



Dr hab. Maciej Bobrowski prof. uczelni.  
Politechnika Gdańska,  
Wydział Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej,  
Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk.  
e-mail: mate@mif.pg.gda.pl  
tel. +48 58 347 12 35

Gdańsk, 06.03.2024

## **Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Igi Biskupek zatytułowanej „Badanie mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę II przez domenę wiążącą receptor białka S wirusa SARS-CoV-2 z wykorzystaniem pola siłowego UNRES.”**

Na początku, zanim przejdę do analizy samych badań wykonanych przez Panią Igę Biskupek, a później napisanej przez nią pracy doktorskiej, chciałbym skomentować temat badań i podejście doktorantki do wyboru przedmiotu badań. Mianowicie podjętym problemem był wirus SARS-CoV-2 (wywołujący chorobę COVID-19) i pierwszy etap wywoływania przez niego zakażenia u ssaków. Mianowicie Pani Iga Biskupek zbadała dokowanie koronawirusa do białka (enzymu) ACE2, oraz, w drugiej części, przeprowadziła analizę mechanizmu infekcji w organizmie człowieka w przypadku najbardziej rozpowszechnionych odmian wirusa: alfa, beta, gamma, delta, omicron, wild type. Tematyka ta jest bardzo istotna. Recenzję pisałem w marcu 2024 r. Epidemia koronawirusa rozpoczęła się 17 listopada 2019 r. w mieście Wuhan, w środkowych Chinach, a 11 marca 2020 r. została uznana za pandemię. W Polsce pierwszy przypadek zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oficjalnie stwierdzono 4 marca 2020 r. w szpitalu w Zielonej Górze, gdzie zdiagnozowano zachorowanie 66-letniego mężczyzny, który przyjechał autokarem z Niemiec. Od 20 marca 2020 r. do 15 maja 2022 r. (ponad dwa lata) obowiązywał w Polsce stan epidemii. Potwierdzono około 7 mln zgonów na świecie. Wzrosła też bardzo śmiertelność z powodu innych chorób, a także zmalała liczba urodzeń. A na całym świecie tąpnięciu uległy liczne gałęzie ludzkiej działalności, takie jak: gospodarka, turystyka, kultura, oświata, ochrona zdrowia, i wiele innych. Pani Iga Biskupek zaczęła swoją pracę badawczą wkrótce po wynalezieniu przyczyn choroby COVID-19. A zatem chciałbym w tym miejscu pochwalić panią Igę Biskupek za to, że bardzo szybko zaczęła metodą naukową dążyć do poprawy bardzo dramatycznej sytuacji i do dowiedzenia się więcej o mechanizmie odpowiedzialnym za zakażenie. Oczywiście każdy zdaje sobie sprawę, że znajomość mechanizmu zakażenia jest sprawą fundamentalną i dopiero ta wiedza pozwala na znalezienie antidotum.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska powstała w Pracowni Symulacji Polimerów w Katedrze Chemii Teoretycznej UG pod opieką dr hab. Artura Giedonia, profesora uczelni. Jak wskazuje nazwa zespołu, w gronie tym stosuje się i rozwija metody teoretyczne służące badaniom struktur molekularnych, mniejszych i większych, w tym makrocząstek. Zespół już od dłuższego czasu zajmuje się tematyką białek, tzn. ich teoretycznego zwijania na podstawie informacji o strukturze 1-rzędowej i przy pomocy odpowiednich algorytmów pól siłowych. Zespół bierze udział w rozwijaniu pola siłowego nazywanego w skrócie UNRES, w którym, z kolei, stosuje się przybliżenie gruboziarniste (ang. coarse graining), czyli znaczne uproszczenie modeli układów atomów, które postrzega się jako elipsoidy. W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że oddziaływanie elipsoid



opisywane jest na podstawie danych empirycznych, gdyż złożoność oddziaływań np. pomiędzy resztami aminokwasów jest bardzo duża i może obejmować zarówno wiązania silne jak i słabe.

I właśnie pole siłowe UNRES zastosowała pani magister Iga Biskupek do swoich badań. Stosując odpowiednie oprogramowanie wykorzystujące UNRES Pani Iga Biskupek symulowała proces wiązania pomiędzy wybranymi białkami wariantów wirusa i wybranym białkiem gospodarza. Wcześniej, na podstawie danych literaturowych, głównie dotyczących hipotez opisujących mechanizm makromolekularny, danych o sekwencji i strukturach przestrzennych zaangażowanych białek, jak również przy pomocy oprogramowania pod nazwami Clustal, UCSF Chimera a także przy pomocy intuicji chemicznej zlokalizowano potencjalne miejsca dokowania wybranej domeny białka S wirionu oraz białka zakażanego organizmu, którym to białkiem ma być najprawdopodobniej ACE2. To pierwsze, białko S (i domena RBD tego białka) są obecne w charakterystycznym kolcu wirusa (ang. spike; S). Wirus dostając się do organizmu ma rozpoznawać miejsce infekcji właśnie poprzez swoiste oddziaływanie pomiędzy dwoma białkami: wirusowym RBD i ACE2 gospodarza. Następnie doktorantka analizuje zaobserwowane oddziaływania pomiędzy aktywnymi obszarami obydwu białek, przy czym wielokrotnie odnosi się do różnic w sekwencji aminokwasowej w przypadku białek ACE2 obecnych u różnych zwierząt oraz do danych o zachorowalności tych zwierząt na COVID-19, co pozwoliło na wiarygodne opisanie charakterystycznych aktywnych oddziaływań pomiędzy białkami. Doktorantka następnie poddała analizie uzyskane stany przejściowe w procesie zakażenia żywiciela wirusem SARS-CoV-2, czyli te wynikające z uzyskiwania minimum energii jak największego oddziaływania pomiędzy RBD i ACE2. Utworzenie takiego stanu przejściowego ma być niezbędne do wystąpienia kolejnych etapów infekcji, czyli tych, które prowadzą do uwolnienia wirionów potomnych w komórkach zakażonego organizmu. Pani Iga Biskupek zbadała mechanizm dokowania kolca koronawirusa do wyselekcjonowanego białka gospodarza, którym ma być enzym ACE2. Następnie pani Biskupek przeszła od modelu gruboziarnistego do pełnoatomowego i ponownie wykonała symulacje dynamiki molekularnej. Na koniec porównano energie oddziaływań w przypadkach różnych odmian wirusa. Dość ciekawa jest sama końcowa konkluzja dot. najbardziej prawdopodobnego scenariusza infekcji, związanego właśnie ze znalezionymi energiami oddziaływania pomiędzy RBD i ACE2. Mianowicie pani Iga Biskupek postuluje, że minimum energetyczne w stanie pośrednim nie może być zbyt głębokie, gdyż proces infekcji zatrzyma się w niewłaściwym miejscu, co uniemożliwi zajście dalszych efektywnych kroków zakażenia gospodarza. Taka sytuacja ma mieć miejsce w przypadku ACE2 psów oraz świń. Autorka nawet podała we wstępie dane o sposobie w jaki działają niektóre leki na COVID-19, co może mieć związek min. z siłą oddziaływań pomiędzy białkami.

Praca wskazuje bezwzględnie na dojrzałość badawczą, dociekliwość, zainteresowanie tematem i poświęcenie się jemu i dużą pracowitość. Również analiza danych literaturowych została wykonana profesjonalnie i trafnie, w celu uzyskania najbardziej istotnych danych.

Poniżej trochę krytyki.

Brakuje mi porównań dotyczących wiarygodności danych o energiach oddziaływań i uzyskiwanych danych z obliczeń zarówno polem siłowym UNRES i AMBER, a przecież właśnie te dane mają właśnie być podstawą do końcowego wniosku o sposobie wiązania dwóch kluczowych białek. Na przykład brak jest porównania uzyskiwanych energii z energiami zauważanych oddziaływań typu wiązanie wodorowe,  $\pi$ - $\pi$  kation- $\pi$ , hydrofobowe i inne. Są to dość słabe oddziaływania pomiędzy fragmentami molekuł a zatem opis energii jest dość mocno wrażliwy na wykorzystaną metodę. Brakuje mi w tym miejscu krytycyzmu. Autorka podkreślała zalety upraszczania modeli w przybliżeniu gruboziarnistym, jednak nie skrytykowała jakości opisu po za-



stosowaniu uproszczeń. Przydał by się krótki rozdział z opisem porównań, np. wyodrębnionych i scharakteryzowanych oddziaływań z danymi literaturowymi dla takich samych oddziaływań opisanych metodami w innych modelach. Właściwie z wykonanych rysunków nawet rzadko widać niektóre oddziaływania, nie ma też zaznaczonych odległości pomiędzy oddziałującymi aminokwasami albo ich kluczowymi atomami. Trudno jest więc odnieść te wyniki do do wyników uzyskanych bardziej zaawansowanymi algorytmami stosowanymi dla mniejszych modeli, ale bez uproszczeń.

Nie doszukałem się też informacji o tym, co dokładnie następuje po uzyskaniu już stanu przejściowego. Autorka pisze o dość ciekawym wniosku, mianowicie o tym, że minimum energetyczne w stanie pośrednim nie może być zbyt głębokie, gdyż proces infekcji zatrzyma się w niewłaściwym miejscu, co uniemożliwi zajście dalszych efektywnych kroków zakażenia gospodarza. I właściwie ten wniosek urywa dalszą informację albo chociaż spekulację. Mam na myśli sam mechanizm molekularny. Bo to, że następuje interakcja pomiędzy dwoma białkami i w jaki sposób to minimum wygląda (od strony konfiguracji przestrzennej) to czytelnik wie, ale co dokładnie następuje w następnym kroku oraz jaki precyzyjnie ma to mieć związek ze względnie niegłębokim (energetycznie) stanem przejściowym, to już właściwie nie wiadomo. Czy ten kompleks stanu przejściowego ma się rozpaść, czy ma może nastąpić seria rotacji, zerwania części oddziaływań, itd., nie wiadomo. A może jednak to właśnie ten etap wpłynę na swoistość zakażenia wirusem a nie samo dokowanie? A jeśli nie to dlaczego nie? Brak jest tutaj krytycznej dyskusji. Tzn. krytycznej w odniesieniu do własnych badań i wniosków.

Wstęp, nazywany częścią teoretyczną, jest bardzo długi ale za to dość ciekawy i zawiera min. dane statystyczne z dramatycznego przebiegu pandemii koronawirusa, którą mieliśmy szczęście przeżyć. W części wstępnej autorka zamieściła diagramy i rysunki, prawdopodobnie zaczerpnięte z innych prac. Jednak brak jest pod tymi rysunkami informacji o tym, z jakiego źródła pochodzą te rysunki. Nawet jeśli dany rysunek miałby być przerysowany to również wówczas informację o pochodzeniu oryginału należy umieścić, ze względu na procedury antyplagiatowe. W pracy występuje bardzo duża liczba błędów interpunkcyjnych w niektórych częściach pracy, w szczególności notoryczny brak przecinków w zdaniach. Pojawiły się również błędy literowe. Oczywiście, jak pisałem wcześniej, praca jest ciekawa i w ogólności dobrze napisana.

Praca doktorska jest oryginalna zaś podjęta tematyka i metody badawcze są bardzo trafne. Z pewnością uzyskane rezultaty badań mają znaczenie praktyczne ale też stanowią kolejny krok w celu zrozumienia istotnych mechanizmów, które zabijają organizmy żywe, w tym ludzi.

Doktorantka opublikowała jedną pracę za 140 punktów (jako pierwszy autor), 3 prace za 100 punktów (w 2 przypadkach jako pierwszy autor) i brała też udział w konferencjach.

Biorąc pod uwagę wszystko, co napisałem powyżej, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 186 ust. 1 pkt 3 oraz 5 jak również w art. 187 ust 1–4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U.2021.478. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Igi Biskupek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też oddzielnie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Igi Biskupek.

dr hab. Maciej Bobrowski, prof. PG