

Załącznik 2

dr inż. Justyna Karolina Broniarczyk

**Autoreferat
przedstawiający opis dorobku
i osiągnięć naukowych**

Czynniki biorące udział w zakażeniu komórek wirusem brodawczka

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Zakład Wirusologii Molekularnej

Poznań, 2019

1. Imię i Nazwisko: Justyna Karolina Broniarczyk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii-biochemii:** 30.06.2009,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Wirusologii Molekularnej. Tytuł pracy doktorskiej „*Udział białka TSG101 w transformacji nowotworowej komórek nabłonka szyjki macicy zakażonych wirusem HPV16*”, Promotor: prof. dr hab. Anna Goździka-Józefiak
- **Dyplom magistra inżyniera biotechnologii żywności:** 30.06.2006
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
- **Dyplom magistra biologii molekularnej:** 30.06.2004
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii
- **Dyplom licencjata biologii:** 9.07.2002
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **01.10.2004 – 30.06.2009** - Studium Doktoranckie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- **01.01.2010 – obecnie** – adiunkt, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Wirusologii Molekularnej

4. Stypendia i staże zagraniczne

Stypendia

- 1) **Umberto Veronesi Postdoctoral Fellowship** ICGEB, Triest, Włochy, 1.04.18-1.04.19.
- 2) **Short-term ICGEB Postdoctoral Fellowship**, ICGEB, Triest, Włochy, wielokrotnie w latach 2014-2017.
- 3) **Stypendium młodego doktora (UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości)**, ICGEB, Triest, Włochy, 1.09.12-1.12.12.
- 4) **Swedish Institute Fellowship (Baltic Sea Region Program/Visby Program)** Södertörns University College, Stockholm, Szwecja, 18.10.2010 – 18.10.2011.
- 5) **FEBS Summer Fellowship**, Södertörns University College, Stockholm, Szwecja, 1.07.2018-30.09.2008.

Staż:

- 1) **Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii ICGEB** (ang. *International Centre for Genetics Engineering and Biotechnology*) w **Triście Włochy**, w grupie badawczej (Tumour Virology Group) kierowanej przez doktora Lawrence'a Banksa, w okresach 1.03.14-04.14; 15.06.14- 5.10.14; 1.02.15-31.10.15; 1.02.16-31.07.16; 1.03.17-30.11.17 w ramach stypendiów: Short-Term ICGEB postdoctoral Fellowships, oraz w okresie 1.04.18-1.04.19 w ramach Umberto Veronesi Fellowship.

Södertörns University College, Stockholm, Szwecja, 1.07.2018-30.09.2008

(FEBS summer Fellowship); 18.10.2010 -18.10.2011 (Swedish Institute Fellowship.)

5. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Czynniki biorące udział w zakażeniu komórek wirusem brodawczka

b) Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

- 1) **Broniarczyk J.**, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Banks L. Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery. *Virology*. 2014 Jul; 460-461:83-90.
IF₂₀₁₄ 3,321; IF_{5-letni} 3,115; pkt. MNiSW 30.
(mój udział procentowy szacuję na 75%).
- 2) **Broniarczyk J.**, Massimi P, Bergant M, Banks L. Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process. *J Virol*. 2015 Sep;89(17):8727-32.
IF₂₀₁₅ 4,606; IF_{5-letni} 4,13; pkt. MNiSW 40.
(mój udział procentowy szacuję na 75%).
- 3) **Broniarczyk J.**, Pim D, Massimi P, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Crump C, Banks L. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. *Sci Rep*. 2017 Mar 28;7:45159.
IF₂₀₁₇ 4,122; IF_{5-letni} 4,609; pkt. MNiSW 40.
(mój udział procentowy szacuję na 70%).
- 4) **Broniarczyk J***, Ring N, Massimi P, Giacca M, Banks L. HPV-16 virions can remain infectious for 2 weeks on senescent cells but require cell cycle re-activation to allow virus entry. *Sci Rep*. 2018 Jan 16;8(1):811.
IF₂₀₁₈ 4.122; IF_{5-letni} 4,609; pkt. MNiSW 40.
*** equal contribution=równorzędne autorstwo/udział**
(mój udział procentowy szacuję na 45%).
- 5) Siddiq A, **Broniarczyk J***, Banks L. Papillomaviruses and Endocytic Trafficking. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 4;19(9).
IF₂₀₁₇ 3,687; IF_{5-letni} 3,878; pkt. MNiSW 30.
*** equal contribution=równorzędne autorstwo/udział**
(mój udział procentowy szacuję na 45%).
- 6) **Broniarczyk J.**, Massimi P, Pim D, Bergant Marušič M, Myers M, Garcea RL, Banks L. Phosphorylation of HPV-16 L2 Contributes To Efficient Virus Infectious Entry *J Virol*. 2019 Apr 17.
IF₂₀₁₇ 4,368; IF_{5-letni} 4,13; pkt. MNiSW 40
(mój udział procentowy szacuję na 70%).

Wyniki badań składających się na osiągnięcie naukowe są przedstawione w **6** monotematycznych pracach (5 prac eksperymentalnych, 1 praca przeglądowa) opublikowanych w latach **2014-2019**, których sumaryczny współczynnik oddziaływania (**IF**, *ang. impact factor*) według roku opublikowania jest równy **24,226** (**IF_{5-letni} 24,471**), a liczba **punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego** (wg. listy MNiSW z 26.01.2017) wynosi **220**. We wszystkich **6** publikacjach jestem pierwszym autorem, w **2** pracach mój udział jako pierwszego autora jest równorzędny z drugim autorem (*equal contribution).

c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Monotematyczny cykl prac pt. „**Czynniki biorące udział w zakażeniu komórek wirusem brodawczaka**” obejmuje 6 prac opublikowanych w latach 2014-2019, w których opisałam nowe mechanizmy odpowiedzialne za regulację cyklu replikacyjnego wirusów brodawczaka.

Wyniki moich badań przyczyniły się do znaczących odkryć w dziedzinie biologii ludzkich wirusów brodawczaka (*HPV*, *ang. Human Papillomaviruses*), a moje prace po raz pierwszy wykazały, że:

- Białka kapsydu L1 i L2 wirusa brodawczaka ludzkiego oddziałują ze składnikami maszynerii komórkowej ESCRT (*ang. endosomal sorting complexes required for transport*),: białkami TSG101 (*ang. Tumor susceptibility gene 101 protein*) i VPS4 (*ang. Vacuolar protein sorting-associated protein 4*)
- Zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego może być znacznie szybsze niż wcześniej sądzono, a czas potrzebny na transport genomu wirusa do jądra komórkowego zależy od etapu cyklu komórkowego zakażonej komórki.
- Wiriony HPV16 są bardzo stabilne i mogą pozostać zakaźne przez co najmniej 2 tygodnie, czekając na powierzchni komórki do czasu jej podziału, aby móc do niej wniknąć
- Fosforylacja białek kapsydu jest obecna w wirionach brodawczaka i wpływa na proces odplaszczania wirusa

Wirusy brodawczaka ludzkiego (*HPV*, ang. *Human Papillomaviruses*), to rodzina małych, niemających otoczki wirusów DNA. Dotychczas zidentyfikowano ponad 200 typów wirusów HPV. Większość powoduje jedynie łagodne zmiany nabłonkowe; jednakże niewielka grupa o potencjale transformującym jest odpowiedzialna za prawie wszystkie przypadki raka szyjki macicy i większość innych nowotworów takich jak: rak sromu, rak pochwy, rak odbytu, rak prącia i rak głowy i szyi (zur Hausen i wsp., 1996, 2002; Bouvard i wsp., 2009).

Wirusy HPV zakażają komórki nabłonka, a ich cykl replikacyjny jest ściśle związany z procesem różnicowania się komórek nabłonka. Wirus dostaje się do komórek warstwy podstawnej nabłonka w wyniku mikrourazów, ale nowe zakaźne cząstki wirusa mogą być uwalniane tylko z komórek górnej rogowej warstwy nabłonka. Najważniejszymi regulatorami w produktywnym cyklu replikacyjnym wirusa są onkoproteiny wirusowe, E6 i E7, które odpowiadają za tworzenie środowiska sprzyjającego replikacji wirusowego materiału genetycznego w środkowych warstwach nabłonka, gdzie w normalnych warunkach replikacja DNA nie byłaby możliwa. W rzadkich przypadkach, długotrwała, przetrwała infekcja i zakłócenie produktywnego cyklu replikacyjnego wirusa może prowadzić do inicjacji procesu nowotworzenia (Doorbar i wsp., 2012, Ganti i wsp., 2015).

Wirusy brodawczaka mają genom w postaci kolistej, kowalentnie zamkniętej cząsteczki dsDNA, zbudowanej z około 8 tysięcy par zasad. Genom ten zapakowany jest w kapsyd o symetrii ikozaedralnej, złożony z 360 kopii głównego białka kapsydu - L1 i 12-36 kopii mniejszego białka kapsydu L2 (Buck i wsp., 2008; Modis i wsp., 2012). Podczas gdy oba białka pełnią ważną rolę w procesie składania wirionów potomnych i cyklu replikacyjnym wirusów, to białko L2 dodatkowo bierze udział w transporcie genomu wirusa do jądra komórkowego (Day i wsp., 1998, 2004).

Cykl replikacyjny wirusów HPV to skomplikowany i złożony proces, w skład którego wchodzi powiązane ze sobą i następujące po sobie etapy. W wyniku oddziaływania wirusa z powierzchnią komórki i jego adsorpcji, dochodzi do zmian w konformacji białek kapsydu, co umożliwia dalszy proces wnikania wirusa do komórki na drodze endocytozy (Joyce i wsp., 1999; Giroglou i wsp., 2001; Yang i wsp., 2003, Day i wsp., 2008). W endosomach późnych na skutek obniżenia pH dochodzi do odpłaszczania wirusa i uwolnienia jego materiału genetycznego. Większa część białka L1 ulega degradacji w lizosomach (Smith i wsp., 2008, Dabydeen i Meneses, 2009; Bienkowska-Haba i wsp., 2012), natomiast kompleks białko L2-genom wirusa jest transportowane poprzez sieć trans aparatów Golgiego i najprawdopodobniej retikulum endoplazmatyczne do jądra komórkowego (Day et al., 2013,

Zhang et al., 2014). W wyniku pęknięcia otoczki jądrowej podczas mitozy (Pyeon et al., 2009; Aydin et al., 2014), genom wirusa dostaje się do struktur jądrowych PML inaczej zwanych domenami jądrowymi ND10 (ang. *Nuclear Domain 10*), w których dochodzi do inicjacji replikacji wirusowego materiału genetycznego i składania wirusów potomnych (Day PM, 2004).

Oddziaływania pomiędzy białkami kapsydu, a elementami komórki, odgrywają bardzo ważną rolę w procesie zakażenia komórki wirusem brodawczaka (Aksoy i wsp., 2017, Campos, 2017). **Nie wszystkie jednak mechanizmy odpowiedzialne za regulację cyklu replikacyjnego wirusów HPV są w pełni wyjaśnione. Ich dokładne poznanie może mieć nie tylko istotne znaczenie w rozwoju profilaktyki i terapii chorób wywołanych przez wirusy brodawczaka, ale może również stanowić cenne źródło wiedzy na temat biologii komórek gospodarza.**

Z tego względu celem moich badań było zidentyfikowanie i scharakteryzowanie nowych czynników komórkowych biorących udział w zakażeniu komórki wirusem brodawczaka.

W pierwszej kolejności chciałam wyjaśnić czy maszyna komórkowa ESCRT (kompleksy ESCRT wraz z białkami wspomagającymi) bierze udział w procesie zakażenia komórki wirusem brodawczaka. Endosomalny kompleks sortujący wymagany do transportu wewnątrzkomórkowego (ESCRT ang. *endosomal sorting complexes required for transport*), pełni bardzo ważną rolę w procesie dojrzewania endosomów i formowania ciał wielopecherzykowych MVB (ang. *multivesicular bodies*). Wcześniejsze badania wykazały, że wiele wirusów wykorzystuje składniki maszyny komórkowej ESCRT na różnych etapach cyklu replikacyjnego (Votteler i Sundquist, 2013). Jednak rola tego kompleksu w zakażeniu komórki wirusem HPV nie była wcześniej badana.

Jednymi z głównych składników, regulujących działanie maszyny ESCRT są białka TSG101 (ang. *Tumor susceptibility gene 101*) i VPS4 (ang. *Vacuolar protein sorting - associated protein 4*). Białko TSG101 jest kluczowym składnikiem kompleksu ESCRTI, w przypadku braku tego białka kompleks ten nie jest tworzony. Natomiast VPS4 to białko wspomagające o aktywności katalitycznej, odpowiadające za odysocjowanie kompleksu ESCRT od błony endosomów.

Moje badania wykazały, że białka TSG101 i VPS4 pełnią ważną rolę nie tylko w zakażeniu komórki ludzkim wirusem brodawczaka, ale również wirusem bydlęcym (BPV, ang. *Bovine Papillomavirus*) czy mysim (MmuPV, ang. *Murine Papillomavirus*), co podkreśla

ważną rolę tego kompleksu w cyklu replikacyjnym wirusów brodawczaka. Wykazałam również, że białka TSG101 i VPS4 oddziałują z białkami kapsydu wirusa brodawczaka L1 i L2. Dodatkowo udowodniłam, że interakcje białek: L2HPV16-TSG101 wpływają na lokalizację białka L2 w komórce, oraz na jego modyfikacje potranslacyjne, ubikwitynacje (*Broniarczyk i wsp., 2014, Virology*).

Ponadto wykorzystując linie stabilne z indukowaną ekspresją białka VPS4 dzikiego (VPS4WT-GFP) i jego katalitycznie nieaktywnego mutantu (VPS4EQ-GFP) udowodniłam, że nieaktywne białko VPS4 blokuje proces odpłaszczania wirusa brodawczaka (*Broniarczyk i wsp., 2018, Scientific Reports*).

Podsumowując moje badania po raz pierwszy pokazały, że składniki maszynerii komórkowej ESCRT odgrywają bardzo ważną rolę w cyklu replikacyjnym wirusów brodawczaka, regulując proces odpłaszczania wirusa.

Kolejnym celem moich badań naukowych było sprawdzenie jak długo może trwać transport wirusa (jego genomu) do jądra komórkowego.

Jak wcześniej wspomniano transport genomu wirusa do jądra komórkowego wymaga mitozy, podczas której otoczka jądrowa pęka i bariera między cytoplazmą a jądrem zanika (Pyeon i wsp., 2009; Aydin i wsp., 2014). Pozwala to kompleksowi białko L2-genom wirusa uzyskać dostęp do struktur jądrowych PML, określanych jako miejsce replikacji wirusowego DNA i składania wirusów potomnych (Day PM, 2004).

Dotychczasowe doniesienia naukowe sugerowały, że transport genomu wirusa HPV do jądra komórkowego jest procesem powolnym. W komórkach niesynchronizowanych, zakażonych cząstkami pseudowirusowym (*PsVs*, ang. *pseudoviron particles*) wirusa HPV16, zawierającymi gen reportowy lucyferazę, sygnał wskazujący, że doszło do infekcji (ekspresja genu reportowego lucyferazy) pojawiał się nie wcześniej niż 16 godzin od zakażenia (Spoden i wsp., 2013). Jest to bardzo zaskakujące zważywszy, że klasyczne ścieżki wewnątrzkomórkowego transportu są zazwyczaj bardzo szybkie (Huotari J, Helenius A. 2011), a dodatkowo w kontekście naturalnego zakażenia komórek warstwy podstawnej nabłonka wirusem HPV wydaje się dziwne aby transport genomu wirusa do jądra komórkowego był procesem aż tak powolnym.

Aby to wyjaśnić postanowiłam sprawdzić jak długo może trwać transport genomu wirusa w komórkach, w których cykl komórkowy został zsynchronizowany przy użyciu afidikoliny (ang. *aphidicolin*) lub tymidyny (ang. *thymidine*). W komórkach będących w fazie S cyklu komórkowego, które zostały zainfekowane cząstkami *PsVs*, pierwszy sygnał infekcji

(ekspresja genu reporterowego lucyferazy) pojawiał się już po 8 godzinach po podaniu cząstek pseudowirusowych do komórek. Dodatkowo analiza przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazała, że genom wirusa kolokalizuje ze strukturami jądrowymi PML już 1-2 godziny po infekcji, gdy komórki zostały zakażone tuż przed wejściem w stan mitozy.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły, że transport genomu wirusa do jądra komórkowego może być znacznie szybszy niż wcześniej uważano. Wykazałam, że szybkość transportu genomu wirusa HPV do jądra zależy od etapu cyklu komórkowego, w którym znajduje się infekowana komórka. Jeśli wirus zainfekuje komórkę, będącą tuż przed mitozą, transport genomu wirusowego do jądra może odbyć się nawet w ciągu 1- 2h (Broniarczyk i wsp., 2015, *Journal of Virology*).

Następnym postawionym przeze mnie pytaniem badawczym było: jak długo i gdzie cząstki wirusa HPV mogą czekać na mitozę, nie tracąc przy tym swoich właściwości infekcyjnych? Aby odpowiedzieć na to pytanie wykorzystałam cząstki pseudowirusowe i model komórek starzejących się, niedzielących się (*ang senescent cells*). Model ten po raz pierwszy opisano w 1965 roku kiedy to zauważono że fibroblasty BJ, po długich okresach pasażowania w hodowli, ulegają starzeniu replikacyjnemu (zanik podziałów komórkowych), nie tracąc przy tym aktywności metabolicznej (Hayflick, L., 1965). Komórki te można stymulować, aby ponownie weszły w cykl komórkowy i rozpoczęły podziały komórkowe poprzez wprowadzenie do nich siRNA, wyciszającego ekspresję genu *p53* (siRNA *p53*) (Beauséjour et al., 2003).

Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty z wykorzystaniem tych fibroblastów i cząstek pseudowirusowych wykazały, że wirus HPV16 może zakażać tylko krótko pasażowane, aktywnie dzielące się komórki. Wielokrotnie pasażowane komórki, ulegały starzeniu replikacyjnemu (zanik podziałów komórkowych) i były odporne na zakażenie wirusem HPV. Zakażenie komórek starzejących się wirusem HPV16 zostaje jednak przywrócone po wprowadzeniu siRNA *p53*. Dodatkowo przeprowadzone przeze mnie eksperymenty wykazały, że wirus HPV16 może zachować właściwości zakaźne nawet przez 2 tygodnie, w oczekiwaniu na podziały komórki. Za pomocą przeciwciała neutralizującego, skierowanego przeciwko białku kapsydu L1 wirusa wykazałam, że wirus HPV czeka na aktywację podziałów komórkowych na powierzchni komórki, nie tracąc przy tym swoich właściwości zakaźnych. Świadczył o tym spadek infekcji po podaniu przeciwciała neutralizującego. Aby dokładnie sprawdzić gdzie wirus czeka aż komórka zacznie się aktywnie dzielić wykorzystałam mikroskopie konfokalną. Analiza ta potwierdziła, że w

komórkach starzejących się, nie dzielących się, cząstki pseudowirusowe wirusa HPV16 gromadzą się na powierzchni komórki, tuż przy błonie komórkowej, natomiast po wprowadzeniu siRNA p53 i aktywacji podziałów komórkowych, wirus dostaje się do wnętrza komórki i kolokalizuje z wczesnymi i późnymi endosomami.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki mają bardzo duże znaczenie w cyklu replikacyjnym wirusów HPV. Moje badania po raz kolejny potwierdzają bardzo ważną rolę mitozy w procesie zakażenia komórki wirusem brodawczaka, dodatkowo pokazując, że stymulacja i inicjacja podziałów komórkowych jest niezbędna, aby wirus mógł wnikać do komórki. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty, pokazały również, że cząstki wirusa HPV16 są bardzo stabilne i mogą pozostać zakaźne i wrażliwe na przeciwciała neutralizujące przez co najmniej dwa tygodnie, czekając na powierzchni komórki na inicjację podziałów komórkowych (*Broniarczyk i wsp., 2018, Scientific Reports*).

Ostatnim celem moich badań było wyjaśnienie, czy modyfikacje potranslacyjne białek kapsydu: L1 i L2 biorą udział w składaniu i odplaszczaniu wirusa HPV.

Dane literaturowe wskazują, że fosforylacja białek wirusowych odgrywa ważną rolę na różnych etapach cyklu replikacyjnego wirusów i reguluje takie procesy jak transport, odplaszczanie wirusa, replikacje jego materiału genetycznego, składanie i uwalnianie wirionów potomnych (Keating & Striker, 2012; Hoover & Cheng Kao, 2016). Mimo, że rola fosforylacji została bardzo dobrze scharakteryzowana w przypadku białek onkogennych E6 i E7 wirusów brodawczaka, niewiele wiadomo na temat fosforylacji białek kapsydu tego wirusa. Wcześniejsze badania wykazały, że białka kapsydu wirusów brodawczaka produkowane w systemie bakulowirusowym ulegają fosforylacji (Xi & Banks, 1991). Zaobserwowano również, że białko L2 może podlegać takim potranslacyjnym modyfikacjom jak sumoilacja i ubikwitynacja (Marusic et al., 2010; Broniarczyk et al. 2014). Obecność tych modyfikacji w wirionach i ich rola w cyklu replikacyjnym wirusów brodawczaka nie została jednak jeszcze w pełni wyjaśniona.

W tym celu cząstki pseudowirusowe wirusów brodawczaka ludzkiego - HPV16 i bydłowego - BPV1 (ang. *bovine papillomavirus*) wyprodukowane w warunkach laboratoryjnych jak i również natywne wirusy BPV1 wyizolowane z brodawek bydła, po oczyszczeniu poddałam analizie proteomicznej. Spektrometria mas umożliwiła identyfikację zachowawczego miejsca fosforylacji w białku L2 w pozycji T62 w przypadku wirusa HPV16 i T59 w przypadku wirusa BPV1. Treonina w tej pozycji występuje nie tylko w białku L2

wirusów brodawczaka ludzkiego i bydlęcego, ale również króliczego i mysiego. Obecność fosforylacji w białku L2 potwierdziłam przy użyciu przeciwciała rozpoznającego swoiste miejsce fosforylacji (HPV16L2-pT62). Pokazałam również, że brak fosforylacji w miejscu T62/T59 w białku L2 obniża zakaźność cząstek pseudowirusowych wirusów HPV16 i BPV1 w komórkach różnych linii. Dodatkowo wykazałam, że mutacja w miejscu fosforylacji, substytucja treoniny alaniną (T62A/T59A) nie ma wpływu na takie procesy jak składanie wirionów potomnych czy początkowy etap wnikania wirusa do komórki, ale hamuje proces odpłaszczania wirusa.

Podsumowując, moje badania po raz pierwszy wykazały obecność fosforylacji białek kapsydu w wirionach HPV16 i BPV1. W białku L2 wirusa HPV-16/BPV-1 zidentyfikowano zachowawcze miejsce fosforylacji w pozycji T62/T59. Występowanie tego miejsca fosforylacji u różnych wirusów brodawczak świadczy o jego ważnej roli w cyklu replikacyjnym tych wirusów. Wyniki moich badań potwierdziły, że mutacja w miejscu fosforylacji nie ma wpływu na składanie wirionów potomnych, ale ma wpływ na proces odpłaszczania wirusa (*Broniarczyk i wsp., 2019, Journal of Virology*).

Wyniki wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego zostały omówione w artykule przeglądowym opublikowanym w *International Journal of Molecular Sciences* (*Siddiq, Broniarczyk, Banks 2018*).

Celem tej pracy przeglądowej było podsumowanie postępów w badaniach nad rolą endocytozy w cyklu replikacyjnym wirusów brodawczaka, a także opisanie w jaki sposób białka onkogenne wirusów brodawczaka modulują i zaburzają transport wewnątrzkomórkowy, prowadząc do inicjacji procesu nowotworzenia.

Wierzę, że wyniki badań, które są częścią mojego osiągnięcia naukowego przyczyniły się do znaczących odkryć w biologii wirusów brodawczaka i po raz pierwszy pokazują znaczenie nowych, wcześniej nieopisanych czynników w regulacji cyklu replikacyjnego tych wirusów. Moje badania po raz pierwszy pokazały, że ważną rolę w procesie odpłaszczania wirusa odgrywa maszyna komórkowa ESCRT (białka TSG101 i VPS4) i fosforylacja białek kapsydu. Ponadto udowodniłam, że transport wirusa w komórce może być znacznie szybszy niż wcześniej uważano. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów wykazały, że genom wirusa może dostać się do jądra komórkowego nawet w ciągu 1-2 godzin jeżeli wirus zainfekuje komórkę tuż przed mitozą. Ponadto wykazałam, że wiriony HPV16 są

bardzo stabilne i mogą pozostać zakaźne przez co najmniej dwa tygodnie, czekając na powierzchni komórki na inicjację podziałów komórkowych.

Wszystkie uzyskane przeze mnie wyniki przybliżają nas do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących proces zakażenia komórki wirusem HPV i mogą być w przyszłości przydatne do identyfikacji nowych dróg blokowania infekcji wirusowej. Ważne jest, aby pamiętać, że obecna na rynku szczepionka chroniąca przed wirusem HPV ma tylko właściwości profilaktyczne a nie terapeutyczne. Wciąż nie ma metod leczenia, które mogłyby bezpośrednio zablokować zakażenie wirusem HPV i pomóc w uniknięciu inicjacji rozwoju procesu nowotworzenia.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A. Dane bibliometryczne (wg bazy Web of Science, sprawdzono dnia 24.04.19)

- IF dotychczasowych publikacji: **IF: 42,869 (IF_{5-letni} 49,879)**
- Liczba punktów MNiSW: **511**
- Łączna liczba cytowań: **221**
- Łączna liczba cytowań bez autocytowań: **203**
- Indeks-H: **6**

Jestem autorem lub współautorem **19** publikacji naukowych (w tym **14** publikacji jako pierwszy lub drugi autor), **6** rozdziałów w monografiach (w przypadku **5** jestem pierwszym autorem) oraz **22** doniesień prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Wykaz wszystkich prac oraz działań składających się na aktywność naukową przedstawiłam w załączonym wykazie opublikowanych prac naukowych (Załącznik 4).

A. Tematyka pozostałych prac badawczych

1) Po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie mojej pracy doktorskiej, otrzymałam prestiżowe stypendium rządowe ze Szwedzkiego Instytutu (**Baltic Sea Region Program/Visby Program**) i spędziłam rok pracując w grupie Profesora Magnusa Johanssona w Sztokholmie. Wyjazd ten umożliwił mi poszerzenie mojej wiedzy praktycznej i teoretycznej z dziedziny wirusologii molekularnej.

Doświadczenie zdobyte w Szwecji pomogło mi po powrocie do Polski kontynuować badania nad rolą czynników komórkowych biorących udział w zakażeniu komórki ludzkim wirusem brodawczaka. Moje wstępne wyniki badań zainteresowały międzynarodowe środowisko naukowe co zaowocowało przyznaniem mi wielu **stypendiów konferencyjnych** (*ang. travel grants*) umożliwiającymi mi bezpłatny udział w międzynarodowych konferencjach i kursach. Bardzo ważnym momentem w mojej karierze naukowej był udział w kursie wirusologicznym *“The Molecular Mechanisms of Viral Infection Propagation”* w Republice Afryki Południowej w marcu 2010 r. Podczas tego szkolenia poznałem wybitnego eksperta w dziedzinie wirusów brodawczaka - profesora Lawrence'a Banksa. Spotkanie to zaowocowało rozpoczęciem kilkuletniej współpracy z Międzynarodowym Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (*ang. International Centre for Genetics Engineering and Biotechnology*) w Trieście, Włochy. W sumie w ośrodku naukowym ICGEB w Trieście spędziłam z przerwami prawie 4 lat. Moje pobyty we Włoszech były finansowane ze środków UE (**stypendium UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości**) oraz **kilku krótkoterminowych stypendiów podoktorskich ICGEB (Short-term Postdoctoral Fellowships)**. Przebywając w Trieście nauczyłam się technologii cząstek pseudowirusowych (*ang. PsVs pseudoviral particles*) i równocześnie pracowałam nad kilkoma projektami dotyczącymi biologii wirusów brodawczaka. Wszystkie projekty ukończyłam z sukcesem, publikując 10 artykułów naukowych w międzynarodowych czasopismach wirusologicznych. Sześć z tych prac jest częścią mojego osiągnięcia naukowego. Kolejne trzy artykuły, dotyczą mechanizmów regulujących transport wirusa brodawczaka w komórce. Jedną z prac opisuje oddziaływanie pomiędzy białkiem L2 wirusa HPV i neksyną sortującą 27 (SNX27), (*ang. sorting nexin 27*), która jest częścią kompleksu retromerowego, odpowiedzialnego za transport białek z endosomów do sieci trans aparatu Golgiego (*TGN ang. trans Golgi network*) (**Pim i wsp., 2015, Journal of Virology**). Celem kolejnego projektu było wyjaśnienie roli innego białka komórkowego neksyny sortującej 17 (SNX17) w transporcie wirusa HPV (**Bergant i wsp., 2017, Journal of General Virology**). Natomiast jeden z najnowszych artykułów dotyczy roli VAP - transbłonowych białek siateczki śródplazmatycznej (ER, *ang. endoplasmic reticulum*), biorących udział w tworzeniu miejsc kontaktu błon w cyklu replikacyjnym wirusów HPV (**Siddiqi i wsp., 2018, Journal of Virology**). Jednym z artykułów powstałych we współpracy z ośrodkiem ICGEB jest również praca przeglądowa opisująca rolę domen PDZ białka onkogennego E6 wirusa HPV w procesie nowotworzenia (**Ganti i wsp., 2015, Viruses**).

Warto dodać, że moja ciężka praca i determinacja została zauważona przez prestiżową włoską **Fundację Umberto Veronesi**, która wspiera młodych naukowców pracujących w

dziedzinie onkologii. Zostałam uhonorowana stypendium podoktoranckim (**Umberto Veronesi Postdoctoral Fellowship**) na rok 2018, aby kontynuować badania w ośrodku ICGEB w Trieście.

Przez cały okres od ukończenia doktoratu byłam również aktywnie zaangażowana w pracę naukową i dydaktyczną w Zakładzie Wirusologii Molekularnej na Uniwersytecie Adama Mickiewicza. Wspólnie z profesorem Anną Goździcką-Józefiak współpracowałam z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie. Celem naszych projektów było poszukiwanie nowych markerów molekularnych karcynogenezy w diagnostyce raka szyjki macicy. Jeden z naszych projektów dotyczył analizy ekspresji białka TSG101 i LSF w różnych stadiach raka szyjki macicy (*Broniarczyk i wsp., 2014, Oncology Letters*). Kolejny projekt miał na celu analizę polimorfizmu powtórzeń cytozynowo-adeninowych w promotorze P1 genu *IGF-1* w nowotworze szyjki macicy (*Kwaśniewski i wsp., 2014, Molecular Medicine Reports*).

W okresie tym oprócz wykonywania pracy badawczej i dydaktycznej poszerzałam również nieustannie swoją wiedzę w dziedzinie wirusologii, karcynogenezy i proteomiki, pisząc artykuły przeglądowe i rozdziały w monografiach. Artykuły przeglądowe w których powstawaniu współuczestniczyłam omawiają: rolę czynników epigenetycznych w powstawaniu nowotworów wywoływanych przez wirusy (*Poreba i wsp., 2011, Clinical Epigenetics*) oraz funkcje przeciwdrobnoustrojowe peptydów roślinnych (*Nawrot i wsp., 2014, Folia Microbiologica*). Napisałam również trzy rozdziały w podręczniku (*Goździcka-Józefiak, 2019, Wirusologia PWN*), w których opisałam proces wnikania wirusów do komórki oraz scharakteryzowałam ortomyksowirusy i wirusy hepatotropowe.

Warto podkreślić, że moje osiągnięcia naukowe były kilkakrotnie nagradzane **nagrodami zespołowymi II stopnia (za rok 2014, 2017) oraz nagrodą indywidualną II stopnia (2015) Rektora UAM.**

2) Przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowanie nauką zaczęło się w latach 2002-2004, kiedy to w ramach pracy magisterskiej pt. „*Analiza oddziaływań pomiędzy białkami komórkowymi a białkiem HCR z prawidłowego nabłonka szyjki macicy w drożdżowym systemie dwuhybrydowym ProQuest Two Hybrid System (Gibco BRL)*” rozpocząłam badania naukowe pod kierunkiem pani profesor Anny Goździckej-Józefiak w Zakładzie Wirusologii Molekularnej UAM w

Poznaniu. Prace magisterską obroniłam z sukcesem w czerwcu 2004 roku. W październiku 2004 roku rozpocząłem Studium Doktoranckie na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu pod kierunkiem pani profesor Anny Goździckiej-Józefiak. Celem mojej pracy doktorskiej było wyjaśnienie roli białka TSG101 w komórkach nabłonka szyjki macicy w kontekście procesu zakażenia wirusem HPV16 i karcynogenezy. Białko TSG101 pełni w komórce wiele różnorodnych i ważnych funkcji, takich jak: ubikwitynacja białek, regulacja transkrypcji, transport endosomalny, regulacja proliferacji i wzrostu komórki, zaburzenie których może prowadzić do inicjacji lub promocji rozwoju procesu nowotworowego. TSG101 ulega konstytutywnej ekspresji w komórkach wszystkich tkanek podczas rozwoju embrionalnego, a także w organizmie dojrzałym. Zaburzenia w ekspresji tego białka obserwuje się w komórkach nowotworowych. Rola TSG101 w kancerogenezie zwłaszcza w przypadku nowotworów, w etiologii których ważną rolę odgrywają wirusy nie była znana. Brak również danych na temat mechanizmu regulacji jego ekspresji

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że ekspresja *TSG101* w komórkach nowotworowych nabłonka szyjki macicy jest obniżona zarówno na poziomie mRNA jak i białka i nie jest to wynikiem zmian w sekwencji kodującej, promotorowej i regulatorowej genu *TSG101* ani w metylacji wysp CpG. Wyniki te będące częścią mojego doktoratu zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Medicine* (**Broniarczyk i wsp., 2010**).

Badania będące częścią mojej pracy doktorskiej (oraz ich kontynuacja po doktoracie) były finansowane z dwóch projektów: interdyscyplinarnego grantu międzyuczelnianego UAM/UM oraz z grantu własnego NCN.

Równoległe z badaniami do mojej pracy doktorskiej wykonywałam również eksperymenty do mojej drugiej pracy magisterskiej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Celem mojej drugiej pracy magisterskiej była identyfikacja bakterii wybranych izolatów o aktywności listeriobójczej technikami biologii molekularnej.

W czasie trwania studiów doktoranckich otrzymałam również stypendium z **Fundacji FEBS (FEBS Summer Fellowship)** i spędziłam 3 miesiące w Szwecji (Södertörns University College, Sztokholm, Szwecja; czerwiec-październik 2008 r.). W trakcie mojego pobytu w Sztokholmie uczyłam się technik służących do analizy oddziaływań białko-białko, pracując nad projektem „Identyfikacja i charakterystyka oddziaływań pomiędzy białkiem NS1 wirusa grypy a białkami komórkowymi posiadającymi domeny PDZ”.

Bibliografia

- Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. 2017. HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res* 772:13-22.
- Aydin I, Weber S, Snijder B, Samperio Ventayol P, Kuhbacher A, Becker M, Day PM, Schiller JT, Kann M, Pelkmans L, Helenius A, Schelhaas M. 2014. Large scale RNAi reveals the requirement of nuclear envelope breakdown for nuclear import of human papillomaviruses. *PLoS Pathog* 10:e1004162.
- Campos SK. 2017. Subcellular Trafficking of the Papillomavirus Genome during Initial Infection: The Remarkable Abilities of Minor Capsid Protein L2. *Viruses*, 9(12).
- Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22(16):4212-22.
- Bergant M, Peternel Š, Pim D, Broniarczyk J, Banks L. 2017. Characterizing the spatio-temporal role of sorting nexin 17 in human papillomavirus trafficking. *J Gen Virol.*, 98(4):715-725.**
- Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M. 2012. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J Virol* 86:9875-87.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V, Group WHOIAfRoCMW. 2009. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10:321-2.
- Broniarczyk J, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Banks L. 2014. Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery. *Virology* 460-461:83-90.**
- Broniarczyk JK, Warowicka A, Kwaśniewska A, Wohuń-Cholewa M, Kwaśniewski W, Goździcka-Józefiak A. 2014 Expression of TSG101 protein and LSF transcription factor in HPV-positive cervical cancer cells. *Oncol Lett.* 7(5):1409-1413.**
- Broniarczyk J, Massimi P, Bergant M, Banks L. 2015. Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process. *J Virol.* 89(17):8727-32.**
- Broniarczyk J, Pim D, Massimi P, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Crump C, Banks L. 2018. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. *Sci Rep.*7:45159,**
- Broniarczyk J, Ring N, Massimi P, Giacca M, Banks L. HPV-16 virions can remain infectious for 2 weeks on senescent cells but require cell cycle re-activation to allow virus entry. *Sci Rep.* 2018 Jan 16;8(1):811.**
- Broniarczyk J, Massimi P, Pim D, Bergant Marušič M, Myers MP, Garcea RL, Banks L. 2019. Phosphorylation of HPV-16 L2 Contributes To Efficient Virus Infectious Entry. *J Virol.* Apr 17.**
- Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, Trus BL. 2008. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *Journal of Virology* 82:5190-5197.
- Dabydeen SA, Meneses PI. 2009. The role of NH4Cl and cysteine proteases in Human Papillomavirus type 16 infection. *Virol J* 6:109.
- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72:142-50.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14252-7.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT. 2008. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* 82:12565-8.
- Day PM, Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR, Schiller JT. 2013. Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *J Virol* 87:3862-70.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55-70.
- Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaic V, Banks L. 2015. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* 7:3530-51.**
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-70.
- Hayflick, L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37(3), 614
- Hoover H, Cheng Kao C. 2016. Phosphorylation of the viral coat protein regulates RNA virus infection, vol Volume 8.
- Huotari, J. & Helenius, A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30(17), 3481–3500.

- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810-22.
- Keating JA, Striker R. 2012. Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Reviews in medical virology* 22:166-181.
- Kwasniewski W, Gozdzicka-Jozefiak A, Kotarska M, Polak G, Barczynski B, Broniarczyk J, Nowak W, Wolun-Cholewa M, Kwasniewska A, Kotarski J. 2015 Analysis of cytosine-adenine repeats in P1 promoter region of IGF-1 gene in peripheral blood cells and cervical tissue samples of females with cervical intraepithelial lesions and squamous cervical cancer. *Mol Med Rep.* 11(2):766-74**
- Marusic MB, Mencin N, Licen M, Banks L, Grm HS. 2010. Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *J Virol* 84:11585-9.
- Modis Y, Trus BL, Harrison SC. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J* 21:4754-62.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Gozdzicka-Józefiak A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol (Praha).* May;59(3):181-96.**
- Pim D, Broniarczyk J, Bergant M, Playford MP, Banks L. 2015. Novel PDZ Domain Interaction Mediates the Binding between Human Papillomavirus 16 L2 and Sorting Nexin 27 and Modulates Virion Trafficking. *J Virol.* 89(20):10145-55.**
- Poreba E, Broniarczyk J, Gozdzicka-Jozefiak A. 2011 Epigenetic mechanisms in virus induced tumorigenesis. *Clin Epigenetics.* 2(2):233-47.**
- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. 2009. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5:e1000318.
- Siddiq A, Broniarczyk J, Banks L. Papillomaviruses and Endocytic Trafficking. 2018. *Int J Mol Sci.*19(9).**
- Smith JL, Campos SK, Wandinger-Ness A, Ozbun MA. 2008. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J Virol* 82:9505-12.
- Spoden G, Kühling L, Cordes N, Frenzel B, Sapp M, Boller K, Florin L, Schelhaas M. 2013. Human papillomavirus types 16, 18, and 31 share similar endocytic requirements for entry. *J Virol.* July;87(13):7765-73.
- Votteler J, Sundquist WI. 2013. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe.* Sep 11;14(3):232-41.
- Yang R, Day PM, Yutzy WH, Lin KY, Hung CF, Roden RB. 2003. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol* 77:3531-41.
- Xi SZ, Banks LM. 1991. Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid proteins: detection of L1-L2 protein complexes. *J Gen Virol* 72 (Pt 12):2981-8.
- Zhang W, Kazakov T, Popa A, DiMaio D. 2014. Vesicular trafficking of incoming human papillomavirus 16 to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum requires gamma-secretase activity. *MBio* 5:e01777-14.
- zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288:F55-78.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-50.

Poznań 26/04/2019
Justyna Broniarczyk