



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka
e-mail kjkryn@biol.uw.edu.pl
Tel. (+48)22 55 41 216

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Małgorzaty Kalenik „Profile transkryptomyczne śledzion kur immunizowanych szczepionkami przeciwko wirusowi grypy ptaków H5N1”

Promotor – prof. dr hab. Agnieszka Sirko

Promotor pomocniczy – dr Anna Góra-Sochacka

Rozprawa doktorska mgr Barbary M. Kalenik została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w grupie badawczej kierowanej przez prof. dr hab. Agnieszkę Sirko. Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka ”Centrum Biotechnologii produktów leczniczych. Pakiet innowacyjnych biofarmaceutyków dla terapii i profilaktyki ludzi i zwierząt” oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu ”Szczepionka przeciwko grypie- innowacyjne otrzymywanie antygenów podjednostkowych” .

Obiektem badań doktorantki był wirus grypy A1 podtyp H5N1 będący wirusem z grupy wirusów wysoko patogenych (HPAI). Po raz pierwszy izolowano ten szczep w Hong Kongu roku 1997, w Europie na fermach drobiu rozprzestrzenił się w początkowych latach XXI wieku oraz potem po dziesięciu latach. Jak dotąd nie obserwowano transmisji wirusa między ludźmi, przypadki chorobowe ludzi były konsekwencją kontaktu z zakażonymi ptakami. Tym niemniej wirus ze względu na wysoki poziom zmienności genetycznej warunkowanej pomyłkami RNA polimerazy (przesunięcie antygenowe), procesem reasortacji (skok antygenowy) czy procesami rekombinacji jest wirusem o wysokim potencjale pandemicznym. Głównie proces reasortacji może doprowadzić do zmiany gospodarza i rozwoju pandemii. W świetle tych danych prace mające na celu opracowanie bezpiecznej i skutecznej szczepionki zarówno dla ludzi jak i ptaków uznają za celowe i uzasadnione.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziek@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Przedstawione w rozprawie doktorskiej analizy profili transkryptomycznych śledzion kur immunizowanych badaną szczepionką przeciwko wirusowi grypy H5N1 są logiczną kontynuacją prowadzonych wcześniej badań podczas których opracowano prototypy szczepionek, analizowano ich działanie oraz wpływ modyfikacji genetycznych na skuteczność preparatu. Porównywano poziom odpowiedzi immunologicznej na różne schematy szczepień (jedna vs dwie dawki szczepionki, szczepionka DNA vs szczepionka podjednostkowa białkowa). Obie szczepionki zostały skonstruowane w oparciu o antygen HA (hemaglutynina), wysoce immunogenne białko obecne w dużej ilości na powierzchni wirusa i odpowiedzialne za wiązanie z receptorami komórek eukariotycznych. Dodatkowo poszukiwano strategii immunizacji umożliwiającej uzyskanie krzyżowej odporności przeciwko wirusom zawierającym różne warianty antygeny HA. Otrzymane dane (test HI – hemaglutynin inhibition) wskazujące na wyższy poziom indukowanej odporności przy schemacie szczepienia dwoma dawkami zawierającymi różne preparatami (dawka podstawowa-szczepionka DNA, dawka przypominająca - podjednostkowa, białkowa) w porównaniu do dwukrotnego szczepienia tym samym preparatem były punktem wyjścia przeprowadzonych analiz. W prezentowanej rozprawie szczepionką DNA był plazmid zawierający cDNA hemaglutyniny z wirusa H5N1 izolowanego od łabędzia w Polsce w roku 2006 z zoptymalizowanymi kodonami dopasowanymi do ekspresji w organizmie kury domowej. Szczepionką białkową była rekombinowana hemaglutynina produkowana w ekspresyjnym układzie drożdżowym - *Pichia pastoris*.

Rozprawa mgr Barbary M. Kalenik składa się z dwu prac oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach: *Developmental and Comparative Immunology* (IF=3.274) oraz *Virology Journal* (IF=2.468) i jednej pracy przeglądowej w *Virus Research* (IF=2.667). Przeprowadzenie interdyscyplinarnych badań (przygotowanie preparatów szczepionkowych, immunizacja kurcząt, izolacja RNA z komórek śledziony, analizy transkryptomiczne metodą mikromacierzy, opracowanie danych) wymagało współpracy naukowców o różnych kompetencjach, tak więc nie budzi zdziwienia fakt, że obie prace oryginalne są wieloautorskie (odpowiednio siedmiu i ośmiu autorów), ale w obu doktorantka jest pierwszym autorem. Wszyscy współautorzy w odpowiednich oświadczeniach w sposób opisowy podali swój udział w przygotowaniu publikacji od strony koncepcyjnej, wykonawczej i edytorskiej. Doktorantka była głównie odpowiedzialna za

analizy czystości preparatu RNA izolowanego ze śledzion kurcząt, analizę wyników eksperymentu mikromacierzowego i przygotowanie publikacji do druku.

Prezentowana rozprawa miała na celu wyjaśnienie różnic w mechanizmach indukcji odpowiedzi immunologicznej w zależności od rodzaju szczepionki, schematu szczepień oraz rasy kur. Dane przedstawione w pierwszej publikacji to analiza zmian w ekspresji genów indukowanych przez trzy schematy szczepień (DNA/białko; DNA/DNA i białko/białko). Grupa kontrolna była immunizowana pustym plazmidem nie zawierającym antygeny a eksperyment wykonano na kurach mięsnych Ross 308. Wszystkie zastosowane schematy szczepień skutkowały zmianą ekspresji genów w śledzionie. Najwyższą liczbę genów DEG (differentially expressed genes) zaobserwowano w wypadku szczepionki białko/białko choć uprzednio ta szczepionka w teście HI wykazywała najniższą skuteczność. Jak tłumaczymy zaobserwowaną negatywną korelację? Ponad 50% genów DEG było charakterystycznych dla konkretnego schematu szczepień, co zapewne jest związane z innymi mechanizmami indukcji odpowiedzi immunologicznej przez szczepionki DNA w porównaniu do szczepionek białkowych. Geny o najwyższym poziomie zmienności były powiązane z procesami immunologicznymi. Przeprowadzono szczegółową analizę szlaków immunologicznych zawierających geny DEF. Czy z przeprowadzonych analiz można wnioskować w którym kierunku powinny zmierzać dalsze próby „ulepszenia szczepionki”? Czy podobne wnioski dotyczące rodzaju szczepionki i schematu szczepień można także „rozciągnąć” na szczepienia ludzi?

Druga publikacja to porównanie zmian ekspresji genów wywołanych szczepionką DNA (jedna lub dwie dawki) w zależności od rasy kurcząt. Analizowano dwie rasy kurcząt typu nieśnego (White Leghorn WL i Rosa) oraz rasę typu mięsnego Ross 308 (rasa badana w poprzednich analizach). Nie jest dla mnie jasne dlaczego kury rasy WL były o statusie SPF. Podobnie jak w poprzednich badaniach stwierdzono indukcję humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz zmiany w ekspresji genów jako efekt immunizacji dwoma dawkami szczepionki. Liczba genów DEF była różna dla różnych ras kur przy tym samym schemacie szczepień. Były wśród nich zarówno geny wspólne dla badanych ras ptaków jak i geny charakterystyczne dla konkretnej rasy. Większość DEF genów stanowiły geny kodujące białka o funkcjach powiązanych z układem neuroendokrynoimmunologicznym. Interesujący jest wynik wskazujący na indukcję dużo większej liczby genów kodujących mikroRNA o funkcjach regulatorowych u kur nieśnych. Poznanie zapisu genetycznego kury domowej a następnie porównania genomów kilku ras nieśnych i mięsnych przed

ponad piętnastu laty udokumentowały obecność wielu zmian wprowadzonych do genomów w procesie udomawiania i ukierunkowanej selekcji pod kątem zmian korzystnych dla człowieka. Wiele z nich dotyczy funkcjonowania układu immunologicznego co tłumaczy zaobserwowane różnice w profilach transkryptomicznych. Jak doktorantka widzi zastosowanie otrzymanych danych do ewentualnego podniesienia efektywności działania szczepionek o czym wspomina w podsumowaniu badań ?

Poza dwoma artykułami przedstawiona rozprawa zawiera rozdział będący wprowadzeniem w zagadnienia prezentowane w rozprawie, krótkie omówienie poszczególnych publikacji oraz podsumowanie badań. Wprowadzenie w zwięzły sposób przedstawia kilka różnorodnych aspektów związanych z immunizacją kurcząt przeciwko grypie zarówno natury biologicznej (charakterystyka wirusa grypy, przebiegu zakażenia, odpowiedzi immunologicznej, rodzaje szczepionek jak i ekonomicznej (koszty ponoszone przez przemysł drobiarski). Zebranie tych danych w krótkiej, zwięzłej formie nie było łatwym przedsięwzięciem. Doktoranta sprostała temu wyzwaniu. Osobiście oczekiwałam kilku bardziej szczegółowych informacji o testowanych lub wprowadzonych już do szczepień stad kur szczepionkach DNA.

Jeszcze jedna uwaga edytorska – przy prezentowaniu wyników badań wysokoprzepustowych należało do przedstawionej rozprawy dołączyć także dane z załączników do publikacji.

Publikacja przeglądowa przedstawia w zwięzły sposób różne aspekty funkcjonowania defensyn, głównie beta defensyny skupiając się na ich aktywnościach immunomodulujących i potencjalnym zastosowaniu jako adjuwantu.

Mam kilka pytań n natury ogólnej:

Jakie są losy szczepionki skoro w Polsce nie są stosowane prewencyjne szczepienia stad kurcząt przeciwko grypie?

Jakie były rezultaty szczepień szczepionkami DNA w innych regionach świata np. w Chinach ?

Czy w oparciu o uzyskana wiedzę można i planowane są badania dotyczące immunizacji przeciwko innym chorobom wirusowym kur?

Czy można skrócić czas immunizacji np. poprzez zastosowania odpowiednich adjuwantów co jest istotne w odniesieniu do kur ras mięsnych ?

Czy znane są badania manipulujące genomem kur przy zastosowaniu np technik CRISPR? Cas w celu zwiększenia skuteczności działania szczepionek???

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona rozprawa stanowi interesujący punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami działania szczepionek DNA. Uznaję przedstawioną rozprawę doktorską za wartościową i spełniającą wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN o dopuszczenie mgr Barbary Małgorzaty Kalenik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na innowacyjność badań wnioskuję o nagrodzenie rozprawy stosowną nagrodą.

Warszawa 21.12.2020


prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>