



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
INSTYTUT NAUK BIOLOGICZNYCH

Katedra Wirusologii i Immunologii
Akademicka 19, 20-033 Lublin, Fax: (4881) 537 59 59; tel: (4881) 537 59 43

Prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska
Katedra Wirusologii i Immunologii
Instytut Nauk Biologicznych UMCS

Lublin 16.08.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Igi Dalidowskiej

pt.: „Rola białek szoku cieplnego Hsp90 w replikacji ludzkiego adenowirusa 5”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pana dr hab. Pawła Bieganowskiego, prof. IMDiK w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Wachlarz leków przeciwwirusowych nie jest bogaty. Działanie obecnych preparatów skupiają się na hamowaniu aktywności tych białek wirusowych, które są niezbędne do replikacji patogenu. Często punktem uchwytu działania leku są białka wirusowe, które nie podlegają tak częstym zmianom. Jednak historia pokazuje, że mimo to wirusy nabywają oporność na stosowane preparaty, np. wirus grypy wobec oseltamiviru, zaś ostatnio wykryto także trzy mutacje wirusa SARS-CoV-2, które nadają mu oporność wobec Paxlovidu. Dlatego nowym kierunkiem badań jest zwrócenie uwagi na te białka komórki gospodarza, które są niezbędne dla replikacji wirusów. Zahamowanie ich aktywności byłoby interesującą alternatywą dla leków skierowanych bezpośrednio przeciwko wirusowi. Temu zagadnieniu jest poświęcona praca Pani mgr Igi Dalidowskiej.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Igi Dalidowskiej, ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i mieści się na 77 stronach zawierających: Wstęp, Hipotezę i Cel pracy, opis Metodyki badań, Wyniki, Dyskusję, Wnioski oraz Piśmiennictwo. Na początku rozprawy zostało umieszczone objaśnienie skrótów użytych w pracy oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Zachowano odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy.

Można było dołączyć do pracy publikację, w której umieszczono część wyników rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp zawiera niezbędne informacje służące wprowadzeniu czytelnika w problematykę pracy. Doktorantka opisuje rodzinę *Adenoviridae*, budowę wirionu AdV5, bardzo szczegółowo cykl replikacyjny wirusa wraz z rolą komórkowego białka Hsp90 w tym procesie. Interesujące jest, iż wiele wirusów wykorzystuje to białko gospodarza nie tylko do poprawnego fałdowania białek własnych. Pani mgr Iga Dalidowska przedstawia te wirusy w obszernej tabeli ze zwróceniem uwagi na specyficzną rolę Hsp90 w poszczególnych etapach replikacji wirusów różnych rodzin. Już z tego wyłania się obraz potencjalnych korzyści z zablokowania aktywności tego białka gospodarza. Wstęp został zaopatrzony w trzy ryciny, jednak Rycina 1 i 3 nie ma podanego źródła – czy była to własna praca Autorki? I w oparciu o jakie piśmiennictwo.

Przedstawiona **Hipoteza i Cel pracy** zawiera logiczne uzasadnienie podjętych badań oraz jasno wyznaczone zadania do wykonania.

Rozdział **Materialy i Metody** został opracowany w sposób, w który, w większości przypadków, umożliwia powtórzenie każdego doświadczenia. Na początku scharakteryzowano sposób pozyskiwania HAdV5 w hodowli komórek linii HEK293. Dalej posłużono się metodami biologii molekularnej w celu otrzymania materiału genetycznego wirusa. Półilościowy oraz ilościowy PCR wykorzystano do określenia zmian ilościowych mRNA oraz białek E1A, DBP i heksonu. Szczegółowo opisano proces transfekcji komórek linii HEK293 i A549 plazmidami kodującymi białka HAdV5 lub Hsp90 α oraz ich detekcję. Pani mgr Iga Dalidowska pokazuje tym samym bardzo dobre przygotowanie warsztatu metodologicznego.

Zapoznając się z przedstawionym rozdziałem nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

1. Niewystarczająco dokładnie podano źródła pochodzenia materiałów wykorzystywanych w pracy, np. obu linii komórkowych (z numerami katalogowymi), inhibitora 17-AAG. Czy do hodowli komórek użyto cieplarki czy termostatu z przepływem CO₂ i jakiego typu oraz producenta?
2. Dlaczego do badań wybrano linię komórek HEK293 transfekowanych AdV5, które już wytwarzają białko E1A? Takie uzasadnienie znalazłam dopiero w Dyskusji.
3. Jakie stężenie DAPI zostało wykorzystane w barwieniu immunofluorescencyjnym?
4. Na jakiej podstawie wybrano do badań stężenie inhibitora 17-AAG i dlaczego dwa różne? Co prawda taka informacja znajduje się w rozdziale Wyniki, ale tutaj należało o tym wspomnieć.
5. W podrozdziale Analiza statystyczna. brakuje podania programu służącego do obliczenia wartości średnich wraz z odchyleniem SD oraz jego źródła. Podobna uwaga dotyczy oprogramowania Image Studio Lite – skąd go pozyskano?

Ogólnie mogę stwierdzić, że Doktorantka niezbyt starannie przygotowała ten rozdział w kontekście źródeł pochodzenia materiałów i oprogramowania służącego do opracowania wyników.

Wyniki przedstawione zostały w logicznym porządku. Najpierw Doktorantka omawia ogólny wpływ inhibitora 17-AAG na replikację AdV5 z uwzględnieniem różnych etapów namnażania wirusa przy zahamowaniu aktywności białka Hsp90. Wykazano, że Hsp90 nie wywiera wpływu na adsorpcję wirusa (brak zmian w ekspresji receptorów komórkowych CAR i integrynowych), ale już na uwalnianie kompletnych wirionów z komórki, co wskazuje na rolę Hsp90 w hamowaniu innych etapów replikacji wirusa, co było przedmiotem dalszych badań Pani mgr Igi Dalidowskiej. Na początek Autorka ustaliła, że dodatek inhibitora hamował syntezę strukturalnych białek wirusa na wczesnych etapach udowadniając, że ma to miejsce do 9 godziny po zakażeniu, za co odpowiada zmniejszenie transkrypcji genów dla białek E1A, DBP i heksonu. Warta podkreślenia jest ta część badań, która udowadnia rolę Hsp90 w przebiegu infekcji poprzez interakcję z białkiem E1A (badanie koimmunoprecypitacji).

Do tej części pracy mam następujące uwagi:

1. Badanie cytotoksyczności inhibitora 17-AAG powinno być opisane jako pierwsze. To ono posłużyło do wybrania jego nietoksycznych stężeń do dalszych analiz, w tym jako pierwszemu przedstawionemu badaniu immunofluorescencyjnemu – chyba, że Autorka tu wybrała stężenie 17-AAG 0,25 μ M na innej podstawie (jakiej?).
2. Na Rycinie 6A stężenie inhibitora 17-AAG powinno być podane w μ M a nie w nM, tak jak to jest później opisane. Generalnie należało ujednoczyć jednostki stężenia – w Dyskusji podawane są zamiennie jednostki μ M i nM. Z kolei na Rycinie 6B mało przekonujący jest widok zmniejszenia replikacji AdV5 w zależności od jego inokulum - moim zdaniem należało tu pokazać także analizę densytometryczną.
3. Inhibitor był podany jednorazowo i wówczas, w zależności od czasu kontaktu, obserwowano hamowanie replikacji adenowirusa. Czy w świetle wniosku opisującego potencjalne wykorzystanie inhibitora jako leku w przyszłości nie należało się pokusić o wielokrotne podawanie inhibitora, jako symulacji leczenia? Na przykład co 8-9 godzin jak wskazują na to wyniki badań, tyle, że w tym przypadku należałoby też przeprowadzić badanie cytotoksyczności aby wykluczyć akumulację inhibitora. Uważam, że Doktorantka mogła pokusić się o takie badanie, gdyż jednorazowe podanie inhibitora skutkowało później niepełną inaktywacją Hsp90 i stopniową akumulacją białka E1A w komórce, a w konsekwencji replikacją AdV5.
4. Czy różnice w analizie densytometrycznej białka E1A przedstawione na Rycinie 17B i C były statystycznie istotne? Wg mnie brakuje takiego porównania.

Pani mgr Iga Dalidowska **Dyskusję** rozpoczyna od oceny wpływu inhibitora 17-AAG na replikację HAdV5 w komórkach linii A549 zwracając uwagę na konkretny etap tego procesu uzależniony od aktywności białka opiekuńczego Hsp90, a mianowicie syntezy wirusowych białek E1A, DBP i heksonu. Podkreśla, że ich inhibicja jest krótkotrwała, po czym na nowo dochodzi do replikacji wirusa. Białko gospodarza Hsp90 pełni różne funkcje w komórce i jest w różny sposób wykorzystywane przez wirusy w celu propagacji co Doktorantka przedstawiła we Wstępie. Dlatego celowe było zbadanie, na który etap replikacji wirusa białko to wywiera wpływ. Zastosowanie inhibitora 17-AAG pozwoliło ustalić, że od aktywności Hsp90 uzależniona jest synteza wczesnych białek wirusa, w tym E1A, co zgodne jest z obserwacjami autorów stosujących inne linie komórkowe. Wskazuje to na uniwersalny mechanizm wykorzystywania białka Hsp90 przez AdV5, polegający na umożliwieniu syntezy i dojrzewania wirusowego E1A. Autorka zwraca uwagę, że nie można jednak wykluczyć

udziału białka Hsp90 w późniejszych etapach replikacji AdV5, lecz temat ten wymaga dodatkowych badań.

Ogólnie oceniam sposób poprowadzenia dyskusji jako bardzo dobry i wyczerpujący wszystkie zagadnienia poruszone w części doświadczalnej dysertacji. Przedstawiona dyskusja jest niewątpliwie mocnym punktem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Wnioski odpowiadają na wyznaczone cele pracy.

Bibliografia obejmuje 139 pozycji, w przeważającej części prac anglojęzycznych z ostatnich 5 lat. Nie mam żadnych zastrzeżeń i uwag dotyczących doboru cytowanych w dysertacji pozycji literatury światowej.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Cała rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim. Podział pracy na rozdziały i podrozdziały (zwłaszcza w Dyskusji) jest jasny i czytelny.

Podsumowanie recenzji

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi **oryginalne** i bardzo szczegółowe opracowanie roli białka Hsp90 w replikacji ludzkiego AdV5 co stanowi o innowacyjności tej pracy. Pani mgr Iga Dalidowska wykorzystała bardzo szeroki wachlarz metod, aby bezspornie udowodnić, iż Hsp90 odpowiada za produkcję i dojrzewanie wirusowego białka E1A, bez którego dalsze etapy replikacji wirusa nie są możliwe. Wyniki pracy doktorskiej pozwalają stwierdzić, iż ze względu na rolę Hsp90 w replikacji wirusów warto jest rozważyć to białko jako cel terapii przeciwwirusowej, nie tylko w stosunku do adenowirusów. Niewątpliwie cel, zakres i wykonanie badań oraz dyskusja są mocnymi stronami tej pracy, podczas gdy rozdział Materiały i Metody wymaga jednak większej uwagi. Jest to wskazówka dla Doktorantki w opracowywaniu przyszłych publikacji.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Igę Dalidowską rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (t.j. Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnoszę do Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra
Wirusologii i Immunologii UMCS

prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska