Dr hab. Ewa Szołajska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Gackowskiej pt. „Makrocząsteczkowe struktury oparte o cząstki wirusopodobne jako potencjalne nośniki szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA"

Recenzowana rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod naukowym kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Szewczyka.

Projekt doktorski Pani mgr Karoliny Gackowskiej dotyczył opracowania preparatu szczepionkowego opartego na cząstkach wirusopodobnych wykorzystanych jako potencjalne nośniki stabilizowanego informacyjnego RNA.

Zastosowanie technologii mRNA, która umożliwia szybkie dostosowanie szczepionek do nowo pojawiających się wariantów wirusa, zrewolucjonizowało proces wytwarzania szczepionek. Badania nad zastosowaniem technologii mRNA w profilaktyce chorób zakaźnych trwały intensywnie od początku XXI wieku, a pierwszymi szczepionkami zawierającymi mRNA dopuszczonymi do obrotu były szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV-2. Wykazały one skuteczność w zapobieganiu infekcji oraz jej ciężkiemu przebiegowi i odegrały kluczową rolę w spowolnieniu i opanowaniu pandemii COVID-19, potwierdzając poza wszelkimi wątpliwościami skuteczność technologii mRNA.

Zaproponowana w rozprawie strategia zakładała wykorzystanie jako nośnika mRNA dobrze scharakteryzowanego pod względem strukturalnym rekombinowanego małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus smal surface antygen – sHBsAg), które samorzutnie tworzy nanostruktury wirusopodobne. Takie podejście jest zgodne z tendencjami współczesnej wakcynologii, która propaguje szczepionki oparte na niezakaźnych rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych otrzymywanych w bezpiecznych i wystandaryzowanych warunkach ekspresji heterologicznej. Ogromną zaletą szczepionek VLP jest ich zdolność do uruchamiania zarówno humoralnej jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, która czyni te cząstki uniwersalnymi kandydatami na szczepionki nowej generacji. Obecnie na świecie jest dopuszczonych do użycia kilka preparatów tego typu. Wybór przez Doktorantkę VLP sHBsAg uzasadnia ich zdolność do wzbudzenia silnej odpowiedzi immunologicznej oraz potencjał do prezentacji heterologicznych antygenów, potwierdzony w przypadku dopuszczonych do użytku preparatów szczepionkowych oraz licznych szczepionek eksperymentalnych.

W opracowywanej szczepionce rekombinowane VLP sHBsAg, zostały zmodyfikowane poprzez wprowadzenie motywów umożliwiających wiązanie kwasów nukleinowych, z zamiarem ich wykorzystania jako nośników mRNA kodującego nukleoproteinę wirusa grypy typu A. Należy podkreślić, że potrzebę prowadzenia badań nad opracowaniem szczepionki nowej generacji przeciw grypie uzasadnia niezadowalająca skuteczność dostępnych do użycia preparatów szczepionkowych, wymagających dodatkowo corocznej reformulacji, oraz realne zagrożenie wystąpieniem kolejnej pandemii wirusa grypy. Pani Karolina Gackowska zastosowała nowatorskie podejście do stworzenia uniwersalnej szczepionki, która w przeciwieństwie do klasycznych preparatów, opartych na szybko ewoluujących antygenach powierzchniowych, jest nakierowana na wewnętrzne białko wirusa o

wysoce konserwowanej sekwencji aminokwasowej. Zastosowana strategia powinna zapewnić ochronę przed różnymi szczepami wirusa grypy typu A, do którego należą wirusy powodujące między innymi grypę sezonową u ludzi, które w przeszłości były przyczyną kilku światowych pandemii. Zaproponowana biwalentna szczepionka jednocześnie zapewni ochronę przed zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B.

Realizację projektu doktorskiego Pani mgr Karolina Gackowska rozpoczęła od opracowania metody produkcji w systemie ekspresyjnym bakulowirusa i oczyszczania chimerycznych VLP opartych na sHBsAg. Zaprojektowała kilka wariantów cząstek, w których do pętli cytoplazmatycznych sHBsAg zostały wprowadzone motywy pochodzące z domeny bogatej w argininy (ang. arginine-rich domain, ARD) białka kapsydowego HBV wiążącego kwasy nukleinowe. Motywy te dodatkowo zmodyfikowano w celu zwiększenia ich zasadowego charakteru, tym samym zdolności do wiązania RNA.

Dodanie do N-końca podwójnej formy Strep-tag - Twin-Strep-tag (TS), wykazującego wysoką siłę wiązania do Strep-Tactin®XT, umożliwiło Doktorantce otrzymanie homogennych preparatów rekombinowanych chimerycznych VLP w wyniku jednoetapowego oczyszczania, z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. Przewagę tej metody nad użyciem ultrawirowania w gradiencie OptiPrep potwierdziły analizy z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Uważam, że jest to duże osiągnięcie.

Z wyjątkiem jednej modyfikacji, polegającej na insercji do pętli cytoplazmatycznej motywu bogatego w argininy o długości 35 aa, zmiany wprowadzone w celu umożliwienia wiązania mRNA nie wpłynęły na zdolność samoorganizacji chimerycznych VLP sHBsAg. Poprawne składanie cząstek Doktorantka potwierdziła za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz pomiarów DLS.

W założeniu lokalizacja domen wiążących kwasy nukleinowe wewnątrz VLP, miała umożliwić „upakowanie" związanego mRNA we wnętrzu cząstek podczas ich składania, zapewniając ochronę przed nukleazami oraz umożliwiając jego dostarczenie do komórek. Natomiast pomimo przetestowania przez Doktorantkę różnych warunków, próby rozkładania i ponownego składania VLP sHBsAg nie powiodły się. Wprawdzie cząstki udało się rozłożyć na mniejsze podjednostki z użyciem detergentów, ale próby ich oddializowania prowadziły do powstania agregatów. Zamieszczenie przez Doktorantkę tych wyników uważam za istotne, ponieważ wyniki negatywne są zwykle pomijane, a ich publikowanie zapobiega powtarzaniu przez innych badaczy eksperymentów skazanych na niepowodzenie.

Kolejnym etapem było zaprojektowanie przez Doktorantkę czterech matryc do transkrypcji mRNA, umożliwiających użycie różnych typów czapeczek. Po potwierdzeniu prawidłowości i funkcjonalności konstruktu, Doktorantka do otrzymania stabilizowanego mRNA kodującego nukleoproteinę wirusa grypy typu A wykorzystała matrycę do transkrypcji z czapeczką CleanCap. Dodatkowo, aby ułatwić wiązanie mRNA do rekombinowanych wariantów TS-sHBsAg, dodała sekwencję sygnału pakującego z genomu HBV jako 5' UTR.

Następnie Pani Karolina Gackowska podjęła się sprawdzenia, czy wprowadzone do sekwencji sHBsAg zmodyfikowane motywy pochodzące z ARD białka kapsydowego HBV są zdolne do wiązania mRNA. W tym celu przeprowadziła eksperyment, w którym zbadała wiązanie radioaktywnie znakowanego mRNA do wariantów częściowo zrenaturowanych białek TS-sHBsAg na błonie PVDF. Białka, poza wariantem z insercją długiej sekwencji bogatej w argininy, wiązały radioaktywnie znakowane mRNA kodujące białka wirusowe o różnych sekwencjach i długościach. Istotnej informacji o możliwości tworzenia kompleksów sHBsAg-VLPs–mRNA dostarczył eksperyment, podczas którego Doktorantka zbadała wiązanie wyznakowanego fluorescencyjnie mRNA do cząstek sHBsAg-VLPs w warunkach natywnych. Jedynym wariantem, dla którego zaobserwowała odziaływanie z mRNA w eksperymencie opartym o metodę typu dot blot, były cząstki

z substytucją 35 aa motywu wiążącego kwasy nukleinowe. Wynik sugerował lokalizację motywu na zewnątrz VLP.

Ostatnim etapem badań zaprezentowanych w rozprawie była ewaluacja wybranych kandydatów szczepionkowych w modelu *in vivo*. Autorka podkreśliła że, eksperymenty miały charakter pilotażowy, co ograniczyło liczbę możliwych kombinacji mieszanin VLPs-mRNA użytych podczas immunizacji myszy. Wykorzystano różne kombinacje zawierające warianty VLPs wybrane na podstawie testów wiązania mRNA, oraz mRNA, bez lub z dodatkiem adiuwantu Addavax. Preparat mRNA przeznaczony do immunizacji myszy został oczyszczony we współpracy z Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego kierowanym przez prof. dr hab. Jacka Jemielitego.

W związku z niepowodzeniem prób otrzymania VLPs z upakowanym wewnątrz mRNA, w celu dostarczenia mRNA do komórek docelowych Doktorantka zastosowała nanocząstki lipidowe (LNP-mRNA-NP). Analizy odpowiedzi humoralnej (test ELISA) i komórkowej (test ELISpot) wykazały, że zarówno VLPs oparte na sHBsAg, jak i mRNA kodujące nukleoproteinę, były immunogenne. Doktorantka stwierdziła, że najlepszym kandydatem szczepionkowym zawierającym zarówno VLPs, jak i mRNA-NP jest mieszanina składająca się z VLPs wariantu z substytucją krótkiego motywy ARD do pierwszej pętli cytoplazmatycznej i nanocząstek lipidowych z enkapsydowanym mRNA-NP.

W mojej opinii badania przeprowadzone przez Panią Karolinę Gackowską stanowią istotny postęp w projektowaniu poliwalentnych szczepionek przeciwko chorobom zakaźnym, łączących technologie VLP i mRNA. Skuteczność i bezpieczeństwo jednoczesnego szczepienia preparatem opartym na antygenach białkowych oraz zawierającym mRNA zostały już potwierdzone w przypadku realizowanych zgodnie z rekomendacjami jednoczasowych szczepień przeciw COVID-19 i przeciw grypie.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Gackowskiej została przedstawiona w formie monografii naukowej. W mojej opinii tytuł rozprawy dobrze odzwierciedla zawartą w niej treść. Napisane w języku polskim opracowanie liczy 127 stron, ma poprawny układ i strukturę, na którą składają się: *Spis treści*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (*Abstract*), *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały i aparatura*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie, Bibliografia, Osiągnięcia* naukowe. Autorka uwzględniła także *Wykaz skrótów*.

Zawarty na 28 stronach *Wstęp* stanowi kompetentne wprowadzenie w tematykę rozprawy i uzasadnia potrzebę podjęcia przez Doktorantkę prac badawczych. Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy w obszarze badań będących przedmiotem rozprawy. W mojej opinii w tekście zabrakło informacji dotyczących nukleoproteiny wirusa grypy w kontekście potencjału białka jako antygenu szczepionkowego. W szczególności scharakteryzowania indukowanej przez białko odpowiedzi immunologicznej i jej udziału w eliminacji wirusa podczas infekcji. Cytowane prace źródłowe zostały odpowiednio dobrane, co świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Pani Karoliny Gackowskiej do realizowanych badań.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła precyzyjnie cel badań, które zostały podzielone na cztery etapy.

Rozdziały *Materiały i aparatura* oraz *Metody* zostały starannie zredagowane. Autorka uwzględniła wszystkie zastosowane metody oraz materiały badawcze. Szczegółowość opisu umożliwia innym badaczom powtórzenie opisanych doświadczeń. W mojej opinii zastosowane metody badawcze zostały odpowiednio dobrane do realizacji zamierzonych celów pracy, a ich szeroki zakres świadczy o dużych umiejętnościach praktycznych Doktorantki.

Liczący 32 strony maszynopisu rozdział *Wyniki* zawiera starannie skonstruowany opis przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów oraz uzyskanych danych doświadczalnych zaprezentowanych w postaci poprawnie opracowanych rycin. Racjonalnie zaprojektowane doświadczenia, układające się w logiczny ciąg badań zostały wykonane z uwzględnieniem odpowiednich kontroli.

Realizacja projektu doktorskiego wymagała od Pani Karoliny Gackowskiej opanowania między innymi: metod biologii molekularnej, biochemicznych, hodowli komórek owadzich i ssaczych, immunologicznych oraz analizy statystycznej danych. Wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego wachlarza metod świadczy o Jej dużych umiejętnościach praktycznych i samodzielności w prowadzeniu badań.

Przedstawiona w syntetycznej formie *Dyskusja* została opracowana w sposób logiczny i rzeczowy. Rozdział jest podzielony na sekcje tematyczne, w których Doktorantka analizuje i interpretuje rezultaty realizacji kolejnych etapów projektu doktorskiego. Należy docenić krytyczną ocenę własnych wyników, świadczącą o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Podsumowanie Autorka przedstawiła w postaci zwięzłych stwierdzeń, które znajdują poparcie w wynikach zaprezentowanych w rozprawie.

Bibliografia zawiera zestawienie 213 pozycji cytowanych w tekście rozprawy. Istotną część stanowią artykuły naukowe opublikowane w ostatnich latach. Dobór prac świadczy o dobrej znajomości tematyki badawczej.

Rozprawę kończy wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki. Zgodnie z informacją istotna część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej została już upowszechniona w środowisku międzynarodowym w formie artykułu naukowego opublikowanego w uznanym czasopiśmie z zakresu wirusologii (*Virology, DOI:https://doi.org/10.1016/j.virol.2025.110651*). Pani Karolina Gackowska jest pierwszą autorką artykułu, co świadczy o Jej wiodącym udziale w jego powstaniu. Wyniki swoich badań Doktorantka prezentowała również w formie plakatów podczas międzynarodowych konferencji naukowych.

Pragnę podkreślić, że rozprawa została bardzo starannie przygotowana pod względem merytorycznym i redakcyjnym, zawiera bardzo nieliczne błędy mające charakter pomyłek pisarskich.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

- W Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych do nadprodukcji chimerycznych cząstek wirusopodobnych HBV-HCV oraz VLP wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, wykorzystywany był z sukcesem system oparty na pierwotniaku *Leishmania tarentolae*, w którym produkowane są białka z ssaczym wzorem glikozylacji. TS-sHBsAg VLP były otrzymywane w komórkach owadzich. Poproszę o komentarz do wyboru systemu ekspresyjnego.
- W przypadku immunizacji cząstkami TS-sHBsAg-capmut1, najwyższy poziom odpowiedzi anty-NP obserwowano gdy stosowano mieszaninę VLPs oraz LNPs-mRNA-NP, a najniższy – gdy mRNA-NP nie było enkapsydowane w LNPs. Poziom ten był jednak wyższy niż u myszy szczepionych tylko buforem PBS lub VLPs z dodatkiem AddaVax. Na tej podstawie Doktorantka wnioskowała, że *„mRNA-NP jest w jakiś sposób chronione przez VLPs i transportowane do komórek.*" Proszę o doprecyzowanie jaki mógłby być mechanizm ochrony i dostarczenia mRNA do komórek.
- Wariant capsub1 w połączeniu z nanocząstkami LNPs-mRNA-NP indukował bardzo słabą odpowiedź anty-HBsAg. Zdaniem Doktorantki *„takie połączenie prowadzi do agregacji VLPs między sobą lub z LNPs, bądź do wzajemnej dezintegracji VLPs i LNPs.*" Czy przeprowadzono analizę mikroskopową bądź DLS mieszaniny użytej do immunizacji?

- Obserwowana odpowiedź przeciwko NP indukowana w wyniku immunizacji mieszaniną VLPs i LNPs-mRNA-NP była niższa w porównaniu z odpowiedzią myszy zaszczepionych wyłącznie LNPs-mRNA-NP. Doktorantka stwierdziła, że: *„...może to być spowodowane zbytnim obciążeniem układu immunologicznego – mniejsza ilość VLPs mogłaby być tutaj bardziej odpowiednia."* Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób ustalono dawkę VLP zastosowaną do immunizacji myszy?
  Komercyjne szczepionki przeciwko HBV oparte na VLP sHBsAg są stosowane w dawkach 20 ug dla dorosłych i 10 ug dla dzieci, w przypadku preparatu Engerix, a preparat Recombivax HB jest podawany w dawkach 10 ug dla osób w każdym wieku.
- Z powodu braku odpowiednich przeciwciał Doktorantka nie mogła potwierdzić lokalizacji 35 aa motywu ARD w strukturze VLP. Czy rozwiązaniem mogłoby być przeprowadzenie modelowania molekularnego?

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia oraz umiejętności praktyczne Doktorantki, świadczące o Jej bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań. Pani mgr Karolina Gackowska wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnościami współpracy. Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana *„Makrocząsteczkowe struktury oparte o cząstki wirusopodobne jako potencjalne nośniki szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA"* spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Karoliny Gackowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie ze względu na znaczenie poznawcze i w dalszej perspektywie aplikacyjne uzyskanych przez Doktorantkę danych, oraz opublikowanie w artykule naukowym istotnej części wyników będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Karoliny Gackowskiej.

Warszawa, dnia 13 marca 2026 r.

E. Szołajska

Dr hab. Ewa Szołajska
Środowiskowa Pracownia Hodowli Komórkowych
i Produkcji Białek Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN