



Prof. dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Biomedycznej UAM

Poznań, 15 marca 2024 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Igi Biskupek

“Badanie mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę II przez domenę wiążącą receptor białka S wirusa SARS-CoV-2 z wykorzystaniem pola siłowego UNRES”

Niniejsza recenzja sporządzona została na wniosek przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne dr. hab. Zbigniewa Kaczyńskiego prof. UG zgodnie z uchwałą podjętą na posiedzeniu Rady Dyscypliny dnia 21 lutego 2024 roku w sprawie powołania recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr Idze Biskupek.

Doktorantka przedłożyła rozprawę o przywołanym powyżej tytule w formie maszynopisu. Rozważając dobór tematyki badawczej rozprawy warto podkreślić jej aktualność. Pandemia COVID-19 wywołana koronawirusem SARS-CoV-2 objęła szacunkowo niemal 800 milionów ludzi na całym świecie i doprowadziła do śmierci prawie 7 milionów chorych. Polska również została doświadczona pandemicznie, a liczba ofiar sięgająca 120 tysięcy spowodowała w szczycie pandemii spadek oczekiwanej długości życia Polaków o około dwa lata. Do tej dramatycznej sytuacji doszło pomimo iż wydawało się, że w XXI wieku dysponujemy nowoczesną, w porównaniu choćby z epidemią hiszpanki w początkach XX wieku, służbą zdrowia oraz rozbudowanym warsztatem badawczym w obszarach wirusologii, immunologii, projektowania leków czy szczepionek.

Zrozumienie mechanizmów towarzyszących infekcji wirusem SARS-CoV-2, a co za tym idzie postępom w rozwoju pandemii COVID-19 stanowiło wyzwanie dla licznych zespołów badawczych próbujących sprostać temu wyzwaniu. Trudno porównywać skalę pandemii COVID-19 ze wspomnianą wcześniej pandemią grypy hiszpanki z lat 1918-1920, można jednak zauważyć szereg podobieństw. Zakładając, że ludzkość potrafi efektywnie uczyć się na własnych błędach, zrozumienie zarówno molekularnych procesów towarzyszących infekcji, jak i w szerszym kontekście szeregu procesów w skali całej populacji, w tym również socjologicznych czy behawioralnych towarzyszących rozprzestrzenianiu się pandemii ma ogromne znaczenie. Dlatego tematyka rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr Ięgę Biskupek jest bez wątpienia aktualna i bardzo interesująca.

Warto również podkreślić, że badania te Doktorantka wykonała pod opieką promotorską uznanego specjalisty w zakresie symulacji komputerowych układów makromolekularnych – dr. hab. Artura Giełdonia, prof. UG z Pracowni Symulacji Polimerów, Katedry Chemii Teoretycznej Uniwersytetu Gdańskiego.

Jak wcześniej nadmieniałem, dysertacja zredagowana została przez mgr Biskupek w postaci klasycznego maszynopisu liczącego 133 strony i opatrzonego załącznikami zawierającymi dwie publikacje naukowe stanowiące trzon niniejszej rozprawy, w których Autorka jest głównym autorem. Praca zilustrowana została 34 rysunkami, 3 wykresami oraz 5 tabelami. Treść pracy podzielona została na 7 części zgodnie z klasyczną formułą redakcji manuskryptów z obszaru nauk ścisłych i przyrodniczych.

Przechodząc do omówienia pokrótce zawartości dysertacji, pierwszym rozdziałem merytorycznym jest część literaturowa poprzedzona szczegółowym wykazem stosowanych skrótów. Część literaturowa podzielona została na 5 podrozdziałów, w których Autorka kolejno przybliżyła klasyfikację i budowę koronawirusów, układ renina-angiotensyna, ewolucję wirusów na przykładzie koronawirusów, wirus SARS-CoV-2 oraz warsztat obliczeniowy. Opis teoretyczny tematyki koronawirusów jest zwarty ale treściwy i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy. Z kolei omówienie warsztatu badawczego daje dobre wyobrażenie metod obliczeniowych, a w szczególności metodologii UNRES, które mają zostać zastosowane do rozwiązania postawionego problemu badawczego.

W rozdziale trzecim Autorka sformułowała cel pracy, którym było zbadanie molekularnego mechanizmu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 powodującego chorobę COVID-19. Aby ten cel zrealizować postanowiła przeprowadzić serię symulacji procesu wiązania białka ACE2 z domeną wiążącą receptor (RBD) wirusa SARS-CoV-2 z wykorzystaniem pola siłowego UNRES wsparte o analizy sekwencyjne aby opisać reszty aminokwasowe uwikłane w proces infekcji. Równoległe podjęła problem wpływu zmienności genetycznej różnych wariantów wirusa na proces infekcji.

W kolejnej części rozprawy oznaczonej jako część eksperymentalna Autorka omówiła i przedyskutowała uzyskane wyniki. Rozdział ten Autorka podzieliła na dwie nienumerowane sekcje:

- *Badanie mechanizmu infekcji oraz powinowactwa koronawirusa SARS-CoV-2 względem enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2),*
- *Badanie roli mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę-2 (ACE2) przez domenę wiążącą białka S dominujących wariantów wirusa SARS-CoV-2.*

W obu tych sekcjach Autorka prezentuje i dyskutuje uzyskane wyniki. W pierwszej skupiła się na omówieniu znanych już oddziaływań oraz szczegółowemu omówieniu interakcji zaobserwowanych w modelu eksperymentalnym. W pierwszej sekcji omówiła także wyniki

uzyskane dla stanu przejściowego. Wyniki wsparte zostały również analizą rozkładu potencjału elektrostatycznego w badanych układach.

W drugiej sekcji na uwagę zasługuje dogodne, z punktu widzenia czytelnika, zestawienie mutacji wirusa (tabela II.4) oraz szczegółowa charakterystyka energetyczna stanu przejściowego, co pozwala wysunąć pewne wnioski dotyczące domniemanego mechanizmu wiązania i rozpoznawania RBD-ACE2.

W kolejnych rozdziałach Autorka przedstawia wnioski z rozprawy doktorskiej (rozdział V), wykaz ilustracji (rozdział VI) oraz bibliografię (rozdział VII). Zacytowana w pracy literatura jest bardzo bogata, liczy bowiem 319 pozycji, została też dobrze dobrana by zilustrować omawiane zagadnienia.

Najważniejszymi osiągnięciami badawczymi wynikającymi z pracy mgr Biskupek, w subiektywnej ocenie recenzenta są:

- zbadanie powinowactwa w procesie wiązania wirusa SARS-CoV-2 do receptora ACE2 w serii kompleksów tego białka pochodzącego od człowieka oraz kilku ssaków (pies, mysz, nietoperz, świnia i cyweta) przy użyciu pola siłowego UNRES. W efekcie Autorka zidentyfikowała stan przejściowy, w którym formuje się kompleks.
- Określenie zmian w mechanizmie infekcji różnymi formami wirusa (typ dziki pierwotny, alfa, beta, gamma, delta, omikron), ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań z różnych wariantów wirusa z ACE2.

W ocenie recenzenta, mgr Iga Biskupek zrealizowała postawione w ramach pracy doktorskiej cele badawcze. Zastosowany warsztat badawczy nie budzi wątpliwości, a wykorzystanie jako głównego narzędzia pola siłowego UNRES doskonale się sprawdziło w badaniach kompleksów RBD SARS-CoV-2 z ACE2. Dysertacja została napisana w sposób bardzo przystępny dla czytelnika, zilustrowana czytelnymi i informatywnymi rysunkami, a przeprowadzona dyskusja wyników jest wyczerpująca. Warto też docenić fakt, że wszystkie uzyskane wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach w czasopiśmie (klasyfikowany w Q1), w których Doktorantka jest pierwszym autorem.

Jednakże podczas lektury manuskryptu nasunęły mi się pewne komentarze krytyczne dotyczące sposobu prezentacji uzyskanych wyników, które chciałbym wyartykułować w tym miejscu, oczekując także, że zostaną wyjaśnione podczas publicznej obrony rozprawy.

Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej dla kompleksów ACE2 z RBD opisane w pierwszej części prezentowanych wyników (część IV, sekcja: *Badanie mechanizmu infekcji oraz powinowactwa koronawirusa SAS-CoV-2 względem enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2)*), o których mowa między innymi na stronie 54, 65 i kolejnych powinny,

w ocenie recenzenta, zostać zilustrowane przykładowymi danymi z symulacji – zależnościami RMSD lub energii potencjalnej w funkcji czasu symulacji. Jest to pewna niekonsekwencja ze strony Autorki, gdyż są zaprezentowane zależności RMSD czy energii potencjalnej dla wybranych trajektorii MD przykładowych układów omawianych w drugiej sekcji *Badanie roli mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę-2 (ACE2) przez domenę wiążącą białka S dominujących wariantów wirusa SARS-CoV-2 wyników* (rozdział 2.1, Wykres II.1 i II.2). Pomimo, że są to dość rutynowe wyniki, często nawet pomijane, to w przypadku pracy doktorskiej warto je zaprezentować, aby pokazać jakość i przebieg symulacji. W zasadzie są to bezpośrednie wyniki ilustrujące pracę Doktorantki.

W ocenie recenzenta ciekawym dla czytelnika aspektem byłaby tendencja zmian odległości pomiędzy konkretnymi resztami (często nawet takimi samymi lub podobnymi w badanej serii struktur) w analizowanych kompleksach. Oczywiście przy ilości analizowanych obszarów w poszczególnych kompleksach nawet obserwacje o charakterze jakościowym są bardzo istotne. Jednakże okraszenie tekstu wybranymi, przykładowymi wartościami liczbowymi odległości pomiędzy analizowanymi resztami z pewnością wzbogaciłoby i ubarwiło tekst.

Kolejną kwestią, która nasuwa się przy lekturze dysertacji i dotyczy obu nienumerowanych części obejmujących prezentację wyników w części eksperymentalnej jest pytanie, czy nie warto byłoby przedstawić zmiany i oddziaływania o charakterze bardziej globalnym jak na przykład czy nachylenie osi helis w strukturze ACE2 w rejonie wiążącym się z RBD wirusa uległo zmianie. Jeżeli tak, to jak zmieniały się te parametry?

Uwagi te nie umniejszają jednak pozytywnego odbioru pracy i są wskazówkami dla Autorki jakie informacje mogłyby być interesujące dla czytelnika.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Jak wcześniej nadmieniono, praca napisana jest poprawnym językiem fachowym, została starannie zredagowana, a rysunki ilustrujące omawiane w pracy problemy są, z małymi wyjątkami, czytelne. Podczas lektury pracy moją uwagę przykuło jednak kilka niezręcznych sformułowań lub błędów edytorskich, o których chciałbym nadmienić.

- Autorka w pracy wykorzystuje rysunki zaadaptowane z innych źródeł i poprawnie zacytowane. Niestety opisy na tych rysunkach są w języku angielskim i aby nie sprawiać pewnej przypadkowości mogłyby zostać przetłumaczone, na co z łatwością pozwalają obecne narzędzia graficzne. Tym bardziej, że niekiedy Autorka dokonywała takich adaptacji (patrz rysunek I.2 czy I.4).
- Pewną niekonsekwencją jest stosowanie przez Autorkę zamiennie nazwy „angiotensyna II” lub „angiotensyna-2” (np. w nazwach sekcji w rozdziale IV). Podobna sytuacja dotyczy notacji wirusa: „SARS-CoV-2” lub „SARS-CoV2”.

- Niezręczne jest stosowanie (nawet przy zastrzeżeniu w tekście aby nie mylić z histydyną) notacji heptapeptydu „HPPHCPC”. Bardziej czytelne jest „hPPhCPC”.
- Niekiedy numeracja rysunków w tekście była niepełna, co utrudniać może odniesienie się do właściwych rycin przywoływanych przez autorkę (przykład: str. 84, linii 8).
- Oddziaływania o charakterze wiązań wodorowych, o których mowa w tekście mogłyby zostać na rysunkach oznaczone linią przerywaną (przykładowo: rysunek II.4).
- W pracy pojawiają się typowe drobne błędy edytorskie (literówki), których Autorce nie udało się odnaleźć w finalnej wersji maszynopisu.

Komentarze te nie mają wpływu na pozytywny odbiór pracy, stanowią jedynie wskazówkę dla Autorki na co powinna zwracać w przyszłości uwagę podczas redakcji kolejnych prac.

Podsumowanie

W podsumowaniu niniejszej opinii o pracy doktorskiej stwierdzam, że mgr Iga Biskupek zrealizowała postawiony na wstępie cel pracy i uzyskała szereg interesujących i wartościowych wyników, które będą pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów infekcji wirusem SARS-CoV-2. Wykorzystany przez Doktorantkę aparat obliczeniowy został poprawnie dobrany, a zaprezentowane wyniki i ich interpretacja nie budzą wątpliwości. Doktorantka przeprowadziła również krytyczną dyskusję. Docenić należy też publikację uzyskanych wyników badań oraz zawarte w dokumentacji pozostałe dokonania naukowe.

Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Ięgę Biskupek spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późniejszymi zmianami). Przedkładam tedy wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Igi Biskupek do dalszych etapów procedury doktorskiej.