



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii

dr hab. Dominik Gront, prof UW
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii



Warszawa,
dnia 30 grudnia 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej

*„SARS-CoV-2: Antibodies and effect of non-structural proteins
on protein synthesis in human ribosomes”*

złożonej przez pana magistra Hunga Van Nguyena.

Wszyscy pamiętamy niedawny wybuch globalnej pandemii COVID-19, która zmieniła współczesne społeczeństwo i systemy opieki zdrowotnej. Poprzedzona wcześniejszymi epidemiami koronawirusa, takimi jak SARS-CoV w latach 2002-2003 i MERS-CoV w 2012 r., które dotknęły jedynie wybrane regiony naszej planety, pandemia COVID-19 pojawiła się pod koniec 2019 r. z niespotykaną dotąd szybkością i skalą. Pochodząca z Wuhan w Chinach choroba, wywołana nowym wirusem SARS-CoV-2, szybko rozprzestrzeniła się na całym świecie, powodując ponad 6,9 miliona potwierdzonych zgonów oraz poważne wyzwania społeczne, gospodarcze i związane ze zdrowiem publicznym. Co więcej, liczne warianty wirusa SARS-CoV-2, takie jak Alpha, Delta i Omicron, stanowiły poważne wyzwanie dla rozwoju leków i strategii leczenia. Zdolność wirusa do mutacji nie tylko zwiększyła jego zdolność do przenoszenia się i potencjał do ewolucji immunologicznej, ale także wymagała ciągłych aktualizacji szczepionek i podejść terapeutycznych, podkreślając potrzebę dynamicznych, adaptacyjnych reakcji w walce z pandemią. Wysiłki mające na celu zapobieganie COVID-19 i leczenie zakażonych pacjentów opierały się na wielopłaszczyznowym podejściu, obejmującym środki zdrowia publicznego, kampanie szczepień i rozwój terapii przeciwwirusowych. Szczepionki, głównie oparte na mRNA i wektorach wirusowych, stały się kamieniem węgielnym profilaktyki, podczas gdy strategie leczenia ewoluowały, obejmując leki przeciwwirusowe, immunomodulatory i opiekę wspomagającą. Znaczny nacisk położono na terapie oparte na przeciwciałach, takie jak przeciwciała monoklonalne zaprojektowane w celu neutralizacji wirusa oraz nanoprzeciwciała, mniejsze fragmenty przeciwciał o wysokiej stabilności i elastyczności. Terapie te okazały się obiecujące w zwalczaniu określonych białek wirusa, zmniejszaniu wirerii i poprawie wyników leczenia pacjentów, szczególnie u osób z grupy wysokiego ryzyka. Jednak interakcje między przeciwciałami i białkami SARS-CoV-2 są trudne do zbadania na poziomie oddziaływań pomiędzy pojedynczymi atomami. Mając na uwadze tę złożoność, rozprawa doktorska złożona przez Hunga Van Nguyena stanowi istotny wkład w ten obszar wiedzy. W swoich pracach, Doktorant postawił sobie dwa główne cele: zbadanie, w jaki sposób przeciwciała i nanoprzeciwciała wiążą się z białkiem

kolca (S) SARS-CoV-2 oraz wyjaśnienie wpływu niestrukturalnego białka 1 (NSP1) na syntezę białek w ludzkim rybosomie.

Rozprawa doktorska, którą miałem przyjemność recenzować, została napisana w języku angielskim i składa się z pięciu rozdziałów, poprzedzonych streszczeniami (w języku polskim i angielskim), listą publikacji Doktoranta oraz zwyczajowymi podziękowaniami. Autor zamieścił również w pracy spis treści, spisy ilustracji i tabel, a także wykaz często używanych skrótów.

Na pierwszej stronie „Wstępu” autor zawarł krótki rys historyczny pandemii i podsumował ówczesnie podjęte strategie terapeutyczne. Pozostała część tego dwudziestostronicowego rozdziału poświęcona jest szczegółowemu omówieniu struktury i funkcji wirusa SARS-CoV-2. Autor opisuje organizację genomu wirusa i kodowanych przez niego białek, podsumowując dostępną wiedzę na temat każdego białka, zarówno strukturalnego, jak i niestrukturalnego, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w mechanizmie działania wirusa. Część ta napisana jest bardzo przejrzysto i łatwa w odbiorze, nawet dla osób niebędących ekspertami w tej dziedzinie. Kolejny, liczący bez mała dziesięć stron rozdział, opisuje metody obliczeniowe wykorzystane przez autora w jego pracach. W telegraficznym skrócie autor przedstawia metodę dynamiki Langevina, a następnie omawia pola siłowe, z których korzystał w swoich badaniach: klasyczne pełnoatomowe pola siłowe, gruboziarniste pole siłowe Martini oraz pole siłowe typu Go, oparte na reprezentacji węgli alfa. Po tej części następują trzy rozdziały rozprawy, które odpowiadają trzem publikacjom, opisującym badania własne autora. Każdy rozdział rozpoczyna się od wymaganych oświadczeń o wkładzie złożonego przez współautorów, po którym następuje zwięzłe podsumowanie danej pracy, a kończy się kopią samego opublikowanego artykułu. Wreszcie, czytelnik dociera do „Wniosków”, które nie tylko podsumowują główne ustalenia rozprawy, ale także zapewniają cenne perspektywy dla przyszłych prac w tej dziedzinie. Pan Nguyen jest autorem 17 publikacji, które ukazały się w latach 2014-2024; pięć z tych prac zostało opublikowanych podczas studiów w szkole doktorskiej; trzy z owych pięciu zostały włączone do niniejszej rozprawy. Należy zauważyć, że Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich tych prac i wniósł bardzo istotny wkład w opisane badania.

Nie czuję się wystarczająco kompetentny, aby komentować strukturę i funkcję wirusa SARS-CoV-2, opisaną we „Wprowadzeniu”, ponieważ nie jestem ekspertem w dziedzinie wirusologii. Przejdę zatem do rozdziału drugiego - części metodologicznej, w której Doktorant opisał metody obliczeniowe zastosowane w swojej pracy badawczej. Autor poświęcił zaledwie dwa zdania (zajmujące trzy i pół linijki) na opis klasycznego sformułowania metody Dynamiki Molekularnej. W mojej ocenie jest to zdecydowanie za mało, biorąc pod uwagę, że metoda ta ma fundamentalne znaczenie dla rozprawy i jest wykorzystywana we wszystkich publikacjach Kandydata. Poniżej czytelnik znajdzie jedynie półstronicowy opis dynamiki Langevina, metody, która wykorzystana była jedynie w jednej z trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy. Następnie znajduje się opis trzech pól siłowych wykorzystanych w symulacjach: klasycznego empirycznego pełnoatomowego pola siłowego, gruboziarnistego pola Martini, a także metody typu Go, która wykorzystuje informacje o znanej natywnej strukturze modelowanego kompleksu białkowego. W tej ostatniej wykorzystano reprezentację węgli alfa. Podejście to jest bardzo atrakcyjne ze względu na jego wydajność obliczeniową, ma ono jednakże istotne ograniczenia. Moim

zdaniem autor powinien był poświęcić kilka zdań na przedstawienie tych ograniczeń czytelnikowi. Rozdział drugi kończy się opisem kilku metod eksperymentalnych oraz obliczeniowych, dzięki którym można wyznaczyć stałą równowagi dysocjacji kompleksu białko-ligand. W rozdziale tym zabrakło mi choćby krótkiego opisu roli rozpuszczalnika oraz sposobów uwzględnienia go w modelowaniu molekularnym.

Kolejne trzy rozdziały poświęcone zostały trzem oryginalnym pracom autora, stanowiącym podstawę rozprawy. Prace te, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach: dwie w *Journal of Chemical Physics B* oraz jedna w *Scientific Reports*, niewątpliwie zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów przed ich przyjęciem do druku. Poniżej pozwolę sobie jednak na kilka krytycznych uwag, które nasunęły mi się podczas ich lektury.

Pierwsza publikacja (rozdział nr 3) opisuje badania nad terapiami przeciwciałowymi stosowanymi w leczeniu COVID-19, szczególnie w kontekście neutralizowania białka S wirusa SARS-CoV-2. Autorzy skupili się na terapii REGN-COV2, która jest koktajlem dwóch przeciwciał monoklonalnych: REGN10933 i REGN10987. Badania pokazują, że oba przeciwciała wiążą się z różnymi regionami domeny RBD białka S, oraz że kombinacja tych przeciwciał oferuje większą stabilność i skuteczność w porównaniu do zastosowania każdego z nich pojedynczo. Wyniki symulacji wskazały, że REGN10933 wykazuje silniejsze wiązanie niż REGN10987, ale to połączenie obu przeciwciał (REGN10933+REGN10987) oferuje największą stabilność i siłę wiązania. W pracy tej przedyskutowano też wpływ mutacji białka S, wynikających z różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami wirusa, na skuteczność terapii wspomnianymi przeciwciałami. Białko S jest także bohaterem kolejnej pracy (rozdział nr 4), tym razem oddziałując z nanoprzeciwciałem (Nb) H11-H4 oraz przeciwciałem CR3022. Wyniki symulacji wskazały, że CR3022 wiąże się z RBD silniej niż H11-H4, co potwierdziły zarówno wartości siły maksymalnej (F_{max}), jak i energii swobodnej wiązania. Połączenie obu molekuł, a więc CR3022 i H11-H4, wykazało jeszcze większą siłę wiązania, co sugeruje synergistyczny efekt tej kombinacji. Dodatkowo, badania uwzględniły wpływ różnych wariantów SARS-CoV-2, takich jak Alpha, Delta czy Kappa, na zdolności neutralizacyjne H11-H4, wskazując, że Nb zachowuje skuteczność wobec wybranych wariantów. W obydwu tych pracach czytelnik zauważy znaczną rozbieżność w wartościach stałej dysocjacji K_d wyznaczonej różnymi metodami. Wartości eksperymentalne kilkukrotnie różnią się od wyników symulacji. W publikacji pierwszej wyniki obliczeń uzyskane metodą PRODIGY dla przeciwciała REGN10933 są ponad czterokrotnie większe niż wartości uzyskane w symulacjach REX-US, dla których z resztą nie podano oszacowania błędu. Czy różnice te mogą wynikać z pominięcia jawnych (atomistycznych) oddziaływań białek (a więc RBD oraz przeciwciał) z rozpuszczalnikiem w publikacji pierwszej? Powody tych różnic w publikacji drugiej są zapewne inne: tu bowiem zastosowano rozpuszczalnik gruboziarnisty w modelu Martini. A może to skutek porównywania wartości zmierzonych w stanie równowagi termodynamicznej z nierównowagowymi symulacjami? Mam nadzieję, że Doktorant będzie w stanie wskazać potencjalne źródła rozbieżności między danymi literaturowymi a obliczonymi wartościami.

Trzecia publikacja (rozdział nr 5) koncentruje się na roli białka NSP1 wirusa SARS-CoV-2, które pełni kluczową funkcję w wyłączeniu ekspresji genów gospodarza (tzw. host shutoff),

umożliwiając wirusowi unikanie odpowiedzi immunologicznej i promując jego replikację. NSP1 wiąże się specyficznie z podjednostką 40S rybosomu, blokując kanał wejścia mRNA i tym samym hamując translację mRNA gospodarza. Białko to, utrudniając syntezę białek komórkowych, w tym czynników przeciwwirusowych, sprzyja replikacji wirusa i jego ucieczce przed odpowiedzią immunologiczną. Z uwagi na istotną rolę NSP1 w cyklu życiowym wirusa i jego zdolność do osłabiania odpowiedzi przeciwwirusowej, jest ono uznawane za potencjalny cel terapeutyczny. Wyniki symulacji SMD wykazały, że w obecności NSP1 mRNA wiąże się z rybosomem znacznie silniej niż w jego nieobecności, co sugeruje, że NSP1 skutecznie blokuje kanał wejścia mRNA, uniemożliwiając jego translację. Energia swobodna wiązania obliczona za pomocą symulacji alchemicznych również potwierdziła, że NSP1 znacząco zwiększa powinowactwo mRNA do rybosomu, co zgodne jest z wcześniejszymi badaniami eksperymentalnymi. Wyniki te dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów działania NSP1 oraz jego wpływu na proces translacji.

Rozprawa doktorska jako całość prezentuje się bardzo dobrze: jej konstrukcja jest przemyślana i spójna. Trudno też znaleźć w niej uchybienia edytorskie. Z obowiązku recenzenta wymienię trzy, które udało mi się dostrzec.

- Pisząc o metodach gruboziarnistych, na stronie 22 autor zaznacza, że „...which not only saves computational time and resources but also often produces results that agree well with all-atom MD simulations and experimental data”; w moim odczuciu jest to niezbyt udane sformułowanie; sugeruje bowiem, że w wielu innych przypadkach metody gruboziarniste dają błędne wyniki.
- Na stronie 29 we wzorze (9) autor wykorzystuje $[A]$ do oznaczenia stężenia wolnego ko-faktora; wydaje mi się jednak, że $[A]$ oznacza stężenie wolnego ligandu (w tym przypadku: przeciwciała).
- W tabeli nr 3 publikacji trzeciej (na stronie 7039) jeden z wierszy jest przesunięty względem pozostałych.

Uwagi te mają jedynie charakter edytorski i w żadnym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej wyników uzyskanych przez Doktoranta. W mojej ocenie rozprawa spełnia z należytą starannością wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2020 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 poz 742 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych. Ponadto, analiza zawarta w pracy dowodzi wiedzy praktycznej Doktoranta, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dlatego też **wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej**, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach procedury nadania stopnia doktora panu magistrowi Hungowi Van Nguyenowi. Biorąc pod uwagę wysoką jakość wyników oraz ogromny wkład Doktoranta w ich uzyskanie **wnoszę o wyróżnienie rozprawy**. Szczegółowe uzasadnienie wniosku o wyróżnienie stanowi załącznik do niniejszej recenzji.

dr hab. Dominik Gront, prof. UW



UNIwersYTET
WARSAWski

Wydział Chemii

dr hab. Dominik Gront, prof UW
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii



Warszawa,
dnia 30 grudnia 2024 r.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

*„SARS-CoV-2: Antibodies and effect of non-structural proteins
on protein synthesis in human ribosomes”*

złożonej przez pana magistra Hunga Van Nguyena.

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana magistra Hunga Van Nguyena z uwagi na jej bardzo wysoki poziom merytoryczny. Doktorant wyróżnia się na swoim etapie kariery naukowej, będąc współautorem siedemnastu artykułów naukowych, opublikowanych w prestiżowych czasopismach. W swojej pracy pan Nguyen wyjaśnił na poziomie atomowym zjawiska związane z oddziaływaniem białek wirusa SARS-CoV-2 z przeciwciałami oraz jednostką 40S rybosomu ludzkiego. Rozprawa ta wyróżnia się pod względem edytorskim oraz klarowności jej przekazu. Dodatkowo, Doktorant w swojej pracy wykazał się opanowaniem szerokiego wachlarza zaawansowanych metod obliczeniowych.

dr hab. Dominik Gront, prof. UW