

Kraków 24.04.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Przedstawiona mi do recenzji **praca doktorska autorstwa Pani mgr Natalii Derewońko pt. „Rola białek wirusowych oraz ich oddziaływanie z czynnikami komórkowymi podczas bezpośredniego transportu międzykomórkowego (cell-to-cell spread) alfaherpeswirusów”** powstała w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk oraz promotorem pomocniczym Pan dr Michał Rychłowski. Praca jest bardzo obszerną monografią liczącą 189 stron. Pomimo tego, że praca jest kontynuacją badań od lat prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów to jest ona pracą nowatorską, oryginalną i wnoszącą wiele nowych danych do wyjaśnienia mechanizmów bezpośredniego transportu międzykomórkowego herpeswirusów.

Choroby wywoływane przez herpeswirusy najprawdopodobniej były już znane nawet kilka tysięcy lat przed naszą erą, a po odkryciu wirusów około 120 lat temu stosunkowo dobrze poznano: budowę cząstek herpeswirusowych, ich sekwencje genomowe, ich strategię replikacji. Ciągle jednak pozostają nie do końca poznane pewne obszary biologii tych wirusów. Do nich należą między innymi – mechanizmy latencji, a także alternatywna do klasycznej metody rozprzestrzeniania się wirusów z komórki do komórki (z ang. *cell-free entry*, CFE), droga bezpośredniego transportu międzykomórkowego (z ang. *cell-to-cell spread*, CTC). Obecnie istnieją leki, które stosowane są w przebiegu wielu chorób herpeswirusowych. Działają one głównie w czasie aktywnej replikacji wirusów, hamując najczęściej syntezę wirusowego genomu. Niestety nie ma dostępnych leków, które hamowałyby przejście wirusa do stanu utajenia, jego reaktywację czy wnikanie wirusa do komórki. Dlatego uważam, że wszystkie badania, które mają na celu dokładniejsze poznanie tych mechanizmów mogą być bardzo pomocne w tworzeniu leków nowej generacji. Pod tym względem podjęty przez doktorantkę temat pracy może mieć także znaczenie praktyczne.

Recenzowana przeze mnie praca doktorska oprócz bardzo rzetelnego przedstawienia przeprowadzanych przez doktorantkę zadań badawczych ma bardzo ładną szatę graficzną: bardzo starannie i pięknie wykonane ryciny, zdjęcia oraz nagrane filmy obrazujące wędrówkę wykorzystanych w badaniach wirusów w komórkach i pomiędzy komórkami.

Podobnie jak we wszystkich pracach monograficznych na wstępie doktorantka zamieściła: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim i bardzo obszerny wstęp liczący około 40 stron.

We wstępie charakteryzuje podrodzinę alfaherpeswirusów omawiając systematykę, budowę wirionu i cykl replikacyjny tych wirusów. Moja mała uwaga do coraz bardziej skomplikowanej systematyki wirusów (str 15). W nazwach wirusów nie mówimy już o typie wirusa, pozostają jedynie cyfry. Wirus EBV, to wirus Epsteina-Barr, a nie wirus Epsteina Barra ponieważ został on po raz pierwszy opisany w 1964 roku przez dwójkę naukowców – Michaela Epsteina i Yvonne Barr. We wstępie pracy doktorantka dużo uwagi poświęca opisowi najnowszej wiedzy na temat rozprzestrzeniania się wirusów na drodze bezpośredniego transportu międzykomórkowego, ponieważ jest to tematyka podjętych przez nią badań. Kolejny podrozdział dotyczy charakterystyki bydlęcego herpeswirusa 1 (BHV-1) ponieważ model tego właśnie wirusa wybrała do swoich badań. W ostatnim podrozdziale wstępu zapoznaje czytelnika z różnorodnymi technikami badań bezpośredniego transportu międzykomórkowego (CTC) oraz badaniami interakcji białek wirusowych z białkami komórkowymi podczas transportu CTC.

