

Kraków, dnia 31 stycznia 2022 roku



Uniwersytet Jagielloński

Ocena rozprawy doktorskiej
„Interakcje glikoproteiny B wybranych alfaherpeswirusów z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II”

autorstwa mgr Kingi M. Grabowskiej
z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
przygotowanej pod opieką
promotora **prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk**
i promotora pomocniczego **dr Andrei Lipińskiej**

Wyniki badań naukowych z ostatnich kilkunastu lat pokazują, jak różne wirusy rozwinęły ewolucyjną strategię ingerencji w mechanizmy wydzielania komórkowego endo- i egzocytozy poprzez zawłaszczenie ścieżki biogenezy *egzosomów*. Strategia „*konia trojańskiego*” chroni internalizowane wirusy, co dobrze było opisane na przykładzie retrowirusów, przed degradacją w procesach fagolitycznej i proteosomalnej degradacji. Co jest intrygujące, strategia ta nie tylko sprzyja infekowaniu nowych komórek przez namnażane cząstki wirusa, ale także może wpływać na odporność na wirusy, co w przypadku wirusów opryszczki wciąż pozostaje niejasne. Przyczyniło się to między innymi do niepowodzeń w opracowaniu skutecznych szczepionek przeciwko ludzkim herpeswirusom.

W te współczesne trendy wirusologii i nanomedycyny wpisuje się tematycznie i metodologicznie praca doktorska wykonana przez panią mgr Kingę Grabowską pod kierunkiem promotorki prof. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk i promotorki pomocniczej dr Andrei Lipińskiej zatytułowana „*Interakcje glikoproteiny B wybranych alfaherpeswirusów z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II*”.

Przedstawiona mi do recenzji praca opisuje badania nad oddziaływaniem *glikoproteiny B (gB)* wybranych *alfaherpeswirusów*, takich jak ludzki HSV-1, bydłęcy BHV-1 i wirus pseudowścieklizny, z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami *MHC klasy II*. *gB* należy do rodziny białek

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

występujących u wszystkich herpeswirusów i jest jednym z najbardziej konserwowanych białek herpeswirusowych.



Uniwersytet Jagielloński

Praca doktorska p. mgr Kingi Grabowskiej w swej formie składa się z 10 części obejmujących: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie, wstęp, osobno cel pracy, dwie części opisujące materiały i metody, część poświęcona wynikom (rozbudowana), dyskusja i bibliografia i materiały dodatkowe. Praca zawiera: 38 rycin, 9 tabel, 158 odniesień do cytowanej literatury i 6 stron internetowych oraz materiały dodatkowe, które stanowią nagranie 6 filmów stanowiących zapisy zdjęć poklatkowych z mikroskopu konfokalnego, obrazujące internalizację EVs.

Celem rozprawy doktorskiej p. mgr Kingi Grabowskiej było zbadanie związku *gB* trzech wybranych *alfaherpeswirusów* (HSV-1, BoHV-1, PRV) ze szlakiem endosomalno-egzosomalnym komórek gospodarza, poprzez: badanie zdolności *gB* do lokalizacji w EVs wraz z próbą określenia mechanizmu inkorporacji *gB* do EVs, badanie zdolności *gB* do oddziaływania z cząsteczkami *MHC klasy II* (ludzkimi i bydlęcymi) i obniżania poziomu *MHC II* na powierzchni komórek, co poświadczałoby immunomodulacyjny charakter *gB*. Ponadto doktorantka podjęła się charakterystyki fizyko-biochemicznej EVs uwalnianych przez komórki infekowane wybranymi *alfaherpeswirusami*. Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej były częścią projektu zatytułowanego „Badanie roli egzosomów w przebiegu infekcji *alfaherpeswirusami*”, finansowanego z programu SONATA Narodowego Centrum Nauki.

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

Aby zrealizować tak ambitne pod względem merytorycznym i metodologicznym cele, doktorantka podjęła się badań, sięgając po szereg metod i technik badawczych stosowanych w biologii komórki, biologii molekularnej, mikrobiologii – wirusologii, genetyce i inżynierii materiałowej. Jednym słowem zastosowała narzędzia wykorzystywane w nanomedycynie, a zaaplikowane z powodzeniem do badań nad *pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EVs)*.

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

Wymienię te techniki, aby podkreślić ogrom pracy młodej badaczki i jej niewątpliwe umiejętności laboratoryjne oraz znajomość technik badawczych:

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

wirowanie, ultrawirowanie i wirowanie w gradiencie gęstości, chromatografia wykluczenia, techniki mikroskopii optycznej (fluorescencyjna mikroskopia konfokalna) i elektronowej (transmisyjna mikroskopia elektronowa i kriomikroskopia), techniki cytometrii przepływowej z sortowaniem, techniki klonowania i transfekcji, metoda immunoprecypitacji z western blott, ELISA.



Uniwersytet Jagielloński

Klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *EVs* przedstawiona w pracy opiera się o bardzo tradycyjny podział, wzorowany na pracach prof. Edit Buzas (György i wsp.2011), powielony następnie w wielu kolejnych pracach i ugruntowany w takich bazach danych, jak EVpedia z 2015 roku, Exocarta oraz Vesiclepedia. Podział ten stanowi punkt wyjścia do badań doktorantki i posłużył on do opracowania metody oddzielania *EVs* z medium hodowlanego zakażonych wirusem komórek linii hodowlanych. Dziś wiemy, że ta klasyfikacja nie jest doskonała, ponieważ opiera się o dwa niekiedy nachodzące na siebie kryteria: parametry fizyczne *EVs* (średnica) i kryterium biologiczne (biogeneza). Uznanie tych kryteriów za wyłączne niesie za sobą ryzyko kontaminacji różnych subpopulacji *EVs*, wykazujących takie same średnice, a pochodzących z innego komórkowego *milieu*. Dlatego też ważne jest, aby użyć odpowiednich metod separacji *EVs* i ich charakterystyki. Z tym zadaniem doktorantka poradziła sobie wyśmienicie, w rozdziale 6.4 (Metody pracy z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi) opisane zostały szczegółowe protokoły badań. *EVs* izolowano i oddzielano z medium hodowlanego za pomocą technik wirowania preparatywnego i w gradiencie gęstości (kryterium gęstości i średnicy) oraz chromatografii wykluczenia (kryterium wielkości). Jako kryterium biologiczne przyjęto obecność markerów *exosomów* tetraspanin *CD9* i *CD63* oraz białka Alix. Nie ma na tej liście markerów dla *mikropęcherzyków* (ektosomów) takich jak aktyny czy białka ARF - potwierdzających czystość subpopulacji *EVs*. To mogłoby wzbogacić pracę o kolejne dowody naukowe potwierdzające poprawność wybranych metod, nie jest natomiast żadnym uchybieniem w tej pracy. W tym miejscu odniosę się też do Tabeli 2 opisującej klasyfikację *EVs*. Mogłaby być ona uzupełniona o inne, bardziej szczegółowe markery dla *mikropęcherzyków*.

W tym miejscu pragnę też odnieść się do części wyników opisujących charakterystyki biochemiczne i fizyczne *EVs*. W rozdziale 7.3 brakuje obliczeń

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

gęstości dla poszczególnych frakcji jodiksanolu. Wykonanie tych obliczeń pozwoliłoby na charakterystykę gęstości oczyszczonych EVs. Ponadto brakuje też w wynikach pokazanych rozkładów wielkości otrzymanych EVs za pomocą technik NTA, DLS lub TRPS, opisywanych w pracy doktorskiej w tabeli 4. Zdaję sobie sprawę, że jest ograniczony dostęp do tych technik i nie uważam też tych badań za kluczowe dla interpretacji uzyskanych wyników. Ta uwaga ma charakter techniczny, aby wskazać, że kryterium wielkości EVs jest interpretowane na różnym poziomie precyzji pomiaru, z których jedną z najczulszych technik są techniki mikroskopii elektronowej (TEM), użyte przez doktorantkę do charakterystyki EVs. Wyniki Rycina 21 przedstawia obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) EVs oddzielanych z pożywki hodowlanej znad linii komórkowych po barwieniu negatywowym octanem uranylu. Przy każdym z tych zdjęć mogłyby pojawić się histogramy z rozkładami wielkości średnicy, tym bardziej że na poprzedzającej stronie (str. 91) widnieje, iż średnicę pęcherzyków wyznaczano przy użyciu oprogramowania mikroskopu elektronowego i analizowano 100 pęcherzyków dla każdego preparatu. A więc dane są, aby podkreślić brak „znaczących różnic w populacjach pęcherzyków dla poszczególnych preparatów”.

Bardzo intrygujące dla mnie, jako recenzenta, jest uzyskanie wyników wskazujących na złożony wzór glikozylacji *gB* izolowanej z EVs zakażonych linii komórkowych (Rycina 23). Te zmiany we wzorze glikozylacji, potwierdzone technikami trawienia enzymatycznego, mogą dać wgląd w szlak biogenezy EVs jako nośników *gB* pochodzących od *alfaherpeswirusów*. Wyniki te doktorantka dyskutuje, wskazując na odmienność tych obserwacji z wcześniejszymi publikacjami, sugerując, że te modyfikacje wymagają dodatkowej „obróbki” w aparacie Golgiego.

Doktorantka biegle posługuje się technikami cytometrii przepływowej, jednak w swych badaniach nie sięgnęła po nie do charakterystyki uwalnianych EVs. Ciekawi mnie, czym spowodowana była ta decyzja, czy ograniczeniami technicznymi metody? Ciekawi mnie też wybór antygenu EVs jako markera egzosomów- *tetraspaniny CD63*. W Tabeli 5 przedstawione są także inne białka związane ze szlakiem wydzielania egzosomów i wpływające na cykl replikacyjny



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

alfaherpeswirusów, np. takie jak *TSG101*, ale też możliwa jest rola w tym cyklu innej *tetraspaniny*: *CD9*. Na panelu wyników (Rycina 24) pokazujących skuteczność transfekcji linii komórkowych przez badanie powierzchniowej ekspresji *gB* i antygenów *MHCII* tych linii, *tetraspanina CD63* miała posłużyć jako wskaźnik oddziaływania replikowanego białka *gB* z białkami szlaku endosomalnego. Jaki to ma związek z obecnością *CD63* w różnych frakcjach EVs otrzymanych z transfekowanych linii komórkowych? Szczególnie interesująca jest odpowiedź na to pytanie w kontekście słabej ekspresji na EVs otrzymanych z linii komórkowej Jurkat.

Niezmiernie wartościowym osiągnięciem w pracy p. *mgr Kingi Grabowskiej* jest uzyskanie obrazów mikroskopowych w technice zapisu poklatkowego wskazujących na internalizację EVs pochodzących od komórek będących „gospodarzem” wirusa do komórek docelowych, w tym przypadku linii guza nowotworowego wątroby (Huh7). Wyniki te udowadniają transfer EVs zarówno w przypadku obecności lub braku *gB* dla wirusa HSV-1. Jest to dla mnie absolutnie wyjątkowe odkrycie, które pozwoli być może w przyszłości na wyjaśnienie mechanizmów nowotworzenia i metastazy czerniaka skóry do płuc, kości i wątroby (linia MJS, z której otrzymano preparat EVs, wywodzi się z guzów czerniaka)!

Osobnym zagadnieniem są badania ko-lokalizacji *gB* z białkami markerowymi *egzosomów* i *MHCII*, udokumentowane na rycinach 18, oraz markera recyrkulujących endosomów (Rab11) rycina 15, późnych endosomów (Rab7) rycina 16, i lizosomów (LAMP1) rycina 17. Te wyniki pokazują dobitnie udział białek *MHCII* w transporcie białek wirusa za pośrednictwem EVs, co zostało opublikowane w osobnej pracy doktorantki (Grabowska K. et al. *Viruses*. 2020;12(4):429. doi: 10.3390/v12040429). Podczas obrony będę prosiła o interpretacje wyników analizy tych obrazów (Tabela 8 i 9).

Praca doktorska p. *mgr Kingi Grabowskiej* została napisana czystą i bezbłędną polszczyzną. Autorka unikała stosowania terminologii obcej w opisach metodycznych, z małymi wyjątkami. Tego się nie da zawsze ominąć, gdyż większość terminów naukowych (medycznych) ma swój źródłostów w łacinie, grece lub języku angielskim. Mam tu na myśli użycie takiego



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instituł Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

sformułowania jak „infekowane komórki” stosowanego zamiennie ze sformułowaniem „zakażone komórki”, forma „infekowane” przeważa i wyparła formę „zakażone”. Ale już sformułowanie „test łysinkowy” całkowicie zastąpiło jego angielski odpowiednik „plaque assay”. Bezdyskusyjną zaletą wyróżniającą pracę doktorską p. mgr Kingi Grabowskiej jest estetyczny i przejrzysty układ pracy, edytorskie dopracowanie rycin, mam na myśli zarówno schematy, jak i panele z wynikami badań, zawierające wykresy, schematyczne ilustracje opisujące eksperymenty, zdjęcia immunoblotów, czy wykresy przedstawiające wyniki analiz.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Kingi Grabowskiej jest naukowym dziełem o wybitnej wartości naukowej i walorach poznawczych dla badań nad mechanizmami odporności na *alfaherpeswirusy*. Praca ta nie tylko rozszerza i ugruntowuje stan wiedzy na temat udziału *EVs* w zakażeniach wirusowych, ale także stanowi przykład rzetelnego badania naukowego. Ponadto doktorantka stawia w swej pracy odważne hipotezy, które dyskutuje w oparciu o doskonale dobrane piśmiennictwo.

Wniosuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie dla p. mgr Kingi Grabowskiej, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” oraz rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Wniosuję również do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr Kingi Grabowskiej, zgodnie z Regulaminem wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczna, co uzasadniam w osobnym wniosku.



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków