

prof. dr hab. Jacek Jaworski  
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Warszawa, 26 kwietnia 2023 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Derewońko, pt. „Rola białek wirusowych oraz ich oddziaływanie z czynnikami komórkowymi podczas bezpośredniego transportu międzykomórkowego (*cell-to-cell spread*) alfaherpeswirusów”.**

**Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie**

Przedmiotem rozprawy pani mgr Natalii Derewońko było zbadanie roli wybranych białek wirusa BHV-1 w bezpośrednim transporcie międzykomórkowym wirusów oraz określenie białek komórek gospodarza, z którymi oddziałuje białko otoczki gE. W celu realizacji postawionych zadań Doktorantka opracowała nowatorską metodę przyżyciowej analizy mikroskopowej bezpośredniego transportu wirionów, co pozwoliło na znaczne pogłębienie dotychczasowej wiedzy na temat dynamiki tego procesu. Alfaherpeswirusy powodują wiele poważnych chorób ludzi i zwierząt gospodarskich, generując poważne koszty ekonomiczne, zarówno dla systemu opieki zdrowotnej, jak i dla gospodarki, szczególnie rolnictwa. Alfaherpeswirusy mogą wykorzystywać dwie alternatywne drogi rozprzestrzeniania się pomiędzy komórkami, w tym jedną, bezpośredniego transportu międzykomórkowego, omijającą wszelkie bariery zewnątrzkomórkowe, zarówno fizykochemiczne, jak i ze strony układu immunologicznego. Stanowi to poważne wyzwanie dla efektywnej terapii antywirusowej. Ponieważ, droga bezpośredniego transportu międzykomórkowego została odkryta relatywnie niedawno, wiedza na jej temat jest ograniczona. Jej poszerzenie wymaga opracowania nowych narzędzi i zrozumienia interakcji białek kluczowych dla tego rodzaju transportu z białkami gospodarza. To stanowiło motywację Doktorantki do podjęcia opisanych w niniejszej rozprawie badań. W efekcie została opracowana nowa metoda badawcza dająca lepszy wgląd w poszczególne etapy rozprzestrzeniania się wirusa i rolę białek gE oraz US3 w tym procesie. Ponadto, mgr Derewońko zidentyfikowała białko PP1 $\alpha$  jako potencjalnego partnera białka gE w trakcie infekcji. Ponieważ, dotychczas, podobne dane nie były publikowane, przedstawioną mi do oceny pracę należy uznać za nowatorską i o potencjalnie istotnym znaczeniu dla rozwoju wiedzy.

**Formalny opis rozprawy**

Rozprawa licząca 188 strony maszynopisu ma układ typowy. Rozpoczynają ją spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz dość obszerny liczący 48 strony Wstęp, zawierający 4 główne podrozdziały, które wprowadzają czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Po Wstępie, Doktorantka opisała Założenia i Cel swojej pracy doktorskiej. Po nich następuje wyczerpujący, ponad 30 stronicowy, opis materiałów i metod, podzielony na 52 główne podrozdziały. Wyniki, liczące 43 strony podzielone zostały na 2 główne podrozdziały, które bardziej szczegółowo omawiam poniżej w ocenie

merytorycznej rozprawy oraz krótkie podsumowanie wyników. Po Wynikach następuje 22 stronicowa Dyskusja. Po Dyskusji zamieszczono kolejno Wnioski i imponującą Bibliografię liczącą 505 pozycji. Rozprawa kończy się spisem dodatkowych materiałów dołączonych do rozprawy na nośniku USB. W rozprawie zamieszczono 45 rycin, 10 tabel i 8 filmów.

## Ocena merytoryczna

**Wstęp** ocenianej rozprawy jest obszerny. Omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia tematyki i celów rozprawy. Pierwsza część Wstępu jest poświęcona systematyce Alfaherpeswirusów, ich budowie, organizacji genomu i przebiegowi infekcji. Druga skupia się na bardziej szczegółowym opisie różnych strategii wykorzystywanych przez tę grupę wirusów do bezpośredniego transportu międzykomórkowego. Trzecia część Wstępu jest już poświęcona informacjom szczegółowym na temat BHV-1, od chorób przez niego wywoływanych po wykorzystanie go w badaniach jako wirusa modelowego. Ostatni, czwarty podrozdział Wstępu poświęcono dostępnym technikom badania transportu międzykomórkowego oraz interakcji białek wirusa zaangażowanych w ten proces. Lektura Wstępu była dla mnie fascynująca. Jest to bardzo sprawnie napisany przegląd literatury pokazujący dogłębną wiedzę Doktorantki w temacie jej badań. Jest to też rozdział bogato zilustrowany, co również podnosi jego wartość, zarówno naukową, jak i estetyczną. Moja drobna uwaga dotycząca Wstępu jest taka, że oprócz podkreślania co wiadomo, warto było bardziej uwypuklić te aspekty, gdzie nasza wiedza jest bardzo niska, co podkreślałoby aktualność stawianych sobie przez mgr Derewońko celów rozprawy.

**Cele rozprawy.** Jako główny cel pracy mgr Natalia Derewońko postawiła sobie „określenie roli kompleksu glikoprotein gE/gI oraz kinazy US3 wirusa BHV w bezpośrednim transporcie komórkowym [...] oraz zbadanie ich oddziaływania z czynnikami komórkowymi w trakcie tego procesu”. Pracę badawczą Doktorantka podzieliła na dwa etapy. W pierwszym analizowała rozprzestrzenianie się rekombinantów wirusowych, w tym zmutowanych i pozbawionych badanych białek. W drugim badała oddziaływania gE/gI z białkami komórkowymi gospodarza. W mojej ocenie zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe zostały określone trafnie, i w sposób umożliwiający uzyskanie konkluzyjnych wyników badań. Moje jedyna uwaga jest taka, iż cel główny sugerował również badanie interakcji kinazy US3, co nie było przeprowadzone, a zatem mógłby zostać sformułowany wężej, aby w pełni odzwierciedlać badania wykonane w ramach pracy doktorskiej.

**Materiały i Metody.** W mojej ocenie, materiały i metody wykorzystane w ocenianej rozprawie zostały opisane w sposób bardzo wyczerpujący i wystarczający do powtórzenia wykonanych procedur przez osoby dysponujące odpowiednim doświadczeniem, i umiejętnościami. Z drobnych uwag krytycznych zwróciłbym uwagę, na następujące aspekty:

1/ w przypadku wymienionych przeciwiał pierwszorzędowych warto było podać numery katalogowe (str. 64),

2/ w przypadku plazmidów z Addgene (str. 65) warto było podać numery im przypisane w repozytorium oraz o ile to jest wskazane na stronie Addgene, odnośnik do oryginalnej publikacji, w której były one wytworzone,

3/ wydaje mi się, że wzorce wielkości DNA nie są wzorcami masowymi (str. 67),

4/ Opis metod statystycznych jest w mojej ocenie dość skąpy. Brak np. informacji, ile wykonywano powtórzeń biologicznych. I dlaczego wybrano test Manna-Whitneya. Np. czy sprawdzano normalność rozkładu danych i jakiego testu w tym celu używano.

**Wyniki.** W pierwszej części wyników (Rozdział 8.1) Doktorantka przeprowadziła analizę rozprzestrzeniania się rekombinantów BHV-1 na drodze CTC w różnych typach hodowli komórkowych, w celu określenia wpływu wybranych białek wirusa na ten proces. Analiza ta składała się z kilku etapów, mających na celu m.in. (i) optymalizację warunków pozwalających na ograniczenie transmisji wirusa na drodze innej niż CTC w linii komórek MDBK i pierwotnych fibroblastów bydłęcych (przy użyciu roztworu metylocelulozy i surowicy anti-BHV-1, (ii) określenie wstępne roli białek gE i US3 na przebieg infekcji przy użyciu metod tradycyjnych (iii) opracowanie nowatorskiej metody przyżyciowej analizy rozprzestrzeniania się rekombinantów BHV-1 i w końcu (iv) ponowne opisanie wpływu badanych białek na dynamikę CTC przy użyciu tej metody. W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, iż

- (i) preferowana droga transmisji BHV-1 może zależeć od typu komórek (MDBK – CFE i CTC; zaś fibroblasty pierwotne CTC),
- (ii) brak wpływu kinazy US3 na przebieg infekcji drogą CTC w przypadku badań tradycyjnymi metodami,
- (iii) wpływ US3 na prędkość infekcji w pierwszych godzinach tego procesu w przypadku badań tradycyjnymi metodami.

Dalsze, bardziej szczegółowe analizy obrazów, uzyskanych w efekcie analizy przyżyciowej rozprzestrzeniania się rekombinantów BHV-1, posłużyły do określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka gE w trakcie formowania łąsin wirusowych. W efekcie, Doktorantka wykazała, iż w przypadku BHV-1 pozbawionych US3 występowało znaczne opóźnienie przemieszczenia się białka gE z aparatu Golgiego do błony komórkowej, co może tłumaczyć obserwowane wcześniej spowolnienie transmisji wirusa na drodze CTC. Podsumowując, dzięki opracowanej nowatorskiej metodzie pani mgr Derewońko zyskała wgląd we wczesne etapy infekcji na drodze CTC i scharakteryzowała udział kluczowej kinazy wirusowej – US3 w tym procesie. Są to bardzo istotne poznawczo wyniki i doceniam ich wagę. Niemniej mam kilka uwag do analizy opisanych wyników.

Pierwsza grupa uwag tyczy się analizy statystycznej. Podobnie jak w Materiałach i Metodach w podpisach do rycin oraz w tekście Wyników nie podano, ile razy dane doświadczenie było wykonane. To nie pozwala na ocenę czy wykorzystywane testy

statystyczne były prawidłowo dobrane. Np. czy można było stwierdzić, że rozkład danych odbiega od normalnego, co stanowiłoby podstawę do użycia testu Manna-Whitneya. Ponadto, nigdzie nie podano, co na wykresach reprezentują słupki błędów (SD czy SEM). Na Ryc. 23 grupa kontrolna zawsze wynosi 100%, mam zatem wątpliwość, czy w ogóle test Manna-Whitneya dawał wiarygodne wyniki. Ze sposobu prezentacji danych wydaje się, że one-sample t-test byłby bardziej adekwatny. W przypadku wyników przedstawionych na Ryc. 27 Doktorantka doszła do wniosku, iż w 9 godzinie zaobserwowano różnicę w tempie rozprzestrzeniania się badanych rekombinantów. Jednak nie przeprowadzono żadnych analiz statystycznych potwierdzających, iż ta różnica jest istotna. Na Ryc. 30 dokonano licznych porównań międzygrupowych, wykorzystując do tego test Manna-Whitneya służący do porównania ze sobą dwóch grup (najczęściej eksperymentu i kontroli). Jest to potencjalnie dopuszczalne pod warunkiem wykonania korekty testu biorącej pod uwagę liczbę wszystkich dokonywanych porównań w eksperymencie. Nie mam jednak pewności czy była ona wykonana. Najprawdopodobniej jednak najoptymalniejszym testem, przy założeniu nienormalnego rozkładu danych, byłby nieparametryczny odpowiednik testu ANOVA np. test Kruskala-Wallisa z odpowiednim testem post-hoc.

Druga grupa komentarzy odnosi się do badania lokalizacji komórkowej białka gE. Doktorantka stwierdza, że białko miało lub nie miało lokalizację w aparacie Golgiego lub w błonie komórkowej. Ale nie przeprowadzono równoczesnego obrazowania przyżyciowego z aparatem Golgiego wyznakowanym fluorescencyjnie. Podobnie jest w przypadku błony komórkowej, choć w tym wypadku Doktorantka przeprowadziła dodatkowe barwienia utrwalonych komórek. A zatem powstaje pytanie, na jakiej podstawie Doktorantka określiła lokalizację wirusa w aparacie Golgiego? Szczególnie w przypadku mutantów może to mieć kluczowe znaczenie, gdyby droga ich sortowania była zaburzana nie tylko w czasie, ale też i w odniesieniu do przedziałów komórkowych. Podrozdziały 8.1.2 i 8.1.3 są poświęcone konstrukcji nowych podwójnie wyznakowanych fluorescencyjnie rekombinantów BHV-1 i analizie ich rozprzestrzeniania się poprzez nanorurki. Pomimo mojego podziwu dla sprawności technicznej Doktorantki, uważam, że te dwa rozdziały odbiegają od logicznej konstrukcji całej pracy i w sumie niewiele wnoszą do rozprawy. Co więcej, Rozdział 8.1.2 w moim odczuciu jest opisem metod i raczej powinien znaleźć się w części rozprawy poświęconej właśnie wykorzystywanym metodom.

Rozdział 8.2 skupia się na analizie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami gospodarza. W tym celu wykorzystano technikę immunoprecypitacji połączoną z ilościową spektrometrią masową (metoda SILAC). W efekcie mgr Derewońko wyodrębniła szereg białek komórek gospodarza zaangażowanych w regulację różnorodnych procesów komórkowych np. transportu czy dynamiki cytoszkieletu. Jednak największe wzbogacenie spośród białek ko-immunoprecypitujących z badanym kompleksem białek wirusowych zaobserwowano w przypadku fosfatazy białkowej PP1 $\alpha$ . Dlatego w dalszej pracy Doktorantka skupiła się na bardziej dogłębnej analizie tej interakcji. W rezultacie doszła do wniosku, że pomimo, iż białka te współwystępują to nie oddziałują ze sobą bezpośrednio. Natomiast nie zamieszczono wyników wskazujących, iż PP1 $\alpha$  ma znaczenie dla rozprzestrzeniania się wirusa na drodze

CTC, co byłoby eleganckim dopełnieniem tej części pracy. W Dyskusji, mgr Derewońko odniosła się do tej kwestii, opisując próby przeprowadzenia tego typu eksperymentu. W moim odczuciu warto było zamieścić wyniki tych prób w wynikach, nawet jeśli były one dla autorki rozczarowujące. Z uwag krytycznych do tej części chciałem zwrócić uwagę na bardzo złą jakość blotu na Ryc 37A. Ten obraz jest tak przeeksponowany, że w zasadzie niemożliwe jest zaobserwowanie jakichkolwiek różnic nawet gdyby występowały. Oprócz tego zabrakło mi w przypadku wyników eksperymentów typu IP informacji o frakcji początkowej (tzw. *input*). Pokazywanie jej jest przyjętym i pożytecznym zwyczajem, gdyż pozwala ocenić zarówno efektywność samej immunoprecypitacji, jak i upewnić się, że właściwy prążek został uznany za analizowane białko. Z uwag mniej technicznych chciałem się dowiedzieć, czy rozkład komórkowy białka PP1 $\alpha$ -mCherry, był spodziewany i identyczny z rozkładem białka endogennego? Jest to o tyle istotne, że brak kolokalizacji gE-GFP z nadprodukowanym białkiem PP1 $\alpha$ -mCherry (Ryc. 45) Doktorantka uznała za kolejny dowód braku bezpośredniego oddziaływania tych dwóch białek.

Podsumowując, w ocenianej pracy doktorskiej, przeprowadzono bardzo wiele doświadczeń, dostarczających wartościowych informacji na temat rozprzestrzeniania się międzykomórkowego wirusa BHV-1 i roli wybranych białek wirusa w tym procesie. Zidentyfikowano również potencjalne białka gospodarza zaangażowane w ten proces. W moim odczuciu, jest to ważny wkład w rozwój wiedzy na temat biologii Alfaherpeswirusów.

**Dyskusja.** Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Derewońko odnosi uzyskane wyniki do istniejącego stanu wiedzy i jest bardzo sprawnie napisana, ponownie dowodząc, iż Doktorantka posiada szeroką wiedzę w zakresie tematyki pracy. Dla mnie jako czytelnika, mankamentem było jednak niewyodrębnienie podrozdziałów poświęconych konkretnym omawianym zagadnieniom. Przez to odnalezienie w Dyskusji fragmentów dotyczących konkretnej części Wyników stanowiło pewne wyzwanie.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Od strony graficznej zdjęcia mikroskopowe są dobrej jakości, choć wydaje mi się, że w części przypadków, pomimo dołączenia filmów, byłoby wskazane ujęcie na rycinach większej liczby zdjęć poklatkowych badanych procesów, tak jak to zwykle czyni się w publikacjach naukowych. Natomiast samo dołączenie zdjęć bardzo doceniam, gdyż naprawdę pomagają one lepiej ocenić dynamikę badanych przez Doktorantkę procesów. Na pozytywną ocenę zasługuje również umieszczenie w części Wyników poświęconej analizie interakcji białkowych białka gE, rycin poglądowych i schematów, co pozwala lepiej zrozumieć logikę eksperymentów oraz dynamikę badanych interakcji białkowych. W pracy pojawiają się pojedyncze błędy językowe lub niezbyt fortunne naukowo sformułowania, ale zwykle, o ile nie jest to problem dominujący nie wymieniam ich w recenzjach. W tym kontekście muszę jednak zwrócić uwagę na nagminne używanie przez Doktorantkę słowa ilość zamiast słowa liczba w przypadku obiektów policzalnych. Jest to rażący błąd językowy i radziłbym go unikać w przyszłych tekstach nie tylko naukowych.

## Wniosek końcowy

Podsumowując, pomimo kilku powyższych uwag polemicznych, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Natalii Derewońko spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Część wyników została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i przyczyniła się do poszerzenia naszej wiedzy na temat transportu międzykomórkowego alfa herpeswirusów. Natomiast opracowana przez Doktorantkę nowa metoda analizy tego procesu na pewno przyczyni się do dalszych odkryć w tej dziedzinie. W związku z tym, wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani mgr Natalii Derewońko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Jaworski