



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

AUTOREFERAT

**Charakterystyka mechanizmów molekularnych replikacji
ludzkiego wirusa niedoboru odporności w poszukiwaniu
nowatorskich podejść terapeutycznych.**

Dr Anna Kula-Päcurar

Małopolskie Centrum Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Kraków 2023

1. Imię i nazwisko:

Anna Kula-Păcurar

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy doktora:

Doktor nauk Przyrodniczych

Data nadania stopnia: 17 sierpnia 2009

Miejsce nadania stopnia: Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (ICGEB), Triest (Włochy) i Open University (Wielka Brytania)

Tytuł rozprawy doktorskiej: Identification and characterization of protein complexes involved in HIV-1 RNA biogenesis, processing, and export.

Promotor: Dr Alessandro Marcello (ICGEB, Włochy)

Recenzenci: Prof. Andrew Lever (University of Cambridge, Cambridge, UK)

Dr Mike Myers (ICGEB, Włochy)

Tytuł zawodowy magistra:

Magister biologii

Data uzyskania tytułu: 30 czerwca 2005

Miejsce nadania stopnia: Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

Tytuł pracy magisterskiej: Lokalizacja kinazy PrkC w komórkach *Bacillus subtilis*

Promotor: Prof. dr hab. Michał Obuchowski (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk)

Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn (Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk)

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2019 – obecnie: Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Stanowisko: adiunkt

2017 - 2019: Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Stanowisko: asystent

2013 - 2016	Institute of Molecular Biology and Medicine, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium Stanowisko: post-doc
2009-2012	Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (ICGEB), Triest, Włochy. Stypendium CERES (Central-European Initiative (CEI) and Marie Curie Actions) Stanowisko: post-doc
2004 (lipiec-październik)	Biosearch Technologies, Novato, USA stanowisko: stażysta

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

a) Tytuł pracy:

Charakterystyka mechanizmów molekularnych replikacji ludzkiego wirusa niedoboru odporności w poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia:

Równy wkład jest oznaczony gwiazdką (). Autorstwa korespondencyjne są oznaczone symbolem hash (#).*

1. **Kula A**, Guerra J, Knezevich A, Kleva D, Myers MP, Marcello A. Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies MatrIn3 as a nuclear cofactor of Rev function. *Retrovirology*. 2011 Jul 20; 8:60 (IF₂₀₂₁ = 3.768; MNiSW₂₀₂₁ = 100, liczba cytowań = 64)

Udział habilitanta w powstaniu pracy: współtwórca hipotezy badawczej; planowanie eksperymentów i koordynowanie badań; wykonanie zdecydowanej większości eksperymentów (w tym m.in. opracowanie protokołu biochemicznego do izolacji frakcji jądrowych i cytoplazmatycznych, opracowanie podejścia MS2-tagging dla HIV-1 RNA w celu jego immunoprecypitacji, analiza danych proteomicznych, wykonanie PCR, wykonanie PCR w czasie rzeczywistym, eksperymenty z RNAi i Western blotting); analiza, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowania rycin do publikacji; przygotowanie manuskryptu, korekta pracy przed złożeniem i przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na **65%**

2. **Kula A**, Gharu L, Marcello A. *HIV-1 pre-mRNA commitment to Rev mediated export through PSF and MatrIn 3*. *Virology*. 2013 Jan 20;435(2):329-40. (IF₂₀₂₁ = 3.513, MNiSW₂₀₂₁ = 100 points, liczba cytowań= 41)

Udział habilitanta w powstaniu pracy: współtwórca hipotezy badawczej; planowanie eksperymentów i koordynowanie badań; wykonanie zdecydowanej większości eksperymentów (walidacja wyników ze spektrometrii mass, wykonanie PCR i PCR w czasie rzeczywistym, Western blotting, doświadczenia z RNAi, wykonanie i analiza zdjęć z mikroskopii konfokalnej); analiza, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowania rycin do publikacji; przygotowanie manuskryptu, korekta pracy przed złożeniem i przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na **70%**.

3. Darcis G*, **Kula A***, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-Ammar A, Delacourt N, Melard A, Kabeya K, Vanhulle C, Van Driessche B, Gatot J-G, Cherrier T, Pianowski LF, Gama L, Schwartz C, Vila J, Burny A, Clumeck N, Moutschen M, De Wit S, Peterlin M, Rouzioux C, Rohr O and Van Lint C. An In-Depth Comparison of Latency Reversing Drug Combinations in Various in vitro and ex vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatin- 1+JQ1 and Ingenol B+JQ1 to Potently Reactivate HIV-1. *PLoS Pathog*. 2015 Jul 30;11(7): e1005063, (IF₂₀₂₁ = 7.464; MNiSW₂₀₂₁ = 140 points, citations = 197)

Udział habilitanta w powstaniu pracy: współtwórca hipotezy badawczej; planowanie i wykonanie większości doświadczeń z współautorem (doświadczenia reaktywacji wirusa w modelach in vitro i ex vivo, pomiar wirusa metodami cytometrii przepływowej, p24 ELISA, PCR-em w czasie rzeczywistym; izolacja komórek PBMC i spoczynkowych limfocytów T od pacjentów; analiza aktywacji limfocytów cytometrią przepływową; badania toksyczności związków LRA); wykonanie mechanistycznych doświadczeń przy użyciu metodą EMSA, metodą pomiaru aktywności lucyferazy i doświadczeń z inhibitorami; analiza, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowania rycin do publikacji; przygotowanie manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na **39%**.

4. **Kula A**, Delacourt N, Bouchat S, Darcis G, Avettand-Fenoel V, Verdikt R, Corazza F, Necsoi C, Vanhulle C, Bendoumou M, Burny A, De Wit S, Rouzioux C, Rohr O and Van Lint O. Heterogeneous

HIV-1 reactivation patterns of disulfiram and combined disulfiram+romidepsin treatments. J Acquir Immune Defic Syndr. 2019 Apr 15;80(5):605-613 (IF2021 = 3,777; MNiSW2021 = 140 points, citations = 12).

Udział habilitanta w powstaniu pracy: twórca hipotezy badawczej; planowanie i wykonanie zdecydowanej większości doświadczeń (doświadczenia reaktywacji wirusa w modelach in vitro i ex vivo; doświadczenia pomiaru wirusa cytometrią przepływową, ELISą i RT-qPCR); izolacja komórek PBMC; badania toksyczności; badania mechanistyczne metodą Western blotting; analiza, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowania rycin do publikacji; przygotowanie manuskryptu, korekta pracy przed złożeniem i przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na **70 %**.

5. Ait-Ammar A*, **Kula A***, Darcis G, Verdikt R, De Wit S, Gautier V, Mallon PWG, Marcello A, Rohr O, Van Lint C. Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. Front Microbiol. 2020 Jan 24; 10:3060. Review. (IF2020 = 6,064, MNiSW2021 = 100 points, citations = 74)

Udział habilitanta w powstaniu pracy: współtwórca koncepcji pracy; zebranie literatury; przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu i ryciny, korekta pracy przed złożeniem, odpowiedzi do recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 44 %.

6. **Kula-Pacurar A#**, Rodari A, Darcis G, Van Lint C#. Shocking HIV-1 with immunomodulatory latency reversing agents. Semin Immunol 2021 May. doi: 10.1016/j.smim.2021.101478 (IF2021= 10,671, MNiSW2021 = 140 points, citations = 4)

Udział habilitanta w powstaniu pracy: stworzenie koncepcji pracy; zebranie literatury; pozyskanie finansowania na badania; przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na **80 %**.

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 35.257

Suma punktów MNiSW (2021): 720

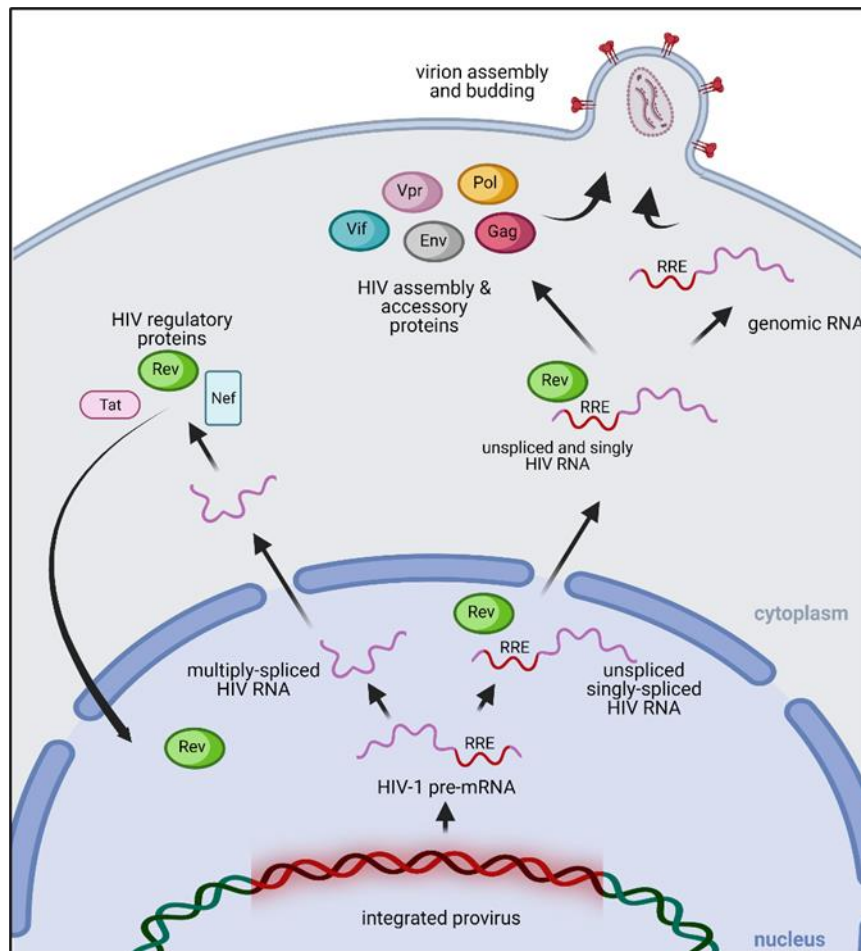
Sumaryczna liczba cytowań: 392

- c) Omówienie celu naukowego ww./prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

HIV-1/AIDS, od początku pandemii w 1981 roku, nadal pozostaje głównym zagrożeniem publicznym z 36,3 milionami zgonów i ponad 38 milionami ludzi żyjących z HIV-1. Pomimo ogromnych wysiłków podejmowanych w celu zwalczania HIV/AIDS nadal nie ma szczepionki ani skutecznej terapii prowadzącej do całkowitego wyleczenia. Obecnie stosowana terapia antyretrowirusowa (z ang. *antiviral therapy*, ART)¹, która hamuje etapy replikacji wirusa jest skuteczna w kontrolowaniu, ale nie w eliminacji infekcji, gdyż wirus HIV-1 przechodzi w stan uśpienia (stan latencji) maskując się przed działaniem leków przeciwretrowirusowych i rozpoznaniem immunologicznym. W konsekwencji pacjent musi być poddany leczeniu całe życie, gdyż odstawienie leków skutkuje nawrotem wiremii. HIV-1 zakaża komórki, które posiadają na swojej powierzchni receptor CD4. Są to limfocyty T, monocyty, makrofagi, komórki mikrogleju i dendrytyczne. Jednakże, głównym typem komórek zakażanych przez HIV są spoczynkowe CD4+ limfocyty T. Po związaniu się wirusa z receptorem CD4 dochodzi do uwolnienia się kapsydu do wnętrza komórki, gdzie rozpoczyna się etap odwrotnej transkrypcji. Wirusowa odwrotna transkryptaza przepisuje ssRNA (ang. sing-stranded RNA) wirusa HIV-1 na dsDNA (ang. double-stranded DNA) i powstałe dsDNA jest następnie transportowane do jądra komórki w celu integracji do genomu gospodarza przechodząc w formę prowirusa przy udziale wirusowej integrazy i czynników komórkowych tj. LEDGF. Po integracji, rozpoczynają się etapy pointegracyjne ekspresji genów wirusa. Następuje to w sytuacji, gdy komórkowa polimeraza II RNA (RNAPII – ang. RNA polymerase II) w obecności komórkowych czynników transkrypcyjnych i wirusowego białka Tat transkrybuje wirusowe pre-mRNA z sekwencji promotorowej wirusa zlokalizowanej w rejonie 5'LTR (ang. long terminal repeat). Zsyntetyzowane podczas transkrypcji pre-mRNA wirusa HIV-1 stanowi policystronowy transkrypt, który podlega złożonej obróbce potranskrypcyjnej w celu ekspresji białek wirusowych. W wyniku **obróbki po-transkrypcyjnej** powstają trzy główne klasy wirusowego RNA: (i) RNA o długości ok. 2kb, które uległo całkowitemu splicingowi (z ang. multiply-spliced, MS HIV-1 RNA); (ii) RNA o długości 4kb, które uległo częściowemu splicingowi (z ang. singly-spliced, SS HIV-1 RNA) oraz (iii) pełne, genomowe RNA, które nie uległo obróbce po-transkrypcyjnej (z ang. unspliced, US HIV-1 RNA)². MS RNA jest transportowany do cytoplazmy przez kanoniczną ścieżkę transportu, gdzie służy jako matryca do ekspresji białek regulatorowych wirusa, Tat i Rev (Ryc. 1). Tat bierze udział w transkrypcji, a białko Rev jest

odpowiedzialne za transport z jądra do cytoplazmy wirusowych transkryptów US i SS, poprzez wiązanie się do sekwencji RRE (z ang. Rev-responsive element)³ zlokalizowanej w sekwencji intronowej (Ryc. 1). Następnie Rev wiąże się do komórkowego receptora transportowego CRM-1 i promuje translokację US and SS HIV-1 RNA z jądra do cytoplazmy (Ryc. 1). Rev angażuje również aktywność wielu innych białek komórkowych tj. helikazy komórkowe DDX1 i DDX3⁴, kompleks białkowy PSF/MATR3⁵⁻⁷ lub Sam68⁸. Cytoplazmatyczny US HIV-1 RNA stanowi matrycę do ekspresji wirusowych genów strukturalnych budujących wirion, ale także stanowi genomowe RNA, które jest pakowane do wirionów (Ryc. 1). Powstałe wiriony są uwalniane poprzez pączkowanie, a ich dalsze dojrzewanie umożliwia zainfekowanie kolejnych komórek, powodując wiremę. W rzadkich przypadkach (szacuje się, że 1 komórka na milion limfocytów T), ekspresja genów wirusowych zostaje wyciszona w komórce i prowirus utrzymuje się w komórce **w formie latentnej**. Latentny wirus staje się niewidoczny dla układu immunologicznego i leków tworząc tzw. latentne rezerwuary. Latencja wirusa HIV-1 jest złożonym procesem, w którym ekspresja genu HIV-1 jest tłumiona przez wiele molekularnych mechanizmów komórkowych^{9,10}. Wyróżniamy tutaj takie mechanizmy jak miejsce integracji HIV-1 do genomu komórki gospodarza¹¹, obecność represyjnego nukleosomu nuc-1 i przestrzenne umiejscowienie w jądrze zintegrowanego prowirusa¹², brak ekspresji (w komórkach limfocytów spoczynkowych) czynników transkrypcyjnych gospodarza, takich jak NF-κB, czy sekwestracja w cytoplazmie nieaktywnego kompleksu elongacji transkrypcji P-TEFb w obrębie kompleksu 7SK RNA (omówione w ¹⁰). Ponadto kontrola epigenetyczna promotora HIV-1 tj. metylacja wysp CpG w promotorze, czy deacetylacja histonów wpływa represyjnie na transkrypcję wirusa¹³. Oprócz blokad transkrypcyjnych prowadzących do latencji HIV-1, wirus jest również wyciszany przez słabiej scharakteryzowane mechanizmy działające na poziomie po-transkrypcyjnym, tj. defekty w splicingu, hamowanie eksportu wirusowego RNA z jądra do cytoplazmy lub hamowanie translacji białek HIV przez mikroRNA¹⁴⁻¹⁶.

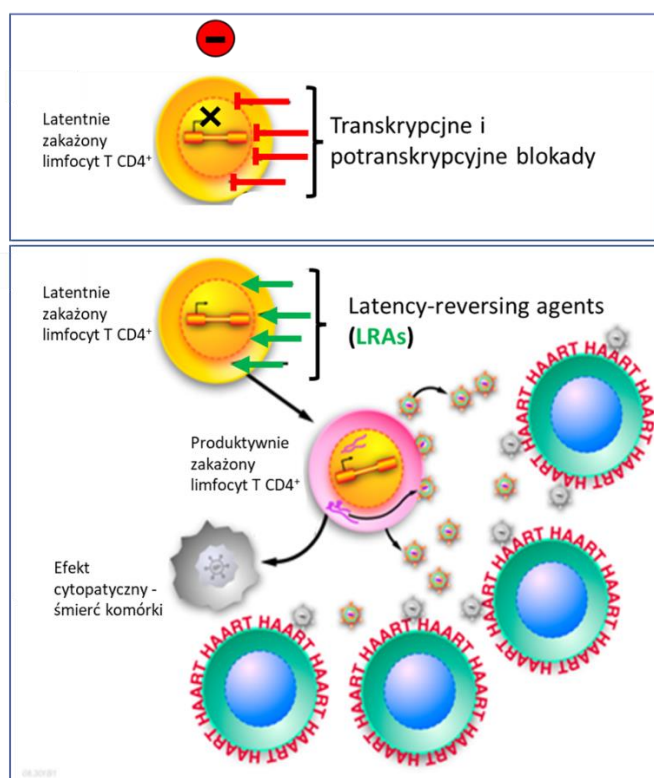


Rycina 1. Ekspresja genów wirusa HIV-1 i Rev-zależny eksport. Schemat własny (utworzony przez BioRender).

Strategia „shock-and-kill”

Obecnie stosuje się kilka strategii mających na celu eliminację latentnych rezerwuarów. Jednym z najbardziej zbadanych terapeutycznych podejść eksperymentalnych jest strategia „shock-and-kill”. Jak pokazano na Ryc. 2, opiera się ona na reaktywacji wirusa HIV-1 z latentnie zakażonych komórek (faza „shock”) przy zastosowaniu różnych związków chemicznych LRAs (z ang. „latency reactivating agents”). LRAs uwalniają mechanizmy molekularne blokujące transkrypcję genów wirusowych. Wybudzenie z latencji pozwala na fazę „kill”, podczas której komórki latentnie zakażone umierają z powodu efektów cytopatycznych lub cytotoxicznych mechanizmów efektorowych komórki gospodarza w wyniku reaktywacji wirusa (Ryc. 2). Jednoczesne podanie leków antyretrowirusowych powinno być zachowane w terapii „shock-and-kill”, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się infekcji przez reaktywowane neosyntetyzowane wirusy (Ryc. 2). LRA można podzielić na kilka klas, w zależności od mechanizmu działania. Wyróżniamy tutaj aktywatory kinazy białkowej C (PKC) tj. briostatyna-1, czy prostratyna, które aktywują NF- κ B, który jest głównym czynnikiem inicjacji transkrypcji wirusa HIV-1. Inhibitory Bromodomain i Extraterminal (BET) bromodomain”, czyli BETi tj. JQ1 lub I-BETs, które

blokują bromodomeny BET (głównie białka BRD4) i hamują interakcję BRD4 z czynnikiem elongacji transkrypcji P-TEFb, co sprzyja rekrutacji P-TEFb do promotora wirusa HIV-1 i zwiększeniu transkrypcji wirusa¹⁷. Ponadto BETi działają również poprzez uwalnianie P-TEFb bezpośrednio z kompleksu 7SK snRNP, aczkolwiek mechanizm ten jest słabo poznany¹⁸. Związki epigenetyczne uwalniają blokady epigenetyczne w obrębie promotora wirusa HIV-1. Wyróżniamy tutaj inhibitory deacetylaz histonowych (HDACi, *histone deacetylase inhibitors*) tj. romidepsyna, czy inhibitory metylaz DNA tj. 5-Aza¹⁹. Badania *in vitro* (z wykorzystaniem latentnie zakażonych linii komórkowych) i *ex vivo* (z wykorzystaniem komórek pierwotnych izolowanych z krwi pacjentów zakażonych HIV-1 i leczonych antyretrowirusowo) potwierdzają skuteczność LRA w reaktywacji wirusa z latencji¹⁹⁻²¹. Badania kliniczne nie wykazały jednak skutecznej redukcji latentnych rezerwuarów u pacjentów przyjmujących LRAs^{22,23}. Najprawdopodobniej wynika to z heterogeniczności latentnych rezerwuarów (zakażenie różnych typów komórek) i złożoności mechanizmów molekularnych (innych w różnych typach komórek) (omówione przez nas w⁹). Ponadto LRA nie działają na mechanizmy potranskrypcyjne ekspresji genów wirusa. Prowadzone są także badania (w hodowlach komórkowych *in vitro* and *ex vivo*) nad zastosowaniem skojarzonego podania dwóch klas LRAs, działających na różne szlaki komórkowe, celem uzyskania mocniejszego i synergicznego wybudzenia z latencji^{19-21,24}. W związku z powyższym kluczowym jest głębsze poznanie mechanizmów molekularnych regulujących ekspresję genów wirusa HIV-1 i latencję, aby racjonalnie zwiększyć skuteczność strategii „shock-and-kill” i miejmy nadzieję, osiągnąć sukces kliniczny.



Rycina 2. Schemat działania terapii „shock-and-kill”. Wyciszenie ekspresji genów wirusowych jest regulowane poprzez mechanizmy (i) blokujące transkrypcję HIV-1 (w tym blokady epigenetyczne promotora) i (ii) mniej poznane mechanizmy hamujące etapy po-transkrypcyjnej ekspresji wirusa HIV-1 (górny panel). LRA uwalniając blokady transkrypcji reaktywują wirusa z latencji, co prowadzi do śmierci zakażonej komórki. Nowopowstałe reaktywowane wirusy nie zakażają nowych komórek dzięki podaniu leków ART (na rycinie jest podana dawna nazwa: HAART) (dolny panel).

Celem prac wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego przedstawionego w 5 artykułach naukowych było badanie mechanizmów molekularnych ekspresji genów wirusa HIV-1 w kontekście poszukiwania bardziej skutecznych podejść terapeutycznych.

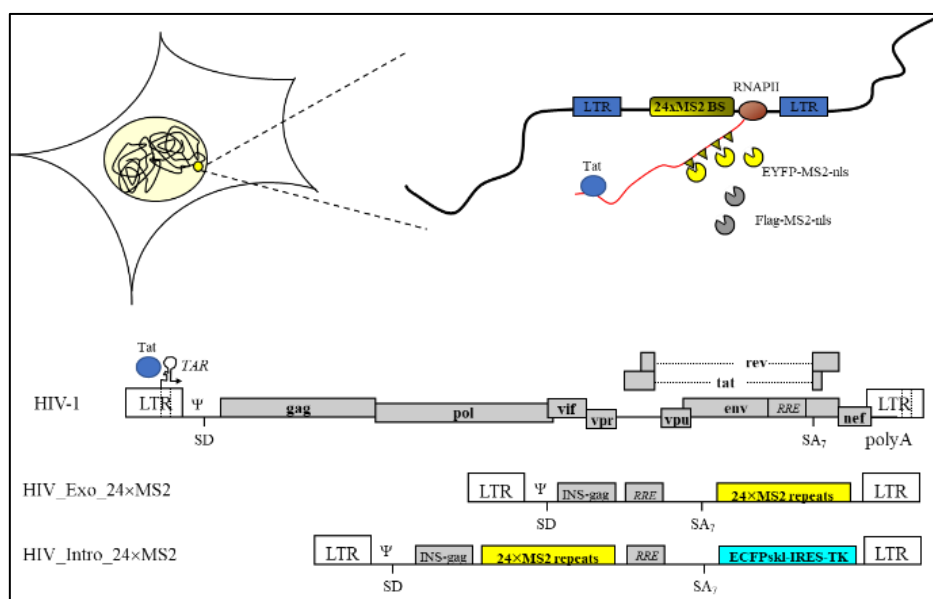
Charakterystyka nowych mechanizmów molekularnych ekspresji genów wirusa HIV-1.

MATR3 jako nowy czynnik wirusowego białka Rev.

W pierwszej publikacji z osiągnięcia naukowego zidentyfikowaliśmy czynnik komórkowy MATR3 i badaliśmy jego rolę w Rev-zależnym eksporcie cząstek RNA wirusa HIV-1 z jądra do cytoplazmy⁶. W niniejszej pracy, w celu identyfikacji nowych białek oddziałujących z wirusowym RNA, wykorzystaliśmy metodę znakowania wirusowego RNA sekwencją MS2 a identyfikacja oddziałujących białek, w tym MATR3, została dokonana przy zastosowaniu spektrometrii mas.

Kula A, Guerra J, Knezevich A, Kleva D, Myers MP, Marcello A. *Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies Matr3 as a nuclear cofactor of Rev function.* *Retrovirology.* 2011 Jul 20; 8:60.

W pracy tej wykorzystaliśmy dwie stabilne linie komórkowe (U2OS-HIV-24xMS2-intro i U2OS-HIV-24xMS2-exo), które zawierają zintegrowany reporterowy wektor wirusowy zawierający metkę MS2 (sekwencja formująca struktury RNA szpilki w 24 powtórzeniach o powinowactwie do białek faga MS2) (Ryc. 3). Wprowadzenie metki do sekwencji intronowej lub eksonowej pozwoliło na analizę transkryptów US lub MS wirusa HIV-1 odpowiednio w stabilnej linii U2OS-HIV-24xMS2-intro lub U2OS-HIV-24xMS2-exo.

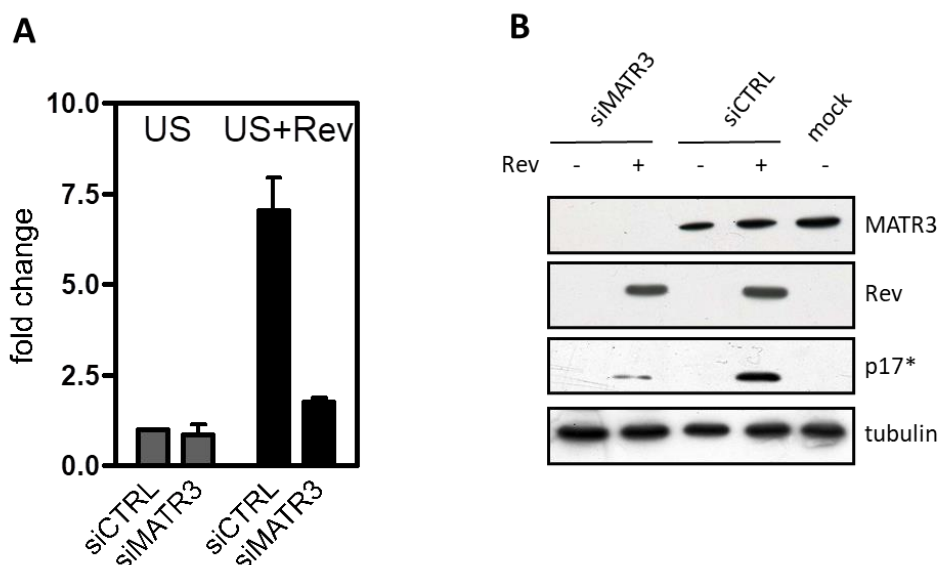


Rycina 3. Znakowanie wirusowego RNA metodą MS2. Struktura szpilek do włosów od bakteriofaga MS2 w 24 powtórzeniach została wprowadzona do eksonowej lub intronowej (pomiędzy SD a SA₇) sekwencji wektora wirusowego. Wiązanie się białka MS2 do tej struktury umożliwia detekcję RNA przy użyciu mikroskopii konfokalnej (MS2 z metką białka fluorescencji) lub immunoprecypitację na złożu do dalszych analiz biochemicznych lub analitycznych (np. MS2 z metką peptydu flag). *Schamat opublikowany w Kula et al., Retrovirology 2011.*

Oby dwie linie stabilne zostały użyte do identyfikacji nowych czynników jądrowych oddziałujących z HIV-1 RNA. U2OS-HIV-24xMS2-intro, U2OS-HIV-24xMS2-exo oraz dzięki U2OS (jako kontrola niespecyficzności wiązania do złoża) poddane zostały transfekcji plasmidami pTat, wyrażającym wirusowe białko Tat w celu aktywacji transkrypcji wirusa w promotora LTR i pMS2-flag, wyrażającym białko MS2 znakowane metką Flag w celu immunoprecypitacji (IP) RNA HIV-1 (Ryc. 3). IP z wykorzystaniem przeciwciał do metki flag na złożu agarozowym pozwoliła na związanie MS2 z przyłączonym znakowanym sekwencją MS2 wirusowym RNA. Obecność na złożu wirusowego RNA została potwierdzona metodą RT-PCR z wykorzystaniem starterów do amplifikacji US i MS HIV-1 RNA. Uzyskane IP zostały poddane analizie spektrometrii mas. Białka obecne na złożu inkubowanym z

lizatem jądrowym z dzikich komórek U2OS transfekowanych pTat i pMS2-flag zostały potraktowane jako niespecyficzne oddziaływania. Ostatecznie zidentyfikowano 32 białka. Większość zidentyfikowanych białek odgrywa rolę w metabolizmie RNA, natomiast skupiono się w dalszej części pracy na charakterystyce białka MATR3, gdyż rola tego czynnika komórkowego nie była poznana w replikacji wirusa HIV. MATR3 (z ang. nuclear matrix 3) jest białkiem wchodzącym w skład struktury szkieletowej jądra komórkowego tzw. macierzy jądrowej zaangażowanej w przebieg wielu procesów komórkowych, takich jak replikacja i naprawa DNA, czy regulacja cyklu komórkowego²⁵. W dalszej części pracy, potwierdziliśmy wiązanie białka MATR3 do wirusowego RNA metodą MS2. W kolejnym etapie zbadano rolę MATR3 w regulacji wirusowego RNA. W tym celu, wyciszono ekspresję MATR3 przy zastosowaniu metody interferencji RNA (RNAi) w komórkach HEK293T transfekowanych wektorem wirusowym pHIV-HY²⁶ i plasmidami pTat (w celu aktywacji transkrypcji wirusa) i pRev (odpowiedzialnym za eksport Rev-zależnych RNA z jądra). Analiza poziomów transkryptów US i MS HIV-1 RNA przy użyciu RT-qPCR powstałych pod wpływem transkrypcji z wektora wirusowego wykazała obniżony poziom transkryptów US i nie wykazała zmian w poziomie MS HIV-1 z próbkami z wyciszoną ekspresją MATR3. Ponadto poziom białka Gag wyrażanego z US HIV-1 także uległ zmniejszeniu w komórkach traktowanych siRNA w kierunku MATR3, wskazując na rolę tego białka w regulacji ekspresji Rev-zależnych transkryptów.

W dalszej części, aby potwierdzić rolę MATR3 w Rev zależnym eksporcie, oceniono poziom jądrowego i cytoplazmatycznego US i MS HIV-1 RNA w komórkach traktowanych siMATR3. W tym celu, komórki HEK293T z wyciszoną ekspresją MATR3 (i komórki kontrolne siCTRL) zostały poddane transfekcji wektorem wirusowym pHIV-HY²⁶, plasmidem pTat w obecności lub braku pRev. Po 24 godzinach od transfekcji, komórki zostały poddane frakcjonowaniu celem uzyskania frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej. Analiza RT-qPCR wykazała, że wyciszenie ekspresji MATR3 redukuje poziom cytoplazmatycznego US HIV-1 RNA, nie wpływa na poziom jądrowego US HIV-1 RNA i nie zmienia poziomu MS HIV-1 RNA w obydwóch frakcjach. Te wyniki wykazały, że MATR3 wpływa na eksport Rev-zależnych transkryptów. W końcowej części pracy przy zastosowaniu metody immunoprecypitacji z wykorzystaniem przeciwciał anti-MATR3 i Western blot do białka Rev potwierdzono oddziaływanie MATR3 z wirusowym białkiem Rev. Ponadto, trawienie próbek IP RNAzą A wskazało na RNA-zależne oddziaływanie pomiędzy MATR3 i Rev. Wykazano zatem, że MATR3 jest czynnikiem oddziałującym z białkiem Rev i odgrywającym pozytywną rolę w Rev-zależnym eksporcie.



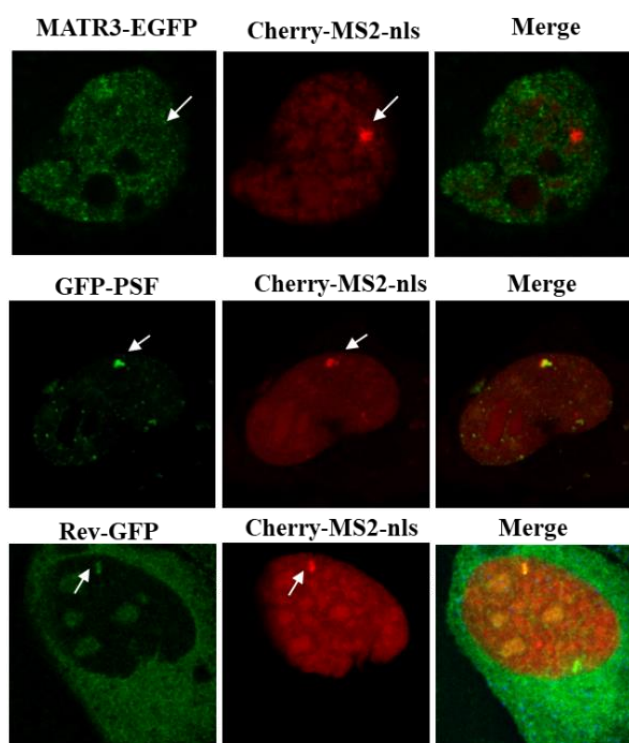
Rycina 4. Wyciszenie MATR3 hamuje aktywność wirusowego białka Rev. A) Analiza ilościowa poziomów US HIV-1 RNA modulowanego przez MATR3. Ekspresja US wirusowego RNA w komórkach 293T traktowanych siRNA była badana po transfekcji vHY-IRES-TK, Tat i Rev-EGFP. Poziomy US RNA analizowano za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, a dane normalizowano do ekspresji β -tubulin mRNA. Dane przedstawiono jako zmianę poziomu, przy czym komórki poddane działaniu siCTRL, transfekowane vHY-IRES-TK i Tat przy braku Rev, ustawiono jako 1. Przedstawiono wyniki trzech niezależnych eksperymentów \pm SD. Zahamowanie było znaczące ($p = 0,00112$). **B)** Ekspresja HIV-1 Gag (p17*). Analiza Western blot ekstraintów białkowych z poddanych działaniu siRNA komórek 293T wyrażających vHY-IRES-TK, Tat i Rev-EGFP. p17* jest produktem skróconego genu Gag wektora vHY-IRES-TK. Tubulina jest kontrolą nałożenia białka. *Rycina opublikowana w Kula et al., Retrovirology 2011.*

Reasumując, w pierwszym manuskrypcie zidentyfikowaliśmy białko jądrowe MATR3 jako nowy kofaktor białka Rev i Rev-zależnego eksportu wirusowych transkryptów. Należy podkreślić, iż zrozumienie mechanistycznych aspektów tego procesu jest potrzebne do pełnego wyjaśnienia udziału MATR3 w eksporcie transkryptów wirusowych za pośrednictwem Rev.

Identyfikacja kompleksu białkowego MATR3/PSF i jego rola w Rev-zależnym eksporcie.

W drugiej publikacji z osiągnięcia naukowego, badano rolę białka komórkowego PSF, które zostało zidentyfikowane we wcześniejszej analizie proteomicznej czynników oddziałujących z HIV-1 RNA⁶. W niniejszej pracy, wykorzystując metody biochemiczne i mikroskopię konfokalną, wykazano, że PSF tworzy kompleks białkowy z MATR3 i białkiem wirusowym Rev, który bierze udział w retencji i eksporcie z jądra Rev-zależnych transkryptów⁵.

