



Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Uniwersytet Gdański
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMED
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk
Tel. (58) 523 6381
e-mail: krystyna.bienkowska-szewczyk@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk, 28 czerwca 2021

Recenzja pracy doktorskiej Pani Anety Pluta zatytułowanej:

Badanie wpływu mutacji w regionie LTR oraz genie tax wirusa enzootycznej białaczki bydła na poziom replikacji wirusa u zwierząt zakażonych

Praca doktorska Pani Mgr Anety Pluty dotyczy biologii molekularnej retrowirusa BLV, który od wielu lat jest przedmiotem szerokich i konsekwentnie prowadzonych badań w grupie kierowanej przez P. Profesora dr hab. Jacka Kuźmaka. Praca Pani Mgr Pluty stanowi w mojej ocenie bardzo istotny i wartościowy wkład w ten nurt badawczy.

Dla wirusologów zmienność genetyczna wirusów była zawsze jednym z najważniejszych zagadnień badawczych. Obecnie, od momentu rozpoczęcia pandemii koronawirusa, ten temat nabrał innego wymiaru, nie tylko w publikacjach ale także we wszystkich mediach codziennie są wiadomości o mutacjach i wariantach wirusowych. W tym kontekście tematyka pracy, skupiona na analizie zmienności w rejonie regulacyjnym genomu zwierzęcego wirusa białaczki, nabiera szczególnego znaczenia, pokazując że nawet drobne zmiany w zapisie genetycznym mogą zmieniać przebieg infekcji i rozprzestrzeniania się wirusa. Praca P. Mgr Pluty jest również znakomitą przykładem nawiązania do koncepcji „One Health” czyli trendu w nauce zmierzającego do równoczesnego poznawania chorób zwierząt i ludzi w powiązaniu ze wspólnym, zmieniającym się środowiskiem. Główny model badawczy, wirus białaczki bydła, badany przez Autorkę pod kątem wykrywania mutacji w szczepach izolowanych od zwierząt i analizie molekularnej tych zmian, jest nie tylko patogenem zwierzęcym o niedostatecznie poznanej potencjalnie zakaźnym i chorobotwórczym, lecz także modelem dla pokrewnych retrowirusów ludzkich, a cechy biologiczne tego wirusa są w pracy omawiane i dyskutowane w kontekście cech innych wirusów. W tym aspekcie szczególną wartość

ma pierwsza praca przedstawiona przez doktorantkę w rozprawie doktorskiej, przeglądowy artykuł omawiający mechanizmy regulacyjne wirusa BLV i ludzkiego wirusa T-limfotropowego (HTLV). Jest to pierwsza z czterech publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej Pani Anety Pluty, trzy pozostałe to oryginalne prace eksperymentalne. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych i we wszystkich czterech Doktorantka jest pierwszym Autorem, a także Autorem korespondującym, co świadczy o jej wiodącej roli w powstaniu tych prac. Jest to bardzo dobry dorobek publikacyjny, przy czym te prace nie są jedynymi publikacjami Autorki, w bazie Pubmed jest w sumie 12 publikacji z jej udziałem, a więc można ten dorobek określić jako zdecydowanie wyróżniający się.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską Pani Anety Pluty stanowią spójną całość. Praca przeglądowa, rozpoczynająca ten cykl publikacji, zatytułowana: „Regulation of Expression and Latency in BLV and HTLV”, opublikowana w czasopiśmie „*Viruses*” w 2020 jest obszernym i bardzo dobrym wprowadzeniem i przewodnikiem do biologii molekularnej BLV. Artykuł szczegółowo przedstawia wspólne i specyficzne cechy tych dwóch delta-retrowirusów, porównując je z innymi wirusami z rodziny *Retroviridae*. Jedną z głównych cech wirusów z tej rodziny jest niezwykle złożona sieć oddziaływań z białkami komórkowymi; zaprezentowany artykuł jest bardzo pomocny w zrozumieniu skomplikowanej mapy regulacji transkrypcji i kontroli latencji u delta-retrowirusów. Najważniejszym opisywanym rejonem ważnym dla mechanizmów regulacji ekspresji genów jest rejon LTR i zawarte w nim elementy strukturalne, kluczowe dla interakcji z komórką gospodarza, przede wszystkim poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, które są szczegółowo scharakteryzowane w artykule. Jednak poza charakterystyką regionu LTR, mutacji w nim występujących oraz działaniem białka (transaktywatora) Tax, w artykule można znaleźć wiele informacji dotyczących m.in. badań nad udziałem hormonów w kontroli replikacji BLV, strategii ucieczki wirusa przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz ekspresji i działania wirusowych i komórkowych miRNA i lnc RNA w trakcie infekcji i latencji. W oparciu o charakterystykę molekularnych mechanizmów regulacyjnych, wskazywane są potencjalne cele terapeutyczne, które, na podstawie badań nad bydlęcym wirusem białaczki mogą mieć zastosowanie w terapii zakażeń wirusami ludzkimi, takimi jak wirus HTLV. Artykuł jest wyczerpującym i wartościowym kompendium wiedzy o różnych etapach regulacji cyklu życiowego delta-retrowirusów. Napisanie dobrej pracy tego typu wymaga doświadczenia, szerokiej wiedzy, umiejętności w doborze i selekcji prac źródłowych (literatura do tego artykułu zawiera 255 pozycji!) i zawsze świadczy o dojrzałości naukowej autora.

Następne trzy publikacje dotyczą badań nad zmiennością genetyczną BLV. Podobnie jak ludzki wirus HTLV, wirus białaczki bydła odznacza się stabilną sekwencją genomową, szczególnie w porównaniu z niezwykle dynamiczną zmiennością wirusa HIV. Stosunkowo niska liczba mutacji genomowych BLV i HTLV wynika z innego sposobu transmisji i dokładniejszego kopiowania sekwencji genomu przez odwrotną transkryptazę. Indywidualne cechy mechanizmu zmienności genetycznej wirusa BLV na tle innych retrowirusów powodują, że poszukiwanie i wykrywanie źródeł zmienności wirusa wymaga zastosowania precyzyjnych analiz skupionych na zdefiniowanych fragmentach genomu. Dla większości retrowirusów najwięcej uwagi poświęca się rejonom kodującym białka powierzchniowe, których zmienność jest odpowiedzialna za ucieczkę przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza i trudności w sformułowaniu skutecznych szczepionek. Jednak, jak omówiono m.in. w artykule przeglądowym zamieszczonym w pracy doktorskiej, kluczowe są także wszelkie mutacje w

regionach regulatorowych, decydujących o wydajności replikacji wirusa i przebiegu infekcji. W artykule zatytułowanym: „Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences”, który ukazał się w *Virology Journal* w 2018 r., przedstawione zostały badania skierowane na wykrywanie mutacji w rejonie LTR prowirusowego DNA w 64 próbkach pochodzących w większości z różnych regionów Polski (47 próbek) a także z innych rejonów Europy. próbki pochodziły od naturalnie zakażonych zwierząt, u których infekcję potwierdzono wcześniej metodami serologicznymi. Materiał do badań genetycznych uzyskano poprzez powielanie rejonu LTR BLV techniką PCR w starannie opracowanych warunkach. Sekwencjonowanie (wykonane komercyjnie) pozwoliło na wykrycie 97 mutacji, z których część powtarzała się w różnych próbkach, najczęściej w rejonie U3. Szczegółowa analiza różnych wariantów sekwencji w rejonie LTR wskazała na korelację ze zdefiniowanymi genotypami i podgrupami wirusa BLV, przy czym niektóre z nich miały wyraźny związek z pochodzeniem geograficznym badanych próbek. Zaobserwowano także różnice w czasie pojawiania się niektórych wariantów, co może sugerować trend w ewolucji wirusa, przyczyniający się do pojawiania się nowych szczepów w stadach wolnych od zakażeń BLV. Powiązanie określonego podtypu genetycznego wirusa z występowaniem w określonym rejonie geograficznym ma zasadnicze znaczenie nie tylko dla indywidualnej strategii/polityki zwalczania zakażeń danym wirusem, ale także dla poznawania mechanizmów ewolucyjnych oraz śledzenia sposobów i dynamiki rozprzestrzeniania się wirusa, więc wyniki uzyskane w tej pracy mają wartość zarówno poznawczą jak i epidemiologiczną.

Zgodnie z wiedzą o stosunkowej stabilności sekwencji genomu BLV, ogólna liczba wykrytych poliformizmów w badanych próbkach nie była wysoka, ale analiza sekwencji wykazała, że niektóre z nich były zlokalizowane w miejscach wiązania czynników transkrypcyjnych, co może się przekładać na efektywność ekspresji genów wirusa. W następnej pracy zaprezentowanej w rozprawie doktorskiej, Doktorantka skupiła się na analizie tego zagadnienia, przenosząc informacje uzyskane z zakażeń terenowych do obszaru szczegółowych badań molekularnych.

W tej pracy, opublikowanej w 2020 r. w czasopiśmie „*Pathogens*” („Effects of naturally occurring mutations in bovine leukemia virus 5'-LTR and tax gene on viral transcriptional activity”), Autorka podjęła próbę analizy związku mutacji zidentyfikowanych w genomie BLV z funkcjami rejonu LTR i białka Tax. Opracowano modelowy układ badawczy z zastosowaniem lucyferazy jako genu reporterowego, którego ekspresję kontrolowano - w różnych kombinacjach - za pomocą sekwencji LTR i transaktywatora Tax, przeniesionych do odpowiednich wektorów plazmidowych. Sekwencje, w których wykryto i przanalizowano szereg mutacji, pochodziły z 15 wariantów wyselekcjonowanych spośród 106 próbek uzyskanych od zwierząt zakażonych BLV. W ten sposób Doktorantce udało się wykazać, że niektóre poliformizmy obecne w sekwencji LTR i w genie Tax w istotny sposób wpływają na poziom ekspresji testowanego genu, przy czym zaobserwowano wyłącznie podwyższenie tego poziomu, nie wykryto odwrotnego wpływu badanych mutacji. Raporty na temat podobnego wpływu mutacji punktowych w LTR były publikowane dla m.in. lentiwirusów HIV i wirusa Maedi-Visna, co wskazuje na możliwy wspólny mechanizm regulacji wpływający na patogenezę retrowirusów. Za bardzo interesujące uważam wyniki dotyczące analizy sekwencji Tax, białka, którego wielofunkcyjne działanie, związane z aktywacją genów wirusowych i komórkowych oraz onkogenezą delta-retrowirusów nie jest dla BLV dobrze poznane. Na temat mechanizmu działania odpowiednika Tax u wirusa HIV, transaktywatora TAT, opublikowano ponad 5000 prac; dla białka

Tax wirusa BLV tylko ok. 160, a niewątpliwie jest to białko nie tylko kluczowe dla replikacji wirusa ale także dla mechanizmu powstawania białaczki u bydła. Zwraca uwagę bardzo zaawansowana metodyka zastosowana w tej pracy, od metod z zakresu biologii komórki do technik molekularnych i bioinformatycznych. Doktorantka wykazała też biegłość w analizach statystycznych i opracowywaniu własnych protokołów eksperymentalnych, np. dotyczących metod PCR.

W związku z wynikami tej publikacji mam 2 pytania:

ponieważ niektóre z wykrytych mutacji dotyczyły oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi, które mogą być komórkowo i gatunkowo specyficzne, czy istnieje możliwość, że przeprowadzenie podobnych analiz w komórkach typowego gospodarza (krowich) mogłyby się różnić od wyników uzyskane w komórkach HeLa?

Czy znane są doświadczenia typu „swap” (wymiany) białka Tax pomiędzy HTLV i BLV?

W ostatniej pracy włączonej do rozprawy doktorskiej, opublikowanej również w czasopiśmie „*Pathogens*” (Analysis of nucleotide sequence of Tax, miRNA and LTR of bovine leukemia virus in cattle with different levels of persistent lymphocytosis in Russia) w 2021, Doktorantka kontynuowała analizy genetyczne, skupiając się na poszukiwaniu związku wykrytych zmian z obrazem klinicznym choroby (poziomym limfocytozy). Materiałem do badań w tej pracy była kolekcja próbek zebranych od zakażonych zwierząt w Rosji, a analiza sekwencji objęła prócz rejonu LTR i Tax także sekwencje kodujące wirusowe miRNA. W cyklu życiowym wirusa BLV wytwarzane jest znacznie więcej miRNA niż u wielu innych retrowirusów, ale biologiczne znaczenie i funkcje tych cząsteczek nie są dokładnie poznane, choć opublikowano dane pokazujące ich wpływ na transformację komórek i na modulację odpowiedzi immunologicznej. Dane uzyskane w pracy P. Mgr Pluty dostarczają nowych informacji na temat roli miRNA w patogenezie zakażeń BLV, przy czym fakt, że badane sekwencje pochodziły od zwierząt o znanym obrazie klinicznym choroby, nadaje im dodatkową wartość.

We wszystkich badanych sekwencjach po zaobserwowaniu występowania różnego rodzaju mutacji, poszukiwano korelacji pomiędzy poszczególnymi poliformizmami, przynależnością do określonych genotypów, liczbą kopii prowirusowego DNA i liczbą leukocytów; takie analizy prowadziły do wyodrębnienia wariantów o charakterystycznych cechach. Interpretacja tych zależności jest złożona, jednak w tej pracy potwierdzono pokazany we wcześniejszych publikacjach wpływ zmienności genetycznej, szczególnie w rejonie długich powtórzeń końcowych, na replikację BLV i wskazano na związek tego zjawiska z przebiegiem i skutkami infekcji.

Wszystkie prace włączone do rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach o znaczącym wskaźniku oddziaływania (IF: 2,37; 3,02; 3,8), bardzo często cytowanych w badaniach z obszaru wirusologii. Recenzenci tych czasopism na pewno bardzo szczegółowo analizowali wyniki przedstawione w zamieszczonych w rozprawie publikacjach, ja chciałabym zwrócić uwagę na znaczenie tych wyników i sposób ich przedstawienia. Prace włączone do rozprawy P. Mgr Pluty tworzą spójną całość, składającą się tematycznie, tworząc cykl badań ujmujących zagadnienie zmienności genetycznej związanej z rejonami TLR i Tax wirusa BLV w kilku aspektach: identyfikacja mutacji i poliformizmów, ich analiza porównawcza, związek z regulacją poziomu ekspresji i replikacji wirusa oraz z obrazem klinicznym choroby. Powiązanie pracy o profilu weterynaryjnym, związanym z diagnostyką i epidemiologią zakażeń wirusowych z jednoczesnym przeniesieniem wyników tych badań do analiz molekularnych i bioinformatycznych można by określić jako wzorcowe,

wielopłaszczyznowe podejście do zagadnienia naukowego z wykorzystaniem możliwości, jakie daje model zwierzęcy oraz dostępność izolatów terenowych z różnych rejonów geograficznych. Sama rozprawa została przygotowana niezwykle starannie, zwraca uwagę rzetelnością, systematycznością i kompletnością opisu wyników. Pracę rozpoczyna obszerny wstęp, opisujący wirusa białaczki bydła, charakteryzujący różne postaci wywoływanej przez niego choroby oraz zagadnienia związane z diagnostyką i zwalczaniem BLV. Scharakteryzowane są poszczególne geny i białka BLV, cykl życiowy, patogeneza i stan wiedzy dotyczącej zmienności genetycznej tego wirusa. Jedyny element, którego trochę brakuje w tym tekście, to ilustracja, która pokazywałaby cały genom BLV i schemat ekspresji genów, łącznie z opisem etapów procesu „splicing”, czego nie ma też w pracy przeglądowej (pokazane są tylko rejony LTR), a co byłoby pomocne w charakterystyce ekspresji rejonu pX. Cel pracy został dokładnie przedstawiony, a dla ułatwienia zapoznania się z artykułami składającymi się na rozprawę doktorską, Autorka zamieściła też dokładny opis każdej z prac eksperymentalnych, przedstawiający główne wyniki i metodykę zastosowaną w pracy, a także cel i uzasadnienie podjętych badań. W rozprawie zamieszczono też streszczenie w języku polskim i angielskim oraz podsumowanie głównych wniosków. Bardzo pomocny przy czytaniu pracy jest obszerny i dokładny spis skrótów, co obrazuje ogólną sumienność Autorki przy przygotowaniu rozprawy. Praca napisana jest bardzo poprawnym językiem, przejrzysto sformułowana, starannie zredagowana, do publikacji dołączono komplet wszystkich szczegółowych danych uzupełniających (supplementary data), zawierający sekwencje, porównania sekwencji, opis próbek klinicznych i wiele innych danych - wszystko to ułatwia pracę recenzenta, ale także stanowi w moim odczuciu odzwierciedlenie podejścia Autorki do problemu naukowego i jej osobowości jako samodzielnej badaczki. Literatura jest starannie dobrana, nie zauważyłam też błędów edytorskich ani drukarskich. Właściwie tylko w tekście pierwszej publikacji znalazłam małe, raczej zabawne niedopatrzenie, w zdaniu: *Table 2 shows average genetic distances estimated for the 64 sequences obtained in this study, as well as 17 sequences from other studies (insert reference here)* zapewne miał się w tym miejscu znaleźć odnośnik do pozycji literaturowej!

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską powstały we współpracy z naukowcami z kilku krajów, z Kanady, Belgii, Argentyny, ale jak wcześniej wspomniałam, we wszystkich prezentowanych publikacjach Pani Mgr Pluta jest wiodącym autorem, co niewątpliwie świadczy o jej umiejętności współpracy w ramach międzynarodowych projektów i stanowi dobrą prognozę dla dalszego rozwoju naukowego Doktorantki.

W trakcie obrony chciałabym prosić Doktorantkę o krótkie przedyskutowanie dwóch zagadnień:

- W rozprawie często pojawia się termin „latencja”, w wirusologii termin ten jest używany głównie dla określenia stanu utajenia u herpeswirusów, ale także używa się go przy określaniu etapu rozwoju wirusa w komórce; jak należy rozumieć latencję retrowirusów? czy w czasie obrony Doktorantka mogłaby zinterpretować różne znaczenia tego terminu?
- Jakie jest zdanie Doktorantki na temat hipotez o udziale BLV w powstawaniu nowotworów piersi u ludzi, o której wspomina w rozprawie doktorskiej? Czy zgromadzono na ten temat przekonujące dane?

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam pracę doktorską, różnorodny warsztat badawczy i cały dorobek naukowy Pani Mgr Pluty. Praca Pani Mgr Anety Pluta w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, wnioskuję więc do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach o dopuszczenie Pani Mgr Pluty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na bardzo wysoką wartość naukową pracy i sposób jej opublikowania wnioskuję również o wyróżnienie pracy.

Krzysztof Potemski - Sędzia