UNIWERSYTET GDAŃSKI

IN MARI VIA TUA

Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Uniwersytet Gdański
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Abrahama 58 , 80-307 Gdańsk
Tel. (+48) 58 5236381
e-mail : krystyna.bienkowska-szewczyk@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk 15 sierpnia 2022

**Ocena osiągnięć naukowych i dorobku naukowo-badawczego dr Remigiusz Worcha w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego**

Dr Remigiusz Worch jest obecnie pracownikiem Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M.Nenckiego , gdzie jego aktywność naukowa dotyczy nauk biologicznych. Z wykształcenia jest fizykiem, studia ukończył na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie pracował nad swoim projektem doktorskim i gdzie w 2007 r. uzyskał stopień doktora. Staż podoktorski odbył w Niemczech, w instytucie Biotec Technische Universität w Dreźnie w latach 2008-2010 , a następnie podjął prace w Instytucie Fizyki PAN w Warszawie , w Laboratorium Fizyki Biologicznej, gdzie pracował do roku 2021.

Dr Remigiusz Worch uzyskał stopień doktorski na podstawie rozprawy zatytułowanej : *Analiza oddziaływania jądrowego kompleksu białkowego CBC ze strukturą 5' końca RNA metodami biofizyki molekularnej*. Tytuł tej pracy dobrze charakteryzuje cały dorobek dr Worcha, oparty na zastosowaniu wiedzy i metodyki z dziedziny fizyki do rozwiązywania zagadnień biologicznych z wykorzystaniem różnych modeli, przy czym stopniowo w jego profilu badawczym pojawia coraz więcej modeli wirusowych. Pracując w Laboratorium Fizyki Biologicznej jako swoje główne obszary zainteresowań wymienił badania nad dynamiką i oddziaływaniem biomolekuł oraz zastosowanie technik fluorescencyjnych; badania te dotyczyły w głównej mierze fuzji błon wywołanej przez białka wirusowe. Tej tematyki dotyczy główne osiągniecie badawcze przedstawione przed Dr Worcha w celu uzyskania stopnia doktora habilitowanego.

Fuzja błonowa to zasadniczy proces w przebiegu wielu procesów biologicznych. Jest to również kluczowy etap w rozwoju infekcji dla wirusów posiadających osłonkę, takich jak np. wirus HIV, wszystkie herpeswirusy, wirus odry, wirus grypy czy koronawirusy. Fuzja – czyli złączenie się dwóch błon – jest

kluczowym procesem dla „sukcesu" infekcji, czyli wprowadzenia do komórki materiału genetycznego i innych niezbędnych do replikacji składników wirusa do wnętrza komórki. Proces ten może zachodzić na powierzchni infekowanej komórki lub wewnątrz pęcherzyków endocytarnych i wymaga obecności specyficznych białek wirusowych. Fuzja błonowa jest od lat przedmiotem intensywnych badań - opublikowano tysiące raportów dotyczących mechanizmu tego procesu , struktury białek wirusowych w nim uczestniczących i ich współdziałania z białkami komórki gospodarza. Jednak praktycznie dla żadnego wirusa mechanizm wywoływanej przez niego fuzji nie jest w pełni poznany , chociaż scharakteryzowano bardzo wiele szczegółów tego procesu metodami wirusologicznymi, biochemicznymi, fizycznymi i bioinformatycznymi. Jednak fuzja błon jest procesem bardzo dynamicznym, a uczestniczące w niej białka, glikoproteiny wirusowe o złożonej budowie, zakotwiczone w błonach lipidowych , przechodzące w trakcie spotkania wirusa z komórką szybkie zmiany konformacyjne, są bardzo trudnym obiektem badań. Badania takie są dalej intensywnie rozwijane przy użyciu coraz szerszego wachlarza nowych technologii, gdyż – poza samym celem zrozumienia tego ważnego zjawiska biologicznego - badania takie są nakierowane na możliwości terapeutyczne. Zahamowanie procesu fuzji może uniemożliwić wnikanie wirusa do komórki, a więc zahamowanie infekcji na bardzo wczesnym etapie. Większość dostępnych leków przeciwwirusowych działa na późniejszych etapach , hamując replikację wirusa lub przetwarzanie jego białek , kiedy wirus jest już obecny w komórkach, natomiast potencjalne inhibitory fuzji mogą całkowicie „nie wpuścić" wirusa do komórki. Że takie podejście jest możliwe, udowadnia przykład całej gamy inhibitorów fuzji stosowanych w terapii zakażeń HIV, z których pierwszy , Fuzeon ( enfuwirtyd, peptyd złożony z 36 aminokwasów) został wprowadzony na rynek już w 2003 r, jako pierwszy z nowej generacji leków przeciwretrowirusowych. Miało to duże znaczenie, biorąc pod uwagę ogromną zmienność genetyczną wirusa HIV , z czego wynika szybkie tempo pojawiania się wirusów opornych na kolejne terapeutyki. Jednak dla innych wirusów odznaczających się wysoką zmiennością genetyczną , takich jak wirus zapalenia wątroby typu C ( HCV) , czy wirus grypy ( influenza) dotychczas, mimo wielu wysiłków badawczych, nie udało się opracować skutecznych inhibitorów fuzji .

Prace dr Worcha dotyczą właśnie wirusa grypy, a ich głównym tematem jest badanie mechanizmu działania peptydu fuzyjnego tego wirusa. Mimo że peptydy fuzyjne to stosunkowo krótkie fragmenty białek wirusowych biorących udział w fuzji, to ich struktura i działanie są krytyczne dla wytworzenia połączenia miedzy błonami. Strukturze peptydów fuzyjnych poświecono bardzo wiele prac, opartych m.in. na miejscowej mutagenezie hemaglutyniny lub na użyciu różnej długości peptydów syntetycznych. W pracach Dr Worcha wykorzystano do tych badań sztuczne systemy błonowe.

**1. Ocena głównego osiągniecia naukowego.**

Tematem głównego osiągnięcia przedstawionego przez Dr Worcha jest :

**Badanie mechanizmu działania peptydu fuzyjnego wirusa grypy w sztucznych układach błonowych**

Jako podstawę do postępowania habilitacyjnego Dr Worch podał 5 publikacji , które ukazały się latach 2013-2021. Wszystkie publikacje ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, cztery z nich to prace eksperymentalne , a jedna praca to artykuł przeglądowy. Habilitant nie dołączył tych publikacji do materiałów przesłanych do oceny , przedstawił tylko ich treść w swoim autoreferacie.

W pierwszej publikacji, która ukazała się w *FEBS Letters* w 2013 r ( The helical hairpin structure of the influenza fusion peptide can be seen on a hydrophobic moment map), Dr Worch zajął sie analiza amfifilowości peptydu fuzyjnego (HAfp) stanowiącego N-koniec hemaglutyniny, głównego białka osłonkowego wirusa grypy. Jako parametr oceny amfifilowości przedstawiony jest tzw. moment hydrofobowy , którego wartość obliczana na bazie sekwencji aminokwasowej może być, jak autor pokazal , podstawą do stworzenia mapy cech hydrofobowych danego białka, co moze być odzwierciedlone w jego konformacji. W tej pracy takie analizy przeprowadzono dla różnych serotypów wirusa grypy, porównując te wyniki z analiza białka gp41 wirusa HIV. W swoim autoreferacie dr Worch wskazuje na potencjalne zastosowanie takiej metody do przewidywania , które fragmenty białka mogą funkcjonować jako peptydy fuzyjne, powołując się na swoje nieopublikowane badania dotyczące końskiego reowirusa (EEV).

Dr Worch jest jedynym autorem tej pracy , w pozostałych 4 pracach jest pierwszym autorem.

W następnej publikacji , w artykule opublikowanym w *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* w 2016 r. ( Three conserved C-terminal residues of influenza fusion peptide alter its behavior at the membrane interface) przeprowadzono szczegółową analizę struktury i własności peptydu HAfp , zwracając uwagę na znaczenie długości tego fragmentu i rolę trzech C-końcowych reszt aminokwasowych w wytwarzaniu połączenia miedzy błonami. W tej pracy Autorzy posłużyli się syntetycznymi peptydami różnej długości oraz użyli liposomów, pęcherzyków jednowarstwowych (unilamellar vesicles ), jako modelowych układów błonowych o różnej średnicy . Kluczowe dla tej pracy było opracowanie testu wydajności procesu fuzji, co jest zawsze wyzwaniem w badaniach nad przebiegiem fuzji . Autorzy posłużyli się technikami mikroskopii fluorescencyjnej, wykorzystując metodę FRET (fluorescence resonance energy transfer) do analizy fuzji z udziałem HAfp pomiędzy pęcherzykami różnej wielkości. Opracowano tez innowacyjny test obrazowania fuzji poprzez pomiar czasu trwania fluorescencji (technologie FLIM ). Dzięki tym metodom oraz zastosowaniu szeregu analiz biofizycznych , takich jak symulacje dynamiki molekularnej, w pracy tej wykazano że peptyd złożony z 23 aminokwasów przyjmuje inna orientację ( spinki do włosów) niż krótsze peptydy , co ma znaczenie dla mechanizmu zaburzania podwójnej warstwy lipidowej zachodzącego w czasie fuzji. Co wiecej, pokazano że obecność trzech konserwowanych reszt na C-końcu peptydu jest istotna dla funkcji tego

peptydu. Za bardzo ważne uważam wyniki dotyczące znaczenia cholesterolu w mechanizmie funkcji indukowanej przez dłuższy peptyd HAfp 23 , w kontekście wielu prac analizujących rolę „lipid rafts" w procesach wnikania wirusów do komórek; udział cholesterolu w wejściu do komórki sugerowano np. w wypadku wirusa HIV.

Dwa następne artykuły opublikowano w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences,* kolejno w r. 2018 i 2021. W publikacji z 2018 r. pt „Charged N-terminus of influenza fusion peptide facilitates membrane fusion" Dr Worch jest autorem korespondującym (podobnie jak w poprzedniej pracy w BBA). W tej pracy wykorzystano m.in. metodykę opisana w poprzedniej publikacji do badań nad udziałem ładunku N-końcowego na konfigurację peptydu HAfp w dwuwarstwie lipidowej. Uzyskano dane potwierdzające obserwacje, że konfiguracja helikalnej szpilki do włosów, spinającej błony , sprzyja najwyższej aktywności fuzyjnej tego peptydu. Wyniki tej pracy wskazują, że dodatnio naładowany N-koniec peptydu stabilizuje tę strukturę poprzez tworzenie wiązań wodorowych z resztami 21-23, wskazują też na znaczenie ustawienia i orientacji peptydu w błonie dla jego skutecznego działania.

W ostatniej publikacji z r. 2021 (Transient Excursions to Membrane Core as Determinants of Influenza Virus Fusion Peptide Activity) dalej konsekwentnie badano aktywność fuzyjną peptydu HAfp23. Badania były skupione wokół zagadnienia lokalizacji i głębokości zanurzenia peptydu w błonie oraz dynamicznych interakcji z warstwami błony w trakcie kolejnych faz procesu fuzyjnego. Porównywano aktywność fuzyjną peptydu HAfp typu dzikiego z wersjami zmutowanymi w dwóch pozycjach, wskazując na wpływ tych mutacji na konfigurację peptydu w błonie. Badania te potwierdzają fakt, ze zmiana nawet pojedynczej reszty aminokwasowej w strukturze peptydu fuzyjnego może całkowicie zmienić lub uniemożliwić proces fuzji. Autorzy badali , używając metod opracowanych w poprzednich pracach i metod spektroskopowych ( takich jak pomiar wygaszania fluorescencji tryptofanu), dynamikę wnikania peptydu do błon, wskazując na ścisłe związanie tej aktywności z konformacją HAfp.

Ostatnia praca włączona do zestawu prac tworzące osiągniecie naukowe Dr Worcha to artykuł przeglądowy, opublikowany wcześniej, w 2014 r., w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* (Structural biology of the influenza virus fusion peptide). Jak wskazuje tytuł, Autor scharakteryzował znaczenie głównych cech peptydu HAfp , takich jak długość, sekwencja aminokwasowa występowanie specyficznych motywów, ładunek poszczególnych reszt aminokwasowych dla tworzenia określonej struktury peptydu i dla mechanizmu jego działania. Porównał wyniki i metodykę prac w licznych opublikowanych raportach na temat badania szczegółów przebiegu fuzji indukowanej przez hemaglutyninę wirusa grypy wewnątrz endosomów . Zgromadzone w tej publikacji dane literaturowe były zapewne wykorzystane w planowaniu i realizacji dalszych prac eksperymentalnych dr Worcha.

Wszystkie zaprezentowane w tym zestawie prace dr Worcha mają wspólny wątek badawczy skupiony na relacji struktury i funkcji peptydu fuzyjnego wirusa grypy i na mechanizmie fuzji błon , stanowią więc spójny tematycznie cykl publikacji. Wyniki tych prac mają znaczenie ogólnobiologiczne, ponieważ przyczyniają się do lepszego zrozumienia skomplikowanej maszynerii fuzji, procesu umożlwiającego wnikanie wielu wirusów do różnych typów komórek . Mimo że są to prace dotyczące badań podstawowych, mogą one mieć wpływ na projekty aplikacyjne, gdyż peptydy imitujące peptydy fuzyjne mogą mieć zastosowanie w terapiach przeciwwirusowych. Autor podał, że całkowity wskaźnik IF dla tego zestawu publikacji wynosi 18.280, natomiast nie podał liczby cytowań dla poszczególnych publikacji.

**2. Ocena pozostałego dorobku naukowo- badawczego.**

Prace stanowiące osiągniecie naukowe Dr Worcha stanowią tylko niewielką część całego jego dorobku naukowego. Poza omówionymi powyżej publikacjami włączonymi do głównego tematu , w bazie PubMed jest ok. 30 artykułów , których jest współautorem. Jak podaje dr Worch w swoim autoreferacie , łącznie jest współautorem 44 publikacji, dla których łączna wskaźnika Impact factor wynosi (5-letni) : 131.160 (po doktoracie: 117.154), a łączna liczba cytowań wynosi wg Web of Science: 375 (bez autocytowań: 354).

Habilitant nie scharakteryzował w swoim autoreferacie swoich różnych zainteresowań naukowych , ale na podstawie tematyki kolejnych publikacji, wyłania się w jego dorobku kilka wątków badawczych, od prac o profilu typowo biofizyczno-chemicznym , opublikowanych w takich czasopismach jak *ACS Omega* (Comparison of α-Helix and β-Sheet Structure Adaptation to a Quantum Dot Geometry: Toward the Identification of an Optimal Motif for a Protein Nanoparticle Cover", 2019) , *RSC Advances* (2014), *Journal of Physics* (2013) czy *Journal of Physical Chemistry* (2021) do tematyki opartej na modelach biologicznych. Wśród tych ostatnich kilka prac związanych jest z badaniami dotyczącymi funkcjonowania czapeczki („cap" obecnej na 5' końcu eukariotycznego mRNA. Tymi zagadnieniami dr Worch zajmował się jeszcze w czasie pracy nad doktoratem, badając m.in. oddziaływanie kompleksu wiążącego „cap" (CBC) ze strukturą czapeczki. Po doktoracie kontynuował dalsze prace w tej dziedzinie w powiazaniu m.in. z analizą translokacji peptydów poprzez sztuczne błony (Translocation of 5' mRNA cap analogue — peptide conjugates across the membranes of giant unilamellar vesicles- *BBA* 2016) i z badaniami nad aktywnością rybonukleazy PARN. Zastosowanie sztucznych błon jako modelu do analizy zjawisk zachodzących w błonach biologicznych to inny wątek przewijający się w pracach dr Worcha, zapoczątkowany podczas jego stażu podoktorskiego w Dreźnie w zespole dr Petry Schwille. Modele wirusowe były wykorzystane w kilku pracach, takich jak opublikowana w 2020 r. w *Viruses* praca pt „Influenza A H1 and H3 Transmembrane Domains Interact Differently with Each Other and with Surrounding Membrane Lipids" czy praca „Effect of HIV-1 TAT Peptide Fusion on 5' mRNA Cap Analogs Cell Membrane Permeability and Translation Inhibition" opublikowana w tym samym roku w czasopiśmie *Bioconjugate Chemistry*. Dr Worch jest także współautorem rozdziału pt „Model membrane

systems",w bardzo znanym wydawnictwie książkowym *Methods in Molecular Biology* wyd . w 2013 r. Jest także współautorem dwóch patentów krajowych.

W analizie bibliometrycznej ogólnego dorobku publikacyjnego Dr Worcha zwraca uwagę znaczna sumaryczna liczba cytowań (około 370 ) , wysoki na tym etapie rozwoju naukowego indeks Hirscha (H11) oraz fakt, ze większość artykułów została opublikowana w czasopismach o wysokiej randze naukowej, co składa się na bardzo dobrą ocenę dorobku publikacyjnego Dr Worcha.

Poza publikacjami w czasopismach naukowych, dr Worch prezentował także wyniki swoich prac na międzynarodowych konferencjach, takich jak International Conference on Influenza w Londynie w r 2015, Biomolecules and Nanostructures w Podlesicach w r 2017 oraz 6th European JoinTheoretical/Experimental Meeting on Membranes w Helsinkach (2018).

Dr Worch pracował jako wykonawca w wielu projektach prowadzonych w Instytucie Fizyki PAN i na Uniwersytecie Warszawskim, finansowanych głownie przez Narodowe Centrum Nauk, a także przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Z sukcesem tez bardzo aktywnie samodzielnie zdobywał finansowanie swoich projektów naukowych: otrzymał stypendium z Fundacji Alexandra von Humboldta, grant badawczy z Fundacji Naukowej Polpharmy (na temat związany z głownym wątkiem badawczym przedstawionym do oceny: *Mechanizm oddziaływania peptydu fuzyjnego wirusa grypy z błonami lipidowym*) , grant z Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej i dwa granty z NCN : Sonata oraz obecnie realizowany projekt z programu Sonata Bis (*Peptydy fuzyjne i segmenty transbłonowe wybranych wirusów otoczkowych: struktura, dynamika oraz oddziaływania z błoną)* . Otrzymanie grantu z tego ostatniego programu oznacza, że badacz zaczyna tworzyć swój własny zespół , a więc osiąga pełna samodzielność w realizacji zamierzeń naukowych, co bardzo dobrze koreluje z procedurą habilitacyjną.

Inne aspekty działalności naukowej dr Worcha to recenzowanie artykułow dla takich czasopism naukowych, jak m.in. ACS Omega, Vaccines, JoVE, Biomolecules, European Physics Letters, Current Organic Chemistry, Sensors, Cells, International Journal of Molecular Sciences.

W trakcie swojej pracy naukowej Dr Worch otrzymał szereg nagród, poczynając od stypendium dla wyróżniających się doktorantów, następnie stypendium dla młodych naukowców Start z Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej, stypendium dla młodych wybitnych naukowców MNiSW , ostatnio otrzymał nagrodę *Naukowiec przyszłości* podczas Forum Inteligentnego Rozwoju.

**3. Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej.**

Dr Worch prowadził w trakcie swojej pracy różnego typu zajęcia dydaktyczne. Jako pracownik naukowy Uniwersytetu Warszawskiego dr Worch prowadził zajecia dla studentów ( ćwiczenia z Pracowni fizyki, ćwiczenia rachunkowe) natomiast w Instytucie Fizyki PAN brał udział w prowadzeniu kursów dla doktorantów. W latach 2009-2019 w różnych okresach prowadził opiekę nad stażystami , nad młodszymi pracownikami w projektach badawczych. Był współpromotorem kilku prac magisterskich. Jego doświadczenie dydaktyczne obejmuje także pracę jako nauczyciel w szkole podstawowej i licealnej.

Zajmował się aktywnie działalnością popularyzatorską, biorąc udział w piknikach naukowych, akcjach takich jak Dni Otwarte , Festiwale Nauki, konkursy młodych fizyków. Był nagrodzony (zwycięzca) w konkursie popularyzatorskim *Inter* prowadzonym przez Fundację Na Rzecz Nauki Polskiej w 2013 r.

Habilitant nie podal w swoim autoreferacie szczegółowych informacji o swojej współpracy zagranicznej, poza faktem że odbył swój staz podoktorski w Niemczech. Jednak z jego publikacji współautorskich wynika, że współpracuje z zespołami zagranicznymi, takimi jak Max Planck Institute of Biochemistry w Martinsried , z ktorego wywodzą się współautorzy kilku wspólnych publikacji.

Po zapoznaniu się z dostarczoną dokumentacją stwierdzam, iż dr Remigiusz Worch spełnia warunki formalne by ubiegać się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Podsumowując, na podstawie analizy dorobku naukowego Dr Remigiusza Worcha oraz prac składających się na jego osiągnięcia badawcze, uważam, że jego osiągnięcie naukowe, pozostały dorobek naukowo-badawczy oraz dorobek dydaktyczny, organizacyjny i popularyzatorski w pełni spełniają wymogi zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i w związku z tym pozytywnie opiniuję jego wniosek o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.