

Łódź, 18.11.2024 r.

dr hab. Bożena Dziadek, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Baran pt. „Opracowanie metody *in vitro* do oceny immunogenności komponentów szczepionek w profilaktyce chorób infekcyjnych”.

Przedłożona do mojej oceny praca doktorska autorstwa mgr Joanny Baran została wykonana w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej we współpracy z Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT, pod kierunkiem dr hab. Moniki Staniszewskiej, prof. PW jako promotora. Współkierującą pracą była dr Małgorzata Milner-Krawczyk.

Przedmiotem rozprawy było opracowanie komórkowych modeli *in vitro* typu 2D i 3D umożliwiających ocenę potencjału adiuwantowego lub immunogennego oraz właściwości cytotoksycznych wytypowanych, przez Autorkę, komponentów potencjalnej szczepionki przeciwko zakażeniu koronawirusem SARS-CoV-2. Jako adiuwant szczepionkowy zastosowano nowatorsko dla potrzeb immunoprofilaktyki modyfikowany, niezdolny do replikacji szczep onkolitycznego adenowirusa Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L charakteryzujący się ekspresją dwóch ligandów, mianowicie ICOSL i CD40L, swoistych, odpowiednio, dla powierzchniowych cząsteczek ICOS i CD40, warunkujących dodatkowe lecz niezbędne interakcje międzykomórkowe zapewniające wzbudzenie efektywnej odpowiedzi odpornościowej, w tym odpowiedzi poszczepiennej. Z kolei komponent antygenowy doświadczalnej szczepionki stanowiły rekombinowane białka wirusa SARS-CoV-2, mianowicie otrzymane w ramach doświadczalnej części pracy doktorskiej białko rRBD obejmujące domenę osłonkowej glikoproteiny S wirusa bezpośrednio zaangażowaną w wiązanie błonowego receptora komórkowego, którym jest konwertaza angiotensyny II (ACE2), a także komercyjna podjednostka S1 glikoproteiny osłonkowej S i komercyjne białko nukleokapsydu N. Ponadto w skład niektórych testowanych kompozycji szczepionkowych wchodziły przeciwciała swoiste dla wspomnianej powyżej osłonkowej glikoproteiny S wirusa SARS-CoV-2. Biorąc pod uwagę, iż zakażenia wirusem SARS-CoV-2 nadal stanowią istotny problem kliniczny, a dostępne narzędzia ich immunoprofilaktyki zapewniają jedynie krótkotrwałą ochronę odpornościową, uważam tematykę badawczą podjętą przez Panią mgr Joannę Baran za szczególnie uzasadnioną. Niezwykle pożądanym byłoby bowiem dysponowanie modelami *in vitro* umożliwiającymi szybką ocenę i wiążące się z nią precyzyjne dopracowanie potencjału

badanego preparatu immunoprofilaktycznego, czy też immunoterapeutycznego do poziomu zapewniającego rozwój długotrwałej, swoistej ochrony odpornościowej, nie tylko w przypadku zakażeń wirusem SARS-CoV-2, ale także innymi patogenami.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Baran obejmuje standardowe dla tego typu manuskryptów rozdziały (Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Bibliografia), a także dodatkowe części, takie jak opis ograniczeń i perspektyw odnoszących się do typu prowadzonych doświadczeń oraz usystematyzowane listy rycin i tabel. Dodatkowo w manuskrypcie przedstawiono spis osiągnięć naukowych będących wynikiem prowadzonych prac badawczych z zakresu biotechnologii.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest rzeczowy i bardzo dobrze przemyślany. Przedstawiono w nim m.in. zagadnienia merytoryczne dotyczące badanych w doświadczeniach parametrów warunkujących rozwój mechanizmów odpornościowych indukowanych przez oceniane kompozycje szczepionkowe. Ponadto omówione zostały walory i ograniczenia modeli doświadczalnych stosowanych do charakterystyki składników potencjalnych preparatów szczepionkowych. Moim zdaniem, przedstawiając zalety komórkowych modeli *in vitro* zbyt definitywnie stwierdzono ich przewagę nad zwierzęcymi modelami *in vivo*. Dlatego prosiłabym Panią Magister o wyjaśnienie czy rzeczywiście jej stanowisko w tej kwestii jest tak jednoznaczne? Czy etycznie dopuszczalnym jest lub kiedykolwiek będzie izolowanie ludzkich tkanek, oprócz krwi, w celu tworzenia nowych modeli *in vitro*? Czy modele zwierzęce *in vivo* rzeczywiście są uboższe jeśli chodzi o przeprowadzanie badań na licznej i zróżnicowanej populacji osobników i nie zapewniają odpowiedzi odpornościowej ze strony różnorodnych populacji komórek zarówno immunokompetentnych, jaki i tych nie wchodzących w skład układu odpornościowego? Nie znajduję też etycznych argumentów wskazujących na bardziej uprawnione wykorzystywanie w badaniach doświadczalnych ludzkich modeli komórkowych. Wdzięczna będę za wyjaśnienie również tej kwestii. Niewątpliwie bardzo interesującym podejściem naukowym wykorzystanym w prezentowanej pracy jest zastosowanie po raz pierwszy, jako adiuwantu szczepionkowego, onkolitycznego, modyfikowanego adenowirusa Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L, badanego już wcześniej pod kątem jego potencjału jako nowoczesnego narzędzia terapii przeciwnowotworowej. Współautorką tamtych badań jest Pani Prof. Monika Staniszevska – promotor recenzowanej pracy doktorskiej. Ponieważ ten aspekt projektowania składu potencjalnych szczepionek jest bardzo intrygujący, prosiłabym o przybliżenie jakie zalety i ograniczenia wiążą się z wprowadzaniem tak skonstruowanych adiuwantów? Trafnym elementem wstępnej części rozprawy jest także charakterystyka samego wirusa SARS-CoV-2, ale także omówienie strukturalnych białek wchodzących w skład jego wirionu, które zostały wytypowane jako potencjalne składniki komponentu antygenowego badanych kompozycji szczepionkowych. W tym fragmencie, może byłoby jednak warto poświęcić więcej uwagi ważnemu dla przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa białku N. Zakres merytoryczny przytoczonych we Wstępie informacji naukowych

wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną mgr Joanny Baran i tym samym na jej świetne przygotowanie do zadań badawczych wykonanych w pracy doktorskiej.

Cel pracy został sformułowany w sposób czytelny i precyzyjny, a jego osiągnięcie zaplanowano poprzez realizację dziewięciu ambitnych etapów doświadczalnych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wykorzystanie w pracy różnorodnych metod i technik badawczych z zakresu mikrobiologii, immunologii, biotechnologii i genetyki. Tak bogaty warsztat badawczy niewątpliwie wymagał dużego zaangażowania i cechuje doświadczonych naukowców. Odnosząc się do tego rozdziału prosiłabym Panią mgr Joannę Baran o odpowiedź na kilka nurtujących mnie pytań. Czy określany był status immunologiczny/serologiczny krwiodawców jeśli chodzi o przebyte infekcje wirusem SARS-CoV-2 lub przyjęte szczepionki przeciwko Covid-19? Jest to ważne ze względu na możliwą modyfikację odpowiedzi odpornościowej i tym samym aktywności funkcjonalnej zaangażowanych w mechanizmy odpornościowe komórek pozyskiwanych z krwi osobników po przechorowaniu Covid-19 lub immunoprofilaktycznej immunizacji, co może ostatecznie przełożyć się na wyniki prowadzonych doświadczeń. Jakie analizy pozwoliły na wyselekcjonowanie regionu obejmującego pozycje 331-524 sekwencji aminokwasowej białka RBD, jako najbardziej interesującego pod względem immunogenności? Czy zasadnym było odrzucanie supernatantów hodowlanych po 72 godzinach stymulacji komórek wybranym komponentem szczepionkowym bez oceny stężeń obecnych w nich cytokin? W mojej ocenie taka procedura mogła przyczynić się do zaniżenia zanotowanych w efekcie końcowym stężeń tych rozpuszczalnych mediatorów.

Otrzymane w pracy wyniki zostały przedstawione w sposób skrupulatny i stanowią zbiór najważniejszych spostrzeżeń wynikających z przeprowadzonych doświadczeń. Jako jedno z osiągnięć wskazano optymalizację warunków izolacji, hodowli i przechowywania otrzymywanych z krwi dawców jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Zwrócono uwagę, iż zastosowane modyfikacje osiągnęły efekt w przypadku utrzymania wysokiej żywotności komórek w testach 24- i 48-godzinnych, natomiast w hodowlach prowadzonych 7 dni stwierdzono znamienne spadki ich żywotności. W związku z tym chciałabym zapytać, na czym polegały dalsze zabiegi optymalizacji, których celem było zapobieżenie zaobserwowanemu niekorzystnemu efektowi w 7-dniowych doświadczeniach prowadzonych z zastosowaniem zarówno komórkowego modelu 2D, jak i 3D? W tym miejscu chciałabym podkreślić, iż zanim przystąpiono do zasadniczej części doświadczalnej, wykonano szereg bardzo ważnych oznaczeń mających na celu dostosowanie warunków prowadzonych procedur badawczych, w tym warunków przygotowania i hodowli komórek, a także stosowanych stężeń badanych komponentów szczepionkowych, tak aby zapewniały one wiarygodność danych doświadczalnych. Moim obowiązkiem jako recenzenta jest zaznaczenie, iż w przeprowadzonych badaniach mgr Joanna Baran wykorzystwała zaplanowany przez siebie komórkowy model 3D, bazujący na jednojądrzastych komórkach krwi ludzkiej i komórkach linii Calu-3 reprezentujących ludzkie komórki nabłonkowe płuc. Na uwagę zasługuje także imponujący zakres określanych w pracy parametrów, w tym immunologicznych i genetycznych,

warunkujących możliwość rozległej, porównawczej analizy potencjału szczepionkowego wytypowanych czynników. Charakter badanych zmian został przemyślany i dotyczył m.in. porównania wskaźników komórkowej i humoralnej odpowiedzi odpornościowej poprzez oszacowanie, odpowiednio, liczebności populacji limfocytów TCD⁴⁺ i TCD⁸⁺ oraz limfocytów B, w tym odpowiadających im subpopulacji komórek pamięci odpornościowej, przed i po stymulacji wybranymi czynnikami lub ich kompozycjami. Jednym z parametrów ocenianych w pracy była również ekspresja powierzchniowej cząsteczki CD40 z zastosowaniem komórek linii Vero E6 po ich wcześniejszej stymulacji badanymi antygenami i adiuwantem. Dlaczego w badaniach tych stosowano rekombinowane białko rRBD, indywidualnie lub w kombinacjach, w stężeniu 5,24 µg/ml, które jak wstępnie wykazano jest cytotoksyczne dla testowanych komórek? Czy uzasadnionym jest analizowanie danych z tak przygotowanych prób badanych? Dodatkowo przeprowadzono analizę na poziomie transkryptomu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej traktowanych kompozycją obejmującą modyfikowanego adenowirusa oraz rekombinowane białka S i N wirusa SARS-CoV-2. Procedura ta wskazała m.in. wzrost poziomu ekspresji 8 genów w stymulowanych komórkach. Aktywność funkcjonalna produktów tych genów powiązana jest z wewnątrzkomórkowym szlakiem sygnałowym zależnym od białka Rap1, znaczącym dla kontroli i przebiegu różnych procesów komórkowych, np. adhezji, migracji, proliferacji i przeżycia. Odnosząc się do celu kluczowego zadania badawczego pracy jakim było opracowanie i określenie przydatności modelu 3D w określaniu potencjału immunochronnego nowych komponentów szczepionkowych, nie mam wątpliwości, iż został on osiągnięty. Wykonane prace doświadczalne dowodzą bowiem, iż zapewnia on ocenę zmian różnorodności i liczebności subpopulacji limfocytów T i B, a także stężeń cytokin modulujących wzbudzone poprzez preparat szczepionkowy mechanizmy odpornościowe. Współdziałanie tych elementów odpowiedzi odpornościowej jest nieocenione w kontekście rozwoju stanu swoistej immunochrony, a analiza tego typu danych pozwala prognozować efektywność konstruowanych narzędzi immunoprofilaktyki i/lub immunoterapii.

Badania *in vitro* pracy doktorskiej zostały wzbogacone o wartościową ocenę *in vivo* bezpieczeństwa badanej szczepionki obejmującej modyfikowany szczep adenowirusa oraz rekombinowane białka S i N wirusa SARS-CoV-2. Doświadczenia te przeprowadzono w oparciu o zastosowanie modelu zwierzęcego, dokładnie myszy szczepu BALB/c i wykazały one brak wpływu pojedynczych komponentów, a także pełnego preparatu na przeżywalność zwierząt oraz morfologię i wagę narządów, takich jak płuca, wątroba, serce, śledziona, nerki i otrzewna.

Dyskusja wyników badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej ma formę naukowego opracowania, w którym Pani Magister Joanna Baran krytycznie komentuje własne wyniki i konfrontuje je ze światową literaturą naukową.

Cennym elementem rozprawy doktorskiej jest przedstawienie ograniczeń i perspektywy dotyczących podjętego kierunku badawczego. Jak słusznie podkreślono ważnym ograniczeniem w kontekście badania aktywności immunogennej czy immunomodulacyjnej nowych szczepionek,

bazujących na rekombinowanych białkach, są zanieczyszczenia endotoksyną bakteryjną czy też obecność znaczników, np. sześciu reszt histydyny, które projektowane są jako fragment rekombinowanego produktu warunkujący jego oczyszczenie za pomocą chromatografii powinowactwa. Zarówno bowiem obecność LPS, jak i dodatkowej sekwencji aminokwasowej może wpływać na końcowy efekt indukowany przez testowany preparat szczepionkowy.

Podsumowaniem pracy doktorskiej jest sześć czytelnie sformułowanych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań.

Przedstawiony spis cytowanych w pracy doktorskiej publikacji obejmuje 188 dobrze dobranych pozycji literatury przedmiotu.

Pod względem edytorskim recenzowana praca doktorska jest bardzo starannie przygotowana, a moje wskazówki techniczne obejmują zaledwie 6 pozycji.

Przedstawione powyżej pytania i komentarze nie wpływają na moją wysoką ocenę strony naukowej recenzowanej rozprawy. Zaprezentowane wyniki prac doświadczalnych stanowią oryginalne podejście w konstruowaniu komórkowych modeli *in vitro* umożliwiających szybką ocenę właściwości adiuwantowych i/lub immunogennych komponentów nowych preparatów immunoprofilaktycznych czy też immunoterapeutycznych. Aspekt nowości naukowej wnosi także, bez wątpienia, wykorzystanie jako adiuwantu modyfikowanego adenowirusa oraz wykazanie, że mechanizm nasilania odpowiedzi odpornościowej przez ten składnik szczepionkowy związany jest ze stymulacją ekspresji cząsteczki CD40 wchodzącej w swoistą interakcję z ligandem CD40L, co zapewne sprzyja dostarczeniu jednego z kluczowych sygnałów kostymulujących, niezbędnego do pełnej aktywacji limfocytów TCD⁴⁺. Dodatkowo, wykorzystany wachlarz technik doświadczalnych jest imponujący, a uzyskane rezultaty stanowią wkład w rozwój reprezentowanej przez Doktorantkę dyscypliny.

Dorobek naukowy Pani Magister Joanny Baran jest bogaty. Obejmuje on dwanaście wieloautorskich publikacji naukowych, z czego połowę stanowią prace doświadczalne. Wszystkie publikacje odnoszą się do dyscypliny biotechnologia. Łączna wartość współczynnika IF dla tych prac wynosi 32,8, a liczba punktów ministerialnych 1140. Podkreślenia wymaga fakt, że otrzymane w ramach pracy doktorskiej wyniki stały się podstawą do przygotowania trzech publikacji oryginalnych, z których dwie ukazały się w czasopiśmie BioTechnologia, a trzecia znajduje się na etapie oceny recenzentów w czasopiśmie Immunologic Research należącym do grupy Springer Nature. We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto owocem pracy doktorskiej jest praca przeglądowa oraz zgłoszenie patentowe. Kończąc chciałabym podkreślić obszerny życiorys naukowy Pani mgr Joanny Baran obejmujący szerokie doświadczenie naukowe uwarunkowane angażowaniem się w realizację projektów badawczych, a także uczestnictwem w praktykach i szkoleniach. Ważne miejsce na tej płaszczyźnie zajmują także trzy współautorskie wnioski patentowe oraz nagrody w konkursach dotyczących szybkiej diagnostyki zakażeń wirusem Lassa.

Wniosek końcowy

W moim przekonaniu, rozprawa doktorska mgr Joanny Baran spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. z późn. zm. (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Przedstawione badania zostały przeprowadzone na wysokim poziomie naukowym, z wykorzystaniem świetnego warsztatu metodologicznego Doktorantki, stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Joanny Baran do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie mając na uwadze wysokie walory naukowe pracy doktorskiej mgr Joanny Baran składam do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej wniosek o jej wyróżnienie.

