

Olsztyn, 25 czerwca 2021 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej
i Administracji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anety Pluty pt. „Badanie wpływu mutacji w regionie LTR oraz genie *tax* wirusa enzootycznej białaczki bydła na poziom replikacji wirusa u zwierząt zakażonych”.

Podstawą prawną przygotowania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dn. 13 grudnia 2017 r. i pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dn. 28 kwietnia 2021 r.

Rozprawa doktorska mgr Anety Pluta została przygotowana w Zakładzie Biochemii i Zakładzie Analiz Omicznych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem Promotora, prof. dr hab. Jacka Kuźmaka i Promotor pomocniczej, dr hab. Marzeny Rola-Łuszczak.

Rozprawa doktorska oparta jest o cztery opublikowane recenzowane artykuły naukowe, w których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. Pluta A, Jaworski JP, Douville RN. Regulation of expression and latency in BLV and HTLV. *Viruses* 2020 (praca przeglądowa). IF 3,816, MNiSW – 100.
2. Pluta A, Rola-Łuszczak M, Douville RN, Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphism in regulatory sequences. *Virology Journal* 2018 (praca oryginalna). IF 2,37, MNiSW – 20.
3. Pluta A, Willems L, Douville RN, Kuźmak J. Effects of naturally occurring mutations in bovine leukemia virus 5'-LTR and *tax* gene on viral transcriptional activity. *Pathogens* 2020 (praca oryginalna). IF 3,018, MNiSW – 100.
4. Pluta A, Blazhko NV, Ngirande C, Joris T, Willems L, Kuźmak J. Analysis of nucleotide sequence of *Tax*, miRNA and LTR of bovine leukemia virus in cattle with different levels of persistent lymphocytosis in Russia. *Pathogens* 2021 (praca oryginalna). IF 3,018, MNiSW – 100.

Zawartość merytoryczna publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska jest zgodna z tytułem pracy doktorskiej, w związku z czym rozprawa doktorska spełnia formalny warunek polegający na spójności tematycznej prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Należy zaznaczyć, że 3 z 4 publikacji zostało wydrukowanych w bardzo dobrych czasopismach o wysokim wskaźniku IF i wysokiej punktacji MNiSW. Łączny IF prac wchodzących w skład

rozprawy doktorskiej wynosi 12,22, a łączna liczba punktów MNiSW wynosi 320. Prace Doktorantki zostały opublikowane z udziałem autorów zagranicznych pracujących w renomowanych ośrodkach naukowych.

Zarówno informacja zamieszczona w pracach oryginalnych jak i dołączone do dokumentacji przesłanej razem z egzemplarzem rozprawy doktorskiej oświadczenia współautorów publikacji wyraźnie wskazują, że Doktorantka odegrała wiodącą rolę w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań oraz opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów prac. W tym miejscu nasuwa się tylko uwaga, że (moim zdaniem) oświadczenia te powinny zostać włączone do monografii, a nie występować w postaci osobnych dokumentów. Jeśli w monografii są zamieszczone oświadczenia Doktorantki i Promotorów, to również oświadczenia współautorów, kluczowe przecież dla oceny rozprawy doktorskiej, powinny się tam znaleźć.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch głównych części: polskojęzycznej części zawierającej formalne elementy rozprawy doktorskiej, w której omówione zostały szeroko zagadnienia związane z pracą doktorską oraz części zawierającej teksty publikacji w języku angielskim będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej wzbogacone o obszernie materiały dodatkowe (Supplementary Materials), które są dostępne w wersjach online publikacji. Bogactwo i objętość tych materiałów dodatkowych budzi moje duże uznanie.

Ocena rozprawy doktorskiej opartej o opublikowane, szczególnie w dobrych czasopismach naukowych, artykuły jest zawsze trudniejsza niż ocena niepublikowanej monografii. Artykuły wchodzące w skład niniejszej rozprawy zostały poddane wnikliwej i krytycznej ocenie recenzentów zarówno co do znaczenia tematyki badawczej, wykorzystanej metodologii badań jak i uzyskanych wyników. Jeśli nawet zostaną w nich znalezione jakieś mankamenty, to ich poprawienie jest już, z reguły, niemożliwe. Recenzentowi takiej rozprawy doktorskiej pozostaje zaakceptować przedstawione publikacje i wypowiedzieć się tylko o całościach badań Doktorantki.

