



Ewa Szolańska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Igi Dalidowskiej
z tytułu
„Rola białek szoku cieplnego Hsp90 w replikacji ludzkiego adenowirusa 5”

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Promotora dr. hab. Pawła Bieganowskiego prof. IMDiK. Badania zostały przeprowadzone we współpracy z zespołem prof. Macieja Przybylskiego z Zakładu Mikrobiologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Tematyka projektu doktorskiego Pani mgr Igi Dalidowskiej, dotycząca badania wpływu inhibitora białek szoku cieplnego Hsp90 na namnażanie ludzkiego adenowirusa typu 5 (HAdV-5), jest istotna zarówno z naukowego punktu widzenia jak i możliwości wykorzystania uzyskanych wyników w opracowaniu leków i terapii antywirusowych, w tym mających zastosowanie w przypadku leczenia infekcji wywołanych przez adenowirusy. Powszechnie występujące zakażenia adenowirusami mają zazwyczaj łagodny przebieg i nie są groźne dla osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Podczas gdy w przypadku małych dzieci oraz osób z zaburzeniami układu odpornościowego stanowią poważne zagrożenie utraty zdrowia, a w pewnych przypadkach nawet śmierci. W grupie ryzyka ciężkiego przebiegu infekcji znajdują się pacjenci z chorobami immunologicznymi i nowotworowymi oraz poddawani immunosupresji w związku z coraz częściej stosowanymi w medycynie transplantacjami narządów, szpiku kostnego czy komórek macierzystych. W związku z niską skutecznością leczenia dostępnymi lekami antywirusowymi ciężkich zakażeń adenowirusami u osób z obniżoną odpornością, istnieje potrzeba opracowania nowych leków. Mając to na uwadze należy wysoko ocenić trafność i aktualność wybranej tematyki badawczej. Również w kontekście konieczności intensyfikacji badań ludzkich patogenów i opracowywania skutecznych metod walki z nimi, którą uświadomiła wywołana przez koronawirusa pandemia Covid-19.

Obiecującym celem terapii antywirusowych są niezbędne do namnażania się wirusa czynniki komórki gospodarza. Taka strategia stwarza możliwość uniknięcia pojawienia się oporności patogenu na stosowany lek, która jest istotną przyczyną niepowodzeń terapii antywirusowych. Dane literaturowe wskazują, że do wydajnej replikacji wirusów należących do różnych rodzin wymagana jest aktywność komórkowych białek szoku cieplnego Hsp90. Na tej podstawie w recenzowanej rozprawie przyjęto hipotezę, zgodnie z którą zahamowanie aktywności białka opiekuńczego będzie miało wpływ na przebieg infekcji adenowirusem i założono, że efekt zahamowania replikacji wirusa będzie związany z zakłóceniem produkcji lub funkcji określonych białek wirusowych. Celem badań opisanych w rozprawie było określenie roli Hsp90 w przebiegu cyklu życiowego ludzkiego adenowirusa typu 5. Badania zostały przeprowadzone w modelu komórek ludzkich infekowanych w obecności specyficznego inhibitora Hsp90 – 17-allylamino-17-demetoksygeldanamycyny (17-AAG). Badania zmierzały do ustalenia, który z etapów replikacji wirusa jest zależny od aktywności białka opiekuńczego. Realizowano to poprzez analizę wpływu zahamowania aktywności Hsp90 na przyłączanie HAdV-5 do powierzchni komórek, z uwzględnieniem dostępności receptorów wykorzystywanych podczas internalizacji wirusa. Badano wpływ inhibitora na transkrypcję genów fazy wczesnej i późnej, replikację wirusowego DNA oraz syntezę białek wirusowych. Kolejnym zadaniem było sprawdzenie oddziaływania białka opiekuńczego z jego potencjalnymi klientami - białkami wirusowymi. Badania zostały logicznie zaplanowane i zrealizowane z wykorzystaniem różnorodnych metod z zakresu hodowli komórkowych, wirusologicznych, mikroskopii fluorescencyjnej, biochemicznych oraz biologii molekularnej, wśród nich ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Świadczy to o dużych umiejętnościach praktycznych Doktorantki.

Doktorantka z sukcesem zrealizowała zamierzone cele. Wykazała, że ludzki adenowirus typu 5 wymaga do wydajnego procesu replikacji w hodowlach komórkowych aktywności opiekuńczej białka Hsp90. Zastosowanie inhibitora 17-AAG w dawkach nietoksycznych dla komórek powodowało spowolnienie namnażania się wirusa, a nie całkowite zahamowanie jego replikacji. W szczególności badania wykazały, że przejściowe zahamowanie replikacji wirusa przez inhibitor Hsp90 nie jest wynikiem zaburzenia procesu adsorpcji ani internalizacji wirusa. Natomiast antywirusowa aktywność inhibitora Hsp90 jest spowodowana

obniżeniem poziomu białka E1A, które ulega transkrypcji jako pierwsze podczas infekcji HAdV-5 i aktywuje transkrypcję wczesnych oraz późnych genów wirusa. Udowodniono, że aktywność Hsp90 jest niezbędna dla procesu syntezy *de novo* białka E1A, natomiast nie jest wymagana dla zachowania stabilności dojrzałego białka obecnego w komórce przed dodaniem inhibitora. Potwierdzeniem, że białko E1A jest klientem/partnerem molekularnym Hsp90 było wykazanie bezpośredniego oddziaływania Hsp90 α z białkiem E1A (izoformą 289R) podczas tworzenia kompleksów w komórkach ludzkich. W mojej opinii interesującym wynikiem jest również wykazanie znaczącego obniżenia ilości infekcyjnych wirionów - kapsydów zawierających DNA, w komórkach traktowanych inhibitorem, w stosunku do hodowli kontrolnych. Obserwacja ta może wskazywać na udział białka opiekuńczego również w późnych etapach cyklu replikacyjnego adenowirusa.

Zaprezentowane w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Są cennym wkładem w poznanie biologii adenowirusów. Mimo, że proces replikacji ludzkich adenowirusów jest bardzo dobrze poznany, brak było doniesień literaturowych na temat udziału w nim białek HSP 90. Rezultaty projektu doktorskiego mgr Igi Dalidowskiej mogą stanowić w przyszłości podstawę do opracowania nowej terapii efektywnej w leczeniu ciężkich zakażeń adenowirusem, opartej na wykorzystaniu związków hamujących aktywność białek Hsp90.

Znacząca część wyników badań stanowiących podstawę rozprawy została opublikowana w czasopiśmie z listy JCR - *International Journal of Molecular Sciences* w 2021. Doktorantka jest pierwszą autorką pracy, co wraz z odnośnymi adnotacjami w publikacji świadczy o Jej wiodącej roli w powstaniu publikacji.

Lektura ocenianej rozprawy nasuwa kilka pytań i uwag. Prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

- Podczas badania wpływu zahamowania aktywności Hsp90 na produkcję białka wczesnego E1A (str. 54) inhibitor zastosowano w stężeniu 4 μ M, które jest stężeniem toksycznym, jak wskazują prezentowane na rycinie 5 wyniki badania przeżywalności komórek A549 traktowanych 17-AAG. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie czym było podyktowane użycie inhibitora w tak wysokim stężeniu. Czy efekt nie był widoczny gdy stosowano inhibitor w niższych stężeniach?
- Doktorantka analizując w *Dyskusji*, obserwowany przy zahamowaniu aktywności Hsp90, znaczący spadek ilości infekcyjnych cząstek wirusa, rozważa udział białka opiekuńczego w procesie wprowadzania DNA do kapsydu i wskazuje na potrzebę dalszych badań tego zagadnienia. Jeśli są one planowane, to poprosiłabym Doktorantkę o krótkie przedstawienie podczas obrony w jaki sposób zostałyby przeprowadzone.
- Interesujące byłoby uzupełnienie niniejszych badań o eksperymenty *in vivo*. Chciałabym poznać opinię Doktorantki czy Jej zdaniem wyniki uzyskane w modelu komórkowych do tego uprawniają. Jeśli tak, to który z modeli zwierzęcych stosowanych w badaniach nad ludzkim adenowirusem mógłby być wykorzystany?
- Zastosowany w badaniach inhibitor powoduje zahamowanie aktywności obu izoform Hsp90 obecnych w cytoplazmie komórek ludzkich. Powstawanie kompleksów E1A z mutantem Hsp90 α wskazuje, że izoforma α białka opiekuńczego jest niezbędna dla replikacji adenowirusa. Co wiadomo na temat udziału w tym procesie izoformy β ? Wyjaśnienie tej kwestii umożliwiłoby użycie specyficznych inhibitorów hamujących poszczególne izoformy Hsp90. Poproszę Doktorantkę o odniesienie się do tej kwestii.
- Wyniki analizy badania wpływu 17-AAG na przejściową ekspresję sklonowanych białek HAdV-5, przedstawione na rycinie 12 (str. 49), Doktorantka podsumowała w *Dyskusji* stwierdzeniem: „...niezmieniony poziom poszczególnych białek HAdV-5 wskazuje, prawdopodobnie że nie należą one do puli klientów Hsp90” (str. 64). Chciałam poprosić Doktorantkę o komentarz do interpretacji uzyskanego wyniku, z uwzględnieniem faktu, że jednym z badanych białek było E1A. Eksperyment nie obejmował analizy głównych białek strukturalnych kapsydu, co wynikało z problemu z ich produkcją. Czy rozważano możliwość analizy produkcji/stabilności białek kapsydu w kontekście infekcji wirusowej przy użyciu specyficznych przeciwciał rozpoznających poszczególne białka?
- Moją uwagę zwróciła rozbieżność pomiędzy opisami na rycinie 19 zawartej w rozprawie (str. 56) i zamieszczonej w pracy opublikowanej przez Doktorantkę w *Int J Mol Sci* w 2021 roku (Figure 8), podczas gdy obie prezentują ten sam wynik bezpośredniego oddziaływania Hsp90 α z białkiem

E1A 289R. Podpis na rycinie 19 wskazuje na użycie w eksperymencie inhibitora, czego Autorka nie komentuje w opisie uzyskanego wyniku. Również w tekście publikacji (Dalidowska i wsp., 2021) nie ma wzmianki o użyciu 17-AAG. Dodatkowo w opisie procedury przeprowadzenia powyższego eksperymentu w rozdziale rozprawy *Materiał i metody* znajduje się informacja o wykorzystaniu do transfekcji plazmidów kodujących izoformy E1A (str. 41). Czy oznacza to, że badano również powstawanie kompleksów Hsp90α z E1A 243R. Jeśli tak, to jaki wynik uzyskano?

Rozprawa doktorska mgr Igi Dalidowskiej przedstawiona została w formie monografii naukowej. W mojej opinii tytuł rozprawy dobrze odzwierciedla zawartą w niej treść. Napisane w języku polskim opracowanie liczy 77 stron, ma poprawny układ i strukturę, na którą składają się: *Spis treści*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (*Abstract*), *Wstęp*, *Hipoteza i cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski* oraz *Literatura*. Autorka uwzględniła także *Listę skrótów*. Obok części, których zamieszczenie wynika z wymogów formalnych, rozprawa zawiera rozdział *Innowacyjność pracy*. Autorka uzasadniła w nim w syntetycznej formie wybór tematyki badań i wskazała na jej innowacyjny aspekt.

Streszczenia w języku polskim i angielskim są merytoryczne tożsame, zostały dobrze opracowane. Przedstawiają w skróconej formie zawartość rozprawy, główne dane i wnioski.

Wstęp stanowi krótkie, ale kompetentne wprowadzenie w tematykę rozprawy. Zawiera logiczne uzasadnienie podjęcia tematyki badań i jej aktualności. Autorka w przystępnej formie przedstawiła zagadnienia stanowiące tło dla zaprezentowanych wyników. Tekst rozdziału jest udokumentowany odpowiednio dobranymi danymi literaturowymi co wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki w zakresie problematyki badań. Wprowadzenie teoretyczne zostało zilustrowane tabelą i trzema dobrze dobranymi ilustracjami, które ułatwiają zrozumienie tekstu, ale żadna z rycin nie została przywołana w tekście. Ponadto sugerowałabym stosowanie nazwy „włókno” w miejsce używanego przez Autorkę „*fiber*”.

W rozdziale *Hipoteza i cel pracy* Autorka przedstawiła w klarowny sposób hipotezę badawczą oraz precyzyjnie sformułowany główny cel oraz cele szczegółowe pracy.

Rozdział *Materiały i metody* zawiera szczegółowy opis wykorzystywanych przez Doktorantkę metod, które zostały odpowiednio dobrane do realizacji zamierzonych celów pracy. Rozdział został starannie zredagowany. Moja uwaga dotyczy tego, że zawiera opis metody barwienia immunofluorescencyjnego adenowirusowego białka śmierci ADP (str. 40, podrozdział 3.5.4.), podczas gdy Autorka nie przedstawiła w rozprawie wyników eksperymentu przeprowadzonego zgodnie z tą procedurą.

Liczący 13 stron maszynopisu rozdział *Wyniki* zawiera logicznie skonstruowany opis danych doświadczalnych zaprezentowanych w postaci 16 czytelnych rycin. Mam kilka uwag do opracowania rozdziału:

Niektóre z rycin zostały zamieszczone w opublikowanej przez Doktorantkę pracy Dalidowska i wsp., 2021. Podpisy pod tymi rycinami powinny więc zawierać odnośnik do publikacji.

Na rycinach prezentujących wyniki analizy western blot Autorka nie zamieściła obrazu migracji wzorca mas cząsteczkowych, który umożliwiłby czytelnikowi ocenę wielkości badanych białek.

Na rycinie 6 (str.44) błędnie podano wartość najwyższego użytego miana wirusa. Z opisu na rycinie (Figure 1) zamieszczonej w publikacji Dalidowska i wsp., 2021 wynika, że TCID₅₀/ml wynosiło 10 000, a nie jak podano „1000”.

W opisie wyników analizy wpływu 17-AAG na produkcję sklonowanych białek HAdV-5 (str. 50) zabrakło wyjaśnienia pochodzenia skrótu nazwy białka UXP, a w rozprawie nie ma wzmianki na temat tego białka.

W zawartej na 9 stronach *Dyskusji* Autorka przedstawiła krytyczną ocenę rezultatów projektu doktorskiego w świetle aktualnego stanu wiedzy prezentowanego w literaturze. Rozdział jest opracowany w sposób logiczny i rzeczowy. Pewien niedosyt budzi brak szerszego omówienia uzyskanych wyników z perspektywy ich praktycznego wykorzystania, które jest merytorycznie uzasadnione. Dodatkowo ta kwestia została w interesujący sposób przedyskutowana w pracy Dalidowska i wsp. 2021. Rozdział kończy się *Podsumowaniem*, w którym Autorka w syntetycznej formie przedstawiła najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie. W tekście pojawił się błąd: Autorka odwołuje się do ryciny 16 i 17, podczas gdy omawiane wyniki zostały przedstawione na rycinach 17 i 18 (str. 66).

Wnioski z przeprowadzonych badań zostały sformułowane w postaci zwięzłych stwierdzeń, które znajdują poparcie w zaprezentowanych w rozprawie wynikach projektu doktorskiego.

Rozdział *Literatura* zawiera zestawienie 139 pozycji cytowanych w rozprawie. Dobór prac świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem. Jednak z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne niezręczne sformułowania, które wynikają zapewne z pośpiechu podczas redagowania pracy. Ponadto w tekście występują błędy literowe i edycyjne, których nie wymieniam

Str. 41 „Do immunoprecypitacji wykorzystano komórki HEK293 transfekowane plazmidami kodującymi izoformy E1A w połączeniu z mutantem Hsp90α E46A.”

Str. 55 „...poziom E1A utrzymuje się na stałym poziomie.”

Str. 63 „Ze wskazanych danych literaturowych wynika także, że izolowana domena CR3 ma zdolność również zdolność aktywacji transkrypcji z promotora MLP.”

Str. 67 „Efekt inhibicji replikacji, spowodowany dodatkiem 17-AAG, widoczny jest w momencie kiedy inhibitor dodany jest w momencie zakażenia hodowli.”

Pragnę podkreślić, że zawarte w recenzji komentarze, uwagi krytyczne i sugestie nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość naukową rozprawy i fakt, że osiągnięcia ocenianego projektu doktorskiego mogą w przyszłości stanowić podstawę projektowania leków i terapii antywirusowych. Ponadto znacząca część wyników badań stanowiących przedmiot rozprawy została opublikowana w pracy eksperymentalnej, której Doktorantka jest pierwszym autorem.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Igi Dalidowskiej zatytułowana „Rola białek szoku cieplnego Hsp90 w replikacji ludzkiego adenowirusa 5” spełnia zwyczajowe oraz ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Igi Dalidowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Warszawa, dnia 31 sierpnia 2022

Ewa Szolajska

Dr hab.

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa