NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO
-PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY
Zakład Wirusologii
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Fax: (+48 22) 54-21-385, Tel. (+48 22) 54-21-230,
e-mail: wiruspzh@pzh.gov.pl

dr hab. Joanna Siennicka
prof. nadzw. NIZP-PZH
jsiennicka@pzh.gov.pl

Warszawa, 14-10-2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Aleksandry Milewskiej**

Early steps of human coronavrus NL63 infection

wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Pyrcia

Rozprawa doktorska mgr. Aleksandry Milewskiej dotyczy zakażenia koronowirusami. Wirusy te wywołują u ludzi choroby dróg oddechowych, z reguły o łagodnym przebiegu. Jednakże pojawienie się w 2002 r. wirusa SARS czyli wirusa zespołu ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej, który powodował zakażenia kończące się w 10% śmiercią, zmieniło spojrzenie na koronawirusy. W ostatnim czasie obserwuje się zachorowania wywoływane wirusem MERS czyli *middle east respiratory syndrom coronavirus* przebiegające z ponad 30% śmiertelnością. W aspekcie zachorowań powodowanych zakażeniami tymi wirusami uważam, że recenzowana przeze mnie praca jest niesłychanie ważna. Jej wyniki przybliżają nam poznanie mechanizmów wniknięcia wirusa do komórki, jak również przedstawiają substancje czynnie hamujące replikację koronawirusów, co wobec braku leków przeciwko nim ma kolosalne znaczenie.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa opiera się na dwóch pracach stanowiących spójną całość, opublikowanych w świetnych czasopismach, a mianowicie *PLoS One* (2015 IF 3,057) i *Journal of Virology* (2014 IF 4,439) co jest zgodne z art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), to jest z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę *„(...) spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)"*. Artykuły te, stanowiące załącznik rozprawy, poprzedzają streszczenia w języku angielskim i polskim, wprowadzenie, cele badania, podsumowanie wyników, wykaz

wszystkich publikacji Doktorantki, oraz bibliografia zawierająca 71 pozycji. W załączniku umieszczono również oświadczenia współautorów dwóch publikacji stanowiących podstawę doktoratu. Podkreślić w tym miejscu należy, że dorobek Doktorantki to 10 prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach, o łącznej wartości IF 36,881.

Ocena merytoryczna

Muszę przyznać, że gdy rozprawę stanowią opublikowane prace, jej recenzent ma ułatwione zadanie. Publikacje zostały przecież poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje, w których interesie jest utrzymanie wysokiego rankingu czasopism. Przypomnę, że mowa tutaj o pracach zamieszczonych w amerykańskich pismach o IF 3,057 i 4,439. Należy podkreślić, że w obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem a z oświadczeń współautorów wynika, że miała wiodący udział w ich powstawaniu.

Praca 1. *Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells.* **Milewska A**, Zarebski M, Nowak P, Stozek K, Potempa J, Pyrc K. J Virol. 2014 Nov;88(22):13221-30.

W pracy skupiono się na badaniu wczesnych etapów zakażenia koronawirusem człowieka NL63 (HCoV-NL63), a mianowicie rolą receptora ACE2 (ang. *angiotensin-converting enzyme 2*) oraz proteoglikanów związanych z siarczanem heparanu. Stosując wyrafinowany warsztat metodyczny udowodniono, że obecność receptora komórkowego ACE2 jest wymagana i wystarczająca do zakażenia przez HCoV-NL63. Wykazano, że wywołanie ekspresji białka ACE2 w komórkach opornych na zakażenie wirusem powoduje, że komórki te stają się wrażliwe. Jednakże wywołanie nadekspresji receptora ACE2 nie miało wpływu na adhezję wirusa do powierzchni komórki. To spostrzeżenie zasugerowało badaczom istnienie dodatkowego czynnika odpowiedzialnego za ten proces. W kolejnych eksperymentach wykluczono z tej roli kwas sialowy i szereg lektyn, potwierdzono za to udział związków heparanu. Tak więc wykazano, że proteoglikany związane z siarczanem heparanu działają jako receptor wiążąc koronawirusa HCoV-NL63 z powierzchnią komórki.

Praca 2. *HTTC: Broad range inhibitor of Coronavirus entry*. **Milewska A**, Kaminski K, Ciejka J, Kosowicz K, Zeglen S, Wojarski J, Nowakowska M, Szczubiałka K, Pyrc K. PLoS One. 2016 Jun 1;11(6):e0156552.

W pracy opisano doświadczenia przeprowadzone z chitozanem (HTCC-63) oraz z czterema jego kationowo zmodyfikowanymi polimerami (HTCC-57, HTCC-62, HTCC-65, HTCC-77). Po pierwsze zbadano mechanizm działania polimeru HTCC-63. W tym celu analizowano jego wpływ na różne fazy cyklu replikacyjnego HCo-NL63. Zbadano czy polimer ten wchodzi w interakcję bezpośrednio z wirionem i stwierdzono, że HTCC-63 nie inaktywuje bezpośrednio wirusa, ani nie hamuje procesu adhezji wirionów do powierzchni komórek LLC-Mk2. Następnie badania poprowadzono w komórkach wykazujących wysoki poziom ekspresji receptora ACE2 (A549_ACE2^{+}). Otrzymano wyniki świadczące o tym, że polimer wpływa na

przyłączanie się wirionu z jego komórkowym receptorem ACE2 i w konsekwencji blokuje zakażenie. Kolejne doświadczenia dotyczyły działania polimeru HTCC-63 na zakażenie wywoływane przez inne, nisko zakaźne koronawirusy. Otrzymane wyniki wskazywały działanie w stosunku do koronawirusów NL-63, OC43 i HKU1 ale nie 229E. Zsyntetyzowano więc dodatkowe warianty chitozanu różniące się miedzy sobą stopniem podstawienia grup amonowych w łańcuchu polimeru w zakresie od 57% do 77%. Badanie skuteczności działania przeprowadzono *in vitro* i *ex vivo* a osiągnięte wyniki wskazują na to, że HTCC jest zdolne do hamowania wniknięcia do komórek każdego ze zbadanych koronawirusów człowieka.

Muszę przyznać, że obie publikacje robią duże wrażenie. Oczywiście w pozytywnym znaczeniu. Ogrom pracy włożony w wykonanie badań i ich rozmach budzą mój podziw. Stosowany warsztat badawczy, poczynając od prowadzenia hodowli komórkowych i tkankowych, namnażania wirusów i ich mianowania, po metody takie jak PCR, Western blot, cytometria przepływowa, kolorymetria, czy mikroskopia konfokalna, również wzbudza szacunek. W oświadczeniu Doktorantka stwierdza, że w pracach stanowiących rozprawę doktorską *„(...) jestem głównym autorem i wykonałam większość doświadczeń prezentowanych na zawartych w nich rycinach. Brałam czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowania wyników oraz przygotowania manuskryptów (...)"* co jednoznacznie świadczy o umiejętności przez nią samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.
Do żadnej z publikacji stanowiących rozprawę doktorską nie mam uwag.

Ocena edytorskiej strony rozprawy
Mam uwagi do wstępnej części rozprawy doktorskiej, a mianowicie do sformułowania celów pracy. W streszczeniach, zarówno angielskim jak i polskim są trzy cele, podczas gdy na stronie 19 widnieją dwa. Poza tym streszczenia nie są sformułowane jednoznacznie, co może nie być wadą, ale robi wrażenie nieporządku. Podobnie jak brak oświadczeń 4 osób, współautorów publikacji.
W streszczeniu polskim używane jest określenie *„ludzki koronawirus"* podczas gdy właściwszym określeniem jest koronawirus człowieka.

Podsumowanie
Przedstawiona mi do oceny praca dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest poznanie cyklu replikacyjnego wirusów oraz poznanie substancji hamujących ich namnażanie. Założone cele, możliwe do osiągnięcia dzięki niezwykle wszechstronnemu warsztatowi metodycznemu, zostały w pełni zrealizowane a uzyskane wyniki stanowią cenny przyczynek do pogłębienia wiedzy oraz, być może, opracowaniu leku skutecznie hamującego koronawirusy.

Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).
Zawarte w recenzji uwagi w niczym nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Na tej podstawie mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.
Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej, z głębokim przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.