

Prof. dr hab. Jacek Kuźmak

Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Graul pt. "Modulacja odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji herpeswirusem-molekularne aspekty działania kompleksu białek UL49.5/gM wirusa BHV-1

Praca doktorska mgr Małgorzaty Graul stanowi ważny element tematyki badawczej związanej z herpeswirusami, prowadzonej od wielu lat w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Podstawowym celem pracy było zbadanie mechanizmu funkcjonowania kompleksu białek UL49.5 i glikoproteiny M (gM), kodowanych przez bydłęcy herpeswirus 1 (BHV-1), w kontekście modulowania odpowiedzi immunologicznej, w przebiegu zakażenia tym patogenem.

Podjęcie powyższych badań jest jak najbardziej uzasadnione, biorąc pod uwagę fakt, że herpeswirusy w toku ewolucji wykształciły różne mechanizmy unikania i hamowania odpowiedzi immunologicznej, co jest krytyczne dla oddziaływań wirus-gospodarz. Dlatego z dużą aprobatą należy odnieść się do badań obejmujących z jednej strony identyfikację molekularnych mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej, a z drugiej strony umożliwiających poznanie mechanizmów zaangażowanych w zwalczanie zakażenia, w tym rolę mechanizmów odpowiedzi wrodzonej.

W przypadku zakażeń BHV-1 jednym z tych mechanizmów jest zaangażowanie wirusowego białka UL49.5 BHV-1 w hamowanie prezentacji antygenów wirusowych w kontekście cząstek MHC klasy I, poprzez oddziaływanie z transporterem związanym z przetwarzaniem antygenów (TAP). Dlatego zakłócenie funkcjonowania białka TAP, którego zadaniem jest transport peptydów antygenowych z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego w celu związania z cząstkami MHC I i ich prezentacji limfocytom T cytotoksycznym, prowadzi do zahamowania odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo, aktywność białka UL49.5 należy rozpatrywać w kontekście tworzenia kompleksu z glikoproteiną M (gM) BHV-1, w późnej fazie zakażenia. Pomimo licznych badań w tym obszarze nadal nie są jednak znane szczegóły molekularnego mechanizmu działania kompleksu białek UL49.5 i gM.

Drugą przesłanką podjęcia badań jest niewątpliwie fakt, że herpeswirusy będąc szeroko rozpowszechnioną grupą wirusów, posiadają określony patogenny potencjał w odniesieniu do ludzi i zwierząt. BHV-1, wykorzystany w prezentowanych badaniach, jako

modelowy patogen, uważany jest za jeden z głównych czynników wirusowych odpowiedzialnych za stany zapalne górnych dróg oddechowych i układu rozrodczego bydła. W skali światowej przyjmuje się, że około 20- 30% populacji bydła jest zakażone BHV-1; w Polsce odsetek ten waha się od 15 do 40% . Jakkolwiek kliniczne przypadki zakażeń BHV-1 stwierdzane są rzadko, to stała obecność wirusa w populacji bydła, a także wolnożyjących przeżuwaczy, jest przyczyną znacznych strat finansowych. Nie bez znaczenia jest również fakt, że BHV-1 stanowi dobry model w badaniach innych, spokrewnionych z nim herpeswirusów, głównie ze względu na bezpieczeństwo pracy oraz stosunkową łatwość w hodowli.

Prezentowane badania, oprócz niewątpliwych wartości poznawczych, mogą mieć w przyszłości związek z określonymi zastosowaniami praktycznymi związanymi z nowymi możliwościami opracowania bardziej skutecznych szczepionek, generujących odporność przeciwwakacyjną nie tylko ograniczającą siewstwo wirusa i zabezpieczających przed rozwinięciem objawów klinicznych, ale także eliminujących ryzyko latencji wirusowej.

We Wstępie Doktorantka ciekawie przedstawiła zagadnienia odnoszące się do podziału filogenetycznego herpeswirusów oraz scharakteryzowała, na przykładzie BHV-1, budowę tego patogenu, organizację genomu, cykl replikacyjny i patogenezę zakażeń. W sposób syntetyczny przedstawiła również aktualny stan wiedzy na temat szczepionek i szczepień przeciw temu wirusowi. Następnie dość szeroko omówiła budowę i funkcje retikulum endoplazmatycznego, skupiając uwagę na aspektach związanych z dojrzewaniem i degradacją białek związanych z tą strukturą, umiejętnie przy tym selekcjonując i przytaczając te dane mające bezpośredni związek z tematem dysertacji. Wartościowe są podrozdziały dotyczące prezentacji antygenów limfocytom T poprzez cząsteczki MHC klasy I oraz sposoby unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez herpeswirusy, co stanowi dobre umotywowanie zaplanowanych badań. W ostatnich częściach wstępu przedstawiła stan wiedzy na temat budowy i funkcji białek UL49.5 i gM. Generalnie, ta część pracy napisana z dużą troską o czytającego, wskazuje na znajomość aktualnego piśmiennictwa i dużą wiedzę Doktorantki z tego zakresu.

Mam zaledwie kilka uwag dotyczących początkowych części rozprawy;

Str.10, l.4 od góry - o ile wydaje się, że można używać zamiennie określenia zakażenie i infekcja, to użyte przez Doktorantkę sformułowanie „...gatunki infekujące ssaki” nie jest właściwym określeniem. Powinno być „...gatunki zakażające ssaki”

Str.13, l.20 od góry - w miejsce określenia „zmniejszenie wagi bydła” proponuję określenie „zmniejszenie przyrostów masy ciała” , co zgodne jest z przyjętym nazewnictwem weterynaryjnym

Str.17, l.8 od dołu – Belgia i Czechy nie mają statusu kraju wolnego od zakażeń BHV-1, a jedynie posiadają zatwierdzony program zwalczania

Str.18, l.2 od góry – chodzi o wielokrotne pasażę wirusa w celu uzyskania szczepu atenuowanego, a nie pasażę hodowli

Str.18, l.13 od dołu - system DIVA, zastosowany w szczepionkach, pozwala na odróżnienie zwierząt szczepionych od zakażonych terenowym szczepem BHV-1, a nie zwierząt chorych

Str.18, 1.5 od dołu - oprócz wymienionych dwóch szczepionek przeciw BHV-1, dopuszczonych do stosowania w Polsce, należy uwzględnić jeszcze trzy preparaty: Ibraxion (MERIAL), Biobos (Bioveta) i Hiprabovis (HIPRA).

Kolejny rozdział to prezentacja głównych celów pracy - ujęty jest on w formie dwóch zagadnień: (I) poszukiwanie motywów w N-końcowej domenie białka UL49.5, odpowiedzialnych za blokowanie funkcjonowania transportera związanego z przetwarzaniem antygenów (TAP) i kierowaniem go do degradacji oraz (II) identyfikacja domen w białkach UL49.5 i gM odpowiedzialnych za ich wiązanie, dojrzewanie i eksport ze struktur retikulum endoplazmatycznego, w komórkach zakażonych BHV-1, przedstawionych logicznie i w sposób syntetyczny. Nie mam tutaj żadnych uwag.

Nie mam żadnych uwag do rozdziału „Materiał i metody”. Rozdział ten został napisany dokładnie, a dobór oraz celowość zastosowanych metod nie budzi zastrzeżeń. Różnorodność zastosowanych metod obejmujących: hodowlę komórek *in vitro*, namnażanie i mianowanie wirusa, mutagenezę miejscowo-specyficzną, cytometrię przepływową i sortowanie komórek, produkcję wektorów retrowirusowych i system wprowadzania genów do komórek ssaczy, badanie transportu znakowanych peptydów przez transporter TAP czy wyciszanie ekspresji genów za pomocą siRNA, dobrze świadczy o technicznym przygotowaniu mgr Małgorzaty Graul do pracy laboratoryjnej. Podkreślić trzeba, że większość z tych metod musiała być zoptymalizowana na potrzeby opisywanych badań. Rozdział ten wystarczająco przybliżył czytającemu część metodyczną pracy. Drobną uwagę, dotyczy użycia określenia „eksprymujących gen” str. 64 l.9 od dołu, dla którego można znaleźć odpowiedniki w języku polskim.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na trzy zadania badawcze w których opisano wyniki licznych doświadczeń, które Doktorantka wykonała aby osiągnąć założone cele pracy. W pierwszym zadaniu badawczym, stosując metodę mutagenezы miejscowo-specyficznej, skonstruowała liczne warianty genu UL49.5, które po wprowadzeniu do komórek linii ludzkiego czerniaka (MJS) pozwoliły na otrzymanie linii komórek MJS, stabilnie produkujących warianty białka UL49.5. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie retrowirusowego systemu transferu genów, warunkującego ich konstytutywną ekspresję, co było krytyczne dla dalszych obserwacji. Mutacje dotyczyły wybranych sekwencji aminokwasowych lub motywów w N-końcowej domenie białka UL49.5, odpowiedzialnych za blokowanie transportera TAP i indukcję jego degradacji, a ich wybór poprzedzony był uprzednimi badaniami *in silico*. Doktorantka analizując obecność cząstek MHC klasy I i stabilność podjednostek TAP1 i TAP2 w komórkach MJS, stabilnie produkujących warianty białka UL49.5 wykazała, że N-końcowe reszty proliny (motyw PPQ) są niezbędne do blokowania funkcji transportera TAP. Ważnym osiągnięciem tych badań było także wykazanie, że reszty aminokwasów obdarzonych ładunkiem, zlokalizowane w N-końcowej domenie białka UL49.5 są niezbędne dla degradacji transportera TAP, co sugeruje istotną rolę mostków solnych w utrzymaniu struktury przestrzennej tego białka.

Prezentowane doświadczenia przeprowadzono głównie z wykorzystaniem komórek linii ludzkiego czerniaka, dobór których Doktorantka argumentuje wysokim stopniem

permissywności dla BHV-1, aktywnością tego wirusa względem ludzkiego homologa transportera TAP oraz lepszą dostępnością odczynników do analizy aktywności TAP w komórkach pochodzenia ludzkiego. Niewątpliwie są to okoliczności przemawiające za użyciem komórek MJS, jednak może to rodzić pytanie o użycie do badań komórek linii nienowotworowych, pochodzenia bydłowego. Jest to ważne, biorąc pod uwagę analizę mechanizmów odporności wrodzonej, względnie prowadzenie badań dotyczących możliwych aplikacji klinicznych. Byłbym wdzięczny za ustosunkowanie się Doktorantki do tej kwestii. Proszę również o wyjaśnienie różnic w profilu produkcji wariantów białka UL49.5 w uzyskanych liniach stabilnych komórek MJS i MDBK, co zaprezentowano na ryc. 17 i 18, na stronie 74. Czy brak danych odnoszących się do wariantów R31A, E32A i RE/AA oznacza, że nie były one produkowane przez komórki linii MDBK, czy też w badaniach tych użyto tylko dwa warianty R30A i RRE/AAA?

W drugim zadaniu Doktorantka skupiła uwagę na innej właściwości białka UL49.5 jaką jest tworzenie kompleksu z białkiem gM BHV-1. Skoncentrowała się przede wszystkim na analizie wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami UL49.5 i gM, w czym pomocne okazały się skonstruowane mutanty BHV-1, charakteryzujące się brakiem ekspresji genów kodujących białko gM i UL49.5. Wykorzystała je do zakażenia komórek MDBK wykazując, że obecność obydwu białek jest wzajemnie niezbędna dla ich dojrzewania i odpowiedniej lokalizacji w zakażonej komórce. W opisie wyników tych badań nie znalazłem informacji na bazie jakich szczepów BHV-1 przygotowano powyższe konstrukty. Prosiłbym o wyjaśnienie, ponieważ z zestawienia przedawnionego na stronie 48 wynika, że do dyspozycji były szczepy Lam i Jura. Kolejnym aspektem badań była identyfikacja domen i motywów strukturalnych odpowiedzialnych za powstawanie i dojrzewanie kompleksu białek UL49.5/gM. W badaniach tych pomocne okazały się skonstruowane mutanty BHV-1, produkujące białko gM pozbawione domeny cytoplazmatycznej oraz mutanty BHV-1 produkujące chimeryczne warianty białka UL49.5. W mojej ocenie najbardziej atrakcyjne wydają się wyniki potwierdzające, że domena cytoplazmatyczna gM jest zbędna podczas wiązania białka UL49.5 i eksportu kompleksu z retikulum endoplazmatycznego, natomiast region transbłonowy UL49.5 odgrywa kluczową rolę regulatorową podczas dojrzewania kompleksu UL49.5/gM. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem Doktorantki jest też wykazanie, że motyw aminokwasowy determinujący zamek glicynowy piątego regionu transbłonowego białka gM jest niezbędny dla prawidłowego wiązania białka UL49.5 oraz dojrzewania kompleksu UL49.5/gM.

W trzecim zadaniu Doktorantka skupiła się na określeniu roli komórkowego białka PiB w mechanizmie funkcjonowania UL49.5, wykazując jego marginalne znaczenie.

W podsumowaniu, rozdział „Wyniki” oceniam bardzo pozytywnie. Na uwagę zasługuje różnorodność i jednocześnie tematyczna spójność tych badań, odnosząca się do wielu różnych interakcji leżących u podstaw funkcjonowania i dojrzewania kompleksu UL49.5/gM. Jakkolwiek mnogość informacji będących pochodną wykonanych badań jest trudna do interpretacji, to mgr Małgorzata Graul dobrze sobie poradziła z obfitością wyników.

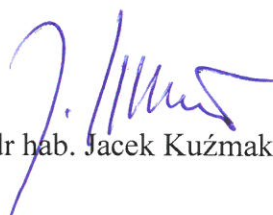
Rozprawę kończy rozdział Dyskusja, który potwierdza dużą dojrzałość Doktorantki jako kompetentnego pracownika naukowego, poruszającego się swobodnie w obszarze wiedzy o skomplikowanych relacjach zachodzących w układzie zakażona komórka-

herpeswirus. W porównaniu do innych tego typu opracowań rozprawa nie zawiera końcowych wniosków ale uważam, że ich brak zrekompensowany jest wyeksponowaniem w rozdziale Dyskusja krótkich konkluzji podsumowujących wyniki.

Oceniana praca wnosi nowe, istotne dane do wiedzy z zakresu molekularnych mechanizmów modulacji odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia BHV-1, a otrzymane wyniki są bardzo ważne dla dalszego rozwoju tego obszaru wiedzy. Wyszczególnione przeze mnie drobne uwagi nie zmieniają faktu, że rozprawę mgr Małgorzaty Graul oceniam bardzo wysoko.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Graul pod tytułem "Modulacja odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji herpeswirusem-molekularne aspekty działania kompleksu białek UL49.5/gM wirusa BHV-1" odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku ((Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz.595) z późniejszymi zmianami i przedstawiam Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Graul do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie dysertacji nagrodą.

Puławy, 27.06.2019r.


Prof. dr hab. Jacek Kuźmak