

Prof. dr hab. Jacek Kuźmak

Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy

w Puławach

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Zimnej zatytułowanej:
Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu
produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen
szczepionkowy**

Rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej dotyczy otrzymania i użycia rekombinowanych cząstek wirusopodobnych (VLPs), jako antygenów do opracowania szczepionki przeciw kleszczowemu zapaleniu mózgu (TBEV). Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jednostce, która posiada wieloletnią, dobrze udokumentowaną tradycję badań nad wykorzystaniem VLPs, jako antygenów szczepionkowych. Tematyka pracy wpisuje się w bardzo aktualny kierunek badań jakim jest opracowanie skutecznych narzędzi immunoprofilaktyki w odniesieniu do chorób zakaźnych wywoływanych przez wirusy przenoszone przez kleszcze. Jest też próbą odpowiedzi na wyzwania związane ze znaczącym wzrostem zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu u ludzi, co związane jest z globalnymi zmianami klimatu. Stąd podjęcie badań nad opracowaniem szczepionki przeciw TBEV, opartej o rekombinowane cząstki wirusopodobne, jest zadaniem jak najbardziej uzasadnionym i aktualnym.

Praca doktorska oparta jest o trzy opublikowane recenzowane artykuły naukowe, w których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. Zimna M., Krol E. *Leishmania tarentolae* as a platform for the production of vaccines against viral pathogens. NPJ Vaccines, 9 (1):212, 2024.
2. Zimna M., Brzuska G., Salat G., Svoboda P., Barańska K., Szewczyk B., Ruzek D, Krol E. Antiviral research, 209, 105511, 2023.
3. Zimna M., Brzuska G., Salat G., Ruzek D, Krol E. Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick borne encephalitis virus-like particles – A recombinant vaccine candidate. Antiviral research, 228, 105941, 2024.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch głównych części: polskojęzycznej części zawierającej formalne elementy rozprawy doktorskiej oraz części zawierającej teksty trzech publikacji w języku angielskim, będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, wzbogacone o materiały dodatkowe. Zawartość merytoryczna tych publikacji jest zgodna z

tytułem pracy doktorskiej, w związku z czym rozprawa ta spełnia formalny warunek polegający na spójności tematycznej prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Ocena rozprawy doktorskiej opartej o opublikowane, szczególnie w dobrych czasopismach naukowych, artykuły jest zawsze zadaniem trudniejszym niż ocena nieopublikowanej monografii. Recenzenci tych czasopism z pewnością dokonali wnikliwej i krytycznej oceny wyników przedstawionych w zamieszczonych w rozprawie publikacjach, dlatego chciałbym jedynie zwrócić uwagę na znaczenie tych wyników, jak i sposób ich przedstawienia. Zarówno informacja zamieszczona w pracach oryginalnych jak i dołączone do dokumentacji oświadczenia współautorów publikacji wyraźnie wskazują, że doktorantka odegrała wiodącą rolę w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań oraz opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów prac. Prace doświadczalne stanowiące rozprawę doktorską powstały we współpracy z wiodącym w zakresie badań nad TBEV ośrodkiem w Czechach i we wszystkich tych publikacjach Pani Mgr Zimna jest wiodącym autorem, co niewątpliwie świadczy o jej umiejętności współpracy w ramach międzynarodowej współpracy i stanowi dobrą prognozę dla Jej dalszego rozwoju naukowego.

Pierwsza publikacja (praca nr 1) jest pracą przeglądową i zawiera bardzo szeroki i głęboki przegląd literatury dotyczącej wykorzystania pierwotniaka *Leishmania tarentolae* do produkcji antygenów szczepionkowych dla różnych wirusów. W pracy przedstawiona została aktualna wiedza na temat charakterystyki systemu ekspresyjnego opartego na *L.tarentolae* w porównaniu do innych systemów takich jak bakterie, drożdże, komórki owadzie czy komórki ssaków. Podkreślone zostały szczególne cechy tego systemu związane z dużą wydajnością syntezy białek, możliwością obróbki potranslacyjnej czy glikozylacją białek. W pracy przedstawiono i omówiono również przykłady zastosowań antygenów wirusowych produkowanych przez *L.tarentolae* oraz innowacyjne wykorzystanie tego pierwotniaka jako żywego i inaktywowanego wektora szczepionkowego. Tabela 2 w tej publikacji jest dobrym udokumentowaniem takich zastosowań. Artykuł jest wyczerpującym i wartościowym kompendium wiedzy o różnych możliwościach wykorzystania *L.tarentolae* do produkcji białek antygenowych wirusów, co w kontekście zakresu tematycznego pracy doktorskiej jest znaczącym elementem. Napisanie dobrej publikacji przeglądowej wymaga doświadczenia, szerokiej wiedzy, umiejętności w doborze i selekcji prac źródłowych (literatura do tego artykułu zawiera 71 dobrze dobranych pozycji), co zawsze świadczy o dojrzałości naukowej autora.

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

W pracy numer 2 Doktorantka zaprojektowała konstrukty plazmidowe i uzyskała ekspresję białek TBEV w systemie *L. tarentolae* oraz scharakteryzowała te białka. Uwaga skupiona została na białku E i prM/M TBEV, które posiadają zdolność tworzenia cząstek wirusopodobnych po ekspresji genów je kodujących w komórkach eukariotycznych. Efektem tych badań było wykazanie produkcji i sekrecji obydwu białek w komórkach *L. tarentolae* oraz potwierdzenie, że uzyskiwane rekombinowane białka składają się w cząstki

wirusopodobne. Na uwagę zasługuje innowacyjne wprowadzenie sekwencji peptydu P2A ze świńskiego teschowirusa-1, co niewątpliwie wydajnie zwiększyło tworzenie VLPs. Następnie, uzyskane VLPs poddane zostały wielokierunkowej analizie funkcjonalnej, co jest krytyczne biorąc pod uwagę przyszłe ich wykorzystanie, jako antygenów szczepionkowych. Dwa zaproponowane i przeprowadzone przez Doktorantkę kierunki badań tj. badania związane z oceną właściwości antygenowych uzyskanych białek oraz badaniem ich immunogenności uważam za wystarczające aby ocenić potencjał otrzymanych białek, w perspektywie ich wykorzystania jako antygenów szczepionkowych. W mojej ocenie najważniejszym osiągnięciem tych badań było wykazanie, że otrzymane VLPs indukują wysokie miana przeciwciał neutralizujących dla TBEV u immunizowanych myszek oraz wyniki doświadczenia typu „challenge”, które faktycznie potwierdziły właściwości ochronne VLPs, zastosowanych jako immunogen.

W pracy numer 3 Doktorantka podjęła się zbadania wpływu różnych adiuwantów oraz drogi podania białek rekombinowanych na immunogenność VLPs, a także scharakteryzowała odpowiedź immunologiczną dla różnych wariantów immunizacji. Wykorzystując analogiczny jak w poprzedniej pracy model doświadczalny oparty na myszach immunizowanych VLPs Doktorantka wykazała, że najbardziej zrównoważoną odpowiedź immunologiczną, w sensie udziału odpowiedzi Th1/Th2, uzyskano przy zastosowaniu adiuwantu Alhydrogel® w połączeniu z MPLA, przy podaniu domięśniowym. Wykazała także, że zastosowanie VLPs w połączeniu ze wszystkimi stosowanymi adiuwantami generowało znacznie silniejszą odpowiedź przeciwciał neutralizujących niż w przypadku immunogenu bez adiuwantu, przy czym profil odpowiedzi przeciwciał neutralizujących był porównywalny przy zastosowaniu trzech różnych typów TBEV.

Wszystkie powyższe prace włączone do rozprawy Pani mgr Marty Zimny zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach o znaczącym wskaźniku oddziaływania (IF : 5.2; 4.5), często cytowanych w badaniach z obszaru wirusologii. Tworzą spójną całość, składającą się tematycznie, tworząc cykl badań związanych z opracowaniem prototypu szczepionki przeciwko TBEV, opartej na rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych. Podjęcie takiego tematu wymusiło konieczność przeprowadzenia różnorodnych obserwacji odnoszących się do optymalizacji wieloetapowego procesu otrzymywania i oczyszczania VLPs TBEV, wyboru odpowiednich adiuwantów i badania właściwości antygenowych i immunogennych uzyskanych białek. Zwraca uwagę bardzo zaawansowana i zróżnicowana metodyka badań zastosowana w tych pracach, od metod z zakresu biologii komórki do technik molekularnych i bioinformatycznych. Trzeba podkreślić, że jakkolwiek większość z tych metod była dostępna w laboratorium Zakładu Szczepionek Rekombinowanych, który posiada długą i bogatą tradycję badań nad cząstkami wirusopodobnymi, to Doktorantka musiała zoptymalizować te metody na potrzeby własnych badań. Dlatego docenić tu trzeba niewątpliwie duży udział Doktorantki w metodycznej części pracy.

Analiza wyników prac doświadczalnych skłania mnie do zadania pytań, nie z obowiązku recenzenta, ale raczej z ciekawości naukowej.

Prosiłbym o wyjaśnienie dlaczego w teście ELISA, opisywanym w publikacji numer 1 i 2, użyto jako antygen VLPs produkowane w systemie komórek ssaczych, w komórkach HEK293T, a nie VLPs produkowane przez *L. tarentolae*.

Zastanowił mnie również fakt relatywnie wysokich wartości uzyskanych w teście ELISA, w badaniu surowicy krwi myszek traktowanych jedynie PBS z dodatkiem adiuwantu Adda/Vax, w porównaniu do badania surowic od myszek traktowanych VLPs. Dane te zestawiano na rycinie 5, w publikacji numer 1. Podobna sytuacja jest widoczna w badaniu z zastosowaniem proteiny E, jednak nie była obserwowana w badaniu surowicy krwi testem komercyjnym. Prosiłbym o wyjaśnienie.

Integralną częścią pracy doktorskiej jest opracowana w języku polskim kompilacja publikacji wchodzących w skład rozprawy. Opatrzona jest ona obszernym wstępem, w którym Doktorantka przedstawiła szeroki przekrój zagadnień uwzględniających klasyfikację taksonomiczną TBEV, bieżącą sytuację epidemiczną związaną z zakażeniami tym wirusem, scharakteryzowała organizację genomu wirusa, cykl replikacyjny i patogenezę zakażeń. Skupiła też uwagę na dwóch zagadnieniach, istotnych z punktu widzenia badań będących przedmiotem pracy. Przedstawiła budowę i funkcje białek prM/M i E oraz ich znaczenie w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej dla TBEV oraz omówiła, co jest bardzo wartościowe w mojej ocenie, budowę i zastosowanie cząstek wirusopodobnych, jako potencjalnych antygenów szczepionkowych. Dobrym rozwiązaniem są tu schematy przedstawione na rycinach 1, 2 i 3. Cel pracy został dokładnie przedstawiony w postaci pięciu zadań badawczych, a dla ułatwienia zapoznania się z artykułami składającymi się na rozprawę doktorską, Doktorantka zamieściła też dokładny opis każdej z prac eksperymentalnych, przedstawiający główne wyniki i metodykę zastosowaną w pracy, a także cel i uzasadnienie podjętych badań.

W rozprawie zamieszczono też streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wnioski końcowe. Bardzo pomocny przy czytaniu pracy jest dokładny spis skrótów, co ułatwia zrozumienie tekstu. Należy zaznaczyć, że współczesna biologia i biologia molekularna, tak jak inne dziedziny nauk biomedycznych, oparta jest w ogromnym stopniu na akronimach, które z jednej strony ułatwiają i przyspieszają komunikację, ale z drugiej strony wymagają ich dobrej znajomości. Lista publikacji liczy 94 pozycje i wszystkie z nich należy określić jako bardzo dobrze dobrane. Na podkreślenie zasługuje to szczególnie w dzisiejszych czasach, gdy swobodny dostęp do elektronicznych baz danych skłania często autorów do zamieszczania nadmiernej liczby cytowań. Ograniczenie liczby cytowań świadczy z kolei o umiejętności ich krytycznej oceny i docenieniu tych najważniejszych. Praca napisana jest bardzo poprawnym językiem, przejrzysto sformułowana, starannie zredagowana, do publikacji dołączono komplet wszystkich szczegółowych danych uzupełniających (*supplementary data*) co ułatwia pracę recenzenta, ale także stanowi w moim odczuciu odzwierciedlenie podejścia Doktorantki do problemu naukowego i Jej osobowości jako samodzielnego badacza.

Mam zaledwie kilka uwag dotyczących tej części pracy, które nie zmieniają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej:

Str. 15, l.12 od góry – użyto określenie zagrożeniem epidemiologicznym, a powinno być zagrożeniem epidemicznym.

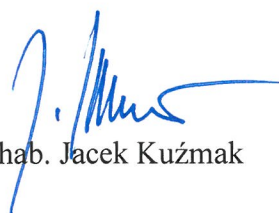
Str.22, l. 5 od góry – użyto określenia po ugryzieniu (kleszcza), a raczej powinno być po ukąszeniu lub ukłuciu

Str.25, l.7 od góry – użyto określenia zwalczania wirusów wewnątrzkomórkowych, w kontekście aktywności limfocytów T cytotoksycznych. Wydaje się, że zasadne byłoby użycie określenia niszczenie komórek zakażonych wirusem.

Str.32, l.3 od dołu – użyto określenia odpowiedź śluzówkowa, a powinno być raczej odpowiedź ze strony błon śluzowych.

Oceniana praca jest ważnym opracowaniem mogącym przyczynić się do optymalizacji procesu projektowania i otrzymywania antygenów szczepionkowych przeciw wirusowi kleszczowego zapalenia mózgu na bazie VLPs. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Marty Zimnej pt. Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen szczepionkowy. odpowiada warunkom określonym w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022r. poz. 574 ze zm.) i przedstawiam Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wnioszek o dopuszczenie mgr Marty Zimnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, 10 marca 2025r.


Prof. dr hab. Jacek Kuźmak