



Dr hab. Edyta Paradowska, prof. nadzw. IBM PAN  
Pracownia Wirusologii  
Instytut Biologii Medycznej  
Polskiej Akademii Nauk  
w Łodzi

Dziedzina: MWB UG i GUMed Łódź, 20.11.2019  
Wpłynęło dnia 25.11.2019  
L.dz. nr 58/2019

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Mirosławy Panasiuk

pt. „Molekularne mechanizmy przechodzenia alfaherpeswirusów z komórki do komórki”

#### Charakterystyka ogólna rozprawy

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk. Rozprawa doktorska została przedstawiona do recenzji w postaci manuskryptu polskojęzycznego przygotowanego w układzie typowym dla prac doświadczalnych. Rozprawa obejmuje łącznie 138 stron i zawiera następujące rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Metody, Materiały, Wyniki i Dyskusję. Ponadto, do pracy dołączono Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Bibliografię obejmującą 137 pozycji oraz Legendy do filmów. Rozprawa zawiera 53 ryciny, 10 tabel i 13 filmów. Czytelny schemat pracy i jej rozdziałów ułatwia czytelnikowi lekturę dysertacji.

Tematyka rozprawy jest bardzo interesująca od strony poznawczej. Poznanie mechanizmów rozprzestrzeniania się wirusów pomiędzy komórkami gospodarza ma także duże znaczenie w opracowaniu nowych strategii profilaktycznych i terapeutycznych. Namnażanie wirusów w komórkach wrażliwych jest zwykle związane z uwolnieniem zszyntetyzowanych wirionów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a następnie z rozpoznaniem i związaniem białek kapsydu lub osłonki lipidowej z koreceptorami obecnymi na powierzchni komórek gospodarza. Zmiany konformacyjne białek powierzchniowych umożliwiają wirusom wnikanie do komórek na drodze fuzji, endocytozy lub wiropexsj. W przypadku wirusów bezosłonkowych, rozprzestrzenianie się zakażenia jest zwykle związane z lizą komórek zakażonych, uwalnianiem cząstek wirusowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i ich wnikaniem do komórek przez endocytozę. Wirusy osłonkowe, do których należą herpeswirusy, mogą być uwalniane pozakomórkowo i wnikać na drodze fuzji lub endocytozy.

Przemieszczanie się wirusów osłonkowych pomiędzy komórkami może także następować na drodze transmisji bezpośredniej, przy wykorzystaniu połączeń międzykomórkowych („cell-to-cell spread”) i z pominięciem etapu uwalniania wirionów do środowiska zewnętrznego. Należy zwrócić uwagę, że taki sposób przenoszenia wirusów umożliwia im unikanie lub ograniczenie odpowiedzi ze strony układu odpornościowego gospodarza.

Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest zagadnienie międzykomórkowej transmisji bezpośredniej członków podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Ze względu na zdolność herpeswirusów do zakażenia komórek układu nerwowego, możliwość występowania w nich w stanie latencji i zdolność wirusa do reaktywacji, poznanie strategii i czynników uczestniczących w transmisji bezpośredniej tych patogenów jest niezwykle istotne. Podczas realizacji badań Doktorantka wykazała, że bydlęcy herpeswirus typu 1 (BoHV-1) wykorzystuje do rozprzestrzeniania się występujące naturalnie połączenia międzykomórkowe zwane nanorurkami (tzw. *tunneling nanotubes*, TNT) oraz określiła rolę wirusowej kinazy serynowo-treoninowej Us3 w transmisji zakażenia. Podjęcie przez Doktorantkę tych badań uważam za wyzwanie ambitne, trudne i bardzo wartościowe.

### **Struktura i ocena pracy doktorskiej**

Streszczenie w języku polskim i angielskim obejmuje wprowadzenie, cel pracy, opis badań i wyników oraz podsumowanie. We **Wstępie** Doktorantka zawarła najważniejsze informacje dotyczące poznanych mechanizmów przenoszenia wirusów oraz charakterystykę członków rodziny *Herpesviridae*, w tym zastosowanego w badaniach BoHV-1. Wśród mechanizmów międzykomórkowego przemieszczania się wirusów Doktorantka omówiła zakażenie z zewnątrz („free entry”) i transmisję bezpośrednią („cell-to-cell spread”) z opisem występujących naturalnie połączeń międzykomórkowych takich jak mostki, nanorurki, filopodia i synapsy wirusowe. Opisano funkcje połączeń ścisłych i przylegających między komórkami oraz rolę białek uczestniczących w stabilizacji tych połączeń. Zwrócono także uwagę na możliwość wykorzystania synaps znajdujących się na zakończeniach nerwów czuciowych i motorycznych, które służą do przenoszenia wirusów neurotropowych. Doktorantka omówiła ponadto udział kompleksów glikoproteinowych osłonki wirusa gE/gI i gH/gL i innych białek w bezpośredniej transmisji BoHV-1. Zaznaczyła ponadto, że rola wielofunkcyjnego białka tegumentu - kinazy Us3 w tym procesie nie została dotychczas określona. Ryciny zawarte we wstępie stanowią doskonałe uzupełnienie treści rozdziału i ułatwiają analizę prezentowanych treści.

