



Puławy, 20 maja 2015r

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Lacka pt. "Characterization of Ankyrin-repeat Proteins (ANK) Encoded by Orf virus (ORFV)" przygotowanej pod opieką prof.dr hab.

Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W swojej pracy doktorskiej Pan Krzysztof Lacek przedstawił wyniki badań nad białkami wirusa ospy owczej (ORFV), w strukturze których zawarte są powtórzenia ankirynowe (ANK). Wirus ten jest jednym z przedstawicieli rodzaju *Parapoxvirus*, rodziny *Poxviridae*, który skupia epiteliotropowe wirusy wywołujące naturalne zakażenia u zwierząt oraz posiadające właściwości zoonotyczne. Zainteresowanie Doktoranta tym patogenem i wykorzystanie go jako modelowego organizmu, związane było jednak z możliwością użycia wirusa Orf jako wektora szczepionkowego. Silna odpowiedź immunologiczna uzyskana dla doświadczalnych szczepionek przeciw takim patogenom jak: borna disease virus (BDV), bovine diarrhoea virus (BVD) czy rabbit hemorrhagic disease virus (RHD) świadczy o dużym potencjale aplikacyjnym wektorów, przygotowanych w oparciu o ORFV. Co więcej, wirus Orf wykazuje silne właściwości modulujące odpowiedź immunologiczną, głównie tę wrodzoną, co stwarza nowe możliwości wykorzystania takich wektorów wirusowych w strategii szczepień. Jednak tak szerokie zastosowanie wirusa Orf, jako wektora, musi uwzględniać badania nad molekularną charakterystyką niektórych białek, kodowanych przez genom wirusa, co w perspektywie może zapewnić większe bezpieczeństwo stosowania tego typu szczepionek i wzmocni ich potencjał immunogeny.

Punktem zainteresowania mgr Lacka była charakterystyka białek ANK-1, ANK-2 i ANK-3 kodowanych przez geny ORFV 126, 128 i 129 wirusa Orf. Białka te zawierają szereg powtórzeń ankirynowych, które są jednym z najczęściej występujących motywów

i przez to biorą udział w oddziaływaniach pomiędzy białkami. Przez analogię do innych białek zawierających powtórzenia ankirynowe, odgrywających kluczową rolę w zakażeniach wywoływanych przez wirusy z rodziny *Poxviridae*, Doktorant przyjął założenie że białka ANK-1.2.3 mogą wchodzić w interakcje z białkami komórek gospodarza w trakcie procesu zakażenia.

Na tej podstawie mgr Lacek sformułował dobrze zdefiniowany cel pracy, którym była wstępna charakterystyka białek ANK-1, ANK-2 i ANK-3 wirusa Orf uwzględniająca analizę powtórzeń ankirynowych, analizę ekspresji tych białek w komórkach zakażonych wirusem Orf oraz ich komórkową lokalizację, a także wpływ ekspresji tych białek na żywotność komórek. Uważam, że podjęcie tych badań w zaproponowanym zakresie jest uzasadnione i jak najbardziej aktualne zwłaszcza, że rola tych białek jak i ich znaczenie w przebiegu zakażenia wirusem Orf nie były do tej pory badane. Oprócz niewątpliwych wartości poznawczych badania te mogą mieć powiązania z pewnymi aplikacjami, związanymi z konstruowaniem wektorów szczepionkowych na bazie wirusa Orf.

Rozprawa obejmuje 142 strony druku i jest ilustrowana licznymi zdjęciami mikroskopowymi, zdjęciami żeli oraz rycinami i tabelami. Praca napisana jest w języku angielskim, została zredagowana bardzo starannie i czyta się ją w sposób płynny i zrozumiały. Układ pracy ma prawidłową strukturę charakterystyczną dla tego rodzaju opracowań, chociaż Autor nie uwzględnił rozdziału „Wnioski”, tak typowego dla prac doktorskich.

We wstępie Autor omówił taksonomię pokswirusów, strukturę wirionów, cykl replikacyjny, ekspresję genów w zakażonych komórkach oraz właściwości immunomodulacyjne tych patogenów. W drugiej części wstępu omówił podobne zagadnienia odnoszące się do wirusa ospy owczej. W kolejnej części omówione zostały powtórzenia ankirynowe w aspekcie występowania, struktury i ich biologicznych właściwości, co stanowi dobre umotywowanie zaplanowanych badań. Ostatnia część wstępu poświęcona jest molekularnym mechanizmom odpowiedzialnym za dystrybucję białek do poszczególnych przedziałów komórkowych, głównie do mitochondriów i jądra komórkowego. Generalnie, ta część pracy napisana z dużą troską o czytającego, urozmaicona licznymi schematami i wskazuje na znajomość aktualnego piśmiennictwa i dużą wiedzę Doktoranta z tego zakresu.

Cel główny, jak i cztery cele pośrednie zostały przedstawione jasno i odpowiadają merytorycznie tytułowi rozprawy doktorskiej.

Rozdziały „Materials” oraz „Methods” zostały napisane starannie, a dobór oraz celowość zastosowanych metod nie budzi zastrzeżeń. Różnorodność zastosowanych metod

dobrze świadczy o technicznym przygotowaniu Doktoranta do pracy laboratoryjnej. Obydwa rozdziały w sposób wystarczający przybliżyły też czytającemu część doświadczalną pracy.

Rozdział „Results” podzielony został na pięć części. Ta część pracy doktorskiej jest opisana szczegółowo i dokładnie zanalizowana, a wyniki uwidocznione na rycinach i fotografiach są bardzo starannie opracowane.

Pierwsza część tego rozdziału dotyczyła analizy *in silico* i potwierdziła występowanie charakterystycznych domen i motywów w strukturze białek ANK-1,2,3. Stosując programy do analizy danych bioinformatycznych Doktorant wykazał istnienie 10 i 9 powtórzeń ankirynowych odpowiednio w białku ANK-1 i 2 oraz ANK-3. Dodatkowo wyniki tej analizy wykazały, że białko ANK-1 zawiera motyw związany z jego mitochondrialną lokalizacją, podczas gdy białko ANK-2 zawiera sekwencje umożliwiającą jego wiązanie się ze strukturami jądra komórkowego. Podobne spostrzeżenie dotyczyło białka ANK-3. Generalnie, wyniki te otworzyły Doktorantowi drogę do dalszych badań nad subkomórkową lokalizacją tych białek oraz rolę specyficznych domen białkowych w kierowaniu tych białek do poszczególnych przedziałów komórkowych.

W kolejnych badaniach Doktorant uzyskał ekspresję genów kodujących białka ANK-1,2,3 w systemie bakteryjnym i bakulowirusowym oraz użył otrzymane rekombinowane formy tych białek do otrzymania swoistych antysurowic dla białek ANK-1,2,3. Uzyskane królicze antysurowice okazały się swoiste dla poszczególnych białek ANK i wykazały brak reakcji krzyżowych pomiędzy nimi, co jest krytyczne dla zaplanowanych badań. Ich zastosowanie do analizy kinetyki ekspresji białek ANK w komórkach Vero, zakażonych ORFV wykazując, że białko ANK-1 ulega ekspresji w późnej fazie zakażenia, a białko ANK-2 w fazie wczesnej. Takie wyniki zastały następnie potwierdzone analizą transkryptów dla genów ANK metodą Northern blotting.

Kolejna część rozdziału „Results” związana jest z analizą wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ANK-1. W badaniach tych Doktorant wykorzystał komórki transferowane plazmidem zawierającym gen dla ANK-1 w fuzji z EGFP, co umożliwiło fluorescencyjne znakowanie tego białka. Badania z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej wykazały lokalizację tego białka w mitochondriach, co następnie zostało potwierdzone poprzez analizę frakcji cytoplazmatycznej i frakcji błonowej, zawierającej mitochondria transferowanych komórek. W celu precyzyjnego określenia mechanizmu kierowania białka ANK-1 do mitochondriów Doktorant przygotował panel stopniowo skracanych konstruktów ANK-1 z fuzją EGFP i przeprowadził analizę lokalizacji tego białka. Postępowanie to wykazało, że kluczową rolę w kierowaniu białka ANK-1 do mitochondriów odgrywają dwa powtórzenia

ankirynowe AR8 i AR9. Jest to pewnością interesujące spostrzeżenie wskazujące, że powtórzenia ankirynowe mogą stanowić nowy typ sekwencji kierujących białka do mitochondriów. Postępując konsekwentnie, Doktorant skupił następnie swoją uwagę na subkomórkowej lokalizacji białek ANK-2 i 3. Badania komórek transfekowanych plazmidem zawierającym gen dla ANK-2 i ANK-3 w fuzję z EGFP wykazały, że obydwa te białka lokalizują się w jądrze komórkowym, a w przypadku białka ANK-2 region zlokalizowany w C terminalnym końcu, pomiędzy aminokwasami 433 a 474, jest odpowiedzialny za jego jąderkową akumulację. Wyniki dotyczące mitochondrialnej i jądrowej lokalizacji białek ANK-1 i ANK-2 były podstawą zaplanowania ostatniego doświadczenia, w którym analizowano wpływ ekspresji tych białek na stopień przeżywalności komórek Vero, poddanych indukowanej apoptozie. Doktorant powiązał znaną rolę tych organelli komórkowych w procesie apoptozy z licznymi przykładami potwierdzającymi udział białek innych wirusów w hamowaniu tego procesu i na tej podstawie założył, że białka ANK-1 i ANK-2 mogą być odpowiedzialne za mechanizm zapobiegający programowanej śmierci komórek zakażonych wirusem Orf. Badania te jednak nie dały jednoznacznych wyników potwierdzających antyapoptyczne działanie tych białek. Generalnie, rozdział „Results” oceniam bardzo pozytywnie i choć liczba informacji będących pochodną wykonanych badań jest czasami trudna do interpretacji, mgr Lacek dobrze poradził sobie z obfitością wyników. Sprzyjało temu wyeksponowanie na końcu każdego z podrozdziałów krótkiej konkluzji podsumowującej wyniki badań.

W rozdziale „Discussion” Autor poddał wyniki badań własnych interpretacji odnosząc je do wyników innych autorów, konsekwentnie trzymając się logicznego ciągu przeprowadzonych doświadczeń. Sposób prowadzenia dyskusji potwierdza, że Doktorant doskonale zna piśmiennictwo związane z obszarem swoich badań i umiejętnie potrafi je wykorzystać.

Z pozycji recenzenta pozwolę sobie na kilka uwag dotyczących ocenianej pracy. Zauważyłem, że Autor dość często używa w tekście określenia „polyclonal sera” zamiennie, jak zrozumiałem, do terminu „anti-ANK polyclonal sera”; oczywiście ten ostatni jest właściwy. Wyjaśnienia wymaga, według mnie, opis wyników zamieszczonych na ryc. 12, dotyczących analizy autoradiograficznej lizatów *E.coli*. Określenie na str. 78 „Additional bands of lower molecular weight were also observed” nie wyjaśnia przyczyn występowania tych prążków. W rozdziale 7.17 Autor opisuje sposób określenia miana ORFV, lecz czytając tekst nigdzie nie spotkałem informacji dotyczącej miana wirusa, który użyty był do zakażenia komórek. Pan mgr Krzysztof Lacek jest pierwszym autorem publikacji, która ukazała się w

Virus Genes (2014), 49,68-79, w której opisane są wyniki badań zamieszczane w ocenianej rozprawie. Uważam, że informacja o tej publikacji powinna być uwidoczniiona w pracy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że oceniana praca wnosi nowe, oryginalne dane do wiedzy z zakresu patogenezy zakażeń wirusem Orf. Doktorant dobrze zaplanował i przeprowadził doświadczenia przy użyciu nowoczesnych technik badawczych i narzędzi bioinformatycznych uzyskując atrakcyjne wyniki, które właściwie zinterpretował. Potwierdza to jego kompetencje jako dojrzałego pracownika naukowego.

Biorąc pod uwagę moją pozytywną opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Lacka pod tytułem "Characterization of Ankyrin-repeat Proteins (ANK) Encoded by Orf virus (ORFV)" odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiam Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed wniosek o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Lacka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie tej pracy odpowiednią nagrodą.


Prof. dr hab. Jacek Kuzmak