

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****INSTYTUT GENETYKI I MIKROBIOLOGII**ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 13 | +48 71 325 21 51

fax +48 325 21 51

igm@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

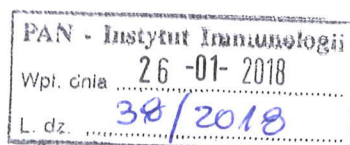
Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290
fax. +48 71 325 21 51
email. zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl

Wrocław, 2018-01-26

RECENZJA**rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Tomczyka****pt. „Immunologiczne następstwa zakażenia *in vitro* leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej.”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Tomasza Tomczyka, została wykonana pod kierunkiem dr hab. Egberta Piaseckiego oraz dr Beaty Orzechowskiej jako promotora pomocniczego w Laboratorium Wirusologii, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Praca poświęcona jest badaniom dotyczącym zakażenia leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem vesicular stomatitis virus (VSV).

Badania były realizowane w ramach projekt badawczego nr 43/2016/KNOW/IITD (519-1-4-2-447): „Następstwa immunologiczne zakażenia ludzkich leukocytów krwi obwodowej wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) *in vitro*”. A część wyników została opublikowana w Journal of Innate Immunity (2018, IF (2016/2017) = 3.938, 35 pkt MNiSW), Tomczyk T. et al. „Immune consequences of *in vitro* infection of human peripheral blood leukocytes with vesicular stomatitis virus (VSV)” oraz w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej (2013), Tomczyk T., Orzechowska B. „Zastosowanie wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) jako wektora szczepionek przeciwwirusowych.”



Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. vesicular stomatitis virus – VSV) należący do *Rhabdoviridae*, jest wirusem posiadającym genom w postaci niesegmentowanej pojedynczej nici RNA o ujemnej polaryzacji zamknięty w osłonce białkowo-lipidowej. Przedstawiciele *Rhabdoviridae* charakteryzują się dużym tropizmem gatunkowym zakażając szerokie spektrum gospodarzy takich jak rośliny, owady, skorupiaki, ryby, ptaki i ssaki. VSV jest z zasady patogenem ssaków kopytnych, jednakże notowano również przypadki grypopodobnych infekcji u ludzi.

Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej może być wykorzystywany jako onkolityczny ze względu na selektywność wobec komórek rakowych. Modyfikowane genetycznie VSV mogą posłużyć w terapii różnego rodzaju nowotworów w tym glejaka, prostaty, czerniaka, nowotworów płuc czy pęcherza moczowego. VSV może też być stosowany jako bazowy wektor szczepionkowy, po wbudowaniu do jego genomu informacji kodujących antygeny żądanego patogenu. Rosnące zainteresowanie wykorzystaniem wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej jako szczepionkowego oraz w terapii chorób nowotworowych wymagają dokładnego określenia parametrów bezpieczeństwa stosowania go u ludzi, zwłaszcza że wirus ten ma zdolność do zakażenia leukocytów *in vitro* oraz wykazuje tropizm do komórek nerwowych.

Projekt badawczy Pana mgr Tomasza Tomczyka jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół Laboratorium Wirusologii IITD dotyczących określania poziomu nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej. Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena potencjału infekcyjnego wirusa VSV wobec leukocytów krwi obwodowej człowieka oraz charakterystyka efektów tego zakażenia. Ze względu na neurotropizm wirusa VSV badania wykonywano *in vitro* a nie na modelu zwierzęcym.

Chcąc zrealizować cele badawcze wykonano szereg dobrze przemyślanych eksperymentów:

- o określono podatność leukocytów na zakażenie VSV za pomocą cytometrii przepływowej
- o porównano stężenia cytokin (TNF- α , IFN- γ , IL-10) wytwarzanych przez komórki zakażane i kontrolne
- o zbadano wpływ zakażenia VSV na stopień ekspresji genów indukowanych interferonem
- o zidentyfikowano subpopulację leukocytów wrażliwą na zakażenie VSV
- o scharakteryzowano zmiany w ekspresji markerów powierzchniowych w obrębie grupy/grup komórek podatnych na zakażenie
- o określono stopień apoptozy wywoływanej przez VSV w zakażonych leukocytach
- o wykonano profil cytokinowy i chemokinowy zakażanych leukocytów

W pracy wykorzystano szereg metod z zakresy wirusologii i immunologii, w tym hodowle tkankowe (namnażanie i mianowanie wirusa VSV z wykorzystaniem metody TCID₅₀ oraz zliczania łysek); zakażanie komórek pełnej krwi i izolowanych leukocytów; oznaczanie przeciwciał neutralizujących VSV w surowicy; pomiary spektrofotometryczne oraz z wykorzystaniem wielokolorowej cytometrii przepływowej. Doktorant posłużył się również technikami biologii molekularnej analizując ekspresję markerów powierzchniowych przy użyciu techniki real-time PCR.

Wybór metodologii uważam za bardzo dobrze uzasadniony, nie tylko merytorycznie w/w potrzebami, ale także godnym uznania przygotowaniem praktycznym Doktoranta. Pragnę również podkreślić, że Doktorant swobodnie porusza się w zaawansowanych technikach w tym RT-PCR planując w sposób przemyślany eksperymenty oraz dobór markerów i genów reporterowych.

Omawiając formalną stronę dysertacji, Pan mgr Tomasz Tomczyk, zastosował układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 137 stron, w tym 18 rycin, 4 tabele oraz 280 pozycji bibliograficznych, głównie anglojęzycznych. Rozsądnym zabiegiem było też załączenie spisu skrótów, który jest bardzo pomocny w przypadku tematyki immunologicznej. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatnie do prezentowanych treści. Tekst pracy jest napisany bardzo starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym unikającym żargonu naukowego lub zapożyczeń językowych.

Mam drobną sugestię co do wstępu pracy, w którym zabrakło mi pomocniczych rycin np. przedstawiającej budowę wirionu VSV z zaznaczeniem organizacji genomu wirusa, czy rycin prezentujących schemat modyfikacji genomu w celach wykorzystania wirusa jako wektora szczepionkowego lub onkolitycznego. Ponieważ praca i omawiane wyniki dotyczą różnych populacji leukocytów, w tym monocytów i komórek z nich powstających, pomocne byłoby dołączenie poglądowej ryciny opisującej te populacje z zaznaczeniem posiadanych przez nie markerów powierzchniowych.

Rozdział materiały i metody jest zorganizowany logicznie i wszystkie 18 metod jest przedstawionych w sposób klarowny i zrozumiały. Szkoda, że doktorant nie umieścił poglądowej fotografii obserwowanych łysek wirusowych. W metodologii opisującej RT-PCR nie wyjaśniono zasadności doboru poszczególnych genów, w tym *VSV_L* jako markera replikacji wirusa.

Bardzo przypadł mi do gustu sposób wykonania eksperymentów i przedstawienia ich w bardzo logiczny sekwencyjny sposób, który pozwala prześledzić całą dedukcję założonego projektu. Pierwszym doświadczeniem było przetestowanie efektywności diagnostycznej kluczowego przeciwciała anty-VSV-G służącego do oceny stadium aktywnego namnażania się wirusa w komórce. Wykonano dodatkowe kontrole wykluczające możliwość fałszywych dodatnich lub ujemnych odczytów, zanim przystąpiono do realizacji właściwych eksperymentów. Badania zostały najpierw wystandaryzowane/ zoptymalizowane pod względem czasu obserwacji oraz wartości MOI wirusa (multiplicity of infection) oznaczającego liczbę wirionów przypadających na zakazaną komórkę.

Analiza podatności leukocytów na zakażenie VSV pozwoliła na wyróżnienie próbek pochodzących od osób słabo lub silnie podatnych. Sprawdzone następnie wpływ zakażenia VSV na wytwarzanie przez leukocyty cytokin: interferonu gamma (IFN- γ), TNF- α oraz IL-10; zaangażowanych w rozwój i przebieg nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Metodą RT-PCR przeanalizowano następnie ekspresję genów receptorów cytoplazmatycznych rozpoznających dsRNA i ssRNA, oraz genów kodujących cztery białka należące do grupy tzw. „ISG” (geny indukowane interferonem): IFITM3, MxA, OAS2 i teterynę. Dodatni efekt wzrostu poziomu ekspresji zaobserwowano dla genu *MxA* kodującego dynamino-podobną fosfatazę.

W tym miejscu chciałbym zapytać, dlaczego akurat wybrano gen kodujący polimerazę VSV (multifunctional large (L) polymerase) jako referencyjny dla potwierdzenia aktywnej replikacji wirusa?

W kolejnych doświadczeniach Doktorant wykorzystał cytometrię przepływową do immunofenotypowania leukocytów w pełnej krwi i analizy zmian receptorów w zakażonych populacjach leukocytów.

Szkoda, że na rycinie 8 nie znalazły się podpisy oznaczające poszczególne rodzaje frakcjonowanych komórek korespondujące z podpisem ryciny. Dla niewprawnego w immunologii biologa analiza przedstawionych schematów jest zatem utrudniona. Szczególnie ostatnia kolumna wykresów podpisana tylko VSV-G, bez opisu które pole należy interpretować jako VSV-G+. I właśnie tutaj do analizy podatności różnych populacji na zakażenie VSV oraz konsekwencji tego zakażenia bardzo przydałby się dla czytelnika poglądowy schemat przedstawiający drzewo różnicowania się leukocytów wraz z opisem posiadanych przez nie receptorów.

W dalszych badaniach określono stopień apoptozy wywoływanej przez VSV w leukocytach i tu nie bardzo zrozumiałam wyniki przedstawione na Figurze 14B, gdzie słupki opisane są jako apoptoza całkowita i późna, gdzie wartość całkowitej jest mniejsza od późnej.

Czy to może pomyłka i zamiast całkowitej miał być podpis wczesna?

Prosiłabym też o wyjaśnienie wniosku z Fig 15 (strona 94): „Obserwowany efekt sugeruje, że apoptoza komórek CD14⁺ wywołana zakażeniem VSV może w dużej mierze dotyczyć komórek, które nie replikują wirusa.” A jednak na tej figurze wartość słupka późna apoptoza VSV-G⁺ jest dużo wyższa niż w komórkach wykazujących brak apoptozy. Czy zatem wynik VSV-G⁺ nie oznacza tu replikacji wirusa?

Ostatni eksperyment odnosił się to charakterystyki środowiska cytokinowego leukocytów zakażanych VSV. I tu Doktorant stwierdza: „Stężenia wymienionych interleukin (1 β , 10, 12 i 15 oraz rozpuszczalnej formy receptora dla interleukiny 2 (IL-2R)) były istotnie niższe w przypadku zakażanych komórek z grupy osób słabo podatnych na zakażenie w porównaniu do komórek kontrolnych z tej grupy. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w stężeniu tych cytokin w grupie zakażanych próbek pochodzących od osób podatnych na zakażenie VSV. Stwierdzono też istotny wzrost stężenia rozpuszczalnej formy receptora dla IL-2 w przypadku zakażanych komórek pochodzących od osób podatnych na zakażenie w porównaniu do komórek kontrolnych. Zmiany tej nie zanotowano w przypadku próbek pochodzących od osób słabo podatnych na zakażenie.

Moje zatem pytania:

- 1. Czy taki spadek stężenia cytokin u osób niewrażliwych może być elementem warunkujących efekt słabej podatności na zakażenie VSV?*
- 2. Czy wzrost poziomu IL-2 może być markerem zakażenia/podatności na zakażenie leukocytów wirusem VSV?*

W końcowych etapach dysertacji, Doktorant wykazał się umiejętnością syntetycznego podejścia do analizy wniosków z nich wynikających, co jest szczególnie trudne w przypadku tematyki immunologicznej. Postawione cele omawianej pracy zostały osiągnięte zgodnie z założeniem i podsumowane w dziesięciu głównych punktach. Szczegółowa dyskusja pozwoliła Autorowi na wysnucie trzech ogólnych wniosków, które przejrzyście przedstawiła w rozdziale 9.

Ponieważ tematyka immunologiczna jest zawsze bardzo złożona i trudna w interpretacji, chciałabym poprosić Doktoranta o syntetyczne podsumowanie swoich badań, mam tu na myśli ogólne pytanie:

I z tego wszystkiego wynika? Jakie mogą być konkluzje Pańskich badań w kontekście potencjalnego zastosowania wirusa VSV do tworzenia nowych terapii antynowotworowych oraz szczepionek?

Podsumowanie

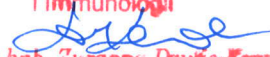
Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą, jestem przekonana, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Nie mam istotnych zastrzeżeń do merytorycznej strony pracy. Przeprowadzenie tych badań dowodzi osiągnięcia dużych umiejętności Doktoranta w poprawnym posługiwaniu się nowoczesnymi metodami badawczymi oraz kompetentnej interpretacji uzyskiwanych rezultatów. Duża wartość naukowa projektu została znakomicie potwierdzona przez publikację wyników w specjalistycznym czasopiśmie z listy filadelfijskiej Journal of Innate Immunity.

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Tomczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (jt. Dz.U. z 2016 r., poz. 882 ze zm.).

Wnioskuje również o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Tomasza Tomczyka zgodnie z wytycznymi regulaminu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Prof. Zuzanna Drulis-Kawa

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Patogenów
i Immunologii

prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa