



Dr hab. Edyta Paradowska, prof. nadzw. IBM PAN

Łódź, 29.08.2022

Pracownia Wirusologii

Instytut Biologii Medycznej

Polskiej Akademii Nauk

w Łodzi

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdy Wąchalskiej

pt. „**Udział białek komórkowych uczestniczących w hamowaniu prezentacji antygenów zależnym od białka UL49.5 bydlęcego herpeswirusa BHV-1**”

Charakterystyka ogólna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Udział białek komórkowych uczestniczących w hamowaniu prezentacji antygenów zależnym od białka UL49.5 bydlęcego herpeswirusa BHV-1*” została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk i dr Andrei Lipińskiej (promotor pomocniczy) w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Rozprawa doktorska została przedstawiona do recenzji w postaci manuskryptu polskojęzycznego zawierającego 139 stron. Układ tekstu rozprawy jest typowy dla doświadczalnych rozpraw doktorskich i zawiera następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję i Wnioski. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Stosowanych Skrótów, a zakończona Piśmiennictwem, Spisem Rycin oraz Osiągnięciami naukowymi Doktorantki. W rozprawie zawarto 60 rycin, tabelę i 181 pozycji piśmiennictwa. Zarówno układ pracy, jak również poszczególnych rozdziałów jest czytelny, co ułatwia czytelnikowi lekturę dysertacji.

Wirusy wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających im unikanie odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. W warunkach zakażenia antygeny prezentowane przez cząsteczki MHC klasy I pochodzą m.in. z proteolitycznej degradacji białek wirusowych, które poddane ubikwitynacji, a następnie proteolizie ulegają degradacji lub są transportowane z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego przez transporter związany z przetwarzaniem antygenów (TAP). Po utworzeniu kompleksu białka wirusowego z MHC klasy I, TAP odłącza się od kompleksu, który ulega przemieszczeniu na powierzchnię komórki. Niektóre wirusy mają zdolność hamowania prezentacji antygenów przez

cząsteczki MHC klasy I np. przez zatrzymywanie ich w retikulum endoplazmatycznym i ubikwitynizację. W retikulum może także dochodzić do gromadzenia się nieprawidłowo sfałdowanych białek, które mogą być eliminowane przez działanie ligaz ubikwityny E3 i szlak komórkowy ERAD. Bydlęcy herpeswirus typu 1 (BoHV-1) posiada zdolność manipulacji szlakiem ERAD i kierowania transportera TAP do degradacji proteasomalnej, prawdopodobnie przy wykorzystaniu białek komórkowych gospodarza.

Tematyka rozprawy jest nowatorska i interesująca od strony poznawczej. Doktorantka podjęła się próby identyfikacji tych czynników komórkowych, które uczestniczą w degradacji kompleksu TAP indukowanej przez białko UL49.5 BoHV-1. Białko UL49.5 BoHV-1 jest wczesnym białkiem transbłonowym typu I, które może występować jako monomer, homodimer lub w kompleksie z glikoproteiną M osłonki wirusa. Określenie czynników komórkowych wykorzystywanych przez białko BoHV-1 do degradacji kompleksu TAP może mieć również istotne znaczenie dla poznania mechanizmów wykorzystywanych przez inne herpeswirusy.

Struktura i ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Streszczenie jest napisane prawidłowo i obejmuje wprowadzenie, cel pracy, opis badań i wyników oraz podsumowanie. Część doświadczalna pracy została poprzedzona **Wstępem** liczącym 24 strony. Wstęp rozpoczyna się od omówienia proteasomalnej degradacji białek z udziałem ubikwityny. Doktorantka przedstawiła kaskadowy charakter ubikwitynacji, opisała ligazy ubikwityny E3 kompleks proteasomu 26S i szlak komórkowy ERAD. W dalszej części wstępu Autorka zapoznaje czytelników z rodziną herpeswirusów, opisując ich budowę, genom, cykl replikacyjny i patogenezę na przykładzie BoHV-1. Następnie Autorka opisała ogólnie strategie immunomodulacyjne wykorzystywane przez herpeswirusy, w tym ich wpływ na szlak prezentacji antygenów przez cząsteczki MHC klasy I. Doktorantka skoncentrowała się na mechanizmach hamowania aktywności transporterów TAP, które umożliwiają ATP-zależny transport antygenów do retikulum endoplazmatycznego. Wstęp kończą informacje dotyczące budowy i potencjalnych funkcji domen białka UL49.5. Dobór zagadnień omawianych we wstępie pracy jest przemyślany i tworzy logiczną całość z kolejnymi rozdziałami rozprawy. Treść rozdziału i sposób omówienia poszczególnych zagadnień potwierdzają wiedzę i znajomość piśmiennictwa w zakresie realizowanej tematyki badawczej.

Cel pracy został sformułowany jasno i przekonująco. Celem pracy było poszukiwanie i identyfikacja czynników komórkowych wykorzystywanych przez białko UL49.5 BoHV-1 do degradacji kompleksu TAP.

Rozdział **Materiały i Metody** zawiera szczegółowy opis stosowanych odczynników, materiałów i metod. Wszystkie wykorzystane procedury są opisane szczegółowo w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na uwagę zasługuje zróżnicowanie metod

badawczych wykorzystanych do pracy z DNA, białkami i komórkami ssaków, co potwierdza duże doświadczenie Doktorantki w pracy laboratoryjnej. Wśród metod pracy z kwasem deoksyrybonukleinowym zastosowano m.in. transformację komórek, izolację, ligację i defosforylację DNA, natomiast do badania białek wykorzystano Western blotting, SDS-PAGE i immunoprecypitację. Zakres metod pracy z komórkami ssaczymi obejmował np. transdukcję komórek otrzymanymi wektorami retro- i lentiwirusowymi, immunofluorescencyjną mikroskopię konfokalną, cytometrię przepływową, wirusowe zakażenia doświadczalne, wyciszanie ekspresji genów siRNA i badanie przesiewowe przy użyciu biblioteki siRNA dla genów układu ubikwityna-proteasom. Ponadto, Doktorantka skonstruowała model fluorescencyjny kompleksu TAP w fuzji z białkiem GFP. Ze względu na brak danych strukturalnych dotyczących oddziaływania kompleksu TAP z białkiem UL49.5 BoHV-1, Doktorantka przygotowała różne warianty TAP-GFP w zakresie linkera i lokalizacji GFP. Podkreślenia wymaga duży warsztat metodyczny Doktorantki i zastosowane oryginalne rozwiązania.

Autorka zaobserwowała, że intensywność fluorescencji nie zależała od rodzaju zastosowanego linkera, lecz od lokalizacji GFP. Fuzja GFP na końcu aminowym skutkowała intensywniejszą fluorescencją podjednostek TAP w porównaniu do fuzji na końcu karboksylowym. Oznaczenie poziomu ekspresji MHC klasy I wykazało, że zdolność UL49.5 do hamowania transportera była podobna dla wszystkich badanych wariantów TAP-GFP. Jednakże podatność na degradację indukowaną przez UL49.5 była najwyższa w przypadku zastosowania linkera helikalnego w konstrukcie zawierającym TAP1 oraz konstrukt TAP2-N-GFP, który został przez Doktorantkę wybrany do dalszych badań. Autorka przeprowadziła wysokoprzepustowe badanie przesiewowe siRNA, w wyniku którego zidentyfikowała białka komórkowe zaangażowane w degradację TAP w obecności UL49.5 BoHV-1. Wykazała, że w proces degradacji zaangażowane są białka należące do kompleksu ligaz CRL2, kulina 2 oraz elonginy B i C. Doktorantka zidentyfikowała także białko KLHDC3 będące receptorem rozpoznającym substrat kompleksu CRL2 w degradacji TAP zależnej od UL49.5. Rolę KLHDC3 jako receptora potwierdziła przez immunoprecypitację białka UL49.5 pod nieobecność KLHDC3. Przeprowadzona analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych wykazała duże podobieństwo receptora KLHDC3 bydlęcego, ludzkiego i mysiego. Autorka potwierdziła, że białko UL49.5 pośredniczy w oddziaływaniu między TAP a kompleksem CRL2-KLHDC3 a sekwencja RGRG UL49.5 jest degronem, który prawdopodobnie służy jako adaptor rekrutujący kompleks CRL2 do transportera TAP. Doktorantka wykazała, że białko UL49.5 oddziałuje z KLHDC3 także niezależnie od obecności TAP. Badanie oddziaływania białka UL49.5 z kompleksem CRL2 wykazało, że UL49.5 oddziałuje z kuliną 2 tylko na wczesnym etapie infekcji, podczas gdy w późniejszych etapach replikacji większość białka UL49.5 tworzy kompleks z gM osłonki wirusa.

Przeprowadzone badania i uzyskane przez Doktorantkę wyniki oceniam bardzo wysoko. Wyniki analiz i schematy zastosowanych układów badawczych zostały przedstawione na 40

czytelnych rycinach. Pozytywnie oceniam także schematyczne przedstawienie hipotetycznych modeli, które Autorka zaproponowała na podstawie otrzymanych wyników (np. Rys. 6.23 i 6.24). Jestem pod wrażeniem wyników, które mogą stanowić materiał do dalszych badań.

Dyskusja pracy została napisana dojrzałe a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi w niej uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.

Wnioski zostały sformułowane w postaci sześciu punktów. W mojej ocenie są one zbyt obszerne i powinny ulec skróceniu.

Cytowane **Piśmiennictwo** obejmuje 181 pozycji. Są to głównie anglojęzyczne prace oryginalne, w tym prace polskich autorów. Dobór bibliografii świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień związanych z podjętą tematyką badawczą. Doceniając fakt cytowania przez Doktorantkę prac fundamentalnych, zwracam uwagę na niewielki udział w cytowanym piśmiennictwie artykułów opublikowanych w ostatnich trzech latach.

W kontekście prezentowanych wyników chętnie poznałabym opinię Doktorantki dotyczącą kilku istotnych zagadnień przedstawionych poniżej:

1. W jaki sposób inne białka BoHV-1 wpływają na mechanizmy odporności wrodzonej?
2. Jakie mechanizmy unikania odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza wykształciły inne herpeswirusy?
3. Jaka jest rola kompleksu UL49.5-gM BoHV-1?
4. Jakie mogą być praktyczne implikacje uzyskanych wyników?

Rozprawa została napisana starannie i poprawnie pod względem językowym i edytorskim. Zawiera niewiele błędów literowych i stylistycznych, co jest trudne do uniknięcia w obszernej monografii. Rozdziały rozprawy są dobrze opisane i przygotowane z uwzględnieniem starań o stronę graficzną. Wszystkie przedstawione w pracy rysunki są czytelne. Jednakże Autorce nie udało się uniknąć błędów, niezręczności czy nieścisłości a do obowiązków recenzenta należy ich odnotowanie:

1. Część rysunków umieszczonych we Wstępie rozprawy została bezpośrednio przeniesiona ze źródeł oryginalnych, jedynie z wprowadzonymi opisami w języku polskim (podano w opisie materiały źródłowe)
2. Doktorantka w wielu tytułach rysunków nie wyjaśnia przedstawianych schematów/mechanizmów i odsyła czytelnika do tekstu rozdziału umieszczając zdanie: „Opis znajduje się w tekście”. Autorka pod każdym rysunkiem powinna wyjaśnić zastosowane na rysunku skróty i wyjaśnić przedstawione na nim procesy

3. Autorka w rozprawie stosuje zapis koniec lub fragment „C(T)-terminalny” w odniesieniu do końców łańcucha polipeptydowego; zapis ten powinien zostać zastąpiony sformułowaniem koniec „karboksylowy (aminowy)”
4. Autorka niepotrzebnie używa sformułowania ”wirusa HIV-1” zamiast „HIV-1” (str. 35)
5. Nie udało się Autorce uniknąć żargonu laboratoryjnego np. „N-terminalna fuzja” (str. 35), „oflankowany” (str. 47), „permeabilizowano” (str. 53), „ko-ewoluowanie” (str. 27)
6. Pojawiły się błędy w nazewnictwie wirusa „białko CPXV012 poxwirusa (CPXV, ang. cowpox virus)”. Powinno być: „białko CPXV012 pokswirusa (CPXV, ang. cowpox virus)”
7. Część zastosowanych skrótów nie została uwzględniona w przygotowanym wykazie (np. Ub, CD8+, SUMO, UBL, skróty nazw niektórych wirusów: PRV, EHV-1).

Chciałabym podkreślić, że dostrzeżone przez mnie błędy i krytyka nie umniejszają wartości naukowej rozprawy i nie rzutują na bardzo pozytywną ocenę całości pracy.

Praca doktorska była częścią projektów PRELUDIUM 18 i SONATA BIS 4 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Autorka uzyskała ponadto środki finansowe na stypendium doktorskie na Uniwersytecie Stanforda, USA (ETIUDA 8, Narodowe Centrum Nauki).

Część wyników została opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Cells* w artykule pt. „Fluorescent TAP as a Platform for Virus-Induced Degradation of the Antigenic Peptide Transporter”. Autorzy: Wachalska, M., Graul, M., Praest, P., Luteijn, R.D., Babnis, A.W., Wiertz, E., Bieńkowska-Szewczyk, K., Lipińska, A.D. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały ponadto przedstawione w trzech doniesieniach konferencyjnych.

Wniosek końcowy

W ocenie formalnej rozprawy stwierdzam, że praca ma strukturę prawidłową, napisana jest poprawnym językiem i zawiera właściwie przedstawione wyniki. Błędy językowe, literowe i redakcyjne nie są liczne. Uwagę zwraca czytelna forma prezentacji wyników, która ułatwia czytelnikowi odbiór zawartych w rozprawie informacji.

Badania Doktorantki dotyczą interesującego tematu, z dużym potencjałem poznawczym i aplikacyjnym. Pani mgr Magda Wachalska wykazała się wiedzą w podjętej tematyce badawczej i dużym doświadczeniem w realizacji eksperymentów naukowych. Badania wykonane z wykorzystaniem dobrze dobranych i zróżnicowanych metod pozwoliły na osiągnięcie w pełni zamierzonych celów. Jestem przekonana, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są oryginalne, wartościowe i mają dużą wartość naukową.

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny desercja Pani mgr Magdy Wąchalskiej pt. „Udział białek komórkowych uczestniczących w hamowaniu prezentacji antygenów zależnym od białka UL49.5 bydłęcego herpeswirusa BHV-1” stanowi samodzielny dorobek Autorki, który spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez przepisy obowiązującej Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym. Przedmiotem badań składających się na rozprawę jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdy Wąchalskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z uwagi na zakres objętych badań, uzyskane wartościowe wyniki poznawcze i jakość naukową ocenianej pracy zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny o wyróżnienie dysertacji.

KIEROWNIK
Pracowni Wirusologii
Instytutu Biologii Medycznej PAN

Dr hab. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN