



Recenzja rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydata: **Joanna Baran**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Development of an in vitro Method to Assess the Immunogenicity of Vaccine Components in the prevention of Infection Diseases**

Promotor/promotorzy: **dr hab. Monika Staniszewska**

Promotor pomocniczy: **dr Małgorzata Milner-Krawczyk**

Recenzent: **prof. dr hab. Maria Rapała-Kozik**

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

1. Tematyka rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Joanny Baran porusza tematykę innowacyjnych platform wektorowych stosowanych w projektowaniu szczepionek ochronnych przeciwko chorobom wirusowym. Jest to zagadnienie o dużym znaczeniu naukowym i praktycznym, szczególnie w świetle globalnych wyzwań zdrowotnych, takich jak pandemia COVID-19 czy rosnąca oporność na antybiotyki. W pracy szczególną uwagę poświęcono zastosowaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej w celu optymalizacji konstrukcji wektorów wirusowych. Stworzone w ten sposób platformy wykorzystane zostały jako narzędzia do dostarczania antygenów do komórek gospodarza, co umożliwi indukcję silnej odpowiedzi immunologicznej.

Wprowadzenie do tematyki badawczej przedstawia szczegółowy przegląd literatury dotyczącej aktywacji układu immunologicznego i zaangażowanych komórek obronnych, opis mechanizmu infekcji powodowanej przez wirus SARS-CoV-2, zaangażowanych w jego rozpoznanie receptorów oraz aktywację produkcji cytokin, chemokin i innych mediatorów. W dalszej części Autorka opisuje możliwości prewencji z wykorzystaniem różnych typów szczepionek, w tym wykorzystujących wektory wirusowe, co pozwala czytelnikowi zrozumieć kontekst omawianych badań. Rozdziały poświęcone projektowaniu wektorów są szczegółowe i dobrze zorganizowane. Autorka uwzględniła różne strategie modyfikacji genetycznych, takie jak wprowadzenie specyficznych mutacji w celu poprawy wydajności transdukcji genów. Co ważne, Autorka zwraca także uwagę na aspekty bezpieczeństwa, omawiając ryzyko przypadkowej aktywacji mechanizmów patogenności wirusów wektorowych.

Zakład Biochemii

Porównawczej i Bioanalitiky

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 65 27

fax +48(12) 664 69 02

email: maria.rapala-
kozik@uj.edu.pl

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było zoptymalizowanie metody oceny własności immunogennych platform adenowirusowych zawierających ligandy ICOS i CD40, w połączeniu z antygenami: rRBD, S-His oraz/lub N-His. Analizowano także ich bezpieczeństwo biologiczne z wykorzystaniem modelu mysiego.

W przeprowadzonych badaniach Autorka wykorzystwała model angażujący: izolowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) oraz komórki linii Calu-3, które w hodowli 3D, w warunkach powietrzno-płynnych rozwijają fenotyp rzęskowy, reprezentujący model nabłonka oskrzelowego dróg oddechowych i są podatne na infekcję wirusem RSV i SARS-CoV-2.

W celu określenia efektu immunologicznego badanych platform wykorzystano zarówno antygen rRBD (rekombinowane białko wiążące receptor), pozyskiwany lokalnie, którego czystość była jednak niewystarczająca dla prowadzonych badań, jak również antygeny dostępne komercyjnie: białko kolca (S), fragment S1 z metką histydynową (Spike-S1-His, nvivoGen) oraz białko nukleokapsydu z metką histydynową (Nucleocapsid-His; InvivoGen). Ponadto, zastosowano dwa rodzaje adiuwantów bazując na wektorach wirusowych opartych na serotypie ludzkiego adenowirusa 5, gdzie jeden z nich (AdV1: AdV-D24-ICOSLCD40L) zawierał ligandy współstymulujące (CD40L i ICOSL) a drugi wektor AdV5/3 był pozbawiony tych transgenów.

Wstępne wyniki miały na celu optymalizację procesu izolacji PCMB, z uwzględnieniem warunków termicznych w traktowaniu komórek, składu i przygotowania pożywki, oraz krioprotekcji. Przeprowadzona standaryzacja pozwoliła na zwiększenie liczby żywych komórek do 88,88% w siódmym dniu hodowli, co umożliwiło dalsze badania.

Dalej zweryfikowano żywotność komórek PBMC i VERO E6 po ich ekspozycji na kontakt ze stężeniowymi kombinacjami adenowirusów z lub bez ligandów współstymulujących oraz wybranych antygenów (rRBD, S-His i/lub N-His). W badaniach tych wykorzystano test MTS oraz cytometrię przepływową a także elektronową mikroskopię skaningową.

Te wstępne standaryzacje umożliwiły dalsze, skrupulatne badania zmierzające do określenia wpływu omawianych czynników immunogennych na odpowiedź komórkową PBMC, w szczególności zaobserwowano zmiany w subpopulacjach limfocytów CD4+ i CD8+ oraz komórki CD19+. Z kolei w warunkach ko-hodowli PBMC ze zróżnicowanymi komórkami nabłonka płucnego, prowadzonej w układzie 3D, wykazano zwiększoną ekspresję genów związanych z szlakiem RAP1, który odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, wpływając na różnicowanie limfocytów T i B.

Przeprowadzono także profilowanie cytokin z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, w którym stwierdzono zwiększenie poziomu IL-8 i IL-10 odpowiedzialnych za reakcję przeciwzapalną, oraz IL-12p70 wskazującej na silną aktywację odpowiedzi immunologicznej, w szczególności komórek T i NK, w odpowiedzi na działanie pełnego wektora wraz z badanymi antygenami S-His i N-His. Odnotowano także wzrost poziomu INF- γ dla wszystkich badanych kombinacji z udziałem AdV1, wskazując na udział odporności komórkowej w eliminacji zakażonych komórek.

Finalnie przeprowadzono eksperymenty in vivo z udziałem modelu infekcji u myszy, wykazując, że badany system platformy szczepionkowej oparty na adenowirusach AdV1 i AdV2 nie wpływa negatywnie na przeżywalność myszy, ani na rozwój ich narządów wewnętrznych.

Pracę kończy obszerna dyskusja i rozdział wskazujący na ograniczenia przeprowadzonych badań, wynikające z konieczności użycia rekombinowanych białek, które dla celów oczyszczania niosą w swej sekwencji różne metki. Mogą one wpływać na immunogenność lub specyfikę odpowiedzi immunologicznej a ponadto wymagają dodatkowych kroków niezbędnych dla usunięcia LPS. Autorka wskazuje także na trudności w czerpaniu informacji o działaniu układu odpornościowego w oparciu o ograniczone w czasie hodowle komórkowe.

Warto podkreślić interdyscyplinarność tematyki rozprawy, która jest ściśle związana z aktualnymi trendami w biotechnologii i mikrobiologii, oferując konkretne rozwiązania dla współczesnych problemów zdrowotnych i społecznych. Autor skutecznie łączy tu wiedzę z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii i immunologii, co czyni pracę interesującą nie tylko dla specjalistów w dziedzinie biologii, ale również dla badaczy zajmujących się rozwojem nowych terapii medycznych.

Podsumowując, rozprawa wnosi wartościowe dane empiryczne oraz podstawy teoretyczne, co podkreśla jej znaczenie naukowe.

2. Wiedza kandydata

Autorka rozprawy doktorskiej wykazuje szeroką wiedzę teoretyczną i praktyczną, co znajduje odzwierciedlenie w podejściu do problematyki badawczej. W pracy przedstawiono analizy mechanizmów molekularnych, na których opiera się działanie proponowanych platform wektorowych. Doktorantka umiejętnie przedstawiła zależność między strukturą genetyczną wektorów a ich skutecznością w indukcji odpowiedzi immunologicznej. W rozdziale metodologicznym Autorka wykazała się znajomością szerokiego wachlarza technik eksperymentalnych, takich jak analizy genetyczne,

zaawansowane metody obrazowania mikroskopowego czy cytometria przepływowa. Szczególnie interesujący jest zastosowany model do oceny stabilności wektorów w długoterminowych eksperymentach.

Duże wrażenie robi zdolność Autorki do krytycznej analizy literatury naukowej i własnych wyników oraz do wyciągania trafnych wniosków, co dodatkowo podkreśla Jej kompetencje naukowe. W rozdziale dotyczącym dyskusji, nie tylko interpretuje Ona dane w kontekście współczesnej literatury, ale również wskazuje na potencjalne ograniczenia zastosowanych metod i proponuje alternatywne podejścia. Ta umiejętność do samodzielnego myślenia naukowego i identyfikacji luk badawczych podkreśla wysokie kompetencje Doktorantki.

Warto dodać, że Autorka wykazuje dużą świadomość praktycznych aspektów swoich badań. W pracy wielokrotnie zwraca uwagę na potencjalne zastosowania technologiczne omawianych rozwiązań, co jest szczególnie ważne w kontekście transferu wyników naukowych do przemysłu, a Jej interdyscyplinarne podejście do badanego problemu stanowi ważny wkład w rozwój dziedziny biotechnologii.

3. Samodzielność kandydata

Rozprawa doktorska potwierdza także wysoki poziom samodzielności Autorki w zakresie prowadzenia badań naukowych, poczynając od etapu formułowania hipotez badawczych, poprzez projektowanie i realizację eksperymentów, aż po analizę wyników. Umiejętnie integruje Ona różne techniki badawcze w celu uzyskania kompleksowych wyników.

Autorka zaprojektowała kompleksowe eksperymenty obejmujące optymalizację konstrukcji wektorów, ocenę ich skuteczności w modelach komórkowych i zwierzęcych oraz analizę potencjalnych skutków ubocznych. Każdy z etapów pracy został przeprowadzony z należytą starannością, co świadczy o świadomości naukowej i odpowiedzialności badawczej Doktorantki.

Jej samodzielność przejawia się także w umiejętności rozpoznawania potencjalnych ograniczeń zastosowanych metod oraz w proponowaniu alternatywnych rozwiązań. W pracy wyraźnie widać krytyczne podejście do interpretacji wyników, co znajduje odzwierciedlenie w części poświęconej dyskusji. Autorka nie unika trudnych pytań i przedstawia możliwe wyjaśnienia dla wyników odbiegających od oczekiwań, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Umiejętności analityczne, interdyscyplinarne podejście i zdolność do prowadzenia złożonych badań świadczą o wysokim stopniu samodzielności

naukowej Autorki, co jest jednym z kluczowych elementów oceny pracy doktorskiej. Przygotowana rozprawa stanowi ważny wkład w rozwój nauk biologicznych, co potwierdza także dorobek naukowy Autorki rozprawy doktorskiej.

4. Oryginalność rozprawy

Rozprawa doktorska stanowi przykład pracy naukowej o wysokim stopniu oryginalności. Autorka zaprojektowała i przeprowadziła badania, które przyczyniają się do rozwoju nowoczesnych platform wektorowych, łącząc wiedzę teoretyczną z praktycznymi zastosowaniami. Oryginalność pracy polega na zaproponowaniu innowacyjnych kombinacji wektorów wirusowych, które pozwalają na poprawę ich stabilności i efektywności w indukcji odpowiedzi immunologicznej.

Jednym z kluczowych osiągnięć pracy jest opracowanie metod optymalizacji modyfikowanych wektorów wirusowych, co otwiera nowe możliwości w dziedzinie szczepionek personalizowanych. Wyniki badań przedstawione w pracy są nie tylko oryginalne, ale także praktyczne, co potwierdza ich znaczenie dla rozwoju analiz biotechnologicznych.

Rozprawa zawiera również elementy interdyscyplinarne, łączące biologię molekularną, immunologię oraz inżynierię genetyczną. To podejście pozwoliło na uzyskanie wyników, które mogą znaleźć zastosowanie w ochronie zdrowia publicznego, a także w rozwoju nowych terapii celowanych.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne

A/ Pytania:

1. Czy przeprowadzone analizy wykorzystujące model 3D tworzony z udziałem komórek Calu 3 mogłyby być prowadzony także z wykorzystaniem sferoidów, jakie byłyby wady lub zalety takiego modelu?
2. Czy istnieje ryzyko wystąpienia nieprzewidzianych efektów ubocznych związanych z proponowanymi modyfikacjami wektorów wirusowych w modelach klinicznych?
3. Czy Autorka planuje dalsze badania nad potencjalnym zastosowaniem platform wektorowych w terapiach personalizowanych, np. w leczeniu chorób nowotworowych?

4. Jakie mogą być konsekwencje długoterminowego stosowania zmodyfikowanych wektorów w populacjach o zróżnicowanej strukturze genetycznej?
5. Czy Autorka przewiduje możliwość zastosowania proponowanych metod w diagnostyce chorób zakaźnych?

B/ Uwagi krytyczne:

1. W omówieniu cytokin aktywowanych w infekcjach inicjowanych przez COVID-19 na str 37 stwierdzenie przy każdej z nich, że powodują one szereg schorzeń nic nie wnosi, należałoby inaczej skonstruować zapis tych informacji.
2. Rysunek 10 został zaczerpnięty ze zbiorów innego autora, a opis nie posiada informacji o jego pochodzeniu. Rysunek zawiera także znacznie szerszy zakres działających leków, które nie są rozważane w pracy. Brakuje też opisu rysunku pod jego tytułem.
3. Na str 44 zauważono powielenie użytego wcześniej tekstu.
4. Pojawienie się opisów metodycznych we wprowadzeniu nieco zaskakuje - str 45-47. Rys 12.
5. Mylna informacja w tekście na str 82 co do zawartości tabeli nr 20.
6. Brak informacji pod rysunkami o liczbie wykonanych powtórzeń biologicznych prezentowanych wyników.
7. W jaki sposób potwierdzano prawidłowość wzrostu modelu 3D z wykorzystaniem komórek Calu-3 (np. badanie przepuszczalności, detekcja zmian wybranego markera); czy weryfikowano na ile formowany model był odtwarzalny?
8. W pracy brak wyników dla oczyszczania rekombinowanego białka - czy Doktorantka brała udział w jego pozyskiwaniu?
9. Dlaczego miano wirusa dla adenowirusa 5 było testowane w komórkach H226 podczas gdy inne testowane były w stosowanej dalej w eksperymentach linii VERO E6?
10. Dlaczego analiza profilu cytokin nie posiada analizy statystycznej, ile razy przeprowadzono te oznaczenia?
11. Podobne pytania dotyczy wyników oznaczeń na myszach.
12. Odnotowano także niekompletność cytacji, w szczególności dotyczących prac Autorki, które już są opublikowane (np. nie wiadomo czy w 2023 roku Autorka opublikowała pracę, czy jest ona wciąż w akceptacji); brak cytacji dla praca Sałkowska et al., 2020; pozycja literaturowa nr 44 jest także niekompletna – brak nazwy czasopisma.

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy

Rozprawa została napisana w sposób przejrzysty i logiczny. Bogaty materiał ilustracyjny oraz szczegółowe opisy metodologii są mocnymi stronami pracy.

Pewne elementy, takie jak bardziej szczegółowe wyjaśnienie potencjalnych ograniczeń zaproponowanego podejścia, mogłyby być rozwinięte. Ponadto warto rozważyć rozbudowanie sekcji dyskusji o porównanie wyników z innymi podejściami obecnymi w literaturze naukowej.

7. Ocena końcowa

Mimo tych drobnych uchybień, ja, niżej podpisana, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki 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.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK/NIE

Uzasadnienie wniosku (w przypadku zaznaczenia odpowiedzi TAK):

Rozprawa wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym, innowacyjnością oraz potencjalnym znaczeniem praktycznym, zasługuje zatem na wyróżnienie.

Data sporządzenia recenzji: 27.01.2025

Podpis recenzenta: