

Molekularny mechanizm działania wybranych  
immunomodulacyjnych białek alfaherpeswirusów

---

## AUTOREFERAT



Dr Andrea Diana Lipińska

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2023

Gdańsk, 31 lipca 2023r.

1. Imię i nazwisko.

**Andrea Diana Lipińska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne — z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

• **2006 Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii**

Stopień nadany przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku w dniu **5 lipca 2006**, na podstawie rozprawy pt. „*Identification and characterization of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) proteins interfering with the host immune response* (Identyfikacja i charakterystyka białek bydłęcego herpeswirusa 1 (BHV-1) odpowiedzialnych za hamowanie odpowiedzi immunologicznej)” – praca napisana w języku angielskim, wykonanej w Katedrze Wirusologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii. Promotor prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk.

Rozprawa została wyróżniona przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii.

• **1999 Magister biotechnologii**

Stopień nadany przez Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Praca magisterska pt. „„Ekspresja i analiza rekombinowanych glikoprotein gE i gI wirus BHV-1 (bydłęcego herpeswirusa typu 1) w systemie bakulowirusowym” została wykonana pod opieką prof. dr hab. Bogusława Szewczyka w Katedrze Wirusologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**2008 — obecnie**

Adiunkt, Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

**2006 - 2008**

Asystent, Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

**2004 - 2005**

Starszy technik, Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.)

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Osiągnięcie naukowe przedstawione w niniejszym wniosku stanowi cykl powiązanych tematycznie **7 publikacji naukowych**, które zostały zebrane pod wspólnym tytułem „**Molekularny mechanizm działania wybranych immunomodulacyjnych białek alfaherpeswirusów**”.

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

Poniższe oryginalne publikacje doświadczalne zostały opublikowanych w latach 2011-2023:

1. Verweij M.C., **Lipińska A.D.**, Koppers-Lalic D., van Leeuwen W.F., Cohen J.I., Kinchington P.R., Messaoudi I., Bienkowska-Szewczyk K., Rensing M.E., Rijsewijk F.A., Wiertz E.J. (2011) The capacity of UL49.5 proteins to inhibit TAP is widely distributed among members of the genus *Varicellovirus*.

**Journal of Virology**, 85(5), 2351-2363. DOI: 10.1128/JVI.01621-10.

IF<sub>2011</sub>=5,402; punkty MNiSW<sub>2010</sub>=32; punkty MNiSW<sub>2012</sub>=40 (brak wykazu w 2011r.), liczba cytowań: 33.

2. Verweij M.C.\*, **Lipińska A.D.\***, Koppers-Lalic D., Quinten E., Funke J., van Leeuwen H.C., Bieńkowska-Szewczyk K., Koch J., Rensing M.E., Wiertz E.J. (2011) Structural and functional analysis of the TAP-inhibiting UL49.5 proteins of varicelloviruses.

*\* oznaczono autorów o równocennym wkładzie w powstanie danej pracy*

**Molecular Immunology**, 48(15-16), 2038-2051.

DOI: 10.1016/j.molimm.2011.06.438.

IF<sub>2011</sub>=2,897; punkty MNiSW<sub>2010</sub>=32; punkty MNiSW<sub>2012</sub>=25 (brak wykazu w 2011r.), liczba cytowań: 29.

3. Graul M., Kisielnicka E., Rychłowski M., Verweij M.C., Tobler K., Ackermann M., Wiertz E.J.H.J., Bieńkowska-Szewczyk K., **Lipińska A.D.\*** (2019) Transmembrane regions of bovine herpesvirus 1-encoded UL49.5 and glycoprotein M regulate complex maturation and ER-Golgi trafficking.

*\* autor korespondencyjny*

**Journal of General Virology**, 100(3):497-510. DOI 10.1099/jgv.0.001224.

IF<sub>2019</sub>=3,376; punkty MNiSW<sub>2019</sub>=70; liczba cytowań: 5.

4. Karska N., Graul M., Sikorska E., Zhukov I., Ślusarz M.J., Kasprzykowski F., **Lipińska A.D.\***, Rodziejewicz-Motowidło S.\* (2019) Structure determination of

UL49.5 transmembrane protein from bovine herpesvirus 1 by NMR spectroscopy and molecular dynamics.

\* oznaczono autorów, którzy wspólnie i równocześnie nadzorowali powstawanie pracy

***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes***, 1861(5), 926-938.

DOI 10.1016/j.bbamem.2019.02.005.

IF<sub>2019</sub>=3,411; punkty MNiSW<sub>2019</sub>=100; liczba cytowań: 7.

5. Wąchalaska M., Graul M., Praest P., Luteijn R.D., Babnis A.W., Wiertz E.J.H.J., Bieńkowska-Szewczyk K., **Lipińska A.D.\*** (2019) Fluorescent TAP as a platform for virus-induced degradation of the antigenic peptide transporter.

\* autor korespondencyjny

Cells, 8(12):1590. DOI: 10.3390/cells8121590.

IF<sub>2019</sub>=5,656; punkty MNiSW<sub>2019</sub>=140; liczba cytowań: 7.

6. Karska N., Graul M., Sikorska E., Ślusarz M.J., Zhukov I., Kasprzykowski F., Kubiś A., **Lipińska A.D.**, Rodziejewicz-Motowidło S. (2021) Investigation of the effects of primary structure modifications within the RRE motif on the conformation of synthetic bovine herpesvirus 1-encoded UL49.5 protein fragments.

**Chemistry & Biodiversity**, 18(2):e2000883. DOI: 10.1002/cbdv.202000883.

IF<sub>2021</sub>=2,745; punkty MNiSW<sub>2019</sub>=70; liczba cytowań: 4.

7. Graul M., Karska N., Wachalska M., Krupa P., Ślusarz M.J., Lubocki M., Bieńkowska-Szewczyk K., Rodziejewicz-Motowidło S., Sieradzan A.K.\*, **Lipińska A.D.\***, (2023) The N-terminal proline hinge motif controls the structure of bovine herpesvirus 1-encoded inhibitor of the transporter associated with antigen processing required for its immunomodulatory function.

\* oznaczono autorów korespondencyjnych

**Journal of Molecular Biology**, 13;435(5):167964. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.167964.

IF<sub>2023</sub>=6,151; punkty MEiN<sub>2023</sub>=140; liczba cytowań: 1.

Współczynnik oddziaływania (IF) oraz punktacja ww. publikacji zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania oraz zgodnie z punktacją MSWiN/MEiN dla danego okresu; liczba cytowań wg Google Scholar.

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **29,638**

Łączna liczba cytowań wg bazy Google Scholar to **86**; wg bazy Web of Science to: **57**

Index Hirscha ww. publikacji według bazy Google Scholar – **12**

Index Hirscha ww. publikacji według bazy Web of Science – **11**

ORCID:0000-0002-8115-9499

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w **załączniku nr 3.1**. Oświadczenia habilitantki dotyczące wkładu w powstanie wykonanych prac znajdują się w **załączniku nr 3.2**.

### c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Cykl wymienionych powyżej publikacji przedstawia wyniki moich prac badawczych prowadzonych w Katedrze Wirusologii Molekularnej (przekształconej w 2012r. w Zakład Biologii Molekularnej Wirusów) Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Prace te wynikały z mojego głównego zainteresowania naukowego zagadnieniami oddziaływania wirusów z układem immunologicznym gospodarza, a w szczególności strategiami immunomodulacyjnymi, prowadzącymi do tzw. „ucieczki immunologicznej” (ang. „*immune evasion*”). Wirusy, aby przetrwać w toku ewolucji, nabyły zdolność do ukrywania się przed składnikami układu immunologicznego lub ich aktywnego hamowania. Herpeswirusom - dużym wirusom o genomach w postaci dwuniciowego DNA, kodującego dużą liczbę immunogennych białek, przysługuje tytuł „*mistrzów ucieczki immunologicznej*”, ponieważ liczba różnych białek i małych niekodujących RNA wirusowych zaangażowanych w immunomodulację, jest u herpeswirusów wyróżniająca. Dodatkowo, herpeswirusowe białka immunomodulacyjne działają w oparciu o różnorodne strategie, celując w komórkowe szlaki odporności wrodzonej, jak i szlaki prezentacji antygenów, odpowiedzialne za aktywację limfocytów B i T. Hamowanie prezentacji antygenów jest szczególnie ważne ze względu na wykorzystywaną przez herpeswirusy **latencję** - stan utajenia w określonych tkankach gospodarza (układu nerwowego u alfaherpeswirusów) i cyklicznych reaktywacji z tego stanu, co naraża wirusy na spotkanie ze składnikami aktywowanego wcześniej układu odpornościowego.

Przedstawione w niniejszym autoreferacie prace wyrosły „z pnia” badań w ramach pracy doktorskiej, wykonanej w Katedrze Wirusologii Molekularnej w latach 2000-2006, podczas których uczestniczyłam w identyfikacji właściwości immunomodulacyjnych białka **UL49.5** (i ortologów) dla czterech **alfaherpeswirusów**: bydłęcego herpeswirusa 1 (BoHV-1), wirusa pseudowścieklizny/wścieklizny rzekomej (PRV) i końskich herpeswirusów 1 i 4 (EHV-1, EHV-4). Wykryłam także, że aktywność białka **UL49.5 BoHV-1** jako inhibitora kompleksu **transportera peptydów antygenowych TAP** jest negatywnie regulowana przez tworzenie kompleksu z drugim białkiem wirusowym – **glikoproteiną M (gM)** (Załącznik 4, p.II, pozycje 26-28) zestawienia całkowitego dorobku naukowego). Tworzenie **heterodimeru UL49.5/gM** u BoHV-1 pozwala na dojrzwanie obu białek w **retikulum endoplazmatycznym (ER)** i uwolnienie kompleksu z ER. UL49.5 związane przez gM nie oddziałuje z komórkowym transporterem TAP.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej pozostawiły duży niedosyt wiedzy w zakresie tej tematyki, szczególnie molekularnych aspektów oddziaływań między białkami i ich struktury. Ważnym „motorem” dalszych badań stał się **międzynarodowy staż badawczy w laboratorium prof. Emmanuela Wiertza w Leiden University Medical Center w Holandii** (lata 2002-2004, łącznie 13 miesięcy). W jego trakcie nie tylko finalizowałam doświadczenia do doktoratu (czego wynikiem jest podwójna afiliacja w publikacji w poz. 28 zestawienia całkowitego dorobku), ale rozpoczęłam nowy kierunek badań nad kompleksem UL49.5/gM. Moim celem było zrozumienie na poziomie molekularnym działania obydwu białek u wybranych alfaherpeswirusów. Staż ten rozpoczął również długoletnią współpracę

międzynarodową z zespołem prof. Wiertza, która zaowocowała 4 wspólnymi publikacjami po uzyskaniu stopnia doktora.

W celu określenia molekularnego mechanizmu działania kompleksu UL49.5/glikoproteina M zadałam sobie cztery pytania główne, na które starałam się odpowiedzieć w trakcie swoich badań:

1. Jak bardzo konserwowane wśród alfaherpeswirusów są właściwości immunomodulacyjne białka UL49.5?
2. Jaki jest mechanizm hamowania aktywności transportera TAP?
3. W jaki sposób następuje wiązanie UL49.5 i glikoproteiny M, które reguluje właściwości immunomodulacyjne białka UL49.5 oraz które motywy odpowiadają za wewnątrzkomórkowy transport UL49.5/gM?
4. Jaki jest mechanizm degradacji transportera TAP w przypadku ortologu UL49.5 byłącego herpeswirusa 1?

#### Ad.1.

**Transporter peptydów antygenowych** (pełna nazwa: transporter związany z przetwarzaniem antygenów, ang. *transporter associated with antigen processing*, **TAP**), jest kluczowym białkiem **szlaku prezentacji antygenów** zależnym od białek głównego układu zgodności tkankowej **MHC klasy I** w celu aktywacji **cytotoksycznych limfocytów T** i ich odpowiedzi, w tym przeciwwirusowej. TAP nie ma swojego funkcjonalnego zamiennika. Ewoluował w komórkach kręgowców jako zlokalizowany w błonie ER heterodimer, złożony z białek **TAP1** i **TAP2**. Geny *TAP1/TAP2* zidentyfikowano u przedstawicieli gromad ryb, płazów (*Xenopus levis*), gadów, ptaków i ssaków. Aspekty strukturalne są w przypadku TAP niezwykle ważne, ponieważ cała aktywność transportera opiera się na cyklu zmian konformacyjnych. TAP należy do transporterów ABC, które czerpią energię do transportu różnych substratów z wiązania i hydrolizy ATP. Jego substratem jest peptyd o określonej długości (zwykle 8-16 reszt aminokwasowych) i preferowanych sekwencjach, powstający w wyniku obróbki białek antygenowych przez proteasom, tzw. peptyd antygenowy. TAP posiada sumarycznie 19 helis transmembranowych, 9 w TAP1 i 10 w TAP2, tworzących domenę transmembranową TMD. Transport peptydu z cytoplazmy do światła ER następuje w wyniku cyklu złożonych zmian konformacyjnych, wśród których wyróżnia się trzy główne: spoczynkową konformację otwartą do cytoplazmy oraz pośrednią zamkniętą, gdy następuje wiązanie dwóch cząsteczek ATP i peptydu oraz jego translokacja pomiędzy helisami transbłonowymi transportera prowadząca do otwarcia się od strony światła ER i uwolnienia peptydu (konformacja otwarta do światła ER). Peptyd antygenowy zostaje przejęty przez MHC klasy I dzięki współdziałaniu białek opiekuńczych kompleksu PLC. Pełna hydroliza ATP wywołuje zmiany przywracające konformację spoczynkową. Związanie peptydu antygenowego warunkuje uwolnienie kompleksu MHC klasy I z ER na ścieżkę sekrecyjną do błony komórkowej, gdzie cząsteczki oddziałują z receptorem limfocytów cytotoksycznych.

Gen **UL49.5** (zawdzięcza swoją nietypową nazwę lokalizacji w genomie, w tzw. rejonie długim (ang. *unique long*, *UL*) pomiędzy wcześniej odkrytymi genami *UL49* i *UL50*) występuje u wszystkich herpeswirusów i należy do tzw. „*core genes*”, co wskazuje na ich ważną rolę. U niektórych przedstawicieli *Herpesviridae* **białko UL49.5** ulega N- lub O-glikozylacji i nosi nazwę glikoproteina N (gN). Rola tego białka polega zwykle na wspomaganie **glikoproteiny**

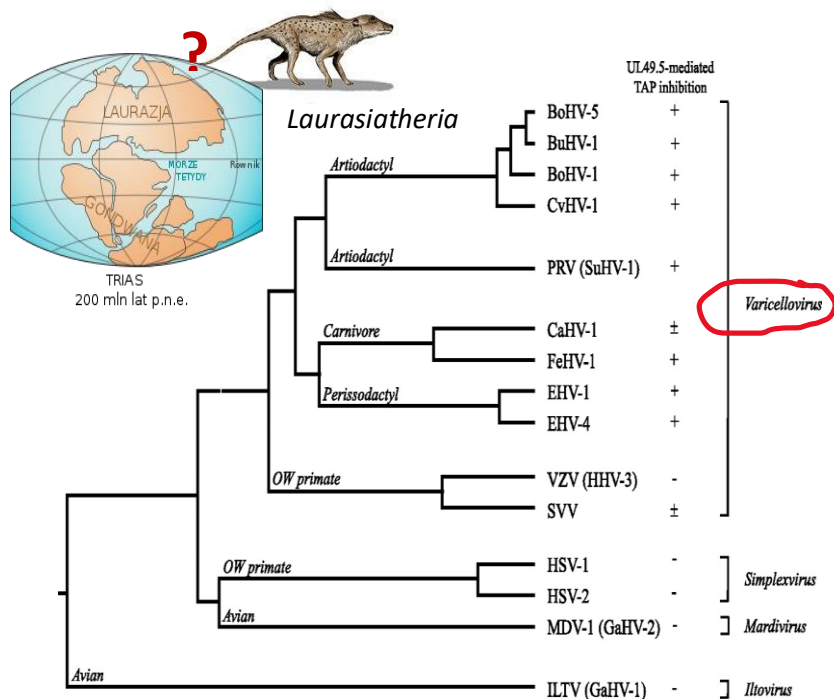
**M** (gM) w ramach kowalencyjnie związanego mostkiem dwusiarczkowym heterodimeru. Kompleks lokalizuje się w osłonce wirusa i uczestniczy w rozprzestrzenianiu się pomiędzy komórkami gospodarza.

W ramach pracy doktorskiej przyczyniłam się do zidentyfikowania ortologów UL49.5 BoHV1, PRV i EHV1/4 jako białek wiążących TAP i blokujących jego rearanżacje strukturalne potrzebne do translokacji peptydu, co jest cechą wspólną mechanizmu ich działania. UL49.5 EHV1/4 dodatkowo hamuje wiązanie ATP, a UL49.5 BoHV-1 dodatkowo indukuje degradację białek TAP1 i TAP2, zależną od proteasomu. U jednego z najważniejszych ludzkich patogenów alfaherpeswirusowych – wirusa opryszczki pospolitej HSV-1, UL49.5 nie ma zdolności wiązania TAP; wirus ten wykształcił za to inny inhibitor TAP - białko ICP47, działające w oparciu o inny mechanizm. Stopień konserwacji sekwencji aminokwasowej TAP u ssaków jest wysoki, natomiast stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowych wymienionych homologów UL49.5 jest niski; łączy je ogólna architektura budowy, podział na najdłuższą domenę N-terminalną, pojedynczą domenę transbłonową i krótki rejon cytoplazmatyczny na C-końcu białka. Biologiczną cechą wspólną u herpeswirusów jest również tworzenie heterodimeru z gM.

Naturalnym pierwszym pytaniem badawczym, które sobie zadałam, był stopień konserwacji właściwości immunomodulacyjnych UL49.5 u alfaherpeswirusów. Założyłam, że poszerzenie charakterystyki zdolności do hamowania TAP UL49.5 innych alfaherpeswirusów pozwoli porównać sekwencje aminokwasowe UL49.5 działających jako inhibitory i tych, które takich właściwości nie wykazują. Rezultaty tych badań opisuje pierwsza publikacja cyklu stanowiącego niniejsze osiągnięcie naukowe: [Verweij i wsp., JV 2011](#). W publikacji tej jestem drugim autorem, ponieważ w ramach zespołu badawczego i we współpracy międzynarodowej z zespołem prof. E. Wiertza oraz **dr Fransa Rijsewijka z Instytutu Zdrowia Zwierzęcego w Lelystad, Holandia**, rozdzielono badania nad poszczególnymi homologami UL49.5. Mój wkład to **stwierdzenie po raz pierwszy obecności inhibitora TAP u należących do rodzaju *Varicellovirus* kociego i psiego herpeswirusa (FeHV-1, CHV-1)**, izolacja genu UL49.5 tych wirusów, uzyskanie linii komórek ludzkiego czerniaka i linii specyficznych dla gospodarza (kocie, psie) z konstytutywną ekspresją UL49.5 tych wirusów i potwierdzenie ich właściwości immunomodulacyjnych. Linia ludzkiego czerniaka stała się najczęściej wykorzystywanym w moich badaniach modelem, ze względu na jej ustaloną „renomę” w badaniach szlaków prezentacji antygenów (linia ta produkuje zarówno cząsteczki MHC klasy I, jak i klasy II) oraz permissywność dla wirusów o znaczeniu weterynaryjnym, przynajmniej BoHV-1 i PRV.

Analizowane przeze mnie homologii UL49.5 nie wpływały na poziom białek ludzkiego TAP, ale silnie hamowały aktywność ludzkiego i swoistego dla gospodarza transportera. Stosując podobną metodykę, **zbadalam homologii UL49.5 z ptasich alfaherpeswirusów ILTV (ang. *infectious laryngotracheitis virus*, wirus zakaźnego zapalenie krtani i tchawicy u drobiu grzebiącego) i MDV-1 (wirus choroby Mareka u drobiu) oraz HVT (herpeswirus indyków), wykazując, iż nie mają one zdolności do hamowania TAP i MHC klasy I**, również w linii MJS oraz linii komórek ptasich. Praca w tym projekcie wymagała ode mnie wprowadzenia w laboratorium warsztatu pracy z nowymi gatunkami alfaherpeswirusów o znaczeniu weterynaryjnym i liniami laboratoryjnymi lub hodowlami pierwotnymi komórek ich gospodarza, np. izolowanymi z zarodków kurzych, czego nauczyłam się w trakcie wizyty badawczej w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach.

Wyniki potwierdzający mój wkład jako wykonawcy w tej publikacji są przedstawione na Rys. 3, 4, 7, 8 (cztery z siedmiu opisujących dane doświadczalne). Do tych doświadczeń wniosłam również autorstwo koncepcji badań i analizę wyników oraz ich graficzne przedstawienie; uczestniczyłam w przygotowaniu wersji oryginalnej manuskryptu. W ramach zespołu w tej publikacji dr Rijsewijk potwierdził zdolność do hamowania TAP oraz również degradacji transportera w przypadku blisko spokrewnionych z BoHV-1 wirusów BoHV-5 (herpeswirus bydła typu 5), BuHV-1 (herpeswirus bawołów) i CvHV-1 (herpeswirus jeleniowatych). Natomiast w zespole prof. Wiertza zbadano aktywność genu UL49.5 z prototypowego dla varicellovirusów ludzkiego wirusa ospy wietrznej i półpaśca VZV oraz spokrewnionego z nim blisko wirusa ospy wietrznej małp SVV, **wykazując, iż nie mają zdolności do hamowania transportera (Rys.1).**



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne wybranych alfaherpeswirusów, uwzględniające ewolucję ich gospodarzy. Zaznaczono występowanie genu UL49.5 o właściwościach immunomodulacyjnych (+) lub bez takich właściwości (-). Na podstawie Fig. 9 z Verwei i wsp., JV 2011.

Aspekt ewolucji molekularnej alfaherpeswirusów w kontekście białek-inhibitorów kompleksu TAP uważam za bardzo interesujące zagadnienie naukowe, wskazujące, że koewoluujące z gospodarzami herpeswirusy prawdopodobnie nabyły zdolność do wiązania TAP przez UL49.5 na etapie wirusa patogennego dla żyjącego jeszcze na superkontynencie Laurazji ssaczego przodka drapieżników i przeżuwaczy. Wirus HSV-1 oraz należący do podrodziny betaherpeswirusów ludzki cytomegalowirus i przedstawiciel gammaherpeswirusów, wirus Epsteina-Barr, posiadają inne geny, których produkty są inhibitorami TAP (jako przykłady zbieżnej ewolucji), natomiast ich homologi UL49.5 nie pełnią tej funkcji. W ramach kontynuacji badań w kontekście ewolucyjnym alfaherpeswirusów obecnie prowadzę badania nad zdolnością do hamowania transportera TAP przez **herpeswirusa fok typu 1 PhHV-1** (blisko spokrewniony z kocim i psim herpeswirusem). Interesuje mnie również **bydłęcy herpeswirus typu 2**, który jest bliżej spokrewniony z HSV-1, ale nie posiada genu-ortologu jego inhibitora TAP – białka ICP47. Czy to oznacza, że BHV-2 nie potrafi hamować transportu peptydów antygenowych?

Wyniki tej publikacji pozwoliły mi na porównanie sekwencji aminokwasowej badanych homologów UL49.5 i próbę wytypowania konserwowanych reszt aminokwasowych lub motywów, które mogłyby wyróżniać UL49.5 o właściwościach immunomodulacyjnych.

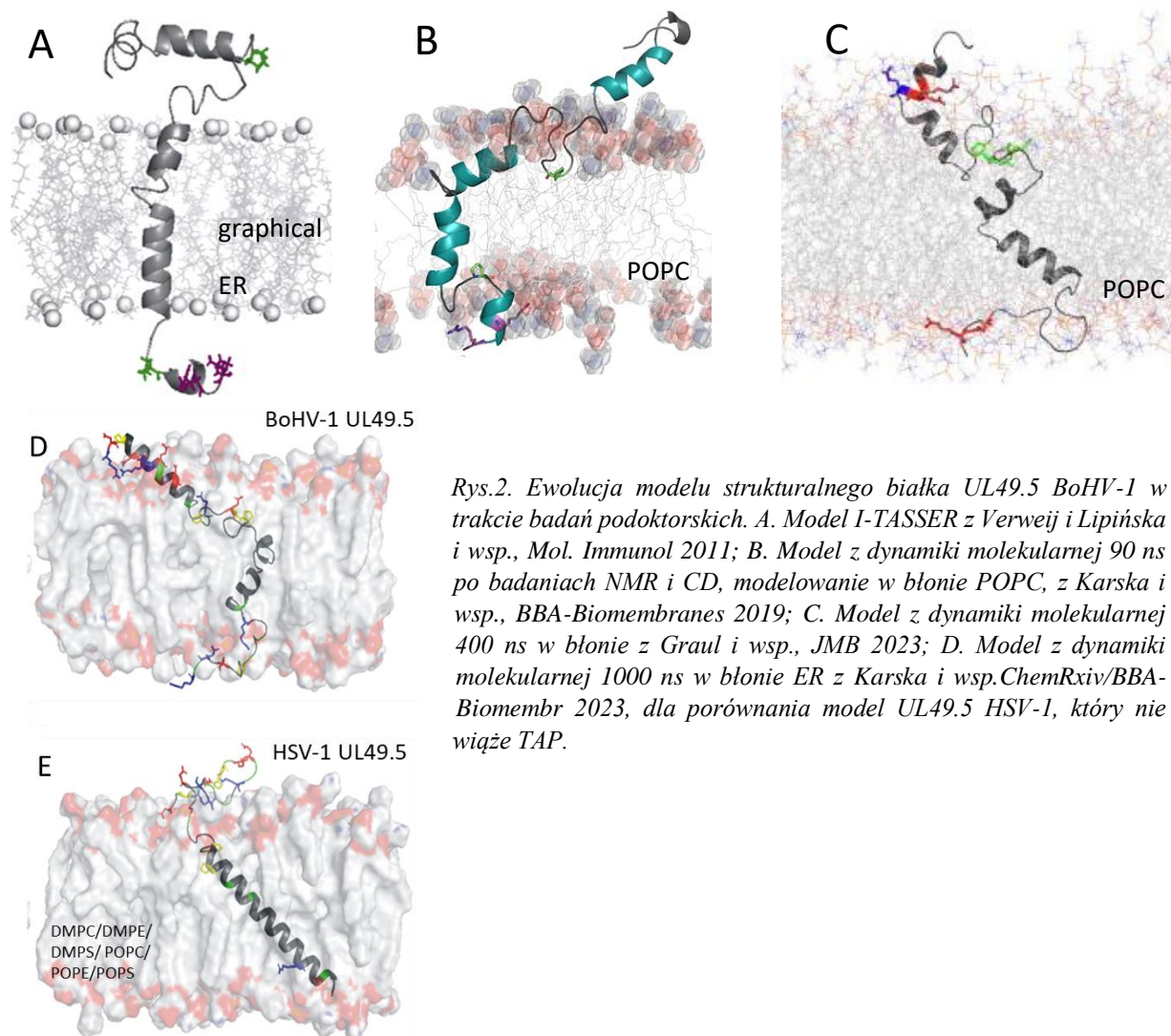


Takich sekwencji nie było dużo. Rolę tych rejonów i konkretnych reszt postanowiłam zbadać metodą mutagenyzy miejscowo-specyficzej oraz wymiany domen (ang. „*domain swapping*”), przechodząc do badań w zakresie drugiego pytania badawczego.

## Ad.2.

Porównanie sekwencji aminokwasowej homologów UL49.5 alfaherpeswirusów pozwoliło na wytypowanie do dalszych badań przede wszystkim rejonu RGRG (cztery dodatkowe reszty na C-końcu, które występują u ortologów UL49.5 zdolnych do degradacji TAP), KK/SS (potencjalne miejsca ubikwitynacji, które mogłyby wpływać na zdolność do degradacji transportera) oraz reszt prolinowych w domenie N-terminalnej (mogłyby wpływać na podobieństwo strukturalne). Rezultatem tych badań jest druga publikacja z cyklu, [Verweij i Lipińska i wsp., Mol. Immunol 2011](#), w której jestem równorzędnym pierwszym autorem razem z **Dr Marieke Verweij** z zespołu prof. Wiertza. Moja rola polegała na zaplanowaniu i przygotowaniu metodą mutagenyzy miejscowo-specyficzej i PCR konstruktów DNA z mutacjami punktowymi w genie *UL49.5* BoHV-1 w różnych kombinacjach, otrzymanie linii komórek MJS z konstytutywną ekspresją otrzymanych wariantów oraz określenie ich wpływu na poziom cząsteczek MHC klasy I i poziom białek TAP1/TAP2. Dodatkowo, dr Verweij przygotowała konstrukty kodujące białka z zamienionymi domenami, otrzymane metodą fuzyjnego PCR łączącego sekwencję kodującą domenę N-terminalną UL49.5 BoHV-1 z rejonem TM (transbłonowym) UL49.5 wirusa VZV niedziałającym jako inhibitor i odwrotnie: domenę N-terminalną UL49.5 z VZV z rejonem TM z UL49.5 BoHV-1 („*domain swapping*”). Wykorzystano również rejony TM białek komórkowych – białka CD3δ i receptora toll-podobnego 2. To podejście metodyczne miało wytypować przynajmniej domenę białka UL49.5 odpowiedzialną za jego aktywność względem TAP. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że do hamowania TAP jest potrzebna domena N-terminalna UL49.5 BoHV-1, zakotwiczona w błonie ER (może do zakotwiczenia wykorzystać rejon TM z innego białka), a do degradacji TAP niezbędny jest C-terminalny motyw RGRG, szczególnie obecne w nim reszty zasadowe. Co ciekawe, reszty lizyn i seryn, które wydawały się być najbardziej prawdopodobnymi miejscami do przyłączenia ubikwityny do UL49.5, określiłam jako zbędne do degradacji TAP.

*Wyniki potwierdzający mój wkład jako wykonawcy w tej publikacji są przedstawione na Rys. 7,8,9 (trzy z ośmiu opisujących dane doświadczalne). Do tych doświadczeń wniosłam również autorstwo koncepcji badań i analizę wyników oraz ich graficzne przedstawienie; uczestniczyłam w przygotowaniu wersji oryginalnej i ostatecznej manuskryptu. Efektem moich badań było zaprezentowanie pierwszego modelu strukturalnego białka UL49.5 BoHV-1, przygotowanego przez Dr Hansa van Leeuwena z Leiden University Medical Center w Holandii, z wykorzystaniem platformy I-TASSER (opierającej się na tzw. metodzie przeplatania motywów strukturalnych), przedstawiony w manuskrypcie jako Fig.10. Model ten stał się początkiem „podejścia strukturalnego” do badań białka UL49.5 i ewoluował podczas kolejnych lat moich badań podoktorskich (Rys.2).*



Rys.2. Ewolucja modelu strukturalnego białka UL49.5 BoHV-1 w trakcie badań podoktorskich. A. Model I-TASSER z Verweij i Lipińska i wsp., *Mol. Immunol* 2011; B. Model z dynamiki molekularnej 90 ns po badaniach NMR i CD, modelowanie w błonie POPC, z Karska i wsp., *BBA-Biomembranes* 2019; C. Model z dynamiki molekularnej 400 ns w błonie z Graul i wsp., *JMB* 2023; D. Model z dynamiki molekularnej 1000 ns w błonie ER z Karska i wsp. *ChemRxiv/BBA-Biomembr* 2023, dla porównania model UL49.5 HSV-1, który nie wiąże TAP.

„Podejście strukturalne” wynikało z wyciągniętego na tym etapie badań wniosku, że za aktywność immunomodulacyjną UL49.5 mogą odpowiadać nie tylko określone reszty aminokwasowe, lecz także motywy strukturalne, a poznanie struktury UL49.5 może pozwolić na wyjaśnienie zasady działania inhibitora. Uznałam, że wprowadzając mutacje punktowe bez znajomości wpływu zmian na strukturę białka, nie mogłam być pewna, czy zmiany upośledzają miejsce interakcji z TAP bezpośrednio, czy też wpływają ogólnie na strukturę białka i zmieniają jego aktywność w sposób pośredni. Ponieważ otrzymany przez serwer I-TASSER model UL49.5 wydawał mi się mało dokładny, zwróciłam się do zespołu **Prof. Adama Liwo z Pracowni Modelowania Molekularnego Wydziału Chemii UG**, który z kolei zasugerował wykonanie badań eksperymentalnych potrzebnych do lepszego zrozumienia struktury UL49.5 BoHV-1 i skierował mnie do **prof. Sylwii Rodziewicz-Motowidło z Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii UG**. W ten sposób rozpoczęła się moja wieloletnia współpraca z zespołem Prof. Rodziewicz-Motowidło, która zaowocowała 4 wspólnymi manuskryptami publikacji i 4 wnioskami grantowymi złożonymi do Narodowego Centrum Nauki.

**Badania strukturalne z wykorzystaniem techniki spektroskopii NMR i dichroizmu kołowego (CD)** fragmentów białka UL49.5 BoHV-1 oraz jego wariantów z substytucjami określonych reszt aminokwasowych przedstawiają dwie kolejne publikacje z cyklu: [Karska i wsp., BBA-Biomembranes 2019](#) i [Karska i wsp., Chemistry & Biodiversity 2021](#). W

pierwszej z tych publikacji, wspólnie i równocześnie z prof. Rodziewicz-Motowidło, nadzorowałam powstawanie pracy a dr Natalia Karska była pracownikiem typu „post-doc” w moim zespole badawczym, następnie przeniosła się do zespołu w Katedrze Chemii Biomedycznej. Od 2012r. opiekowałam się naukowo jako promotor pomocniczy doktorantką **Małgorzatą Graul** (doktorat w 2019r.), która również jest współautorką tych prac.

W ramach tych badań zostały przez dr Karską wykonane eksperymentalne badania strukturalne (CD, NMR) zsyntetyzowanych przez nią dwóch fragmentów białka UL49.5 BoHV-1, których wyniki posłużyły do opracowania metodą dynamiki molekularnej bardziej dokładnego modelu białka wirusowego. Moja rola w tych badaniach polegała na pomocy w zaplanowaniu fragmentów UL49.5 do syntezy chemicznej, w oparciu o dotychczasową wiedzę o białku wirusowym, oraz na uczestnictwie w interpretacji wyników, szczególnie ich znaczenia biologicznego. Większość mutantów punktowych UL49.5 BoHV-1 została zbadana strukturalnie (NMR, CD) i/lub wymodelowana, a ich aktywność sprawdzona przeze mnie i doktorantkę Małgorzatę Graul w hodowlach komórek ssaczy. W trakcie tych badań zrozumiałam również, że w badaniach strukturalnych UL49.5 i jego modelowaniu **ważną rolę powinien odgrywać model błony**. TAP jest kompleksem rezydującym w ER, UL49.5 wiąże TAP w ER, a błona ER różni się swoim składem lipidowym i grubością (to tylko niektóre ważne parametry) od błon innych kompartmentów. Założyłam, że reszty aminokwasowe UL49.5 mogą oddziaływać również z fosfolipidami błony, co będzie wpływać na strukturę białka. Model I-TASSER w ogóle nie uwzględniał obecności błony podczas modelowania. W obu powyższych publikacjach zarówno badania CD i NMR, jak i modelowanie, zostały wykonane w środowisku naśladującym biochemicznie błonę eukariotyczną (micele dodecylofosfatydylocholiny (DPC) i dwuwarstwa 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholiny (POPC)). Otrzymany eksperymentalnie model 3D białka UL49.5 pod wieloma względami różnił się od teoretycznego z serwera I-TASSER, chociaż zachowywał wspólny schemat architektury białka. Wprowadzenie do układu modelu błony fosfolipidowej pozwoliło na określenie, że białko UL49.5 BoHV-1 jest w dużej części „schowane” w błonie, ze światłem ER kontaktuje się jedynie fragment domeny N-terminalnej, a od strony cytoplazmy – głównie zbadany wcześniej motyw RGRG. Moją uwagę zwróciło również nietypowe ułożenie rejonów TM w błonie – **helisa TM** w tym białku jest wyraźnie **dwuczęściowa**, z przełamaniem struktury w środku i ułożeniem obu części fragmentu TM **pod kątem** (tu został on określony na 110°). Innymi motywami strukturalnymi, które mogłyby odgrywać ważną rolę w funkcjonowaniu białka, były jego N-terminalna  $\alpha$ -helisa oraz motyw prolinowy domeny N-terminalnej, który wydawał się dodatkowo zakotwiczać tę część białka w błonie.

Pierwszym walidowanym motywem strukturalnym była **N-terminalna helisa UL49.5** BoHV-1, która wg analizy struktury drugorzędowej nie występowała w alfaherpeswirusowych homologach niehamujących TAP. Dlatego w badaniach opublikowanych w **Chemistry & Biodiversity** wspólnie z prof. Rodziewicz-Motowidło, zaplanowałam substytucje w domenie N-terminalnej, które miały zaburzyć tworzenie  $\alpha$ -helisy. Chociaż predykcje struktury II-rzędowej wykonane metodami bioinformatycznymi wskazywały na zaburzenia w tworzeniu helisy, w badaniach eksperymentalnych (CD i NMR fragmentów UL49.5) okazało się, że N-terminalna  $\alpha$ -helisa w rejonie D24-G44 jest dość mało podatna na zmiany, w tym wynikające z zastąpienia **motywu RRE(30-32)** resztami glicyny lub proliny, które powinny „złamać” helisę. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskałam jednak helisę wydłużoną lub skróconą, co nie przekładało się na zmiany w aktywności białka. *Mój wkład w publikacji polegał również na zaplanowaniu eksperymentalnego wprowadzenia mutacji do motywu RRE metodą mutagenезy miejscowo-specyficznej, a następnie, przy współudziale Dr Małgorzaty Graul, członka mojego*

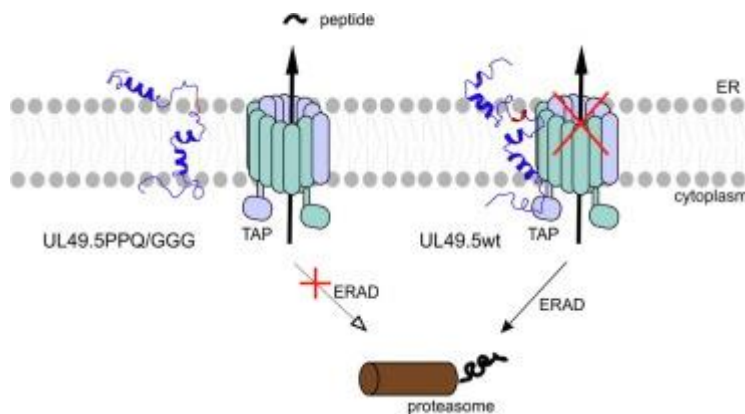
zespołu badawczego, otrzymanie linii komórek MJS z konstytutywną ekspresją otrzymanych wariantów oraz określenie ich wpływu na poziom cząsteczek MHC klasy I i poziom białek TAP1/TAP2. Analizowałam też wyniki, uczestniczyłam w przygotowaniu wersji oryginalnej i ostatecznej manuskryptu. Zbadanie roli motywu RRE miało być kontrolą pozytywną dla badań innych wariantów UL49.5, do porównania, ponieważ motyw ten został wcześniej opisany przez zespół **Shafiqula Chowdhuriego** z **Louisiana State University** (DOI: 10.1371/journal.pone.0025742) jako najbardziej kluczowy dla aktywności badanego białka. Taka sama sekwencja, badana przez nas, wykazywała jednak aktywność bardzo podobną do białka typu „dzikiego”; korelowało to również z małymi zmianami w strukturze białka, chociaż, jak wiadomo, czasami nawet niewielkie zmiany strukturalne mogą skutkować zmianami funkcjonalnymi. Dlatego ten wynik był dla nas nieoczekiwany i na tym etapie badań trudny do wyjaśnienia.

W ramach kontynuacji tych badań, w pracy opublikowanej jako **Graul i wsp., JMB 2023** razem z dr Małgorzata Graul z mojego zespołu, wprowadziłyśmy mutacje w motywie RRE do genomu wirusa BoHV-1 (mutant BoHV-1 UL49.5 RRE/AAA), by sprawdzić, jak zmienia się aktywność tego mutantu w czasie infekcji. Głównym celem tych badań było jednak określenie roli innego motywu strukturalnego UL49.5 BoHV-1, opartego na resztach prolin 52-53, tzw. **zawiasu prolinowego** w strukturze białka (**52PPQ53**). Motyw ten wydawał się mi dość wyróżniającym elementem składowym białka BoHV-1. *W publikacji tej jestem ostatnim autorem i równorzędnym autorem korespondencyjnym*, ponieważ praca ta obejmowała dwie części – badania strukturalne białka dwiema metodami modelowania molekularnego – „all-atom” (wykonane przez **dr Pawła Krupę** z **Instytutu Fizyki PAN** i dr Natalię Karską) i „UNited RESidue – UNRES” - te nadzorował **dr hab. Adam Sieradzan** z zespołu Prof. Liwo, oraz *badania biologiczne, w których moja rola polegała na zaplanowaniu doświadczeń konstrukcji serii wariantów UL49.5 z mutacjami w badanym rejonie, konstrukcji wektorów retrowirusowych do przenoszenia tych wariantów w celu konstrukcji linii stabilnych z UL49.5, a także zaplanowanie konstrukcji metodą homologicznej rekombinacji z DNA kasety do mutagenyzy wspomnianego wcześniej mutantu BoHV-1 UL49.5 RRE/AAA oraz **BoHV-1 UL49.5 PPQ/GGG**.*

*Do doświadczeń w tej części, oprócz autorstwa koncepcji badań, wniosłam analizę wyników oraz ich graficzne przedstawienie; w części strukturalnej uczestniczyłam w analizie i interpretacji wyników; jestem też głównym autorem odpowiedzialnym za przygotowanie wersji oryginalnej i ostatecznej manuskryptu.*

Przedstawione w tej publikacji wyniki badań zaprezentowały ewoluujący trzeci model 3D białka UL49.5 BoHV-1. Tym razem wykonaliśmy modelowanie dwiema metodami, które dały spójne wyniki, i przedłużony został czas symulacji. Model ten pozwolił nam na wskazanie, że motyw prolinowy odpowiada za **dotychczasowe zakotwiczenie domeny N-terminalnej białka**. Dzięki temu dodaliśmy tę rolę do listy możliwych funkcji motywów opartych o reszty prolin w białkach. Analiza dynamiki struktury w czasie pomogła również zrozumieć, że tak nietypowa błonowa kotwica reguluje ruchliwość poszczególnych części białka oraz dostępność C-końca białka w cytoplazmie. Model ten podkreślił również rolę zgięcia pomiędzy dwiema częściami rejonu transbłonowego, tu wyniósł on prawie 88° i ulegał wyraźnym zmianom w zmutowanych wariantach UL49.5. Te wszystkie zmiany strukturalne korelowały z wyraźnymi zmianami w aktywności UL49.5 z upośledzonym motywem PPQ. **Wykazałam, że mutant PPG/AAA lub PPQ/GGG to najbardziej upośledzona funkcjonalnie forma UL49.5**, jaką badałam. Zdolność do hamowania transportu TAP spadała o 60% w przypadku linii stabilnej z samym

wariantem genu i o 43% w komórkach infekowanych mutantem wirusowym BoHV-1 PPQ/GGG. Za tę zmianę aktywności najprawdopodobniej odpowiada dużo słabsze oddziaływanie z kompleksem TAP, co wykazała immunoprecypitacja kompleksu. Motyw PPQ może odpowiadać za interakcje z transporterem bezpośrednio lub regulować pośrednio strukturę wymaganą do zablokowania TAP. Motyw PPQ, pomimo, że znajduje się w domenie N-terminalnej białka, jest również niezbędny do indukowania degradacji transportera; rolę tę przypisujemy motywowi C-terminalnemu RGRG, którego dostępność dla maszyny ERAD najprawdopodobniej może się zmieniać bez prolinowej kotwicy (w tych cząsteczkach, które nadal, chociaż dużo słabiej wiążą TAP) (**Rys.3**).



Rys. 3. Abstrakt graficzny z Graul i wsp., *JMB* 2023 podsumowujący właściwości molekularne UL49.5 BoHV-1 z substytucjami w motywie PPQ domeny N-terminalnej („zawias prolinowy”).

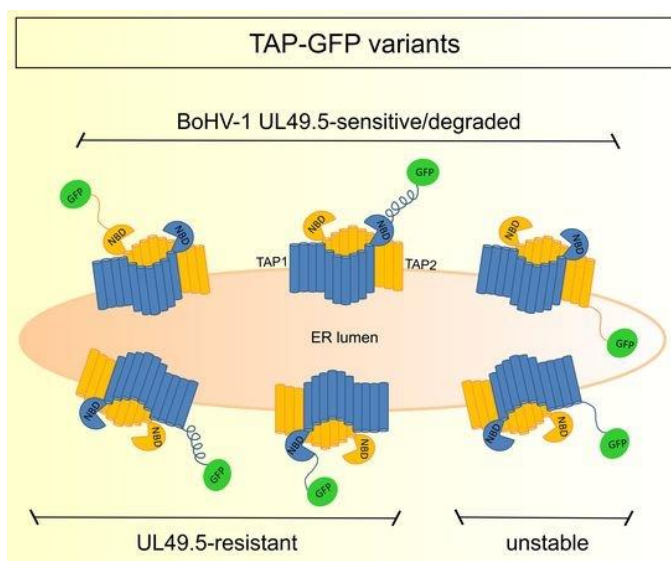
W badaniach tych mutant BoHV-1 RRE/AAA miał ponownie tylko nieznacznie upośledzoną zdolność hamowania transportu peptydów antygenowych, wiązał poprawnie transporter i indukował jego degradację tak, jak wirus typu „dzikiego”.

Dopiero moja dyskusja z Shafiqiem Chowdhury’em podczas konferencji międzynarodowej European Congress of Virology w Gdańsku w maju 2023r. pozwoliła wysunąć **mikrohipotezę**, która mogłaby częściowo wytłumaczyć obserwowane różnice w aktywności mutantu w motywie RRE. Otóż oprócz różnic w metodyce badań, mutant wykonany w USA jest oparty na innym szczepie wirusa - Cooper. Szczep ten nie jest genetycznie odległy od wykorzystywanego przez nas szczepu holenderskiego Lam, ale wg dr Chowdhury’ego ma on zupełnie inną kinetykę ekspresji genów UL495-gM oraz zdolność UL49.5 do oddziaływania z innymi białkami wirusowymi. To nie tłumaczy różnic obserwowanych w liniach stabilnych, gdzie jedynym elementem wirusowym jest gen UL49..5 o identycznej sekwencji w tych szczepach, ale postanowiłam w przyszłości zweryfikować mikrohipotezę o różnych szczepach wirusa, otrzymując, dzięki współpracy z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym - Państwowym Instytutem Badawczym w Puławach, referencyjny szczep Cooper BoHV-1.

Badania strukturalne UL49.5 będą kontynuować w przyszłości. Model białka nadal ewoluuje, a jego kolejną odsłonę przedstawiliśmy w pracy z poz. 1 zestawienia mojego całkowitego dorobku (**Karska i wsp., ChemRxiv/BBA-Biomembranes 2023**). W modelu tym zastosowano jeszcze bardziej przedłużoną symulację dynamiki molekularnej, ale przede wszystkim, opracowano do badań *in silico* (dr Paweł Krupa z Instytutu Fizyki PAN) model błony ER o składzie fosfolipidowym przypominających błonę biologiczną. W pracy tej dr Karska zbadała też strukturalnie homolog UL49.5 HSV-1, wskazując na znaczne różnice strukturalne między tymi białkami, przede wszystkim w rejonie TM (zgięty w BoHV-1/wyprostowany u HSV-1) i domenie N-terminalnej (mniej ruchliwa ustrukturyzowana, z motywem PPQ u BoHV-/nieustrukturyzowana, ruchliwa, bez dodatkowego zakotwiczenia u HSV-1). W pracy tej do uzyskanego wstępnego modelu TAP **zadokowano** też UL49.5 BoHV-

1, uzyskując wstępny model, wg którego motyw PPQ i rejon TM UL49.5 BoHV-1 mogą pełnić główną rolę w oddziaływaniach. Model ten wymaga optymalizacji i weryfikacji doświadczalnej, dlatego złożyliśmy z dr Krupą i zespołem prof. Rodziejcz-Motowidło wniosek grantowy OPUS do Narodowego Centrum Nauki na te badania, a dr Natalia Karska już uzyskała finansowanie z NCN w ramach projektu SONATA, żeby uzyskać struktury innych wirusowych inhibitorów TAP.

Badając oddziaływanie TAP z wariantami UL49.5 przez lata zmagaliśmy się z problemem braku dostępnych komercyjnie dobrych przeciwciał anti-TAP1 i anti-TAP2. Dlatego postanowiłam opracować platformę do badań komórkowych opartą na fluorescencyjnie znakowanej transporterze, w postaci fuzji z białkiem zielonej fluorescencji GFP. Wyniki tych badań prezentuje kolejna publikacja z cyklu: [Wachalska i wsp., Cells 2019](#). W roku 2014 Magda Wąchalska dołączyła do mojego zespołu jako doktorantka, nad którą sprawowałam opiekę jako promotor pomocniczy (doktorat został obroniony w 2022r.). Konstruując platformę TAP-GFP w komórkach MJS i komórkach ludzkiej białaczki U937, wykorzystaliśmy linie tych komórek z mutacją typu „knock-out” – delecją w genie TAP1 lub TAP2 (MJS) lub obu genów (U937). Takie podejście pozwoliło zastąpić endogenną podjednostkę TAP wersją egzogenną z GFP. Linie TAP1KO/TAP2KO otrzymałam dzięki współpracy z zespołem Prof. Wiertza z Holandii. Badania jeszcze z czasów pionierskich nad UL49.5 BoHV-1 pokazały, że dołączanie GFP do TAP może skutkować brakiem jego podatności na degradację. Dlatego w tej pracy postanowiłam zaplanować serię wariantów, dołączając GFP do TAP1 lub TAP2, od strony N- lub C-terminalnej, przy użyciu różnych linkerów (**Rys.4**). Dwa z konstruktyw wykazywały optymalną aktywność i podatność na UL49.5, więc wykorzystywałam je w kolejnych badaniach. W badaniach prezentowanych w pracy z Cells do uzyskanego systemu TAP-GFP wprowadziliśmy też geny kodujące inne inhibitory TAP – wirusowe białka ICP47 wirusa opryszczki HSV-1, US6 ludzkiego cytomegalowirusa i CPXV012 wirusa ospy krów, w celu porównania ich aktywności. Dowiedzieliśmy się, że białko UL49.5 obniżało poziom MHC klasy I na powierzchni komórek tak samo dobrze jak białko ICP47, za to jako jedne spośród badanych, wykazywało zdolność do degradacji transportera. Uzyskałam również ko-ekspresje genów inhibitorów w parach; jest



to podejście stosowane do ustalenia konformacji TAP wiązanej przez białka-inhibitory. Wg uzyskanych danych wciąż oczekujących na opublikowanie, UL49.5 wiąże konformację późniejszą niż ICP47, a wcześniejszą niż CPXV012, co jest zgodne z hipotezą, że to konformacja pośrednia ze związanym peptydem powinna być tą, którą UL49.5 blokuje.

*Rys.4. Abstrakt graficzny z Wachalska i wsp., Cells 2019, wizualizujący serię konstruktyw TAP-GFP przygotowanych jako platforma do dalszych badań aktywności UL49.5 i innych wirusowych inhibitorów TAP.*

Rola tworzenia heterodimeru z wirusową glikoproteiną M jest kluczowym podczas infekcji BoHV-1 mechanizmem regulującym aktywność UL49.5, co wykazałam w czasie swoich badań doktorskich (publikacja z załącznika 4, p.II, poz. 27). Zgłębiając aspekty molekularne funkcjonowania UL49.5, chciałam poznać **interakcje z glikoproteiną M również na poziomie molekularnym**, identyfikując te domeny białek, motywy lub reszty aminokwasowe, które są odpowiedzialne za to wiązanie. Zastosowałam podejście wprowadzania delecji w genach *UL49.5* i *UL10*, kodującym gM oraz mutagenezę miejscowo-specyficzną. Wyniki badań zebraliśmy w kolejnej publikacji z cyklu **Graul i wsp., JGV 2019**.

*W publikacji tej jestem ostatnim autorem i autorem korespondującym, sprawowałam podczas badań opiekę nad całym zespołem, w tym Małgorzatą Graul w ramach jej pracy doktorskiej. Odpowiadam za koncepcję badań, analizę wyników i ich wizualizację, przygotowanie wersji oryginalnej manuskryptu.* W pracy tej wykazaliśmy, że do tworzenia kompleksu UL49.5-gM i jego transportu do błony komórkowej nie są potrzebne domeny cytoplazmatyczne obu białek. Za te procesy wydaje się odpowiadać domena transbłonowa (gM ma 8 helis transbłonowych) oraz poprawne sfałdowanie białek zachodzące jedynie, gdy tworzą one kompleks. Domena cytoplazmatyczna gM jest konieczna do endocytozy kompleksu z powierzchni komórki i inkorporacji do wirionów BoHV-1 (endocytoza jest uważana u alfaherpeswirusów za mechanizm, dzięki któremu białka osłonki trafiają do miejsc składania wirionów). Badania te wymagały opanowania warsztatu konstrukcji mutantów wirusowych dzięki rekombinacji miejscowo-specyficznego DNA wirusa w postaci tzw. BAC (ang. *bacterial artificial chromosome*), czyli wielkiego plazmidu utrzymywanego w *E.coli*. Technologia ta jest szczególnie przydatna w przypadku modyfikacji genetycznych genomu wirusa, które upośledzają jego namnażanie. Technologię BAC pozyskałam dzięki nawiązaniu współpracy z **Prof. Mathiasem Ackermannem z Uniwersytetu w Zurychu w Szwajcarii**, gdzie doktorantka odbywała staż badawczy. Wynik pokazujący zbędność domeny cytoplazmatycznej gM do dojrzewania białka i jego akceptacji przez system kontroli jakości ER (ang. *ER quality control*) był dość nieoczekiwany, ponieważ licząca 32 reszty aminokwasowe domena cytoplazmatyczna glikoproteiny wydawała się najbardziej prawdopodobnym źródłem motywów odpowiadających za retencję w ER lub uwalnianie z ER. W czasie tych badań zaczęły się pojawiać doniesienia literaturowe o roli tzw. **motywów glicynowych/zamków glicynowych**. Zamek glicynowy to podwójny motyw glicynowy GxxxGxxxG, gdzie rolę reszty glicyny może pełnić inna reszta o niewielkim rozmiarze, jak alanina lub seryna. Dlatego postanowiliśmy zbadać sekwencję 8 rejonów transbłonowych gM i rejonu TM UL49.5 metodami bioinformatycznymi, poszukując potencjalnych motywów podobnych do glicynowych. Wytypowałyśmy 3 takie motywy w gM i jeden w rejonie TM UL49.5, co mogłoby tłumaczyć mechanizm oddziaływania obu białek BoHV-1. Sekwencje kodujące te motywy zostały poddane mutagenezie miejscowo-specyficznej, w rezultacie której obie reszty glicyny lub alaniny z motywu zostały zastąpione resztami leucyny, co jest przyjętą w przypadku tych motywów metodyką. Okazało się, że zmiany w obrębie **5** (szczególnie) i **7** motywu glicynowego gM znacząco upośledzały tworzenie kompleksu z UL49.5 oraz działanie ochronne gM, polegające na kompetycji z TAP. Ponieważ wykazałam, iż mutageneza potencjalnego motywu w UL49.5 nie wpływała na kompleks, wydaje się, że **motywy glicynowe są odpowiedzialne za utrzymanie konformacji domeny transbłonowej gM potrzebnej do wiązania UL49.5**. W badaniach tych zdecydowałam się też wykorzystać konstrukty UL49.5 z zamienionymi domenami z homologiem z wirusa VZV z publikacji Verweij, Lipińska i wsp., Mol. Immunol. 2011. Ponadto, wykorzystując sekwencję kodującą **rejon TM z**

**hemaglutyniny grypy** szczepu **H5N1** wyizolowanego w naszym laboratorium z zakażonego łabędzia, przygotowałam konstrukt, który pozwalał na zakotwiczenie domeny N-terminalnej UL49.5 BoHV-1 przez fragment TM z hemaglutyniny (HA). Konstrukty te pozwoliły określić, że jest możliwe tworzenie heterodimeru gM z chimerycznym białkiem z domeną N-terminalną UL49.5 BoHV-1 zakotwiczoną w błonie przez rejon TM z VZV lub HA grypy, ale jedynie rejon z natywnego białka z BoHV-1 warunkuje właściwe dojrzewanie i wewnątrzkomórkowy transport heterodimeru. Rola rejonu TM UL49.5 wydaje się więc być bardziej kluczowa dla oddziaływania z gM niż z TAP. W pracy z JMB natomiast pokazaliśmy, że rejon PPQ UL49.5 nie jest potrzebny do wiązania gM i dojrzewania kompleksu, w przeciwieństwie do oddziaływania z TAP.

#### Ad.4

W publikacji o roli motywu PPQ wykazaliśmy, że model fluorescencyjnego TAP można wykorzystać do badania degradacji transportera w obecności UL49.5. UL49.5 z mutacjami w motywie PPQ tracił zdolność do indukowania degradacji TAP.

Dlatego ważnym zadaniem badawczym stało się zrozumienie, jaki jest **mechanizm degradacji białek TAP1 i TAP2 w obecności UL49.5 BoHV-1** (i prawdopodobnie jego ortologów z motywem RGRG na C-końcu). Degradacja nie wydaje się być procesem niezbędnym do hamowania transportera TAP. Z perspektywy lat badań skłaniam się ku hipotezie, że jest jedynie ostatecznym usunięciem białek transportera, które i tak są zahamowane przez związanie UL49.5. Hipotezę tę potwierdzają skonstruowane warianty UL49.5 BoHV-1, z mutacjami zmieniającymi zaobserwowane podczas badań strukturalnych (NMR) mostki solne stabilizujące domenę N-terminalną: R30DR31D (RR/DD) i D36K, które mają niezmienną aktywność hamowania transportu peptydów antygenowych, ale nie destabilizują poziomu białek TAP. Wyniki te wciąż oczekują na opublikowanie, prezentowaliśmy je na konferencjach naukowych. W autoreferacie dodatkowo przedstawiłam wyniki naszych prac nad mechanizmem degradacji, które są zawarte w dwóch manuskryptach publikacji znajdujących się na dzień 31 lipca 2023r. w recenzjach. W badaniach tych wykorzystaliśmy model fluorescencyjnego TAP opublikowanego przez nas w Cells.

Planując badania, rozważałam dwie hipotezy badawcze dotyczące degradacji TAP zależnej od UL49.5 BoHV-1: 1) że UL49.5 utrzymuje po związaniu TAP konformację transportera, która jest podatna na degradację, intensyfikując usuwanie TAP przez system kontroli jakości białek ER powiązany ze szlakiem ERAD (ang. *ER-associated degradation*); 2) że UL49.5 pełni rolę adaptora rekrutującego składniki szlaku ERAD, które nie mają zdolności rozpoznawania TAP w nieobecności wirusowego białka. W celu weryfikacji hipotez zastosowaliśmy wysokoprzepustowe badania przesiewowe (ang. *highthroughput screening*). Pierwsze podejście badawcze to „screen” oparty na bibliotece interferującego RNA (siRNA), możliwy dzięki nawiązanej na krajowej konferencji współpracy z **dr hab. Romanem Szczęsnym z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie**. W tym zespole były dostępne sub-biblioteki siRNA oraz metoda wizualizacji efektu, oparta na zautomatyzowanej transfekcji i obserwacjach mikroskopowych zmian we fluorescencji (w naszym przypadku – TAP-GFP) po wyciszeniu poszczególnych genów z sub-biblioteki określonej jako „proteostaza – homeostaza białek”. Szczęśliwie w bibliotece tej, liczącej sobie siRNA dla 1920 genów człowieka znalazły się geny odpowiedzialnej ligazy ubikwityny, czyli białka E3. Jest nim wieloskładnikowa **CRL2** – ligaza oparta na platformie w postaci **kuliny-2**, wraz z białkami **elongina B i C**. CRL2 rozpoznaje różne białka komórkowe w zależności od specyficznego białka-receptora. W identyfikacji tego białka-receptora oraz innych białek uczestniczących



pomógł „screen” oparty na bibliotece lentiwirusowej sgRNA systemu CRISPR/Cas9. Badanie to wykonała doktorantka Magda Wachalska, którą się opiekowałam jako promotor pomocniczy, w ramach pobytu w laboratorium **Prof. Rona Kopito z Uniwersytetu Stanforda**, eksperta od degradacji białek. Staż ten zapoczątkował moją współpracę z Prof. Kopito, która na pewno będzie kontynuowana w przyszłości w celu weryfikacji roli innych białek wskazanych przez „screen”. Delecje genów w komórkach MJS-TAP2-GFP metodą CRISPR/Cas9 pozwoliły na wytypowanie na pierwszym miejscu białka **KLHDC3** (Kelch domain containing protein 3) jako receptora CRL2. Białko to uczestniczy w rozpoznawaniu tzw. **C-degronów**, czyli niekorzystnych w swoim składzie aminokwasowym motywów na C-kobnku białka, które promują ich intensywną degradację, przeważnie zależną od proteasomu. W naszym przypadku KLHDC3 rozpoznaje **motyw RGRG UL49.5**, rekrutując CRL2, które jest białkiem cytoplazmatycznym. W przypadku opublikowania wyników, będzie to pierwsze doniesienie o udziale CRL2 w systemie ERAD. Lista znanych białkowych substratów KLHDC3 jest krótka, dodaliśmy więc do niej kolejny, w tym pierwszy wirusowy. Stosując podejście strukturalne, **dr Magdalena Ślusarz z zespołu Prof. Liwo** wymodelowała KLHDC3 z decapeptydem reprezentującym C-koniec UL49.5 oraz pełną strukturę UL49.5 w błonie ER z KLHDC3. Modele te wskazują na ważne oddziaływania ostatniej reszty glicyny G95 oraz reszty argininy R93 w wiązaniu oraz tłumaczy, dlaczego reszty KK/SS UL49.5 (których rolę weryfikowałam w publikacji z Mol. Immunol.) nie są dostępne dla CRL2 do ubikwitynacji – są one zaangażowane w wiązanie KLHDC3. W rezultacie to TAP (nie wiemy jeszcze która podjednostka) staje się celem molekularnym ubikwitynacji i degradacji, a za degradację UL49.5 odpowiada inna komórkowa ligaza ubikwityny – HRD1 systemu ERAD. Badania weryfikujące oddziaływanie z KLHDC3 zamierzam kontynuować doświadczalnie, poprzez mutagenezę miejscowo-specyficzną KLHDC3. Można również podjąć próbę krystalizacji białka KLHDC3 z peptydem reprezentującym C-koniec UL49.5. Wg badań *in silico* wiązanie KLHDC3 może zmieniać umiejscowienie domen UL49.5 w błonie, co należałoby zweryfikować doświadczalnie – KLHDC3 jest w kompleksie UL49.5 z TAP, ale jak czasowo i przestrzennie ten kompleks się tworzy, w jakiej kolejności, jest kolejnym fascynującym pytaniem naukowym.

W swoich badaniach podoktorskich staram się łączyć badania aspektów strukturalnych białek w celu lepszego zrozumienia molekularnego mechanizmu ich działania i interakcji. Chciałabym móc „zobaczyć” na poziomie molekularnym kompleks UL49.5 z transporterem TAP i białkiem KLHDC3 oraz kompleks UL49.5 i gM. Moim naukowym celem jest próba opracowania modelu doświadczalnego do badań strukturalnych kompleksu TAP z UL49.5 BoHV-1 metodą **kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM)**. Rozpoczęłam przygotowania do ekspresji genów kompleksu w dwóch systemach eukariotycznych – systemie bakulowirusowym, gdzie produkcję samego TAP uzyskano już wcześniej, a ja uzyskałam ekspresję genu *UL49.5*, natomiast większe nadzieje pokładałam w systemie pierwotniakowym *Leishmania tarentolae*, w którym można wyprodukować w dużych ilościach, w miarę homogenicznie (co jest warunkiem do badań cryo-EM) białka eukariotyczne zbliżone modyfikacjami do tych otrzymywanych w komórkach ludzkich. Model do cryo-EM może stanowić wyzwanie, ponieważ oprócz trzech badanych białek w błonie ER (izolowanych jako mikrosomy), potrzebne jest dodanie do układu syntetycznego peptydu antygenowego i ATP. Badania będę próbować wykonać w Polsce, dzięki współpracy z **prof. Michałem Szymańskim** z naszego wydziału, w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Alternatywą są również badania w USA, w zespole

**dr Jue Chen** z Howard Hughes Institute, która otrzymała już strukturę cryo-EM TAP z białkiem ICP47 (jedyna dostępna struktura doświadczalna TAP), a z którą nawiązałam kontakt pisząc publikację o strukturze UL49.5 zadokowanej do TAP.

Na badania nad molekularnym mechanizmem działania UL49.5 otrzymałam finansowanie w ramach dwóch grantów badawczych. Po urlopach macierzyńskich, w 2011r otrzymałam grant w ramach II Edycji Programu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (*“Exploring new immune evasion mechanisms of herpesviruses the search for improvement strategies of anti-herpesviral vaccines and virus-based therapeutics”* – „Zgłębiając nowe mechanizmy „ucieczki immunologicznej” herpeswirusów – poszukiwanie nowych strategii udoskonalania szczepionek przeciwvirusowych i wektorów wirusowych stosowanych jako terapeutyki”), a następnie w 2015r. grant w ramach Projektu SONATA BIS4 Narodowego Centrum Nauki („Molekularny mechanizm działania białek alfa herpeswirusów kluczowych dla modulacji odpowiedzi immunologicznej”).

Za swoje najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu prac uważam:

- dodanie ortologów UL49.5 FHV-1 i CHV-1 do listy białek UL49.5, które są zdolne do hamowania kompleksu TAP,
- uzyskanie opartego na badaniach eksperymentalnych modelu 3D białka UL49.5 BoHV-1,
- wskazanie na ważną rolę motywu PPQ (zawiasu prolinowego) UL49.5 BoHV-1 w wiązaniu TAP i hamowaniu transportera, chociaż kontynuacja badań jest potrzebna do pełnego zrozumienia, w jaki sposób.
- wykazanie ważnej roli zamków glicynowych w rejonach TM glikoproteiny M w tworzeniu heterodimeru z UL49.5 BoHV-1, co reguluje aktywność UL49.5 podczas infekcji.
- wyjaśnienie, że za interakcje UL49.5-gM i dojrzewanie kompleksu/eksport z ER odpowiada struktura domeny transbłonowej, a nie konkretne sekwencje sygnałowe.
- rozwinięcie modelu badawczego i metodyki do badań wirusowych białek-inhibitorów kompleksu TAP.

A poza cyklem:

- identyfikację białek komórkowych odpowiedzialnych za degradację TAP indukowaną przez UL49.5 oraz za degradację samego UL49.5.

Znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju dziedziny nauk i dyscypliny biotechnologii:

Poznanie molekularnego mechanizmu działania alfa herpeswirusowych białek UL49.5/gM w kontekście odpowiedzi immunologicznej ma znaczenie na kilku płaszczyznach. **1)** pozwala lepiej zrozumieć **patogenezę** konkretnych wirusów oraz wskazać, jak możemy wykorzystać tę wiedzę biotechnologicznie, np.: planując udoskonalone szczepionki antyherpeswirusowe lub leki. Między innymi, moje wyniki wskazują, że BoHV-1 hamuje kompleks TAP i indukuje jego degradację we wczesnej fazie infekcji (5-11 godzin), natomiast w późniejszej fazie dołączają inne immunomodulacyjne białka (np.: rybonukleaza wirusowa vhs - produkt genu *UL41*).

Wyniki te korelują z raportowanymi przez inne grupy badawcze obserwacjami przebiegu odpowiedzi immunologicznej u zakażonych krów, w której kluczową rolę odgrywają głównie bardzo wczesne i wczesne antygeny wirusa, później TAP nie pełni już efektywnie swojej roli w prezentacji antygenów. W rezultacie, przygotowując wniosek grantowy do europejskiej weterynaryjnej sieci ERA-NET-ICRAD na opracowanie szczepionek przeciw BoHV-1 opartych o nowe platformy ekspresji antygenów, zaproponowałam, by do głównego białka antygenowego wirusa dodać jako drugi antygen szczepionkowy, białko natychmiastowo-wczesne Circ BoHV-1.

2) UL49.5 BoHV-1 jest wykorzystywane w badaniach nowych wektorów do przeciwnowotworowej terapii człowieka, tzw. **wektorów onkolitycznych**. Są one oparte na wirusie HSV-1, w którym jego gen białka immunomodulacyjnego ICP47 podmienia się na UL49.5 z tego względu, że działa ono na TAP w modelu mysim i takie wektory można testować na myszach. Zrozumienie mechanizmu aktywności UL49.5 jest w takim przypadku ważne, by lepiej przewidzieć, jak takie wektory będą działać w terapii.

3) Warsztat badawczy, taki jak platforma TAP-GFP do badania szlaku prezentacji antygenów zależnego od MHC klasy I, jest dość uniwersalny, by można go wykorzystać do badań właściwości immunomodulacyjnych innych wirusów. Metodę, którą rozwinęłam, mogłam wykorzystać w mojej obecnej tematyce badawczej, obejmującej **badania właściwości immunomodulacyjne białek wirusa SARS-CoV-2** w ramach projektu OPUS NCN. Badam przede wszystkim zdolność poszczególnych białek koronawirusa do hamowania szlaków prezentacji antygenów (z wykorzystaniem TAP-GFP), wiele z tych białek posiada po kilka rejonów transbłonowych, mogą więc dodatkowo korzystać z doświadczenia z badań gM jako białka transbłonowego.

4) Białka wirusowe są często cennymi narzędziami, dzięki którym poznajemy komórkowe szlaki molekularne. Białka wirusowe podlegają bowiem najczęściej tym samym regułom, szlakom, mechanizmom, enzymom, co białka komórkowe. Aktywność szlaku ERAD została na początku poznana dzięki wirusowym białkom przejmującym tę maszynę do celu wirusowej propagacji i ucieczki immunologicznej, podobnie jak UL49.5 BoHV-1 „kradnie” komórkowy szlak C-degronów i ERAD do usuwania TAP. Jedyna znana do tej pory struktura TAP została otrzymana w kompleksie z białkiem ICP47 HSV-1, które stabilizuje kompleks. Jest to jednak tylko jedna z konformacji TAP. Może dzięki UL49.5 będziemy mogli poznać kolejną konformację strukturalną TAP i potwierdzić założenia o występowaniu trzech konformacji tego transportera.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową lub artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Pierwszy staż zagraniczny odbyłam w trakcie studiów magisterskich (2-miesięczny w Institute for Animal Health w Compton, Wielka Brytania), a następnie w ramach stypendium naukowego Fellowship of the International Agriculture Centre (IAC) w Wageningen (3-miesięczny w Institute for Animal Health and Science w Lelystad, Holandia, w laboratorium dr Fransa Rijsewijk). W latach 2002-2004 dołączyłam do zespołu **Prof. Emmanuela Wiertza**, z **Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center w Leiden, Holandia** i okresach kilkumiesięcznych (3 miesiące+5miesiące+5miesiące) finalizowałam doświadczenia do doktoratu (czego wynikiem jest podwójna afiliacja w publikacji w poz. 28

zestawienia całkowitego dorobku), oraz rozpoczęłam nowy kierunek badań nad kompleksem UL49.5/gM, aby zrozumieć, na poziomie molekularnym, jak działają oba białka u wybranych alfaherpeswirusów. Staż ten był finansowany przez dwa stypendia **FEBS** (Federation of European Biochemical Societies), które uzyskałam: **FEBS Summer Fellowship** i **FEBS Scholarship for Central and Eastern Europe**. Badania w Leiden rozpoczęły również długoletnią współpracę międzynarodową z zespołem prof. Wiertza, która **zaowocowała 4 wspólnymi publikacjami po uzyskaniu stopnia doktora**. W ramach pobytu w Leiden rozpoczęłam przygotowanie konstruktów herpeswirusów innych niż opisane w doktoracie, rozpoczęłam planowanie mutantów UL49.5 z mutacjami punktowymi w celu weryfikacji ich wpływu na aktywność białka. Przygotowywałam też linie mysich komórek z UL49.5 BoHV-1, ponieważ białko to unikalnie dla inhibitorów TAP blokuje też mysy transporter. Oświadczenie Prof. Wiertza potwierdzające rolę tego stażu w mojej karierze podoktorskiej załączam jako Załącznik 3.3.

Natomiast nawiązana w zespole Prof. Wiertza współpraca naukowa i przyjaźń z **dr Danijelą Koppers-Lalic** (pierwsza autorka publikacji w poz. 28 z zestawienia całkowitego dorobku w Zał. 4) zaowocowała dalszą współpracą i 3 wspólnymi publikacjami po doktoracie, gdy dr Koppers-Lalic rozpoczęła pracę w **Erasmus Medical Center w Rotterdamie, Holandia**, w tematyce egzosomów. Rolę egzosomów w infekcji alfaherpeswirusami zaczęłam się zajmować w ramach projektu badawczego SONATA, którego byłam kierownikiem.

#### 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

**Działalność dydaktyczna** stanowi bardzo ważny komponent mojej pracy na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii od początku mojego zatrudnienia. Staram się cały czas rozwijać swoje umiejętności dydaktyczne, uczestnicząc w szkoleniach w zakresie dydaktyki w ramach Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG i włączając innowacyjne metody dydaktyczne do zajęć, które prowadzę dla studentów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii (na I i II stopniu), kierunku Bioinformatyka Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki (wykłady i ćwiczenia laboratoryjne w ramach kursu Biologia komórki i metabolizm dla I stopnia), Wydziału Farmacji GUMed (wykłady i seminaria w ramach kursu w języku angielskim „*Viruses as sustainable drug targets and pharmaceutical platforms*” dla międzynarodowych studiów II stopnia International Master in Sustainable Drug Discovery – S-DISCO) i od roku akademickiego 2023/2024 kierunku Marine Biotechnology wspólnie prowadzonego przez MWB i Wydział Oceanografii i Geografii UG (w języku angielskim, II stopnia, kurs wykładowy „Principles of molecular and cellular biology”). Będę również prowadzić pracownię magisterską dla studentów w ramach międzynarodowej sieci **European University of the Seas (SEA-EU)**, do której należy Uniwersytet Gdański. Byłam członkiem zespołu roboczego przygotowującego **dwa programy kształcenia**: programu studiów I stopnia na kierunku Biotechnologia opartego o moduły tematyczne (za prace te zostałam wraz z zespołem nagrodzona Nagrodą Zespołową I stopnia Rektora UG) oraz programu nowego anglojęzycznego kierunku Marine biotechnology wspomnianego wyżej. Aktywnie działam jako wykładowca, opiekun pracy magisterskiej i praktyk wakacyjnych dla studentów uruchomionych w roku 2022/2023 międzynarodowych studiów S-DISCO, współpracując w tym zakresie z Wydziałem Farmacji GUMed. Dla wielu kursów przygotowywałam od podstaw programy: oba wspomniane wyżej studia anglojęzyczne, ćwiczenia laboratoryjne Pracownia biochemii białek na II stopniu Biotechnologii (prowadzę często grupy anglojęzyczne studentów

z wymiany międzynarodowej Erasmus, przyczyniając się do rozwoju umiędzynarodowienia na mojej uczelni), ćwiczenia laboratoryjne Laboratorium z wirusologii (którego jestem pomysłodawcą), Organizmy modelowe – komórki ssacze (seminaria i ćwiczenia laboratoryjne), Zastosowanie wirusów w biotechnologii i medycynie (wykłady), Seminarium z publikacji doświadczalnych w biologii molekularnej i biotechnologii (również prowadzę grupy anglojęzyczne), wykłady z Systematyki i taksonomii organizmów, Przeglądu mikroorganizmów (protisty, sinice i wirusy), patogenów wirusowych roślin, dawniej również seminaria metodyczne z Metod Biologii Molekularnej dla I stopnia Biotechnologii. W przypadku obu ćwiczeń laboratoryjnych jestem współautorką skryptów polsko- i anglojęzycznych dla studentów. Dużym wyróżnieniem w pracy dydaktycznej była nominacja do plebiscytu Nauczyciel Akademicki Roku Dziennika Bałtyckiego w 2021r. Jestem też współautorka doniesienia plakatu z zakresu dydaktyki na konferencji międzynarodowej 45th FEBS Congress "Molecules of Life: Towards New Horizons" pt.: *Boosting the learning of biotechnology by concept-based teaching* z 2021r.

Za swoją działalność naukową i dydaktyczną otrzymałam w 2022r. **Medal Komisji Edukacji Narodowej**.

W okresie styczeń 2021-czerwiec 2022 opiekowałam się naukowym **Minigrantem studenckim** dotyczącym badania białek wirusa SARS-CoV-2 w ramach projektu ProUG ("PROgram Rozwoju Uniwersytetu Gdańskiego" współfinansowanego przez przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego"). Minigrant realizowała czwórka studentów I stopnia Biotechnologii wyłonionych w konkursie. Prowadzę corocznie pracownię specjalizacyjną licencjacką i magisterską, opiekując się pracami dyplomowymi na I stopniu Biotechnologii (licencjackimi) oraz pracą laboratoryjną i pracami dyplomowymi magistrantów. W sumie wypromowałam ok. **19 prac licencjackich i 25 magisterskich**. Pełniłam rolę **promotora pomocniczego** w trzech zakończonych doktoratach: mgr **Małgorzaty Graul** (doktorat w 2019r.), mgr **Kingi Grabowskiej** (2022r.), mgr **Magdy Wachalskiej** (2022r.). Pozostaję promotorem pomocniczym w trzech przewodach doktorskich (mgr Dorota Lesiak, mgr Marcin Lubocki, mgr Michalina Michalska) realizowanych w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów.

W ramach **popularyzacji nauki** regularnie brałam udział w Bałtyckim Festiwalu Nauki, byłam członkiem zespołu koordynującego tę imprezę na Wydziale, za co razem z innymi organizatorami otrzymaliśmy w 2010r. Nagrodę Zespołową stopnia pierwszego Rektora UG.. Wygłaszałam wykłady popularno-naukowe (m.in.: „Wcale nie tajemnica – czyli co „kryją” szczepionki na COVID19?” w 2021r., „O "skaczących" wirusach - dlaczego mogą na nas skoczyć i nas zaskoczyć (a wolelibyśmy by mogły nam tylko naskoczyć)” w 2022r.) w czasie imprezy popularyzującej naukę **Noc Biologów** oraz wykłady dla szkół ponadpodstawowych. W 2018r. byłam członkiem Komitetu Głównego przygotowującego konkurs dla szkół średnich Quiz Wiedzy o Szczepionkach STARBIOS2 na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii.

W ramach **działalności organizacyjnej** na Uniwersytecie Gdańskim jestem/byłam członkiem wielu Zespołów/Komisji wydziałowych (m.in. Wydziałowego Zespołu ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia, Wydziałowej Komisji ds. bezpieczeństwa biologicznego i zamkniętego użycia GMO i GMM, Wydziałowej Komisji ds. oceny nauczycieli akademickich, corocznie Wydziałowej komisji ds. przeprowadzenia rozmowy kwalifikacyjnej w języku angielskim na I roku studiów stopnia II, przewodnicząc komisjom egzaminacyjnym podczas

egzaminów dyplomowych licencjackich) i ogólnouczelnianych (m.in. Uczelnianego Zespołu ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia, Uczelnianej Komisji ds. Statutu UG) oraz w kadencji 2019-2024 pełnię funkcję **Senatora UG**.

7. Inne ważne informacje dotyczące mojej kariery zawodowej.

a) **Inna działalność naukowo-badawcza**

Oprócz badań, które stały się podstawą cyklu publikacji opisanych w p. 5 niniejszego Autoreferatu, pełniłam funkcję Kierownika projektów badawczych o innej tematyce, które przyczyniły się do powstania publikacji naukowych:

- projekt w ramach programu **POMOST/2010-2/7** o tytule „*Exploring new immune evasion mechanisms of herpesviruses – the search for improvement strategies of anti-herpesviral vaccines and virus-based therapeutics*” **Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej** (okres realizacji 2011-07-01-2014-09-30, budżet 554 000 PLN) – oprócz badań w zakresie molekularnego mechanizmu działania kompleksu UL49.5/gM, badałam właściwości immunomodulacyjne kinazy serynowo-treoninowej US3 wirusów BoHV-1 i PRV, czego rezultatem są publikacje 14, 20 z Załącznika Nr 4; jeden manuskrypt wciąż oczekuje na publikację)

- projekt w ramach programu **SONATA 2 Narodowego Centrum Nauki** o tytule: „*Badanie roli egzosomów w przebiegu infekcji alfa herpeswirusami*” (okres realizacji 2012-08-06 – 2015-12-05, budżet 759 615 PLN) – jego rezultatem są publikacje 7, 8, 17 z Załącznika nr 4; w projekcie tym badałam inkorporację białek wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV do **egzosomów** wydzielanych w czasie infekcji i w linii stabilnej produkującej homologi glikoproteiny B tych wirusów. **Glikoproteina B (gB)** jest silnie konserwowanym białkiem herpeswirusów, które odpowiada głównie za wejście do komórek gospodarza. Natomiast moje badania przyczyniły się do przybliżenia jej roli na późniejszych etapach infekcji, gdy gB jest produkowane w celu inkorporacji do wirionów. Oprócz tego, w nieznanym, ale prawdopodobnie specyficznym sposobie, zostaje inkorporowana do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, których subfrakcję stanowią egzosomy. Dodatkowo, jej obecność w komórkach ekspresyjnym geny cząsteczek MHC klasy II sprawia, że poziom tych białek na powierzchni jest niższy. Porównywałam te właściwości u trzech badanych alfa herpeswirusów, wykazując, że gB BoHV-1 posiada takie właściwości immunomodulacyjne, ale słabsze niż gB HSV-1, natomiast gB PRV takich właściwości nie wykazywało. Pokazałam również inkorporację innych białek wirusa (np. glikoproteiny gD) do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz zdolność takich pęcherzyków do oddziaływania z przeciwciałami w surowicy wytwarzanej w odpowiedzi na obecność wirusa BoHV-1, co wskazuje na zdolność takich pęcherzyków do pełnienia roli „pułapki” (ang. *decoy*) wpływającej na przebieg infekcji. Projekt ten wymagał ode mnie wprowadzenia warsztatu pracy z egzosomami, metodami takimi jak sączenie molekularne, ultrawirowanie, w tym w gradiencie jodoksanolu, transmisyjna mikroskopia elektronowa (dzięki współpracy z **dr hab. Magdaleną Narajczyk** z Pracowni Mikroskopii Elektronowej UG). W trakcie tego projektu, dzięki stażowi naukowemu w laboratorium prof. Wiertza nawiązałam współpracę z **dr Irene Bijnsdorp** z Amsterdam University Medical Center w Amsterdamie, Holandia, dzięki czemu otrzymałam cenne protokoły i optymalizowaliśmy nasz warsztat badawczy na egzosomach z moczu.

Obecnie kieruję projektem **OPUS 21 NCN** o tytule „*Właściwości immunomodulacyjne białek koronawirusa SARS-CoV-2*” (okres realizacji 2021-07-08 – 2025-09-30, budżet 1 908 360 PLN). W tym projekcie badam przede wszystkim zdolność poszczególnych białek koronawirusa do hamowania szlaków prezentacji antygenów, próbując zidentyfikować ich właściwości immunomodulacyjne.

Oprócz innej tematyki badawczej własnych projektów, chętnie współpracuję z innymi zespołami w ramach ich badań, czego rezultatem są publikacje 2,5,9,13,15,16,18,19 z Załącznika 4: w ramach współpracy międzynarodowej (np. produkcja przeciwciał do wykrywania białka sigma reowirusa – poz. 18 Zał. 4) oraz krajowej z innymi jednostkami i w ramach wydziału (badanie aktywności przeciwwirusowej związków metali i innych związków biologicznie czynnych, analizy cytometryczne i konstrukcja linii stabilnych przy użyciu wektorów retrowirusowych w badaniach nowotworów – np. poz. 19 Zał. 4).

**Recenzje w czasopismach naukowych:** Zgodnie z rejestrem moich recenzji w bazie Publons/Web of Science do tej pory przygotowałam **23 recenzje** artykułów do międzynarodowych czasopism naukowych, takich jak: Nature Communications, Journal of Applied Genetics, Cells, Viruses, Microorganisms, Biomolecules, Pharmaceutics, Membranes, Pharmacological Reports, Veterinary Research,. Jestem członkiem Reviewer Board czasopisma Membranes MDPI oraz, razem z **dr hab. Magdaleną Weidner-Glunde** z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie edytorem naukowym wydań specjalnych (SI) "Herpesvirus Manipulation of Cellular Processes" i "Herpesvirus Manipulation of Cellular Processes 2.0" w czasopiśmie Viruses MDPI.

**Członkostwo w towarzystwach naukowych i komitetach organizacyjnych:** Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, European Society of Veterinary Viruses, International Society of Extracellular Vesicles. W 2013r. byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego międzynarodowej konferencji 36th International Herpesvirus Workshop, która odbyła się w Gdańsku, a w 2023r., międzynarodowej konferencji European Virology Congress, również w Gdańsku, pełniłam też rolę przewodniczącej jednej z sesji.

**Współpraca z otoczeniem gospodarczym:** W czasie pandemii COVID-19 odpowiadałam na potrzebę współpracy z otoczeniem gospodarczym, testując właściwości wirusobójcze środka dezynfekującego dla firmy AVANTI oraz materiału odpornego na wirusy do potencjalnej produkcji maseczek.

**b) Udział i kierownictwo w grantach, otrzymane stypendia, wyróżnienia i nagrody naukowe po uzyskaniu stopnia doktora:**

Chronologicznie od najnowszych:

**2022** - Medal Komisji Edukacji Narodowej.

**od 2021** - kierowanie projektem naukowym OPUS 21 NCN „*Właściwości immunomodulacyjne białek koronawirusa SARS-CoV-2*”, jak opisano wyżej.

**2019** - Nagroda Zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za opracowanie nowego, nowatorskiego Programu Kształcenia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii.

**2016** - Nagroda Zespołowa II stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania and mechanizmem interakcji receptora FGFR2 z kinazą RSK2 I ich roli w migracji komórek epitelialnych raka piersi.

**2015 – 2021** kierowanie projektem naukowym SONATA BIS 4 NCN „*Molekularny mechanizm działania białek alfa herpeswirusów kluczowych dla modulacji odpowiedzi immunologicznej*”. Był to główny projekt finansujące badania stanowiące podstawę cyklu publikacji, jak opisano w p. 4 Autoreferatu. Oprócz badań nad białkami UL49.5/gM w projekcie tym badałam rolę mikroRNA wirusów HSV-1 w infekcji, wprowadzając warsztat badan nad mikroRNA wirusowymi.

**2012 – 2015** kierowanie projektem naukowym SONATA 2 NCN „*Badanie roli egzosomów w przebiegu infekcji alfa herpeswirusami*”, jak opisano wyżej.

**2011 – 2014** kierowanie projektem naukowym POMOST FNP „*Exploring new immune evasion mechanisms of herpesviruses – the search for improvement strategies of anti-herpesviral vaccines and virus-based therapeutics*”, jak opisano wyżej.

**2011** - Nagroda Zespołowa II stopnia Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe poparte publikacjami naukowymi.

**2010** – Nagroda Zespołową I stopnia Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za koordynowanie prac związanych z organizacją Festiwalu Nauki na Wydziale w dwóch ostatnich kadencjach.

**2010** – Wykład plenarny podczas konferencji Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego "Mikrobiologia 100 lat po Robercie Kochu".

**2009** - Stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

**2006** - Nagroda Zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe poparte publikacjami naukowymi.

**2006** - Wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii.

.....  
(podpis wnioskodawcy)