



Dr hab. n. med. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN
Kierownik Pracowni Wirusologii
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk
w Łodzi

Łódź, dnia 25 listopada 2023 r.

**Ocena osiągnięcia naukowego oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
Pani dr Anny Kuli-Păcurar w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**

Podstawa formalna recenzji

Recenzja została przygotowana w związku z decyzją Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o powołaniu mnie na recenzenta dorobku naukowego w postępowaniu habilitacyjnym Pani dr Anny Kuli-Păcurar w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzję wykonano w oparciu o materiały dostarczone przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Przedstawione do oceny materiały odpowiadają ustawowym wymogom postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego i pozwalają na przeprowadzenie oceny dorobku Pani dr A. Kuli-Păcurar w zakresie:

- 1) osiągnięcia naukowego pt. „*Charakterystyka mechanizmów molekularnych replikacji ludzkiego wirusa niedoboru odporności w poszukiwaniu nowatorskich podejść terapeutycznych*”,
- 2) aktywności naukowej realizowanej w uczelniach i instytucjach naukowych, w szczególności zagranicznych,
- 3) osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę.

Ocena osiągnięć Kandydatki została dokonana na podstawie art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

Przebieg kariery naukowej

Dr n. przyr. Anna Kula-Păcurar jest absolwentką Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie w 2005 r. na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii uzyskała tytuł magistra biologii ze specjalizacją biologia molekularna. Praca magisterska pt. „*Lokalizacja kinazy PrkC w komórkach Bacillus subtilis*” realizowana była pod kierunkiem prof. dr. hab. Michała Obuchowskiego i prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna. W trakcie studiów dr A. Kula-Păcurar odbyła 3-miesięczny staż w firmie biotechnologicznej LGC Biosearch Technologies wNovato (USA). Habilitantka odbyła studia doktoranckie w Międzynarodowym Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, ICGEB) w Trieście (Włochy) pod opieką dr. Alessandro Marcello. Habilitantka uzyskała stopień naukowy

doktora nauk przyrodniczych w 2009 r. na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Identification and characterization of protein complexes involved in HIV-1 RNA biogenesis, processing, and export*”. Następnie dr A. Kula-Păcurar otrzymała stypendium CERES (Central-European Initiative and Marie Curie Actions), w ramach którego w latach 2009-2012 odbyła staż podoktorski w ICGEB w grupie badawczej dr. A. Marcello. W latach 2013-2016 Habilitantka odbyła kolejny staż podoktorski w Instytucie Biologii Molekularnej i Medycznej Wolnego Uniwersytetu Brukselskiego (Institute of Molecular Biology and Medicine, Université Libre de Bruxelles, IMBM ULB) w Gosselies (Belgia), w grupie prof. Carine Van Lint. Od 2017 r. dr A. Kula-Păcurar rozpoczęła pracę w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (MCB UJ) w Krakowie, początkowo jako asystent naukowy, a od 2019 roku do chwili obecnej - na stanowisku adiunkta.

Ocena osiągnięcia naukowego przedstawionego w postaci cyklu powiązanych tematycznie artykułów

Dr A. Kula-Păcurar jako osiągnięcie naukowe przedstawiła cykl sześciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. „*Charakterystyka mechanizmów molekularnych replikacji ludzkiego wirusa niedoboru odporności w poszukiwaniu nowatorskich podejść terapeutycznych*”. W skład cyklu wchodziły cztery artykuły oryginalne oraz dwie prace przeglądowe opublikowane w recenzowanych i cenionych czasopismach naukowych z listy JCR. Artykuły oryginalne zostały opublikowane w latach 2011-2019 w *Retrovirology*, *Virology*, *PLoS Pathogens* oraz *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, natomiast prace przeglądowe opublikowano w czasopismach *Frontiers in Microbiology* (2020) i *Seminars in Immunology* (2021).

Osiągnięcie naukowe stanowią następujące artykuły:

1. Kula A, Guerra J, Knezevich A, Kleva D, Myers MP, Marcello A. Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies Martin 3 as a nuclear cofactor of Rev function. *Retrovirology* 2011;8:60.
2. Kula A, Gharu L, Marcello A. HIV-1 pre-mRNA commitment to Rev mediated export through PSF and Martin 3. *Virology* 2013;435(2):329-40.
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 JS, Cherrier T, Pianowski LF, Gama L, Schwartz C, Vila J, Burny A, Clumeck N, Moutschen M, De Wit S, Peterlin BM, Rouzioux C, Rohr O, Van Lint C. An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various *In Vitro* and *Ex Vivo* HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins and Ingenol-3-Bispropionate to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.* 2015;11(7): e1005063.
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, Van Lint C. Heterogeneous HIV-1 Reactivation Patterns of Disulfiram and Combined Disulfiram+Romidepsin Treatments. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2019;80(5):605-13.
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;10:3060.
6. Kula-Păcurar A, Rodari A, Darcis G, Van Lint C. Shocking HIV-1 with immunomodulatory latency reversing agents. *Semin Immunol.* 2021;51:101478.

Artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe są współautorskie, przy czym dr A. Kula-Păcurar jest pierwszą autorką wszystkich publikacji (w tym w dwóch przypadkach występuje jako pierwszy współautor).

W jednej pracy przeglądowej Habilitantka pełni dodatkowo funkcję współautora korespondencyjnego. Wyniki artykułów oryginalnych, stanowiące osiągnięcie naukowe Habilitantki, powstały głównie w laboratoriach zagranicznych, w tym w ICBEG (prace nr 1 i 2) oraz w IMBM ULB (prace nr 3 i 4). Habilitantka szacuje swój udział w powstanie poszczególnych prac cyklu na poziomach: 65% (praca nr 1), 70% (prace nr 2 i 4), 39% (praca nr 3), 44% (praca nr 5) i 80% (praca nr 6). Dr A. Kula-Păcurar oświadcza, że Jej wkład w powstanie ww. publikacji dotyczył współtworzenia hipotez badawczych lub koncepcji prac, planowania i realizacji większości eksperymentów, analizy i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowania manuskryptów i odpowiedzi na recenzje. Deklaracja Habilitantki jest zgodna z przedstawionymi oświadczeniami pozostałych współautorów i informacjami dostępnymi w publikacjach (*Author contributions*). Wskazane w materiałach współczynniki oddziaływania ww. publikacji (IF) wynoszą od 3,513 do 10,671. Artykuły cyklu uzyskały łącznie $IF_{2021} > 35$, 720 punktów MEiN₂₀₂₁ i 392 cytowań.

W pierwszej z prac cyklu, opublikowanej w czasopiśmie *Retrovirology* w 2011 r., opracowano metodę identyfikacji białka jądrowego Matr3 (MATR3) i określono jego rolę w transporcie RNA HIV-1 z jądra komórkowego do cytoplazmy zależnym od czynnika transkrypcyjnego Rev. W badaniach wykorzystano stabilne linie komórkowe zawierające zintegrowany wektor wirusowy i znakowane miejsca wiązania RNA z białkiem. Wyciszenie ekspresji MATR3 metodą interferencji RNA umożliwiło zbadanie jego roli w regulacji ekspresji transkryptów zależnych od Rev. Wykazano, że białko MATR3 jest kofaktorem aktywności Rev, wiąże RNA HIV-1 i jest wymagany w Rev-zależnym transporcie wirusowego RNA do cytoplazmy.

W pracy nr 2 (*Virology*) autorzy wykazali, że plejotropowe białko jądrowe PSF tworzy kompleks z białkami MATR3 i Rev HIV-1. Zaobserwowano, że podobnie jak MATR3, PSF nie uczestniczy w transkrypcji, ale reguluje etapy potranskrypcyjne w Rev-zależnym transporcie RNA HIV-1. Potwierdzono zarazem oddziaływanie PSF z RNA HIV-1. Jednakże, w odróżnieniu od MATR3, białko PSF wiąże się do wirusowego RNA w miejscu transkrypcji. W oparciu o otrzymane wyniki Autorzy zaproponowali model, w którym białko Rev wykorzystuje szlak komórkowy z udziałem białek jądrowych PSF i MATR3. Białko PSF prawdopodobnie reguluje stabilność wirusowego RNA, natomiast MATR3 bierze udział w retencji RNA w macierzy jądrowej. Autorzy artykułu przypuszczają, że retencja US RNA w jądrze komórkowym przy udziale PSF i MATR3 może stanowić mechanizm regulacji potranskrypcyjnej transkryptów Rev-zależnych i ekspresji genów wirusowych. Jednocześnie wskazano białka MATR3 i PSF jako możliwe nowe cele terapeutyczne.

