



Ewa Szolańska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Hoffmann zatytułowanej „Analiza funkcji i biogenezy wybranych mikroRNA wirusa pseudowścieklizny (PRV)”

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod naukowym kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk oraz dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Rozprawa doktorska Pani Weroniki Hoffmann dotyczy istotnego zagadnienia jakim jest badanie roli mikroRNA (miRNA) w regulacji replikacji wirusów. Te krótkie niekodujące cząsteczki RNA, biorące udział w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym, są obiektem badań wirusologicznych od wykrycia blisko dwadzieścia lat temu pierwszego wirusowego miRNA. Od tego czasu zidentyfikowano blisko 300 miRNA, w większości kodowanych w genomach przedstawicieli herpeswirusów, wśród nich 11 miRNA wirusa pseudowścieklizny (PRV, ang. *pseudorabies virus*) obecnych w zainfekowanych komórkach nerki świńskiej, kodowanych w intronie transkryptu związanego z latencją - LLT (ang. *Large Latency Transcript*) PRV.

PRV jest alfaherpeswirusem, wywołującym groźną nieuleczalną chorobę Aujeszky'ego, powodującą poważne straty w produkcji trzody chlewnej i bydła. Naturalnym rezerwuarem PRV są świny i dziki, w których w układzie nerwowym wirus może się utrzymywać w stanie latencji przez długi okres czasu i po reaktywacji zakażać inne osobniki. Krąg gospodarzy wirusa pseudowścieklizny jest bardzo szeroki obejmuje wiele gatunków zwierząt domowych jak psy i koty oraz gryzonie. W ostatnich latach pojawiają się również niepokojące doniesienia o przypadkach infekcji u pracowników ferm trzody chlewnej w Chinach, potwierdzone wykryciem wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym, oraz specyficznych przeciwciał we krwi pacjentów z zapaleniem mózgu o ciężkim przebiegu. Ze względu na szeroki krąg gospodarzy oraz jego wydajne namnażanie się w hodowlach komórkowych, PRV jest często wykorzystywany jako model do badań nad mechanizmami infekcji alfaherpeswirusowej *in vitro*, oraz w modelach zwierzęcych. Również podczas badań reaktywacji wirusa ze stanu latencji.

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Hoffmann została przygotowana w formie monografii naukowej, jej tytuł odzwierciedla zawartą treść. Napisane w języku polskim opracowanie liczy 177 stron. Ma poprawny układ i strukturę, na którą składają się: *Spis treści*, *Wykaz stosowanych skrótów*, *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Wstęp*, *Cel pracy*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Metody*, *Materiały*, *Załączniki*, *Bibliografia* oraz *Dorobek naukowy*. Proporcje poszczególnych części są prawidłowe.

We *Wstępie* Autorka w przystępnej formie przedstawiła zagadnienia istotne z punktu widzenia zaprezentowanych w rozprawie badań, dotyczące cyklu replikacyjnego wirusa pseudowścieklizny oraz miRNA. Ze szczególnym uwzględnieniem biogenezy oraz dostępnych metod badania miRNA, w tym strategii kontroli jego poziomu. To wprowadzenie ułatwia czytelnikowi ocenę trafności wyboru zastosowanych przez Doktorantkę strategii i metod badawczych. Tekst rozdziału jest udokumentowany odpowiednio dobranymi danymi literaturowymi i wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Pani Weroniki Hoffmann w zakresie problematyki badań.

Klarownie sformułowany *Cel pracy* został poprzedzony krótkim uzasadnieniem potrzeby przeprowadzenia badań. Autorka wymieniła również badania, których przeprowadzenie było wymagane dla realizacji zamierzonych celów.

Liczący 54 strony maszynopisu rozdział *Wyniki* zawiera starannie skonstruowany opis doświadczeń oraz uzyskanych wyników, który umożliwia czytelnikowi swobodne podążanie za tokiem realizacji prac badawczych. Racjonalnie zaprojektowane doświadczenia, układają się w logiczny ciąg badań. Zwraca uwagę stosowanie przez Doktorantkę nowoczesnych metod badawczych z zakresu m.in. biologii molekularnej, biochemii, biotechnologii, biologii komórki i wirusologii. Wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego wachlarza metod świadczy o Jej dużych umiejętnościach praktycznych. Rozdział kończy się podsumowaniem, w którym Autorka w ośmiu punktach przedstawiła w syntetycznej formie najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie.

Dyskusja jest podzielona na sekcje tematyczne, w których Doktorantka szczegółowo analizuje i interpretuje własne wyniki w kontekście danych literaturowych. Należy docenić wnikliwość i krytyczną ocenę przez Doktorantkę własnych wyników oraz ograniczeń stosowanych podejść metodycznych. Autorka wskazuje na możliwości udoskonalenia metodologii doświadczalnej, która mogłaby być wykorzystana podczas kontynuacji badań związanych z ustaleniem, który z miRNA[1-3] odpowiada za przebieg infekcji PRV i uzasadnia potrzebę kontynuowania prac nad udoskonaleniem modelu

Wnioski z przeprowadzonych badań zostały sformułowane w postaci pięciu zwięzłych stwierdzeń, które znajdują poparcie w uzyskanych danych.

Zawarte w rozdziałach *Metody* i *Materiały* szczegółowe i kompetentne opisy metodyki prowadzonych badań oraz wykorzystanych materiałów nie budzą zastrzeżeń.

Bibliografia zawiera zestawienie ponad trzystu pozycji cytowanych w rozprawie, głównie z ostatnich lat. Dobór prac świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu.

Celem badań przedstawionych w rozprawie była analiza funkcji klastra trzech pierwszych miRNA zlokalizowanych w intronie LLT wirusa PRV. W szczególności zbadanie potencjału miRNA do modulowania ekspresji genów wirusowych i określenia ich roli w regulowaniu cyklu życiowego wirusa. Projekt doktorski zakładał również wyjaśnienie, który spośród miRNA badanego klastra pełni dominującą rolę.

Doktorantka z sukcesem zrealizowała pierwszą część projektu doktorskiego, dzięki opracowaniu modelu badawczego opartego na stabilnej produkcji klastra trzech miRNA europejskiego szczepu PRV-NIA-3 w komórkach jądra świni (ST, ang. swine testicle). Skonstruowaną linię komórkową ST_LL1 [1-3] wykorzystwała do analiz funkcjonalnych miRNA podczas litycznej infekcji wirusa PRV szczepu NIA3 (ang. Northern Ireland Aujeszky-3). Doktorantka wykazała, że klastr znacząco obniżył poziom zarówno aktywatorów infekcji IE180, EP0 jak również białka strukturalnego wirusa - glikoproteiny gE, podczas wczesnych etapów infekcji PRV. Wykazała również niewielkie zaburzenie zdolności transmisji i proliferacji wirusa.

Dalsze badania obejmowały weryfikację, który spośród nadprodukowanych miRNA jest odpowiedzialny za obserwowane efekty. Doktorantka planowała zrealizować ten cel stosując strategię selektywnego obniżania poziomu wybranych miRNA (ang. loss-of-function studies, LOF) poprzez zahamowanie powstawania dojrzałych miRNA i badanie efektu fenotypowego w komórkach linii ST_LL1[1-3].

Tę część projektu doktorskiego Pani Weronika Hoffmann realizowała w ścisłej współpracy z zespołem prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Wstępnym etapem było otrzymanie rekombinowanego enzymu odpowiedzialnego za wycinanie dojrzałych miRNA z ich prekursorów. Do produkcji rybonukleazy Dicer Doktorantka wykorzystwała stosowany z powodzeniem w Jej rodzimym Zakładzie bakulowirusowy system ekspresji genów w komórkach owadzych. Zwiększenie wydajności ekspresji osiągnęła dzięki modyfikacji wyjściowej sekwencji cDNA ludzkiego genu

Dicer, polegającej na usunięciu fragmentu sekwencji poprzedzającego kodon startu translacji. Dołączenie do sekwencji kodującej Dicer sekwencji znacznika polihistydynowego, umożliwiło wstępne oczyszczenie białka metodą chromatografii powinowactwa. Optymalizacja warunków nadprodukcji i dwustopniowej procedury oczyszczania rekombinowanej rybonukleazy z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej, umożliwiło Doktorantce otrzymanie wysokiej jakości preparatu, o czystości umożliwiającej jego wykorzystanie w analizach wiązania RNA w warunkach *in vitro*. Podczas gdy dostępne komercyjne preparaty hDicer nie spełniały tego kryterium. Preparat został z powodzeniem wykorzystany przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak do określenia rodzaju oddziaływań pomiędzy Dicer a różnej długości oligomerami RNA, będącymi potencjalnymi inhibitorami procesu cięcia pre-miRNA przez hDicer. Na podstawie otrzymanych wyników, zaproponowano mechanizmy regulacji przetwarzania pre-miRNA przez hDicer, kontrolowane przy użyciu oligomerów RNA.

Doktorantka potwierdziła w warunkach *in vitro* możliwość zahamowania powstawania dojrzałych miRNA przez oligomery 2'OMe i Morpholino komplementarne do rejonów apikalnych substratów pre-miRNA. Podczas gdy użycie obu rodzajów oligomerów ingerujących w biogenezę miRNA w systemie komórkowym wywołało nieselektywne obniżanie poziomu miRNA z klastra LLT[1-3] wirusa PRV, co uniemożliwiło kontynuowanie badań z ich wykorzystaniem. Również w uproszczonym układzie badawczym z zastosowaniem oligomerów mirVana, hybrydujących do dojrzałych miRNA (AMO, ang. anti-miRNA oligonucleotides), i wykorzystaniu niemodyfikowanych komórek ST infekowanych PRV przy niskiej wartości współczynnika MOI, nie wykazano selektywnego działania oligomerów. Opracowany model badawczy wymaga więc udoskonalenia.

Realizacja projektu doktorskiego była zadaniem bardzo ambitnym i okazała się trudnym wyzwaniem. Doktorantka wykazała się godną uznania konsekwencją i wytrwałością w realizacji zamierzonego celu. Świadczy o tym zawarty w rozprawie opis zrealizowanych prac badawczych, jak również informacja dotycząca początkowych etapów realizacji projektu, obejmujących zastosowanie kilku wymagających dużych umiejętności praktycznych, oraz dużego nakładu pracy, podejść badawczych wykorzystanych przez Doktorantkę z zamiarem zidentyfikowania genów na które są nacelowane miRNA PRV. Ponieważ ich zastosowanie nie umożliwiło uzyskania jednoznacznych rezultatów, nie zostały one opisane w rozprawie.

Rozprawa została starannie przygotowana pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na wymagające korekty sformułowania jak „wirus roślin”, „konserwa komórek *Escherichia.coli*” . Sugerowałabym zastąpienie „predykcji bioinformatycznych” „przewidywaniami.”

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony.

- Międzygatunkowa transmisja wirusów jest złożonym procesem często wymagającym pojawienia się zmian adaptacyjnych na poziomie molekularnym. Czy znane są podstawy skuteczności wirusa PRV w przełamywaniu bariery międzygatunkowej. Jednocześnie jestem ciekawa czy zdaniem Doktorantki istnieje ryzyko transmisji wirusa PRV pomiędzy ludźmi.
- Czy zdaniem doktorantki wyniki badań *in vitro* wskazujące na potencjał klastra miRNA LLT[1-3] do kontrolowania produkcji wirionów potomnych, stanowią uzasadnienie dla potwierdzenia tego efektu w modelu *in vivo*? Jeśli tak, w jakim model Doktorantka przeprowadziłaby badania?
- Wśród przyczyn niezgodności w ocenie przez różne grupy badawcze wpływu miRNA PRV na ekspresję genów wirusa i proces jego replikacji Autorka wymieniła między innymi różne wartości MOI, mogące wpływać na kinetykę infekcji. Proszę o wyjaśnienie czy Doktorantka testowała różne warunki infekcji podczas realizacji pierwszej części projektu. Jakie warunki infekcji *in vitro* mogą imitować przebieg litycznej infekcji PRV *in vivo*?

- Autorka wyjaśnia w rozprawie „*W momencie gdy zaczynałam pracę nad przygotowaniem preparatu, różnice w strukturze i funkcjonowaniu rybonukleaz Dicer u różnych gatunków ssaków nie były znane. Z tego powodu, oraz z uwagi na historię wcześniej prowadzonych przez zespół z IChB PAN badań moja praca obejmowała produkcję Dicer również pochodzącą od człowieka.*”. Czy gdyby Doktorantka obecnie rozpoczęła badania, również zdecydowałaby się na produkcję hDicer?

Doktorantka jest współautorką dwóch artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W pracach tych Pani Weronika Hoffmann jest pierwszą autorką lub ”dzieli tę pozycję” z drugą współautorką. Informacje zawarte w sekcji „*Autor Contributions*” pracy “*Functional Analysis of a Frontal miRNA Cluster Located in the Large Latency Transcript of Pseudorabies Virus*” (*Viruses*, 2022) wskazują na wkład Doktorantki na wszystkich etapach powstania pracy. W przypadku pracy „*How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing*” (*Acta Biochimica Polonica*, 2016) udział w prezentowanych w publikacji badaniach Doktorantka opisała w rozprawie.

Recenzowana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętności praktyczne Doktorantki, świadczące o Jej bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań. Pani Weronika Hoffmann wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnościami współpracy. Prezentowane w rozprawie wyniki poza walorem poznawczym mają istotny potencjał aplikacyjny w kontekście opracowywania nowatorskich strategii przeciwwirusowych. Co wydaje się szczególnie ważne w przypadku wirusów odzwierzęcych infekujących ludzi.

Podsumowując wysoko oceniam wartość naukową recenzowanej pracy i z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Hoffmann zatytułowana „*Analiza funkcji i biogenezy wybranych mikroRNA wirusa pseudowścieklizny (PRV)*” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i składam do Rady Dyscypliny Biotechnologicznej Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Weroniki Hoffmann do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, dnia 17 maja 2024 r.

Dr hab. Ewa Szolajska
Środowiskowa pracownia Hodowli Komórkowych
i Produkcji Białek
Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN