



Olsztyn, dnia 15 marca 2024

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” wykonanej w Katedrze Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Artura Gieldoña, prof. UG.

Rozprawa doktorska ma formę tradycyjną, a zaprezentowane w niej wyniki oparte są na dwóch pracach, w których Pani Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (ang. impact factor) tych prac wynosi 10,2 a liczba punktów MNiSW 280. Poza tymi dwoma pracami Pani Doktorantka jest współautorem dwóch innych prac o sumarycznym współczynniku oddziaływania równym 8,442 (punkty MNiSW – 170) oraz 10 doniesień konferencyjnych przedstawionych w formie plakatów. W jednej z tych prac Pani Doktorantka jest pierwszym autorem. Dorobek naukowy Pani Doktorantki należy ocenić jako znaczący na tym etapie kariery naukowej.

Rozprawa doktorska została podzielona na następujące części:

- streszczenia w językach polskim i angielskim,
- wykaz stosowanych skrótów,
- część teoretyczna w większości poświęcona koronawirusom, ze szczególnym naciskiem na wirus SARS-CoV-2, zawierająca również krótki opis metod obliczeniowych zastosowanych w pracy,
- części nazwanej przez Panią Doktorantkę eksperymentalną, zawierającą wyniki przeprowadzonych przez nią obliczeń (eksperymentów numerycznych). Główna część rozprawy doktorskiej podzielona została na dwie części. W pierwszej z nich Pani Doktorantka bada oddziaływanie domeny wiążącej receptor (RBD) białka kolca (białka S) koronawirusa do enzymów konwertujących angiotensynę II (ACE2) pochodzących z różnych organizmów. Druga część poświęcona jest zbadaniu wpływu mutacji w białku S, mających miejsce w różnych wariantach wirusa SARS-Cov-2, na jego oddziaływanie z ludzkim enzymem ACE2,



- Wnioski rozprawy doktorskiej
- Wykaz rysunków
- Bibliografia

W swojej rozprawie doktorskiej Pani Doktorantka podejmuje próbę zrozumienia na poziomie molekularnym jednego z etapów mechanizmu infekcji komórek pochodzących z różnych organizmów przez różne warianty koronawirusa SARS-CoV-2. Badany etap procesu polega na związaniu się białka S obecnego na powierzchni kapsuły wirusa z enzymem konwertującym angiotensynę II – ACE2 obecnego na powierzchni zaatakowanej komórki gospodarza. Pani Doktoranta skoncentrowała się na zbadaniu oddziaływań pomiędzy RBD białka S, a receptorem ACE2 obecnym w organizmach o różnym stopniu podatności na infekcję (człowiek, nietoperz, cyweta, mysz, świnia i pies). Drugi problem badawczy podjęty przez Panią doktorantkę polegał na zbadaniu oddziaływania pomiędzy ludzkim białkiem ACE2, a zmutowanymi białkami S pochodzącymi od różnych wariantów wirusa SARS-CoV-2 (alfa, beta, gamma, delta i omicron). Oczywiście lepsze zrozumienie mechanizmu wiązania wirus-receptor, w tym wpływu mutacji punktowych na to oddziaływanie, może przysłużyć się w racjonalnym zaprojektowaniu odpowiednich leków, które mogłyby zatrzymać infekcję SARS-CoV-2 na wstępnym etapie. Dlatego problem podjęty przez Panią Doktorantkę niewątpliwie ma bardzo duże znaczenie w kontekście walki ze skutkami rozprzestrzeniania się koronawirusa SARS-CoV-2.

Do zbadania oddziaływań RBD – ACE2 Pani Doktorantka zastosowała powszechnie dostępne narzędzia modelowania molekularnego oraz przeprowadziła symulacje dynamiki molekularnej kompleksu białka S z enzymem ACE2 za pomocą gruboziarnistego modelu UNRES. Zastosowane metody zostały dobrane właściwie do przedstawionego zagadnienia badawczego, aczkolwiek duża część otrzymanych wniosków ma charakter bardziej jakościowy, niż ilościowy. Układ pracy jest logiczny i właściwie dobrany do przedstawionej tematyki. Niestety praca zawiera dużą ilość błędów językowych prawdopodobnie wynikających z pośpiechu w jej przygotowaniu. Oto kilka z nich: str. 6 – „Enelope Protein”; str. 15 – „...które powstały w opisanie zostały w jednostce czasu...”; str. 20 – „...która jest szczególnie niebezpiecznymi dla cieląt...”; str. 25 – „...oraz ludzi opiekującymi się zwierzętami...”; str. 34 – „...ostrej uszkodzenie płuc...”; str. 48 – „Multiscale dodaje możliwość wieloskładnikowych



układów molekularnych...”; str. 75 – „Oddziaływanie F486(RBD) oraz trzema resztami...”; str 87 – „Nowo zbudowane warianty alfa, beta, gamma oraz omicron...” – brak delta, która jednak pojawia się na liście symboli. Pojawiają się też niestety sformułowania raczej żargonowe np. na str 81 – „dodatkowym oddziaływaniem stabilizującym kompleks jest wzajemna orientacja przestrzenna RBD – ACE2”. Również podpisy rysunków i tabel powinny być formułowane dokładniej i w sposób bardziej przemyślany. Przykładowo w tabeli II.1 brakuje reszt 326 i 330 z trzeciego obszaru kontaktowego ACE2. Wydaje się, że kolejne uważne przeczytanie rozprawy pozwoliłoby na usunięcie większości wyżej przedstawionych pomyłek i nieścisłości.