Kolejno, doktoranta formułuje swoje cele badawcze. Głównym celem pracy było określenie roli kompleksu wirusowych glikoprotein gE/gI oraz kinazy US3 wirusa BHV-1 w bezpośrednim transporcie międzykomórkowym oraz zbadanie ich oddziaływania z czynnikami komórkowymi w czasie tego procesu. Uważam, że wybór tych protein wirusowych jest bardzo uzasadniony, ponieważ odgrywają one bardzo ważną rolę w procesie rozprzestrzeniania się BHV-1 na drodze CTC. Natomiast kinaza serynowo-treoninowa US3, która jest białkiem tegumentu wirusa i pełni wiele funkcji ważnych w procesie replikacji wirusa i oddziaływania wirusa na komórkę gospodarza, podczas CTC prowadzi do drastycznych zmian w cytoszkieletu komórki oraz formowania długich wypustek komórkowych, które mogą umożliwiać bezpośredni kontakt pomiędzy oddalonymi od siebie komórkami. Mechanizm tworzenia wypustek nie został jednak jeszcze dokładnie poznany.

Rozdział 6 i 7 pracy to bardzo dokładnie, bardzo dobrze i przejrzysto opisane materiały i metody stosowane w czasie prowadzonych eksperymentów badawczych. Metody badawcze, które doktorantka musiała poznać i zastosować w czasie powstawania pracy są imponujące. Wniosuję, że częściowo musiała już wykorzystywać je w swojej pracy magisterskiej, ponieważ praca doktorska jest jej kontynuacją. Wśród wykorzystywanych metod, to między innymi: metody różnorodnych hodowli komórkowych *in vitro* oraz namnażania w nich wirusów, tworzenie wirusowych rekombinantów i ich mianowanie. Cytometria przepływowa, spektrometria masowa oraz metody molekularne: PCR, sekwencjonowanie, metody rekombinacyjne, klonowanie. I wreszcie wszystkie metody związane z mikroskopią konfokalną, ponieważ wiele eksperymentów prowadzonych było z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego konfokalnego Leica SP8X.

Rozdział 8, to bardzo rzetelnie przedstawione wyniki swoich eksperymentów, które autorka podzieliła na 2 etapy. Pierwszy etap badań obejmował analizę przyżyciową rozprzestrzeniania się wyznakowanych fluorescencyjnie rekombinantów BHV-1 w różnych hodowlach komórkowych (pierwotnych i transformowanych). Niektóre użyte do badań rekombinanty wirusowe były już wcześniej skonstruowane, a niektóre jak np. rekombinant kodujący białko fuzyjne VP26-mCherry skonstruowany był przez doktorantkę w ramach powstającej pracy doktorskiej. W drugim etapie

doktorantka skupiła się na badaniach oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w procesie rozprzestrzeniania się wirusa na drodze CTC. Wyniki swoich badań autorka dokumentuje pięknymi rycinami, schematami prezentowanych eksperymentów, wykresami, kolorowymi zdjęciami z fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego oraz załączonymi filmami.

Uważam, że do najcenniejszych naukowych wyników badań zaprezentowanych w recenzowanej pracy doktorskiej należą:

1. Opracowanie przez doktorantkę oryginalnego i nowatorskiego testu na określenie prędkości rozprzestrzeniania się wirusów (dzikiego typu czy też różnych jego rekombinantów) na drodze CTC w różnego rodzaju hodowlach komórkowych z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Ten model badań może być wykorzystany nie tylko do badań wędrówki herpeswirusów, ale także innych wirusów w układach różnych komórek. W porównaniu z stosowanym do tej pory testem klasycznym, opartym na analizie wielkości powstających łysinek, test opracowany przez doktorantkę pozwala na określenie dynamiki procesu wędrówki cząstek wirusowych w każdej godzinie obserwacji. Z wykorzystaniem testu CTC w pracy udało się uwidocznić wpływ delekcji genu kodującego kinazę US3 na obniżenie tempa transmisji wirusa BHV-1 w 9 hpi, który został zniwelowany po 12 hpi. Analiza filmów poklatkowych pokazała również opóźnienie czasu transloкации gE-GFP do połączeń komórkowych w komórkach zakażonych mutantami BHV-1 pozbawionymi aktywności kinazy (BHV-1 Δ US3 oraz BHV-1 US3KD).
2. Skonstruowanie nowych rekombinantów BHV-1 kodujących białko fuzyjne VP26-mCherry, które to rekombinanty doktorantka wykorzystwała do analizy przyżyciowej rozprzestrzeniania się ich między innymi w międzykomórkowych nanorurkach (TNT). Białko wirusowe VP26 jest małym białkiem kapsydowym. Nie jest ono konieczne do replikacji wirusa, ale występuje w dużych ilościach w nowo powstających kapsydach, co umożliwia dobrą wizualizację rozprzestrzeniania się wirusa w komórkach gospodarza. Dzięki infekcji podwójnie znakowanym rekombinatem BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry i wykorzystaniu opracowanego przez doktorantkę nowego testu udało się ustalić, że białka kapsydu oraz osłonki wirusa są transportowane oddzielnie w międzykomórkowych nanorurkach. Zarówno test, jak i skonstruowane rekombinanty wirusa mogą być stosowane w dalszych badaniach.
3. Identyfikację 17 białek komórkowych, w tym 6 o lokalizacji błonowej, między innymi podjednostki α białkowej fosfatazy 1 (PP1 α), które mogą oddziaływać z wirusową glikoproteiną gE/gI w procesie rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 na drodze CTC. Tę część pracy prowadzono we współpracy z Pathoproteomics Research Group (Uniwersytet Ernst Moritz Arndt, Greiswald, Niemcy), z wykorzystaniem spektrometru masowego LTQ Orbitrap Velos. Pani Dereweńko udało się potwierdzić oddziaływanie gE-GFP z PP1 α w trzech typach komórek bydłowych oraz dodatkowo pokazać, że nie zachodzi bezpośrednia interakcja między gE a PP1 α . Wskazuje to na konieczność obecności kompleksu gE/gI i/lub innych białek wirusowych do

zajścia tego oddziaływania. Te wstępne, bardzo cenne obserwacje wymagają jeszcze dalszych dodatkowych badań, które zamierza doktorantka dalej kontynuować, ponieważ uważa, że badanie oddziaływania białek wirusowych oraz fosfataz komórkowych wydaje się słusznym kierunkiem w lepszym poznaniu transmisji na drodze CTC. Ponieważ białko PP1 α jest silnie konserwowanym ewolucyjnie białkiem wśród kręgowców, interakcja z tą fosfatazą może być uniwersalna dla różnych gatunków herpeswirusów, co mogłoby stanowić podstawę do tworzenia nowych leków przeciw herpeswirusowym infekcjom.

Rozdział 9 pracy to bardzo dojrzałe przeprowadzona dyskusja licząca 24 strony wraz z końcowymi wnioskami. Bardzo ładnie udowadnia autorka, między innymi, jak ważna i oryginalna jest jej metodologia testu prędkości CTC, która nie została do tej pory opisana w literaturze naukowej. Wiele z moich pytań i wątpliwości, które nasuwały mi się czytając rozdział materiały i metody oraz wyniki, doktorantka wyjaśnia właśnie w dyskusji, cytując bardzo umiejętnie i dobrze, wybrane pozycje literaturowe innych autorów. W jej pracy doktorskiej bibliografia stanowi aż 505 pozycji literatury.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Doktorantka wykonała, z zastosowaniem dobrze dobranych metod badawczych, i opisała rzetelnie i dojrzałe wszystkie etapy pracochłonnych eksperymentów i wyciągnęła cenne wnioski. Kontynuacja wybranych aspektów badań recenzowanej pracy doktorskiej może również być pomocna w konstruowaniu nowych leków przeciw chorobom herpeswirusowym. **Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Natalii Derewońko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie, ale niestety według regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich Rady Nauk Biologicznych UG, który otrzymałam wraz z prośbą o jej zrecenzowanie, praca autorstwa Pani mgr Natalii Derewońko nie spełnia wszystkich w nim wymaganych warunków.



Prof. dr hab. nauk med. Magdalena Kosz-Vnenchak