

KATEDRA I KLINIKA CHORÓB ZAKAŻNYCH, CHORÓB WĄTROBY
I NABYTYCH NIEDOBORÓW ODPORNOŚCIOWYCH

Akademii Medycznej we Wrocławiu

ul. Koszarowa 5, 51-149 Wrocław

emerytowany Kierownik: prof. zw. dr hab. **Andrzej Gładysz**

tel. sekr. 71 395-75-49; tel/fax sekr. (071) 325 52 42

e-mail: andrzej.gladysz@am.wroc.pl

Wrocław, dnia 15 maja 2012 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Rafała Kamińskiego pt. Analiza oddziaływań pomiędzy wirusowym białkiem Rev, cząsteczkami wirusowego RRE RNA i komórkowym czynnikiem Pur α (tytuł w oryginale: The analysis of the interactions between HIV-1 protein Rev, viral RRE RNA and a host cell factor Pur α), zlecona mi uchwałą Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Praca, przysłana mi do oceny, stanowi oprawiony maszynopis obejmujący 71 stron. Napisana została w języku angielskim. Posiada typowy układ, a więc: wprowadzenie, w którym zamieszczone zostały informacje nt. struktury biologicznej HIV-1 i został przedstawiony cykl rozwojowy tegoż wirusa z podkreśleniem elementów stanowiących cel badawczy wykonawcy, tj. mgr Rafała Kamińskiego, który skupił swą uwagę na relacjach między wirusowym białkiem Rev i sekwencją RRE ostatniego intronu wirusowego m RNA a komórkowym białkiem Pur α , mając nadzieję na wykorzystanie uzyskanych wyników do skonstruowania kolejnego „ogniwa”, być może bardziej skutecznego w strategii kompleksowej terapii anty-HIV, które działałyby na kolejnym ważnym etapie cyklu życiowego wirusa, tj. w wieloetapowym procesie transkrypcji. Wiadomo bowiem, że wirus stara się wykorzystać dla swych celów zarówno jądrowe, jak np. czynnik transkrypcyjny NF κ B, a także błonowe białka komórkowe, jak również potranskrypcyjne mechanizmy regulacji genów realizując własny proces replikacji. W tym celu „podsycza” też nieustannie aktywację immunologiczną w zakażonym organizmie. Po bardzo przejrzystym, rzeczowym wprowadzeniu, Doktorant przedstawia cele pracy, materiał i opisuje metody zastosowane w realizacji projektu.

Wyniki podsumowuje we wnioskach, poczym dyskutuje uzyskane przez siebie rezultaty, zachęcając do rozwijania i pogłębiania badań z obszaru Jego doświadczenia, które nie wykluczone, stworzyłyby metodę, a może lek, które umożliwiłyby blokowanie transkrypcyjnych procesów ekspresji HIV-1. Autor słusznie uważa, że zahamowanie, czy choćby ograniczenie funkcji białka Pur α ,

uczyniłoby obecną terapię bardziej skuteczną, a także alternatywną w sytuacji powstania oporności HIV na dotychczasowe leki przeciwwirusowe.

Praca jest racjonalnie ilustrowana rycinami i tabelami, co czyni ją bardzo przejrzystą i czytelną. Umożliwia weryfikację toru myślenia w przeprowadzonych badaniach. Praca jest metodycznie skonstruowana wzorcowo. Piśmiennictwo zostało dobrane tematycznie i w sposób celowy, bez zbędnego balastu, umożliwia konsekwentne i logiczne przytaczanie go w treści pracy.

Praca powstała dzięki współpracy dwóch ośrodków naukowych: Laboratorium Genetyki Molekularnej i Wirusologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Centrum Neurowirusologii Uniwersytetu Medycznego w Filadelfii, w Pensylwanii w USA. Praca ta jest efektem implikacji naukowej doświadczonych badaczy: prof. Kamela Khalili z USA i dr hab. Magdaleny Kosz-Vnenchak z Polski – współpromotorów pracy oraz równie umiejętnego jak i skutecznego wykorzystania przez mgr R. Kamińskiego – doktoranta, udostępnionego mu, nowoczesnego warsztatu naukowego.

HIV, podobnie do innych wirusów, podczas swej replikacji angażuje mechanizmy komórkowe, białkowe kofaktory komórkowe chcąc, z jednej strony ułatwić sobie namnażanie się, ale jednocześnie indukuje reakcje ze strony, komórkowych mechanizmów obronnych, w tym grupy komórkowych białek restrykcyjnych – utrudniających replikację HIV. Poznanie, głębsze, tych mechanizmów stwarza nadzieję na realne zahamowanie postępującej pandemii zakażeń HIV.

Dostrzegł to właśnie Doktorant – mgr Rafał Kamiński – co wyraził w jasno określonych celach swej pracy doktorskiej. Skupił swą uwagę badawczą na tworzących się kompleksach Pur α : Rev, Pur α : RRE RNA i związanymi z tym konsekwencjami dla przebiegu infekcji HIV-1.

Wyniki ocenianego przeze mnie doktoratu stanowią implikację do dalszych badań nad rolą regulacji stężenia białka Pur α i jego wpływu na ekspresję HIV-1.

Materiał i metody badań zostały dostosowane do przyjętych tez pracy, w ich doborze Doktorant wykorzystał wiedzę i doświadczenie wynikające z publikacji i współpracy z zespołem prof. Kamela Khalili, których prace Autor przywołuje zarówno we wstępie jak i w dyskusji. Dobiera odpowiednie systemy doświadczalne w celu ustalenia wpływu białka Pur α na funkcję wirusowego białka Rev, a uzyskane wyniki ilustruje na rys. 1, 2 i 3 oraz w celu sprawdzenia, które domeny obu tych białek wpływają na wielkość ekspresji genów reporterowych, zawierających sekwencję RRE (rys. 4, 5 i 6). Opisy eksperymentów sprawdzających rozmieszczenie białek Pur α i Rev w komórkach oraz tworzenie odpowiednich kompleksów i ich współoddziaływanie ilustrują rysunki od 7 do 13.

Opis i analizę wyników Doktorant kończy 4 wnioskami, które są logicznym podsumowaniem przeprowadzonych badań i w pełni oraz adekwatnie odpowiadają na postawione w pracy tezy badawcze.

Uzyskane wyniki, Autor odnosi do stwierdzeń pochodzących z wcześniejszych badań, opublikowanych w rzeczowo dobranym i przytoczonym w rozprawie piśmiennictwie i dyskutuje z nimi stawiane przez siebie hipotezy, co czyni tą część rozprawy bardzo wartościową poznawczo. Przykładem są: sugestia, że białko Pur α może działać w potranskrypcyjnej obróbce wirusowego m RNA, związanego z funkcją białka Rev i, że poprzez oddziaływanie z białkiem Rev i RRE może być odpowiedzialne za kierowanie do miejsc translacji w cytoplazmie cząstek kompleksów rybonukleinowo-białkowych zawierających wirusowe m RNA, które nie przeszło splicingu, a także, że białko Pur α może zwiększyć cytoplazmatyczne stężenie reporterowego RNA, nie objętego procesem splicingu niezależnie od obecności sekwencji RRE. Te obserwacje pozwoliły Doktorantowi zwrócić uwagę na rolę białka Pur α w niezależnych od białka Rev drogach eksportu z jądra komórkowego cząstek m RNA, co podnoszono we wcześniejszych badaniach, przytoczonych przez Autora.

Doktorant, w dyskusji, analizując wyniki swych badań i odnosząc się do wcześniejszych doniesień, nie wykluczył, że zdolność białka Pur α (przez własne wiązanie się i ułatwianie wiązania się innych białek regulatorowych) do zmiany konformacji DNA jest też możliwa w oddziaływaniach tego białka z cząsteczkami RNA. Nie można też wykluczyć odkrycia nowej roli białka Pur α , a mianowicie, jego udziału w regulacji wyboru drogi eksportowej jaką zostaną przetransportowane cząsteczki m RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Jednocześnie też Doktorant zwraca uwagę, że nie we wszystkich funkcjach wirusowego białka Rev została poznana rola białka Pur α , co dotyczy np. niedawno zidentyfikowanego drugiego miejsca wiązania się Rev w genomowym RNA HIV-1.

Wszystko to razem sugeruje, że wiązanie się białka Pur α do kompleksu Rev / RRE odgrywa rolę w jego tworzeniu, obróbce i eksporcie z jądra komórkowego, a także do rekrutacji kompleksu do rybosomów w cytoplazmie i translacji. Są to spostrzeżenia, które stanowią nadzieję na ukierunkowanie dalszych badań na wykrycie lub skonstruowanie specyficznego inhibitora funkcji białka Pur α , co może być przełomem w poszukiwaniu metod skuteczniejszego niż dotąd leczenia, albo wpłynąć na weryfikacyjny przegląd dotychczasowych dróg badawczych w poszukiwaniu strategii postępowania eradykującej zakażenie HIV.

Pracę, przedstawioną mi do oceny, uznaję za bardzo wartościową poznawczo. Doktorant zajął się jednym z najmniej zbadanych etapów cyklu życiowego HIV-1. Wykorzystał najnowocześniejszy, dostępny warsztat badawczy (biotechnologiczny). Podjął się zadania, które obok znaczenia poznawczego, ma również, trudną do przecenienia, wartość praktyczną. Wyniki

pracy Doktoranta implikują do konsekwentnych, choć niełatwych intelektualnie, badań umożliwiających stworzenie nowego, bardziej skutecznego, ogniwa w dotychczasowej strategii terapii HAART.

Doktorat oceniam bardzo wysoko, jego wartość warsztatowa i merytoryczna, w moim przekonaniu, zasługuje też na wyróżnienie, o co wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału.

Wnoszę też do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Rafała Kamińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. zw dr hab. Andrzej Gładysz
członek CK ds Stopni i Tytułów

