



Recenzja pracy doktorskiej opracowanej przez mgr. Karolinę Zimmer pod tytułem "Analiza zmienności genetycznej glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) u pacjentów poddanych terapii interferonem alfa z rybawiryną"

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk, Zakład biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział biotechnologii UG i GUMed.

Recenzent: prof. dr. hab. n. med. Miłosz Parczewski, Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

Wstęp

Zakażenie HCV pozostaje istotnym problemem klinicznym dotyczącym 46-76 milionów osób ze znaczącą liczbą nowych zakażeń rocznie. Od roku 2011 w terapii antyretrowirusowej funkcjonują bezpośrednio działające preparaty przeciwwirusowe – inhibitory proteazy (NS3), inhibitory polimerazy (NS5B) oraz inhibitory białka dodatkowego NS5A, aktualnie najczęściej o charakterze pangentypowym (o funkcji przeciwwirusowej niezależnej od genotypu wirusa). Niemniej terapie przeciwwirusowe pegylowanym interferonem z rybawiryną (PegIFN/RBV) stanowiły przez wiele lat podstawę terapii, i do niedawna były stosowane w grupie osób niepełnoletnich z powodu ograniczeń rejestracyjnych i systemowych związanych z programem terapeutycznym. Dzieci pozostają szczególną grupą wśród osób z aktywnym HCV, najczęściej zakażonymi drogą wertykalną, problem zakażeń w tej populacji jest istotny w krajach wysokiej częstości występowania zakażeń HCV takich jak Egipt czy Pakistan.

Pomimo strategii WHO dotyczącej eliminacji tego zakażenia z celami określającymi 90% redukcję nowych zakażeń oraz śmiertelności o 65% do roku 2030 (w porównaniu do roku 2015), cel ten w wielu krajach będzie trudny do osiągnięcia, co jest związane z ograniczonym dostępem do terapii przeciwwirusowych, migracją (także wojenną) oraz nowymi transmisjami w grupach na przykład związanych ze zjawiskiem chemseksu w grupach mężczyzn mających kontakty seksualne z mężczyznami. Z tego powodu zakażenie HCV pozostaje kluczowym problemem badawczym nie tylko w kontekście transmisji ale również skuteczności leczenia. Problem zmienności cząstek wirusowych u osób nieodpowiadających na leczenie pozostaje problemem kluczowym także w kontekście zrozumienia ewolucji wirusa w kontekście ewentualnych prac nad szczepionką. Prace takie pozostają zasadne jako część wielokierunkowej strategii eliminacyjnej.

W ocenianej pracy doktorskiej Pani magister Karolina Zimmer podejmuje się dogłębnej, precyzyjnej i wielokierunkowej oceny zmienności i funkcji dwóch glikoprotein osłonkowych HCV – E1 i E2, włączając szczegółowe analizy genetyczne, wzoru glikozytacji oraz funkcjonalne związane z rozpoznaniem epitopów przez przeciwciała neutralizujące. Grupą badaną była kluczowa grupa dzieci leczonych pegylowanym interferonem w skojarzeniu z rybawiryną z analizami podgrup zależnie od odpowiedzi na to leczenie.

Sam zakres pracy doktorskiej oceniam bardzo wysoko, jako poznawczo istotne analizy z istotnym wkładem w naukę dotyczącą zmienności wirusowej szczególnie w kontekście ucieczki przed presją selekcyjną terapii. Poznanie tych mechanizmów przekłada się na poprawę zrozumienia ewolucji molekularnej HCV i daje podstawę nad dalszą pracą nad funkcją neutralizującą istotną dla opracowania szczepionki profilaktycznej.

Ocena metodologiczna

Praca doktorska liczy 132 strony. Układ pracy jest typowy ze stosownym wykazem skrótów, streszczeniami w języku polskim i angielskim, obszernym wstępem, jasno sprecyzowanymi celami pierwszo i drugorzędowymi, szczegółową metodologią opisującą zastosowane techniki badawcze, opis wyników wraz z ich podsumowaniem, zwięzłą dyskusję oraz szeroką bibliografię. Ostatnią częścią pracy jest podsumowanie dorobku naukowego. Należy podkreślić, że część przedstawionych wyników ocenianej pracy doktorskiej została już opublikowana (Zimmer K, Chmielewska AM, Jackowiak P, Figlerowicz M, Bienkowska-Szewczyk K. *Alterations in N-glycosylation of HCV E2 Protein in Children Patients with IFN-*

RBV Therapy Failure. Pathogens. 2024 Mar 15;13(3):256. doi: 10.3390/pathogens13030256. PMID: 38535599; PMCID: PMC10974529) co cementuje jej wartość naukową.

Ocena merytoryczna pracy

Merytoryczna część pracy rozpoczyna się precyzyjnym wstępem opisującym nie tylko ogólnie strukturę i zmienność genetyczną genomu HCV oraz cykl replikacyjny tego wirusa, ale również skrót zagadnień epidemiologicznych oraz podstawy terapii z rysem historycznym i obecnym standardem opieki. Autorka szczegółowo opisuje funkcje kluczowych białek będących podstawą analiz prezentowanych w pracy doktorskiej (E1 i E2) a także przejrzysto rozwija aspekty odpowiedzi immunologicznej przeciwko HCV z aspektami zmienności wirusa będącymi podstawą ucieczki przed mechanizmami obronnymi. Wstęp pracy doktorskiej wieńczy podsumowanie prób opracowania szczepionki przeciw HCV wraz z opisem zasad ich działania oraz ograniczeń. Wstęp jest wartościowy, napisany ciekawie i przystępnie świadczy o szerokiej wiedzy i merytorycznym przygotowaniu doktorantki do prowadzonych prac.

Cele pracy są sformułowane przejrzysto – celem nadrzędnym pracy jest badanie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną białka E2 HCV a skutecznością leczenia PegIFN/RBV uzupełnionym o cel analiz wzoru glikozylacji tego białka.

W części metodologicznej autorka bardzo precyzyjnie opisuje wszystkie metody zastosowane w pracy. Metodologia jest wielokierunkowa i obejmuje szerokie zastosowanie technik będących podstawą w wirusologicznych badaniach laboratoryjnych włączając przygotowanie linii komórek bakteryjnych, prace z DNA (w tym techniki amplifikacji, klonowania, konstrukcję chimerycznych heterodimerów glikoprotein, izolację DNA, odpowiednie trawienie oraz techniki wizualizacyjne. Kolejną częścią metodologii jest opis technologii prac z białkami włączając techniki elektroforetyczne, Western-Blottingu, ELSIA, ale również pomiary infekcyjności; autorka pracy wykonywała również badania z zastosowaniem hodowli komórkowych do produkcji pseudocząstek HCV. Opisane są nawet materiały zastosowane w technologiach badawczych, co jest cennym, choć niekoniecznym uzupełnieniem metodologii. Metodologicznie praca doktorska jest przeprowadzona wzorowo i odpowiada celom pracy.

Wyniki pracy są spójne. Rozdział ten rozpoczyna opis amplifikacji materiału genetycznego oraz konstrukcji chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1 i E2. Szczegółowo przedstawiona jest charakterystyka pacjentów od których pozyskano próbki wraz z danymi na

temat skuteczności terapii. Jednym z kluczowych wyników badań jest rekonstrukcja filogenetyczna powiązań sekwencji pseudotypów wirusowych od pacjentów z i bez odpowiedzi na leczenie PegIFN/RBV. Interesujące jest, że w rekonstrukcjach tych uwidoczniło wyraźnie większe zróżnicowanie generyczne pseudoszczepów HCV u dzieci leczonych skutecznie, podczas gdy u osób które nie odpowiedziały na leczenie zmienność genetyczna była istotnie mniejsza. Wynik ten jest elegancko odzwierciedlony na drzewach filogenetycznych które wartościowo odzwierciedlają opisywaną ewolucję wirusową. Kolejnym ważnym metodologicznie wynikiem (choć opis procesu technologicznego rekonstrukcji heterodimeru E1/E2 należałoby raczej umieścić w metodologii) jest ocena wielkości glikoprotein E1 i E2 z glikoproteinami E2 uzyskanymi od osób nieodpowiadających na leczenie posiadającymi mniejszą masę cząsteczkową, co skłoniło autorkę pracy do konkluzji o zmienionej glikozylacji tego białka. Zmiana charakteru glikozylacji E2 pochodzących od osób które nie odpowiedziały na leczenie potwierdzono analizą poziomu aminokwasowego z utratą miejsc N glikozylacji oraz zmniejszeniem siły wiązania lektyny GNA co potwierdziło niekompletność procesu N glikozylacji.

Kolejnym etapem pracy była analiza siły wiązania heterodimerów E1/E2 do receptora CD81, będącym jednym z receptorów dla HCV obserwując dość dużą zmienność wydajności wiązania z tym receptorem. W większości przypadków z próbek uzyskanych od osób które nie odpowiedziały na leczenie siła wiązania heterodimeru była niższa, co jest w samo w sobie ciekawym wynikiem będącym podstawą do poszukiwania alternatywnego wyjaśnienia propagacji cząstek wirusowych w przypadku nieskuteczności wirusowej, niezależnie od wiązania z CD81.

Autorka pracy doktorskiej analizowała również funkcję fałdowania białka E2 w zależności od glikozylacji poprzez analizy z wykorzystaniem przeciwciał konformacyjnych uzyskując potwierdzenie gorszego wiązania przeciwciał białek z mutacjami we wzorze glikozylacji konkludując o możliwości istnienia krążących wariantów ucieczkowych (*escape quasispecies*) nawet przed rozpoczęciem leczenia, co jest kolejnym ważnym wynikiem pracy. Z drugiej strony nie potwierdzono zmian ekspresji MHC I związanego z analizowaną zmiennością E2.

Wyniki związane ze zmiennością glikozylacji weryfikowano na większej grupie sekwencji (n=100, baza euHCVdb) obserwując zmianę miejsca glikozylacji w 1.5%-5.3% sekwencji co potwierdza heterogenność szczepów wirusowych krążących populacyjnie.

Ostatnim wynikiem pracy było sprawdzenie poziomu infekcyjności pseudocząstek wirusowych zawierających analizowane glikoproteiny E1/E2 nie ujawniając różnic w zakaźności.

Kluczowe wyniki zostały zgrabnie podsumowane w odrębnej sekcji pracy doktorskiej, podkreślając jej wkład metodologiczny i naukowy w zrozumienie zmienności glikoprotein E1 i E2 HCV związanych z nieskutecznością wirusową terapii PegIFN/RBV stanowiąc jednocześnie wnioski z pracy.

Dyskusja jest zwięzła i spójna, prezentując uzyskane wyniki w kontekście prac innych grup badawczych i nie budzi wątpliwości będąc prawidłowo podsumowana i powiązana z piśmiennictwem.

Podsumowanie

Przedstawiona praca doktorska mgr Karoliny Zimmer pod tytułem "*Analiza zmienności genetycznej glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) u pacjentów poddanych terapii interferonem alfa z rybawiryną*" jest pracą o bardzo wysokiej wartości merytorycznej. Jest to praca wielokierunkowa, dokładna i przeprowadzona wzorowo metodologicznie. Stanowi istotny wkład naukowy w zrozumienie zmienności genetycznej i jej przełożenia na funkcję i glikozylację białek otoczki tego wirusa, analizy pozostają aktualne w kontekście możliwego tworzenia szczepionki przeciw HCV. Wyniki pracy zostały opublikowane w jednej pracy naukowej ze współczynnikiem wpływu na poziomie 3.3 punktu Impact Factor. Rzetelność naukowa pracy zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Dyscypliny Biotechnologia z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Karoliny Zimmer do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o nadanie jej najwyższego przewidzianego regulaminem Uczelni wyróżnienia (*summa cum laude*), na które ta praca z pewnością zasługuje.

Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej

Elementy rozprawy stanowiące o jej wyróżniającym charakterze dotyczą autorskich opracowań metodologicznych amplifikacji regionu E1/E2 HCV oraz analiz filogenetycznych odzwierciedlających różnice w zmienności wirusa w grupach odpowiadających i

niedopowiadających na leczenie przeciwwirusowe, skonstruowania panelu chimerycznych heterodimerów dla precyzyjnych analiz strukturalnych i funkcjonalnych – metodologicznie jest to praca na najwyższym światowym poziomie. Wyniki pracy są również niezwykle wartościowe w kontekście analiz ucieczki przed presją selekcyjną leków stosowanych w leczeniu HCV, a także zawierają bardzo ciekawe i nowatorskie analizy wiążące wzór glikozylacji E2 z konformacją tego białka i siłą wiązania z receptorem CD81. Rozprawa została w części opublikowana w prestiżowym czasopiśmie naukowym, a Doktorantka jest pierwszym autorem w tej publikacji.

Recenzent deklaruje brak konfliktu interesów w związku z ocenianą pracą doktorską.

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. med.

Miłosz Parczewski

