

Poznań 10.12.2021 r.

Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak  
Pracownia Wirusologii Molekularnej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
w Poznaniu

## O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani **mgr Kingi Marii Grabowskiej**, zatytułowanej

***Interakcje glikoproteiny B wybranych alfaherpeswirusów z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II,***

wykonanej w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotorem rozprawy była Pani prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk, a Promotorem pomocniczym – Pani dr Andrea Lipińska.

Wirusy zaliczane do rodziny *Herpesviridae* stanowią dużą grupę wirusów zakażających człowieka, jak też liczne gatunki zwierząt. U ludzi mogą być przyczyną częstych chorób – od zmian skórno-słuzówkowych do nowotworów. Jedną z charakterystycznych ich cech jest zdolność do wywoływania zakażenia utajonego – tak zwanej latencji, w którym można wyróżnić trzy fazy: ustalenie latencji, utrzymanie latencji i reaktywację zakażenia wirusowego. Mechanizmy molekularne latencji nie są poznane. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że w procesie tym ważną rolę odgrywają czynniki komórkowe, jak również wirusowe. Podczas zakażenia herpeswirusami obserwuje się modulację odpowiedzi immunologicznej przez białka wirusowe oraz uwalnianie przez komórki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych EV (ang. *extracellular vesicles*).

Celem przedstawionej do oceny pracy było zbadanie, czy wirusowa glikoproteina B (gB) wybranych alfaherpeswirusów pełni rolę immunodelującą oraz charakterystyka fizykochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, uwalnianych z komórek zakażonych wybranymi alfaherpeswirusami. Z tego względu Doktorantka – mgr Kinga Grabowska postanowiła zbadać oddziaływanie gB z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II. Glikoproteina B występuje u wszystkich wirusów herpes i odgrywa ważną rolę w procesie wnikania wirusa do komórki. Białko to jest zlokalizowane w wirusowej osłonce i wiąże się z resztami cukrowymi siarczanu heparanu w błonie komórkowej gospodarza, co umożliwia wiązanie wirusowych glikoprotein z receptorami komórkowymi: białkiem HVEM (ang. *Herpesvirus entry mediator*), nektyną 1 i 2 oraz fuzję wirusowej osłonki z błoną komórki gospodarza i uwolnienie nukleokapsydu do cytoplazmy. W początkowej fazie infekcji, replikacji wirusów, rozprzestrzenianiu się wirusowych cząstek potomnych do sąsiednich komórek oraz w modulowaniu przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej ważną rolę pełnią szlaki endocytarno-endosomalne i związane z nimi pęcherzyki EV. W formowanie pęcherzyków EV

oraz składanie dojrzałych wirionów wirusów herpes obecnych w egzosomach zaangażowane są białka wchodzące w skład kompleksu ESCRT-III (ang. *endosomal sorting complexes required for transport*).

Przedmiotem badań mgr Kingi Grabowskiej była gB wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1), bydłęcego herpeswirusa 1 (BoHV-1) i wirusa pseudowścieklizny (PRV). Badania prowadzono na komórkach stabilnych linii komórkowych z konstytutywną ekspresją genów gB. W tym celu wykorzystano:

- linię ciągłą komórek ludzkiego czerniaka MeiJuSo, wykazujących konstytutywną ekspresję cząsteczek MHC II,
- linię MeiluSo gD BoHV-1 komórek z ekspresją genu glikoproteiny B bydłęcego herpeswirusa,
- komórki Jurkat linii ludzkich limfocytów w stadium ostrej białaczki, niewykazujące konstytutywnej ekspresji cząsteczek MHC klasy II,
- komórki linii MDBK, wywodzącej się z komórek embrionalnych pochodzących z nerki bydłęcej, wykazujące konstytutywną ekspresję cząsteczek MHC klasy II,
- komórki linii SK6 spontanicznie nieśmiertelnianych komórek nerki świnińskiej, niewykazującą konstytutywnej ekspresji cząsteczek MHC klasy II,
- komórki ludzkie linii Huh-7 izolowane z guza ludzkiego nowotworu wątroby,
- komórki Vero pochodzące z nerki kotawca jasnonogiego oraz
- komórki linii GP2-293 wywodzące się z ludzkiej nerki, transformowane adenowirusem i transfekowane plazmidem umożliwiającym ekspresję genu dużego antygeny wirusa SV 40.

Realizację celów badań Doktorantka rozpoczęła od namnożenia wirusowych cząstek, z których izolowała wirusowy DNA, stanowiący matrycę do powielania sekwencji kodującej gB wirusów HSV 1, BoHV-1 i PRV za pomocą techniki PCR. Geny gB wklonowała do plazmidu pLZRS-IRES-DeltaNGFR. Plazmidami tymi transfekowane były komórki pakujące, w celu uzyskania cząstek retrowirusowych, którymi transdukowała wybrane komórki linii ssaczy. W komórkach syntetyzujących wirusowe białko gB mgr Kinga Grabowska prześledziła lokalizację białka gB na szlaku endosomalno-egzosomalnym. W tym celu wykorzystwała swoiste, znakowane przeciwciała przeciw gB oraz przeciwciała skierowane na białka markerowe wczesnych endosomów (anty EEa1), białka markerowe recyrkulujących endosomów (anty Rab110), późnych endosomów (anty Rab7) i białka markerowego lizosomów (anty LAMP1). Kolokalizację wybranych białek szlaku endosomalno-egzosomalnego z gB analizowała za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej.

Analiza otrzymanych obrazów oraz wartość współczynnika korelacji Pearsona dla porównywalnych kanałów detekcji analizowanych białek w komórkach wybranych linii wykazała, że obecność gB w badanych komórkach nie powoduje znaczących zmian w lokalizacji wybranych białek markerowych. Występowanie gB stwierdziła także w strukturach powiększonych endosomów. Następnie Doktorantka analizowała lokalizację gB, cząsteczek MHC II i egzosomalne białko markerowe CD63 w komórkach zakażonych wirusami HSV 1, BoHV-1 i PRV, stosując trójkolorową immunofluorescencyjną mikroskopię konfokalną. Analiza otrzymanych obrazów dowiodła, że trzy badane białka kolokalizują w skupiskach reprezentujących struktury pęcherzykowe. Ponadto, wartość współczynnika korelacji Pearsona wykazała wyższy stopień kolokalizacji CD63-MHC II w obecności gB. Wyniki tych badań skłoniły Doktorantkę do izolacji EV. Mgr Kinga Grabowska EV izolowała z pożywki hodowlanej komórek linii stabilnych z konstytutywną ekspresją wirusowych gB, stosując filtrację żelową SEC (ang. *Size-exclusion chromatography*). We frakcjach wycieku identyfikowała białka markerowe egzosomów (CD63, Flotylinę2, Alix), stosując Western Blotting oraz mitochondrialne białka Tom 40 i kalneksynę, w celu wykluczenia zanieczyszczeń komórkowych. Morfologię pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zbadała, używając transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wielkość

EV wahała się od 40 do 180 nm. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające gB mgr Kinga Grabowska zidentyfikowała dla wszystkich badanych wirusów herpes, jakkolwiek wzór ich glikozylacji różnił się. Analizując glikozylację gB w preparatach traktowanych endoglikozydazą H (Endo H) i peptydylo-N glikozydazą (PNGaza F), Doktorantka potwierdziła obecność różnych form gB: gBa, gBb i gBc.

Bardzo interesujący nurt badań Doktorantki stanowiła analiza poziomu białka MHC II w komórkach z ekspresją wirusowych glikoprotein gB. Mgr Kinga Grabowska wykazała, że poziom MHC II jest obniżony w populacji komórek linii MJS z ekspresją gB wirusa HSV-1 (o 60%), ale znacznie mniej dla MJS gB BoHv-1 (o 40%), natomiast obecność gB PRV się nie zmieniała. Z kolei, ekspresja tetraspaniny w badanych komórkach nie ulegała zmianie. Badania te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i swoistych przeciwciał. Obniżony poziom cząsteczek MHC II jest prawdopodobnie spowodowany oddziaływaniem gB z homologiczną sekwencją aminokwasową łańcucha polipeptydowego białka Ii/CD74, przyłączanego do MHC II. Obecność potencjalnych miejsc wiązania gB badanych wirusów do cząsteczki MHC II Doktorantka określiła, przeprowadzając analizę porównawczą sekwencji aminokwasowej potencjalnych miejsc wiązania w glikoproteinie B oraz łańcuchach niezmienionego Ii/CD74 do cząsteczki MHC II. Następnie, w celu potwierdzenia oddziaływania gB-MHC II, Doktorantka zastosowała immunoprecypitację z wykorzystaniem swoistych przeciwciał oraz analizę wytrąconych kompleksów za pomocą techniki Western Blotting. Wyniki tych badań potwierdziły tworzenie kompleksów gB z MHC II, z wyjątkiem gB wirusa PRV. Wskazuje to, że gB badanych wirusów w różny sposób wpływają na formowanie kompleksów z MHC II w komórkach różnych typów. Następnie, stosując wirowanie w gradiencie w jodiksanolu, mgr Kinga Grabowska wyizolowała pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane z komórek zakażonych wirusami HSV 1, BoHV-1 i PRV, które analizowała z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz stosując technikę Western Blotting. Doktorantka wykazała, że gB HSV 1, BoHV-1 i PRV, pochodzące z komórek linii MJS, wpływają na poziom MHC II zarówno w komórkach, jak i w EV wydzielanych przez komórki.

W kolejnym etapie badań mgr Kinga Grabowska dowiodła, że wytwarzane zewnątrzkomórkowe pęcherzyki przez zakażone wirusem komórki linii MJS i MJSgB HSV 1 są wchłaniane przez komórki linii Huh HSV 1. Proces ten został zobrazowany na zdjęciach oraz na filmie z mikroskopowego zapisu poklatkowego przeprowadzonych doświadczeń, na załączonym do pracy nośniku danych.

Analizując wyniki badań Doktorantki, stwierdzam, że cele wytyczone na wstępie pracy zostały w pełni zrealizowane. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i wnoszą nowe dane odnośnie oddziaływania białek wirusów herpes z komórkowym szlakiem endosomalno-egzosomalnym.

Za najważniejsze osiągnięcie

mgr Kingi Grabowskiej uważam wykazanie występowania gB wirusów herpes w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz ich udziału w hamowaniu aktywności cząsteczek MHC II. Ważnym osiągnięciem Doktorantki jest optymalizacja metody izolowania EV, co ma istotne znaczenie dla badań nad wirusowymi mechanizmami immunomodulującymi, których poznanie jest ważne dla opracowania nowych leków przeciwwirusowych i szczepionek.

Tematyka badań Doktorantki dotyczy zagadnień nowych i bardzo trudnych, wymagających znajomości oraz umiejętności posługiwania się licznymi metodami badawczymi. Magister Kinga Grabowska wykazała się znajomością i umiejętnością wykorzystania najnowszych oraz różnorodnych metod badawczych z wirusologii, biologii molekularnej, immunologii, technik mikroskopowych oraz bioinformatyki. Wachlarz metod wykorzystanych przez Doktorantkę jest bardzo szeroki, a zastosowany w pracy był adekwatny do wytyczonych celów badań.

Rozprawa doktorska mgr Kingi Grabowskiej została przedstawiona w formie 136-stronicowego wydruku komputerowego, w układzie typowym dla tego typu prac. Część

tematykę badanych zagadnień. Rozdział ten jest napisany w sposób interesujący i jasny, w oparciu na najnowszej literaturze przedmiotu. Cel badań został zaprezentowany w sposób zrozumiały i uzasadniony, a stosowane w pracy metody badawcze – wytyczone i konsekwentnie realizowane – są dokładnie opisane w rozdziale Materiały i metody. Uzyskane wyniki, zamieszczone w rozdziale czwartym, bogato ilustrowanym na 27 rycinach i zdjęciach na załączonym nośniku, były także poddane analizie statystycznej. Dokumentacja wyników jest bardzo staranna. Wyniki badań własnych Doktorantka dyskutuje z danymi z literatury przedmiotu w rozdziale zatytułowanym Dyskusja, wskazując na dobrą znajomość autorki pracy najnowszej literatury przedmiotu i zrozumienie badanych zagadnień. Do pracy dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz bogata bibliografia, obejmująca 136 pozycji literatury przedmiotu. Odczuwam brak podrozdziału dotyczącego wyszczególnionych wniosków z badań, jednak za usprawiedliwione uważam wnioski wyciągane na poszczególnych etapach badań.

Rozprawę doktorską Pani Kingi Grabowskiej oceniam bardzo wysoko. Uważam, że praca ta wnosi szereg nowych danych do badań nad biologią wirusów herpes, które mogą być pomocne w diagnostyce i profilaktyce zakażeń wirusami herpes. Liczne wyniki badań zostały już opublikowane przez Doktorantkę w czasopiśmie „Viruses” w 2020 roku oraz były prezentowane na konferencjach.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgr Kingi Marii Grabowskiej zasługuje na stosowne wyróżnienie.

Praca doktorska Pani mgr Kingi Marii Grabowskiej spełnia wszelkie wymogi określone w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU z 2017 r., poz. 1789). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Kingi Marii Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Kingi Marii Grabowskiej odpowiednią nagrodą.



Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak

### **Uzasadnienie**

Rozprawa doktorska mgr Kingi Marii Grabowskiej wnosi nowe dane dotyczące biologii wirusów herpes. Doktorantka wykazała, że białka wirusa mogą modulować odpowiedź immunologiczną organizmu na zakażenia, co może mieć doniosłe znaczenie przy ustalaniu latencji wirusów. Praca ta poza aspektem poznawczym jest znacząca dla diagnostyki i profilaktyki zakażeń.

### **Uzasadnienie**

Rozprawa doktorska mgr Kingi Marii Grabowskiej wnosi nowe dane dotyczące biologii wirusów herpes. Doktorantka wykazała, że białka wirusa mogą modulować odpowiedź immunologiczną organizmu na zakażenia, co może mieć doniosłe znaczenie przy ustalaniu latencji wirusów. Praca ta poza aspektem poznawczym jest znacząca dla diagnostyki i profilaktyki zakażeń.