



RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Aleksandra Strugały
pt. " Projektowanie i wytwarzanie cząstek wirusopodobnych jako
nośników nanomateriałów"

Ocena formalna:

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra inżyniera Aleksandra Strugały, wykonana została pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Marka Figlerowicza oraz Pani dr hab. Anny Urbanowicz, w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytut Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Recenzowana praca dotyczy kompleksowej charakterystyki kapsydu wirusa mozaiki stokłosa (BMV, ang. brome mosaic virus) w kierunku otrzymywania wirusopodobnych (VLP) makromolekuł oraz ich dalszego stosowania jako nośników nanocząsteczek. Ta wieloetapowa charakterystyka zakładała:

1. opracowanie i optymalizację nowej metody otrzymywania natywnych cząsteczek BMV;
2. użycie oczyszczonych cząsteczek wirusowych (wirionów) do enkapsydacji nanocząstek tlenku żelaza;
3. opracowanie metodyki otrzymywania VLP utworzonych z rekombinowanego białka płaszcza (CP) wirusa BMV wyprodukowanego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym oraz biofizyczna charakterystyka CP.

Rozprawę stanowi kompilacja trzech, spójnych tematycznie artykułów, których doktorant jest współautorem, opublikowanych w latach 2017-2021 w międzynarodowych czasopismach naukowych. Wszystkie z tych prac są publikacjami oryginalnymi, w dwu z nich doktorant jest autorem wiodącym.

W skład rozprawy, poza wspomnianymi wcześniej publikacjami, wchodzi omówienie wyników. Składa się one z: wprowadzenia, celu rozprawy, analizy uzyskanych wyników oraz i ich dyskusji, podsumowania, bibliografii oraz wykazu używanych skrótów. Do dysertacji dołączono także streszczenia w języku polskim i angielskim.

Rozprawie towarzyszy zestaw oświadczeń:

1. doktoranta; określającego jego samodzielny wkład w powstanie danej publikacji;

2. autorów tzw. korespondujących oceniających zaangażowanie doktoranta w pracach towarzyszących powstaniu poszczególnych publikacji.

Z oświadczeń tych można wnioskować, że mgr inż. A. Strugała odgrywał ważną rolę w przeprowadzeniu części eksperymentalnej opisanych badań, a także brał udział w przygotowaniu manuskryptów publikacji co skutkowało tym, że doktorant jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach oraz jednym ze współautorów w trzeciej. W świetle przedstawionych danych, dobór tych prac, tak aby tworzyły rozprawę doktorską nie budzi moich wątpliwości.

Prace stanowiące rozprawę, przed opublikowaniem w periodykach naukowych, podlegały wnikliwej recenzji (peer-review) angażującej specjalistów i edytorów naukowych i uzyskały ich pozytywne opinie. Nie widzę zatem konieczności omawiania strony edytorskiej tych prac w dalszej części mojej oceny.

Ocena merytoryczna:

Tworzenie nowych narzędzi ułatwiających precyzyjne dostarczanie „cargo” do wybranego przedziału komórki eukariotycznej jest niezwykle interesującą dziedziną w biotechnologii. Nanocząstki bazujące na białkowych otoczkach (kapsydach) wirusów roślinnych potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie zarówno w medycynie, jak i w biotechnologii. Z tego też względu, poznanie mechanizmów regulujących tworzenie nanocząstek pochodzenia wirusowego VLPs (ang. virus-like particles) jest bez wątpienia zagadnieniem mającym wysoki priorytet w badaniach biologii molekularnej na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Jest to również powodem, dla którego bardzo wysoko oceniam rangę i znaczenie badań podjętych kilka lat temu przez Prof. Marka Figlerowicza i Jego współpracowników. Ich celem było uzupełnienie wiedzy dotyczącej możliwości zastosowania kapsydów wirusa BMV jako nośników nanocząstek użytecznych w biotechnologii. Oceniana rozprawa dotyczy właśnie tej tematyki. Zastosowane przez doktoranta podejścia doświadczalne są nowatorskie, a co najważniejsze atrakcyjne z punktu widzenia wiedzy podstawowej.

Pierwsza z prac, tworzących dysertację, (Stugała A. i in., [2017] „Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method.” J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci; 1068-1069: str. 157-163) opisuje zastosowanie alternatywnej do znanej z literatury metody otrzymywania preparatu natywnego BMV. Opracowana metoda opiera się na technikach chromatografii cieczowej i pozwala całkowicie pominąć proces ultrawierowania, wcześniej standardowo stosowany w tego typu preparatykach. Należy tu podkreślić nowatorski charakter tej pracy, nie tylko w skali Polski. W kolejnych etapach dokonano oceny jakości cząstek wirusowych uzyskanych nową metodą, w tym: czystość frakcji, pomiary wielkości

wirionów oraz analizę struktury II-rzędowej białek kapsydowych. Uzyskane tą drogą informacje potwierdziły wysoką jakość otrzymanych preparatów i stanowiły podstawę do dalszych prac zmierzających do wykorzystania kapsydów BMV jako nośników nanocząstek.

Tu chciałbym zapytać Doktoranta, co stało u podstawy wyboru techniki cryo-EM w miejsce klasycznej analizy TEM z wykorzystaniem preparatów utrwalanych w żywicach epoksydowych?

W drugiej z prac składających się na rozprawę (Mieloch A. A i in., [2018] „The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core.” AIP Advances 8, 035005) badano możliwości używania wirionów BMV do enkapsydacji nanocząstek tlenku żelaza. Nanocząstki Fe_2O_3 traktowane były poli(tlenkiem etylenu) oraz diheksadecylofosforanem (DHP) w celu wprowadzenia na ich powierzchnię ujemnego ładunku jako czynnika ułatwiającego ich upakowanie wewnątrz kapsydów. W toku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że czynnikiem warunkującym prawidłowe formowanie VLP jest poli(tlenek etylenu) [distearoilu-sn-glicero-3-fosfoetanolamino-N-[karboksy(PEG)2000] w skrócie (COOH-PEG-PL). Związek ten nie tylko wprowadza ujemny ładunek na powierzchnię, ale także zapewnia odpowiednią dyspersję cząstek, dzięki której nie dochodzi do ich agregacji.

W ostatniej z publikacji (Strugała A. i in., [2021] „Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System.” Int. J. Mol. Sci. Mar 18;22(6):3098), przedstawiono wyniki badań, w których używano VLP otrzymanych z rekombinowanego białka płaszcza (rCP), wyprodukowanego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Ponadto, analizowano wpływ mutacji punktowych w obrębie CP na wydajność składania VLP. Wykazano katalityczną funkcję egzogennie dodanego tRNA oraz siarczanu polistyrenu (PSS) w procesie tworzenia kapsydów BMV *in vitro*. Wyznaczono stosunek molowy CP:tRNA dla zoptymalizowania procesu składania podjednostek CP w funkcjonalne i trwałe VLP. Wnioskiem końcowym wynikającym z przeprowadzonych doświadczeń, jest stwierdzenie że, rCP jest dobrym substratem dla efektywnego uzyskiwania VLPs.

W tym miejscu pozwolę sobie na uwagę, która tylko w niewielkim stopniu dotyczy Doktoranta. W mojej subiektywnej ocenie szkoda, że tak wartościowe wyniki autorzy zdecydowali się publikować w periodyku naukowym spod znaku MDPI. Int. J. Mol. Sci. w krajach, gdzie system funkcjonowania nauki jest znacznie bardziej zaawansowany, pismo to nie cieszy się wysokim prestiżem i popularnością. Co jest w wyraźnej opozycji do sytuacji w Polsce, w tym w mojej rodzimej instytucji (IBB PAN)!

Analizując dysertację Pana mgr. inż. A. Strugały, nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości, na które nie znalazłem odpowiedzi. W związku tym proszę o ustosunkowanie się do nich i omówienie podczas publicznej obrony:

1. Czym VLP uzyskane z wykorzystaniem wirusa BMV są „lepsze” od tych uzyskiwanych z wykorzystaniem kapsydów innych wirusów?
2. W jaki sposób skalkulowano efektywność produkcji CP w systemie bakteryjnym?
Ile μg oczyszczonego białka CP uzyskiwano z litra hodowli bakteryjnej?
3. Dlaczego nie usiłowano produkować rekombinowanego białka CP poprzez Agroinfiltrację roślin *Nicotiana benthamiana*? System ten w wielu przypadkach jest bardziej wydajny niż system bakteryjny. Ponadto, białko takie byłoby modyfikowane w sposób charakterystyczny dla komórek roślinnych, a więc w sposób naturalny dla wirusa BMV.
4. Na koniec, chciałbym dowiedzieć się o to, do jak jakich komórek/tkanek i jakie nanocząstki wprowadziłby Doktorant, z wykorzystaniem VLP utworzonych na bazie BMV, by uzyskać efekt terapeutyczny czy biotechnologiczny?

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy, wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat wykorzystywania wirusopodobnych makromolekuł do przenoszenia nanocząsteczek do komórek eukariotycznych, co stanowi wyzwanie dla biotechnologii nie tylko w Polsce, lecz także w skali globalnej.

Uważam, że oceniana praca spełnia wymogi zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), stawiane rozprawom doktorskim a w wielu elementach znacznie je przekracza.

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej, PAN o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. inż. Aleksandra Strugałę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Hennig
Warszawa, 28.V.2022 r.