



UNIwersytet
Warszawski

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

11 września, 2023

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 600
<http://bionano.cent.uw.edu.pl>

Rada Naukowa
Instytutu Fizyki PAN
Al. Lotników 32/46
02-668 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Quyen Van Vu

Rozprawa doktorska mgra Quyen Van Vu zatytułowana „*Influence of the ribosome on protein injection and folding*” została napisana w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Mai Suan Li z Instytutu Fizyki PAN. Drugą osobą, wymienioną w podziękowaniach, która nadzorowała pracę badawczą pana Q. V. Vu i występuje jako ostatni autor dwóch z trzech publikacji jest prof. Edward P. O'Brien z Penn State University w USA.

Temat badawczy rozprawy dotyczy badania procesu zwijania białek w tunelu rybosomu. Białka pełnią wiele funkcji w komórkach, w tym jako enzymy katalizują reakcje. Aby móc pełnić te funkcje, białka muszą przybrać określoną trójwymiarową strukturę przestrzenną. Proces kształtowania się i formowania takiej struktury przestrzennej nazywamy zwijaniem białka. Dla małych białek proces ten nie wymaga dodatkowych czynników, natomiast in vivo większość białek zwija się już podczas ich syntezy (w obecności rybosomu) albo, po uwolnieniu z rybosomu, w obecności innych makrocząsteczek takich jak białka opiekuńcze. Złe zwinięcie białka, tzw. *misfolding*, powoduje, że białko nie przyjmuje funkcjonalnej struktury trzeciorzędowej. Występowanie źle zwiniętych białek w komórkach może być przyczyną chorób.

Rybosomy są kompleksami białek i kwasów nukleinowych, które są odpowiedzialne za proces syntezy polipeptydów w komórkach. Są więc rybozymami, gdyż katalizują reakcję tworzenia wiązań peptydowych (amidowych) pomiędzy aminokwasami. Tworzenie tych wiązań odbywa się w miejscu katalitycznym, tzw. *peptidyl transferase center* (PTC), w dużej podjednostce rybosomu. Kolejność przyłączania aminokwasów określone jest poprzez sekwencję mRNA, którego fragment oddziałuje z rybosomem i po którym rybosom się „ślizga”. Co ważne, syntezowany łańcuch polipeptydowy nie jest uwalniany bezpośrednio do otoczenia tylko wchodzi w tunel dużej jednostki rybosomu. Tunel ten jest zbudowany głównie z rybosomowego RNA (rRNA), ma około 100 Å długości (w formie rozwiniętej odpowiada to ok. 30 aminokwasom) i zapewnia ochronne środowisko dla wydłużającego się peptydu. Tunel zawiera przewężenie oraz rozszerza się przy ujściu z dużej

podjednostki rybosomu. W niektórych przypadkach dochodzi do wstępnego formowania struktury drugorzędowej polipeptydu już w tunelu i wtedy może się w nim zmieścić nawet 60 aminokwasów.

Badania zwijania białek *in vitro* prowadzone były od ponad pięćdziesięciu lat, ale od dwóch dekad, po rozwiązaniu struktury trójwymiarowej rybosomu, naukowcy skupili się na badaniach zwijania białek również *in vivo*, w obecności rybosomu. Badania te pokazały, że dla większości białek ich zwijanie jest kotranslacyjne, czyli zachodzi równolegle z syntezą polipeptydu w rybosomie. Zwijanie to jest wspomagane przez różne czynniki takie jak tunel w rybosomie, szybkość syntezy polipeptydu, która wynika z sekwencji mRNA oraz przy długich łańcuchach także poprzez oddziaływanie z powierzchnią rybosomu wokół ujścia tunelu.

Mimo iż początkowo sądzono, że tunel zapewnia tylko ochronną rolę przed degradacją polipeptydu zanim zwinie się on do struktury funkcjonalnej, to ostatnie badania wskazują na czynną rolę tunelu rybosomu w zwijaniu. Dalsze badania wpływu rybosomu na zwijanie białek są więc istotne i mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia tego procesu (zależnego od sekwencji mRNA) co ułatwi projektowanie związków mogących stać się lekami.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest oparta o wyniki badań autora opublikowanych w latach 2020-2023 w następujących artykułach:

1. Nissley, D. A.; **Vu, Q. V.**; Trovato, F.; Ahmed, N.; Jiang, Y.; Li, M. S.; O'Brien, E. P. Electrostatic Interactions Govern Extreme Nascent Protein Ejection Times from Ribosomes and Can Delay Ribosome Recycling. *JACS*, 2020, 142 (13), 6103–6110.
2. **Vu, Q. V.**; Jiang, Y.; Li, M. S.; O'Brien, E. P. The Driving Force for Co-Translational Protein Folding Is Weaker in the Ribosome Vestibule Due to Greater Water Ordering. *Chem. Sci.* 2021, 12 (35), 11851–11857.
3. **Vu, Q. V.**; Nissley, D. A., Jiang, Y.; O'Brien, E. P.; Li, M. S. Is Posttranslational Folding More Efficient Than Refolding from a Denatured State: A Computational Study. *J. Phys. Chem. B* 2023, 127 (21), 4761–4774.

Czasopisma, w których mgr Q. V. Vu opublikował wyniki badań są anglojęzyczne, znajdują się na liście *Journal Citation Reports* i mają wysokie wskaźniki oddziaływania (tzw. *impact factor*, IF). W ostatnich latach wskaźnik IF dla czasopisma *JACS* wynosi 15, *Chem. Sci.* – 10 i *J. Phys. Chem. B* – 3,5. Dodatkowo są to czasopisma interdyscyplinarne łączące dyscypliny fizyki, chemii i biologii.

Pan Q. V. Vu jest także współautorem czterech innych artykułów, które formalnie nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej, ale część z nich jest związana tematycznie z rozprawą. Dwa z nich są to publikacje w *bioRxiv*, jedna publikacja w prestiżowym *Nat. Commun.* i jedna w *Biochemistry*.

Prace będące częścią rozprawy są pracami zbiorowymi. W dwóch publikacjach mgr Quyen Van Vu występuje jako pierwszy autor, a w dwóch jako drugi autor. W związku z tym pan Q. V. Vu dołączył do rozprawy oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładów do publikacji, a także swoje oświadczenie przedstawiające jego wkład. Z tych oświadczeń wynika, że mgr Q. V. Vu przygotowywał i przeprowadzał symulacje pełnoatomowej i zredukowanej dynamiki molekularnej oraz miał znaczący wkład w opracowanie wyników do wszystkich trzech publikacji. Do publikacji numer 1 przeprowadził i zanalizował symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej, przygotował odpowiednie rysunki i

brał udział w pisaniu manuskryptu. Do publikacji numer 2 i 3 przeprowadził wszystkie symulacje, analizował ich wyniki, przygotował rysunki i brał udział w pisaniu manuskryptów. Jego udział, jeśli chodzi o część wykonawczą i związaną z analizą wyników można uznać za dominujący w powstanie tych artykułów.

Rozprawa doktorska, mimo że jest oparta o cykl prac, ma standardowy podział na rozdziały. Cykl artykułów poprzedza około 30 stronicowe wprowadzenie, które stanowi ważną część rozprawy. Rozprawa oraz wprowadzenie zostały napisane w języku angielskim, poza streszczeniem, które jest napisane w języku polskim. Rozdział 1 jest poświęcony przedstawieniu zjawiska zwijania białek do stanu natywnego, czyli przyjmowania przez polipeptyd stabilnej struktury przestrzennej. Następnie opisany jest rybosom i rola tunelu, przez który wychodzi syntezowany polipeptyd. Na końcu tego rozdziału przedstawione są cele rozprawy. W rozdziale 2 autor opisuje metody obliczeniowe, które stosował w swojej pracy badawczej. Główną techniką były symulacje dynamiki molekularnej, zarówno pełnoatomowe jak i gruboziarniste. Przedstawione są też wyrażenia algebraiczne stosowane do wyznaczenia energii symulowanych systemów (tzw. pola siłowe) w tych dwóch podejściach. Autor opisuje także w skrócie metody wzmocnionego próbkowania w dynamice molekularnej – tzw. sterowaną dynamikę oraz *umbrella sampling*. W dalszych częściach przedstawione są metody analizy symulacji. W rozdziałach 3, 4 i 5 umieszczone są publikacje, w których opisane zostały wyniki badań autora rozprawy. Ostatni rozdział zawiera krótkie podsumowanie wyników, po którym autor umieszcza wykaz odnośników. Odnośniki literaturowe to ponad 150 pozycji; autor cytuje artykuły anglojęzyczne z listy *Journal Citation Reports*.

Pierwsza z cyklu prac opublikowana w *JACS* w 2020 roku dotyczy symulacji gruboziarnistych i pełnoatomowych fragmentu rybosomu. Na podstawie tych symulacji autorzy chcieli ocenić i uzasadnić szybkości wychodzenia różnych polipeptydów z rybosomu po zakończeniu syntezy, czyli odczytu przez rybosom kodonu stop. Autorzy podejrzewali, że nie tylko czas syntezy łańcucha ma znaczenie, ale także czas jego wychodzenia z tunelu i uwolnienie z rybosomu. Przeprowadzono symulacje uwalniania 122 różnych polipeptydów metodami gruboziarnistymi i stwierdzono, że czasy ich wychodzenia z rybosomu po zakończeniu syntezy są różne, nawet 1000 razy. Następnie pan Vu przeprowadził szereg pełnoatomowych sterowanych symulacji dynamiki molekularnej fragmentu rybosomu powoli „wyciągając” polipeptyd z tunelu. Stwierdził, że dla białek, które wychodzą z tunelu powoli potrzebna jest około 30% większa siła niż dla białek wychodzących szybko. Głównym wynikiem tych symulacji było stwierdzenie, że to jak szybko polipeptyd opuszcza tunel zależy od oddziaływań elektrostatycznych. Naładowane dodatnio polipeptydy wychodzą wolniej, gdyż silniej oddziałują z ujemnie naładowanym rRNA tunelu. Przeprowadzono także analizę danych doświadczalnych gęstości rybosomów na określonych kodonach tzw. profilowanie rybosomów (*ribosome profiling*), która wskazała, że rybosomy białek „powolnych” spędzają więcej czasu na kodonie stop, co spowalnia też recykling rybosomu do kolejnej translacji.

Wyniki te uważam za ważne z punktu widzenia możliwego projektowania odpowiednich sekwencji mRNA na przykład dla przyspieszenia syntezy i uwalniania konkretnego polipeptydu z rybosomu. Manipulowanie szybkością produkcji białek może być istotne nie tylko w biotechnologii, ale także w projektowaniu leków.

W kolejnej publikacji w *Chemical Science*, w której mgr Quyen V. Vu występuje jako pierwszy autor, autorzy chcieli wyjaśnić badania doświadczalne sugerujące, że domeny, które zwiną się w ostatniej części tunelu (najdalszej od miejsca katalitycznego i tuż przy powierzchni rybosomu) są mniej stabilne niż gdyby zwinęły się w środowisku wodnym. Po wykonaniu symulacji potencjału średniej siły dla modelowych cząsteczek metanu okazało się, że ujście tunelu osłabia efekt hydrofobowy. W tunelu cząsteczki wody są bardziej zorganizowane, ale ich uwolnienie nie jest tak korzystne jak byłoby w środowisku wodnym. Sugeruje to, że środowisko ujścia tunelu spowalnia zwijanie białek, gdyż w zwijaniu łańcucha dominuje efekt hydrofobowy. W tej publikacji mgr Q. V. Vu przygotował i wykonał wszystkie symulacje, na podstawie których oszacował parametry termodynamiczne układu.

Wyniki te są ważne z punktu widzenia zrozumienia efektów obecności rRNA przy ujściu tunelu i stwierdzonej mniejszej stabilności zwiniętych w tunelu domen białkowych w porównaniu z ich stabilnością w roztworze wodnym. Wyniki te przyczyniają się do zrozumienia sposobu w jakim polipeptyd wydostaje się przez tunel z rybosomu.

W trzeciej z cyklu prac, opublikowanej w *J. Phys. Chem. B*, pan Q. V. Vu badał różnice pomiędzy zwijaniem się białek w obecności rybosomu i w roztworze wodnym. Dobór tematu był pokierowany danymi doświadczalnymi pokazującymi, że rola rybosomu w zwijaniu białek zależy od ich sekwencji. Autorzy wybrali trzy białka testowe i pan Quyen V. Vu przeprowadził dla nich symulacje dynamiki molekularnej w modelu zredukowanym. W jednym przypadku było to białko, którego struktura natywna była zapętlona co było dodatkową komplikacją przy analizie symulacji. Wyniki sugerują, że dla małego białka reduktazy dihydrofolianowej (*dihydrofoliate reductase*, DHFR) rybosom wspomaga zwijanie do formy natywnej. Białko to składa się z dwóch domen, które zwijają się oddzielnie. Dla acetylotransferazy CAT-III (*type III chloramphenicol acetyltransferase*) oraz ligazy DDLB (*D-alanine-D-alanine ligase B*), czyli większych białek, które są natywnie zapętlone, rybosom wspomaga zwijanie jedynie przejściowych nienatywnych struktur. Wyniki symulacji pokazały, że białka te zwijają się szybciej in vitro niż przy udziale środowiska rybosomu.

Kinetyka zwijania białek jest istotnym parametrem odpowiedzi komórki na stres, więc symulacje tych procesów są istotne i mogą wspomóc badania doświadczalne, w których trudno jest określić mechanizm fałdowania się łańcucha.

Wstęp oraz publikacje dobrze się czyta. Znalazłam jednak kilka błędów, nie tylko edytorskich, które wymieniam poniżej, z powodu mojej roli jako recenzenta.

Str. 3, środkowy paragraf, powinno być "Strong hydrogen bond network dominates the solvent properties of water."

Str. 4, "freeze water molecules", chyba nie jest to właściwa forma przymiotnika.

Str. 6, Tabela 1.1 powinno być raczej „mass” a nie „weight”

Str. 10, powinno być „assays” a nie „essays”

Str. 13, podrozdział Cele pracy. Mimo, że cele rozprawy są dla tego recenzenta jasne, nie są dobrze napisane. W kilku zdaniach brakuje czasowników. Jeśli miały to być równoważniki zdań to ta część powinna być inaczej sformatowana. Jest to ważna część rozprawy i powinna być lepiej przedstawiona.

Str. 16, powinno być „...AMBER99SB force field is:”

Str 17., powinno być "bonded potentials"

Str. 21, rysunek 2.2, nie widać na nim wskazanego w opisie czarnego prostokąta

Str. 21, powinno być "... r_i are the coordinates..."

Szkoda, że nie dołączono do rozprawy także pliku PDF zawierającego suplement publikacji z JACS z 2020 roku.

Str. 94, punkt 5. Osłabienie efektu hydrofobowego nie jest jasne w tym punkcie. Jeśli cząsteczki wody w otoczeniu metanu są bardziej zorganizowane w tunelu niż w roztworze wody to ich uwolnienie powinno się wiązać z korzystniejszą zmianą entropii. W tunelu tak nie jest ze względu na ograniczenia przestrzenne. W publikacji zostało to opisane dobrze, ale w podsumowaniu to wyjaśnienie nie jest właściwe lub zbyt uproszczone.

Str. 94, punkt 7, "DHFR folds more efficiently due to protein synthesis." Powinno być raczej "during synthesis"

Str. 95, punkt 10, to nie synteza białka wspomaga zwijanie tylko rybosom. Sformułowanie „protein synthesis assists the folding” nie jest zrozumiałe.

Mam też kilka wątpliwości i pytań, które nasunęły mi się po przeczytaniu rozprawy.

Czy według autora na podstawie wykonanych przez niego symulacji można stwierdzić, że helisa może się utworzyć w pierwszej części tunelu tzw. *upper tunnel*. Jeśli tak to czy wtedy przejdzie przez 10 Å przewężenie (*constriction*)? Czy może taka helisa się rozwinie i ponownie utworzy w dolnej szerszej części tunelu (*lower tunnel*)?

Czy wiadomo jaki jest procent białek u organizmów eukariotycznych, które wymagają wspomaganego zwijania, nie tylko przez rybosom, ale inne białka opiekuńcze?

Gdzie w symulacjach umieszczano jony magnezu, czy też w tunelu? To pytanie głównie dotyczy metod umieszczonych w publikacji w JACS.

Str. 95 Nie rozumiem planu przyszłych badań. Cząsteczek metanu nie da się zastąpić całym białkiem do badania efektu hydrofobowego, gdyż całe białko nie zwinie się w rybosomie i nie będzie też się składało z samych reszt hydrofobowych. Jak autor chciałby badać wpływ tunelu na reorganizację cząsteczek wody i efekt hydrofobowy dla białek?

Być może dwa zapętlone białka CAT-III i DDLB do prawidłowego zwijania potrzebują nie tylko rybosomu, ale także białek opiekuńczych? Czy coś wiadomo na ten temat?

Podsumowując, pan Quyen Van Vu wykonał symulacje pełnoatomowej i gruboziarnistej dynamiki molekularnej dla dużej makrocząsteczki rybosomu i jej fragmentów w celu określenia mechanizmu wychodzenia polipeptydów z tunelu rybosomu do środowiska wodnego oraz oddziaływań tych polipeptydów z rRNA w tunelu. Wskazał przyczyny różnic w stabilności zwiniętych domen wewnątrz tunelu rybosomu i w środowisku samych cząsteczek wody. Wyniki tych badań są ważne ze względu na zrozumienie procesów kotranslacyjnego zwijania białek, które mogą się przyczynić do zrozumienia ich błędnego zwijania w różnych chorobach. Główne wyniki pracy badawczej mgra Quyen Van Vu opierają się na metodach teoretyczno-obliczeniowych, ale są powiązane z obserwacjami doświadczalnymi. Pan Quyen Van Vu posiada warsztat merytoryczny dotyczący biofizyki

obliczeniowej – z zakresu metody dynamiki molekularnej oraz wzmocnionego próbkowania przestrzeni konformacyjnej, a także analizy trajektorii ruchu. Posiada także wiedzę biologiczną dotyczącą zwijania białek.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pana Quyen Van Vu spełnia warunki określone ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668), a w szczególności Art. 187 tej ustawy. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną pana Quyen Van Vu w dyscyplinie nauk fizycznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stanowi również oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Quyen Van Vu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tematyka poruszona w rozprawie jest niezwykle istotna i aktualna a wyniki symulacji pana Quyen Van Vu są opublikowane w prestiżowych czasopismach. Mgr Q. Van Vu wykonał wiele ważnych symulacji wyjaśniających, dlaczego rybosom i znajdujący się w nim tunel, regulują proces translacji na poziomie zwijania polipeptydów. Wyniki badań uznaję za wyróżniające się. Ze względu na ważne wyniki naukowe i dominujący wkład autora rozprawy w ich uzyskanie wnoszę o możliwość wyróżnienia tej rozprawy.

J. Tarylska