



Warszawa, 26 lipca 2021

prof. dr hab. Gracjan Patryk Michlewski

**Do:** Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Szutkowskiej**

**pt. „Struktura drugorzędowa vRNA wirusa grypy typu A w warunkach biologicznych”**

Kiedy pod koniec 2019 roku oczy całego świata zwrócone były na rozwijającą się sytuację epidemiologiczną w Chinach, związaną z nowym wirusem RNA, mało osób mogło przewidzieć jak katastrofalne skutki przyniesie pandemia spowodowana SARS-CoV-2. Miliony zgonów i biliony dolarów strat uzmysłowiły nam, że nawet najmniejsze patogeny ludzkie, jakimi są wirusy, mogą całkowicie zaburzyć normalne życie. W podobny sposób, wirus grypy rok po roku atakuje miliony ludzi i prowadzi do setek tysięcy zgonów. Niestety, od czasu do czasu nowe szczepy tego wirusa powodują pandemie, które tak jak SARS-CoV-2, mogą mieć bardzo ciężkie skutki dla ludzkiej populacji. Z tego względu, poznawanie biologii tych wirusów jest niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego, ale również z punktu widzenia przygotowania na kolejne pandemie, które z pewnością, będą się pojawiać i zagrażać milionom istnień ludzkich i gospodarce całego świata.

Głównym obiektem rozprawy doktorskiej Pani Barbary Szutkowskiej był wirus grypy typu A (IAV), który powoduje corocznej zakażenia, jak również spowodował znane pandemie t.j. grypa hiszpanka czy 'świńska grypa'. Wirus ten jest zbudowany z 8 segmentów (-) RNA, które są zapakowane w otoczkę wirusową, złożoną z komórkowej błony białkowo-lipidowej jak również białek wirusa, które pomagają mu w replikacji swojego materiału genetycznego jak i infekcji komórek. Po przedostaniu się do komórki, wirusowe RNA (vRNA), ulega przepisaniu na kodujące (+) mRNA i replikacyjne (+) cRNA. Po translacji wszystkich białek wirusowych następuje pakowanie nowych cząsteczek wirusa i uwalnianie ich z komórek w celu ponownej infekcji. Pomimo tego, że cały cykl replikacji wirusa jest dobrze poznany struktury poszczególnych segmentów jak i ich oddziaływania z białkami ludzkimi nie są do końca poznane. Dogłębne określenie tych struktur pozwoliłoby na zaprojektowanie leków, nakierowanych na wirusowe RNA, które pomogłyby przy leczeniu ludzi zainfekowanych wirusem grypy.

Większość dotychczasowych prac badających strukturę RNA wirusa opierała się na metodach *in vitro*, czyli badania struktury RNA poszczególnych segmentów w odosobnieniu bez czynników komórkowych. Mgr Barbara Szutkowska w swojej pracy doktorskiej podjęła się bardzo ambitnego celu – ustalenia struktury segmentów RNA wybranego szczepu IAV, *in vitro*, *in virio* (czyli w kontekście wyizolowanego wirusa grypy), jak również *in cellulo* (czyli w kontekście zainfekowanych komórek ludzkich). W celu osiągnięcia tego celu Mgr Szutkowska użyła nowatorskich metod mapowania struktur drugorzędowych z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji. Istotne jest również to, że wyniki badań we wszystkich warunkach zostały ze sobą porównane. Pozwoliło to po raz pierwszy zobaczyć, jak jest zachowana struktura z badań *in vitro* do tych uzyskanych w bardziej fizjologicznych warunkach. W mojej ocenie, najważniejsze konkluzje tej pracy doktorskiej to:

1. Globalne struktury drugorzędowe segmentów IAV różnią się znacząco między badaniami *in vitro*, *in virio* i *in cellulo*.
2. W segmentach IAV istnieją lokalne struktury RNA, które występują zarówno *in vitro*, *in virio* i *in cellulo*.
3. Struktury, o których mowa w pkt. 2 stanowią bardzo ciekawy 'punkt zaczepienia' w celu projektowania nowych interwencji molekularnych, nakierowanych na hamowanie namnażania się i infekcyjności wirusa grypy.

Struktura rozprawy doktorskiej jest bardzo dobrze zaprojektowana i składa się z i) jasno określonego celu pracy, ii) streszczenia, iii) abstraktu w języku angielskim, iv) obszernego i pełnego wstępu literaturowego, v) wyników i dyskusji, vi) podsumowania, vii) materiałów i metod, viii) dodatku i ix) bibliografii. Większość rycin jest bardzo dobrze zaprezentowana i opisana. Niestety, na niektórych rycinach czcionka jest zbyt mała. Szczególną uwagę przykuwa wstęp literaturowy, który w bardzo przystępny sposób opisuje cykl replikacji wirusa grypy jak i strukturę, i funkcje wirusowych RNA i białek. W mojej opinii, pozwoli on na przyswojenie informacji dotyczących wirusa grypy nawet osobą, nie mającą dużej wiedzy na tematy wirusowe. Wybór połączenia wyników i dyskusji zawsze niesie za sobą możliwość braku spójnej i globalnej interpretacji i dyskusji. Do pewnego stopnia zmaterializowało się to w tej rozprawie doktorskiej, gdyż podsumowanie zajęło tylko 6 stron. Jedynym brakującym elementem są przyszłe kierunki prac, wynikające z przedstawionych rezultatów. Myślę, że na tym etapie, można by przedstawić jakie eksperymenty potwierdzą istnienie

zapropionowanych struktur, lub w jaki sposób wiedza o lokalnych strukturach zostanie wykorzystana w celach terapeutycznych.

Poniżej przedstawiam bardziej szczegółowe komentarze dotyczące rozprawy doktorskiej.

1. Na stronie 55 występuje cytowanie Lee et al. Czytając tą treść nie ma możliwości odnalezienia tej pracy zarówno w bibliografii (46. Lee et al., 152. Lee et al.,) jak i w PubMed (133895 rezultaty Lee [first author]).
2. Transkrypcja *in vitro* segmentu 8 vRNA IAV wprowadza GGG na 5' końcu. Naturalny koniec 5' segmentu 8 vRNA to A. Taka zmiana może spowodować inne składanie się cząsteczki RNA i tym samym profil odmienny od tego uzyskanego w badaniach *in virio* czy *in cellulo*.
3. Na stronie 64 czytamy, że wykonana została reakcja PCR w czasie rzeczywistym. Prawdopodobnie chodziło tu o reakcję odwrotnej transkrypcji połączoną z PCR w czasie rzeczywistym – czyli qRT-PCR.
4. Na jakiej podstawie został przypisany prążek na żelu SDS do białka wirusowego na Rycinie 22? Czy zostało wykonane badanie spektrometrii masowej?
5. W wielu miejscach rozprawy doktorskiej czytamy, że 'wyniki mapowania korelują ze strukturą drugorzędową'. Tym niemniej, jedynym dowodem na to są ryciny o w miarę niskiej rozdzielczości. Myślę, że o wiele lepiej byłoby określić tę korelację w postaci liczby, np. procentu miejsc korelujących z jednoniciową strukturą RNA, gdyż w wielu przypadkach sygnały modyfikacji zmapowane są na struktury dwuniciowe.
6. Rycina na stronie 102 powinna mieć numer 47, a nie 1.
7. Rycina 61 przedstawia całkowicie różne struktury uzyskane *in virio* i *in cellulo*. Jaka jest przyczyna, że *in cellulo* nie widzimy większości struktur w centralnej części segmentów 1, 2, 3, 4 i 6?

8. Najważniejszy i najpełniejszy obraz struktury RNA wirusa grypy jest przedstawiony na rycinie 67. Jasno i ewidentnie wskazuje, że przewidywanie struktur RNA w wyizolowanych warunkach *in vitro*, przedstawia zupełnie inny obraz, który prawdopodobnie nie jest zachowany w strukturach tego samego RNA, występujących w warunkach komórkowych. To powinno być centralną osią dyskusji jak i istotną nowością do zaprezentowania w publikacji.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Proszę Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Barbary Szutkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podsumowując, rozprawa doktorka mgr Barbary Szutkowskiej jest niezwykle interesującą, nowatorską i ważną pracą badawczą. Tym samym wnioskuję o wyróżnienie dla tej rozprawy. Pomimo bardzo dużego postępu metodologicznego, mapowanie struktur RNA w komórkach jest bardzo trudnym zadaniem. Nacelowanie takich badań na RNA wirusa grypy, który może spowodować kolejną pandemię, jest logiczne i jak najbardziej czasowe. Rezultaty badań mgr Barbary Szutkowskiej z pewnością przyczynią się do wyboru celów terapeutycznych, które w przyszłości mogą zaowocować nowymi, bardziej skutecznymi terapiami antywirusowymi.

Z poważaniem,

prof. dr hab. Gracjan Patryk Michlewski



 NATIONAL SCIENCE CENTRE  
POLAND

 Ministry of Science  
and Higher Education  
Republic of Poland

 Federal Ministry  
of Education  
and Research