opisane w streszczeniu, tj. (a) zbadanie oddziaływań kilku typów przeciwciał z białkiem kolca wirusa (S) SARS-CoV-2 oraz (b) zbadanie wpływu białka NSP1 na proces syntezy białek zostały osiągnięte.

Tytuł angielski rozprawy („*SARS-CoV-2: Antibodies and effect of nonstructural proteins on protein synthesis in human ribosomes*”) jest cośkolwiek enigmatyczny – nie możemy dowiedzieć się z niego jakimi metodami doktorant się posługuje. Poza tym sugeruje, że przeciwciała też bezpośrednio ingerują w syntezę białek w rybosomie, co oczywiście nie jest prawdą. Tytuł w języku polskim przytoczony na wstępie tej recenzji podałem w swobodnym tłumaczeniu sam, ponieważ w tekście rozprawy go nie znalazłem. Z kolei tytuły publikacji (3), z których składa się rozprawa są precyzyjne i oddają ich treść.

Rozprawa została przygotowana w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, w Zakładzie Fizyki Teoretycznej, pod kierunkiem dr hab. Prof. Dr hab. Mai Suan Li. Badania były związane z

grantem NCN. Praca ma formę cyklu publikacji, który stanowią trzy prace wieloautorskie, opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach międzynarodowych:

1. **Nguyen, H.**; Pham, D. L.; Nissley, D. A.; O'Brien, E. P.; Li, M. S. Cocktail of REGN antibodies binds more strongly to SARS-CoV-2 than its components, but the Omicron variant reduces its neutralizing ability. *J. Phys. Chem. B.* 2022, 126(15), 2812-2823.
2. **Nguyen, H.**; Li, M. S. Antibody-nanobody combination increases their neutralizing activity against SARS-CoV-2 and nanobody H11-H4 is effective against Alpha, Kappa and Delta variants. *Sci. Rep.* 2022, 12 (9701).
3. **Nguyen, H.**; Nguyen, H. L.; Li, M. S. Binding of SARS-CoV-2 non-structural protein 1 to 40S ribosome inhibits mRNA translation. *J. Phys. Chem. B.* 2024, 128(29), 7033-7042.

Rozprawę otwiera deklaracja Autora, streszczenia angielskie i polskie, robiący wrażenie spis publikacji doktoranta (3 składające się na tezę, 2 inne opublikowane w czasie przygotowywania rozprawy doktorskiej, 12 (!) innych opublikowanych w latach 2024 -2020. Pan H. Nguyen jest w niemal wszystkich tych pracach pierwszym autorem, mogę zatem zaryzykować twierdzenie, że jest doświadczonym badaczem.

Rozdział 1 (21 str.) jest to wprowadzenie w tematykę badań i postawienie problemu; Rozdział 2 (10 str.) zawiera zwięzły opis metod obliczeniowych z pewnymi wzmiankami nt. doświadczalnych sposobów wyznaczania stałych wiązania białko-białko; Rozdział 3 zawiera kopie dwóch publikacji nt. wiązania przeciwciał i nanociał (*nanobodies*) do białka S wirusa; Rozdział 4 zawiera publikację nt. wiązania się pewnego białka z wirusa do podjednostki 40S rybosomu, tj. miejsca syntezy białek w komórce. Każda kopia publikacji poprzedzona jest merytorycznym wprowadzeniem oraz nie budzącymi moich wątpliwości oświadczeniami autorów tych prac na temat ich wkładu w powstanie publikacji. Rozprawę zamyka krótki Rozdział 5 (2 strony) w którym znajdują się główne wnioski i zarys możliwych kierunków dalszych badań. Rozprawa zaopatrzona jest ponadto w Spis rysunków, Spis tabel (tylko jedna) oraz skrótów. Bibliografia liczy 320 pozycji, całość zamyka się w 114 stronach. Przedstawiony do oceny cykl publikacji jest spójny tematycznie i nie budzi zastrzeżeń.

We Wstępie mamy bardzo interesujące dane nt. pandemii COVID-19, staranny opis wariantów wirusa, bardzo syntetyczny, ale pożyteczny opis poszczególnych białek, diagramy ilustrujące zamkniętą i otwartą formę białka S. Bardzo pouczający jest Rys. 1.3 (str. 7) z wykazem białek typu NSP. Autor podał też krótkie opisy białek pomocniczych (ORF) ważnych w zrozumieniu działania wirusa, którego cykl życiowy przedstawia Rys. 1.4. Po krótkim opisie aktualnie stosowanych leków przeciwwirusowych (lista jest b. krótka, niestety), następuje bardzo pouczająca a i ważna część – opis przeciwciał i ich potencjału terapeutycznego w walce z wirusem. W wyniku intensywnych badań odkryto, że niektóre przeciwciała przygotowane *in vitro* (nie izolowane z osocza krwi osób, które przechorowały na COVID-19) mają bardzo wysokie powinowactwo do wirusa (w części S) i mogą skutecznie blokować możliwość inwazji wirusa do komórek gospodarza. Dobrze opisane jest znaczenie tych przeciwciał dla terapii oraz problemy związane z ucieczką wirusa przed przeciwciałami, poprzez właśnie mutacje, których w nowych wariantach może być nawet kilkadziesiąt, w stosunku do formy wyjściowej. Ostatnia część wstępu poświęcona jest opisowi roli wspomagającej infekcje białka wirusa NSP1, które po prostu blokuje rybosom i uniemożliwia rozwinięcie obrony immunologicznej w komórce. Dla mnie ta część, napisana

bardzo ładnie, była ciekawa i pouczająca, dowodzi szerszego spojrzenia doktoranta na cel badań jakim było modelowanie pewnych procesów molekularnych w komórce.

Rozdział 2 zawiera encyklopedyczne wiadomości nt. stosowanych metod obliczeniowych tj. klasycznej dynamiki molekularnej, sterowanej dynamiki molekularnej, obliczania profili energii swobodnej (US, *umbrella sampling*) czy istoty tzw. dynamiki gruboziarnistej (CG). Rozdział jest pożyteczny dla czytelnika nie znającego stosowanych w rozprawie technik obliczeniowych, ma charakter całkowicie przeglądowy i nie wnosi niczego nowego (poza brakiem minusa w przypisie do wzoru (1) ☺). Oczywiście nowe są opisy parametrów stosowanych w modelowaniu CG i przyjęte tam modele.

W Rozdziale 3 zaprezentowane są dwie publikacje (#1 i #2 z powyższego spisu) poświęcone problemowi blokowania białka kolca poprzez przyłączenie do niego silnie wiążących się specyficznych przeciwciał monoklonalnych REGN10933 i REGN10987 oraz fragmentu małego przeciwciała z lamy zwanego nanociałem (*nanobody*). Prace nad takimi układami białkowymi są intensywnie prowadzone niemal od momentu wybuchu pandemii, część przeciwciał wykazywała świetne działanie na zwierzętach, trwają próby kliniczne, ale wg mojej obecnej wiedzy nie wprowadzono jeszcze do leczenia żadnej substancji. Nadzieje są jednak bardzo duże. Chodzi o znalezienie łatwo „produkowalnego” w laboratorium białka o jak największym powinowactwie (najlepiej subnanomolowym) do rejonu RGD, którym wirus łączy się z białkiem ACE człowieka. Jeśli duże białko oblepi kolce, infekcji nie będzie albo rozwój infekcji u osoby już chorej ustanie po podaniu takiego specyfiku. Przeciwciała są już stosowane w terapiach i można ograniczyć ich skutki uboczne, o ile są one naprawdę specyficzne. A ten problem sprowadza się do fizyki – trzeba zoptymalizować wiązanie białko-białko. Struktury białek są dynamiczne i do niedawna ich kształty przestrzenne odkrywano z wielkim mozółem i nakładem środków. Obecnie mamy AI i AlphaFold3, ale Autor doktoratu korzystał z lepszych danych tj. struktur eksperymentalnych zdeponowanych w banku światowym PDB. Istota obu publikacji stanowiących Rozdział 3 jest taka sama: opracowano modele pełnoatomowe oraz modele gruboziarniste układu fragment białka S – przeciwciał i obliczono względne powinowactwo różnych przeciwciał do białek natywnych wirusa lub do jego realnych wariantów, trapiących ludzkość w ostatnich latach (Delta, Omicron itd.). Stosowano głównie metodę modelowania SMD polegającą na imitowaniu eksperymentu spektroskopii sił przy pomocy AFM. Do ustalonego atomu w kompleksie przykładano „sztuczną” siłę zewnętrzną i rozciągano taki kompleks rejestrując siłę maksymalną i jednocześnie obliczając pracę siły rozciągającej. Na podstawie tzw. Twierdzenia Jarzynskiego autorzy oszacowali zmiany energii swobodnej potrzebnej do rozerwania czy utworzenia kompleksu. W pracy #1 zbadano dwa przeciwciała testowane w klinikach i ich mieszanie. Obliczenia pokazały, że stosowanie mieszanki ma sens, zespół przeciwciał wiąże się do białka wirusa mocniej niż każde z osobna. Wariant Delta okazał się być też podatny na taką neutralizację, jednak wariant Omicron już nie. Ponadto wykryto, że jedno z przeciwciał jest znacznie „słabsze” (REGN10987). Cenna jest analiza wkładów poszczególnych aminokwasów obszaru kontaktowego w te silne oddziaływania, Obliczenia pokazują, które aminokwasy są kluczowe, a które mają mniejsze znaczenie. Oceniono też relacje pomiędzy wkładami elektrostatycznymi a VdW do tej energii swobodnej. Chociaż tempo symulacji SMD było ok. 10 x większe niż typowo stosowane w eksperymentach AFM, co daje zbyt wysokie wartości siły na rozrywanie kompleksu, to wyniki jakościowo są zgodne z niezależnymi danymi eksperymentalnymi. Publikacja #1 jest wg mnie bardzo elegancką aplikacją dobrze już rozwiniętych metod modelowania komputerowego do bardzo ważnego problemu medycznego. Praca jest napisana ładnie, prosto i do rzeczy. Autorzy zadbali by była zgromadzona rozsądna statystyka, Zastosowano dodatkowo nieco inną metodologię modelowania gruboziarnistego do oceny tych samych

efektów, ale tego tutaj nie komentuję, bowiem doktorant akurat w tej publikacji tych obliczeń nie wykonywał. W trakcie obrony byłbym ciekaw dowiedzieć się, uzasadnienia co spowodowało taki, a nie inny wybór kierunku siły SMD rozrywającej kompleks. Czy testowano inne kierunki? Jakie byłyby ich wpływ na otrzymywane wartości? Czy są jakieś podpowiedzi z eksperymentu, który kierunek siły jest najbardziej realistyczny?

W drugiej części Rozdziału 3 przedstawiono wyniki obliczeń realizowanych wg podobnego schematu badając problem czy "nanobody" wiąże się do domeny RBD kolca silniej czy słabiej niż to przeciwciało? W publikacji #2 autorzy zbadali wiązanie obu przeciwciał stosując dwa podejścia – pełnoatomowe SMD oraz dynamikę molekularną z gruboziarnistym polem MARTINI połączoną z obliczeniami energii swobodnej metodą US (próbkiowania parasolowego, czyli *umbrella sampling*). Tutaj doktorant sam, pod nadzorem prof. Muan Suan Li, wykonał wszystkie obliczenia i analizy wyników. W mojej ocenie również ta publikacja zasługuje na uznanie. Można zastanawiać się do jakiego stopnia wyniki są „odporne” na poczynione założenia, czy podawanie policzonych wartości energii z dokładnością do 0.1 kcal/mol jest do końca uprawnione, czy jednak rzeczywista niepewność tych obliczeń nie jest większa niż niepewności statystyczne podane w tabelach z pracy #2, jednak jakościowo wyniki są zgodne z eksperymentami i uczą nas czegoś nowego: Przeciwciało wiąże się mocniej niż nanociało, ale tylko do typu dzikiego tj. WT wirusa. Dla wariantów Alfa, Kappa i Delta to nanociało H11-H4 ma wg fizyków lepszy potencjał terapeutyczny. Publikacja w Sci. Reports (#2) jest napisana bardzo porządnie, zwięźle i spełnia rygory prezentacji naukowej. Jakość rysunków jest dobra, dyskusja może nieco zbyt skąpa, ale wnioski wyważone i nie idące zbyt daleko. Solidna praca ze sporą dozą nowych rezultatów, nie prezentowanych wcześniej w literaturze światowej. Trzeba podkreślić, że uzyskanie tak znacznej liczby wyników wymagało ogromnej pracy obliczeniowej i pracy związanej z analizą trajektorii, zwłaszcza obliczenia energii swobodnej metodami US są żmudne i trudne. Doktorant wykazał się zatem bardzo dobrym opanowaniem warsztatu teoretycznej biofizyki obliczeniowej.

Dowodzi tego ostatnia praca z cyklu (#3 J. Phys. Chem. B) nt. podstępnej roli białka NSP1 wirusa w blokowaniu syntezy innych białek, które potencjalnie mogłyby utrudnić namnażanie wirusa w komórkach ludzkich. To perfidne działania odbywa się poprzez przyłączanie NSP1 do wejścia do kanału w rybosomie, maszynie molekularnej syntetyzującej białka w oparciu o matrycę RNA. Białko wirusa siedzące u wejścia do kanału blokuje RNA i synteza białek ludzkich ustaje. Brakuje np. przeciwciał czy innych czynników utrudniających wirusowi namnażanie. Wykonanie tej pracy wymagało sporej pomysłowości: (1) zauważania problemu, (2) znalezienia realistycznego modelu strukturalnego, (3) przygotowania kompleksu RNA z białkiem S40, (4) uproszczenia układu by umożliwić bardziej masowe obliczenia dla podukładu, (5) ocenienia czy uproszczone modele nie psują zbyt wiele danych, które chcemy uzyskać z obliczeń. Niewielki zespół wykonał te wszystkie zadania bardzo dobrze, powstał model pozwalający analizować na poziomie molekularnym oddziaływanie między szkodliwym białkiem a ludzkim rybosomem. Widzę tutaj większe znaczenie tej publikacji, daje ona wskazówkę metodologiczną do innych obliczeń tego typu. Warto też zauważyć, że w publikacji #3 wykorzystano cykl termodynamiczny (tzw. obliczenia alchemiczne), by w prosty sposób wyznaczyć efekty energetyczne przeniesienia mRNA z wody do wnętrza białka, metoda ta jest ostatnio mniej stosowana, ale ma ciekawe podstawy formalne.

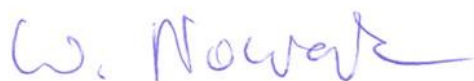
Patrząc ogólnie stwierdzam, że w doktoracie nie ma znaczącego rozwoju metod czy nowych pomysłów formalnych. Jest to bardzo solidna aplikacja istniejących metod i programów do badania problemów o dużym znaczeniu praktycznym.

Strona redakcyjna rozprawy doktorskiej jest niemal znakomita, znalazłem ze dwie litrowki, są usterki w spisie literatury, bowiem wiele pozycji nie ma podanych stron. Muszę zauważyć, że poruszane zagadnienia dotyczą białek, więc ktoś mógłby powiedzieć, że to domena biologii, biochemii czy nawet medycyny, a nie fizyki. Moim zdaniem Rada może spokojnie nadać stopień doktorski w dyscyplinie nauki fizyczne, która obejmuje obecnie biofizykę. Metody badawcze oparte są całkowicie na modelach fizycznych, obliczone wielkości należą do termodynamiki klasycznej, zaś równanie Langevina rozwiązywane tutaj komputerowo to rdzeń mechaniki klasycznej.

KONKLUZJA

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Hung Van Nguyena stanowi rozwiązanie problemu naukowego przy pomocy metod typowych dla nauk fizycznych.. Rozprawa dowodzi dobitnie, że doktorant potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe z wykorzystaniem zaawansowanych metod komputerowych symulacji dynamiki i mechaniki układów molekularnych oraz potrafi dać wkład do interpretacji wyników takich oblicze. Rozprawa świadczy o tym, że doktorant bardzo dobrze zna najnowszą literaturę związaną z badanymi problemami, zwłaszcza badaniami strukturalnymi wirusa SARS-CoV-2. Doktorant ma bardzo duży dorobek naukowy – zrealizował wiele innych projektów.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia ustawowe (tj. Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z 2022 poz. 574 z późn. zm.) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Z przekonaniem wnoszę o dopuszczenie pana Hung Van Nguyena do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.



Wiesław Nowak, prof. zw.