Pierwsza publikacja (praca Nr. 1) jest pracą przeglądową uwzględniającą 255 pozycji literatury i zawierającą bardzo szeroki i głęboki przegląd literatury dotyczącej zagadnień regulacji ekspresji i latencji dwóch deltaretrowirusów, wirusa BLV i spokrewnionego z nim wirusa HTLV-1 odpowiedzialnego za występowanie u człowieka agresywnej i nieuleczalnej formy białaczki pochodzącej z limfocytów (ATL) oraz ciężkich zaburzeń neurologicznych. Oba wirusy wykazują skłonność do zakażeń bezobjawowych i występowania w stanie latencji. Praca ta jest doskonałym wstępem do zagadnień będących podstawą prac oryginalnych. W pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat mechanizmów wyciszenia i regulacji ekspresji tych deltaretrowirusowych prowirusów w porównaniu do innych retrowirusów. W pracy przedstawiono mechanizmy regulacji transkrypcji, ale także regulacji epigenetycznych, rolę motywów obecnych w sekwencjach LTR i rolę ich polimorfizmu w regulacji latencji, rolę sekwencji wzmacniających i kodowanych przez genom wirusowy białek aktywujących, rolę regulacji hormonalnych oraz rolę niekodujących kwasów rybonukleinowych w regulacji ekspresji wirusa BLV i HTLV-1. We wspomnianej pracy przedyskutowano również zagadnienie znaczenia wiedzy na temat mechanizmów regulacji ekspresji i latencji dla efektywniejszego zwalczania skutków zakażeń tymi wirusami. Z nieznanymi recenzentowi powodów omówienia

tej pracy nie zamieszczono w polskojęzycznej części rozprawy doktorskiej, gdzie zamieszczono skrótowe omówienia prac oryginalnych.

Pozostałe prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są już pracami oryginalnymi, odzwierciedlającymi badania przeprowadzone przez Doktorantkę.

W pracy Nr. 2 Doktorantka podjęła się zbadania polimorfizmu i relacji filogenetycznych sekwencji LTR terenowych izolatów BLV izolowanych od zakażonego bydła w krajach Europy Środkowo-Wschodniej. Próbki pochodziły z polskich stad bydła, w których dochodziło do nowych zakażeń w latach 2013-2016, próbki pochodzące z materiału zebranego wcześniej w Polsce (rok 2009) oraz próbki pochodzące od stad, w których BLV występował endemicznie w Mołdawii, Chorwacji, na Ukrainie i w Rosji. Dokonana analiza molekularna była więc oparta na bardzo zróżnicowanym materiale pozwalającym na dokonanie badań zależności czasowych i terytorialnych, jeśli chodzi o zmienność sekwencji LTR. Doktorantka stwierdziła, że jest to pierwszy w Europie przypadek wykonania takich badań w Europie na tak szerokim materiale (ogółem 64 izolaty). Zmienność analizowano w odniesieniu do sekwencji izolatów referencyjnych (17 izolatów). Doktorantka uzyskała dane o polimorfizmie analizowanych sekwencji świadczące o możliwości ewolucji wirusa w kierunku szczepów o odmiennych cech biologicznych oraz o możliwej presji selekcyjnej. Doktorantka nie uzyskała jednakże dowodów na korelację pomiędzy zmiennością badanych sekwencji a poziomem replikacji wirusa. W pracy Doktorantka starannie przedyskutowała swoje wyniki na tle dostępnego piśmiennictwa a spis literatury liczy 45 pozycji.

W pracy Nr. 3 Doktorantka podjęła się badań eksperymentalnych nad rolą polimorfizmu sekwencji LTR i genu tax w regulacji ekspresji prowirusowego genomu. Badania te Doktorantka uzasadniła prawdopodobnym znaczeniem szczepów wirusa BLV o obniżonej ekspresji dla utrzymywania się zakażeń latentnych i, związanym z tym, pojawianiem się nowych przypadków białaczki bydła w stadach wolnych od tej choroby. Doktorantka postanowiła zbadać wpływ polimorfizmu sekwencji ważnych dla replikacji wirusa na efektywność tego procesu. W swojej pracy Doktorantka analizowała polimorfizm izolatów BLV uzyskanych od krów ze stad uznanych za wolne od BLV i przyporządkowała je do grup na podstawie analizy filogenetycznej. Następnie stworzyła szereg konstruktów genetycznych zawierających wybrane warianty sekwencji LTR (15 wariantów) i genu tax (15 wariantów). Warto zaznaczyć, że do uzyskania tych sekwencji Doktorantka zastosowała opracowana przez siebie metodę nested PCR. Uzyskane konstrukty posłużyły do przeprowadzenia badań funkcjonalnych na komórkach HeLa transformowanych plazmidami zawierającym geny lucyferazy oraz plazmidami zawierającymi badane warianty sekwencji LTR i genu tax. Poziom ekspresji genu reporterowego w zależności od badanych sekwencji LTR i tax badano na podstawie poziomu luminescencji lucyferazy w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego uwidacznianej poziomem luminescencji lucyferazy referencyjnej. Doktorantka stwierdziła, że wysoki poziom aktywności lucyferazy reporterowej występował w przypadku wariantów sekwencji LTR i tax z próbek, gdzie określono wysoki poziom prowirusowego DNA. Doktorantka stwierdziła również, że wszystkie warianty sekwencyjne generowały poziom aktywności lucyferazy większy, lub równy, w stosunku do genu referencyjnego, a żaden nie był odpowiedzialny za obniżenie poziomu ekspresji genu reporterowego w stosunku do

wirusa referencyjnego. Na tej podstawie powzięła przypuszczenie, że pojawianie się nowych przypadków białaczki w stadach wolnych od BLV może być spowodowane większą, a nie mniejszą (jak pierwotnie przypuszczano) aktywnością replikacyjną wariantów wirusa. Dyskusja została oparta o 78 publikacji.

W pracy Nr. 4 Doktorantka badała związek pomiędzy parametrami hematologicznymi określającymi poziom przewlekłej leukocytozy a polimorfizmem regionów LTR i tax szczepów BLV pochodzących od bydła ze stad o wysokiej seroprewalencji zlokalizowanych na terenie Rosji. W celu określenia liczby kopii prowirusa Doktorantka zastosowała opracowaną przez siebie metodę określenia liczby kopii genu referencyjnego H3F3A. Doktorantka wykazała istotny związek pomiędzy jedną z mutacji wykrytych w sekwencji LTR a wysoką przewlekłą limfocytozą stwierdzoną u badanej sztuki bydła. Doktorantka stwierdziła również, że niektóre mutacje wpływają na wyższy poziom replikacji wariantu wirusa w stosunku do wariantu referencyjnego. Nie stwierdziła natomiast, żeby jakakolwiek stwierdzona przez siebie mutacja wpływała na obniżenie poziomu replikacji w stosunku do wariantu referencyjnego. W tej pracy, z kolei, lista cytowanej literatury liczy 74 pozycje.

We wszystkich pracach oryginalnych na szczególne uznanie zasługuje właściwie dobrana metodologia oparta o nowoczesne metody badawcze. Nawet biorąc pod uwagę, że etap sekwencjonowania przeprowadzany był przez firmę komercyjnie świadczącą takie usługi, należy docenić niezwykle duży nakład pracy laboratoryjnej, którą wykonała Doktorantka. Szczególnie w pracy Nr. 3 zastosowane metody eksperymentalne mające na celu określenie wpływu polimorfizmu sekwencji LTR i genu tax na aktywność transkrypcyjną prowirusa można określić jako "state of the art".

Należy podkreślić również, że wszystkie prace wchodzące w skład pracy doktorskiej są pracami bardzo obszernymi, których lektura utwierdza recenzenta w przeświadczeniu o wysokich umiejętnościach naukowych i technicznych Doktorantki oraz o umiejętności krytycznej analizy uzyskanych danych doświadczalnych. Doktorantka bardzo trafnie przedyskutowała uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Rozdziały publikacji poświęcone dyskusji wyników są zawsze obszerne oraz konsekwentnie napisane. Wynika z nich, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę w temacie prowadzonych badań połączoną z umiejętnością analizy własnych wyników i wyników innych autorów.

Doktorantka postawiła sobie 3 cele:

1. Analiza molekularna i filogenetyczna sekwencji LTR izolatów BLV będących przyczyną zakażeń nowopojawiających się oraz endemicznych.
2. Wykazanie związku między określonymi mutacjami w sekwencjach LTR i genie białka Tax a aktywnością transkrypcyjną prowirusa BLV w warunkach *in vitro*, przy czym sekwencje pochodziły z wirusów powodujących, jak wspomniano wyżej, zakażenia nowopojawiające się.
3. Zbadanie korelacji między mutacjami w sekwencjach LTR i tax a poziomem prowirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej.

Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie prowadzenia badań Doktorantka wyciągnęła 7 syntetycznych wniosków. Wnioski wynikają ze starannej analizy uzyskanych wyników i w

sposób uproszczony przedstawiają wyniki uzyskanych badań. Trzeba przyznać, że bardzo obszerne i szczegółowe wyniki badań przedstawiono w publikacjach oryginalnych w sposób dosyć skomplikowany i niełatwy do prześledzenia dla kogoś kto nie zajmuje się na co dzień tematyką związaną z tematem rozprawy. W publikacjach oryginalnych wnioski są, niestety, sformułowane w sposób bardzo ogólny i lakoniczny. Analiza trafności sformułowanych w rozprawie wniosków na podstawie prac oryginalnych nie była sprawą łatwą, ale nie można mieć do nich większych zastrzeżeń. Mam jednak wrażenie, że Doktorantka czasami się tutaj trochę gubi. Należy zwrócić uwagę, na przykład, na Wniosek 5, w którym Doktorantka stwierdza, że wykryła kilka znaczących polimorfizmów związanych tylko z niską albo tylko z wysoką przewlekłą limfocytozą, podczas gdy w publikacji oryginalnej (praca Nr. 4) stwierdzono, że nie udało się znaleźć wyraźnej korelacji pomiędzy badanymi wariantami BLV a poziomem limfocytozy, stwierdzono natomiast geograficzną segregację takich wariantów.

Należy zaznaczyć, że wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę nie zawsze są zgodne z postawionymi na początku hipotezami badawczymi, ale tym większe jest znaczenie przeprowadzonych przez nią badań. Jedną z głównych hipotez badawczych Doktorantki zakładała, że pojawiające się w stadach wolnych od BLV nowe przypadki zakażeń mogą być spowodowane występowaniem wariantów wirusa o silnie zmniejszonej ekspresji genomu prowirusowego, natomiast w swoich badaniach Doktorantka nie stwierdziła wariantów BLV o poziomie replikacji niższym od poziomu wybranego szczepu referencyjnego. Doktorantka znalazła natomiast warianty wykazujące wyższy poziom replikacji niż szczep referencyjny, więc należałoby teraz wyjaśnić wpływ takich wariantów na nowopojawiające się zakażenia. Umiejętność trafnej interpretacji nieoczekiwanych wyników oznacza, że porusza się Ona dobrze w obszarze jeszcze nie do końca zbadanym, a uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę do zagadnienia regulacji replikacji wirusa BLV i jego zdolności do wywoływania latentnych i jawnych zakażeń.

Integralną częścią pracy doktorskiej jest opracowana w języku polskim kompilacja publikacji wchodzących w skład rozprawy. Opatrzona jest ona obszernym wstępem wprowadzającym czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań wykonanych w niniejszej pracy. Wstęp obszernie opisuje biologię wirusa BLV oraz wywoływana przez niego enzootyczną białaczkę bydła. Doktorantka dołączyła również bardzo obszerny wykaz wykorzystywanych skrótów, co bardzo ułatwia zrozumienie tekstu. Należy zaznaczyć, że współczesna biologia i genetyka molekularna, tak jak inne dziedziny nauk biomedycznych, oparta jest w ogromnym stopniu na akronimach, które z jednej strony ułatwiają i przyspieszają komunikację, ale z drugiej strony wymagają ich dobrej znajomości.

Co prawda pierwsza z prac wchodzących w skład rozprawy nie jest ujęta w syntetycznym opracowaniu, ale wiedzę na temat biologii wirusa zapewnia czytelnikowi, wspomniany już, bardzo obszerny Wstęp. Następne prace są w sposób syntetyczny, aczkolwiek obszerny, streszczone, z podziałem na zwyczajowe bloki składowe pracy oryginalnej.

Tutaj należy zwrócić niewielką uwagę krytyczną. Tekst w języku polskim w niektórych miejscach wymagałby poprawek stylistycznych i językowych, chociaż w niczym nie umniejsza to jego wartości naukowej.

Po wspomnianej już sekcji dotyczącej wniosków, oraz streszczeń w języku polskim i angielskim znajduje się spis literatury wykorzystanej w polskojęzycznej, syntetycznej części rozprawy. Lista publikacji liczy 107 pozycji i wszystkie z nich należy określić jako bardzo dobrze dobrane. Na podkreślenie zasługuje to szczególnie w dzisiejszych czasach, gdy swobodny dostęp do elektronicznych baz danych skłania często autorów do zamieszczania nadmiernej liczby cytowań. Ograniczenie liczby cytowanych prac świadczy z kolei o umiejętności ich krytycznej oceny i wyłowienia tych najważniejszych.

Tutaj należy zgłosić pewne zastrzeżenia do polskojęzycznego streszczenia pracy Nr. 3 poświęconej badaniom, w zasadzie eksperymentalnym, nad wpływem zmienności sekwencji LTR i genu tax na poziom ekspresji prowirusa BLV. Badania były wykonane bardzo nowoczesnymi technikami, które są szczegółowo omówione w pracy źródłowej. W odróżnieniu od pracy źródłowej metodyka w polskojęzycznym streszczeniu omówiona jest bardzo niedokładnie i skrótowo. W zasadzie, na podstawie tego streszczenia trudno byłoby się zorientować co do zastosowanej metodyki.

Inne drobne zastrzeżenia dotyczące pracy to np. brak określenia typu aparatu do PCR w pracy oryginalnej Nr. 3 i jej polskojęzycznym streszczeniu, czy rozbieżność pomiędzy liczbą próbek krwi w pracy oryginalnej Nr. 4 (44) i w jej polskojęzycznym streszczeniu (48).

Przedstawione powyżej uwagi krytycznie w niczym nie zmniejszają wysokiej merytorycznej oceny pracy doktorskiej. Uważam, że stanowi ona bardzo znaczący wkład w badania nad biologią wirusa enzootycznej białaczki bydła. Podsumowując, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy „O tytule naukowym i stopniach naukowych: z dnia 14 marca 2003 r. (w związku z art. 179 Ustawy „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 3 lipca 2018 r.) i wnoszę do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie mgr Anety Pluty do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, chciałbym wystąpić o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na jej wysoką wartość naukową. Praca jest wykonana bardzo nowoczesnymi metodami i wnosi dużo do wiedzy na temat molekularnych mechanizmów kontroli replikacji wirusa. Moje szczególne uznanie budzi praca Nr. 3, gdzie Doktorantka wykonała szereg badań eksperymentalnych mających na celu określenie wpływu polimorfizmu sekwencji LTR i genu tax na ekspresję prowirusa BLV. Badania te wykraczają w znacznym stopniu poza sprawy ściśle związane z diagnostyką i są świetnym przykładem badań naukowych, na granicy badań podstawowych, na bardzo wysokim poziomie. Doktorantka wykroczyła poza badania analityczne i postanowiła eksperymentalnie wyjaśnić wpływ wykrytej przez Nią zmienności na replikację wirusa enzootycznej białaczki bydła.

KIEROWNIK KATEDRY
Krzysztof Wąsowicz
prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz