



Łukasiewicz
PORT
Polski Ośrodek
Rozwoju
Technologii

00000134/2021/15

Wrocław 12.01.2021

Prof. Izabela Sitkiewicz
Sieć badawcza Łukasiewicz-PORT
Polski Ośrodek Rozwoju Technologii
Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Artura Szczepańskiego
zatytułowanej „Internalizacja psiego koronawirusa oddechowego do
komórek gospodarza”**

Przedstawiono mi do recenzji rozprawę Pana Artura Szczepańskiego pod tytułem „Internalizacja psiego koronawirusa oddechowego do komórek gospodarza”. Autor rozprawy ubiega się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Rozprawa została przygotowana pod kierunkiem prof. Krzysztofa Pyrcia w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz w Laboratorium Wirusologicznym Virogenetics Małopolskiego Centrum Biotechnologii.

Rozprawa została przedstawiona w formie dwóch publikacji wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim zgodnie z wymaganiami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Zgodnie z ustawą (Dz. U. 65 poz 595, wraz z późniejszymi zmianami), rozprawę doktorską może stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników. W związku z tym, aby ocenić indywidualny wkład doktoranta, do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów dotyczące zakresu prac wykonanych w trakcie przygotowania publikacji. Przedstawiona rozprawa spełnia formalne wymagania ustawy.

W skład rozprawy wchodzi dwie wieloautorskie publikacje

- 1) Artur Szczepanski, Katarzyna Owczarek, Monika Bzowska, Katarzyna Gula, Inga Drebot, Marek Ochman, Beata Maksym, Zenon Rajfur, Judy A Mitchell, and Krzysztof Pyrc *Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43: Receptors and Attachment Factors*. *Viruses* 2019, 11(4), 328;
<https://doi.org/10.3390/v11040328>

Strona 1 z 4

- 2) Artur Szczepanski, Katarzyna Owczarek, Aleksandra Milewska, Zbigniew Baster, Zenon Rajfur, Judy A Mitchell, Krzysztof Pyrc *Canine respiratory coronavirus employs caveolin-1-mediated pathway for internalization to HRT-18G cells* . Veterinary Research 2018 Jul 3;49(1):55. doi: 10.1186/s13567-018-0551-9.

Ocena merytoryczna pracy

Głównym celem pracy była identyfikacja mechanizmu/mechanizmów dzięki którym Canine Respiratory Coronavirus (CRCoV) wnika do komórek. W wyniku realizacji szeregu prezentowanych doświadczeń zidentyfikowano drogi wejścia wirusa do komórek oraz określenie miejsca fuzji z błoną gospodarza.

Autor rozprawy wykazał pomocniczą rolę kwasów sjałowych w adhezji wirusa do komórek, lecz wykluczono ich rolę jako receptorów wejścia. Jako dodatkowy czynnik adhezyjny zidentyfikowano inne związki jak na przykład siarczany heparanu. Podobnie do innych ludzkich koronawirusów takich jak HCoV-OC43 i HCoV-HKU1, pokazano, że CRCoV wykorzystuje ludzkie antygeny zgodności tkankowej klasy I (HLA1) w procesie wejścia do komórek.

Kolejne etapy wejścia CRCoV zostały zbadane przy użyciu szeregu technik, włączając w to przede wszystkim techniki mikroskopowe przy współudziale wielu technik modyfikujących fenotypy komórek. Pozwoliło to na pokazanie, że wirus dostaje się do komórek przy pomocy endocytozy zależnej od kaweoliny i dynaminy, a jako miejsce fuzji błon zidentyfikowano wczesne endosomy.

Ze względu na to, że obydwie publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach z Q1 lub Q2 dla dziedzin takich jak wirusologia lub nauki weterynaryjne, nacisk tej recenzji nie będzie położony na ocenę i analizę eksperymentów wchodzących w skład obydwu prac, lecz raczej ocenie kompetencji doktoranta w samodzielnej pracy badawczej, analizie danych z eksperymentów i tworzeniu naukowych tekstów. W czasopismach publikujących artykuły naukowe takie jak te wchodzące w skład rozprawy, ocena manuskryptu przeprowadzana jest przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów i dołączając do tego własną indywidualną ocenę, nie mam zastrzeżeń do formy i zawartości rozprawy.

Wstęp zamieszczony w pracy, oprócz publikacji, w przystępny sposób przybliży budowę koronawirusów, włączając w to wirusa CRCoV i jego podobieństwo do bydłowego koronawirusa BCoV. Opisuje również mechanizmy i typy endocytozy, który to proces zapewnia wnikanie wirusa do komórek gospodarza. Autor rozprawy zamieścił też we wstępie tabelę podsumowującą różnego rodzaju receptory i szlaki wykorzystywane przez koronawirusy

Strona 2 z 4

podczas wejścia do komórki. I z tą tabelą wiążą się moje pierwsze pytania i prośby o komentarz do doktoranta

- Skąd u koronawirusów tak niezwykle bogaty repertuar mechanizmów wniknięcia do komórki?

- czy w związku z tym strategia tworzenia leków blokujących wejście będzie kiedykolwiek skuteczna dla więcej niż np. jednego konkretnego wirusa?

- czy w opinii doktoranta mechanizmy wnikania, zarówno receptory jak i ścieżki wnikania, są zależne od gatunku wirusa czy od jego linii/szczepu?

W swojej pracy doktorant wykazał się wykorzystaniem całego szeregu technik, takich jak:

1. Hodowle komórek
2. Namnażanie wirusów
3. Oczyszczanie cząstek wirusów
4. Generowanie przeciwciał skierowanych przeciw białku N wirusa
5. Analiza typu Western
6. Oznaczenie aktywności hemaglutynin
7. Oznaczenie wiązania wirusa (virus attachment)
8. Mikroskopia konfokalna
9. Cytometria przepływowa
10. Ilościowa reakcja PCR z etapem odwrotnej transkrypcji
11. Odbudowa kwasów sjałowych
12. Badanie wpływu różnorodnych inhibitorów na różne fazy infekcji
13. Transfekcja komórek
14. Analiza bioinformatyczna
15. Analiza statystyczna

Szeroki repertuar zastosowanych analiz świadczy o dojrzałości eksperymetalnej i opanowaniu warsztatu. W obydwu publikacjach doktorant brał udział w planowaniu doświadczeń, analizie, opracowywaniu i dyskusji wyników.

W związku z prezentacją wyników w publikacjach mam kilka uwag i prosiłabym doktoranta o odniesienie się do nich:

- Pierwsza publikacja rozprawy, Figura 11, czy mogłabym prosić o komentarz dotyczący wartości P w górnym panelu A. Dla wirusa CRCoV wysokość kolumn przy stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ jest niemalże identyczna, przy 100 $\mu\text{g/ml}$ słupek błędu jest większy niż przy 10 $\mu\text{g/ml}$, lecz wartość współczynnika p wynosi poniżej 0,01 lub 0,0001

Strona 3 z 4

- Jaki może być powód, że ludzki wirus HCoV-OC43 utracił zdolność do wiązania się do komórek ludzkiego nabłonka oddechowego, i podobnie – dlaczego psi CRCoV nie namnaża się w psich komórkach lecz ludzkich komórkach jednej linii komórkowej. Czy próbowano używać do namnażania CRCoV pierwotnych linii psich?

- Czy jest możliwe, że badane wirusy mogą wykazywać inne mechanizmy wnikania do komórek w zależności od modelu komórkowego/linii do namnażania wirusa?

- Co zdaniem doktoranta powoduje przekraczanie barier międzygatunkowych gospodarza przez koronawirusy?

Podsumowanie

Przedstawione w rozprawie wyniki dają szerszy obraz różnorodności początkowych etapów zakażenia koronawirusami. Ze względu na badania prowadzone na wirusach o różnej specyficzności gatunkowej, praca może pomóc w zrozumieniu mechanizmów przekraczania bariery międzygatunkowej i rozprzestrzeniania się wirusów odzwierzęcych w ludzkiej populacji.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu Pana magistra Artura Szczepańskiego w powstawanie publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w dziedzinie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz z późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pana magistra Artura Szczepańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Prof. hab. dr hab. Andrzej Świerca