

NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Narodowy Instytut Leków

Warszawa, 5 października 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Aleksandry Milewskiej „Early steps of human coronavirus NL63 infection”

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo pana prof. Zbigniewa Madeja, dziekana Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 5 września 2016, z prośbą o wykonanie niniejszej recenzji.

Doktorantka ubiega się o stopień doktora w dziedzinie biologii. Przedstawiona mi do oceny rozprawa pod tytułem „Early steps of human coronavirus NL63 infection” została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Pyrcia z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Rozprawa została przedstawiona jako zestaw dwóch publikacji wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, zgodnie z wymaganiami ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami).

Zgodnie z ustawą, rozprawę doktorską może stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy. Do rozprawy dołączono dołączono oświadczenia współautorów dotyczące zakresu prac wykonanych w trakcie przygotowania publikacji, pozwalające na ocenę wkładu doktoranta.

Ocena merytoryczna pracy

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie wieloautorskie publikacje:

Publikacja nr 1. Milewska A., Zarebski M., Nowak P., Stozek K., Potempa J., Pyrc K. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. J Virol. 2014 Nov;88(22):13221-30. doi: 10.1128/JVI.02078-14. (IF₅ 4.428)

Publikacja nr 2. Milewska A., Kaminski K., Ciejka J., Kosowicz K., Zeglen S., Wojarski J., Nowakowska M., Szczubiałka K., Pyrc K. HTCC: Broad Range Inhibitor of Coronavirus Entry. PLoS One. 2016 Jun 1;11(6):e0156552. doi: 10.1371/journal.pone.0156552. (IF₅ 3.535)

Obydwe publikacje zostały zamieszczone w recenzowanych czasopismach (peer review), które są zaliczane do pierwszego kwartyla (Q1) w danej kategorii i przeszły proces recenzji. W czasopismach jak te, w których ukazały się publikacje, proces oceny manuskryptu przeprowadzany jest zwykle przez dwu niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Redaktorem odpowiedzialnym za proces recenzowania artykułu w PlosOne był Stefan Pöhlmann, z Infection Biology Unit z German Primate Center. Jego pole ekspertyzy naukowej ściśle pokrywa się z tematyką niniejszej rozprawy. Redaktorem drugiego artykułu był Stanley Perlman z Department of Microbiology, University of Iowa, autor wielu publikacji dotyczących koronawirusów

Biorąc pod uwagę ocenę publikacji przez niezależnych redaktorów będącymi specjalistami w tematyce niniejszej rozprawy, recenzentów i dołączając do tego własną ocenę, nie mam żadnych merytorycznych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

Oprócz wspomnianych publikacji, rozprawa zawiera wymagane ustawowo streszczenie w języku angielskim i polskim oraz wprowadzenie zawierające ogólne informacje dotyczące koronawirusów, informacje dotyczące ludzkiego wirusa NL63 i sposobów leczenia infekcji koronawirusami (w języku angielskim). Podczas czytania wstępu o patogenezie koronawirusów, nasunęło mi się pytanie dotyczące ko-infekcji bakteryjnych. W przypadku niektórych patogenów, wykazano, że infekcja wirusowa na przykład wirusem grypy, jest bardzo często związana ze zwiększoną liczbą ciężkich zakażeń *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus pyogenes* i nie jest to prosty mechanizm związany z obniżeniem odporności organizmu. Czy w przypadku koronawirusów zaobserwowano również jakieś korelacje między infekcją wirusową a bakteryjną?

Dodatkowo, rozprawa zawiera sprecyzowane cele (aims of the study – w języku angielskim), oddzielne podsumowanie wyników dla obydwu publikacji rozprawy (w języku angielskim) oraz listę publikacji niewchodzących do rozprawy, których autorką jest doktorantka. Co zasługuje na szczególną uwagę, lista zawiera aż 8 publikacji eksperymentalnych i jeden artykuł przeglądowy, których doktorantka jest główną autorką lub współautorką. Na końcu rozprawy załączona jest bibliografia.

We obydwu zaprezentowanych publikacjach, doktorantka jest pierwszą autorką publikacji. W związku z tym, że publikacje są wieloautorskie, na końcu rozprawy zamieszczono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac, te oświadczenia stanowiły dla mnie podstawę do oszacowania wkładu doktorantki i tego czy przeprowadzone badania mogą stanowić podstawę do uznania przedstawionego materiału, jako rozprawy doktorskiej. Według oświadczeń współautorów, Aleksandra Milewska jest głównym autorem, wykonała większość doświadczeń prezentowanych w artykułach, brała czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowywania wyników, oraz w pisaniu manuskryptów. Rola pozostałych współautorów obejmowała (i) przygotowanie materiału do badań (synteza HTCC), (ii) udział w eksperymentach wykorzystujących mikroskopię konfokalną, (iii) przygotowanie linii komórkowej wyrażającej białko ACE2 na powierzchni, (iv) opiekę mentorską i merytoryczną, (v) współudział w planowaniu eksperymentów, (vi) współudział w przygotowaniu manuskryptów.

Celem badań przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy, było wykazanie podstawowego miejsca wiązania wirusa na powierzchni komórek wrażliwych na ludzkiego koronawirusa NL63, oraz poznanie przeciwwirusowego mechanizmu działania HTCC. Cel, który postawiła przed sobą doktorantka jest ważny zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia. Brak dostępnych opcji terapeutycznych sprawia, że badania nad substancjami blokującymi wczesne etapy infekcji są niezwykle ważne i mogą prowadzić do stworzenia leków przeciwwirusowych. Przedstawione prace pokazują mechanizm wiązania się NL63 do komórek eukariotycznych poprzez wykorzystanie siarczanu heparanu, oprócz znanego wcześniej receptora ACE2. ACE2 jest wymagany do infekcji wirusem, lecz nie jest podstawowym receptorem, do którego wiąże się wirus na powierzchni komórek. Interakcja wirusa z receptorem możliwa jest najprawdopodobniej po związaniu odpowiedniej liczby cząstek wirusa przez siarczan heparanu na powierzchni komórki. Badania pokazują, że proces wiązania wirusa do komórek jest

bardziej skomplikowany niż początkowo uważano. Odkrycie tego mechanizmu wiązania, pokazuje również nową ścieżkę, którą można wykorzystać do projektowania nowych leków przeciwwirusowych.

Druga z przedstawionych prac jest również związana z badaniami nad adhezją wirusowych cząstek do komórek eukariotycznych i poszukiwaniom możliwości zahamowania tego procesu. Autorzy we wcześniejszej pracy, niewchodzącej w skład rozprawy (Milewska A, Ciejka J, Kaminski K, Karewicz A, Bielska D, Zeglen S, Karolak W, Nowakowska M, Potempa J, Bosch BJ, Pyrc K, Szczubialka K. Novel polymeric inhibitors of HCoV-NL63. *Antiviral Res.* 2013 Feb;97(2):112-21) pokazują, że HTCC (N-(2-hydroxypropyl)-3-trimethylammonium chitosan chloride) działa jako inhibitor koronawirusów. Mechanizm opisany w drugiej z publikacji polega na zahamowaniu interakcji pomiędzy białkiem S wirusa a receptorem komórkowym. Pokazano również, że zmodyfikowane cząsteczki HTCC wykazują zmodyfikowaną aktywność w stosunku do różnych wirusów.

Warto wspomnieć, że doktorantka zaangażowana jest również w prace nad inhibitorami innymi niż te skierowane przeciw koronawirusom (Ciejka J, Milewska A, Wytrwal M, Wojarski J, Golda A, Ochman M, Nowakowska M, Szczubialka K, Pyrc K. Novel Polyanions Inhibiting Replication of Influenza Viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Mar 25;60(4):1955-66).

Podczas poszukiwań aktywności naukowej doktorantki, nieuwzględnionych w przedstawionej do oceny rozprawie, natknęłam się na ślady innych badań dotyczących sposobów walki z koronawirusami. Chciałabym prosić doktorantkę o informację czy znana jest obecnie rola deaminaz cytydynowych z rodziny APOBEC3 jako dodatkowego systemu obronnego człowieka przed tymi wirusami? Oraz czy prowadzone są prace nad innymi inhibitorami koronawirusów działającymi na drodze innych mechanizmów niż te opisane w rozprawie.

W pracach wchodzących w skład rozprawy zastosowano szereg technik eksperymentalnych takich jak:

1. Hodowle różnych linii komórkowych
2. Oznaczenie żywotności komórek
3. Badanie adhezji wirusów do komórek i ich replikacji
4. Konstrukcja linii komórkowych wyrażających receptor ACE2
5. Infekcje komórek
6. Izolacja kwasów nukleinowych
7. Odwrotna transkrypcja
8. Ilościowy PCR
9. Izolacja wirusów i ich oczyszczanie
10. Ustalanie miana wirusów
11. Analiza Western blot
12. Cytometria przepływowa
13. Mikroskopia konfokalna
14. Analizy statystyczne

We wszystkich publikacjach doktorantka brał udział w planowaniu doświadczeń, analizie i opracowywaniu wyników, dyskusji, współredagowania manuskryptu i finansowaniu prac. Prace była współfinansowana w ramach projektu NCN Preludium, programu Doctus z Małopolskiego Centrum Przedsiębiorczości, programu LIDER z NCBR, luventus Plus, oraz POIG.02.01.00-12-064/08

Podsumowanie

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy, mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalne znaczenie aplikacyjne. Wyniki zaprezentowanych badań przyczyniły się do lepszego zrozumienia wczesnych etapów infekcji komórek eukariotycznych przez koronawirusy. Kontynuacja tych prac, która mam nadzieję będzie prowadzona, może przyczynić się do powstania środka zapobiegającego, lub też łagodzącego infekcję.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pani magister Aleksandry Milewskiej w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie 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 zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz 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 Wydziału Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pani magister Aleksandry Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech J. Jurek