

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 20.12.2014 r.

### Recenzja

#### **rozprawy doktorskiej mgr Natalii Karskiej zatytułowanej „Synteza oraz badania konformacyjne fragmentów homologów glikoproteiny N bydlęcego herpeswirusa 1 (BHV-1) oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV)”**

Dysertacja doktorska Pani mgr Natalii Karskiej została wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej pod kierunkiem Pani prof. Sylwii Rodziewicz-Motowidło oraz Pani dr hab. Emilii Sikorskiej. W Katedrze od lat praktykowana jest synteza i badanie peptydów szczególnie w wiodących tematach związanych z ich aktywnością biologiczną, którego doskonałym przykładem może być ostatnio opracowany kosmetyk zawierającego jako substancje aktywne peptydy.

Przedstawiona do recenzji praca jest bardzo obszerna, która razem z bibliografią zawiera 180 stron plus dodatkowo 32 strony załączników. Dysertacja ma układ standardowy zawierająca wszystkie istotne dla pracy doktorskiej elementy, co w dzisiejszych czasach jest dużą rzadkością, z tego względu czyta się ją bardzo dobrze, a następujące po sobie rozdziały poukładane są w sposób logiczny posiadając charakter przyczynowo-skutkowy.

Przedstawiona w pracy tematyka wpisuje się w najnowsze trendy badań poruszających bardzo istotny problem wyłączenia mechanizmu odpowiedzi immunologicznej na skutek inwazji wirusowej. Dotyczy sposobów „ucieczki immunologicznej” herpeswirusa bydlęcego (BHV-1) oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV), poprzez inaktywację, inhibicję działania transporterowego kompleksu białkowego TAP. Według recenzenta niniejsza praca należy do prac interdyscyplinarnych zawierając: syntezę organiczną, zaawansowane pomiary NMR oraz badania teoretyczne wykonane za pomocą dynamiki molekularnej.

Pomijając spis treści oraz skrótów literaturowych, praca zaczyna się wstępem teoretycznym w którym Doktorantka najpierw wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji poprzez opis elementów układu immunologicznego, odpowiedzi immunologicznej organizmu wraz z opisem roli komórek efektorowych, odpowiedzi immunologicznej wrodzonej (nieswoistej) i nabytej (swoistej) organizmu wraz z wyodrębnieniem naturalnych barier obronnych przed drobnoustrojami oraz szlakiem prezentacji antygenów wirusowych. Ten ostatni podrozdział bardzo dobrze opisuje kaskadę immunologicznych reakcji biochemicznych zachodzących na skutek obecności patogenu (wirusa czy bakterii) w komórkach organizmu ludzkiego. Następny podrozdział opisuje mechanizmy „obrony” herpeswirusów przed mechanizmami obronnymi organizmu w podziale na białkowe systemy dezaktywacji, w tym opis modelowego białka UL49.5. Rozdział ten jest bogato ilustrowany w znaczny sposób ułatwiający zrozumienie podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej.

Następny rozdział to „Cel pracy”, jest on napisany w sposób wielowątkowy, bardzo szczegółowy i rozbudowany. Na początku Autorka przedstawia podłoże powstania hipotezy

badawczej, które polega na określeniu różnic w aktywności biologicznej białka UL49.5, w zależności od pochodzenia biopolimeru, od herpeswirusa bydłęcego lub wirusa ospy wietrznej i półpaśca. W pierwszym przypadku białko tworzy kompleks z transporterem peptydów antygenowych (TAP) inhibując jego działanie, natomiast w drugim przypadku oddziałuje z TAP, natomiast nie wykazuje właściwości hamujących jego aktywności biologicznej. Zbadanie obu struktur homologicznych białek UL49.5 mogło dostarczyć nowych cennych informacji o systemach obronnych wirusów przed mechanizmami odpornościowymi organizmu. W tym celu jak pisze Doktorantka podzieliła oba białka UL49.5 herpeswirusa BHV-1 (siedemdziesiąt pięć reszt aminokwasowych) oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca VZV (sześćdziesiąt trzy reszty aminokwasowe) na trzy fragmenty N-końcowy, TM-transbłonowy, C-końcowy. A tak naprawdę zgodnie z tabelą 2 na cztery (jeszcze fragment transbłonowo-C-końcowy). Dodatkowo mgr. Karska postanowiła zbadać wpływ modyfikacji struktury pierwszorzędowej na konformację badanych fragmentów białka UL49.5 herpeswirusa BHV-1. Modyfikacje zostały wprowadzone osobno we fragmencie N-końcowym w rejonie reszt aminokwasowych R<sup>9</sup>RE<sup>11</sup>, P<sup>31</sup>PQ<sup>33</sup> oraz na C-końcowym fragmencie R<sup>72</sup>GRG<sup>75</sup>. Wprowadzone mutacje aminokwasowe na N-końcu miały dwa cele badawcze destabilizację peptydu, a następnie jego zwiększoną stabilizację N-końcowej helikalnej struktury poprzez wprowadzenie modyfikacji GGG, RRG, AAA. Dodatkowo został zmieniony fragment białka P<sup>31</sup>PQ<sup>32</sup>(Q), najprawdopodobniej odpowiedzialny za fałdowanie jego struktury, poprzez zastąpienie tej sekwencji tripeptydami GGQ, AAQ, GGG, AAA. Fragment C-końcowy peptydu jest odpowiedzialny za interakcje z transporterem TAP oraz jego degradację proteosomalną z tego względu zostały wprowadzone zmiany w sekwencji R<sup>72</sup>GRG<sup>75</sup> peptydu na KGKG, AGAG, RGAG, AGRG. Całość zaprojektowanych peptydów została przedstawiona w tabeli 3.

W dalszej części pracy został zawarty opis wykonanych eksperymentów wraz z wykorzystanymi metodami pomiarowymi, w której Autorka opisuje syntezę peptydów na podłożu stałym, badania peptydów za pomocą dichroizmu kołowego, opis pomiarów NMR oraz wykorzystane oprogramowanie wraz z algorytmami postępowania. Jest to rozdział napisany bardzo dobrze pozwalający na odtworzenie wykonanych doświadczeń oraz obliczeń.

Rozdział IV zatytułowany „Omówienie wyników” rozpoczyna podrozdział „Synteza i oczyszczanie peptydów” w którym Doktorantka opisuje swoje dokonania dotyczące syntezy zaprojektowanych peptydów, zarówno zakończonych sukcesem oraz tych których synteza i oczyszczanie dostarczyło problemów, z którymi w większości przypadków Autorka dysertacji poradziła sobie doskonale. W następnych podrozdziałach Pani mgr Natalia Karska zastosowała bardzo podobny schemat opisu otrzymanych wyników w stosunku dla każdego z zsyntezowanych i oczyszczanych peptydów. Dla każdego fragmentu białka została najpierw wykonana analiza widm CD w trzech mediach: w wodzie, układzie micelarnym DPC (dodecylofosfocholina - jako model błon lipidowych organizmów eukariotycznych) oraz SDS (dodecylosiarczan sodu - model lipidowych błon bakteryjnych). Następnie została wykonana analiza danych NMR wykonanych w dwóch deuterowanych układach: SDS w buforze fosforanowym (PBS) oraz DPC w wodzie, wraz z analizą otrzymanych struktur. Na końcu zostały przedstawione wyniki badań w układach modelowych błon lipidowych. W ten sposób zostały opisane wyniki dotyczące zarówno natywnych fragmentów białka UL49.5 bydłęcego herpeswirusa, a także wirusa ospy wietrznej i półpaśca, oraz przeprowadzonych wyżej opisanych modyfikowanych peptydów białka BHV-1. Wszystkie opisy są udokumentowane

przy pomocy licznych kolorowych rysunków; co pozwala na bieżące śledzenie przebiegu dyskusji otrzymanych wyników.

Pierwszy etap badań strukturalnych obejmuje opis badań spektroskopowych prowadzących do otrzymania pełnej struktury natywnego białka UL45.9 BHV-1 wraz z jego zadokowaniem w błonie POCP. Otrzymane za pomocą dynamiki molekularnej dane wskazują, że otrzymany model eksperymentalny różni się od wcześniej opublikowanego w literaturze teoretycznego modelu, co uważam za znaczne osiągnięcie. Dodatkowo otrzymana struktura została zadokowana do białka transporterowego TAP. W ten sposób Doktorantka otrzymała 10 potencjalnych struktur kompleksowych z których wybrała trzy jako najbardziej prawdopodobne. W kolejnym etapie do wyselekcjonowanych modeli został również zadokowany substrat, w ten sposób zostały otrzymane struktury (29 możliwych struktur) z których została wybrana jedna 3.1 jako najbardziej prawdopodobna zgodna z danymi literaturowymi.

Badania mające na celu destabilizację/stabilizację N-końca białka UL49.5 poprzez zmianę sekwencji aminokwasowych w rejonie R<sup>9</sup>RE<sup>11</sup> wykonane przy pomocy spektroskopii CD oraz NMR wykazały zgodnie z oczekiwaniem destabilizowanie struktury helikalnej przez triadę aminokwasową GGG podczas, gdy zamiana w sekwencji na RRG najbardziej wydłuża  $\alpha$ -helisę. Wprowadzenie reszt AAA stabilizują zgodnie z oczekiwaniem strukturę helikalną i powoduje, że jest ona dłuższa w porównaniu do natywnego peptydu, ale krótsza od białka z mutacją RRG. Badania peptydów zmodyfikowanych na N-końcu w regionie P<sup>31</sup>PQ<sup>33</sup> ze względu na ich słabą rozpuszczalność i ich zdolność do agregacji zakończyły się połowicznym sukcesem polegającym na wykonaniu widm CD oraz przeprowadzeniu badań przy pomocy dynamiki molekularnej.

Podobnie dla mutacji wprowadzonych na C-końcu w regionie R<sup>72</sup>GRG<sup>75</sup> zostały wykonane jedynie badania za pomocą spektroskopii CD oraz dynamiki molekularnej. Jednakże w tym przypadku jak motywuje Doktorantka brak przeprowadzenia badań NMR był podyktowany otrzymaniem za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego wyników wskazujących na nieuporządkowaną strukturę peptydu. Chociaż, jak wykazały badania wykonane za pomocą dynamiki molekularnej tworzenie się struktury helikalnej na C-końcu peptydu, dla trzech z czterech wprowadzonych „mutacji komputerowych” jest możliwe. Według recenzenta okazja potwierdzenia struktur z fragmentami AGRG, RGAG, KGKG otrzymanych za pomocą dynamiki molekularnej przy użyciu spektroskopii NMR była unikatowa i jednoznacznie mogłaby potwierdzić badania teoretyczne.

Badania biologiczne zaprezentowane w rozdziale zawierającym podsumowanie wyników pracy wykonane na modyfikowanych peptydach wykazały, że N-modyfikowane fragmenty białka w rejonie R<sup>9</sup>RE<sup>11</sup> mające na celu destabilizację struktury mają mały wpływ na inhibicję degradacji białka TAP, co stanowi nowy oryginalny wynik, który jest w opozycji do danych literaturowych otrzymanych przez Huiyong Wei i współpracowników. Natomiast mutacja w rejonie motywu prolinowego P<sup>31</sup>PQ<sup>31</sup> przyniosła pożądane zmiany, w których wymiana sekwencji na trójpeptyd GGG oraz AAQ obniżała aktywność badanych peptydów jako inhibitorów kolejno o 73.88 % oraz 68.65%. Badania biologiczne modyfikowanych fragmentów C-końca białka nie zostały wykonane przez Doktorantkę, ale we wnioskach z tej części badań Autorka dysertacji odniosła się do danych eksperymentalnych wykonanych we współpracy z dr Andreeą Lipńską oraz do danych literaturowych.

Ostatni rozdział prac własnych Doktorantki przedstawia wyniki badań konformacyjnych białka ludzkiego UL49.5 ospy wietrznej i półpaśca VZV. N-końcowy fragment peptydu jak wynika z widm CD zmienia swoją konformację w zależności od użytego medium. W wodzie peptyd posiadał strukturę nieuporządkowaną podczas, gdy użycie układów micelarnych wyraźnie wskazuje na tworzenie się struktury  $\alpha$ -helikalnej. Niestety dla tego fragmentu peptydu nie udało się Doktorantce zarejestrować widm NMR z powodu braku sygnałów pochodzących od protonów amidowych (osobiście jestem dużym zwolennikiem sprawdzania pH w badanych próbkach). Fragment C-końcowy białka podobnie jak fragment N-końca w wodzie posiada strukturę nieuporządkowaną podczas gdy, w układach micelarnych przyjmuje strukturę  $\alpha$ -helikalną, co w tym przypadku zostało potwierdzone badaniami przeprowadzonymi za pomocą spektroskopii NMR. Transbłonowy fragment tego białka został przebadany w układach micelarnych wykazując tworzenie się  $\alpha$ -helisy, która tak jak w poprzednim przykładzie została potwierdzona za pomocą spektroskopii NMR. Zaprezentowane badania pozwoliły na porównanie fragmentów białka UL49.5 wirusa VZV z BHV-1.

Podsumowując, Doktorantka podjęła się niezwykle trudnego problemu naukowego, którego zrozumienie wymaga bardzo dobrego przygotowania literaturowego, a wyniki otrzymane przez Panią mgr Natalię Karską stanowią nieoceniony wkład w badanie mechanizmów blokowania białka transporterowego TAP za pomocą białka UL49.5 wirusa VZV oraz BHV-1. Autorka dysertacji wykazała się niecodzienną znajomością wielu technik laboratoryjnych zarówno podczas syntezy i oczyszczania peptydów jak również znajomością metod spektroskopowych CD i NMR z których ta ostatnia jest szczególnie wymagająca. Dodatkowo wartym wspomnienia jest fakt, że otrzymanie tak wielu różnych wyników wymaga niecodziennej pracowitości i determinacji od doktoranta, które są bardzo pożądanymi cechami u osób zajmujących się badaniami naukowymi. Zdaniem recenzenta z pewnością ilość przedstawionych wyników oraz zakres wykonanych eksperymentów wystarczyłoby na co najmniej dwie rozprawy doktorskie.

Z obowiązku recenzenta muszę również wspomnieć, że pomimo cennego wkładu naukowego jaki stanowi niniejsza dysertacja Doktorantka nie ustrzegła się błędów językowych, pomyłek edytorskich oraz skrótów myślowych, o znakach interpunkcyjnych nie wspominając, których nie mam w zwyczaju wypisywać w recenzji, z tego względu, że nie wpływają na wartość naukową przedstawionych wyników uzyskanych w pracy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Karskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz.595 z późn. zm.). Wniosuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wniosuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

PRODZIEKAN

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. nadzw.