



Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot

Poznań, dn. 02.11.2024 r.

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl
tel. (61) 829-59-31

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zimmer

pt. „Analiza zmienności genetycznej glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) u pacjentów poddanych terapii interferonem alfa i rybawiryną”
dla Rady Dyscypliny Biotechnologia
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Zimmer pt. „Analiza zmienności genetycznej glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) u pacjentów poddanych terapii interferonem alfa i rybawiryną” została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed pod kierunkiem Prof. dr hab. Krystyny Bienkowskiej-Szewczyk.

Pani mgr Zimmer jest współautorką 11 prac naukowych. Główne wyniki ocenianej pracy doktorskiej zostały przedstawione w publikacji naukowej, której Doktorantka jest pierwszym autorem:

Zimmer K, Chmielewska AM, Jackowiak P, Figlerowicz M, Bienkowska-Szewczyk K. Alterations in N-glycosylation of HCV E2 Protein in Children Patients with IFN-RBV Therapy Failure. Pathogens. 2024;13(3):256 (5-letni IF 3.5, 100 pkt. MNiSW, Q2).

W kolejnych 9 pracach Pani mgr Zimmer jest współautorką prac doświadczalnych opublikowanych w punktowanych czasopismach międzynarodowych, takich jak m.in.: *Virology*, *Front. Microbiol.*, *J. Nanobiotechnology*, *Cancers (Basel)*, *Heart Fail. Rev.*, *Microb. Cell Fact.*, *Sensors (Basel)* oraz *Acta Biochim. Pol.* W Jej dorobku znajduje się też praca przeglądowa w języku polskim w piśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* dotycząca nowych metody leczenia i zapobiegania WZW typu C.

Pani mgr Zimmer uzyskała także środki finansowe na realizację 2 grantów badawczych w ramach projektu ramowego Uniwersytetu Gdańskiego „Finansowanie Badań Młodych Pracowników Nauki”, które stanowiły bazę finansową do realizacji pracy doktorskiej.



Przedstawiona do oceny praca dotyczy znalezienia odpowiedzi na pytanie, czy wzór N-glikozylacji glikoprotein E1E2 wirusa zapalenia wątroby typu C może mieć związek z odpowiedzią pacjentów na przyjmowane leki, a także w indukowaniu odpowiedzi ze strony przeciwciał neutralizujących przez potencjalne preparaty szczepionkowe. Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *Hepatitis C Virus*) stanowi jedno z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Należy on do rodziny *Flaviviridae* i jest wirusem o genomie typu (+)ssRNA, a jego ikozaedralny kapsyd posiada osłonkę lipidową. Wywołuje wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW typu C), którego konsekwencją jest marskość wątroby i rak wątrobowokomórkowy. Wysoką wagę badań związanych z wyjaśnieniem mechanizmu zapalenia wątroby typu nie-A i nie-B docenił Komitet Noblowski, który w 2020 roku przyznał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny za odkrycie wirusa zapalenia wątroby typu C dla zespołu Harvey J. Alter, Michael Houghton i Charles M. Rice.

Bardzo uciążliwą cechą wirusa HCV, która przyczynia się do wielu niepowodzeń w terapii jest jego duże zróżnicowanie genetyczne, związane z wysokim tempem mutacji, nawet w obrębie jednego pacjenta. Dlatego pomimo zakażenia danym genotypem wirusa HCV (najczęściej genotyp 1), w organizmie osoby zainfekowanej wirus występuje w postaci wielu różniących się (do 10% sekwencji nukleotydowej) quasi-gatunków. Dotychczas nie udało się opracować skutecznej szczepionki anty-HCV, dlatego pacjenci polegają wciąż na terapiach. Aktualnie dostępne są leki nowej generacji – opisane w pracy „*direct acting antivirals*” (DAA). Jednak przed 2011 rokiem stosowano „złoty standard” - terapię skojarzoną pegylowanym interferonem oraz rybawiryną. Stąd też próby od pacjentów wykorzystane w pracy pochodzą od dzieci leczonych właśnie w ten sposób, dzięki czemu uzyskano dobrze scharakteryzowane próby do analiz.

Autorka powieliła uzyskane 10 sekwencji DNA od dziecięcych pacjentów leczonych pegylowanym interferonem i rybawiryną, kodujące w dużej mierze informację o sekwencji aminokwasowej wirusowego białka E2. Spośród uzyskanych zróżnicowanych sekwencji quasi-gatunków u pacjentów poddanych leczeniu, których wyniki leczenia różniły się od siebie, wybrano na podstawie przygotowanych drzew filogenetycznych sekwencje charakterystyczne dla każdego z pacjentów. Już na tym etapie widać było, iż ewolucja populacji quasi-gatunków w grupie nie reagującej na leczenie była bardzo ograniczona. Wybrane sekwencje pozwoliły na uzyskanie chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1/E2 dla każdej z próbek pochodzących od pacjentów, co umożliwiło wykonanie wielu analiz strukturalnych i funkcjonalnych. Analizy te wykazały, że różnice w masie cząsteczkowej poszczególnych wariantów glikoproteiny E2 wynikały z mutacji prowadzących do utraty poszczególnych miejsc N-glikozylacji i występujących wyłącznie u pacjentów nieodpowiadających na leczenie. Okazało się też, że próby od tych pacjentów, mające mutacje we wzorze N-glikozylacji były dużo gorzej rozpoznawane przez wrażliwe na konformację przeciwciała neutralizujące, co sugeruje, że wspomniane warianty E2 mogły wykazywać lokalną zmianę konformacji.

Natomiast dane na temat częstości pojawiania się wykrytych w pracy zmian we wzorze N-glikozylacji glikoproteiny E2 w zbiorze 100 losowo wybranych sekwencji E2 pochodzących od pacjentów zakażonych HCV genotypu 1a zdeponowanych w bazie danych euHCVdbte pokazały, że ten typ mutacji nie jest unikalny dla grupy badanej wykorzystywanej na potrzeby niniejszej pracy, zatem wskazuje na możliwą uniwersalność przedstawionych wyników.



Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Zimmer ma typowy układ, składając się z rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Cel pracy, Metody, Materiały, Wyniki, Podsumowanie wyników, Dyskusja, Bibliografia, Dorobek naukowy. Przed wstępem Autorka zamieściła szczegółowy 3-stronicowy wykaz skrótów, 2-stronicowe streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz obszerny i szczegółowy spis treści (4 strony). Całość dysertacji liczy łącznie 130 stron, zawierających 188 pozycji literatury (w tym 2 odnośniki do stron internetowych), 31 rysunków oraz 7 tabel.

Zauważyłem jednak pewną rozbieżność pomiędzy przedstawioną pracą w wersji drukowanej, a wersją pracy w pliku pdf. Otóż, praca w wersji drukowanej zawiera 2 strony więcej niż w wersja elektroniczna, ostatnia jej strona nosi numer 132, a w pliku pdf jest nią strona 130. W dalszej części oceny opierałem się na wersji elektronicznej pracy.

28-stronicowy **Wstęp** stanowi bardzo ciekawe opracowanie na temat charakterystyki wirusa WZW typu C, cyklu życiowego, białek wirusowych, ze szczególnym uwzględnieniem glikoprotein osłonkowych E1 i E2. Autorka opisuje także epidemiologię i patogenezę zakażeń HCV, odpowiedź immunologiczną na zakażenie HCV oraz co ważne, na temat rozwoju nowych terapii przeciw-HCV w ostatnich kilkunastu latach. Bardzo interesujące jest także opracowanie rozdziału na temat prób uzyskania skutecznych szczepionek przeciw-HCV, które jak na razie zakończyły się niepowodzeniem. Niemniej jednak badania nadal trwają i są pewne nadzieje na postęp w tym zakresie. Autorka słusznie podkreśla, iż opracowanie idealnej szczepionki przeciw wirusowi HCV powinno skupiać się nie tylko na indukowaniu odpowiedzi ze strony limfocytów T, ale także na wzbudzaniu przeciwciał szeroko neutralizujących przeciw białkom wirusowym, niezbędnych w zapobieganiu przewlekłej infekcji. Być może wyniki uzyskane przez Doktorantkę w pracy przyczynią się do zmiany tej niekorzystnej sytuacji.

Cel pracy (1 strona) jest jasno określony i bardzo ciekawy. Celem pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), a odpowiedzią na terapię pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną u dzieci. W pracy użyto białek wyprodukowanych na matrycy DNA otrzymanego z materiału pochodzącego od pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, którzy byli poddawani wspomnianej terapii. Natomiast szczegółowym celem była analiza zmian we wzorze glikozylacji białka osłonki E2 wirusa HCV, gdyż podczas prac okazało się, że warianty glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów z grupy nie reagującej na leczenie charakteryzowały się niższą masą cząsteczkową w porównaniu do próbek z pozostałych grup pacjentów.

Materiały i metody zostały podzielone na dwa następujące po sobie rozdziały. Pierwszym z nich jest 12-stronicowy rozdział opisujący **Metody** wykorzystane w pracy. Doktorantka korzystała z szerokiego zestawu technik pracy z bakteriami, DNA, analiz bioinformatycznych, technik proteomicznych, hodowli komórek ssaczych, czy produkcji pseudocząstek wirusowych. Nie mam zastrzeżeń co do stosowanych w pracy metod, są bardzo szczegółowo opisane, nowoczesne i właściwie użyte. Na szczególną uwagę zasługuje konstrukcja chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 i ich produkcja w komórkach ssaczych. **Stworzenie wariantów chimerycznych i wyprodukowanie ich jest dużym osiągnięciem Doktorantki.**

Do tej części mam kilka drobnych uwag/pytań:

- Str. 43 – w punkcie 6.1.1. zapisano wartości „575nm”, „50ml”, „1500rpm”, a zapis powinien wyglądać następująco: „575 nm”, „50 ml”, „1500 rpm” – liczba powinna być oddzielona od jednostki spacją; w tym samym punkcie zapisano „CaCL2”, a powinien być użyty indeks dolny „CaCl₂” – podobny zapis bez użycia indeksu dolnego we wzorach sumarycznych pojawia się w innych miejscach pracy.
- Str. 44 – jest „Z konserwy komórek bakteryjnych BL21 E. coli” – chciałbym zapytać co oznacza to sformułowanie?
- Str. 45 – jest „przez 30min.” - W rozdziale **Metody** Autorka używa najczęściej pełne słowo „minut”, a w tym miejscu pojawia się skrót „min”. Jest on jak najbardziej poprawny, ale powinno być to ujednolicone w całej pracy.
- Str. 48, punkt 6.4.3 – jest „przez 1godzinę” – Autorka używa w innych miejscach pracy bardziej adekwatnego skrótu „1h” – nawet w tym samym punkcie pojawia się naprzemienne użycie skrótu i pełnego słowa, dodatkowo nie oddzielonego od liczby „przez 1godzinę”. Wprowadza to niepotrzebnie pewien bałagan do zapisu.

Kolejny rozdział na 8 stronach opisuje wykorzystane w pracy **Materiały**: odczynniki, stosowane w pracy pożywki, bufory i ich skład, użyte przeciwciała, plazmidy, linie komórkowe i szczepy bakteryjne.

Chciałbym w tym miejscu skomentować **wybór materiału wyjściowego do badań**. Materiał ten stanowiło 10 archiwalnych fragmentów DNA (produktów PCR) o długości 1166 nukleotydów kodujących całą sekwencję glikoproteiny E2, niewielki C-terminalny fragment sekwencji glikoproteiny E1 oraz N-terminalny fragment białka P7 wirusa zapalenia wątroby typu C. Matrycą do uzyskania tych próbek w reakcji odwrotnej transkrypcji był całkowity genomowy RNA wyizolowany z surowicy krwi 10 małoletnich pacjentów cierpiących na chroniczną postać zapalenia wątroby typu C, zainfekowanych wirusem genotypu 1a. Z tekstu pracy wnioskuję, iż izolacja RNA z prób oraz reakcja odwrotnej transkrypcji była wykonana podczas wcześniejszych badań Prof. dr hab. M. Figlerowicza (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 712/02 z 05.09.2002), a materiał był przechowany do czasu badań podjętych przez Doktorantkę.

Chciałbym w tym miejscu zapytać jak długi był czas przechowywania tych prób?

Jak wiadomo czas przechowywania ma wpływ na próby, chociaż pod tym względem DNA jest bardzo stabilny i może być podstawą różnych analiz nawet po dłuższym czasie, przy odpowiednich warunkach przechowywania. Jednocześnie rozumiem, iż taki wybór materiału do badań jest zrozumiały w kontekście założonych celów pracy i dostępności materiału od osób chorych poddanych terapii. Niemniej jednak podczas prowadzonych badań wybór ten rodził pewne ograniczenia, co Autorka opisuje w pracy. Na przykład nie było możliwe uzyskanie z pierwotnego materiału potencjalnych sekwencji kodujących całe białko E1 wirusa, dlatego wykorzystano do tego celu sekwencję kodującą białko ze szczepu referencyjnego H77c. Miało to swoje uzasadnienie, gdyż białko to jest zachowawcze w swojej strukturze, niemniej jednak utracono pewną potencjalną informację, która mogłaby w innej sytuacji wzbogacić wyniki. Ponadto liczba prób (od 10 pacjentów)

była zbyt mała, aby wyciągać z pracy szersze wnioski. Niemniej jednak dobrze scharakteryzowany materiał badawczy stanowił punkt wyjścia do całej pracy.

Doktorantka przedstawiła **Wyniki** zebrane na 33 stronach pracy. Rozdział ten podzielony jest na 3 podrozdziały, w których Autorka w usystematyzowany sposób omawia uzyskanie materiału wyjściowego do badań, analizę strukturalną glikoprotein E1E2 wirusa HCV, zawierających warianty genetyczne glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów oraz analizę funkcjonalną zrekonstruowanych heterodimerów glikoprotein, niosących zmienione genetycznie warianty glikoproteiny E2.

Jak już wspomniano wcześniej, materiałem wyjściowym do badań było 10 fragmentów DNA, będących produktami PCR. Matrycą do uzyskania tych próbek był genomowy RNA izolowany z surowicy krwi dziecięcych pacjentów cierpiących na chroniczną postać zapalenia wątroby typu C, poddanych terapii skojarzonej pegylowanym interferonem alfa 2b i rybawiryną w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pacjenci byli bardzo dobrze scharakteryzowani i zostali podzieleni na 3 grupy: NR (*non responders*) – brak odpowiedzi na terapię, SR (*sustained responders*) – trwała odpowiedź na terapię, TR (*transient responders*) – przejściowa odpowiedź na terapię.

Pierwszym etapem pracy była amplifikacja 10 produktów PCR pochodzących od pacjentów, ich klonowanie oraz sekwencjonowanie w celu uzyskania sekwencji reprezentujących quasi-gatunki wirusowe. Produkty reakcji PCR zostały rozdzielone w 1% żelu agarozowym, prążki odpowiedniej wielkości zostały wycięte i oczyszczone przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników. Uzyskane próbki DNA zostały następnie wklonowane do wektora pJET1.2-blunt. Transformacja komórek kompetentnych TOP10 *E. coli* każdym z 10 produktów ligacji umożliwiła otrzymanie serii klonów, z których każdy reprezentował jedną z sekwencji wirusowych quasi-gatunków charakterystycznych dla danego pacjenta. Ostatecznie wybrano losowo 5 sekwencji pseudotypów wirusowych dla każdego z pacjentów, a uzyskane sekwencje DNA w formacie FASTA przesłano do bioinformatycznego wytypowania sekwencji najbardziej charakterystycznych dla wszystkich pacjentów. Wyniki analiz zostały przedstawione w formie drzew filogenetycznych za uprzejmością dr hab. Pauliny Jackowiak z zespołu prof. dr hab. Marka Figlerowicza.

Pomysł na badania przy wykorzystaniu prób już wcześniej wyizolowanych jest bardzo ciekawy, ale też nieco ryzykowny. Najtrudniejszą fazą badań była właśnie ta początkowa, dotycząca wyboru najbardziej charakterystycznych sekwencji populacji quasi-gatunków HCV wśród sekwencji pochodzących inicjalnie z RNA pobranego od pacjentów. Wybór dokonany na tym etapie miał zapewne wpływ na wyniki pracy, będąc opartym o pewne przyjęte kryteria i założenia, ale często jednak losowy, jak zresztą Autorka zaznaczyła.

Niemniej jednak udało się z sukcesem uzyskać chimeryczne heterodimery białek E1 i E2 na podstawie złożenia („*assembly PCR*”) sekwencji kodującej białko E1 ze szczepu referencyjnego HCV H77c oraz białka E2 pochodzącego z sekwencji kodujących wybranych na wcześniejszym etapie od pacjentów, w linii komórkowej HEK293. **Przeprowadzone testy potwierdziły, że heterodimery te formowały się prawidłowo, co jest dużym osiągnięciem pracy.**

Ciekawym problemem kolejnego etapu badań było też to, iż warianty glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów z grupy nie odpowiadającej na terapię (NR) charakteryzowały się niższą masą cząsteczkową w porównaniu do próbek z pozostałych grup pacjentów – trwała (SR) lub

przejęciowa (TR) odpowiedź. Autorka wyjaśnia tę sytuację prawdopodobnym zmienionym wzorem N-glikozylacji tych białek. Do zweryfikowania tego przypuszczenia użyto narzędzi wykorzystujących sztuczną inteligencję. Otrzymane wyniki potwierdziły występowanie zmian we wzorze N-glikozylacji w sekwencjach wyłącznie tych wariantów glikoproteiny E2, które pochodziły od pacjentów nieodpowiadających na terapię. Każda z sekwencji E2 pochodząca z grupy NR charakteryzowała się mutacjami powodującymi utratę przynajmniej jednego miejsca N-glikozylacji.

Badania funkcjonalne stopnia wiązania się różnych wariantów glikoproteiny E2 do lektyn pochodzących z *Galanthus nivalis* pokazały, że we wszystkich próbkach wywodzących się od pacjentów z grupy NR proces N-glikozylacji był niekompletny. Kolejne analizy dotyczące badania stopnia wiązania wariantów genetycznych glikoproteiny E2 do receptora komórkowego CD81 za pomocą testu ELISA wykazały, że zmiany we wzorze N-glikozylacji E2, występujące wyłącznie u pacjentów z grupy NR, mogą mieć wpływ na funkcjonowanie E2, zwłaszcza na jej wiązanie z tym receptorem. Autorka w pracy spekuluje, iż jedną z hipotez, która mogłaby stanowić wyjaśnienie tego zjawiska, jest występowanie zmian w konformacji białka E2 spowodowanych utratą miejsc N-glikozylacji.

Dlatego w tym miejscu chciałbym zapytać, czy Autorka nie rozważyła wykonania bioinformatycznego modelowania 3D tego miejsca wiążącego u różnych pacjentów? Takie modelowanie mogłoby przybliżyć i dodatkowo wzmocnić uzyskaną odpowiedź na postawione w pracy pytanie badawcze.

Dalsze badania dotyczyły potencjalnego wpływu zmian we wzorze glikozylacji E2 na lokalną konformację białka. Uzyskane wyniki wykazały, że próbki E2 pochodzące wyłącznie od pacjentów nieodpowiadających na terapię i posiadające mutacje we wzorze N-glikozylacji były zdecydowanie gorzej rozpoznawane przez wszystkie wykorzystane przeciwciała, co wskazuje na możliwą zmianę lokalnej konformacji glikoproteiny E2. Wynik ten jest bardzo interesujący, gdyż pozwala na konkluzję, iż *„wiriony HCV niosące warianty glikoproteiny E2 ze zmienionym wzorem glikozylacji obecne u pacjentów jeszcze przed rozpoczęciem terapii, mogą przetrwać leczenie jako tzw. mutanty ucieczkowe wirusa”*.

W kolejnych analizach uzyskano wyniki negatywne, niemniej istotne. Nie udało się wykazać istnienia jakiegokolwiek mechanizmu regulującego poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek przez warianty genetyczne glikoproteiny E2. Niejednoznaczne były też wyniki uzyskane poprzez wygenerowanie w komórkach HEK293 pseudocząstki HCV (HCVpp) niosące analizowane warianty białka E2, w celu zbadania wpływu mutacji we wzorze N-glikozylacji obecnych w testowanych wariantach glikoproteiny E2 na infekcyjność wirionów oraz zdolność wnikania cząstek wirusopodobnych do komórek gospodarza.

Natomiast ważne znaczenie dla ogólnego podsumowania wyników pracy miało badanie bioinformatyczne częstości pojawiania się wykrytych w pracy zmian we wzorze N-glikozylacji glikoproteiny E2 w zbiorze 100 losowo wybranych sekwencji E2 pochodzących od pacjentów zakażonych HCV genotypu 1a zdeponowanych w bazie danych euHCVdb. Dane te pokazały, że ten typ mutacji nie jest unikalny dla grupy badanej wykorzystywanej na potrzeby niniejszej pracy, zatem może to mieć szersze, bardziej uniwersalne znaczenie.

Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w postaci przejrzystych rysunków i tabel. Pewne uwagi i nieścisłości z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej:

- Str. 81, Tabela 6, legenda umieszczona pod tabelą zawiera wyjaśnienie dla skrótów (SR, TR), które nie są w niej użyte, zatem są w tym miejscu niepotrzebne: „NR – brak odpowiedzi na terapię, SR – trwała odpowiedź na terapię, TR – przejściowa odpowiedź na terapię, AA - aminokwas, N1-N9 miejsca N-glikozylacji 1-9.”
- Str. 87, Rys. 27B – szkoda, że na wykresie nie zastosowano kolorów dla słupków, tylko jest on monochromatyczny, byłby znacznie bardziej czytelny gdyby był w kolorze.

Po rozdziale z wynikami Doktorantka na niecałych 2 stronach przedstawia wypunktowane, zwięźle **Podsumowanie wyników**.

Przeprowadzona na 9 stronach **Dyskusja** jest dojrzała i wyczerpująca. Rozwija wiele aspektów, które były tylko sygnalizowane w rozdziale z wynikami. Badania Autorki wnoszą duży wkład do wirusologii, mogą mieć wpływ na rozwój szczepionek wirusowych i leków przeciwwirusowych. Pani mgr Zimmer w dyskusji zwraca wielokrotnie uwagę na potencjalne zmiany konformacji glikoproteiny E2 powodowane wykrytymi przez Nią zmianami we wzorze N-glikozylacji obecnymi w wariantach tego białka. Tym bardziej szkoda, iż nie zostały wykonane analizy modelowania homologicznego 3D konformacji tego białka, co byłoby ciekawym uzupełnieniem pracy.

Ważny aspekt dyskusji dotyczy również porównania schematów glikozylacji pomiędzy glikoproteinami osłonkowymi HCV a intensywnie badanym w ostatnich latach wirusem SARS-CoV-2, który spowodował pandemię COVID-19 w latach 2020-2023. Badania glikozylacji białek wirusowych stanowią zatem coraz bardziej rozwijaną część nowej dziedziny, która jest określana jako glikoproteomika wirusów.

W pracy brakuje jednak, poza podsumowaniem wyników, które jest umieszczone zaraz po rozdziale z wynikami, **wypunktowanych najważniejszych wniosków z niej płynących**. Jest to dość duży brak przedstawionej dysertacji, o którego uzupełnienie chciałbym prosić podczas prezentacji. Pewne ważne konkluzje zawarte są za to w streszczeniu pracy.

W rozdziale **Bibliografia** na 22 stronach Autorka wykazuje 188 pozycji literatury, przedstawiających bogatą literaturę przedmiotu, w większości z ostatnich kilkunastu. Dwie pozycje w spisie odnoszą się do stron internetowych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Ostatnie 2 strony pracy stanowią przedstawienie **dorobku naukowego** Doktorantki.

Dysertacja doktorska Pani mgr Karoliny Zimmer napisana jest prawidłowo, piękną polszczyzną i dobrze się ją czyta. Zawiera dopracowane rysunki i przejrzyste tabele. Nie zawiera zbyt wielu błędów, jednak pojawiły się w niej pewne kwestie językowe, które z obowiązku recenzenta chciałbym tutaj przedstawić.

1. Doktorantka w całej pracy przyjęła termin „konserwowany” / „konserwatywny” w odniesieniu do białka, rejonu lub motywu, który jest stosunkowo niezmienny ewolucyjnie i występuje w podobnej formie u różnych organizmów/gatunków/wirusów. Proponuję rozważyć użycie w zamian sformułowania „zachowawczy”, np.
 - str. 7 - wykaz skrótów – jest „CR – rejon konserwowany (ang. Conserved region)”, moja propozycja „rejon zachowawczy”,
 - str. 10 - streszczenie – jest „silnie konserwowane”, propozycja „silnie zachowawcze”,
 - str. 16 – jest „wysoco konserwowany”, propozycja „wysoco zachowawczy”,
 - str. 25 – jest „wysoco konserwatywnych miejsc”, może lepiej brzmiałoby „wysoco zachowawczych miejsc”?
2. Doktorantka używała w wielu miejscach pracy frazy „cząsteczki wirusowe”, czasem tylko wymiennie ze słowem „cząstki”, np.
 - str. 15 - jest "Cząsteczki wirusa", powinno być "Cząstki wirusa",
 - str. 18 - legenda do Rys. 4 - jest „Model lipowiro-cząstki”, natomiast na samym rysunku jest „cząsteczka lipowirusowa” - powinno być w obu przypadkach „cząstka”,
 - str. 47 – jest „zmodyfikowane cząstki cholesterolu LDL”, powinno być „zmodyfikowane cząsteczki cholesterolu LDL”,
 - str. 39 – jest „cząsteczki wirusopodobne”, powinno być „cząstki wirusopodobne”,
 - i tak w wielu miejscach pracy.

Nie jest to sformułowanie błędne, jednak w podręczniku „Wirusologia” pod red. A. Goździckiej-Józefiak, PWN, 2022, a także w wieloletniej pracy dydaktycznej, przyjęliśmy słowo „cząstka” jako zarezerwowane w polskiej terminologii do pełnych cząstek wirusowych, czyli wirionów. Termin ten powinien być zdaniem Recenzenta odróżniony od słowa „cząsteczka” oznaczającego molekułę związku chemicznego, substancji, białka itp. Zdaję sobie sprawę, że może nie być to powszechnie przyjęta terminologia, jednak jako Recenzent pracy rekomendowałbym na przyszłość takie użycie.

3. Jako „kalka” językowa z języka angielskiego lub pewien skrót myślowy od długiego już czasu w języku laboratoryjnym funkcjonuje błędne wyrażenie „ekspresja białek”, w którym oczywiście chodzi o „ekspresję genów kodujących białka” i w ten sposób powinno być używane, ewentualnie można mówić o „syntezie białek” lub „produkcji białek”. Generalnie w pracy ten termin używany był prawidłowo („produkcja białka”), niestety w kilku miejscach pracy Doktorantka nie ustrzegła się tego błędu, np.
 - str. 51 – jest „poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I”, powinno być „poziom syntezy/produkcji cząsteczek MHC klasy I”,
 - str. 52 - jest „pomiar poziomu ekspresji białka reporterowego lucyferazy”, powinno być „pomiar poziomu syntezy/produkcji białka reporterowego lucyferazy”

Doktorantka nie ustrzegła się niestety w pracy innych drobnych błędów – stylistycznych, literowych czy interpunkcyjnych. Wymienię niektóre z nich jako przykład, aby zwrócić uwagę na możliwe uniknięcie ich w przyszłości:

- str. 14 - jest „Jest małym, osłonkowym wirusem”, powinno być „Jest małym, osłonkowym wirusem”,
- str. 18 – jest „procesie wejściu wirusa do”, powinno być „procesie wejścia wirusa do”,
- str. 22 – jest „zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.”, powinno być „zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.” - *in vitro / in vivo* piszemy kursywą,
- str. 22 – jest „przetwarzaniu poliproteiny HCV przez jej w 4 miejscach”, niezrozumiałe, powinno być raczej „przetwarzaniu poliproteiny HCV poprzez jej cięcie w 4 miejscach”,
- str. 26 – jest „Udowodniono, że że konformacja” - powtórzenie „że”,
- str. 29 – jest „wirusowe RNA jest wciąż wykrywalne”, powinno być „wirusowy RNA jest wciąż wykrywalny”,
- str. 31 - jest „w ostrej fazie zakażenia”, powinno być „w ostrej fazie zakażenia”,
- str. 34 – jest „rutynowo badane pod kątem”, powinno być „rutynowo badać pod kątem”,
- str. 35 – jest „doprowadziło osiągnięcia trwałej odpowiedzi”, powinno być „doprowadziło do osiągnięcia trwałej odpowiedzi”,
- str. 40 – jest „Szczepionka zawierające rekombinowanego glikoproteiny”, powinno być „Szczepionka zawierająca rekombinowane glikoproteiny”,
- str. 43 – jest „wysiewano no na płytce.”, powinno być „wysiewano na płytce.”,
- str. 50 – jest „ze śnieżyczki przebiśniega (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)” - nazwa łacińska powinna być pisana kursywą,
- str. 60 – „Bufor płuczący stosowany w chromatografii”, powinno być „Bufor płuczący stosowany w chromatografii”,
- str. 82 – jest „nałożono lizaty komórek”, powinno być „nałożono lizaty komórek”,
- str. 103 - jest „u kolejnych u 20 pacjentów”, powinno być „u kolejnych 20 pacjentów”.

Przedstawione powyżej krytyczne uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową pozytywną i wysoką ocenę pracy. Przedstawiona praca doktorska świadczy o tym, że Pani mgr Karolina Zimmer bardzo sprawnie porusza się w wykorzystaniu szerokiej gamy technik laboratoryjnych, a także posiada ogromną wiedzę i umiejętność samodzielnego planowania i krytycznej analizy wyników badań.

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr Karoliny Zimmer jest bardzo ciekawa, przedstawia wiele interesujących nowych danych i aspektów, wnosząc duży wkład w rozwój wirusologii, szczepionek wirusowych i leków przeciwwirusowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje konstrukcja chimericznych heterodimerów glikoprotein E1E2 i ich produkcja w komórkach ssaczy, co jest dużym sukcesem. Głównym osiągnięciem pracy jest wykryta korelacja między nieprawidłową glikozylacją białka E2 HCV, a brakiem odpowiedzi na terapię skojarzoną interferonem i rybawiryną u leczonych pacjentów od których pobierane były próby. Niestety, jak sama Autorka wskazuje, liczba analizowanych próbek była zbyt mała, aby stwierdzić, że brak glikanów jest bezpośrednio związany z obserwacjami klinicznymi. W związku z tym konieczne są dalsze badania glikozylacji białek wirusowych w izolatach od pacjentów leczonych przeciw HCV. Pozwoli to na potwierdzenie, że wykryte zmiany w glikozylacji białek wirusowych przyczyniają się prawdopodobnie do mniejszej zdolności układu immunologicznego do wykrywania powstałych w ten sposób „wariantów ucieczkowych” wirusa. Wiedza ta może natomiast przyczynić się do opracowania skutecznej szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C.



Oświadczam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Karoliny Zimmer spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Karoliny Zimmer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Robert Nawrot

Poznań, 2.11.2024 r.