W kolejnej pracy (praca nr 3, *PLoS Pathog.*) zbadano potencjał reaktywacyjny i mechanizm molekularny skojarzonego podania dwóch klas związków chemicznych pełniących rolę aktywatorów reaktywacji z latencji (ang. *latency reactivating agents*, LRAs) tzn. agonistów kinazy białkowej C (PKC) i aktywatorów P-TEFb (ang. *positive transcription elongation factor b*). Pierwsza grupa badanych związków obejmowała prostratynę i briostatynę-1, natomiast wśród aktywatorów P-TEFb zbadano potencjał JQ1, BET-I i BET-101. Badania przeprowadzono w dwóch liniach komórkowych zakażonych latentnie HIV-1, limfocytarnej i monocytarnej, oraz w hodowlach PBMC i limfocytów T CD4+ pozyskanych od pacjentów bez wiremii. Zaobserwowano działanie synergistyczne JQ1 i briostatyny-1, które reaktywowały HIV-1 na poziomie zbliżonym do działania kontroli pozytywnej (anty-CD3+anty-CD28). Określono mechanizm działania związków wskazując, że podanie skojarzone obu preparatów powodowało zwiększoną aktywację białek P-TEFb i czynnika NF-κB. Otrzymane wyniki wskazywały, że kombinacja JQ1 i briostatyny-1 może

stanowić obiecujący kierunek do dalszych badań. Godny odnotowania jest fakt, że publikacja uzyskała dotychczas około 200 cytowań.

W pracy nr 4 (*JAIDS*) przedstawiono wyniki badań nad synergistycznym działaniem reaktywacyjnym dwóch klas LRA, disulfiramu i romidepsyny. Badania przeprowadzono w modelach komórkowych *in vitro* oraz w warunkach *ex vivo* - w hodowli PBMC izolowanych od pacjentów bez wirerii HIV-1 i leczonych antyretrowirusowo. Pomiary zewnątrzkomórkowego RNA HIV-1 wykazały słaby potencjał reaktywacyjny wirusa pod wpływem skojarzonego podania ww. preparatów. Autorzy zaobserwowali ponadto różnicowany wpływ disulfiramu w zależności od typu komórek i stężenia preparatu. Disulfiram nie wykazywał aktywności w limfocytarnej linii komórkowej. Wyniki badań nie potwierdziły wcześniejszych obserwacji innego zespołu, że aktywność disulfiramu następuje przez aktywację szlaku Akt prowadzącego do redukcji ekspresji białka PTEN i aktywacji NF-κB.

W skład jednotematycznego cyklu publikacji włączono także dwie prace przeglądowe. W pierwszej z nich (praca nr 5, *Front. Microbiol.*) omówiono czynniki odpowiedzialne za heterogenne profile reaktywacji przy udziale LRA. Wśród omówionych czynników wskazano: różnorodność typów limfocytów T CD4+ tworzących rezerwuar HIV-1, złożoność mechanizmów molekularnych regulujących latencję wirusa, w tym blokady transkrypcji i modyfikacje potranslacyjne, zmienność genetyczną wirusa i gospodarza, rodzaj i czas trwania zastosowanej terapii ART. Omówiono także strategię „*shock and kill*” wykorzystywaną do eliminacji rezerwuarów wirusa. W artykule zwrócono uwagę na konieczność poznania mechanizmów molekularnych latencji wirusa nie tylko na etapie transkrypcji, ale także mechanizmów potranskrypcyjnych. W kolejnej pracy (praca nr 6, *Semin Immunol.*) przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący możliwości reaktywacji HIV-1 ze stanu latencji pod wpływem działania czynników immunomodulujących tj. blokery punktów kontrolnych (ang. *check-point inhibitors*), agoniści receptorów Toll-podobnych, cytokiny, przeciwciała monoklonalne powodujące deplecję limfocytów T CD8+. Zwrócono uwagę na fakt, że czynniki te mogą uczestniczyć nie tylko w reaktywacji wirusa, ale także w aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej. Autorzy pracy omówili dane o mechanizmach molekularnych towarzyszących reaktywacji HIV-1 i aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej w modelach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Wskazali ponadto na możliwe efekty uboczne związane z potencjalnym zastosowaniem LRA.

Wyniki badań Habilitantki dostarczyły nowych danych o mechanizmach komórkowych kontrolujących ekspresję genów HIV-1 oraz ukazały heterogeniczność rezerwuarów latencji. Prace eksperymentalne stawiają hipotezy, weryfikują je przy zastosowaniu właściwych i nowoczesnych narzędzi oraz prezentują niezwykle interesujące wyniki. Zaprezentowany cykl publikacji stanowi logiczny ciąg odpowiedzi na pytania stawiane przez dr A. Kulę-Păcurar oraz dowód na Jej dużą wiedzę, doświadczenie i dojrzałość naukową.

Przedstawione artykuły, opublikowane w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, mogą być uznane za istotny wkład Habilitantki w rozwój wiedzy w zakresie podjętej tematyki badawczej oraz spełniają ustawową definicję osiągnięcia naukowego na stopień doktora habilitowanego.

Ocena aktywności naukowej realizowanej w uczelniach lub instytucjach naukowych, w szczególności zagranicznych

Dr A. Kula-Păcurar w latach 2005-2016 rozwijała swoją karierę naukową w dwóch zagranicznych ośrodkach naukowych: w ICGEB w Trieście (studia doktoranckie, staż podoktorski) i w IMBM ULB w Gosselies. Tematyka badawcza realizowana przez Habilitantkę w tym okresie związana była

z poznawaniem mechanizmów molekularnych odpowiadających za ekspresję genów HIV-1 oraz reaktywację ze stanu latencji przy wykorzystaniu LRA. Przed uzyskaniem stopnia doktora, Habilitantka była współautorką jednego artykułu naukowego opublikowanego w 2009 r. w czasopiśmie *EMBO Journal* ($IF_{2021} = 13,783$ i 200 pkt. $MEiN_{2021}$). Badania naukowe realizowane w trakcie staży naukowych zaowocowały licznymi artykułami opublikowanymi w prestiżowych czasopismach tj. *EMBO Molecular Medicine* i *PLoS Pathogens*.

W MCB UJ dr A. Kula-Păcurar kontynuuje swoje główne zainteresowania badawcze i realizuje badania dotyczące potranskrypcyjnych mechanizmów komórkowych regulujących ekspresję genów HIV-1 w kontekście poszukiwań nowatorskich podejść terapeutycznych zakażenia HIV/AIDS. Odbyte studia i staże zagraniczne umożliwiły Habilitantce nie tylko rozwój naukowy i przygotowanie warsztatu badawczego, ale również nawiązanie cennej współpracy międzynarodowej. Habilitantka współpracuje obecnie z zagranicznymi ośrodkami naukowymi, w tym z Uniwersytetem Strasburskim, Uniwersytetem w Tartu, Uniwersytetem Helsińskim, ULB, Katolickim Uniwersytetem w Leuven i Uniwersytetem w Amsterdamie. Habilitantka wykazała się umiejętnością zdobywania środków finansowych na prowadzone przez siebie badania. W MCB UJ Habilitantka pełniła funkcję kierownika projektu badawczego POLONEZ COFUND, a obecnie kieruje projektami Sonata BIS i OPUS.

Udostępnione dane bibliometryczne wskazują, że poza pracami składającymi się na osiągnięcie naukowe dr A. Kula-Păcurar jest współautorką 15 artykułów naukowych opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora. Prace te powstały głównie w IMBM ULB w Gosselies i w MCB UJ oraz osiągnęły sumaryczny wskaźnik IF_{2021} wynoszący około 87 i 1650 pkt. $MEiN_{2021}$. Tematyka części artykułów związana jest z reaktywacją i potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów HIV-1, ale w ostatnich latach także z innymi zagadnieniami np. badaniem aktywności przeciwwirusowych związków względem SARS-CoV-2.

Parametry bibliometryczne całego dorobku Habilitantki po uzyskaniu stopnia doktora, z włączeniem 6 prac cyklu, to sumaryczny wskaźnik IF_{2021} wynoszący około 123, łącznie 2370 pkt. $MEiN_{2021}$ oraz 758 cytowań. Indeks Hirscha Habilitantki w dniu złożenia wniosku (28.04.2023 r.) wynosił 13 wg bazy Web of Science. Habilitantka prezentowała wyniki prowadzonych badań naukowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, zwykle w postaci prezentacji ustnych. Dr A. Kula-Păcurar nie zawarła informacji w Autoreferacie o posiadanych patentach.

Dr A. Kula-Păcurar angażuje się także w działalność ekspercką. Habilitantka była recenzentką dwóch zagranicznych rozpraw doktorskich (Uniwersytet Strasburski, 2020 r. i Uniwersytet w Tartu, 2021 r.) oraz pracy magisterskiej (Uniwersytet w Dublinie, 2021 r.), co potwierdza, że jest ceniona i rozpoznawana w instytucjach zagranicznych. Habilitantka wykonuje recenzje artykułów dla czasopism naukowych tj. *FEBS letters*, *Scientific Reports*, *iScience*, *Frontiers in Virology*, *Viruses Research*, *PLoS One*, *Cells*. Była ponadto redaktorem gościnnym w czasopiśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Habilitantka jest członkiem rady recenzentów w czasopismach *Frontiers*, *Scientific Reports* i *Viruses*. Ponadto, recenzuje wnioski wpływające do programu współpracy Światowej Akademii Nauk - The World Academy of Science (TWAS) - IsBD UNESCO i programu NAWA; jest również recenzentką grantów finansowanych przez ICGEB oraz członkiem Komisji Rekrutacyjnej do Szkoły Doktorskiej w MCB UJ.

Dorobek Habilitantki powstał dzięki precyzyjnie zdefiniowanym zainteresowaniom naukowym i szeroko rozwijanej współpracy z innymi ośrodkami, co jest Jej dużym osiągnięciem. Znacząca aktywność naukowa realizowana w kilku ośrodkach naukowych, w tym instytucjach zagranicznych potwierdza, że dr A. Kula-Păcurar spełnia w pełni wymogi stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego

Habilitantka jest aktualnie promotorem pomocniczym trzech rozpraw doktorskich realizowanych w ramach Szkoły Doktorskiej MCB UJ, promotorem dwóch prac magisterskich oraz opiekunem naukowym grantu Preludium. Ponadto, dr A. Kula-Păcurar była opiekunem lub współopiekunem prac magisterskich realizowanych w MCB UJ oraz na Uniwersytetach w Bolonii i w Trieście. Od 2019 r. prowadzi wykład dla studentów farmacji CM UJ w ramach fakultetu „*Postępy w zakresie chemioterapii chorób infekcyjnych*”.

Dr A. Kula-Păcurar od 2020 r. jest członkiem panelu ekspertów Światowej Akademii Nauk, Europejskiego Towarzystwa AIDS (od 2015 r.) i Polskiego Towarzystwa AIDS (od 2019 r.). Habilitantka pełniła/pełni funkcję kierownika projektów badawczych finansowanych ze środków Unii Europejskiej i NCN. Dr A. Kula-Păcurar jest także od trzech lat kierownikiem komercyjnych badań klinicznych dotyczących szczepionki przeciw HIV-1.

Habilitantka była zapraszana do wygłaszania wykładów przez Katholieke Universiteit Leuven, ULB Gosselies i Polskie Towarzystwo AIDS. Ponadto, dr A. Kula-Păcurar angażowała się w działania związane z popularyzacją nauki przez organizację wydarzeń kierowanych do dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym.

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej informacje wskazują, że Pani dr A. Kula-Păcurar posiada w dorobku osiągnięcia naukowe stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny, w tym cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych zawartych w wykazie MEiN. Habilitantka wykazuje się ponadto istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności w instytucjach zagranicznych. Dr A. Kula-Păcurar jest wszechstronnie wykształconym, doświadczonym i aktywnym pracownikiem naukowym. Dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny potwierdzają, że Habilitantka jest dobrze przygotowana do prowadzenia samodzielnej pracy naukowo-badawczej.

W związku z powyższym wyrażam opinię, że dr A. Kula-Păcurar spełnia kryteria określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). Wniosuję zarazem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o nadanie Pani dr Annie Kuli-Păcurar stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

KIEROWNIK
Pracowni Wirusologii
Instytutu Biologii Medycznej PAN

Dr hab. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN