



## **Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mirosławy Panasiuk „Molekularne mechanizmy przechodzenia alfaherpeswirusów z komórki do komórki.”**

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Dziekana Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed, prof. dr hab. Igora Koniecznego z dnia 23 września 2019 roku. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk. Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku.

### **Formalny opis rozprawy**

Praca została przygotowana w języku polskim i liczy 138 stron. Do pracy załączone zostało 13 filmów, które uzupełniają prezentacje uzyskanych wyników. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów. W następnej kolejności zaprezentowane zostało streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Właściwa praca została podzielona na Wstęp (24 stron maszynopisu), Cel pracy (1 strona), Metody (12 stron), Materiały (9 stron), Wyniki (48 stron), Dyskusję (10 stron) oraz Bibliografię (137 pozycji literaturowych). Praca ma charakter standardowej rozprawy doktorskiej, jednak część wyników została już opublikowana w *Journal of Virology* w 2018 roku, który jest jednym z najlepszych czasopism w dziedzinie wirusologii molekularnej i jest listowany w bazie ISI Web of Science.

## **Ocena merytoryczna**

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi szerokie studium nad rolą połączeń typu TNT (*ang.* tunneling nanotube) w zakażeniu herpeswirusem bydłęcym typu 1. TNT są stosunkowo słabo poznanymi strukturami, które przyjmując kształt nanorurek tworzą połączenia pomiędzy komórkami. Cytując za autorką pracy, struktury te powstają na skutek wypuszczania filopodiów w kierunku drugiej komórki lub przy oddalaniu się od siebie połączonych komórek, przy czym ta druga koncepcja ma silniejsze umocowanie eksperymentalne. Ponieważ struktury te stanowią potencjalne ścieżki transferu wirusów pomiędzy komórkami, chroniąc je m.in. przed odpowiedzią immunologiczną, transfer ten wydaje się mieć spore znaczenie w rozwoju zakażenia.

Przedstawiona praca stara się odpowiedzieć na pytanie, jaka jest rola tych najcieńszych i najdłuższych połączeń międzykomórkowych w transmisji herpeswirusów. Podjęty przez autorkę temat jest ważny i nowy. Wykazano, że struktury TNTs są wykorzystywane przez niektóre wirusy, włączając w to HIV, jednak w przypadku herpeswirusów literatura na ten temat jest niezwykle uboga.

Przedstawiona praca w przyjazny sposób wprowadza czytelnika w temat połączeń międzykomórkowych i szczegółowo omawia poszczególne ich rodzaje. Dołączone ilustracje bardzo ułatwiają lekturę i stanowią dobre tło dla wstępu. W dalszej części praca wprowadza czytelnika w temat transmisji wirusów pomiędzy komórkami, rozpoczynając od drogi „klasycznej”, kiedy to dochodzi do składania wirionów potomnych, wydostania się wirionów do przestrzeni międzykomórkowej i wreszcie rozpoznania receptora na komórce potomnej i internalizacji do wnętrza komórki. Autorka następnie opisuje transfer wirusów poprzez naturalne połączenia międzykomórkowe. Proces ten jest ściśle regulowany i przynajmniej w niektórych przypadkach opiera się na bezpośredniej interakcji białek wirusowych oraz białek komórkowych. W następnym podrozdziale autorka przechodzi do opisu rodziny *Herpesviridae*, wprowadzając czytelnika w tematykę zakażeń tymi wirusami DNA. Bardzo szczegółowy opis cyklu replikacyjnego w tym miejscu został niesłusznie nazwany „cyklem życiowym”.

Cel pracy został jasno sformułowany i obejmuje analizę funkcji nanorurek w rozprzestrzenianiu się zakażenia herpeswirusowego pomiędzy komórkami oraz rolę wirusowego białka Us3 w tworzeniu się nanorurek.

Metody zostały omówione szczegółowo, w sposób pozwalający na replikację przeprowadzonych badań. Niewielkie zastrzeżenia mam do prezentacji niektórych procedur. W szczególności dotyczy to sposobu prezentacji procesu wirowania, gdzie podana jest liczba obrotów na minutę (rpm), a nie siła działająca na próbkę (rcf). Podczas gdy ta pierwsza wartość zależy od wirówki i odtworzenie procesu wymaga posiadania identycznego rotora, wartość rcf może być odtworzona na dowolnym sprzęcie. Druga nieścisłość dotyczy opisu procesu transferu białek na membranę PVDF, gdzie nieco niefortunnie stwierdzono, że „Po zakończeniu transferu błonę PVDF wywoływano przy użyciu metody western blotting”. Rozumiem, że autorka miała na myśli, że po transferze białek poprzez western blotting dokonano ich immunodetekcji (podobny lapsus pojawia się w tytule rozdziału 6.2.3.). Wykorzystane materiały zostały opisane w pracy z wystarczającą dokładnością.

W rozdziale dotyczącym wyników w sposób czytelny i jasny przedstawiono dane uzyskane w czasie przygotowania pracy doktorskiej. Każdy rozdział dotyczy pojedynczego problemu i jest zobrazowany bardzo czytelnymi rycinami, które nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do interpretacji. Na bardzo duże uznanie zasługują tutaj doskonałej jakości zdjęcia, które są kluczowe dla pracy. Warto jeszcze raz podkreślić, że załączenie do pracy nośnika cyfrowego i możliwość zapoznania się z materiałem wideo jest bardzo dużą zaletą. Przedstawione wyniki jasno pokazują dystrybucję białek w komórkach oraz transfer wirionów poprzez struktury TNT. Wykazano również, że transfer przez struktury TNT prowadzi do inicjacji infekcji w komórce sąsiadującej. Przeprowadzone analizy sugerują, że wirus moduluje tworzenie się struktur TNT, aby ułatwić rozprzestrzenianie się zakażenia, a odpowiedzialne jest za to prawdopodobnie białko US3. Dane zostały poparte eksperymentami, w których wykorzystano rekombinowanego herpeswirusa z mutacją punktową w genie kodującym białko US3 (mutant katalityczny). Nieco zdziwienia z mojej strony budzi fakt, że nie przedstawiono w pracy wyników wskazujących na wpływ obserwowanej modulacji cytoszkieletu oraz struktur TNT na transmisję wirusa (np. rozbudowana analiza obrazu). Nieco danych w tym temacie

dostarczają pomiary wielkości łyseinek tworzonych przez wirusa; wartości te zostały skorelowane ze zdolnością do rozprzestrzeniania się wirusa pomiędzy komórkami. Nieco niedosytu dostarcza lektura wyników dotyczących ekspresji białka US3 w komórkach i nieokreślona faktyczna rola tego białka w modulacji procesu tworzenia struktur TNT, ponieważ przedstawione w tym podrozdziale wyniki nie odpowiadają jasno na postawione pytanie badawcze. W ramach dyskusji prawidłowo przedstawiono uzyskane dane w kontekście istniejącej wiedzy.

### **Ocena edytorska rozprawy**

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie. Na szczególną pochwałę zasługuje format książki w miękkiej oprawie. Dobre wrażenie robi stosunkowo mała liczba błędów językowych i ortograficznych. Przy tak dużym dokumencie wymaga to uważności. Pewne zastrzeżenia mam jednak do oznaczeń stosowanych w pracy. Zgodnie z wytycznymi Rady Języka Polskiego „między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy”. W pracy niestety oznaczenia te są stosowane niespójnie i spacje pojawiają się nieco stochastycznie. Również nieco większą wagę autorka powinna przywiązywać do stosowanych symboli. Przykładowo, zamiast litery „x” powinno stosować się znak mnożenia „x”. Warto również zwrócić uwagę na odpowiednie stosowanie słów liczba oraz ilość z rzeczownikami policzalnymi i niepoliczalnymi.

Lektura pracy momentami prowadzi do wniosku, że autorka nieco zbyt często stosuje anglicyzmy – zamiast komórki epitelialne, korzystniej byłoby po prostu napisać o komórkach nabłonkowych. Nie do końca zrozumiałe jest również wprowadzanie zwrotów „free entry” czy „cell-to-cell spread”, które nic nie wnoszą do pracy. Z drugiej strony nazwa własna Ficoll została spolszczona w liście materiałów do Fikolu.

Ryciny przygotowane zostały z dużą starannością, a opisy jasno odróżniają się od reszty tekstu i zawierają informacje konieczne dla interpretacji przedstawionych danych. Do pracy załączone zostały filmy obrazujące dodatkowo uzyskane wyniki. Jedyna uwaga może dotyczyć ryciny 27., na której panele przedstawiające obraz w

światle przechodzącym są całkiem ciemne i nieczytelne. Rozumiem jednak, że jest to jednak problem edytorski a nie merytoryczny.

### **Podsumowanie**

W mojej ocenie praca prezentuje stosunkowo trudny temat w sposób niezwykle czytelny. Tam, gdzie standardowe metody biologii molekularnej czy biochemiczne pokazywałyby jedynie pośrednio zachodzące procesy, wykorzystanie mikroskopii konfokalnej do obrazowania pojedynczych wirionów i śledzenie ich losów w komórce nie pozostawia wątpliwości co do interpretacji przedstawionych zdarzeń. Niewielkie uchybienia edytorskie w żaden sposób nie obniżają jakości przedstawionej pracy.

Moja ocena pracy jest bardzo wysoka, chciałbym jednak uzyskać odpowiedź na kilka nurtujących mnie pytań:

1. Czy znany jest faktyczny skład nanorurek i ich *cargo*? Czy były podejmowane próby określenia ich składu poprzez np. połączenie technik mikrodissekcji laserowej oraz spektrometrii mas?
2. Jakie jest pochodzenie nanorurek? Czy są to struktury o znaczeniu ewolucyjnym, czy raczej artefakty, których istnienie jest tylko stanem przejściowym pomiędzy dwoma komórkami połączonymi połączeniem szczelinowym i dwoma oddzielnymi od siebie komórkami? Czy istnieją jakiegokolwiek białka komórkowe, które są charakterystyczne wyłącznie dla tych struktur, co umożliwiłoby zahamowanie tego typu komunikacji i określenie faktycznej roli tych połączeń w procesie zakażenia? Czy były podejmowane próby oceny znaczenia struktur TNT dla zakażenia np. w modelu mysim?
3. Proszę przedyskutować, czy obserwowane zwiększenie częstości występowania długich struktur TNT jest związane ze sterowanym przez białka wirusowe procesem tworzenia tych struktur, czy raczej na upośledzeniu procesu remodelingu cytoszkieletu w czasie zakażenia herpeswirusami? Innymi słowy, czy jest to „efekt świadka”, czy faktycznie jest to proces sterowany, który ma znaczenie *in vivo*? Jaki może być mechanizm działania białka US3?

### **Wnioski końcowe**

Po wnikliwym zapoznaniu się z przedstawioną pracą doktorską oraz ocenie indywidualnego wkładu mgr Mirosławy Panasiuk w jej powstanie, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Praca ma oryginalny i nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki mają cechy nowości naukowej. Jestem pod wrażeniem systematyczności prowadzonych badań oraz wyników, które w przyszłości mogą być źródłem kolejnych, bardzo ciekawych badań.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jak również do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych przy Uniwersytecie Gdańskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Mirosławy Panasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
prof. dr hab. Krzysztof Pyrc