



UNIWERSYTET GDAŃSKI



Dziekanaat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 2.04.2015

dz. nr 8/2015

Prof. dr hab. Jarosław Marszałek  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG/GUMed  
ul. Kładki 24; 80-822 Gdańsk  
tel. +48 58 523 6313  
tel./fax. +48 58 523 6427  
E-mail: jaroslaw.marszalek@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk, 31 03 2015

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Lacka zatytułowanej "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.

Głównym celem ocenianej pracy była wstępna charakterystyka trzech białek ANK-1,2,3 kodowanych przez genom wirusa ospy owczej ORFV, których wspólną cechą jest obecność tzw. powtórzeń ankirynowych; charakterystycznych motywów strukturalnych występujących w wielu rodzajach białek często odpowiadających za ich oddziaływania ze specyficznymi partnerami białkowymi. W szczególności doktorant badał kinetykę ekspresji białek ANK-1,2,3 w zainfekowanych komórkach oraz ich sub-komórkową lokalizację. Ponadto zidentyfikował molekularne sygnały odpowiedzialne za komórkową lokalizację białek ANK-1 i ANK-2 oraz badał wpływ ekspresji tych białek na żywotność komórek.

Wirus ospy owczej jest łagodnym patogenem ssaków spokrewnionym z wirusami będącymi groźnymi patogenami człowieka takimi jak wirus ospy VARV. Jednak to nie pokrewieństwo z wirusami patogennymi było głównym motywem podjętych badań a raczej fakt, że wirusy należące do rodziny *Poxviridae* mają silne właściwości immunostymulujące oraz immunomodulujące i tym samym stanowią obiecujący wektor szczepionkowy. Zdaniem autora charakterystyka molekularna białek kodowanych przez genom wirusowy, które wykazują właściwości immunomodulacyjne powinna być pomocna w udoskonaleniu wektorów szczepionkowych opartych o ten wirus. Wybór do analizy białek ANK-1, 2, i 3 posiadających powtórzenia ankirynowe podyktowany był rolą tych motywów strukturalnych w oddziaływaniach białko-białko co sugeruje, że posiadające je białka mogą być czynnikami immunomodulacyjnymi. Dodatkowo właściwości biologiczne tych białek nie były dotychczas badane. Jako recenzent uważam ten wybór za trafny a przedstawione cele badawcze za dobrze określone i jasno sprecyzowane.

We wstępie doktorant omówił kolejno taksonomię i biologię wirusów rodziny *Poxviridae* kładąc szczególny nacisk na ich infekcyjność względem człowieka. Omówił również ich strukturę, cykl replikacyjny oraz właściwości immunomodulacyjne. Przy czym w tej części wstępu w dwóch oddzielnych częściach przedstawił najpierw charakterystykę biologiczną różnych przedstawicieli *Poxviridae* a następnie podobną charakterystykę wirusa ORFV będącego przedmiotem badań. Uważam taki układ za niezbyt szczęśliwy. Wolałbym czytać o

wirusie ORFV w kontekście informacji o innych przedstawicielach tej rodziny. W kolejnej części wstępu doktorant opisał strukturę i funkcję powtórzeń ankirynowych kończąc tą część omówieniem roli tych struktur dla białek kodowanych przez genomy wirusowe. Ta część wstępu jest dobrze napisana i kompetentnie zilustrowana. W ostatniej części wstępu doktorant omówił molekularne mechanizmy sortowania białek do przedziałów sub-komórkowych. Koncentrując się na imporcie białek do mitochondriów i jądra komórkowego. W każdym przypadku podał przykłady białek wirusowych kierowanych do tych przedziałów komórkowych. Również ta część wstępu jest dobrze napisana i prawidłowo zilustrowana. Podsumowując wstęp jest dobrym wprowadzeniem do przedmiotu badań. Zawiera wszystkie informacje niezbędne do śledzenia procesu uzyskiwania i analizy wyników omówionych w dalszej części ocenianej rozprawy.

W rozdziałach metodycznych doktorant omówił materiały oraz metody zastosowane w czasie prowadzenia badań. Rozdziały te są starannie zredagowane i stanowią wyczerpujące źródło informacji, które powinny umożliwić powtórzenie opisanych doświadczeń w każdej pracowni wirusologii molekularnej.

W pierwszej części wyników doktorant przedstawił analizę bioinformatyczną genów ANK-1,2,3 mającą na celu wykazanie, że kodowane przez nie białka w istocie zawierają powtórzenia ankirynowe. Powtórzenia te charakteryzują się dość znaczną zmiennością sekwencji aminokwasowej i ich jednoznaczna identyfikacja wymaga zastosowania kilku niezależnych metod bioinformatycznych. Doktorant wykazał, że białka ANK-1 i 2 mają po 10 powtórzeń ankirynowych. Podczas gdy białko AN-3 ma 9 takich powtórzeń. W każdym z białek zidentyfikował również domenę PRANC charakterystyczną dla wielu białek kodowanych przez genomy wirusów ospy. Domena ta ma znaczenie w ubikwitynacji białek. Dodatkowo wyniki analizy bioinformatycznej sugerowały, że białko AN-1 może zawierać N-kończącą pre-sekwencję kierującą do mitochondrium a białko ANK-2 może zawierać sygnał lokalizacji jądrowej. Te informacje zainspirowały doktoranta do podjęcia badań sub-komórkowej lokalizacji białek ANK.

W kolejnej części wyników doktorant opisał prace, które pozwoliły na uzyskanie przeciwciał specyficznych względem białek ANK. W tym celu stosował klonowanie do wektorów bakteryjnych i bakulowirusowych oraz izolację rekombinowanych białek z membran PVDF. Uzyskane przeciwciała pozwoliły na określenie kinetyki ekspresji białek w komórkach infekowanych wirusem ORFV. ANK-1 ulega ekspresji średniej i późnej fazie infekcji zaś ANK-2 i 3 w fazie wczesnej.

Kolejny rozdział poświęcony jest analizie wewnątrzkomórkowej lokalizacji ANK-1. Wyniki przedstawione w tym rozdziale zostały opublikowane w czasopiśmie *Virus Genes* (2014). Doktorant jest pierwszym autorem tej publikacji. Białko ANK-1 lokalizuje w mitochondriach co pokazano zarówno stosując mikroskopię z wykorzystaniem białka ANK1 w fuzji z EGFP oraz technikę biochemiczną różnicowego wirowania ekstraktu komórkowego na frakcję błonową zawierającą mitochondria i frakcję cytoplazmatyczną. Doktorant wykazał również, że mitochondrialna lokalizacja ANK-1 nie zależy od obecności innych genów wirusowych oraz od replikacji wirusowego DNA. W pracy nie określono, w którym z przedziałów sub-mitochondrialnych lokalizuje się ANK-1

**Pytanie do doktoranta:** W czasie publicznej obrony proszę opisać doświadczenia, które mogłyby określić sub-mitochondrialną lokalizację ANK-1.

Doktorant analizował również sygnał molekularny odpowiedzialny za mitochondrialną lokalizację ANK1. Analiza lokalizacji wariantów delecyjnych oraz białka zawierającego podstawienia aminokwasowe w motywie TPLH w 9 powtórzeniu ankirynowym (AR9) wykazały, że za lokalizację mitochondrialną ANK-1 odpowiadają sekwencje zlokalizowane w powtórzeniach AR8 i AR9 a nie jak przewidywała analiza bioinformatyczna pre-sekwencja na N-końcu białka. Przy czym sekwencja aminokwasowa sygnału lokalizacji mitochondrialnej nie została poznana. Omawiając wyniki uzyskane dla wariantu ANK1- TPLH/TAAH doktorant dyskutuje możliwość zaburzenia struktury motywu AR9 jako przyczyny braku mitochondrialnej lokalizacji tego wariantu białka.

**Pytanie do doktoranta:** Jakiego rodzaju analizy doświadczalne i/lub bioinformatyczne mogłyby zweryfikować hipotezę, że wprowadzone substytucje aminokwasowe wpływają na strukturę motywu AR9 i całego białka ANK-1?

W kolejnej części wyników doktorant omówił doświadczenia mające na celu poznanie subkomórkowej lokalizacji ANK-2. Obserwacje mikroskopowe komórek zawierających białko ANK-2 w fuzji z EGFP pokazały, zgodnie z przewidywaniami bioinformatycznymi, że białko to jest zlokalizowane w jądrze. Ponadto staranna analiza lokalizacji szeregu wariantów delecyjnych ANK-2 wykazała, że umiejscowienie sygnału lokalizacji jądrowej jest zgodny z przewidywaniami bioinformatycznymi. Jądrowa lokalizacja ANK-2 nie jest uzależniona od obecności innych białek wirusa ORFV oraz od replikacji wirusowego DNA.

W kolejnym rozdziale doktorant przedstawił wyniki analizy mikroskopowej pokazujące, że ANK-3 podobnie jak ANK-2 lokalizuje w jądrze komórkowym.

Wyniki dotyczące lokalizacji ANK-2 i 3 nie zostały dotychczas opublikowane.

W podpisie do Fig. 35 napisano ...Subcellular localization of untagged ANK-3 protein....

Czytając tekst nie mogłem się zorientować jak identyfikowano nie wyznakowane białko ANK-3 w mikroskopie fluorescencyjnym.

**Pytanie do doktoranta:** Proszę o wyjaśnienie powyższej kwestii w czasie publicznej obrony.

W ostatniej części wyników doktorant przedstawił wpływ ekspresji białek ANK-1 i ANK-2 na przeżywalność komórek w których zaindukowano proces programowanej śmierci dodając do pożywki staurosporyny. Doświadczenie miało na celu weryfikację ciekawej hipotezy, że białka ANK-1 i ANK-2 mogą być czynnikami wirusowymi odpowiedzialnymi za zahamowanie procesu apoptozy a tym samym stanowią elementy mechanizmu molekularnego, mającego na celu zapobieżenie śmierci komórek zainfekowanych wirusem ORFV. Tą hipotezę doktorant sformułował na podstawie własnych studiów literaturowych. Niestety otrzymane wyniki nie są jednoznaczne. Moim zdaniem słusznie nie zostały włączone do publikacji opisującej mitochondrialną lokalizację ANK-1.

W rozdziale Dyskusja doktorant starannie przedyskutował wyniki uzyskane w czasie realizacji projektu doktorskiego w kontekście dobrze dobranych danych literaturowych. Przy czym rozdział ten rozpoczyna się od dwóch paragrafów wstępnych, które moim zdaniem powinny być stanowić część Wstępu a nie Dyskusji. Dobrą wskazówką dla autorów prac naukowych jest aby dyskusję rozpoczynać od omówienia wyników własnych przedstawionych w danej pracy a dopiero później konfrontować je z danymi literaturowymi. Myślę, że rozdział Dyskusja zyskał by na czytelności gdyby doktorant stosował się do tej praktycznej reguły. Jednak niezależnie od tych uwag dotyczących organizacji tekstu lektura Dyskusji pokazuje jednoznacznie, że doktorant bardzo dobrze zna literaturę związaną z tematyką swoich badań i potrafi ją twórczo wykorzystać.

W końcowej części dyskusji doktorant rozważa znaczenie fizjologiczne białek ANK kodowanych przez genom wirusa ORFV. Stawiając istotne pytanie czy delecja genów kodujących białka ANK będzie miała wpływ na cykl życiowy i infekcyjność wirusa.

**Pytanie do doktoranta:** Jak w naturalnych populacjach ORFV i/lub spokrewnionych wirusów wygląda kwestia obecności/braku w genomie wirusowym poszczególnych genów ANK? Innymi słowy czy liczba tych genów jest zmienna w naturalnych populacjach?

**Dorobek publikacyjny doktoranta:** Poza omówioną w tej recenzji publikacją zawierającą wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej mgr Lacek jest również pierwszym autorem dwóch publikacji, w których przedstawiono wyniki nie zamieszczone w ocenianej rozprawie. Prace te ukazały się w Journal of Hepatology (2012) oraz Journal of Biological Chemistry (2014). Dorobek publikacyjny mgr Lacka oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa pokazuje, iż jej autor potrafi wybrać istotny temat badań, sformułować rzetelne hipotezy badawcze i zweryfikować je za pomocą metod doświadczalnych i informatycznych co jednoznacznie wskazuje na jego zdolność do podjęcia wartościowej pracy badawczej. Zaprezentowane wyniki zostały przez doktoranta poprawnie przedyskutowane i słusznie uznane za wnoszące oryginalny wkład do wiedzy na temat molekularnych mechanizmów funkcjonowania wirusa ORFV. **Istnieją podstawy do wyróżnienia pracy stosowną nagrodą.**

Stwierdzam, że przedstawiona **rozprawa bez wątpienia spełnia wymagania obowiązującej ustawy o tytule i stopniach naukowych**. Z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG/GUMed o dopuszczenie mgr Krzysztofa Lacka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jarosław Marszałek