**Cel pracy** został zdefiniowany w sposób jasny i dojrzały jako poznanie mechanizmu bezpośredniej transmisji alfaherpeswirusów między komórkami, w tym określenie zdolności do wykorzystywania długich połączeń międzykomórkowych. Cel został sformułowany w sposób rzeczowy i dobrany adekwatnie do tematyki omawianej w rozprawie. Wiedza i doświadczenie Doktorantki

umożliwiły określenie etapów pracy doświadczalnej, w tym: obserwację i charakterystykę nanorurek, analizę rozprzestrzeniania się infekcji przez nanorurki w komórkach zakażonych fluorescencyjnymi mutantami BoHV-1 oraz analizę wpływu aktywności katalitycznej kinazy Us3 na proces tworzenia nanorurek w komórkach różnego pochodzenia.

Rozdziały **Metody** i **Materiały** zostały przygotowane w sposób staranny i szczegółowy, umożliwiające powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. Metodologia badań została dobrana w sposób pozwalający na realizację poszczególnych etapów badań i osiągnięcie zamierzonego celu. W badaniach wykorzystano szczep typu dzikiego BoHV-1, mutanty wirusowe zawierające geny fluorescencji GFP lub/i mCherry w rejonie genów kodujących białka wirusowe gE i VP26 oraz mutant z delecją genu kodującego Us3. Badania zostały przeprowadzone z użyciem ciągłych i półciągłych linii komórkowych oraz hodowli pierwotnych fibroblastów bydłęcych i neuronów szczurzych pozyskanych z hipokamu i kory mózgowej. Należy zaznaczyć, że Doktorantka do analizy fragmentów genomu i proteomu wykorzystwała szereg metod biologii molekularnych np. transformację, transfekcję, amplifikację, izolację i oczyszczanie białek oraz metody immunohistochemiczne. Obserwacje mikroskopowe, które stanowiły istotną część metodologii, przeprowadzono przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Część doświadczalną uzupełniają odpowiednio zastosowane metody pracy z wirusem takie jak zakażenie doświadczalne, mianowanie i pomiar wielkości łysinek wirusowych, test neutralizacji, namnażanie i oczyszczanie rekombinantów wirusowych. Metody badawcze stosowane przez Doktorantkę wymagały optymalizacji i opracowania warunków dla wymagającego modelu badawczego.

Rozdział **Wyniki** stanowi najobszerniejszą część rozprawy (48 stron). Rozdział rozpoczyna się od wnikliwej charakterystyki typów połączeń międzykomórkowych obserwowanych w transmisji BoHV1. Doktorantka wykazała obecność białek wirusowych BoHV-1 w TNT oraz zwiększoną częstość występowania ich postaci długiej (>20  $\mu\text{m}$ ) charakteryzującej się obecnością włókien aktynowych i tubulinowych. Zastosowanie mutantów fluorescencyjnych BoHV-1 umożliwiło potwierdzenie zdolności wirusa do zakażenia kolejnych komórek wrażliwych na drodze głównie jednokierunkowej transmisji bezpośredniej przez nanorurkę w środowisku przeciwciał neutralizujących. Obserwacje te zostały potwierdzone w komórkach różnego pochodzenia tzn. między komórkami nabłonkowymi i fibroblastami przy obserwacji białek pochodzących z różnych części cząsteczki wirusowej, białek osłonki gE i Us3 oraz kapsydu VP26. Białka osłonki były częściej obserwowane w tzw. gondolach, natomiast białko kapsydu migrowało prawdopodobnie wraz z kapsydem. W kolejnym etapie badań mgr M. Panasiuk podjęła się określenia roli kinazy Us3 w procesie transmisji wirusa przez nanorurki. Doktorantka przygotowała dwa mutanty fluorescencyjne BoHV-1, jeden zawierający białko Us3 typu dzikiego i mutant zawierający Us3 bez aktywności kinazowej. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że brak aktywności kinazowej Us3 powoduje powstawanie mniejszej liczby nanorurek,

głównie krótszych, w porównaniu do nanorurek powstających w warunkach obecności kinazy Us3 typu dzikiego. Obserwacje dokonane przez Doktorantkę potwierdziły udział aktywności kinazowej Us3 przy tworzeniu długich połączeń międzykomórkowych na wczesnych etapach infekcji. Przygotowanie i zastosowanie konstruktów zawierających jedynie rejon domeny kinazowej Us3 pozwoliło wykazać Doktorantce, że w odróżnieniu od Us3 typu dzikiego, był on niezdolny do modyfikacji cytoszkieletu komórkowego a zmienione białko występowało w jądrze i cytoplazmie w postaci nieregularnych zgrupowań. Mgr M. Panasiuk wykazała także, że białko Us3 zawierające domenę kinazową ma zachowaną zdolność fosforylacji części substratów. Ekspresja Us3 typu dzikiego powodowała apoptozę neuronów szczurzych chociaż efekt ten nie był obserwowany w komórkach pochodzenia nabłonkowego. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę zostały poddane rzetelnej i krytycznej analizie oraz przedstawione w formie właściwie opracowanych rycin, zdjęć i filmów przygotowanych w technice *timelapse*.

**Dyskusja** stanowi logiczną konfrontację uzyskanych wyników z odpowiednio dobranym piśmiennictwem. Dobór bibliografii świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień związanych z podjętą tematyką badawczą.

W kontekście prezentowanych wyników chętnie poznałabym opinię Doktorantki dotyczącą kilku istotnych zagadnień przedstawionych poniżej:

- 1) jakie czynniki, oprócz wirusowej kinazy Us3, mogą wpływać na wytwarzanie połączeń międzykomórkowych, ich długość i stabilność?
- 2) w jakich sytuacjach mechanizm transmisji bezpośredniej wydaje się być możliwy w warunkach infekcji naturalnej (rola typów komórek, cyklu lizogenicznego, inne)?
- 3) trzy białka błonowe alfaherpeswirusów (gE, gI i US9) są istotne w rozprzestrzeleniu herpeswirusów w układzie nerwowym. Proszę o wyjaśnienie potencjalnej roli białka US9 w transmisji międzykomórkowej
- 4) jakie zdaniem autorki mogą być praktyczne implikacje uzyskanych wyników?

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na brak Spisu Tabel oraz Rycin, które mogłyby być pomocne w lekturze dysertacji. Ponadto, Doktorantka stosuje nazewnictwo, które posiada odpowiedniki w języku polskim np. określenie „komórki epitelialne” można zastąpić sformułowaniem „komórki nabłonkowe”, „molekuły” - wyrażeniem „cząsteczki” (str. 8), „komórki permissywne” - „komórki wrażliwe” (str. 11). Doktorantka zastosowała błędnie nazewnictwo wirusa gorączki lasu Semliki (jako „wirus gorączki semliki forest”, str. 9 i 113) oraz osłonki lipidowej („otoczka lipidowa”) na Rys. 11. Niefortunnym wydają się niektóre sformułowania użyte w dysertacji np. „(...) cząsteczki wirusowe przeprowadzają fuzję osłonki lipidowej wirusa z błoną komórki nerwowej”, „genów litycznych” w miejsce genów indukujących cykl lityczny (str. 37) lub informacja o grupie komórek, która „(...) została zainfekowana fluorescencyjnym (zielonym) wirusem Bu-HV1” (str. 79).

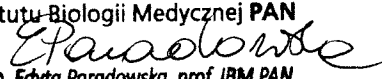
Pomimo, iż praca została opracowana bardzo starannie, Doktorantka popełniła także nieliczne błędy edytorskie. Podane przykłady stanowią jedynie drobne uchybienia, które nie umniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny pracy Doktorantki i nie wpływają na ogólną wysoką ocenę przedstawionej mi do recenzji dysertacji. Wierzę, że doświadczenie i wiedza zebrane w trakcie przygotowania pracy doktorskiej posłuży mgr M. Panasiuk do kontynuacji podjętej tematyki badawczej.

### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Podsumowując, mgr Mirosława Panasiuk jako pierwsza wykazała, że zakażenie alfawirusami stymuluje wytwarzanie TNT, potwierdziła istotną rolę nanorurek w bezpośredniej transmisji międzykomórkowej BoHV-1 i określiła rolę kinazy Us3 w tym procesie. Jest to zarazem pierwsza taka obserwacja w przypadku wirusów DNA. Praca stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie mechanizmów międzykomórkowego przenoszenia wirusów, a uzyskane wyniki powstały przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej i technik hodowli komórkowych. Wyniki pracy uważam za bardzo wartościowe i wnoszące wkład w rozwój wirusologii. Za szczególnie istotne osiągnięcie Doktorantki uważam wykazanie możliwości transmisji herpeswirusa drogą połączeń międzykomórkowych, co może wyjaśniać możliwość rozprzestrzeniania się zakażenia produktywnego z zachowaniem strategii unikania kontroli układu odpornościowego gospodarza. O dużej wartości wykonanych badań i otrzymanych wyników świadczy ich publikacja w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Virology* o wysokim współczynniku oddziaływania, w której Doktorantka jest pierwszym autorem.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja mgr Mirosławy Panasiuk pt. „Molekularne mechanizmy przechodzenia alfaherpeswirusów z komórki do komórki” stanowi samodzielny i interesujący dorobek Autorki, który spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez przepisy obowiązującej Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym. **Z pełnym przekonaniem przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Mirosławy Panasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny i edytorski rozprawy, znaczący zakres badań, uzyskanie wartościowych wyników poznawczych i ich publikację w renomowanym czasopiśmie naukowym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie dysertacji.**

KIEROWNIK  
Pracowni Wirusologii  
Instytutu Biologii Medycznej PAN  
  
Dr hab. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN