Poznań, 4 listopada 2020 r.

dr hab. inż. Krzysztof Pudełko
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Pyrskiego

pt. „Cząstki kapsydopodobne HBcAg otrzymywane w roślinach jako składnik szczepionek oraz bionanocząstek", wykonanej w Instytut Genetyki Roślin PAN pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Pniewskiego.

Recenzja została przygotowana na prośbę Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu przekazaną pisemnie przez Dyrektora Instytutu, Pana prof. dr hab. Pawła Krajewskiego.

Przygotowana przez Pana Magistra Marcina Pyrskiego rozprawa doktorska dotyczy prób wykorzystania białek antygenu rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HbcAg) uzyskanych w roślinnych systemach ekspresyjnych jako składników szczepionek oraz elementów bionanocząstek. W badaniach, których wyniki składają się na omawianą rozprawę Pan Magister Pyrski wykorzystywał zarówno transgeniczne rośliny gatunków uprawnych, takich jak sałata *Lactuca sativa* i tytoń *Nicotiana tabacum* oraz system ekspresji przejściowej w modelowym gatunku N*icotiana benthamiana*. Głównym celem badawczym, który postawił przed sobą Doktorant była weryfikacja hipotezy mówiącej o tym, że cząstki kapsydopodobne (CLP) HBcAg wytworzone w roślinnych systemach ekspresyjnych wywołują istotną odpowiedź układu immunologicznego, gdy podane są domięśniowo oraz doustnie. Dodatkowo zainteresowanie Magistra Pyrskiego budziła możliwość uzyskania w systemie ekspresji przejściowej z wykorzystaniem wektora pEAQ i *Nicotiana benthamiana* mozaikowych cząstek kapsydopodobnych, prezentujących różne epitopy, a także zdolność do odtwarzania struktury CLP przez uzyskane w roślinnych systemach ekspresyjnych rekombinowane białka antygenu rdzeniowego wirusa HPV opłaszczające nanocząsteczki tlenku żelaza.

Postawione główne cele badawcze Pan Magister Marcin Pyrski, w trakcie badań będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, zrealizował.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 126 stron, na które składa się obszerna część teoretyczna oraz stanowiący integralną część pracy, spójny tematycznie, zbiór dwóch artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach *Vaccine* (IF_{2017}=3,285) i *Vaccines* (IF_{2019}=4,760). W przypadku obu przedstawionych artykułów Doktorant jest pierwszym autorem. Taka forma

przedstawienia rozprawy doktorskiej jest przewidziana w w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, a załączone oświadczenia wszystkich współautorów przedstawionych artykułów nie pozostawiają wątpliwości co do indywidualnego i wartościowego wkładu kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tych prac.

Przedstawiona rozprawa zawiera wszystkie niezbędne elementy, takie jak Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz użytych skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Wnioski, Wykaz cytowanej literatury. Tytuł rozprawy jest dobrze sformułowany i właściwie odnosi się do jej treści.

Z uwagi na fakt, że integralną część rozprawy stanowią opublikowane artykuły, w których szczegółowo przedstawiono wykorzystane materiały i metody, zaprezentowano uzyskane wyniki i przeprowadzono ich dyskusję, w części przygotowanej przez Autora na potrzeby przewodu doktorskiego te rozdziały zostały przedstawione w formie nieco skróconej, ale jest to w pełni uzasadnione i nie mam do takiej formy ich zaprezentowania żadnych uwag.

Wydaje się, że przy przygotowaniu ocenianej rozprawy doktorskiej nie było potrzeby włączania do niej hipotezy nr 2 i 3. Uważam za cenne zaangażowanie Autora w prace innych badaczy, w których mogą zostać wykorzystane jego kompetencje i wiedza, ale jak sam pisze we Wstępie (str. 7) *„Dodatkowo opisałem część mojej pracy doktorskiej, która nie została jeszcze opublikowana lub jest częścią publikacji, w których nie byłem wiodącym autorem. Ze względu na spójność wszystkich wykonanych i opisanych przeze mnie doświadczeń naukowych zostały one zamieszczone w tej pracy”*. Moim zdaniem rozdziały 7.2 „HBcAg jako nośnik epitopów w cząstkach mozaikowych” oraz 7.3 „HBcAg CLPs jako otoczka supermagnetycznych cząstek tlenku żelaza” powinny raczej – jeśli Autorowi na tym zależało – zostać zaprezentowane jako aneks do rozprawy, a nie jego integralna część. W takiej formie, jak w ocenianej rozprawie, raczej ujmują jej spójności niż dodają. Jeśli jednak wolą Doktoranta było zaprezentowanie wyników uzyskanych we współpracy z innymi badaczami, to wymagałyby one jednak bardziej szczegółowego opisania wykorzystanych materiałów i metod, oraz pewnego kontekstu. Uważam jednak, że nie było takiej konieczności, a materiał zaprezentowany w głównej części pracy jest interesujący, dobrze udokumentowany i oryginalny.

Pierwsza część rozprawy doktorskiej obejmuje obszerne „Wprowadzenie”, przedstawione na 42 stronach zwartego tekstu. Do jego przygotowania wykorzystano bogatą literaturę przedmiotu, właściwie dobraną i obejmującą 174 pozycje. Z tej listy 57 pozycji to artykuły wydane w 2010 roku lub nowsze. Wydaje się, że wyodrębnienie rozdziału 4. „Cząsteczki kapsydopodobne HbcAg jako nośnik” nie ma silnego uzasadnienia i rozdział ten mógłby zostać opatrzony kolejnym numerem „Wprowadzenia”, czyli 3.6.

Zamieszczona w rozprawie Publikacja nr 1 zawiera 6 rycin obejmujących 8 wykresów, jeden obraz prezentujący wyniki analizy western-blot i jeden obraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W tej publikacji Autorzy przywołują 33 pozycje literaturowe (z czego 14 wydanych w 2010 r. lub nowsze). Dołączono do niej 1 Tabelę w formie suplementu. Publikacja nr 2 zawiera 2 ryciny, na które składa się 5 wykresów i jeden obraz skaningowej mikroskopii laserowej. W artykule przywołano 40 pozycji literaturowych (z których 30 to prace opublikowane w 2010 lub nowsze). Ponieważ przedstawione w rozprawie doktorskiej opublikowane artykuły są pracami wieloautorskimi, Doktorant w sposób właściwy załączył oświadczenia wszystkich Autorów wskazujące na ich szacowany udział w przygotowaniu publikacji. W przypadku obu publikacji deklarowane udziały sumują się do 100% i jednoznacznie potwierdzają 30 % udział Magistra Pyrskiego w przygotowanie Publikacji nr 1 u 35% udział w przygotowaniu Publikacji nr 2. Deklaracje Autorów oraz fakt, że w przypadku obu artykułów Doktorant jest pierwszym autorem wskazują jednoznacznie na jego znaczący – można powiedzieć kluczowy – udział w przygotowaniu obu wartościowych prac i w pełni uzasadniają ich włączenie do ocenianej rozprawy doktorskiej.

Jak wynika z powyższego, oceniana rozprawa doktorska przygotowana jest od strony formalnej właściwie i jako taka nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna

Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest aktualna, gospodarczo i społecznie istotna oraz budząca znaczne zainteresowanie w Polsce i na świecie. Wydaje się, że w ostatnich miesiącach problematyka ta nabrała jeszcze dodatkowego znaczenia, a znaczne środki finansowe przeznaczone w całym świecie na opracowanie szczepionek antywirusowych różnego typu przyczynią się do dalszego dynamicznego rozwoju tego obszaru badań.

Szczepionki uważane są powszechnie za jedno z najważniejszych osiągnięć medycyny ostatniego wieku, a czasem nawet medycyny w ogóle. Ich powszechne stosowanie umożliwiło wyeliminowanie na przestrzeni ostatnich 50 lat wielu groźnych chorób, które wcześniej stanowiły olbrzymie problemy społeczne, gospodarcze i humanitarne. Klasyczne i nadal w przeważającym stopniu stosowane podejście do ich aplikacji drogą iniekcji niesie za sobą jednak szereg problemów, zagrożeń i kosztów. Stąd duże zainteresowanie i potrzeba opracowania alternatywnych – w założeniu łatwiejszych i tańszych – sposobów podawania szczepionek pacjentom. Jednym z takich potencjalnych sposobów jest podawanie szczepionek doustnie.

Prace dotyczące doustnych rekombinowanych szczepionek uzyskiwanych z materiału roślinnego mają swoją długą i bogatą historię ze znaczącym udziałem badaczy polskiego i poznańskiego środowiska biotechnologicznego. Warto tu wymienić pionierów tych badań, czyli Profesorów Andrzeja Płucienniczaka, Józefa Kapustę i Tomasza Pniewskiego – promotora

recenzowanej pracy. Oceniana rozprawa doktorska jest dowodem na to, że historia, która ma swój początek w latach 90-tych XX w. nadal nie jest tylko historią, jest wciąż rozwijana i wciąż pozwala odkrywać nowe perspektywy.

W rozdziale „Wprowadzenie" magister Marcin Pyrski w sposób bardzo przejrzysty i kompetentny wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z funkcjonowaniem układu odpornościowego i jego roli w szczepieniach profilaktycznych. Następnie przedstawia zalety szczepień doustnych i ograniczenia związane z tym podejściem, wynikające z anatomii i fizjologii przewodu pokarmowego oraz wykształcanej tolerancji pokarmowej, a następnie przedstawia współczesny stań badań nad szczepionkami doustnymi i aspekty technologiczne ich aplikacji. W drugiej części tego rozdziału Autor koncentruje się na omówieniu zagadnień badanych szczegółowo w trakcie Jego pracy doktorskiej, a więc omawia znaczenie wirusowego zapalenia wątroby typu B, strukturę antygenu rdzeniowego HBV i jego wykorzystanie jako szczepionki oraz omawia sposoby otrzymywania HBcAg w roślinnych systemach ekspresyjnych - w tym stabilnej transformacji roślin i wykorzystania nowatorskiego podejścia opartego na ekspresji przejściowej. Ostatnia część „Wprowadzenia" poświęcona jest dyskusji nad możliwościami wykorzystania kapsydopodobnych cząstek HBcAg jako nośników prezentujących wprowadzone do nich epitopy heterologiczne oraz nad możliwościami wykorzystania HBcAg do otoczkowania cząstek superparamagnetycznych.

Bardzo wysoko oceniam zawartość merytoryczną tej części pracy i gorąco zachęcam Autora do jej opublikowania w całości jako wartościowego artykułu przeglądowego. W trakcie czytania „Wprowadzenia" uwagę zwraca dobre przygotowanie teoretyczne Autora do podjętych badań, jego dogłębna znajomość problematyki oraz wieloaspektowy sposób rozumienia omawianych zagadnień. Uwagę zwraca także Jego entuzjazm w odniesieniu do potencjału szczepionek doustnych idący w parze z koniecznym obiektywizmem naukowym i świadomością ograniczeń.

Przed przygotowaniem rozdziału do publikacji sugeruję rozważyć pewne poprawki i uściślenia:

- Autor w tekście kilkukrotnie używa określenia „prerogatywa", które w takim kontekście wydaje się niezbyt szczęśliwe. Np. na str. 15 „indukcja silnej odpowiedzi ogólnoustrojowej jest prerogatywą nie tylko immunizacji pozajelitowej" lub str. 20 „transport mikroorganizmu lub antygenu jest ścisłą prerogatywą FAE pokrywającego PP", podczas gdy słowo to ma raczej zastosowanie w polityce i oznacza zwykle „szczególne uprawnienie związane z zajmowanym stanowiskiem lub pełnioną funkcją"
- Autor kilkukrotnie w tekście stosuje kalkę językową w odniesieniu do określenia respectively – odpowiednio. Np. na str 32 (ale też w innych miejscach) „Ryzyko CHB maleje z wiekiem, u niemowląt i starszych dzieci wynosi od 50 do 30%, odpowiednio", podczas gdy zdanie to brzmiałoby lepiej „Ryzyko CHB maleje z wiekiem, u niemowląt i starszych dzieci wynosi odpowiednio od 50 do 30%."

- na str. 33 rozwinięcie skrótu pgRNA omyłkowo widnieje jako pre-genomic DNA
- wydaje się, że podrozdział 3.4.2 – mimo, że obrazowo opisuje strukturę antygenu rdzeniowego HBV – zyskałby znacznie gdyby został uzupełniony rysunkiem, bądź schematem przedstawiającym tę strukturę.

Niezależnie od tych drobnych propozycji korekt, uważam to opracowanie za dobrze przygotowane, interesujące i wartościowe.

Część eksperymentalna rozprawy zawiera przede wszystkim spójny tematycznie, zbiór dwóch artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, a zamieszczonych w rozprawie *in extenso*. Są to – opisany jako Publikacja 1 – artykuł opublikowany w 2017 r w *Vaccine* pt.”HBcAg produced in transgenic tobacco triggers Th1 and Th2 response when intramuscularly delivered” oraz opisany jako Publikacja 2 artykuł z 2019 r opublikowany w *Vaccines* pt. „Parenteral–Oral Immunization with Plant-Derived HBcAg as a Potential Therapeutic Vaccine against Chronic Hepatitis B”. W podrozdziale 7.1 rozdziału 7. rozprawy Autor zamieścił szczegółowe omówienie najważniejszych wyników opisanych w tych pracach, a w podrozdziale 7.2 HbcAg jako nośnik epitopów w cząstkach mozaikowych oraz podrozdziale 7.3 HbcAg CLPs jako otoczka superparamagnetycznych cząstek tlenku żelaza wyniki badań prowadzonych dodatkowo z innymi badaczami.

Jak wspomniano wcześniej, moim zdaniem rozdziały 7.2 i 7.3 nie stanowią pełnego opracowania naukowego, zamieszczony opis doświadczeń nie umożliwia ich powtórzenia, a przedstawione wnioski prezentowane są raczej jako przypuszczenia, spekulacje lub wskazują ewentualne kierunki dalszych badań. Podrozdziały te mogłyby zostać zamieszczone w rozprawie w formie aneksu, a nie w jej podstawowej części. W związku z tym proponuję, aby dwa ostatnie wnioski zamieszczone w Rozdziale 8. potraktować jako hipotezy robocze wskazujące dalsze kierunki badań. Niezależnie od powyższego, warto zwrócić uwagę na zdecydowanie pozytywny obraz wyłaniający się z lektury podrozdziałów 7.2 i 7.3. Wskazują one na interdyscyplinarność zainteresowań Doktoranta, Jego umiejętność pracy w takich wielodyscyplinowych zespołach – co nie zawsze jest łatwe – oraz na dalsze aktywne poszukiwanie interesujących obszarów badawczych.

Zamieszczone w rozprawie w formie dwóch już opublikowanych artykułów materiały stanowią opracowanie spójne, bardzo interesujące, nowatorskie i dobrze przygotowane. W Publikacji 1 dla uzyskania HBcAg wykorzystano roślinny system stałej transformacji *N. tabacum*. W pokoleniu T0 przeanalizowano ponad 200 transgenicznych roślin i znaczna ich część (ponad 30%) pozwalała na uzyskanie 100-200 µg HBcAg na gram świeżej masy liści. W pokoleniu T1 obserwowano spadek zawartości HBcAg w liściach, ale uzyskano linie zawierające ponad 100 µg HBcAg na gram świeżej masy liści. Istotnym elementem tej publikacji jest opracowanie wydajnego systemu oczyszczania HBcAg opartego na buforze TEN II i wirowaniu w skokowym gradiencie sacharozy.

Taki system pozwolił na uzyskanie preparatów HBcAg o 43% czystości. Autorzy wykazali, że HBcAg uzyskane z liści transgenicznego tytoniu i oczyszczone według opracowanej procedury zdolne są do składania w CLP – cząstki kapsydopodobne. Doświadczenia z wykorzystaniem modeli mysich pozwoliły Autorom na wykazanie, że niskie dawki częściowo oczyszczonego preparatu HBcAg uzyskanego z transgenicznego tytoniu podawane domięśniowo mogą aktywować układ odpornościowy myszy i wywoływać znaczną odpowiedź immunologiczną. Oznaczenie profilu przeciwciał pozwoliło wykazać, że uzyskana odpowiedź immunologiczna miała charakter mieszany i wskazuje na stymulację odpowiedzi komórkowej. Ogłoszone w Publikacji 1 wyniki wskazują na duży potencjał roślinnych systemów transgenicznych w produkcji antygenów pozwalających na przygotowanie efektywnych szczepionek.

- Korzystając z okazji chciałbym prosić, aby Doktorant spróbował wyjaśnić tak duże różnice w uzyskanej wydajności oczyszczania HBcAg (opisane w suplemencie Publikacji 1) – sięgające nawet %SD > 60%, a również w zastosowanym protokole rzędu 42%

W Publikacji 2 Autorzy zaproponowali bardzo interesujący schemat szczepienia w oparciu o HBcAg pochodzenia roślinnego a polegający na domięśniowej aplikacji iniekcyjnej szczepionki pierwotnej oraz podanej w formie doustnej szczepionki przypominającej. Szczepionka pierwotna tu zastosowana przygotowana została z HBcAg uzyskanego w systemie ekspresji przejściowej w *N. benthamiana*, natomiast szczepionkę przypominającą oparto na sproszkowanym liofilizacie liści transgenicznej sałaty zdolnej do produkcji HBcAg. Liofilizacja pozwoliła na prawie 20-krotne zwiększenie stężenia antygenu w preparacie roślinnym przy jednoczesnym zmniejszeniu jego objętości. Przedstawiona w ramach rozprawy doktorskiej Publikacja 2 po raz pierwszy w literaturze wykazuje, że podawany doustnie liofilizowany materiał z roślin transgenicznych zawierający stosunkowo małe stężenie antygenu (HBcAg) i podany bez dodatkowych adiuwantów skutecznie wywołuje efekt przypominający szczepienia. To bardzo cenne odkrycie, które – jeśli zostanie wykorzystane i wdrożone – może pomóc rozwiązać jeden z podstawowych problemów związanych z powszechnością skutecznych programów szczepień, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Pisał o tym również Doktorant we „Wprowadzeniu”, wskazując, że duże koszty i problemy logistyczne związane ze stosowaniem tradycyjnych, podawanych iniekcyjnie, dawek przypominających znacznie obniżają skuteczność wielu programów szczepień. W przedstawionej Publikacji 2 Autorzy wykazali też stosunkowo wysoką trwałość preparatów HBcAg z liofilizowanych liści sałaty przechowywanych w $4^{O}C$ przez wiele miesięcy – do 1 roku. Z tą ostatnią obserwacją wiążą się trzy pytania, które pozwalam sobie zadać Doktorantowi:

- Z czego wynika spadek sięgający 50% zawartości antygenu w liofilizowanym preparacie z liści sałaty?

- Jak wyjaśnić zatrzymanie tego spadku i stabilną zawartość HBcAg po 3, 9 i 12 miesiącach przechowywania?
- Jak długo przechowywany preparat z liofilizowanych liści sałaty był wykorzystywany jako szczepionka przypominająca w doświadczeniach z udziałem myszy?

Ocena końcowa

Recenzowaną rozprawę kwalifikuję jako rozprawę doktorską za następujące osiągnięcia:

- podjęcie tematyki badawczej trafnej zarówno pod względem poznawczym, jak i utylitarnym
- wykorzystanie zróżnicowanej i pracochłonnej metodyki badawczej obejmującej techniki molekularne, agronomiczne, chemiczne, medyczne i nauki o materiałach
- właściwe zaplanowanie doświadczeń, analizę zgromadzonego materiału badawczego oraz prawidłowe sformułowanie wniosków w dwóch przekazanych do oceny całego środowiska naukowego opublikowanych artykułach
- przygotowanie wyczerpującego i opartego na wielu źródłach przeglądu literatury przedmiotu rozprawy

Za najbardziej wartościowe osiągnięcie ocenianej rozprawy uważam wykazanie, że niskie dawki częściowo oczyszczonego preparatu HBcAg uzyskanego z roślin transgenicznych podawane domięśniowo mogą aktywować układ odpornościowy myszy i wywoływać znaczną odpowiedź immunologiczną oraz zaproponowanie nowatorskiego schematu szczepienia w oparciu o antygeny pochodzące z roślinnych systemów ekspresyjnych uzyskanych zarówno na drodze stałej transformacji jak i ekspresji przejściowej. Nowoczesne wykorzystanie systemów roślinnych do wytwarzania cennych poznawczo i ekonomicznie antygenów HBcAg stanowi w mojej ocenie istotny wkład w rozwój biotechnologii roślin, a co za tym idzie dyscypliny agronomia.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera istotne naukowe i utylitarne elementy. Stanowi spójne i oryginalne opracowanie naukowe. Stwierdzam, że rozprawa „Cząstki kapsydopodobne HBcAg otrzymywane w roślinach jako składnik szczepionek oraz bionanocząstek” spełnia wymagania sformułowane w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr Marcina Pyrskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Krzysztof Pudełko

Krzysztof Pudełko