



dr hab. n. med. Rafał Bobiński, Prof. ATH
Kierownik Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej
Wydział Nauk o Zdrowiu

Bielsko-Biała, 16.04.2021

Recenzja

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna mgr Emilii Morawiec pt. "Profil ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV."

Patomechanizmy ekspresji genów są jednym z wiodących i pełnych sukcesów problemów badawczych Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej Wydziału Nauk Farmaceutycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Doprowadziły one do wyjaśnienia mechanizmu molekularnego szeregu chorób. Wyzwaniem ostatnich lat, zwłaszcza w okresie trwającej pandemii SARS-CoV-2, jest znalezienie skutecznej metody leczenia chorób wywołanych wirusami. Niestety różnorodność świata wirusów oraz różnorodność ich materiału genetycznego determinują duże możliwości rekombinacyjne i szybkie mutacje skutkujące pojawianiem się nowych wariantów o nieznanej zakaźności jak np. SARS czy Nipah. Poszukiwanie, zatem, metod blokowania replikacji wirusów infekujących komórki jest jednym z kluczowych wyzwań światowej nauki. Jednym ze sposobów jest wykorzystanie endogennych czynników restrykcyjnych powstających w komórce w odpowiedzi na infekcję wirusową. Czynniki te hamują lub zmniejszają poziom ekspresji wirusów na różnym etapie infekcji, zaburzając wirusowy cykl replikacyjny. Kluczowe punkty uchwytu działania czynników restrykcyjnych to blokowanie wnikania wirusa do komórki, blokowanie odplaszczania się wirusa, inhibicja enzymów replikacyjnych (w tym odwrotnej transkryptazy) czy hamowanie enkapsydacji i uwalniania się wirusa z komórki. Dokładne poznanie mechanizmów działania i roli czynników restrykcyjnych w procesie namnażania wirusa wymaga jednak dalszych badań np. typujących geny różnicujące komórki kodujące czynniki restrykcyjne, zaangażowane w blokowanie poszczególnych etapów cyklu replikacyjnego. Jest to szczególnie ważne w badaniach nad podatnością na zakażenie retrowirusami komórek biorcy, po ksenotransplantacji – a w konkretnym przypadku niniejszej pracy,



podatnością ludzkich fibroblastów skóry na zakażenie retrowirusami PERV w aspekcie ksenotransplantacji skóry świńskiej u pacjentów wymagających takiego zabiegu.

Odpowiednio zaprojektowana i wdrożona diagnostyka molekularna jest strategicznym narzędziem do walki z wirusami. Stąd też uważam, że podjęcie przez mgr Emilię Morawiec problematyki oceny ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV, jest wyborem bardzo oryginalnym, uzasadnionym potrzebami poznawczymi i aplikacyjnymi, w pełni nadającym się na tematykę pracy doktorskiej.

Przedmiotem badań były epitelialne komórki nerki świńskiej PK15, będące donorem wirusów PERV-A i PERV-B oraz niestymulowane i stymulowane lipopolisacharydem bakteryjnym prawidłowe ludzkie fibroblasty skóry (NHDF). Infekcyjność PERV analizowano w układzie kokultury. Do hodowli komórek linii NHDF (stymulowanych [NL] i niestymulowanych LPS [N]), dołączone zostały komórki linii PK15. Po pięciu dniach, kokultury rozłączano i następnie kontynuowano hodowlę monokultury NHDF przez jeden dzień. Otrzymane osady komórkowe poddano ekstrakcji DNA i RNA a następnie przeprowadzono detekcję analizowanych genów wirusowych metodą qPCR i RTqPCR. Analizę screeningową profilu ekspresji genów związanych z obroną komórkową przeprowadzono za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A 2.0 Affymetrix. Także metodą mikromacierzy wyznaczano profil miRNA, natomiast walidację wyników mikromacierzy HGU133A 2.0 przeprowadzono metodą RTqPCR. Następnie przeprowadzono selekcję sond do analizy mikromacierzowej. Pulę sond do detekcji mRNA genów związanych z systemem obrony przeciwwirusowej komórek typowano wieloetapowo w oparciu różne bazy i dane literaturowe. Otrzymałą pulę genów poddano ostatecznej analizie w programie Metascape, w celu potwierdzenia czy wszystkie wytypowane cząsteczki są zaangażowane w proces obrony komórki przed infekcją.

W modelowym układzie hodowli in vitro, ustalonym dla linii ludzkich komórek NHDF eksponowanych na zakażenie wirusami uwalnianymi z komórek PK15 (PERV-A i PERV-B), otrzymywano powtarzalne wyniki oznaczeń kopii DNA. Obecność PERV-A DNA w ludzkich fibroblastach została potwierdzona w hodowlach NP i NLP. DNA PERV-B nie został wykryty w grupie NP, ani w NLP. W hodowlach kontrolnych monokultury NHDF [N] i monokultury NHDF eksponowanej na LPS [NL] nie wykryto DNA żadnego z subtypów PERV, co wyklucza ewentualną kontaminację krzyżową prowadzonej hodowli. W żadnym z badanych układów hodowlanych nie zamplifikowano

świńskiego mtDNA, co z kolei świadczy o tym, że wykryte DNA PERV pochodzi wyłącznie z zakażonych komórek NHDF.

W badanych układach modelowych wykryto mRNA PERV-A i PERV-B, przy czym kopii mRNA PERV-A było zdecydowanie więcej, niż w PERV-B, zarówno w grupie NP (monoinfekcja wirusowa), jak i NLP (koinfekcja bakteryjno-wirusowa). Liczba kopii mRNA obu podtypów PERV była wyższa w grupie NLP. W hodowlach kontrolnych N i NL nie wykryto mRNA żadnego z subtypów PERV oraz nie amplifikowano świńskiego GAPDH, co oznacza, że wykryte RNA PERV pochodzi wyłącznie z zakażonych komórek NHDF. Autorka, w toku selekcji sond z różnych baz, po usunięciu zdublowanych wariantów genów otrzymała łącznie 182 ID mRNA, odpowiadające genom kodującym cząsteczki zaangażowane w proces obrony komórki przed infekcją wirusową. Badania wykazały także, iż ekspozycja komórek NHDF w grupie NLP doprowadziła do istotnego statystycznie obniżenia ekspresji genów HuPAR-1 i TFAP-2C w porównaniu z grupami NL, NP i grupą kontrolną. Z kolei, spośród analizowanych mRNA dla czynników restrykcyjnych, w 93 przypadkach obserwowano znaczące różnice w ekspresji. Szczegółowa analiza profilu ekspresji genów kodujących białka motywu trójstronnego TRIM wykazała obniżoną ekspresję TRIM 14 dla monoinfekcji wirusowej (NP). Ekspresja TRIM 2 i TRIM 22 była podwyższona we wszystkich hodowlach badanych (NP, NL i NLP).

Uzyskane wyniki wskazują, że wbudowane w genom świński wirusy PERV mogą się uwalniać i integrować z genomem zakażonych komórek. Aktywacja procesów prozapalnych przez LPS zmniejsza integrację prowirusowego DNA w genomie komórek zakażonych, co jest prawdopodobnie spowodowane pobudzeniem ekspresji czynników restrykcyjnych.

Wnioski wyciągnięte przez doktorantkę są w pełni zasadne, poparte materiałem doświadczalnym i wnikliwym przeglądem piśmiennictwa z tego zakresu. Bogaty materiał doświadczalny, poparty wcześniejszymi publikacjami Zespołu oraz cytowanym piśmiennictwem pozwala wnioskować, iż fibroblasty mogą być interesującym celem badań nad podatnością na zakażenie retrowirusami PERV, co ma szczególne znaczenie w aspekcie ksenotransplantacji skóry świńskiej u pacjentów wymagających przeszczepu tej tkanki i co, zresztą bardzo ładnie, opisano w rzeczowej dyskusji. Myśl ta przewija się poprzez dyskusję i mogłaby być sformułowana w postaci konkretnego wniosku. W mojej ocenie zabrakło także informacji, dlaczego, spośród wszystkich zidentyfikowanych czynników restrykcyjny Doktorantka – w kolejnych etapach – badała profil

ekspresji białek motywu trójstronnego? Co było powodem wybrania tej grupy czynników restrykcyjnych?

Podstawą przygotowania pracy doktorskiej były badania opublikowane w 5 czasopismach o sumarycznej punktacji IF=11,227 i MNiSW=245. Należy jednak podkreślić, że sumaryczny dorobek naukowy Doktorantki jest o wiele większy. Przedstawiona do oceny praca jest oprawionym introligatorsko jednostronnym wydrukiem komputerowym zawartym na 113 stronach, podzielona na 12 rozdziałów z zachowaniem odpowiednich proporcji. Wyraża konsekwentną filozofię Autorki w realizacji zagadnienia naukowego: założenia i cel pracy korespondują z tytułem, a wnioski są konsekwencją uzyskanych wyników w realizacji zakładanych celów. Treść pracy zajmuje 40 stron, pozostałe 73 strony zajmuje tytuł pracy, prezentacja Promotorów, Doktoranta, spis treści, skrótów, wykaz tabel i rycin, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów prac będących podstawą dysertacji i kserokopie publikacji będących podstawą przygotowania pracy doktorskiej. Piśmiennictwo obejmuje 96 pozycji, jest aktualne, starannie dobrane i prawidłowo cytowane w pracy. Praca zawiera 8 tabel i 11 rycin oraz pełnotekstowy wydruk 5 prac opublikowanych przy współudziale Doktorantki na podstawie, których została przygotowana dysertacja. Tabele i ryciny są dobrze zredagowane i czytelne, umieszczone w tekście rozprawy, dobrze dokumentując materiał badawczy, przebieg i wyniki badania. Zauważyłem kilka błędów stylistycznych, edycyjnych, interpunkcyjnych i literowych oraz tendencję do nie trzymania reżimu pisania w jednym czasie (np. str. 15, 17, 20, 22, 30 itp.). Uważam jednak, że nie obniżają one oceny pracy.

Uważam, że praca mgr Emilii Morawiec pt. "Profil ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV" w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Jej przedmiotem jest bardzo istotny i niezwykle oryginalny problem oceny ekspresji czynników restrykcyjnych hamujących ekspresję wirusa w kontekście przeszczepów ksenogenicznych. Wnosi istotne wartości zarówno poznawcze, jak i być może aplikacyjne. Świadczy o głębokiej wiedzy Doktorantki, o opanowaniu przez Nią licznych nowoczesnych techniki biologii molekularnej, o opanowaniu piśmiennictwa i umiejętności korzystania z tego źródła wiedzy, a przede wszystkim o wielkiej pracowitości i wysokiej randze ośrodka, w którym została zrealizowana praca.



Z powyższych względów, z pełnym przekonaniem, przedstawiam Panu Przewodniczącemu i Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Emilii Morawiec do kolejnego etapu przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017r., poz 1789).

DZIEKAN
WYDZIAŁU NAUK O ZDROWIU

dr hab. n. med. Rafał Bobiński, prof. ATH



