

Dr hab. Jacek Jemielity, Prof. UW
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 20.12.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Karskiej

p.t. „Synteza oraz badania konformacyjne fragmentów homologów glikoproteiny N bydłowego herpeswirusa 1 (BHV-1) oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV)”

Układ immunologiczny człowieka to jeden z najbardziej fascynujących układów biologicznych i jest on obecnie bardzo intensywnie badany pod różnym kątem. Ingerencja w funkcjonowanie układu immunologicznego ma obecnie olbrzymie znaczenie z punktu widzenia projektowania nowych terapii przeciwko najgroźniejszym chorobom cywilizacyjnym, włączając w to choroby nowotworowe, autoimmunologiczne czy wirusowe. Jednym z ciekawszych aspektów tych badań są mechanizmy, które wirusy wykształciły w celu uniknięcia odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Zrozumienie tych mechanizmów stanowi klucz do opracowania skutecznych metod zapobiegania oraz leczenia chorób wywoływanych przez wirusy. Przedstawiona mi do recenzji praca, wykonana przez Panią magister Natalię Karską w Katedrze Chemii Biomedycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Sylwii Rdziewicz-Motowidło, prof. UG oraz dr hab. Emili Sikorskiej, jako promotora pomocniczego, doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy. Doktorantka jako obiekt swoich badań, realizowanych w ramach projektu doktorskiego wybrała wirusowe białko UL49.5 z dwóch wirusów rodziny herpeswirusów (BHV-1 i VZV). Białko to uczestniczy w modulacji mechanizmu odpowiedzi odpornościowej głównego układu zgodności tkankowej (MHC I), zaburzając transport i prezentację antygeny, co pozwala na uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza i rozprzestrzenienie się infekcji. Wprawdzie herpeswirusy nie stanowią poważnego problemu dla osób z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym, ale w przypadku upośledzenia układu

immunologicznego (np. u chorych na AIDS, osób poddawanych intensywnej chemioterapii przeciwnowotworowej, czy immunosupresji związanej z przeszczepami) stanowią poważny problem natury medycznej. Niektóre herpeswirusy stanowią również poważny problem ekonomiczny powodując choroby bydła hodowlanego. Należy zatem uznać, że badania podjęte przez Doktorantkę mają istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i aplikacyjnego.

Praca doktorska liczy 180 stron oraz 29 załączników przedstawiających dodatkowe rysunki, tabele i wykresy, a więc jest obszernym materiałem naukowym. Na rozprawę składa się wstęp teoretyczny zwany tu wprowadzeniem, cel pracy, część eksperymentalna, omówienie wyników, podsumowanie oraz bibliografia, praca ma więc (z dokładnością do nazw poszczególnych rozdziałów) układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu chemii i nauk pokrewnych. W pracy zamieszczono 106 rysunków oraz 17 tabel (nie licząc wspomnianych już załączników), starannie przygotowanych pod względem edytorskim, które są bardzo pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autorki rozprawy. W pracy zacytowano 124 pozycji literaturowych, które w większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w czasopiśmie naukowych z chemii, biochemii i immunologii oraz dziedzin pokrewnych. Cała praca przygotowana jest starannie i profesjonalnie pod względem edytorskim profesjonalnie, z drobnymi mankamentami, o których wspomnę później.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) Umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązane problemu naukowego.

Część teoretyczną rozprawy opisano na 34 stronach, więc jest stosunkowo krótka w stosunku do objętości pracy. Autorka sporo miejsca poświęca w tej części zagadnieniom związanym z układem immunologicznym człowieka, różnym mechanizmom generowania odpowiedzi tego układu na patogeny, by następnie skupić się na herpeswirusach ich znaczeniu biologicznym, a w szczególności mechanizmom unikania odpowiedzi immunologicznej. Część teoretyczna jest napisana w sposób interesujący i zobrazowana jest estetycznymi i informatywnymi ilustracjami, jednak pozostawia pewien niedosyt. W szczególności brak pogłębionego opisu badań nad funkcją i właściwościami badanego białka i jego homologów dostępnych w literaturze. Prace temu poświęcone są zacytowane w rozprawie, lecz w zgoła zaskakującym kontekście (przykładowo Lipinska et al. J. Virol. 80, 5822–5832, 2006 [60], lub Koppers-Lalic et al. Plos Pathogens 4, e1000080, 2008 [68]). Brakuje podrozdziału opisującego metody badawcze stosowane w badaniach nad białkiem UL49.5 lub białkami o podobnej funkcji oraz strukturze.

W częściach rozprawy poświęconym badaniom własnym (opisanych w rozdziałach „Część eksperymentalna oraz „Omówienie wyników”) doktorantka opisuje efekty swoich badań, które można podzielić na trzy zasadnicze części: a) projektowanie i chemiczna synteza peptydów będących fragmentami N- oraz C-końca białka UL49.5 wirusów BHV-1 i VZV b) badania spektroskopowe (CD oraz NMR) fragmentów peptydowych tych białek i w końcu c) w końcu wykorzystanie metod modelowania molekularnego, które w połączeniu z wynikami badań spektroskopowych miały doprowadzić do określenia struktury przestrzennej fragmentów białek, a następnie powiązania struktury z aktywnością biologiczną białka UL49.5 wirusa BHV-1 oraz wirusa VZV. Z tego wynika, że plan badawczy to ambitny, interdyscyplinarny program, wymagający od wykonawcy szeregu różnorodnych kompetencji.

W ramach realizacji pracy doktorskiej Pani Natalia Karska zaplanowała i wykonała syntezę 16 peptydów będących fragmentami lub analogami białka UL49.5 wirusa BHV-1 oraz czterech peptydów będących fragmentami wirusa VZV. Synteza peptydów powiodła się, choć niektóre z nich sprawiały kłopoty i wymagały zmiany w protokole syntezy. Większość peptydów została oczyszczona za pomocą HPLC oraz zanalizowana za pomocą spektrometrii mas, lecz w niektórych przypadkach nie udało się uzyskać czystych peptydów do dalszych badań. Część z otrzymanych peptydów została wykorzystana przez Doktorantkę do badań NMR, a otrzymane w ten sposób dane wykorzystano jako więzy w symulacjach dynamiki molekularnej w polu siłowym AMBER. Należy tu podkreślić, że doktorantka zastosowała szereg technik magnetycznego rezonansu magnetycznego włączając w to DQF-COSY, TOCSY, NOESY oraz ROESY. Recenzent nie ma wątpliwości, że analiza tych danych wymagała od mgr Karskiej olbrzymiego nakładu pracy oraz odpowiednich umiejętności. Otrzymane peptydy posłużyły również do badań struktur peptydów metodami spektroskopii dichroizmu kołowego zarówno w roztworach wodnych jak i warunkach micelarnych. Doktorantka wyznaczyła struktury przestrzenne dziewięciu peptydów w miceli DCP oraz dwóch peptydów w miceli SDS. Część poświęcona badaniom własnym to bardzo bogaty materiał badawczy, w którym Autorka podjęła się trudnego zadania jakim była realizacji bardzo ambitnych celów. Trzeba przyznać, że Autorka rozprawy bardzo dobrze poradziła sobie z tym trudnym zadaniem. Za największe osiągnięcie Doktorantki uważam interdyscyplinarność badań wykonywanych podczas realizacji projektu, co obejmowało syntezę peptydów, badania spektroskopowe i w końcu badania obliczeniowe, co w konsekwencji doprowadziło do istotnych informacji o strukturze fragmentów badanego białek, które potem posłużyło do opracowania zintegrowanego modelu białka. Wiedza na temat struktury białka UL49.5 może pozwolić na wyjaśnienie w jaki sposób oddziałuje ono z transporterem TAP, a następnie jaki jest mechanizm unikania odpowiedzi immunologicznej, by w końcu umożliwić projektowanie

potencjalnych terapeutyków przywracających prawidłową reakcję układu immunologicznego na infekcję wirusową.

Szkoda jedynie, że realizacja projektu doktoranckiego nie przyniosła dotychczas efektów publikacyjnych wieńczących dzieło. Ten brak doświadczenia w przygotowywaniu manuskryptów publikacji jest odzwierciedlony w szczególny sposób w części eksperymentalnej pracy oraz w bibliografii. Celem części eksperymentalnej w pracach badawczych jest opisanie procedur, które umożliwiają odtworzenie eksperymentu. W przypadku syntezy peptydów w fazie stałej ten opis jest zbyt lakoniczny i pozbawiony niezbędnych szczegółów koniecznych do odtworzenia syntez. W tej części znajdują się też takie elementy jak mechanizm tworzenia wiązania peptydowego (rysunek 20 oraz 21), które moim zdaniem nie powinny znaleźć się w tej części rozprawy. Tabela 4 zamieszczona w tym rozdziale podsumowuje wysiłki syntetyczne doktoranki, przedstawiając sekwencje otrzymanych peptydów oraz wydajność ich syntezy na złożu stałym. W tabeli 5 zamieszczono warunki oczyszczania oraz charakterystykę HPLC oraz MS oczyszczonych peptydów, niestety nie zamieszczono choćby przykładowych profili HPLC oraz widm masowych. W trakcie publicznej obrony bardzo prosiłbym Doktorantkę o przedstawienie przykładowych zestawów danych, które posłużyły do wypełnienia tabeli (np. profile HPLC i widma MS dla peptydów N.BHV, NBHV.GGG, C.BHV.RGAG). Podpis pod rysunkiem jest nieścisły, ponieważ odległości międzyprotonowe, rodzaj izomerii wiązania peptydowego oraz wartości kątów torsyjnych to nie są dane NMR, a parametry, które można obliczyć dzięki danym NMR.

Słabszym elementem rozprawy jest bibliografia. W tej części pracy jest sporo nieładu, odnośniki są cytowane w niejednolity sposób. Pozycje literaturowe 60 i 65 to ta sama praca, podobnie pozycje 34 i 78 mimo, że różnią się sposobem cytowania z listą współautorów włącznie również odnoszą się do tej samej publikacji, przy czym w żadnym przypadku cytowanie nie dokonane prawidłowo. Jest kilka zupełnie niejasnych cytowań (91, 95, 96, 97). W pozycjach ze spisu literatury nr 12, 63, 64, 70 oraz kilku innych brakuje nazwy czasopisma. Prawidłowe odwołania do poprzednich prac to jeden z kluczowych elementów opisu osiągniętych wyników naukowych, bardzo restrykcyjnie oceniany przez recenzentów manuskryptów w czasopismach naukowych, dlatego też ten element pracy naukowca wymaga szczególnej uwagi i dużej precyzji. Autorka nie ustrzegła również sporadycznych błędów gramatycznych, braku znaków interpunkcyjnych, czy tzw. literówek, co jednak można zrozumieć biorąc pod uwagę objętość rozprawy.

Wymienione mankamenty nie obniżają wartości naukowej dysertacji oraz jej oryginalności, a ich przywołanie w recenzji ma spełniać walor dydaktyczny, co mam nadzieję Doktorantka zechce wykorzystać w dalszej karierze naukowej.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Natalii Karskiej stanowi twórczy i oryginalny wkład w badania nad strukturą i funkcją białek UL49.5 z herpeswirusów przez co spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Natalii Karskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "Jerzy Zeman". The signature is written in a cursive style and ends with a long, sweeping underline that curves back to the right.