



**Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot**  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Biologii, Pracownia Wirusologii Molekularnej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań  
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl  
tel. (61) 829-59-31

Poznań, dn. 12.06.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Aleksandra Strugały**

pt. „Projektowanie i wytwarzanie cząstek wirusopodobnych  
jako nośników nanomateriałów”

dla Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN

Praca doktorska Pana mgr. inż. Aleksandra Strugały pt. „Projektowanie i wytwarzanie cząstek wirusopodobnych jako nośników nanomateriałów” została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Figlerowicza. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr hab. Anna Urbanowicz.

Praca przedstawia spójne i wszechstronne spojrzenie na badania z użyciem cząstek wirusopodobnych (VLP, ang. *virus-like particles*) przy wykorzystaniu wirusa mozaiki stokłosa (BMV – ang. *brome mosaic virus*), zaczynając od przygotowania protokołu izolacji i oczyszczania VLP wirusa BMV z zainfekowanych wirusem roślin, po dokładne zbadanie struktury VLP, a następnie wyprodukowanie rekombinowanych białek rCP budujących cząstki eVLP. Dodatkowo Autor przetestował wpływ mutacji wprowadzanych do sekwencji kodujących wirusowe białko CP na konformację zmutowanych cząstek wirusopodobnych eMVLP, a także zawierających wewnątrz kapsydu tRNA lub siarczan polistyrenu PSS. Praca doktorska mgr. inż. Aleksandra Strugały została przygotowana w postaci zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech artykułów naukowych, które Doktorant streścił i podsumował w 31-stronicowym Autoreferacie, stanowiącym omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy.

Autoreferat ma typowy układ, składając się z rozdziałów zatytułowanych: Wprowadzenie, Cel pracy, Krótkie omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład pracy, Podsumowanie, Bibliografia, Wykaz używanych skrótów. Po stronie tytułowej, podziękowaniach i spisie treści, Autor umieścił dodatkowo streszczenie pracy w wersji polskiej i angielskiej oraz wykazy artykułów Jego autorstwa wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także tych, które w tym składzie się nie znalazły. Tytuły tych artykułów wykazane są w osobnym rozdziale „Załączniki”, po którym Autor umieścił kopie oświadczeń Kandydata i współautorów o wkładzie w publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Ostatnią część pracy stanowią reprinty artykułów stanowiących rozprawę doktorską wraz z materiałami uzupełniającymi, jeśli takie były przygotowane do publikacji.



Całość pracy liczy 79 stron, w tym 37 stron Autoreferatu, 7 stron oświadczeń i 35 stron reprintów trzech artykułów naukowych. Autoreferat zawiera 82 pozycje piśmiennictwa oraz 3 ryciny.

Autoreferat rozpoczyna 10-stronicowe **wprowadzenie**, w którym Autor wyjaśnia różnice pomiędzy nanocząstkami wirusowymi (VNP) a cząstkami wirusopodobnymi (VLP), po czym opisuje ich rolę w biotechnologii i medycynie (szczepionki, terapie przeciwnowotworowe, diagnostyka i wiele innych, np. nanoreaktory, techniki agrarne, energetyka - nanokable). Autor zwraca uwagę na ogromny potencjał aplikacyjny VLP, także tych pochodzących z wirusów roślinnych. Następnie opisuje budowę i replikację wirusa mozaiki stokłosa (BMV). Autor skupia się na budowie kapsydu wirusowego oraz strukturze wirusowego białka CP, będącego białkiem strukturalnym kapsydu. W dalszej kolejności opisuje modele przedstawiające przypuszczalne mechanizmy składania kapsydu wirusowego BMV w porównaniu do CCMV. Wprowadzenie kończy opis możliwego mechanizmu regulacji poszerzania pomiędzy białkami CP kapsydu, co pozwala na wnikanie pożądaných cząsteczek do jego wnętrza. Wyróżnikiem tej części pracy są dwie przejrzyste ryciny przygotowane przez Autora przedstawiające genom i strukturę wirusa mozaiki stokłosa (BMV) (rys. 1) oraz strukturę białka kapsydu CP wirusa BMV (rys. 2). Niedługie, ale bardzo skondensowane i konkretne w swojej treści wprowadzenie, stanowi bardzo dobre kompendium wiedzy o VLP. Autor na nieco ponad 10 stronach zacytował kilkadziesiąt pozycji publikacyjnych z światowej literatury przedmiotu, głównie z kilkunastu ostatnich lat.

Kolejny rozdział Autoreferatu to określenie **celu pracy**. Autor jako cel wskazał „opracowanie wydajnych metod pozyskiwania białek kapsydu BMV oraz konstruowania na ich bazie cząstek wirusopodobnych mogących pełnić funkcje nośników nanocząstek”. Następnie określił 4 cele cząstkowe, których realizacja została opisana w 3 publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Cel pracy został podany w sposób bardzo konkretny i jasny, a także niezwykle ciekawy. Autor nie poprzestał na opracowaniu metody produkcji rekombinowanego białka kapsydu BMV, ale także modyfikował rekombinowane białka kapsydu aby otrzymać VLP o nowych właściwościach.

Kolejny rozdział przedstawiony na 11 stronach zatytułowany „**Krótkie omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**” stanowi tytułowe omówienie i wyjaśnienie znaczenia wyników zaprezentowanych w wybranych publikacjach wchodzących w skład rozprawy.

W pierwszej pracy zatytułowanej „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*” autorstwa: Aleksander Strugała, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka, Anna Urbanowicz, Kamil Szpotkowski, Paulina Bierwagen, Marek Figlerowicz, Maciej Kozak, Christoph Böttcher, Michał Giersig, opublikowanej w czasopiśmie „*Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*” w roku 2017, vol. 1068-1069, strony 157-163, Doktorant wraz ze współautorami zaprezentowali nową metodę oczyszczania wirionów BMV po ich izolacji standardową metodą ekstrakcji fenol-chloroform i wytrąceniu z użyciem PEG. Nowe podejście polega na dwuetapowym oczyszczaniu izolatu z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej ze złożem dietyloaminoetylocelulozowym (DEAE-C) oraz sączenia molekularnego (SEC). Zastosowanie takiego oczyszczania izolatu pozwala na ominięcie czasochłonnego etapu ultrawierowania i uzyskanie cząstek wirusopodobnych o bardzo wysokiej czystości. W pracy wysoką czystość uzyskanego preparatu potwierdzono przy użyciu metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz mikroskopu elektronowego Cryo-TEM. Pozostałe analizy biofizyczne pozwoliły uzyskać





enne dane dotyczące wpływu pH na roztworu na średnicę kapsydu BMV, co potwierdziło wcześniejsze wyniki dla innych wirusów roślinnych, jak TSV czy TBSV. Opracowanie nowej metody oczyszczania cząstek pseudowirusowych, skalowalnej względem ilości materiału wyjściowego, dającej porównywalne efekty jak ultrawierowanie, oceniam jako jedno z ważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej.

Praca ta, jak i pozostałe dwie, została już zrecenzowana i opublikowana, zatem z obowiązku recenzenta przedstawię najbardziej podstawowe dane jej dotyczące. Praca opublikowana jest w języku angielskim. Zawiera 7 ponumerowanych stron, z czego dwie ostatnie zawierają spis literatury składający się z 66 pozycji. Ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Materiały i metody (*Materials and methods*), Wyniki i dyskusja (*Results and discussion*), Konkluzja (*Conclusion*), Podziękowania (*Acknowledgments*). Praca zawiera 4 ryciny, z czego wyróżnia się zdjęcie cząstek BMV z mikroskopu Cryo-TEM (Fig. 1) oraz 3 wykresy (Fig. 2-4), a także 3 tabele. Do pracy dołączony jest suplement w postaci 4-stronicowego opracowania zawierającego 3 wykresy i listę dodatkowych referencji, które uzupełniają dane zawarte w publikacji.

Aktualny współczynnik wpływu, czyli *impact factor* (wg Journal Citation Reports) „*Journal of Chromatography B*” wynosi 3.205, MNiSW 70 pkt., a kwartyl Q2, jest więc to jedno z lepszych czasopism biochemiczno-analitycznych w swojej klasie. Wkład Doktoranta w całość pracy jest znaczny, gdyż jest On pierwszym Autorem pracy. Dodatkowo jest on wsparty trzema oświadczeniami załączonymi do pracy. Pierwsze z nich podpisane jest przez Doktoranta, gdzie oświadcza, iż Jego wkład w powstanie pracy polegał na prowadzeniu uprawy roślin w celu propagacji wirusa BMV, izolacji i oczyszczaniu wirusa BMV z wykorzystaniem metod chromatograficznych, wstępnej analizie jakościowej i ilościowej otrzymanego preparatu wirusowego oraz współdziałanie przy pisaniu manuskryptu. Takie samo w treści oświadczenie o wkładzie Doktoranta w całość pracy wystosowane zostało przez autorów korespondencyjnych pracy Panią dr hab. Annę Urbanowicz, czyli promotora pomocniczą pracy oraz prof. UAM dr hab. Jakuba Rybkę.

Kolejną omówioną w Autoreferacie pracą jest publikacja pt. „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*” autorstwa: Adam A. Mieloch, Monika Kręcisz, Jakub D. Rybka, Aleksander Strugała, Michał Krupiński, Anna Urbanowicz, Maciej Kozak, Bohdan Skalski, Marek Figlerowicz, Michael Giersig, opublikowanej w czasopiśmie „*AIP Advances*” w roku 2018, vol. 8, numer 035005. W pracy został przedstawiony efektywny sposób pakowania wybranych nanocząstek do kapsydów BMV. Wybranymi przez Autorów do pakowania cząstkami były nanocząstki tlenku żelaza wykazujące właściwości superparamagnetyku (SPION, ang. *superparamagnetic nanoparticles*). Właściwości tej cząstki predestynują ją do wykorzystania w medycynie i biologii, np. jako nośnika leków lub w celowanym obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego. Szereg doświadczeń wykonanych przez autorów pracy pozwolił na funkcjonalizację nanocząstek tlenku żelaza przy pomocy związków: disteraoilu-sn-glicero-3-fosfoetanolamino-N-[karboksy(PEG)2000] (COOH-PEG-PL) i foforanu diheksadecylu (DHP). Umożliwiło to ich enkapsydację wewnątrz cząstek wirusopodobnych VLP zbudowanych z białka kapsydu CP wirusa BMV. Prawidłowe kapsydy z nanocząstkami analizowano za pomocą technik DLS oraz CryoTEM, co pozwoliło na wychwycenie pewnych różnic pomiędzy kapsydami z nanocząstkami funkcjonalizowanymi za pomocą jednego bądź drugiego związku. Najważniejszym



osiągnięciem pracy jest wykazanie możliwości uzyskania stabilnych VLP zawierających nanocząstki o właściwościach superparamagnetycznych.

Praca została opublikowana w języku angielskim. Zawiera 9 ponumerowanych stron, z czego ostatnia zawiera spis literatury składający się z 29 pozycji. Ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Wyniki i dyskusja (*Results and discussion*), Konkluzje (*Conclusions*), Materiały i metody (*Materials and methods*), Podziękowania (*Acknowledgments*). Praca zawiera 7 rycin, z czego 2 to zdjęcia cząstek BMV z mikroskopu TEM. Aktualny *impact factor* „*AIP Advances*” wynosi 1.548, MNiSW 70 pkt., a kwartył Q4, jest więc to średnie czasopismo z nauk inżynierskich i pokrewnych. Wkład Doktoranta do pracy „ilościowo” wydaje się stosunkowo niewielki, jest On czwartym w kolejności Autorem pracy, aczkolwiek Jego wkład do pracy był bardzo ważny, wręcz kluczowy, gdyż polegał na namnożeniu, izolacji i oczyszczeniu wirusa BMV, który posłużył do innych analiz wykonanych przez pozostałych autorów pracy. Doktorant napisał też fragment metodyki opisującej proces izolacji i oczyszczania wirusa BMV. Wkład ten jest wsparty przez załączone pisemne oświadczenie Doktoranta oraz autora korespondencyjnego Pana prof. UAM dr hab. Jakuba Rybkę.

