

Dr hab n. med. Piotr Grabarczyk
Zakład Wirusologii
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Warszawa, ul. Chocimska 5

Warszawa, 2 marca 2021 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Artura Szczepańskiego pt.: *Internalizacja psiego koronawirusa oddechowego do komórek gospodarza.*

Praca wykonana w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Laboratorium Wirusologicznym *Virogenetics* Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Promotor prof. dr hab. Krzysztof Pyrc

Rozprawa doktorska mgr Artura Szczepańskiego poświęcona jest identyfikacji mechanizmów wejścia psiego koronawirusa (ang. *Canine Respiratory Coronavirus*, CRCoV) do komórki.

Celem badań podjętych przez Doktoranta było ustalenie receptorów wirusa, poznania jego drogi wejścia do komórki oraz określenie miejsca fuzji z błoną gospodarza. Psi koronawirus jest niedawno (w 2003 roku) poznanym patogenem, mającym znaczenie w etiologii kaszlu kenurowego (ang. *Canine Respiratory Disease*, CIRDC). Choroba ta dotyka psy na całym świecie, zazwyczaj ma łagodny przebieg, jednak w niektórych przypadkach może rozwinąć się w odoskrzelowe zapalenie płuc, bądź śródmiąższowe zapalenie płuc prowadzące do śmierci zwierzęcia. Ten osłonkowy wirus wraz z bydłym koronawirusem (ang. *Bovine Coronavirus*, BCoV) oraz ludzkim koronawirusem HCoV-OC43 należy do gatunku *Betacoronavirus 1* w ramach rodzaju *Betacoronavirus*, podrodziny *Orthocoronavirinae* i rodziny *Coronaviridae*. HCoV-OC43 został wyizolowany w 1967 roku i odpowiada za łagodne infekcje dróg oddechowych.

CRCoV oraz w mniejszym stopniu badane w obecnej rozprawie BCoV i HCoV-OC43, wykazują zbliżoną organizację oraz znaczącą homologię genomu. Co istotne, uważa się, że HCoV-OC43, BCoV, CRCoV oraz koronawirus zakażający dromadery mogą rekombinować, co stanowi potencjalny mechanizm generowania nowych podgatunków wirusa. Ta hipoteza jest tym bardziej prawdopodobna, że wszystkie badane przez Doktoranta koronawirusy dają się hodować na ludzkich komórkach. Koronawirusy badane w pracy wykazują także istotne podobieństwo do

innych koronawirusów - SARS-CoV, SARS-CoV-2 oraz MERS-CoV. Trzy ostatnie wirusy są jednoznacznym przykładem, że koronawirusy potrafią przekraczać barierę gatunkową i w krótkim czasie stworzyć istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Doktorant uznał badane CRCoV oraz BCoV i HCoV-OC43 jako modelowe wirusy w poszerzeniu wiedzy dotyczącej początkowych etapów zakażenia koronawirusami (w streszczeniu pracy doktorskiej), które w ostatnich latach okazały się czynnikami zakaźnymi o istotnym znaczeniu nie tylko dla zdrowia publicznego na całym świecie, ale także dla gospodarki światowej.

Recenzowaną rozprawę należy zaliczyć do prac o charakterze podstawowym, jednak wydaje się, że uzyskane wyniki mają istotny potencjał dla dalszych badań o walorze aplikacyjnym.

Praca nie ma typowej **formy dla rozprawy doktorskiej** (takie jest przynajmniej doświadczenie autora niniejszej recenzji) – składa się z dwóch artykułów opublikowanych odpowiednio w 2018 oraz 2019 roku, w dwóch recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o znaczącym współczynniku wpływu (ang. *impact factor*, IF) - w *Veterinary Research* (IF= 3,117) oraz w *Viruses* (IF=3,816). Należy jednak zaznaczyć, że zastosowana forma rozprawy jest w pełni dopuszczona przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (patrz art. 13 pkt. 2 “*Rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki....*”).

W ocenianej pracy doktorskiej oba artykuły zostały poprzedzone streszczeniem w języku angielskim i polskim, zwięzłym i klarownym wstępem opisującym budowę wirionów, organizację genomu oraz taksonomię koronawirusów. We wprowadzeniu Doktorant przeanalizował związek psiego koronawirusa oddechowego z innymi koronawirusami oraz wykazał się znajomością aktualnego piśmiennictwa na temat czynników adhezyjnych, receptorów i postaci endocytozy w przebiegu zakażenia komórki przez psiego koronawirusa. W dalszej części znajduje się streszczenie publikacji włączonych do rozprawy. Na szczególne uznanie zasługują dwie pogładowe ryciny (2 i 3), które pomagają zrozumieć rolę receptorów wykorzystywanych przez psiego wirusa oddechowego, bydłęcego koronawirusa i ludzkiego koronawirusa OC43 oraz ścieżkę koweolinozależną wejścia do komórki. Tabela 1 świadczy o rozległej znajomości piśmiennictwa dot. receptorów oraz szlaków wykorzystywanych przez koronawirusy podczas wejścia do komórki.

Lektura tego szczegółowego zestawienia wskazuje na znaczące zróżnicowanie receptorów oraz szlaków wykorzystywanych przez koronawirusy podczas wejścia do komórki. Dane przedstawione w Tabeli 1 dobitnie pokazują także różnorodność zakażanych organizmów oraz zróżnicowanie manifestacji klinicznych. W świetle tych danych nasuwają się pytania - na ile uzasadniona jest propozycja przedstawiona w streszczeniu, aby potraktować wybrane gatunki wirusa jako modelowe dla szerszej grupy taksonomicznej m.in. przy poszukiwaniu w przyszłości leków.

Zarówno ryciny, jak i tabela przedstawiona w rozprawie, a nie ujęte w publikacjach oryginalnych z powodzeniem mogłyby być wykorzystane do przygotowania pracy poglądowej omawiającej stan wiedzy w zakresie problematyki badawczej poruszanej w rozprawie. W takim przypadku warto rozważyć uzupełnienie podpisu rycin o stosowne referencje.

Wyniki oraz wyciągnięte przez mgr Artura Szczepańskiego wnioski stanowią odpowiedź na stawiane w pracy cele.

Pewien niedosyt pozostawia stwierdzenie, że weryfikacja roli HLA klasy I jako receptora dla psiego koronawirusa było podyktowane wcześniej postawioną hipotezą. Jak przedstawia Doktorant w tabeli 1, liczba potencjalnych receptorów do rozważenia, które są wykorzystywane przez inne koronawirusy jest znacząca. Przykładowo, dlaczego Doktorant nie rozpatrywał enzymu konwertującego angiotensynę 2 (enzym zlokalizowany w błonie komórkowej komórek znajdujących się w płucach, tętnicach, sercu, nerkach i jelitach) jako receptora, który mógłby uczestniczyć w procesie internalizacji wirusa?

Do mocnych stron rozprawy należy zaliczyć zastosowanie przez Doktoranta licznych i różnorodnych **metod badawczych**, m.in. mikroskopii konfokalnej, cytometrii przepływowej, klonowania, analizy replikacji wirusa na hodowlach komórkowych z zastosowaniem RT-PCR, produkcji przeciwciał, wyciszania genów z wykorzystaniem siRNA i wielu innych. Dzięki temu Doktorant poznał szerokie spektrum technik badawczych oraz miał okazję uczestniczyć w analizie oraz wyciąganiu wniosków z wyników uzyskanych różnymi metodami.

Recenzent jest zwolennikiem podawania przy nazwie odczynnika nazwy kraju i miasta produkcji, a nie dystrybutora. W moim przekonaniu przyjęcie takiej formuły zwłaszcza w czasopiśmie międzynarodowym ułatwia dostęp do odczynników i umożliwia łatwiejsze odtworzenie warunków eksperymentu, zwłaszcza w przypadku badaczy spoza kraju pochodzenia autora publikacji.

Eksperymenty mające wykazać rolę poszczególnych związków/mechanizmów w procesie zakażenia wirusem były starannie zaprojektowane, z uwzględnieniem odpowiednich kontroli pozytywnych i negatywnych, a stawiane hipotezy były weryfikowane nie w pojedynczym badaniu, ale na drodze różnych eksperymentów. Przykładowo rolę kwasów sjałowych (ang. *sialic acids*, SAs) w adhezji do komórek gospodarza Doktorant wykazał wstępnie przez zademonstrowanie zdolności do hemaglutynacji mysich erytrocytów, których błona komórkowa jest bogata w kwasy sjałowe, a następnie potwierdził działając neuraminidazą na komórki przed ich inkubacją z wirusem. Udział SAs w procesie adhezji został dodatkowo zweryfikowany przez inkubowanie wirusa z ich nadmiarem przed dodaniem go do komórek. W obu eksperymentach uzyskano podobne wyniki pozwalające potwierdzić hipotezę o znaczeniu SAs w adhezji wirusa. Istotnym elementem pozwalającym jednoznacznie ocenić uzyskane wyniki było zastosowanie BCoV, w przypadku którego rola SAs jest bardziej oczywista.

W drugiej publikacji badana była internalizacja CRCoV do komórek HRT-18G. W szeregu eksperymentów Doktorant zidentyfikował endocytozę kaweolinozależną jako mechanizm wejścia do komórki oraz wykazał, że proces ten jest zależny od dynaminy, a do fuzji błony dochodzi na wczesnych etapach internalizacji nim endosom nabędzie białka markerowe Rab7. Znaczenie kaweoliny potwierdzono stosując odpowiednie inhibitory oraz przez czasowe wyciszenie wyrażania. Proces wejścia CRCoV był zależny od pH.

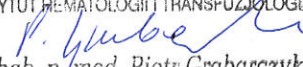
W dyskusji wyniki zostały omówiono wielopłaszczyznowo, nie tylko w odniesieniu do wiedzy na poziomie molekularnym, ale także np. biorąc pod uwagę aktualna znajomość przebiegu klinicznego zakażenia. Dyskusja wyników ma w wielu miejscach charakter krytyczny. Przykładowo Doktorant wskazał, że na uzyskane wyniki mogły mieć wpływ czynniki, których nie kontrolowano w czasie eksperymentów – takim czynnikiem mogło być np. zjawisko adaptacji hodowli komórkowych mogące wpływać na wzmocnienie swoistości wiązania receptorów (str. 18 w pracy opublikowanej w *Viruses*). Doktorant, zapewne z powodu ograniczeń formalnych/redakcyjnych narzucanych przez czasopisma, nie był w stanie przedyskutować wszystkich/większości wątpliwości jakie nasuwają się w związku z analizą uzyskanych wyników. Pozostaje na przykład pytanie na ile działanie zastosowanych inhibitorów miało charakter swoisty? Jak można tłumaczyć np. zróżnicowane działanie inhibitorów dynaminy, które hamują aktywność GTP-azy, a w szczególności różnice w działaniu hamującym między dynasore i iminodyn-22?

Magister Artur Szczepański w obu publikacjach opierał się na aktualnym piśmiennictwie opublikowanym w czasopiśmie międzynarodowych, w większości o wysokiej renomie. Oświadczenia załączone do rozprawy wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych oraz w przygotowaniu publikacji.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska jest starannie przygotowana od strony redakcyjnej, stanowi rozwiązanie oryginalnego, istotnego problemu naukowego i otwiera perspektywę dalszych badań o charakterze aplikacyjnym. Należy podkreślić **istotność podjętej tematyki** oraz **wartość wykonanych badań**, na co wskazuje wysoka liczba cytowań obu artykułów, mimo, że zostały opublikowane niedawno - praca opublikowana w 2019 roku w *Viruses* cytowana była już 15 razy, a pracę z 2018 roku z *Veterinary Research* cytowano dotychczas 9 razy (dane za *Web of Science* z 2 marca 2021 r.).

Przedstawione przeze mnie uwagi nie pomniejszają pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej magistra Artura Szczepańskiego i stanowią zachętę do bardziej wyczerpującego przedyskutowania niektórych aspektów pracy w czasie kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa Artura Szczepańskiego pt.: *Internalizacja psiego koronawirusa oddechowego do komórek gospodarza*” spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz.595; z 2005r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Andrzeja Szczepańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

K I E R O W N I K
ZAKŁADU WIRUSOLOGII
INSTYTUT HEMATOLOGII I TRANSFUZJOLOGII

dr hab. n./med. Piotr Grabarczyk