

Prof. dr hab. Jacek Kuźmak

Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach

### Recenzja

#### **pracy doktorskiej mgr Gabrieli Lucyny Brzuskiej pt. "Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusowi Zika"**

Praca doktorska mgr Gabrieli Brzuskiej dotyczyła wykorzystania rekombinowanych cząstek wirusopodobnych (VLPs) jako kandydatów do opracowania szczepionki przeciw wirusowi Zika. Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jednostce, która posiada wieloletnią tradycję badań nad wykorzystaniem VLPs jako antygenów szczepionkowych. Taka tematyka badawcza wpisuje się w nowoczesny i bardzo aktualny kierunek badań nad wirusem Zika, jakim jest opracowanie metod immunoprofilaktyki swoistej dla tego patogenu.

Impulsem do podjęcia badań była niewątpliwie pandemia zakażeń wirusem Zika w latach 2015-2016, która szybko rozprzestrzeniła się na terenie licznych krajów półkuli południowej, a następnie Ameryki Północnej, dotykając miliony ludzi i prowadząc do istotnych zaburzeń w stanie zdrowia. Związane było to przede wszystkim z możliwością transmisji wirusa z matki na płód, co może powodować szereg wad rozwojowych określanych jako wrodzony syndrom Zika. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia aktualnie aktywna transmisja zakażeń wirusem Zika została odnotowana w 89 krajach, praktycznie na całym świecie. Tak szeroki zasięg występowania wirusa wynika z faktu, że jest on przenoszony przez komary z rodzaju *Aedes*, a zmiany w klimacie, rozszerzające zasięg występowania tych wektorów, są czynnikiem promującym rozprzestrzenianie zakażeń.

Poprzednio występujące pandemie, włączając w to trwającą pandemię COVID-19, jasno wykazały konieczność pilnego posiadania planów gotowości, w których pierwszym elementem jest łatwy dostęp do skutecznego programu szczepień ochronnych. Takie podejście wymusza z kolei konieczność zintensyfikowania badań nad poszukiwaniem nowych możliwości otrzymywania antygenów szczepionkowych. Stąd podjęcie badań nad opracowaniem szczepionki przeciw wirusowi Zika, opartej o rekombinowane cząstki wirusopodobne, jest zadaniem jak najbardziej uzasadnionym i aktualnym.

Prezentowane badania, oprócz niewątpliwych wartości poznawczych, mają przede wszystkim bezpośredni związek z zastosowaniami praktycznymi w kontekście nowych możliwości opracowania antygenów szczepionkowych na bazie cząstek wirusopodobnych, generujących odporność przeciwzakaźną. Perspektywy takie należy rozpatrywać nie tylko w odniesieniu do wirusa Zika, ale także innych patogennych wirusów z rodzaju *Flavivirus*. Jest to niewątpliwie ważny, poznawczy efekt pracy doktorskiej mgr Gabrieli Brzuskiej.

We Wstępie, który zajmuje 37 stron i relatywnie do objętości pracy jest dość obszernym jej fragmentem, Doktorantka przedstawiła szeroki przekrój zagadnień uwzględniających klasyfikację taksonomiczną wirusa Zika, bieżącą sytuację epidemiczną związaną z zakażeniami tym wirusem; scharakteryzowała jego organizację genomu, cykl replikacyjny i patogenezę zakażeń. Następnie skupiła uwagę na dwóch zagadnieniach, istotnych z punktu widzenia badań będących przedmiotem pracy. Szeroko omówiła budowę, dojrzewanie i funkcje dwóch białek prM/M i E oraz ich znaczenie w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej. Drugim zagadnieniem, szeroko analizowanym są rozdziały poświęcone konstrukcji doświadczalnych szczepionek dla wirusa Zika, oraz bardzo wartościowy w mojej ocenie rozdział poświęcony budowie i funkcjonowaniu cząstek wirusopodobnych (VLPs), jako potencjalnych antygenów szczepionkowych dla flawiwirusów. Dobrym rozwiązaniem jest tu zestawienie danych w tabeli nr 3, przedstawiających cechy produkcji VLPs wybranych wirusów z rodzaju *Flavivirus*. Takie podejście jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę fakt, że obydwie białka prM/M i E oraz VLPs były istotą badań prowadzonych przez Doktorantkę. Zagadnienia te stanowiły też dobre umotywowanie dla zaplanowanych badań.

Generalnie, ta część pracy napisana z dużą troską o czytającego, wskazuje na znajomość aktualnego piśmiennictwa i dużą wiedzę Doktorantki z tego zakresu. Dzięki tym informacjom osoba czytająca dysertację jest dobrze wprowadzona w istotę zagadnienia, jaką jest opracowanie rekombinowanych VLPs, jako potencjalnych antygenów szczepionkowych przeciwko wirusowi Zika.

Mam zaledwie kilka, mało znaczących uwag dotyczących początkowych części rozprawy:

Str. 16 i następane strony – numeracja niektórych rozdziałów części „Wstęp” podana jest błędnie, w porównaniu do spisu treści na stronie 4, co stwarza pewną niedogodność przy analizie tekstu.

Str. 24, 1.2 od dołu – użyto określenia konserwowany fragment, a raczej powinno być konserwatywny fragment.

Str. 29 l. 17 od góry – użyto określenia „eksprymujących”, dla którego można znaleźć odpowiedniki w języku polskim.

Str.31 – w rozdziale 4.1.2. Oddziaływanie z układem immunologicznym wprowadzono podrozdział – odporność wrodzona. Przez analogię, na stronie 33 podrozdziały - odpowiedź komórkowa i humoralna mogłyby mieć wspólny podrozdział – odporność nabyta (adaptacyjna).

Kolejny rozdział to prezentacja głównych celów pracy – ujęty jest on w formie dwóch wyszczególnionych zagadnień: (I) oceny wpływu genetycznych modyfikacji białka E na proces składania rekombinowanych VLPs oraz (II) oceny wpływu systemu ekspresji genów na produkcję VLPs, ich antygenowość oraz immunogenność, przedstawionych logicznie i w sposób syntetyczny. Dodatkowo, Doktorantka przedstawiła dwa cele odnoszące się do zaprojektowania nowego typu VLPs, w celu zwiększenia ich produkcji w komórkach ssaczych oraz oceny takich VLPs, jako antygenów szczepionkowych w kontekście doboru systemu dawkowania i adiuwantów dla indukowania odpowiedzi immunologicznej. Myślę, że te dwa ostatnie cele są istotnymi elementami badań i powinny być analogicznie wyszczególnione jak pierwsze dwa.

Rozdziały „Materiały” i „Metody” zostały napisane dokładnie, a dobór oraz celowość zastosowanych metod nie budzi zastrzeżeń. Różnorodność zastosowanych metod obejmujących: manipulacje genetyczne związane z uzyskaniem wariantów białek prM i E wirusa, hodowlę komórek ssaczych, komórek owadzych, pakiet metod do analizy białek wirusowych i VLPs, immunizację myszy oraz ocenę odpowiedzi immunologicznej, dobrze świadczy o technicznym przygotowaniu mgr Gabrieli Brzuskiej do pracy laboratoryjnej. Rozdział ten wystarczająco przybliżył czytającemu część metodyczną pracy. Trzeba podkreślić, że jakkolwiek większość z tych metod była dostępna w laboratorium Zakładu Szczepionek Rekombinowanych, który posiada długą i bogatą tradycję badań nad VLPs, to musiała być ona zoptymalizowana na potrzeby opisywanych badań. Dlatego docenić tu trzeba niewątpliwie duży udział Doktorantki w metodycznej części pracy. Moja uwaga dotyczy sformułowania „odpowiednią ilość” na stronie 73, l. 7 od góry, które powinno brzmieć „odpowiednią liczbę” (komórek). Druga uwaga dotyczy protokołu immunizacji myszy. Zgodnie z opisem zamieszczonym w sekcji 7.6.2. surowice krwi immunizowanych myszy z danej grupy, reprezentujące dany punkt czasowy, łączono w jedną pulę i próbkę taką poddawano analizie. W mojej ocenie postępowanie takie jest oczywiście możliwe, jakkolwiek powinno być poparte wstępnymi badaniami próbek surowicy krwi indywidualnych osobników, w celu potwierdzenia braku istotnych różnic pomiędzy nimi. Czy takie badania były przeprowadzane? Byłbym wdzięczny za ustosunkowanie się Doktorantki do tej kwestii.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na trzy zadania badawcze, w których opisano wyniki licznych doświadczeń, które Doktorantka wykonała w celu osiągnięcia założonych celów pracy. Wyniki uzyskane w każdym z tych zadań badawczych były dyskutowane oddzielnie, co jest moim zdaniem dobrym rozwiązaniem, biorąc pod uwagę mnogość eksperymentów i różnorodność wyników będących ich rezultatem.

W pierwszym zadaniu badawczym (składanie i sekrecja VLPs), Doktorantka zaprojektowała i otrzymała konstrukty kodujące sześć wariantów białek prM i E wirusa Zika. Uwzględniały one kodowanie pełnego białka prME, ME z delecją drugiej domeny transmembranowej białka E, z delecją regionu anchor oraz delecją regionu stem/anchor. Konstrukty te zostały następnie użyte do transfekcji ludzkich komórek embrionalnych (293T) w celu analizy ich ekspresji i możliwości tworzenia VLPs. Ważnym osiągnięciem tych badań z punktu widzenia użycia VLPs jako antygenów szczepionkowych było wykazanie, że białka konstruktów prME ulegały najwyższej ekspresji, natomiast relatywnie niska ekspresja związana była z konstruktami posiadającymi delecje w regionach stem i anchor, co automatycznie eliminuje je z wykorzystania w późniejszych badaniach jako źródła białek antygenowych.

W drugim zadaniu (charakterystyka porównawcza VLPs wyprodukowanych w systemie ekspresji genów w komórkach ssaczych i komórkach owadów) Doktorantka skupiła uwagę na porównaniu wydajności ekspresji VLPs wirusa Zika w komórkach ssaczych i owadzych, analizując najpierw przydatność różnych linii komórkowych. W opisie wyników tych badań, przedstawionych na stronie 95, linia 3 od dołu oraz na ryc. 12, nie znalazłem potwierdzenia dla faktu, że „...zaobserwowano większy poziom białka E oraz fragmentu pr w linii 293T”. Prosiłbym o wyjaśnienie, ponieważ z zestawienia przedawnionego na ryc. 12 wynika, że ekspresja obydwu tych białek była większa w komórkach CHO-K1. Może istotą było występowanie tych białek w pożywce komórek 293T. Kolejnym aspektem badań była analiza porównawcza determinant antygenowych VLPs uzyskanych w komórkach ssaczych

(293T) i owadzych (Sf9) oraz analiza właściwości immunogennych takich VLPs na mysim modelu zwierzęcym. W mojej ocenie są to najbardziej atrakcyjne wyniki badań przedstawione w Dysertacji, ponieważ odnoszą się one bezpośrednio do wskazania, które systemy ekspresji są optymalne, biorąc pod uwagę przygotowanie antygenów szczepionkowych. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem Doktorantki było wykazanie, że VLPs wyprodukowane w komórkach 293T charakteryzują się silniejszą ekspozycją epitopów na glikoproteinie E oraz epitopów dimerycznych tego białka. Doktorantka wykazała także, że VLPs z komórek 293T charakteryzowały się silniejszą immunogennością niż VLPs z komórek owadzych, używając modelu mysiego. Takie wyniki dotyczyły zarówno poziomu przeciwciał skierowanych przeciw rekombinowanej ektodomenie białka E oraz domenie III, jak i poziomu przeciwciał neutralizujących.

W trzecim zadaniu (produkcja i oczyszczanie zmodyfikowanych VLPs (F2A) w systemie ekspresji w komórkach 293T) Doktorantka skupiła się na zaprojektowaniu nowego konstruktów VLPs uwzględniającego modyfikację sekwencji sygnałowej białka prM oraz wstawienie samorozszczepiającego peptydu p2A pomiędzy białka prM i E. Modyfikacje te w istotny sposób spowodowały wzrost poziomu ekspresji białka E zarówno w postaci monomerycznej, jak i dimerycznej. Ta ostatnia forma ma krytyczne znaczenie dla indukowania odpowiedzi immunologicznej przez VLPs, co wykazała Doktorantka w kolejnych doświadczeniach porównując ekspresję tych białek z ekspresją na bazie typu dzikiego. Doktorantka podjęła także próbę oceny schematu dawkowania rekombinowanych VLPs wykazując, że podanie trzech wzrastających dawek cząstek wirusopodobnych w połączeniu z adiuwantem generowało podwyższony poziom przeciwciał w teście ELISA oraz przeciwciał neutralizujących. Takiego zjawiska nie obserwowano przy podawaniu malejących dawek VLPs. Moja uwaga związana z tym fragmentem badań dotyczy wyjaśnienia faktu braku sekrecji IFN $\gamma$  przez splenocyty, co badano w teście ELISpot. Brak sekrecji IFN $\gamma$  zanotowano u myszy immunizowanych różnymi dawkami VLPs, podawanymi z adiuwantem AddaVax, jak i u myszy immunizowanych VLPs, podawanymi z innymi adiuwantami. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie tej kwestii.

W podsumowaniu rozdział „Wyniki” oceniam bardzo pozytywnie. Na uwagę zasługuje różnorodność przeprowadzonych obserwacji, ale jednocześnie tematyczna spójność tych badań, odnosząca się do optymalizacji procesu otrzymywania, oczyszczania i dawkowania VLPs, w kontekście użycia ich jako immunogenu. Wartościowe są informacje z badań *in vivo* potwierdzające immunogeny charakter tych białek. Jakkolwiek mnogość informacji będących pochodną wykonanych badań jest momentami trudna do interpretacji, to Doktorantka dobrze sobie poradziła z obfitością wyników.

Rozprawę kończy rozdział „Wnioski”, zawierający 13 wniosków wynikających z kolejnych, przeprowadzonych doświadczeń.

Oceniana praca jest ważnym opracowaniem mogącym przyczynić się do optymalizacji procesu projektowania i otrzymywania antygenów szczepionkowych przeciw wirusowi Zika na bazie VLPs. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Lucyny Brzuskiej pt. „Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusowi Zika” 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 wniosek o dopuszczenie mgr Gabrieli  
Lucyny Brzuskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, 18.12.2022r.



Prof. dr hab. Jacek Kuźmak