

Dr hab. Magdalena Weidner-Glunde
Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, dnia 15.05.2024 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Weroniki Hoffmann pt.: „Analiza funkcji i biogenezy
wybranych mikroRNA wirusa pseudowścieklizny (PRV)”**

Przedstawiona recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk. Promotorem pomocniczym była Pani dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. IChB PAN.

Badania prowadzone przez Panią Mgr Weronikę Hoffmann w ramach pracy doktorskiej dotyczyły funkcji i biogenezy klastra trzech pierwszych miRNA kodowanych w obrębie intronu transkryptu związanego z latencją (ang. *Large Latency Transcript*, *LLT*) w genomie wirusa pseudowścieklizny (PRV). Praca ta skupiała się na analizie wpływu miRNA LLT[1-3] na przebieg infekcji PRV oraz na badaniu regulacji wycinania/dojrzewania miRNA LLT[1-3] i miała na celu poznanie roli miRNA LLT[1-3] w biologii PRV. Cel pracy został jasno określony i poprawnie sformułowany.

MikroRNA (miRNA) to wysoce konserwowana grupa małych, niekodujących cząsteczek RNA o wielkości 19-25 nukleotydów. Biorą one udział w regulacji poziomu ekspresji genów na etapie transkrypcji bądź translacji. miRNA o wysokiej komplementarności do transkryptu, który wiążą, powodują degradację danego mRNA, natomiast te o niższej komplementarności hamują translację danego transkryptu. Już samo odkrycie, że cząsteczki RNA mogą pełnić funkcje inne niż tylko kodujące (jak mRNA), spowodowało rewolucję w myśleniu o funkcjonowaniu komórki. Ponadto, zwiększająca się liczba nowo odkrywanych typów niekodujących cząsteczek RNA wraz ze wzrastającą w niesamowitym tempie liczbą funkcji, które mogą one pełnić w komórce, sprawia, że badanie RNA oraz jego funkcji jest tematem aktualnym, fascynujący i wciąż nie w pełni zbadanym.

Herpeswirusy, do których należy m.in. wirus pseudowścieklizny posiadają genomy dsDNA, co sprawia, że wiele mechanizmów dotyczących podstawowych funkcji DNA w komórce jest podobne bądź nawet identyczne jak te dotyczące genomu ludzkiego. Nie bez znaczenia jest fakt, że wirusy, jako pasożyty wewnątrzkomórkowe wykorzystują „maszynę komórkową” (czynniki

komórkowe), aby pomyślnie ukończyć swój cykl replikacyjny. Podobnie jak ludzki genom, również genomy herpeswirusów mogą kodować miRNA. Należy zaznaczyć, że tylko w niewielu przypadkach miRNA kodowanego przez genomy wirusowe, głównie herpeswirusowe, znana jest jego funkcja oraz geny docelowe (ang. *targets*). W związku z tym badania dotyczące funkcji wirusowych miRNA są nieodzowne, pozwalając na lepsze zrozumienie oddziaływania między wirusami i gospodarzem.

PRV należy do podrodziny Alphaherpesviridae i wywołuje pseudowściekliznę, zwaną też chorobą Aujeszky'ego. Wirus ten jest groźny głównie dla trzody chlewnej, dlatego aby zapobiec potencjalnym ogromnym stratom w produkcji spowodowanym infekcją PRV, stosuje się szczepionki markerowe zgodnie ze strategią DIVA (ang. *differentiate infected from vaccinated animals*). Stosowana szczepionka nie jest w 100% efektywna, ponieważ jest szczepionką atenuowaną i nie zapobiega ustaleniu latencji przez terenowe szczepy PRV u osobników zaszczepionych, a co za tym idzie nadal możliwe są wybuchy epidemii. W związku z tym konieczne są badania, szczególnie dotyczące kontroli „przełączników” (czynników indukujących przejście) z cyklu litycznego do latencji i *vice versa*. Ze względu na to, że PRV ma szeroki zakres gospodarzy oraz bardzo efektywnie replikuje się w hodowlach komórkowych jest on używany jako model dla infekcji alfa herpeswirusów. Podobnie jak w przypadku innych herpeswirusów cykl życiowy PRV charakteryzuje się dwoma fazami: replikacji litycznej i latencji. Podczas cyklu litycznego wirus replikuje swój genom, ekspresji ulega znaczna większość genów PRV oraz wytwarzane są potomne cząsteczki wirusowe. Latencja natomiast jest etapem, w którym ekspresji ulegają jedynie wybrane geny (latentne), co ma zapobiec wykryciu wirusa przez układ odpornościowy, ale jednocześnie zapewnić jego persystencję. Genom PRV koduje 67 białek. Cztery transkrypty PRV ulegają procesowi splicingu, jednym z nich jest duży transkrypt związany z latencją (LLT). Intron transkryptu LLT koduje prekursor (pri-miRNA) 11 miRNA PRV – prv-miR-LLT1 do prv-miR-LLT11. LLT miRNA są kodowane na nici komplementarnej do tej kodującej najważniejsze transaktywatory cyklu litycznego PRV tj. IE180 i EP0. Jak dotąd miRNA PRV były analizowane głównie jako klaster. Jedynie w dwóch przypadkach zostały przeprowadzone badania funkcjonalne włączając identyfikację docelowych transkryptów regulowanych przez poszczególne miRNA PRV. Były to badania dotyczące prv-miR-LLT7 i prv-miR-LLT-11. W związku z tym autorka pracy doktorskiej zdecydowała się badać pojedyncze cząsteczki z klastra trzech pierwszych miRNA kodowanych w LLT.

Przedstawiona przez Panią mgr Weronikę Hoffmann rozprawa doktorska w formie monografii obejmuje następujące elementy: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie, wstęp, cel

pracy, wyniki, dyskusję, wnioski, metody, materiały oraz załączniki, bibliografię i opis dorobku naukowego doktorantki. Rozprawa została napisana poprawnie merytorycznie oraz stylistycznie w zakresie umożliwiającym zrozumienie i interpretację wyników.

Wstęp rozprawy zawiera obszerne streszczenie wiedzy dotyczącej zarówno miRNA, jak również herpeswirusów i miRNA kodowanych przez wirusy. Ten rozdział Doktorantka podzieliła na trzy części opisujące: (i) poszczególne domeny enzymu Dicer oraz powiązania między strukturą, a funkcją w odniesieniu do tych domen, (ii) biogenezę miRNA oraz kolejne etapy obróbki prekursorów miRNA prowadzące do utworzenia dojrzałego miRNA, oraz (iii) mechanizmy działania miRNA. Ta część pracy jest bardzo klarowna i podkreśla złożoność regulacji funkcji komórkowych i wirusowych, które są zależne od miRNA. Tu Doktorantka słusznie podkreśliła fakt, że większość miRNA wywołuje stosunkowo mały efekt na ekspresję danego genu docelowego i często obserwowane zmiany są wynikiem działania wielu miRNA jednocześnie.

Pani mgr Weronika Hoffmann rozpoczęła badania od sklonowała hDicer w systemie bakulowirusowym, a następnie izolacji i oczyszczania tego preparatu. Autorka potwierdziła również zdolność wyizolowanego enzymu do cięcia prekursorów miRNA *in vitro*. Cały ten proces wymagał optymalizacji na wielu etapach. Autorka przeprowadziła wszystkie te eksperymenty włączając wiele różnych próbek kontrolnych, co umożliwiło wyciągnięcie właściwych wniosków.

Następnie Doktorantka analizowała wpływ miRNA LLT[1-3] na replikację lityczną wirusa. Ten eksperyment został wykonany w linii komórkowej wyprowadzonej przez autorkę - ST_LL[1-3]. Linia ta została stworzona w oparciu o wektor lentiwirusowy kodujący miRNA LLT[1-3] i zawierający gen GFP (green fluorescent protein) jako marker. Mgr Weronika Hoffmann infekowała powyższą linię komórkową rekombinowanym wirusem PRV, zawierającym gen RFP (red fluorescent protein) jako marker. Eksperyment ten okazał się niemożliwy do analizy (miała to być analiza cytometryczna) ze względu na bardzo mocną fluorescencję GFP, która uniemożliwiała odczyt sygnału RFP. Dokładny opis etapów tworzenia, charakterystyki linii komórkowej (m.in. profil ekspresji poszczególnych miRNA podczas infekcji PRV) opisane są w następnym podrozdziale. Pomocnym byłoby umieszczenie tego opisu przed opisem pierwszego eksperymentu, w którym ta linia została użyta. Niemniej jednak, kolejne analizy wykonane w tej linii komórkowej dały bardzo interesujące wyniki. Doktorantka zaobserwowała, że obecność miRNA LLT[1-3] obniżyła ekspresję litycznych transaktywatorów PRV – IE180 i EP0. Kolejna seria eksperymentów analizowała wpływ miRNA LLT[1-3] na ekspresję glikoproteiny gE PRV, która ma wpływ na wirulencję wirusa. Zarówno w analizie immunofluorescencyjnej, cytometrycznej, Western blot jak i RT-qPCR Autorka

zaobserwowała obniżenie ekspresji białka gE w obecności miRNA LLT[1-3]. Kontynuując badanie wpływu miRNA LLT[1-3] na infekcję PRV, kolejne badania analizowały efekt ekspresji klastra miRNA na rozprzestrzenianie się wirusa z komórki do komórki (rozmiar łysinek) oraz replikację wirusa (miano wirusa). Zaobserwowano, że rozmiar łysinek PRV zmniejszył się, a replikacja wirusa była opóźniona w obecności miRNA.

W ostatniej części pracy doktorskiej autorka skupiła się na hamowaniu miRNA LLT[1-3]. Początkowo testowała oligomery 2'OMe oraz morfolino, które wpływają na obróbkę miRNA uniemożliwiając jego dojrzewanie. Jednak oba typy inhibitorów okazały się działać niespecyficycznie w testowanym systemie. Tu należy podkreślić wysoką jakość wykonanych analiz, zaplanowanie wielu kontroli oraz optymalizację warunków eksperymentu na wielu etapach, co umożliwiło wykrycie braku specyficzności użytych inhibitorów. W kolejnym podejściu do zagadnienia hamowania efektów miRNA, Doktorantka użyła oligonukleotydy antisensowne – AMO (ang. *antisense miRNA oligonucleotides*), które wiążą się bezpośrednio z już dojrzałymi miRNA i w ten sposób hamują ich działanie. Również w tym przypadku nie zaobserwowano specyficznego efektu inhibitorów AMO.

Należy podkreślić, że Pani mgr Weronika Hoffmann w ramach doktoratu stworzyła kilka narzędzi, które wymagały wielu etapów optymalizacji, co świadczy nie tylko o wytrwałości Doktorantki, jej dbałości o jakość wyników, ale jest też świadectwem zaawansowania metodycznego.

W dyskusji Pani Mgr Weronika Hoffmann odnosi wyniki swojej pracy do aktualnej literatury i bardzo dogłębnie analizuje znaczenie badań w szerszym kontekście. Autorka punkt po punkcie omawia i porównuje otrzymane wyniki z rezultatami prac innych laboratoriów. Świadczy to o znakomitej znajomości przez Doktorantkę literatury związanej z tematem jej pracy badawczej. Ta część rozprawy doktorskiej jest podzielona na trzy sekcje tematyczne, co bardzo ułatwia podsumowanie wyników. Dyskusja jest napisana poprawnie, a następujące po niej wnioski są klarownie sformułowane.

Wykonanie badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej wymagało wykorzystania wielu metod z zakresu wirusologii, biologii molekularnej, biochemii oraz biologii komórki. Wszystkie metody są bardzo dokładnie opisane. Doktorantka opanowała hodowle komórkowe i produkcję rekombinowanego białka przy użyciu systemu bakulowirusowego. Wykonała wieloetapowe oczyszczanie rekombinowanego białka hDicer. Do analiz funkcjonalnych m.in. infekcji PRV wykorzystywała komórki ssacze. Duża część badań wiązała się też z pracą z RNA (m.in. izolacja RNA, RT-PCR, znakowanie radioizotopowe RNA, elektroforeza RNA, reakcja trawienia RNA przez Dicer) co wymaga dużej dokładności i niesie wysokie ryzyko utracenia materiału ze względu na

niestabilność RNA. Bardzo wiele metod zostało zoptymalizowanych, co jest procesem pracochłonnym i świadczy o ogromie włożonej pracy oraz wytrwałości Autorki w dążeniu do osiągnięcia celu.

Wśród najistotniejszych osiągnięć badawczych Pani Mgr Weroniki Hoffmann uzyskanych w ramach pracy doktorskiej można wymienić:

- (1) stworzenie oraz scharakteryzowanie świńskiej linii komórkowej ze stałą nadekspresją miRNA LLT[1-3] umożliwiającą testowanie efektów fenotypowych miRNA kodowanych przez PRV,
- (2) wykazanie hamującego wpływu miRNA LLT[1-3] na ekspresję transaktywatorów wirusa: IE180, EPO oraz glikoproteiny gE,
- (3) wykazanie, że ekspresja miRNA LLT[1-3] może wpływać na replikację lityczną PRV, a dokładniej na produkcję wirionów potomnych,
- (4) udowodnienie, że niższa ekspresja gE, indukowana przez miRNA LLT[1-3], może ograniczać rozprzestrzenianie się wirusa z komórki do komórki,
- (5) wyprodukowanie, oczyszczenie i scharakteryzowanie aktywności rekombinowanej rybonukleazy Dicer, który to preparat umożliwił późniejsze testy inhibitorów dojrzewania (cięcia prekursorów pre-miRNA) wirusowych miRNA,
- (6) zademonstrowanie efektywnego hamowania dojrzewania (cięcia prekursorów pre-miRNA przez Dicer) miRNA PRV przez oligomery 2'OMe oraz Morpholino w warunkach *in vitro*,
- (7) opracowanie nowego systemu do testowania funkcji PRV miRNA *in cellulo* opartego o inhibitory typu AMO (ang. *antisense miRNA oligonucleotides*), które wiążą dojrzałe miRNA.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Weroniki Hoffmann zostały opublikowane w dwóch publikacjach naukowych, w jednej z nich doktorantka jest pierwszym autorem. Pani Mgr Weronika Hoffmann uzyskała również finansowanie NCN na projekt Preludium 13 związany z tematyką jej pracy doktorskiej, co świadczy o dużej samodzielności Doktorantki oraz że jej kształcenie w ramach doktoratu obejmowało nie tylko badania naukowe, ale także inne umiejętności wymagane na naukowej ścieżce kariery, m.in. zdobywanie funduszy na badania.

Mam następujące pytania dotyczące wyników przedstawionych w pracy doktorskiej:

1. Dlaczego ilość produktu trawienia miR-21-5p przez N-Dicer nie zwiększała się, a wręcz przeciwnie malała wraz ze zwiększeniem ilości hDicer dodanej do reakcji (Ryc.4.8)?

2. Gdyby planowała Pani eksperyment „gain of function” ponownie, zakładając brak ograniczeń czasowych i finansowych, czy ma Pani pomysł na wykorzystanie innej strategii do zbadania genów kontrolowanych przez miR LLT[1-3]?
3. Czy wiadomo coś na temat ekspresji (poziomu ekspresji/zakresu ekspresji) PRV miRNA oraz potencjalnie genów docelowych (targetów) w różnych typach komórek, które mogą być infekowane przez ten wirus (epitelialne, nabłonkowe, nerwowe)?
4. Jak wyjaśni Pani obecność drugiego piku/ramienia (shoulder) wykresu na Ryc. 4.19, które pojawia się w analizie cytometrycznej ekspresji glikoproteiny gE na powierzchni komórek infekowanych PRV po 7h? Czy z czasem (gdybyśmy przeprowadzili tę analizę jeszcze później) wszystkie komórki przesuną się do tego drugiego piku?
5. Ma Pani obecnie bardzo dużą wiedzę praktyczną na temat pracy z miRNA, a szczególnie z miRNA kodowanymi przez wirusy. Czy może Pani, w oparciu o swoje doświadczenie, wymienić najważniejsze czynniki (nie więcej niż 5), o których należy pamiętać, przy planowaniu oraz podczas pracy nad projektem dotyczącym miRNA/wirusowego miRNA?

Podsumowując mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani Mgr Weroniki Hoffmann została napisana przejrzysto, a wyniki badań zostały przedstawione w sposób usystematyzowany. Postawione cele badawcze zostały w pełni osiągnięte. Wyniki uzyskane w ramach opisanych badań zostały przedstawione na 54 stronach i są udokumentowane fotografiami, rycinami, tabelami oraz fachowo omówione w oparciu o aktualne źródła literaturowe (308 pozycji). Rozprawa ta stanowi ważny wkład w badania nad miRNA kodowanymi przez herpeswirusy oraz ich funkcjami w biologii tych patogenów. Doktorantka wykazała się zdolnością planowania i prowadzenia badań na wysokim poziomie, doboru właściwej metodyki badawczej i wyciągania prawidłowych wniosków na podstawie uzyskanych wyników analiz.

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art.187 ust.1-4 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668 z późn.zm.). Wnoszę zatem do wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Hoffmann do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Magdalena Weidner-Glunde