

HP 17.12.2019 le

Poznań, 12 grudnia 2019 roku

Prof. dr hab. Elżbieta Kierzek  
Zakład Genomiki Strukturalnej RNA

### Recenzja

#### osiągnięcia naukowego dr Eweliny Król pt. „Opracowanie innowacyjnych strategii zwalczania infekcji wirusowych u ludzi poprzez zastosowanie chemicznie zsyntetyzowanych inhibitorów”

Recenzja sporządzona w odpowiedzi na pismo dr hab. Joanny Skórko-Głonek, przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 21 listopada 2019 roku w związku ze wszczęciem postępowania habilitacyjnego dr Eweliny Król i powołaniem mnie na recenzenta przez Centralną Komisję ds. Stopni i Tytułów.

#### ***I. Podstawowe informacje na temat wykształcenia i aktywności zawodowej Kandydatki***

Dr Ewelina Król związana jest z Uniwersytetem Gdańskim od roku 2009 kiedy to została zatrudniona, jako starszy referent techniczny w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych działającego w ramach Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jakkolwiek już w roku 2004 została słuchaczką studium doktoranckiego Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii UG. Pracę doktorską pt. „Zastosowanie wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV), jako modelu do badań aktywności nowych inhibitorów rozwoju wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV)”, wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Szewczyka i w roku 2011 uzyskała stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Praca ta została wyróżniona przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Od marca 2012 do teraz zatrudniona jest na stanowisku adiunkta w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych. W międzyczasie, przez okres jednego roku (2014/15) przebywała na urlopie macierzyńskim.

Kandydatka nie odbyła żadnego długoterminowego stażu zagranicznego. Przez okres 1-2 miesięcy była w Veterinary Research Institute w Brnie (Czechy), natomiast 2-miesięczny pobyt w University of Stanford (USA) w ramach programu stażowo-szkoleniowego „TOP500 Inventors Science-Management-Commercialization” trudno nazwać stażem naukowym. Brak długoterminowego stażu zagranicznego jest sporym uszczerbkiem dla dalszego rozwoju naukowego Habilitantki. Dr Król od 2010 roku była kierowniczką kilku polskich grantów. Była dwukrotnie kierowniczką grantu Iuventus plus (MNiSW, 2010-11), ponadto kierowała grantem Preludium (NCN, 2012-16). Obecnie kieruje grantami Sonata (NCN, 2016-19) i Lider (NCBiR, 2017-19). Jest to imponujący dorobek w pozyskiwaniu finansowania projektów badawczych. Ponadto, Habilitantka była wykonawczynią w pięciu innych projektach badawczych.

Dr Ewelina Król jest współautorką 17 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej, z których 7 stanowi temat rozprawy habilitacyjnej. Jak pisze Habilitantka, wygłosiła 6 referatów, z czego 5 na konferencjach w Polsce. Ponadto, 30-krotnie prezentowała wyniki swoich badań, w formie posteru, na konferencjach polskich i zagranicznych. Dr Król na początku swego autoreferatu podaje wiele informacji bibliometrycznych, ale najważniejsze to te, że według Web of Science jej prace cytowane były łącznie 130 razy, a indeks Hirscha dr Król wynosi 6. Zakładając prawie 15-letni (łącznie z wykonywaniem pracy doktorskiej) okres pracy naukowej Habilitantki należy stwierdzić, że zarówno liczba cytowań, jak i indeks Hirscha jest znaczący, ale nie jest szczególnie wyróżniający. Można jednak stwierdzić, że Kandydatka jest aktywnym i rozpoznawalnym w swej dziedzinie naukowcem

W ocenianej rozprawie habilitacyjnej osiągnięcie stanowią badania opisane w cyklu 7 publikacji. Wszystkie one są opublikowane w czasopismach międzynarodowych i w każdej pracy z tego cyklu dr Król jest autorem do korespondencji. Łącznie było one cytowane 42 razy, jednak są to głównie prace z 2-3 ostatnich lat i zapewne z tego powodu liczba ich cytowań jest skromna. Ich *impact factor* (współczynnik oddziaływania) waha się pomiędzy 4,2 i 1,5, ale dla większości publikacji z tego cyklu wynosi około 3,5. Habilitantka ocenia, że Jej udział w ich powstaniu wynosi od 70 do 40%. Dominująca rola dr Król świadczy o jej dojrzałości badawczej i rysującej się samodzielności naukowej w rozwiązywaniu problemów badawczych.

Dr Król jest także współautorką dwóch polskich patentów dotyczących aktywności inhibitorowej pochodnych urydyny oraz sulfidów i sulfotlenków przeciwko wirusom *Flaviride*

Częścią wniosku jest autoreferat liczący 32 strony i stanowiący bardzo dobry przewodnik po cyklu wybranych publikacji. Równocześnie wprowadza on w poruszane zagadnienia naukowe i prezentuje jasno cel prowadzonych przez dr Król badań. Analiza dorobku naukowego wskazuje, że od wielu lat zainteresowania Habilitantki koncentrują się wokół zastosowania niskocząsteczkowych ligandów nakierowanych na inhibicję szeregu RNA wirusów poprzez zmniejszenie modyfikacji (tworzenia glikoprotein) wybranych białek wirusowych. Ich modyfikacja jest konieczna do utworzenia funkcjonalnego wirionu koniecznego do namnażania się wirusa.

Po zapoznaniu się z opisem udziału dr Eweliny Król w publikacjach naukowych stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej pragnę stwierdzić, że udział intelektualny i wykonawczy Kandydatki jest wiodący i spełnia wymogi formalne i prawne przeprowadzenia przewodu habilitacyjnego.

## **II. Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego.**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr Eweliny Król zatytułowane „*Opracowanie innowacyjnych strategii zwalczania infekcji wirusowych u ludzi poprzez zastosowanie chemicznie zsyntetyzowanych inhibitorów*” oparte jest na 7 wieloautorskich publikacjach, w których Kandydatka zawsze była autorką do korespondencji. Sześć z nich to prace eksperymentalne, a jedna jest publikacją przeglądową (*Acta Biochimica Polonica*). Wszystkie zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o znaczącym „*impact factor*” (współczynnik wpływu) wynoszącym od 4,2 do 1,5, a większość oscyluje około 3,5.

Wydaje mi się, że tytuł rozprawy habilitacyjnej dr Król sformułowany jest trochę „na wyrost”. Po pierwsze, Habilitantka nie opracowała „*innowacyjnych strategii*”, gdyż podobne badania prowadzone są od 20 lat przez wiele grup badawczych w świecie. Po drugie, fragment tytułu ociągnięcia „*zwalczania infekcji wirusowych u ludzi...*” nie jest także dobrze

sformułowany, gdyż dr Król badania inhibitorowej aktywności badanych ligandów prowadziła jedynie w różnych liniach komórkowych, zainfekowanych różnymi wirusami RNA. Rozumiem, że „człowiek” był dalekosiężnym celem Jej badań, ale lepiej byłoby sformułować tytuł osiągnięcia naukowego trochę skromniej, za to lepiej oddając opis zebranych badań.

Dr Król przedstawia wyniki badań, jakie zebrała w autoreferacie w sposób klasyczny, tzn. po kolei opisuje cel naukowy, syntetyczny opis uzyskanych wyników oraz znaczenie każdej z siedmiu publikacji. Na wstępie autoreferatu Habilitantka przedstawia główny cel naukowy Jej badań. Otóż, wirusy RNA do ich namnażania muszą utworzyć wirion, a do powstania infekcyjnego wirionu konieczne jest spełnienie wielu warunków, między innymi, modyfikowanie łańcuchami cukrowymi powierzchniowych białek wirusowych. Za ten proces odpowiada wiele enzymów z grupy glikozylotransferaz (GTs). Zaburzenia prawidłowego przebiegu glikozylacji białek wirusowych wpływają na fałdowanie się białek, ich aktywną konformację, oddziaływanie z komórką gospodarza. Wystąpienie zaburzeń glikozylacji prowadzi do inhibicji namnażania się wirusa. Praktycznie wszystkie badania zebrane w omawianym cyklu dotyczą zaburzeń procesu glikozylacji białek wirusowych za pomocą różnych ligandów niskocząsteczkowych. Wszystkie niskocząsteczkowe ligandy, które badała dr Król zostały zsyntetyzowane przez grupy badawcze dr hab. Gabrieli Pastuch-Gawołek oraz dr hab. Ilony Wandzik z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydziału Chemicznego Politechniki w Gliwicach

W dalszej części autoreferatu dr Król opisuje wirusy RNA, którymi się specjalnie interesowała, a mianowicie: wirus grypy (IV), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) oraz kleszczowego zapalenia mózgu (IBEV). Jakkolwiek, jak wynika to z omówienia poszczególnych publikacji interesowały ją także inne wirusy. Omawiając trzy główne wirusy, Kandydatka szczególną uwagę zwróciła na ich białka wirusowe, które ulegają glikozylacji.

W dalszej części autoreferatu dr Król omawia po kolei wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego. Metodologia większości prowadzonych badań była podobna, nie ma więc sensu omawianie każdej publikacji z tego cyklu. Scenariusz prowadzenia badań był taki, że dr Król pozyskiwała niskocząsteczkowe ligandy, będące konjugatami urydyny i różnych monosacharydów od współpracujących grup z Politechniki w Gliwicach (dr hab. Gabrieli Pastuch-Gawołek oraz dr hab. Ilony Wandzik). Trudo się zorientować, czy decyzja o syntezie określonych ligandów podyktowana była możliwością ich syntezy czy ich dopasowaniem do centrum aktywnego glikozylotransferaz. Następnie, dr Król do różnych linii komórkowych (MDCK, różne wersje Huh, A549) zainfekowanych wirusem, który był przedmiotem badań dodawała określone ilości antywirusowych ligandów. Często owe ligandy dodawane były po określonym czasie, zależnym od tempa namnażania się wirusa. Najczęściej inhibitorowy efekt działania ligandów Kandydatka oceniała przeprowadzając testy redukcji łysinek wirusowych oraz zahamowania efektu cytopatycznego. Ilościowa ocena inhibitorowego działania określonego ligandu sprowadzała się do określenia wartości  $IC_{50}$ , natomiast selektywność działania ligandu określał parametr SI. Zwykle, oprócz nowych ligandów do analizy Kandydatka używała związki referencyjne, których aktywności biologiczne określili wcześniej inni badacze. Dla najlepiej inhibujących pochodnych wartości  $IC_{50}$  były w zakresie mikromolowym ( $\mu M$ ). W sumie, Habilitantka badała aktywność około 25 różnych pochodnych. Istotną aktywność inhibitorową obserwowała dla około 20% związków. Wiele z badanych pochodnych różniły się pomiędzy sobą położeniem i rodzajem grup ochronnych, co miało także wpływ na ich aktywność inhibitorową. Ta część omawianych badań każe mi się zastanowić, jaka była ich rozpuszczalność w medium wodnym. Wiele ze stosowanych przez Habilitantkę pochodnych posiadało kilka grup tert-

butylodimetylosililowych, izopropylidenowych, benzyliowych czy benzolowych. Trudno sobie wyobrazić łatwą rozpuszczalność tych pochodnym w buforach wodnych. Drugi problem, jaki mnie zastanawia to, w jakiej formie działają one na glikozylotransferazy. Jest szereg publikacji dotyczących tzw. „*prodrugs*”. W tym przypadku także używa się różnie zablokowanych związków, ale są to takie grupy blokujące, które w zamysle mają zostać usunięte przez różnego typu enzymy po ich wnikięciu do komórki. Interesuje mnie, czy dr Król rozważała również podobną sytuację ze swoimi ligandami.

Dla niektórych ligandów z grupy oznaczonej skrótem GP, których aktywności Dr Król badała w stosunku do wirusa HCV oraz klasycznego pomoru świń, wykazała, że zahamowanie namnażania się wirusa nie wynika z inhibicji aktywności glikozylotransferaz, ale prawdopodobnie z inhibicji procesu replikacji, czyli docelową biomolekułą nie są białka powierzchniowe, ale, jak przypuszcza dr Król, enzymy uczestniczące w cyklu replikacyjnym wirusa. Jest to bardzo ciekawa obserwacja. Zastanawiam się czy Habilitantka rozważała również możliwość, że badane przez nią ligandy wiążą się do wirusowego RNA (vRNA, cRNA czy mRNA). Wiązanie się niskocząsteczkowych ligandów do różnych form wirusowego RNA i w konsekwencji inhibicja procesów replikacji wirusowego RNA została opisana przez wielu autorów.

Kandydatka jest unikalną uczoną, gdyż łączy w sobie dobre umiejętności pochodzące z pogranicza biologii i chemii. Trochę za bardzo monotony jest Jej obecny warsztat badawczy, gdyż zarys wszystkich badań opisanych w autoreferacie jest podobny. Wydaje się być odważną naukowo osobą, która skutecznie przyswaja nowe techniki badawcze związane z różnymi wirusami. Jeśli dodać do tego dużą zdolność pozyskiwania grantów, dobrze to prognozuje na przyszłość. Ponadto, współpracuje z kilkoma grupami badawczymi z kraju i zagranicy, przez co ma możliwość pozyskiwania nowych ligandów i bardzo specyficznych linii komórkowych do badań inhibicji wirusów.

Uważam, że wyniki uzyskane przez Habilitantkę w istotny sposób poszerzają wiedzę na temat oddziaływań niskocząsteczkowych ligandów z innymi biomolekułami, które to oddziaływanie prowadzi do inhibicji namnażania się wirusów RNA. Wyniki badań dr Król na pewno przydadzą się także innym badaczom przy rozwiązywaniu podobnych problemów naukowych. Dr Król wykazała się głęboką znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością racjonalnego planowania i realizowania wartościowych badań oraz zdolnością formułowania wniosków końcowych. Takie umiejętności są bardzo istotne przy samodzielnym kierowaniu badań, a taki jest cel działań autorki przedstawionej rozprawy habilitacyjnej.

Osiągnięcie naukowe dr Eweliny Król oceniam pozytywnie pod względem wartości naukowej. Wkład merytoryczny i wykonawczy w badania zawarte w wybranych przez Kandydatkę 7 publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe nie budzi wątpliwości. Wskazują na to także oświadczenia wszystkich współautorów wybranych publikacji. Duża część prowadzonych badań ma charakter nowatorski i metodyczny. Należy wierzyć, że po uzyskaniu samodzielności naukowej dr Król rozwinie swoje badania także na inne obszary związane z wirusami RNA.

### ***III. Ocena działalności naukowej Kandydatki poza cyklem „publikacji habilitacyjnych”***

Całkowity dorobek publikacyjny dr Eweliny Król to 17 prac, wszystkie w czasopismach z listy filadelfijskiej, a część z nich (7 publikacji) weszła w skład rozprawy habilitacyjnej. Pozostałe 10 publikacji jest w czasopismach o IF w przedziale 13.6 i 0.7, ale większości czasopism ma IF na poziomie 3-4. Wszystkie publikacje dr Król cytowane były około 130 razy, z

czego 7 wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej cytowane było około 40 razy. Wszystkie one dotyczą podobnego tematu, jak te siedem wchodzących w skład habilitacji. Habilitantka jest także współautorką dwóch monografii i dwóch patentów. Łącznie swoje wyniki przedstawiała w formie komunikatów na 6 konferencjach, głównie krajowych. W formie posterów swoje wyniki prezentowała na 30 konferencjach i były to głównie konferencje międzynarodowe. Od początku swojej aktywności naukowej, jeszcze, jako studentka, związana jest z prof. dr hab. Bogusławem Szewczykiem. U niego wykonała pracę magisterską i doktorską i w tej grupie badawczej pracuje do dzisiaj. Za swoje badania otrzymała szereg nagród, głównie krajowych i związanych z Uniwersytetem Gdańskim. Jest także laureatką nagrody naukowej Prezydenta Gdańska. Uzyskała także pięciokrotnie stypendium wyjazdowe na konferencje zagraniczne. Już po złożeniu dokumentów związanych z habilitacją dr Król została laureatką prestiżowej nagrody L'Oréal.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przed obroną pracy doktorskiej w roku 2011 dr Król opublikowała jedną pracę. Natomiast po obronie rozprawy doktorskiej powstało 16 prac, z czego 7 weszło w skład rozprawy habilitacyjnej. Dorobek Kandydatki oceniam pozytywnie jako znaczący na tym etapie rozwoju naukowego.

#### ***IV. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej Habilitantki***

Dr Ewelina Król od roku 2009 do teraz jest pracownikiem naukowym na Uniwersytecie Gdańskim. Od roku 2011 jest zatrudniona, jako adiunkt w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach swoich zajęć dydaktycznych, od samego początku zatrudnienia, prowadziła ćwiczenia laboratoryjne z różnych dziedzin (biochemia, biotechnologia, wirusologia) dla studentów macierzystego Wydziału. Część zajęć prowadzona była w języku angielskim. Przygotowała dwa skrypty do ćwiczeń. Opiekowała się wieloma pracami licencjackimi i magisterskimi, była także promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej. Udziela się często w organizowaniu festiwali naukowych. Była recenzentem wielu manuskryptów dla wydawnictw zagranicznych i krajowych. Działalność dydaktyczną i organizacyjną Kandydatki oceniam pozytywnie jako wyróżniającą.

#### ***V. Ocena końcowa rozprawy habilitacyjnej dr Eweliny Król***

Dr Ewelina Król przedstawiła wniosek habilitacyjny oparty o 7 powiązanych tematycznie wieloautorskich publikacjach z pogranicza biologii molekularnej, biochemii i wirusologii. W większości z tych publikacji wkład merytoryczny i wykonawczy Kandydatki przekraczał 50%. Przedstawione w ramach rozprawy habilitacyjnej prace badawcze stanowią dobrą podstawę do prowadzenia dalszych badań mających na celu poszukiwanie nowych niskocząsteczkowych ligandów, które poprzez oddziaływania z glikozylotransferazami inhibują namnażanie się patogennych wirusów RNA. Badania dr Król są bardzo ważne dla poznania biologii mechanizmów i uwarunkowań proliferacji wirusów RNA, ale także z praktycznego punktu widzenia, czyli inhibicji ich namnażania. Takie silne inhibitory nakierowane na patogenne wirusy RNA mogą kiedyś zostać terapeutykami przeciwko infekcjom wirusowym.

Uważam, że zaprezentowane przez dr Ewelinę Król osiągnięcie naukowe jest wartościowe i razem z pozostałym dorobkiem naukowym spełniają wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r., stanowiąc niezbędną podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Dojrzałość naukowa dr Król i jej merytoryczny udział w opublikowanych badaniach wyraźnie świadczy o jej zdolności do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Pewnym mankamentem w ocenie działalności Kandydatki jest brak długoterminowego stażu naukowego w dobrym ośrodku naukowym, ale to dr Król może zawsze nadrobić.

Wnoszę do komisji habilitacyjnej powołanej decyzją Centralnej Komisji do spraw Stopni i Tytułów o nadanie dr Ewelinie Król stopnia doktora habilitowanego.

Elzbieta Wieniec