Trzecią pracą stanowiącą rozprawę doktorską jest publikacja pt. „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*” autorstwa Aleksander Strugała, Jakub Jagielski, Karol Kamel, Grzegorz Nowaczyk, Marcin Radom, Marek Figlerowicz, Anna Urbanowicz, opublikowanej w czasopiśmie „*International Journal of Molecular Sciences*” w roku 2021, vol. 22(6), numer 3098. Dotychczasowa metoda izolacji i oczyszczania cząstek BMV z hodowanych roślin jęczmienia związana jest z ich czasochłonną i pracochłonną hodowlą. Dodatkowo celem autorów była manipulacja sekwencją powstającego białka kapsydu wirusowego CP. Dlatego postanowiono wyprodukować rekombinowane białko CP (rCP) w systemie prokariotycznym. W tym celu wykorzystano szczep *E.coli* Rosetta2 DE3 pLysS, który umożliwia bardzo wydajną produkcję rekombinowanego białka. Do ekspresji genu rCP posłużył konstrukt na bazie wektora pMCSG48, zawierający sekwencję kodującą białko fuzyjne NusA oraz tzw. His-tag. Schemat konstrukt rCP przedstawiony jest na Rys. 3, str. 23 Autoreferatu rozprawy doktorskiej, natomiast w omawianej publikacji podany jest jedynie krótki, ale skondensowany informacyjnie opis metodyczny, co jeśli chodzi o publikacje naukowe jest w zupełności wystarczające. Gotowe VLP były oczyszczane za pomocą chromatografii powinowactwa, także po odcięciu fragmentu fuzyjnego NusA przez proteazę TEV. Po wyprodukowaniu rCP w systemie prokariotycznym Autor wykonywał eksperymenty składania VLP w różnych układach: pustych, wraz z tRNA w zastępstwie genomowej cząsteczki RNA wirusa BMV, wraz z polimerem PSS o ujemnym ładunku, w celu zapoznania z wpływem pakowanej cząsteczki na strukturę i mechanizm składania kapsydu wirusowego. Ponadto Autor wykonywał doświadczenia mające na celu wprowadzenie zmian do sekwencji kodującej białko CP, aby uzyskać VLP o nowych właściwościach. Wprowadzone mutacje (zamiana 2 aminokwasów z hydrofobowych reszt L123 i F183 na hydrofilowe D123 i T183) osłabiały oddziaływanie białek w strukturze wirusowej cząstki VLP, zatem otrzymane informacje stanowią znaczne poszerzenie wiedzy na temat oddziaływań i dynamiki powstawania VLP, a także informacji na temat tego od czego zależą zmiany konformacji białek CP i wzajemnych oddziaływań w kapsydzie oraz z RNA i innymi cząsteczkami.





Podobnie jak poprzednie, praca opublikowana jest w języku angielskim. Składa się z 15 ponumerowanych stron, z czego dwie ostatnie zawierają spis literatury składający się z 33 pozycji. Praca ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Wyniki (*Results*), Dyskusja (*Discussion*), Materiały i metody (*Materials and methods*). Praca zawiera 10 rycin, które zawierają też w sobie odpowiednie wykresy.

Aktualny współczynnik wpływu, czyli *impact factor* (wg Journal Citation Reports) dla “*International Journal of Molecular Sciences*” wynosi 5.923, MNiSW 140 pkt., a kwartyl Q1, jest więc to bardzo dobre czasopismo z zakresu nauk biologicznych i pokrewnych w aspekcie molekularnym. Doktorant jest pierwszym Autorem pracy, zatem jego wkład w pracę jest znaczący. Świadczy też o tym opis wkładu Autora przedstawiony w dwóch załączonych oświadczeniach podpisanych przez Niego oraz autora korespondencyjnego pracy Panią dr hab. Annę Urbanowicz. Wkład ten polegał na przygotowaniu konstruktów kodujących zrekombinowane białko kapsydu BMV, jego produkcji i oczyszczaniu, projektowaniu mutacji w sekwencji go kodującej, przeprowadzeniu składania pustych cząstek wirusopodobnych (VLP) oraz VLP z cząstkami polianionów, przeprowadzeniu pomiaru DLS VLP oraz przygotowaniu wykresów obrazujących te wyniki, przygotowaniu wstępu literaturowego, wyników oraz dyskusji.

Autoreferat kończy jednostronicowe **Podsumowanie**, w którym Autor streszcza i podkreśla najważniejsze wyniki swojej pracy. Jest ona bardzo wszechstronna, wykorzystująca wiele technik, zaczynając na hodowli roślin, zakażaniu ich wirusem, izolacji cząstek pseudowirusowych, następnie produkcji tychże cząstek w układzie heterologicznym, wprowadzaniu mutacji do sekwencji kodującej białko je budujące, sprawdzanie ich zachowania w różnych warunkach, po wymagające analizy mikroskopowe, spektrometryczne czy bioinformatyczne. Nie wszystkie analizy Doktorant wykonywał osobiście, jednak pokazał umiejętność współpracy z gronem specjalistów krajowych i zagranicznych.

Jeśli miałbym mieć jakieś drobne uwagi do tej części pracy, to zwraca uwagę brak klasycznej dyskusji w Autoreferacie, jednakże jest on tylko omówieniem wyników przedstawionych w trzech publikacjach stanowiących rozprawę, które taką wnikliwą dyskusję zawierają.

W rozdziale **Bibliografia** na 5 stronach przedstawione są 82 przypisy, przedstawiające bogatą literaturę przedmiotu na temat VLP i ich potencjalnego wykorzystania w różnych dziedzinach gospodarki. Ich zebranie w jednym miejscu wydaje się również idealne do przygotowania w przyszłości świetnej pracy przeglądowej.

Ostatni rozdział Autoreferatu stanowi **Wykaz używanych skrótów**, przedstawiający na 3 stronach wyjaśnienia do najpewniej wszystkich skrótów używanych w pracy. Mam tutaj uwagę, która dotyczy nie samego wykazu, lecz wprowadzania skrótów w tekście autoreferatu. Otóż skróty pojawiające się po raz pierwszy w pracy pomimo ich dokładnego wyjaśnienia w omawianym wykazie, powinny być także wyjaśnione po pierwszym ich użyciu w tekście (pełna nazwa angielska pisana kursywą). Niestety w pracy nie zawsze tak jest.

Dodatkowo na stronach 25-26 pojawia się wiele nowych skrótów opisujących cząstki pseudowirusowe w różnych układach. Z punktu widzenia czytelnika bardzo przydatna mogłaby być tabela zbierająca wszystkie wprowadzone skróty: VLP, eVLP, tVLP, eMVLP, tMVLP i ich powiązanie z RNA, a także PVLP i mPVLP – powiązanie z enkapsydowanym PSS. Takie wyjaśnienie



byłoby bardzo pomocne, chociaż czytelnik jest w stanie wydedukować te informacje z tekstu opracowania. Jej brak nie umniejsza jednak wartości pracy.

Przechodząc z obowiązku recenzenta do innych uwag i pytań, chciałbym:

- zwrócić uwagę na zdanie ze str. 25 „Wprowadzone zmiany w założeniu miały być na tyle nieznaczne, żeby nie umożliwiły składania kapsydu, a z drugiej strony, by efekt ich wprowadzenia był stosunkowo łatwo zauważalny” – będę wdzięczny za wyjaśnienie co dokładnie miało być „łatwo zauważalne”,
- zapytać, czy Autorzy nie myśleli jednak o wprowadzeniu takich zmian aminokwasowych, które czyniłyby cząstkę VLP stabilniejszą niż natywna VLP? Jakie to mogłyby być zmiany?
- zapytać, z czego wynikał klucz wyboru publikacji w których Doktorant jest współautorem, jako wchodzących w skład pracy doktorskiej?

Doktorant nie ustrzegł się niestety w pracy innych drobnych błędów - stylistycznych i interpunkcyjnych. Nie będę podawał tutaj ich wszystkich, posłużę się przykładami, aby zwrócić uwagę na możliwe uniknięcie tego typu błędów w przyszłości:

- str. 13 – jest: „budowa ikozaedryczna”, powinno być: „budowa ikozaedralna”,
- str. 8 – jest: „...do lizy tych komórek, i uwolnienia...”, powinno być: „...do lizy tych komórek i uwolnienia...”,
- str. 9 – jest: „raka wątrobokomórkowego”, powinno być „raka wątrobowokomórkowego”; jest: „...wirusa wirusa chlorotycznej plamistości...”, powinno być: „...wirusa chlorotycznej plamistości...”,
- str. 22 – jest: „ekariontów”, powinno być: „eukariontów”,
- str. 22 – jest: „ekspresji białek prokariotycznych”, powinno być: „produkcji białek prokariotycznych”,
- str. 25 – jest: „cząsteczki VLP”, powinno być, jak w całym opracowaniu: „cząstki VLP”.

Przedstawione powyżej krytyczne uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę pracy. Przedstawiona praca doktorska świadczy o tym, że Pan mgr inż. Aleksander Strugała sprawnie porusza się w wykorzystaniu szerokiej gamy technik biologii molekularnej, mikroskopowych, chromatograficznych czy analiz bioinformatycznych, a także posiada wiedzę i umiejętność samodzielnego planowania i krytycznej analizy wyników badań, co jest świetnym prognozą dla dalszej pracy naukowej. Podsumowując, głównym osiągnięciem Pana mgr. inż. Aleksandra Strugały jest przedstawienie nowej alternatywnej metody oczyszczania VLP po izolacji, a także wykazanie, że wyprodukowane metodami biotechnologicznymi białka kapsydu CP tworzą VLP, wraz z ich charakterystyką, co otwiera nowe perspektywy w badaniach tych cząstek. Wyniki te mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale w przyszłości mogą mieć także znaczenie praktyczne w potencjalnym wykorzystaniu VLP jako nośników nanocząstek w biologii i medycynie.



Oświadczam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. inż. Aleksandra Strugały spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668; tekst jednolity Dz.U. z 2022 r. poz. 574) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. inż. Aleksandra Strugały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na dużą wartość poznawczą przedstawionych wyników i możliwość ich praktycznego wykorzystania uważam, iż praca ta zasługuje na wyróżnienie.