PSF jest czynnikiem wiążącym trakt polipirymidynowy (z ang. polypyridine binding factor). Doniesienia literaturowe wskazują na rolę tego białka, przy udziale MATR3, w jądrowej retencji komórkowego hiperedytowanego mRNA^{27,28}. PSF to wielofunkcyjne białko jądrowe, które bierze udział w różnych procesach jądrowych tj. wyżej wspomniana retencja hiperedytowanego RNA, splicing i transkrypcja^{29,30}. Wykazano również, iż PSF specyficznie wiąże się do sekwencji INS (z ang. instability element) znajdującej się w obrębie RNA wirusa HIV, która reguluje stabilność Rev-zależnych transkryptów³¹. Aczkolwiek, rola PSF w ekspresji genów wirusa HIV-1 pozostała ciągle nieznana. W pierwszej części, potwierdziliśmy interakcję pomiędzy wirusowym RNA a PSF metodą Western blot w stabilnych liniach U2OS-HIV-24xMS2-intro i U2OS-HIV-24xMS2-exo na immunoprecypitowanym metodą MS2 wirusowym RNA. Następnie wykazaliśmy, iż PSF, tak jak MATR3, nie uczestniczy w transkrypcji wirusa HIV, ale reguluje po-transkrypcyjne etapy obróbki HIV RNA w Rev-zależnym eksporcie. W dalszej części, wykazano, że wyciszenie ekspresji białka PSF przy zastosowaniu metody RNAi, tak jak w przypadku MATR3, zmniejszyło poziom wirusowego US RNA i ekspresję białka Gag, ale nie wpłynęło na poziom MS, Rev-niezależnych HIV RNA. Natomiast, przy zastosowaniu immunoprecypitacji i Western blot wykazaliśmy, że MATR3 i PSF tworzą kompleks oddziałujący z wirusowym białkiem Rev i oddziaływania pomiędzy MATR3 i PSF są mediowane przez oddziaływania białko-białko, jednakże oddziaływania z Rev są zależne od RNA. Interakcja pomiędzy MATR3 lub PSF a wirusowym RNA została także zbadana metodą immunofluorescencji i mikroskopii konfokalnej. Wirusowe RNA zostało zwizualizowane przy użyciu białka MS2 z fuzją z białkiem czerwonej fluorescencji. W tym celu, linie stabilne U2OS-HIV-24xMS2-intro (Ryc. 5) i U2OS-HIV-24xMS2-exo, zostały poddane transfekcji plasmidem pTat i pCherry-MS2-nls. Przyłączenie się Cherry-MS2-nls do sekwencji MS2 w wirusowym RNA pozwoliło na detekcję transkryptów w miejscu transkrypcji wirusa (Ryc. 5). Białko PSF i Rev kolokalizują się z HIV-1 RNA w miejscu transkrypcji wskazując na oddziaływania ko-transkrypcyjne (Ryc. 5, środkowy i dolny panel). MATR3 natomiast, nie wiązało się do RNA w miejscu transkrypcji wskazując na po-transkrypcyjne oddziaływania z wirusowym RNA (Ryc. 5, górny panel).

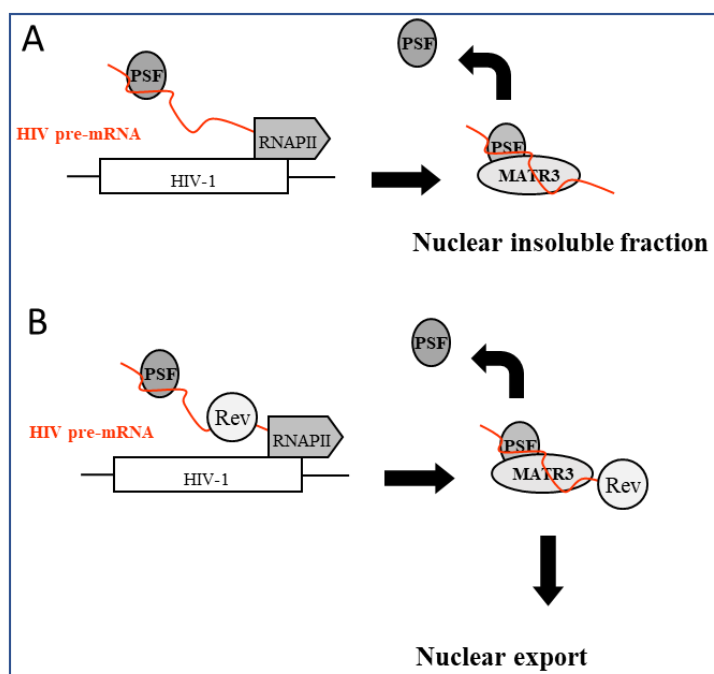


Rycina 5. Ocena lokalizacji białek MATR3, PSF i Rev względem miejsca transkrypcji wirusa HIV-1 w komórkach U2OS-HIV-24xMS2-intro. Komórki zostały poddane transfekcji plasmidami pTat (aby aktywować transkrypcję z promotora w LTR), pCherry-MS2nls i wektorami wyrażającymi MATR3, PSF lub Rev z metką zielonej fluorescencji. Komórki zostały utrwalone i obrazowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Miejsce transkrypcji wirusa HIV-1 jest zobrazowane przez wiązanie się cherry-MS2nls i jest zaznaczone białą strzałką. *Rycina opublikowana w Kula et al., Virology 2013.*

W dalszej części pracy, komórki U2OS zostały poddane biochemicznemu frakcjonowaniu w celu uzyskania frakcji cytoplazmatycznej, nucleoplazmatycznej i frakcji zawierającej macierz jądrową. RT-qPCR do US HIV-1 RNA ukazała retencję wirusowego RNA we frakcji macierzy jądrowej, w której obecna jest MATR3. Ekspresja w komórce białka Rev uwolniła RNA z frakcji macierzy jądrowej do pozostałych dwóch frakcji. W dalszej części, immunoprecypitacja MATR3 z frakcji macierzy jądrowej potwierdziła oddziaływanie pomiędzy MATR3 a US HIV-1 RNA. Wcześniejsze doniesienia literaturowe innych zespołów badawczych ukazały, że PSF tworzy kompleks z MATR3 na A-I [edycja z adeniny (A) na inozynę(I)] hiperedytowanym komórkowym RNA³². Natomiast w modelu stosowanym w niniejszej pracy nie wykazano A-I edycji HIV-1 RNA i oddziaływania HIV-1 RNA z białkiem komórkowym ADAR1, enzymem edytującym tę zmianę na RNA.

Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie modelu (Ryc. 6), w którym białko Rev wykorzystuje nowy szlak komórkowy z udziałem białek PSF i MATR3. Dzięki powyższym odkryciom, rysuje się scenariusz, w którym PSF reguluje stabilność nowo zsyntetyzowanego podczas transkrypcji wirusowego RNA, które następnie jest uwalniane z miejsca transkrypcji i translokowane w obecności

PSF do MATR3. MATR3 z kolei bierze udział w retencji RNA w macierzy jądrowej. US RNA, zawierające introny jest chronione (najprawdopodobniej przed degradacją i splicingiem) w strukturze jądrowej zawierającej MATR3. Białko Rev promuje eksport US RNA oddziałując z MATR3 w macierzy jądrowej i uwalnia to wirusowe RNA przez nucleoplazmę do cytoplazmy. Retencja US RNA w jądrze przy udziale MATR3 i PSF stanowi nowy mechanizm po-transkrypcyjnej regulacji Rev-zależnych transkryptów i ekspresji genów wirusowych. MATR3 i PSF stanowią zatem nowe cele terapeutyczne.



Rycina 6. Schemat regulacji pre-mRNA wirusa HIV-1 przez PSF i MATR3. W miejscu transkrypcji HIV-1 pewna część HIV-1 pre-mRNA jest wiązana przez PSF i kierowana do przedziałów MATR3 w nierozpuszczalnej frakcji jądra (A). PSF oddziałuje z MATR3, ale jest uwalniany z nierozpuszczalnej frakcji jądra (A). Rev przejmuje tę ścieżkę molekularną celem eksportu wirusowego RNA z jądra (B). Schemat opublikowany w Kula A et al., *Virology* 2013.

Skojarzone podanie dwóch klas LRA celem synergistycznego wybudzenia HIV-1 z latencji.

Charakterystyka potencjału reaktywacji i mechanizmu działania antagonistów PKC w skojarzeniu z aktywatorami P-TEFb.

W trzeciej publikacji z osiągnięcia naukowego badano potencjał reaktywacyjny i mechanizm molekularny skojarzonego podania dwóch klas LRA tj. agonistów kinazy PKC i aktywatorów P-TEFb.

Darcis G*, Kula A*, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-Ammar A, Delacourt N, Melard A, Kabeya K, Vanhulle C, Van Driessche B, Gatot J-G, Cherrier T, Pianowski LF, Gama L, Schwartz C, Vila J, Burny A, Clumeck N, Moutschen M, De Wit S, Peterlin M, Rouzioux C, Rohr O and Van Lint C. *An In-Depth Comparison of Latency Reversing Drug Combinations in Various*

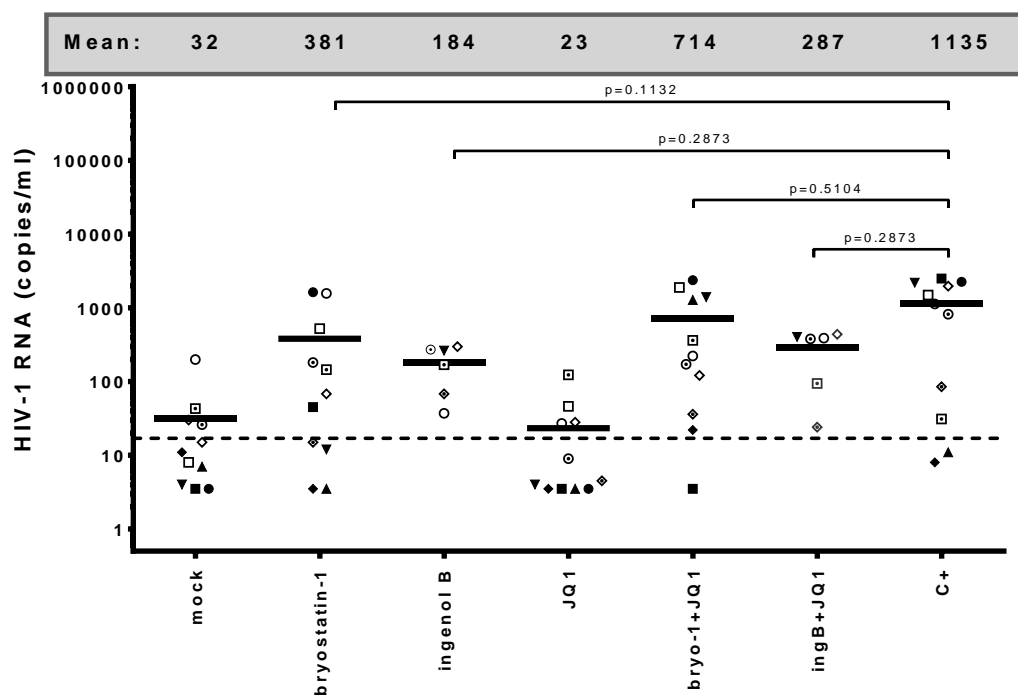
W tej pracy badano agonistów kinazy PKC, czyli prostratynę i briostatynę-1 i związki aktywujące PTEF-b, czyli JQ1, BET-I, BET-101. Szlak kinazy PKC prowadzący do aktywacji czynników transkrypcji NF- κ B i AP-1 jest jednym z najważniejszych szlaków reaktywacji HIV-1 (omówione w ¹⁰). Wcześniejsze badania z wykorzystaniem agonistów PKC potwierdziły ich działanie w reaktywacji z latencji. Przykładowo prostratyna, briostatyna-1 i ingenol-B stymulują ekspresję HIV-1 w latentnie zakażonych liniach komórek T-limfoidalnych i szpikowych i w modelach *ex vivo*. Wpływ briostatyny-1 na reaktywację z latencji wirusa HIV-1 został także oznaczony w badaniach klinicznych³³. Inhibitory BETi (ang. *Bromodomain and Extraterminal bromodomain inhibitors*) należą do związków uwalniających aktywny P-TEFb, który jest komórkowym czynnikiem elongacji transkrypcji. Jest to kompleks komórkowy składający się z dwóch białek: kinazy zależnej od cyklin 9 (CDK9) i cycT1. W komórce P-TEFb występuje w formie nieaktywnej i aktywnej. Forma nieaktywna jest sekwestrowana w cytoplazmie do kompleksu zawierającego małe jądrowe 7SK RNA i białko Hexim-1 (kompleks 7SK snRNP). Wirusowe białko Tat uwalnia aktywny P-TEFb z 7SK snRNP i rekrutuje go do promotora wirusa, z którego P-TEFb (a ściślej Cdk9) fosforyzuje C-końcową domenę polimerazy RNA II (RNAPII) i inicjuje przejście transkrypcji wirusa z fazy inicjacji w fazę elongacji. BETi uwalniają P-TEFb bezpośrednio z kompleksu 7SK snRNP. Ponadto, BETi blokują także oddziaływanie białka BRD4 (zawierającego bromodomenę) z P-TEFb, co sprzyja rekrutacji PTEFb w obecności wirusowego białka Tat do promotora wirusa HIV-1¹⁸. Wcześniejsze badania z użyciem BETi, takich jak JQ1, I-BET, I-BET151 i MS417 potwierdziły potencjał reaktywacyjny tej klasy LRA w modelach *in vitro* i *ex vivo*³⁴.

Celem niniejszego badania była ocena skojarzonego podania obiecujących terapeutycznie dwóch klas LRA w kontekście wywołania wzmożonego (synergistycznego) efektu reaktywacji wirusa. Do tego celu wykorzystano dwie latentnie zakażone linie komórkowe J-Lat 9.2 i U1. Linia J-Lat 9.2 to komórki T limfocytów CD4+, posiadające latentnego prowirusa HIV-1, który posiada gen reporterowy białka zielonej fluorescencji³⁵. Reaktywacja wirusa z latencji skutkuje ekspresją białka GFP, którego poziom jest badany cytometrią przepływową. Z kolei linia U1 to linia komórkowa monocytarna powstała na skutek latentnej infekcji komórek U-937³⁶. Do badania poziomu reaktywacji przy użyciu różnych LRA, użyto następujące techniki pomiaru reaktywacji wirusa z latencji: (i) pomiar antygenu p24 w środowisku zewnątrzkomórkowym metodą ELISA, (ii) RT-qPCR w celu wykrycia wewnątrzkomórkowych transkryptów wirusa HIV-1 i (iii) cytometrię przepływową w celu pomiaru

ilości komórek wyrażających białko zielonej fluorescencji w przypadku linii J-Lat 9.2. W pierwszej części manuskryptu, zbadano profil reaktywacji agonistów PKC w skojarzeniu z BETi i oznaczono suboptymalne stężenia tych związków wywołujące najsilniejszy efekt synergistyczny w obydwóch liniach komórkowych. W drugiej części, wyznaczone kombinacje związków LRA zostały zbadane w hodowlach *ex vivo* komórek PBMC i w spoczynkowych limfocytach T CD4+ izolowanych od awiremicznych pacjentów leczonych antyretrowirusowo. W modelach *ex vivo* wykorzystano ultraczułą metodę RT-qPCR w celu pomiaru poziomu wewnątrzkomórkowego RNA wirusa i poziomu genomowego RNA w wirionach uwolnionych do medium hodowlanego (Ryc. 7). Zidentyfikowano, iż związek JQ1 w połączeniu z briostatyną-1 wybudza wirusa z latencji w stopniu porównywalnym do stymulacji przeciwciałami anti-CD3+anti-CD28, które stanowiły kontrolę maksymalnej reaktywacji (Ryc. 7).

W kolejnej części manuskryptu skupiono się na charakterystyce mechanizmu molekularnego synergistycznej reaktywacji. Wykazano, iż skojarzone, a nie indywidualne, podanie agonistów PKC z BETi uwolniło białko Hexim-1 z kompleksu P-TEFb przy zastosowaniu metody immunoprecypitacji i Western blott. Ponadto, metodą EMSA (z ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) wykazano, iż skojarzone podanie JQ1+briostatyna-1, zwiększyło wiązanie białka NF-κB do promotora wirusa HIV-1 niż samo podanie briostatyny-1. Dodatkowo wykorzystując reporterowy wektor wyrażający białko lucyferazy, którego ekspresja jest kontrolowana z promotora LTR wykazano synergistyczną aktywację ekspresji lucyferazy po dodaniu JQ1+briostatyna i brak reaktywacji w przypadku wektora zawierającego mutacje w sekwencjach NF-κB w promotorze LTR. Ponadto, stosując znane inhibitory szlaku NF-κB (BAY-11-6072), P-TEFb (flawipirydol) i NFAT (cyklosporyna A), wykazano wpływ tych dwóch pierwszych na reaktywację wirusa w komórkach potraktowanych kombinacją JQ1 z briostatyną-1. Te mechanistyczne dane potwierdziły, że skojarzone podanie agonistów PKC z BETi synergistycznie reaktywuje wirusa z latencji poprzez wzmożoną aktywację białek P-TEFb i NF-κB na promotorze wirusa HIV-1.

Reasumując, w tym osiągnięciu naukowym oznaczono skuteczność skojarzonego podania agonistów PKC ze związkami BETi wykazującego bardzo silny, synergistyczny efekt reaktywacji wirusa nie tylko w liniach komórkowych, ale także w hodowlach *ex vivo* komórek pacjentów. Zidentyfikowana także mechanizm działania skojarzone podanie JQ1+briostatyna-1 poprzez wzmożoną aktywację P-TEFb i NFκB. Kombinacja JQ1+briostatyna-1 może być obiecującą opcją terapeutyczną w przyszłych badaniach klinicznych.



Rycina 7. Agoniści PKC (briostatyna i ingenol) i związki uwalniające aktywny P-TEFb (JQ1) indukują ekspresję wirusa HIV-1 w hodowlach *ex vivo*. Hodowle *ex vivo* komórek PBMCs pozbawionych CD8+ izolowanych z krwi 11 pacjentów HIV+ leczonych ARV traktowano przeciwciałami anti-CD3+anti-CD28 (kontrola pozytywna), briostatyną (5nM), JQ1 (0,25µM) lub ing-B (10nM) indywidualnie lub w kombinacji. Trzy dni później oznaczano stężenie genomowego wirusowego RNA w supernatantach hodowli. Porównania statystyczne z kontrolą pozytywną są wskazane, jeśli $p > 0,05$. *Rycina opublikowana w Darcis G & Kula A et al., Plos Pathogens 2015.*

Charakterystyka potencjału reaktywacji i mechanizmu działania disulfiram w skojarzeniu z romidepsyną.

W czwartej publikacji z osiągnięcia naukowego badano potencjał reaktywacyjny kolejnych dwóch klas LRAs, disulfiram i romidepsyny w celu identyfikacji synergicznego wybudzenia z latencji w modelach komórkowych *in vitro* i *ex vivo*²⁴.

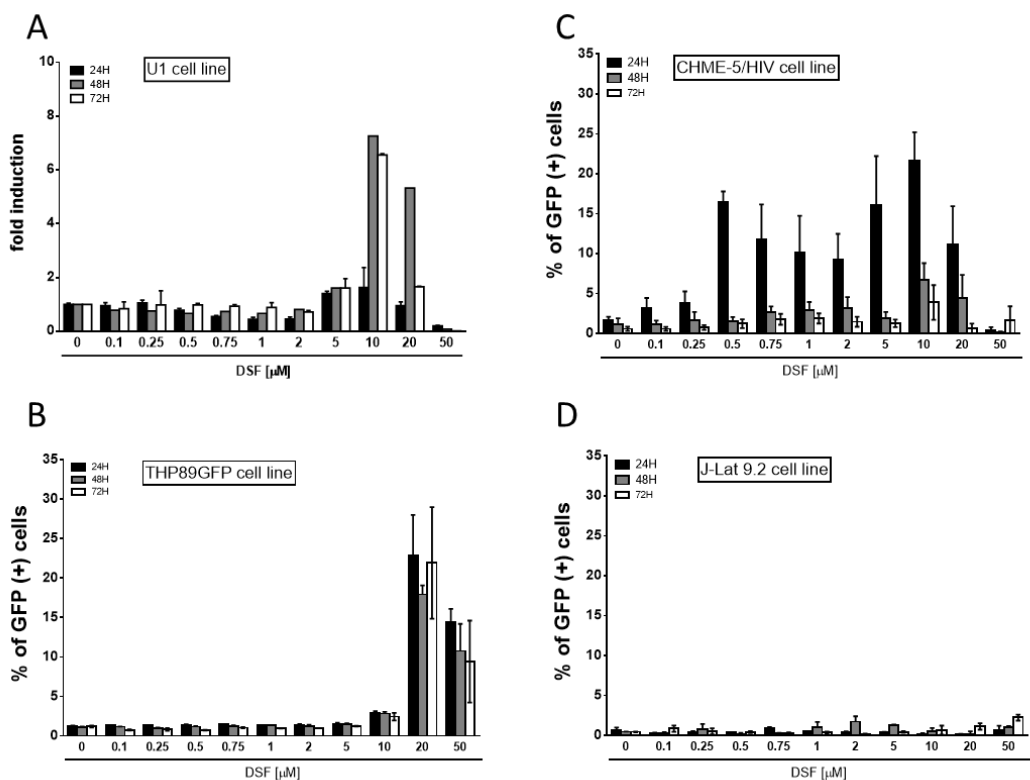
Kula A, Delacourt N, Bouchat S, Darcis G, Avettand-Fenoel V, Verdikt R, Corazza F, Necsoi C, Vanhulle C, Bendoumou M, Burny A, De Wit S, Rouzioux C, Rohr O and Van Lint O. *Heterogeneous HIV-1 reactivation patterns of disulfiram and combined disulfiram+romidepsin treatments.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2019 Apr 15;80(5):605-613.

Do badania wybrano disulfiram i romidepsynę, dwa związki, które zostały zatwierdzone przez Agencję Żywności Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*). Disulfiram od ponad 60 lat

używany jest w leczeniu alkoholizmu natomiast romidepsyna jest lekiem epigenetycznym stosowanym w leczeniu chłoniaków z obwodowych komórek T. Oba związki zostały wcześniej przebadane pod kątem reaktywacji z latencji^{22,37}, aczkolwiek ich skojarzone podanie nie było badane. Wyniki badań zespołu N. Sluis-Cremer wykazały aktywność disulfiramu w reaktywacji z latencji poprzez aktywację szlaku Akt prowadzącego do redukcji ekspresji białka PTEN i w konsekwencji aktywacji NF- κ B³⁸. Romidepsyna należy do inhibitorów deacetylaz histonowych (z ang. histone decetylase inhibitor– HDACi) i poprzez hamowanie deacetylacji na histonach reaktywuje wirusa HIV-1 z latencji jak zostało pokazane w wielu badaniach *in vitro*, *ex vivo* a także *in vivo* (omówione w³⁹).

Celem niniejszego badania była ocena potencjału reaktywacji skojarzonego podania disulfiramu z romidepsyną, dwóch terapeutycznie obiecujących LRA celem sprawdzenia, czy wykazują one efekt synergistyczny. Tak jak w poprzednim osiągnięciu, wykorzystano wiele technik pomiaru reaktywacji wirusa z latencji tj. (i) pomiar antygenu p24 w środowisku zewnątrzkomórkowym metodą ELISA (Ryc. 8A), (ii) RT-qPCR w celu wykrycia wewnątrzkomórkowych transkryptów wirusa HIV-1, (iii) cytometrię przepływową w celu pomiaru ilości komórek wyrażających białko zielonej fluorescencji w modelach THP89GFP i CHEM-5/HIV (Ryc. 5B-D). W modelach *ex vivo* wykorzystano ultraczułą metodę RT-qPCR w celu pomiaru poziomu wewnątrzkomórkowego RNA wirusa i poziomu genomowego RNA w wirionach uwolnionych do medium hodowlanego.

W pierwszej części pracy, oceniono potencjał reaktywacji samego disulfiramu w różnych latentnych liniach komórkowych celem określenia optymalnego stężenia do dalszych badań w kombinacji z romidepsyną. Wykorzystaliśmy modele komórkowe pochodzące z komórek limfocytów (J-Lat 9.2), monocytów (U1 i THP89GFP) oraz latentnie zakażone komórki mikrogleju (CHEM-5/HIV). Traktowanie komórek wzrastającym stężeniem disulfiramu ukazała różnorodny profil reaktywacji, który był zależny od badanej linii komórkowej (Ryc. 8). Disulfiram o stężeniu 10 μ M wykazał najwyższe działanie w liniach U1 (Ryc. 8A) i CHEM-5/HIV (Ryc. 8C) natomiast 20 μ M działało najlepiej w linii THP89GFP (Ryc. 8B). Ciekawym jest fakt, iż disulfiram nie wykazywał aktywności w linii J-Lat 9.2 (Ryc. 8D). Wcześniejsze wyniki badań zespołu N. Sluis-Cremer, ukazały podobne do naszych obserwacje, czyli aktywność disulfiramu w linii monocytarnej U1 oraz brak aktywności w linii J-Lat 9.2³⁸. Autorzy tych badań w dalszej części pracy wykazali, iż w przeciwieństwie to komórek U1, komórki limfocytów T nie wyrażają białka PTEN, co mogłoby wyjaśnić zależne od linii komórkowej różnice w reaktywacji. Aczkolwiek, nasze badania nie potwierdziły obserwacji zespołu N. Sluis-Cremer, gdyż zarówno linia U1 tak jak i J-Lat 9.2 nie wykazała ekspresji białka PTEN. Zatem mechanizm działania disulfiramu pozostaje nadal niejasny.



Rycina 8. Heterogeny profil reaktywacji wirusa HIV-1 pod wpływem disulfiramu. Komórki U1 (panel A), THP89GFP (panel B), CHME-5/HIV (panel C) i J-Lat 9.2 (panel D) poddano działaniu wzrastających dawek disulfiramu. W 24, 48 i 72 godziny po podaniu związku mierzono produkcję CA-p24 metodą ELISA w supernatantach komórkowych (A) lub analizowano ekspresję białek wirusowych za pomocą FACS (C, E i G). *Rycina opublikowana w Kula et al., JAIDS 2019.*

W drugiej części pracy zbadano skojarzone podanie disulfiramu z romidepsyną w trzech liniach monocytarnych (U1, THP89GFP i CHEM-5/HIV). Ponadto, badano symultaniczne lub sekwencyjne (po 24 godz. od podania disulfiramu dodano romidepsynę na kolejne 24 godziny) podanie disulfiramu i romidepsyny. Wykazano, że sekwencyjne podanie nie wykazało wzmożonej reaktywacji a jednoczesne podawanie dwóch LRA wywołało tylko słaby efekt synergistyczny w badanych liniach komórkowych. Następnie badano skojarzone podawanie disulfiramu z romidepsyną w modelu *ex vivo* komórek PBMC od awiremicznych pacjentów leczonych antyretrowirusowo. Pomiary zewnątrzkomórkowego HIV-1 RNA ukazały słaby potencjał reaktywacyjny kombinacji disulfiram+romidepsyna.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tym badaniu ukazały słaby potencjał reaktywacyjny skojarzonego podania disulfiramu i romidepsyny. Aczkolwiek, specyficzne dla danego typu komórek i odmienne wzorce reaktywacji disulfiramu podkreślają heterogeniczność latentnych rezerwuarów. Aktywność disulfiramu w komórkach mieloidalnych sugeruje, iż ten LRA uwalnia specyficzne dla tej

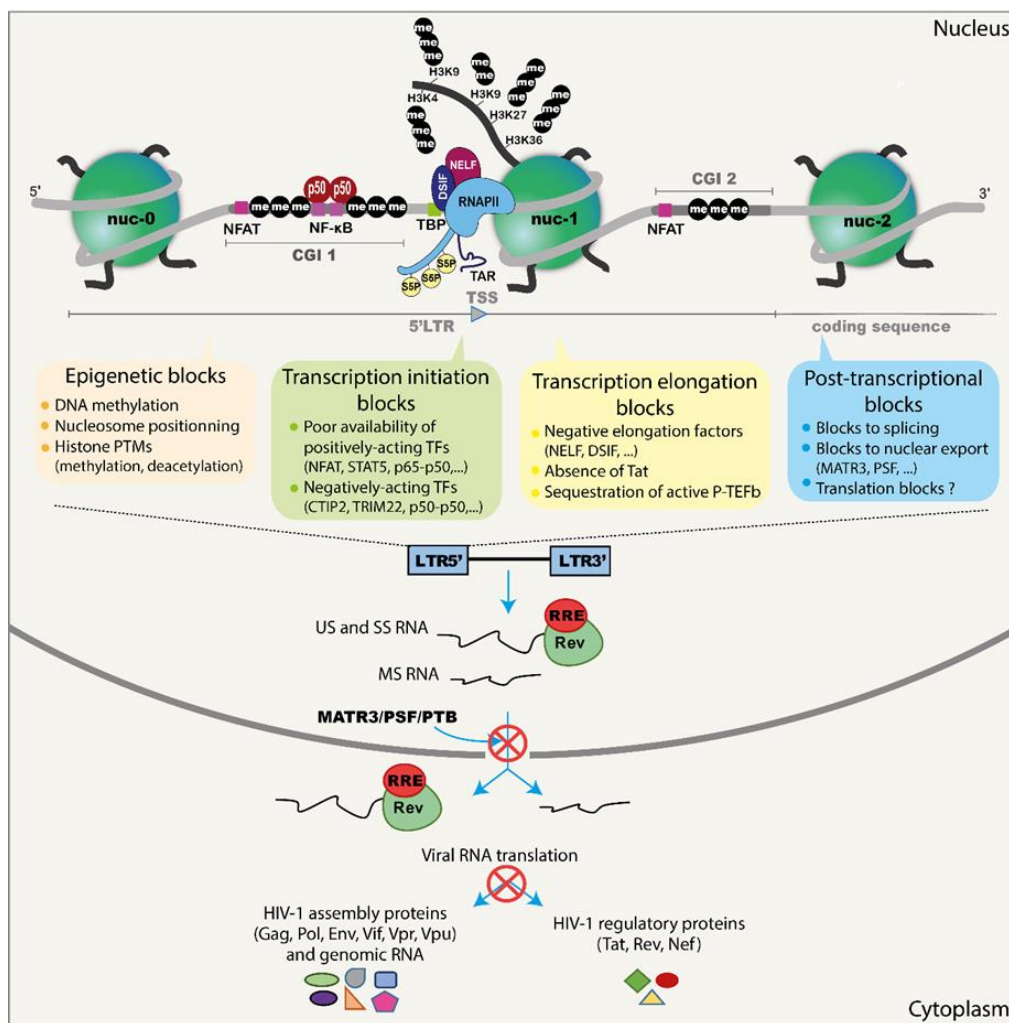
linii mechanizmy komórkowe, które nie są PTEN-zależne. Nasze badania sugerują, iż aby osiągnąć wysoki poziom reaktywacji z latencji, połączenie LRA o szerokim spektrum działania (działające w wielu typach komórek) jest konieczne. Ponadto, wykazanie w hodowlach *ex vivo* słabego efektu reaktywacji skojarzonego podania DSF+romidepsyna dyskwalifikuje tę kombinację w przyszłych badaniach klinicznych.

Badania z wykorzystaniem LRA ukazują heterogeniczność latentnych rezerwuarów.

W piątej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego⁹ podsumowano aktualny stan wiedzy na temat reaktywacji wirusa z latencji z wykorzystaniem różnych klas LRA i ich kombinacji z naciskiem na opis mechanizmów molekularnych latencji wirusa.

Ait-Ammar A*, Kula A*, Darcis G, Verdikt R, De Wit S, Gautier V, Mallon PWG, Marcello A, Rohr O, Van Lint C. *Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs*. *Front Microbiol.* 2020 Jan 24; 10:3060.

W tej pracy omówiono czynniki odpowiedzialne za heterogenne profile reaktywacji przy udziale LRA tj. (i) różnorodność typów komórek CD4+ tworzących rezerwuar (ich pochodzenie, zróżnicowanie i stan aktywacji), (ii) kompleksowość mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za latencję (blokady transkrypcji i blokady po-transkrypcyjnych mechanizmów w tym rola białek MATR3 i PSF), (iii) różnorodność genetyczna zintegrowanego wirusa (jego kompartmentalizacja w różnych tkankach i we krwi obwodowej) oraz (iv) różnice pomiędzy pacjentami (w tym genetyczne podłoże pacjenta, jego płeć, czas rozpoczęcia i trwania terapii, rodzaj terapii ART). W tej pracy podkreślono po raz pierwszy konieczność głębszego zrozumienia nie tylko mechanizmów molekularnych wyciszających wirusa na poziomie transkrypcji, ale także mechanizmów po-transkrypcyjnych (w tym związanych z MATR3 i PSF) w celu skuteczniejszej reaktywacji z latencji, gdyż obecne LRA uwalniają tylko blokady transkrypcji. Racjonalne projektowanie nowych LRA z uwzględnieniem wszystkich wyżej wspomnianych uwarunkowań mających szerokie spektrum działania nie jest obecnie możliwe ze względu na brak wiedzy na temat mechanizmów komórkowych wpływających na ekspresję genów HIV-1 i prowadzących do produktywnej replikacji wirusa.



Rycina 9. Schematyczne przedstawienie różnych bloków transkrypcyjnych i potranskrypcyjnych regulujących latencję wirusa HIV-1. Latencja wirusa jest regulowana na poziomie epigenetycznym, na poziomie inicjacji i elongacji transkrypcji, ale też na poziomie potranskrypcyjnym. Niski poziom kofaktorów białka Rev tj. MATR3, PSF lub PTB stanowią nowy blok na poziomie eksportu HIV RNA z jądra do cytoplazmy. *Rycina opublikowana w Ait-Ammar A, Kula A et al., Frontiers in Virology 2021.*

LRA i immunostymulujące strategie.

W ostatniej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego⁴⁰ podsumowano aktualny stan wiedzy na temat reaktywacji wirusa z latencji z wykorzystaniem immunostymulujących LRA i ich kombinacji z klasycznymi LRA z naciskiem na opis mechanizmów molekularnych reaktywacji.

Kula-Pacurar A[#], Rodari A, Darcis G, Van Lint C[#]. *Shocking HIV-1 with immunomodulatory latency reversing agents.* Semin Immunol 2021. 51 (2021) 101478

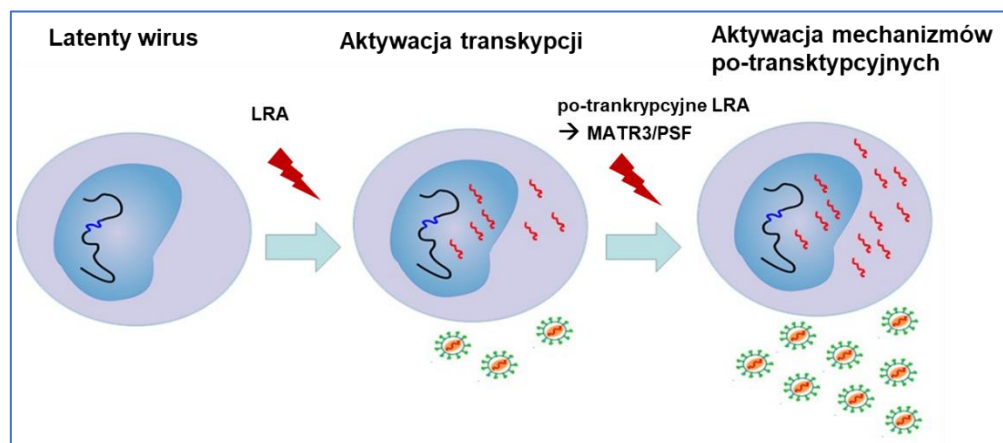
Nawet silna reaktywacja w przy użyciu skojarzonego podania LRAs może nie wystarczyć, aby zadziałał etap „kill”, czyli doszło do eliminacji latentnych rezerwuarów. W niniejszym osiągnięciu skupiono się na omówieniu specyficznej klasy LRAs, to której należą czynniki immunomodulace odpowiedź efektorową celem wzmocnienia przeciwwirusowej odpowiedzi układu immunologicznego w kierunku reaktywowanego wirusa. Ta specyficzna klasa LRA wykazująca podwójny mechanizm działania (potencjał reaktywacyjny i stymulacja odpowiedzi przeciwwirusowej) została szczegółowo omówiona w niniejszym osiągnięciu naukowym. Następujące immunomodulujące LRA zostały przedstawione: (i) blokery punktów kontrolnych (z ang. *check-point inhibitors*) tj. blokery PD-1 i TIGIT, (ii) agoniści receptorów toll-podobnych (TLR), (iii) cytokiny i (iv) przeciwciała monoklonalne pozwalające na deplecję komórek T CD8+. Szczegółowo opisano ich molekularny mechanizm działania w wybudzeniu wirusa z latencji i aktywowaniu odpowiedzi immunologicznej w różnych modelach in vitro, ex vivo i in vivo z wykorzystaniem zwierząt naczelnych lub w badaniach klinicznych z udziałem osób zakażonych HIV. Na koniec omówiono pozostałe wyzwania związane z ich wykorzystaniem w kontekście strategii leczenia HIV-1 tj. efekty uboczne stymulacji układu immunologicznego.

Podsumowanie

Prace wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego ukazują kompleksowość komórkowych i wirusowych mechanizmów molekularnych kontrolujących ekspresję genów wirusa HIV-1. Opisanie w tym osiągnięciu naukowym badania nad wirusem HIV-1, który po integracji do genomu zachowuje się jak ludzki gen, dostarczyły nowych informacji o mechanizmach komórkowych (retencja RNA w jądrze komórkowym przez kompleks białkowy PSF/MATR3) a badania z wykorzystaniem LRA ukazały heterogeniczność latentnych rezerwuarów uwarunkowaną różnorodnością mechanizmów regulujących latencję. Moje badania przyczyniły się do głębszego zrozumienia replikacji wirusa HIV-1 co może być przydatne w poszukiwaniu przyszłych nowatorskich podejść terapeutycznych, w których nie tylko transkrypcyjne, ale także po-transkrypcyjne mechanizmy powinny być modulowane (Ryc. 10).

Zidentyfikowanie i scharakteryzowanie MATR3 i PSF jako nowych kofaktorów wirusowego białka Rev (publikacja nr. 1 i nr. 2), które jest kluczowe w kontrolowaniu produktywnej infekcji, mogą stanowić zatem nowe po-transkrypcyjne cele molekularne w kontekście zwiększenia skuteczności terapii „shock-and-kill”. Obecnie testowane LRA uwalniają wyłącznie mechanizmy represji transkrypcji wirusa, co może być jedną z przeszkód ograniczającą sukces terapii „shock-and-kill”. Dlatego dalsze badania nad mechanizmami po-transkrypcyjnymi (w tym MATR3 i PSF) są konieczne z celu

identyfikacji nowych LRA i ich kombinacji uwalniających blokady po-transkrypcyjne, co jest obecnie moim głównym celem naukowym (Ryc. 10).



Rycina 10. Sposób zwiększenia reaktywacji z latencji wirusa HIV-1 polegający na uwolnieniu blokad transkrypcji (przy użyciu LRA) i na poziomie po-transkrypcyjnym ekspresji genów wirusa (np. poprzez modulację kofaktorów białka Rev).

Badanie różnych klas związków LRA i ich kombinacji jest istotne, aby zwiększyć działanie etapu „shock”. Badania ukazane w publikacji nr. 3 pozwoliły zidentyfikować kombinację dwóch klas LRA, agonistów PKC z aktywatorami P-TEFb (JQ1+bryo-1) i scharakteryzować mechanizm synergicznej reaktywacji polegający na zwiększonym uwolnieniu aktywnego P-TEFb i NF- κ B (publikacja nr. 3). Potwierdzono zatem koncepcję współadministrowania dwóch różnych typów LRA jako perspektywa terapeutyczna. W czwartej publikacji, koadministracja disulfiramu i romidepsyny nie wykazała korzystnego efektu, ale ukazała heterogeniczność reaktywacji disulfiraniem, która była zależna od typu latentnie zakażonej linii komórkowej. Heterogeniczność latentnych rezerwarów została scharakteryzowana właśnie dzięki badaniom reaktywacji przy użyciu LRA (włączając publikację nr. 4) co zostało szczegółowo podsumowane w publikacji nr. 5. Należy podkreślić, że nawet silna (działająca zarówno na etapie transkrypcji i na mechanizmy po-transkrypcyjne) i o szerokim spektrum działania (działająca w różnych typach latentnie zakażonych komórkach) aktywacja ekspresji wirusa HIV-1 może nie wystarczyć, aby wyeliminować reaktywowane komórki. Dodatkowe interwencje są zatem potrzebne, takie jak immunostymulujące strategie wzmacniania przeciwwirusowych funkcji efektorowych układu odpornościowego co zostało omówione w publikacji nr. 6. Nowatorskie podejścia, w tym technologie jednokomórkowe powinny być także brane pod uwagę, aby lepiej zrozumieć, dlaczego wirus w jednej komórce ulega reaktywacji podczas gdy, w innych nie. To jest istotne, aby skutecznie strategię "shock-and-kill" i miejmy nadzieję, osiągnąć całkowite wyleczenie.

Zrozumienie mechanizmów molekularnych i komórkowych warunkujących heterogeniczność latentnych rezerwuarów stanowi kluczowe wyzwanie w wyścigu uzyskania wyleczenia HIV-1/AIDS i te osiągnięcie naukowe zaprezentowane tej pracy przybliży nas do celu.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Studia magisterskie ukończyłam na Uniwersytecie Gdańskim w 2005. Pracę magisterską ze specjalizacji Biologia Molekularna wykonałam pod opieką prof. Michała Obuchowskiego i prof. Grzegorza Węgrzyna. Podczas studiów odbyłam 3-miesięczny staż (lipiec-wrzesień 2004) w firmie biotechnologicznej Bioserch Technologies w ramach programu Work&Travel (Novato, Kalifornia, USA). Studia doktoranckie odbyłam w Międzynarodowym Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (ICGEB) w Trieście afiliowanym z Open University (Wielka Brytania) pod opieką prof. Alessandro Marcello. Po uzyskaniu stopnia doktora (2009), pracowałam jako post-doc w tej samej grupie badawczej dzięki otrzymaniu stypendium Marie Curie (2 lata). Badania prowadzone w tym okresie zostały ujęte w dwóch manuskryptach (manuskrypt nr. 1 i nr. 2). W latach 2012-2013 miałam 11-miesięczny urlop macierzyński. Następnie (luty 2013) rozpoczęłam drugie studia podoktoranckie w Instytucie Biologii Molekularnej i Medycznej w Gosselies (Belgia) Wolnego Uniwersytetu Brukselskiego w grupie prof. Carine Van Lint. Podczas tego stażu uczestniczyłam w projekcie badawczym dotyczącym identyfikacji synergicznej kombinacji różnych klas LRAs w kontekście terapii „shock-and-kill”. Wyniki mojej pracy zostały zamieszczone w dwóch manuskryptach (manuskrypt nr. 3 i 4), gdzie jestem pierwszym autorem lub współautorem. W okresie 4 lat w grupie Carine Van Lint brałam udział w wielu projektach, które zaowocowały 8 publikacjami, w których jestem współautorem, opublikowanych w prestiżowych czasopismach tj. Plos Pathogens, czy EMBO Molecular Medicine. Podczas tego pobytu odbyłam dwa krótkie staże (Szpital Necker w Paryżu i Akademickie Centrum Medyczne w Amsterdamie), dotyczące szkolenia w zakresie ultraczułych technik molekularnych oznaczenia wirusowego RNA w komórkach od pacjentów. Na przełomie 2016/2017, miałam 5-miesięczną przerwę w związku z urlopem macierzyńskim (od listopada 2016 do marca 2017). W kwietniu 2017 rozpoczęłam pracę jako asystent naukowy w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego jako kierownik projektu badawczego w ramach projektu naukowego finansowanego przez Unię Europejską i Narodowe Centrum Nauki (POLONEZ COFUND).

Od 2019 pracuję na stanowisku adiunkta w MCB, UJ. Od momentu przyjazdu do Polski (po 14 latach za granicą) rozpoczęłam rozwijanie własnej ścieżki badawczej opartej na identyfikacji po-transkrypcyjnych mechanizmów komórkowych regulujących latencję wirusa HIV.

Współpracuję z wieloma ośrodkami zagranicznymi tj.

- Uniwersytet Strasburski (Francja) – prof. Olivier Rohr
- Uniwersytet w Tartu (Estonia) – prof. Mati Karelson and dr Simona Selberg
- Uniwersytet Helsiński (Finlandia) – prof. Ezko Kankuri
- Wolny Uniwersytet Brukselski (Belgia) – prof. Carine Van Lint
- Uniwersytet w Amsterdamie (Holandia) – dr Alexander Pasternak
- Katolicki Uniwersytet w Leuven (Belgia) – prof. Zeger Debyser

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne

Podczas doktoratu byłam współopiekunem pracy magisterskiej (Jessica Guerra), obronionej w 2009 roku w Uniwersytecie w Bolonii (Włochy). Podczas studiów podoktoranckich we Włoszech byłam współopiekunem pracy magisterskiej (Danijela Kleva) obronionej w 2010 roku w Uniwersytecie w Trieście (Włochy). Jedna praca licencjacka (Jakub Wadas, 2020) oraz jedna praca magisterska (Piotr Nester, 2019) zostały wykonane odpowiednio w ramach projektów POLONEZ i Sonata BIS, w których pełniłam funkcję kierownika projektu i opiekuna naukowego oby dwóch prac. Ponadto, byłam opiekunem naukowym pracy rocznej (Łukasz Ważny, 2020). Byłam także promotorem pracy magisterskiej pana Jakuba Wadasa (obrona pracy wrzesień 2022) i obecnie jestem promotorem pracy magisterskiej pana Kamila Lalika. Byłam również recenzentem prac zagranicznych tj. dwóch prac doktorskich (Marco de Rovere, Uniwersytet Strasburski 2020, i Simona Selberg, Uniwersytet w Tartu, 2021) i jednej pracy magisterskiej (Ross Murtagh, Uniwersytet w Dublinie, 2021).

Obecnie jestem promotorem pomocniczym trzech rozpraw doktorskich (promotor: prof. Krzysztof Pyrc) w ramach Szkoły Doktorskiej MCB:

- Agnieszka Suder (wykonawca w ramach grantu NCN Sonaty Bis)
- Haidera Ali (wykonawca w ramach grantu NCN Sonaty Bis)
- Jakub Wadas (wykonawca w ramach grantu NCN OPUS)

Dodatkowo jestem opiekunem naukowym w ramach grantu PRELUDIUM (PI: Haider Ali).

Od 2019 prowadzę raz w roku wykład pt. „Postępy w leczeniu infekcji wirusowych - HIV” dla V roku Farmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w ramach fakultetu „Postępy z zakresie chemioterapii chorób infekcyjnych”.

Osiągnięcia organizacyjne

W kwietniu 2017 rozpoczęłam pracę w Uniwersytecie Jagiellońskim w ramach grantu POLONEZ. Po 14-sto letnim pobycie zagranicznym, który pozwolił na zdobycie wiedzy i doświadczenia z biologii molekularnej wirusa HIV-1, zbudowałam warsztat badawczy w zakresie tej tematyki w Małopolskim Centrum Biotechnologii, które posiada laboratorium BSL3. Od kwietnia 2019 jestem kierownikiem grantu Sonata BIS, który finansuje pracę zespołu badawczego składającego się z dwóch doktorantów. Od kwietnia 2023 jestem także kierownikiem grantu OPUS, który finansuje stypendium dla kolejnego doktoranta. Jako kierownik projektów Sonata Bis i OPUS jestem odpowiedzialna za organizację pracy mojego zespołu, składającego się z trzech doktorantów i jednego magistranta. Ponadto od lipca 2020 jestem kierownikiem projektu w ramach komercyjnych badań klinicznych dotyczących szczepionki na HIV-1. Moje doświadczenie w pracy zakaźnej z tym wirusem i znajomość technik, które są wymagane do tych badań klinicznych pozwoliły na zorganizowanie badań w Małopolskim Centrum Biotechnologii. Ze względu na poufność danych szczegółowe informacje nie mogą być tutaj ujawnione, aż do sfinalizowania usług laboratoryjnych (III/IV kwartał 2023). Moją rolę było szkolenie personelu, koordynacja usług laboratoryjnych związanych z przetwarzaniem i transportem próbek, opieka nad laboratorium BSL3 w ramach badania, przygotowywanie raportów i audytów.

Osiągnięcia popularyzatorskie nauki

Angażowałam się również w wydarzenia popularyzujące naukę. W 2018 r. zorganizowałam wydarzenie pod nazwą " Fascynujący mikroświat” w Małopolskim Centrum Biotechnologii dla dzieci z lokalnego Samorządowego Przedszkola Nr 5. Ponadto zorganizowałam dwa zajęcia w latach 2019 i 2021 w tym samym przedszkolu dotyczące higieny osobistej i wirusów w kontekście SARS-CoV-2 pandemii. Dodatkowo w 2022 uczestniczyłam w zajęciach dydaktycznych dotyczących mikrobiologii i obserwacji pod mikroskopem świetlnych w ramach zajęć w Szkole Podstawowej nr 134 w Krakowie.

- 7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

Moje badania znane są z identyfikacji czynników komórkowych MATR3 i PSF jako kofaktorów wirusowego białka Rev odgrywających rolę w po-transkrypcyjnym eksporcie RNA HIV-1^{5,6}. Jako pierwsi podkreśliliśmy znaczenie mechanizmów po-transkrypcyjnych i MATR3 w latencji i reaktywacji^{9,41}. Rozwijałam również strategie "shock-and-kill" celem scharakteryzowania potencjału reaktywacyjnego różnych klas LRA^{19,20,24,42}.

Moje obecne zainteresowania badawcze to dalsza charakterystyka słabiej zbadanych po-transkrypcyjnych mechanizmów u podstaw ekspresji genów HIV-1 w kontekście poszukiwań nowatorskich podejść terapeutycznych zakażenia HIV/AIDS (Suder et al., w przygotowaniu). Współpracuję z ekspertami z różnych dyscyplin, takich jak chemia (prof. M. Karelson, Estonia) i biofizyka (dr M. Maiuri, Włochy) oraz ekspertami w dziedzinie "shock-and-kill" (prof. C. Van Lint, Belgia i dr A. Pasternak, Holandia). Od 2020 roku podjęłam temat epitranskryptomiki jako nowy po-transkrypcyjny cel molekularny w kontekście reaktywacji z latencji (Haider et al, w przygotowaniu). Dzięki współpracy z prof. M. Karelson, badamy potencjał reaktywacji różnych związków modulujących ścieżkę modyfikacji RNA w ramach grantu Sonata BIS i nowo uzyskanego grantu PRELUDIUM.

W swojej działalności zawodowej brałam udział w pięciu krajowych i zagranicznych projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), Komisję Europejską, i Instytut Pasteura w Belgii. Brałam również udział w badaniach prowadzonych w ramach projektu europejskiego EU4HIVCUREH2020- MSCA-RISE-2015. Wszystkie te projekty wymagały zastosowania różnych modeli latencji wirusa HIV i różnych technik molekularnych, co było ważne dla mojego rozwoju naukowego i poszerzyła znajomości w środowisku naukowym. Różnorodność tematów badawczych znacznie poszerzyła moje horyzonty naukowe. Obecnie jestem kierownikiem dwóch projektów naukowych finansowanych przez NCN tj. Sonata Bis i OPUS. Dodatkowo jestem opiekunem naukowych grantu Preludium. Obecnie we współpracy z prof. Zeger Debyser (KU Leuven, Belgia) przygotowałam kolejne dwa wnioski grantowe: CELSA finansowane przez Uniwersytet Leuven (CELSA KU Leuven Research Funds) i Weave Unisono współfinansowane przez FWO i NCN, które są na etapie ewaluacji.

Jako naukowiec, jestem również zaangażowana w przygotowanie recenzji dla różnych czasopism, takich jak Scientific Reports, FEBS, Frontiers, Viruses Research, Plos One i innych. Byłam także redaktorem gościnnym zbioru artykułów dotyczących molekularnych mechanizmów latencji i reaktywacji z latencji wirusa HIV-1 w czasopiśmie Frontiers in Virology⁴³. Ponadto, od 2020 jestem członkiem panelu ekspertów oceniających projekty programu współpracy Światowej Akademii Nauk (TWAS)-IsBD UNESCO: „Joint Research & Technology Transfer Grant. Od 2015 jestem członkiem

Europejskiego Towarzystwa AIDS, a od 2019 Polskiego Towarzystwa AIDS. Uczestniczyłam w ponad 30 międzynarodowych konferencjach i spotkaniach, w tym w konferencji „Retroviruses” Cold Spring Harbor (NY, USA), warsztatach EMBO tj. "RNA Quality Control" (Wiedeń, Austria) i "Human RNA Viruses" (Istambuł, Turcja). Obecnie biorę udział w organizacji warsztatów w zakresie “Health care professional’s capacity building for early detection and response to public health emergencies” dotyczące zdrowia publicznego w Europie Środkowej i Południowo-Wschodniej” w ramach projektu Inicjatywy Środkoeuropejskiej (CEI - Central European Initiative). Warsztaty odbędą się 17-18 października 2023 w Kiszyniowie (Mołdawia).

Moje badania dają mi możliwość współpracy również z sektorem gospodarki. W ramach badań klinicznych nad szczepionką HIV-1 współpracuje z firmą zagraniczną, której nazwy nie mogę ujawnić ze względu na poufność danych. Od czerwca 2023, jestem także członkiem rady doradczej firmy Chemestmed z Estonii (<https://www.chemestmed.com/#team>), która specjalizuje się w syntezie związków epigenetycznych. Moja wcześniej nawiązana współpraca z naukowcami z Uniwersytetu w Tartu (Estonia) i w Helsinkach (Finlandia) w ramach reaktywacji wirusa HIV-1 a epitranskryptomiki pozwoliła na te nowe kontakty z firmą.

Podsumowanie danych bibliometrycznych mojej aktywności naukowej przedstawiłam poniżej:

Tabela 1. Informacje bibliometryczne na podstawie baz danych Scopus i Web of Science z dnia 27.04.2023.

	Publikacje przed doktoratem	Publikacje po doktoracie	SUMA
Liczba publikacji	1	21	22
Liczba cytowań	Web of Science: 56	Web of Science: 784	Web of Science: 840
Liczba cytowań bez autocytowań	Web of Science: 53	Web of Science: 758	Web of Science: 811
Impact factor (IF)	13,783	122,993	136,776
Punkty MNiSW	200	2370	2470

Indeks Hirscha: **13** (Web of Science)

Literatura:

1. Sarturi, J. M. *et al.* Chalcogenium-AZT Derivatives: A Plausible Strategy To Tackle TheRT-Inhibitors-Related Oxidative Stress While Maintaining Their Anti-HIV Properties. *Curr. Med. Chem.* **30**, 2449–2462 (2023).

2. Kula, A. & Marcello, A. Dynamic Post-Transcriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Biology* **1**, 116–133 (2012).
3. Malim, M. H. & Cullen, B. R. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6180–6189 (1993).
4. Yedavalli, V. S. R. K., Neuveut, C., Chi, Y., Kleiman, L. & Jeang, K.-T. Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* **119**, 381–392 (2004).
5. Kula, A., Gharu, L. & Marcello, A. HIV-1 pre-mRNA commitment to Rev mediated export through PSF and Matrin 3. *Virology* **435**, 329–340 (2013).
6. Kula, A. *et al.* Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies Matrin 3 as a nuclear cofactor of Rev function. *Retrovirology* **8**, 60 (2011).
7. Yedavalli, V. S. R. K. & Jeang, K.-T. Matrin 3 is a co-factor for HIV-1 Rev in regulating post-transcriptional viral gene expression. *Retrovirology* **8**, 61 (2011).
8. Modem, S. Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Res.* **33**, 873–879 (2005).
9. Ait-Ammar, A. *et al.* Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front. Microbiol.* **10**, 3060 (2019).
10. Van Lint, C., Bouchat, S. & Marcello, A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* **10**, 67 (2013).
11. Dieudonné, M. *et al.* Transcriptional competence of the integrated HIV-1 provirus at the nuclear periphery. *EMBO J.* **28**, 2231–2243 (2009).
12. Marcello, A., Dhir, S. & Dieudonné, M. Nuclear positional control of HIV transcription in 4D. *Nucleus* **1**, 8–11 (2010).
13. Verdikt, R. *et al.* Novel role of UHRF1 in the epigenetic repression of the latent HIV-1. *eBioMedicine* **79**, 103985 (2022).
14. Lassen, K. G., Ramyar, K. X., Bailey, J. R., Zhou, Y. & Siliciano, R. F. Nuclear Retention of Multiply Spliced HIV-1 RNA in Resting CD4+ T Cells. *PLoS Pathog.* **2**, e68 (2006).
15. Huang, J. *et al.* Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* **13**, 1241–1247 (2007).
16. Norton, N. J., Mok, H. P., Sharif, F., Hirst, J. C. & Lever, A. M. L. HIV Silencing and Inducibility Are Heterogeneous and Are Affected by Factors Intrinsic to the Virus. *mBio* **10**, e00188-19 (2019).
17. Li, Z., Guo, J., Wu, Y. & Zhou, Q. The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 277–287 (2013).
18. Bartholomeeusen, K., Xiang, Y., Fujinaga, K. & Peterlin, B. M. Bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain inhibition activate transcription via transient release of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from 7SK small nuclear ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* **287**, 36609–36616 (2012).
19. Bouchat, S. *et al.* Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol. Med.* **8**, 117–138 (2016).
20. Darcis, G. *et al.* An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatin-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.* **11**, e1005063 (2015).
21. Bullen, C. K., Laird, G. M., Durand, C. M., Siliciano, J. D. & Siliciano, R. F. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat. Med.* **20**, 425–429 (2014).
22. Elliott, J. H. *et al.* Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *Lancet HIV* **2**, e520-529 (2015).
23. Spivak, A. M. *et al.* A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **58**, 883–890 (2014).
24. Kula, A. *et al.* Heterogeneous HIV-1 Reactivation Patterns of Disulfiram and Combined Disulfiram+Romidepsin Treatments. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999** **80**, 605–613 (2019).

25. Pederson, T. Half a Century of "The Nuclear Matrix". *Mol. Biol. Cell* **11**, 799–805 (2000).
26. Marcello, A. & Giaretta, I. Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase from a bicistronic HIV1 vector. *Res. Virol.* **149**, 419–431 (1998).
27. Prasanth, K. V. *et al.* Regulating Gene Expression through RNA Nuclear Retention. *Cell* **123**, 249–263 (2005).
28. Zhang, Z. & Carmichael, G. G. The Fate of dsRNA in the Nucleus. *Cell* **106**, 465–476 (2001).
29. Shav-Tal, Y. & Zipori, D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* **531**, 109–114 (2002).
30. Emili, A. *et al.* Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA N. Y. N* **8**, 1102–1111 (2002).
31. Zolotukhin, A. S. *et al.* PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6618–6630 (2003).
32. Phuphuakrat, A. *et al.* Double-Stranded RNA Adenosine Deaminases Enhance Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteins. *J. Virol.* **82**, 10864–10872 (2008).
33. Gutiérrez, C. *et al.* Bryostatins for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS* **30**, 1385–1392 (2016).
34. Banerjee, C. *et al.* BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1147–1154 (2012).
35. Jordan, A. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.* **22**, 1868–1877 (2003).
36. Folks, T. M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C. A. & Fauci, A. S. Cytokine-Induced Expression of HIV-1 in a Chronically Infected Promonocyte Cell Line. *Science* **238**, 800–802 (1987).
37. Sogaard, O. S. *et al.* The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLOS Pathog.* **11**, e1005142 (2015).
38. Doyon, G., Zerbato, J., Mellors, J. W. & Sluis-Cremer, N. Disulfiram reactivates latent HIV-1 expression through depletion of the phosphatase and tensin homolog. *AIDS* **27**, F7–F11 (2013).
39. Zerbato, J. M., Purves, H. V., Lewin, S. R. & Rasmussen, T. A. Between a shock and a hard place: challenges and developments in HIV latency reversal. *Curr. Opin. Virol.* **38**, 1–9 (2019).
40. Kula-Pacurar, A., Rodari, A., Darcis, G. & Van Lint, C. Shocking HIV-1 with immunomodulatory latency reversing agents. *Semin. Immunol.* **51**, 101478 (2021).
41. Sarracino, A. *et al.* Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression during Replication and Reactivation from Latency by Nuclear Matrix Protein MATR3. *mBio* **9**, e02158-18 (2018).
42. Darcis, G. *et al.* Reactivation capacity by latency-reversing agents ex vivo correlates with the size of the HIV-1 reservoir. *AIDS Lond. Engl.* **31**, 181–189 (2017).
43. Pasternak, A. O., Rohr, O., Van Lint, C. & Kula-Pacurar, A. Editorial: The relevance of molecular mechanisms in HIV-1 latency and reactivation from latency. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, 1190867 (2023).