Mam do Pani Doktorantki trzy pytania dotyczące zastosowanej w badaniach metodologii:

Zarówno w pierwszej części dotyczącej oddziaływania białka S z białkami ACE2 pochodzącymi z różnych organizmów, jak i w części drugiej przedstawiającej badania oddziaływania różnych wariantów wirusa z ludzkimi białkami ACE2 struktury początkowe konstruowane były poprzez mutacje *in silico* struktury wyjściowej (kod pdb: 6LZG). Jak Pani Doktorantka ocenia wiarygodność stworzonych w ten sposób struktur wyjściowych? W szczególności struktury krystaliczne białek ACE2 dostępne są (oprócz białka ludzkiego) dla cywet (kod-pdb: 3D0G, 3D0H, 3D0I, 3SCK, 3SCL, 7WSK). Jak wygląda porównanie struktury krystalicznej białka ACE2 pochodzącego od cywet z przygotowaną przez Panią Doktorantkę strukturą ACE2 otrzymaną za pomocą mutacji *in silico*?

Pani Doktorantka stosowała model gruboziarnisty UNRES zarówno do przeprowadzenia symulacji dynamiki molekularnej kompleksów RBD z ACE2 pochodzących z różnych organizmów, jak również do symulacji różnych wariantów domeny RBD z ludzkim ACE2. Jednak tylko w drugim przypadku nałożono więzy na kąty torsyjne łańcucha głównego, co spowodowało ograniczenie przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej białek. Jaka jest przyczyna tego rodzaju rozbieżności w zastosowanej metodologii? Czy problemem była stabilność struktur domeny RBD powstałej poprzez wprowadzenie w strukturze wyjściowej (pdb: 6LZG) mutacji *in silico*?

Ważnym wynikiem uzyskanym w pracy doktorskiej wydaje się być lokalizacja stanu przejściowego badanego kompleksu uzyskana za pomocą metody UNRES. Na stronie 68 w



tabeli II.3 przedstawiono statystyki opisujące proces przejścia od stanu początkowego do stanu przejściowego dla enzymu ACE2 pochodzącego od człowieka, nietoperza i myszy. W dalszej części pracy analizowane są oddziaływania w stanie przejściowym również dla pozostałych trzech organizmów: cywety, świni i psa. W kontekście tabeli II.3 nie zawierającej danych dla symulacji ACE2 z cywety, świni i psa, nie jest dla mnie jasne skąd pochodzą informacje strukturalne dla stanu przejściowego dla wyżej wymienionych organizmów. Czy symulacje dynamiki molekularnej dla kompleksów ACE2 pochodzących z tych organizmów zostały przeprowadzone przez Panią Doktorantkę? Jeśli tak to dlaczego statystyki dla tych symulacji nie zostały ujęte w tabeli II.3? Jeśli nie to skąd wzięto struktury stanu przejściowego dla tych organizmów przeanalizowane w rozdziale 2.5?

Najważniejsze wyniki przedstawionej rozprawy doktorskiej to określenie struktury przestrzennej stanu przejściowego kompleksu białka S z receptorem ACE2 oraz określenie kluczowych reszt aminokwasowych znajdujących się na styku w.w. białek mających największy wkład w trwałość powstałego kompleksu, zarówno w stanie początkowym, jak i w zlokalizowanym stanie przejściowym. Bardzo ważne wydają się też przedstawione informacje na temat możliwego wpływu mutacji w białku S, oraz różnic w sekwencji aminokwasowej białek ACE2, na stabilność powstałego kompleksu w obu dostępnych formach.

Podsumowując, uważam, że cel rozprawy został przez Panią Doktorantkę zrealizowany jednak duża część wyników (zwłaszcza te dotyczące znaczenia poszczególnych reszt aminokwasowych znajdujących się na styku ACE2 – RBD) ma charakter bardziej jakościowy, niż ilościowy. Duża wartość tego rodzaju badań polega na wskazywaniu przez nie możliwych dróg przeprowadzania eksperymentów, które mogą pozwolić na weryfikację wniosków otrzymanych za pomocą technik modelowania molekularnego. Wnioski z badań przeprowadzonych przez Panią Doktorantkę z pewnością mogą stanowić inspirację do dalszych badań nad wirusem SARS-CoV-2 mających charakter czysto eksperymentalny. Dopiero przeprowadzenie odpowiednich eksperymentów *in vitro* może znacznie wzmocnić (lub zanegować) wnioski z przedstawionej rozprawy doktorskiej. Niemniej jednak uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska wnosi istotny wkład do badań nad wirusem SARS-CoV-2.

W mojej ocenie praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Dz.



UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

dr hab. **Maciej Maciejczyk**, prof. UWM

Katedra Fizyki i Biofizyki

U. 2018 poz. 1668). W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr. Igi Biskupek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,