



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Zoologii

ul. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106



Prof. dr hab. Maria Doligalska
Zakład Parazytologii

Warszawa, 10 sierpnia 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Marcina Grzybowskiego, zatytułowanej
„Rekombinowane białka ROP5 i ROP18 *Toxoplasma gondii* jako antygeny
diagnostyczne i szczepionkowe”

Oceniana praca doktorska została wykonana w Zakładzie Immunoparazytologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Henryki Długońskiej i opieką promotora pomocniczego dr hab. Bożeny Dziadek. Praca została przygotowana w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej.

1. Obszar badań

Zarażenie *Toxoplasma gondii* jest niebezpieczne dla zdrowia i życia zwierząt oraz człowieka. Jest wysoce patogenne dla płodów, a postać utajona ujawnia się u dzieci w różnym wieku. Do niedawna większość badań nad toksoplazmozą dotyczyła epidemiologii. Rozprzestrzenienie pasożyta wynika z bardzo szerokiego kręgu żywicieli. Z tego powodu źródło zarażenia jest trudne do ustalenia. Zarażenie *T. gondii* u osób ze sprawnym układem odpornościowym wzbudza silną odpowiedź immunologiczną, a parazytemia ulega zahamowaniu. Jednak pierwotniaki nie są całkowicie eliminowane i mogą utrzymywać się w żywicielu przez całe jego życie. W szczególnych okolicznościach i niestety coraz częściej notowanych przypadkach spadku odporności żywicieli, może następować reaktywacja utajonego zarażenia. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja pasożyta czyni chorobę trudną do opanowania, a leki ze względu na wysoką toksyczność nie spełniają kryteriów bezpiecznych terapeutyków.

Obecnie badania toksoplazmozy prowadzone w wielu ośrodkach na świecie zmierzają do rozpoznania czynników wirulencji pasożyta, co pozwala lepiej zrozumieć specyficzność wzajemnych oddziaływań pasożyta i żywiciela. Poszukiwania czynników wirulencji skłoniły parazytologów do badania genomu i proteomu. Dzięki tym badaniom możliwe jest rozpoznanie antygenów, które mogą być wytypowane do zastosowania w szczepionkach, natomiast białka immunogenne są niezbędne do opracowania swoistych testów diagnostycznych. Tematyka badań prowadzonych w Zakładzie Immunoparazytologii pod kierunkiem prof. dr hab. Henryki Długońskiej ostatnio koncentruje się na identyfikowaniu białek pasożyta, w celu opracowania szczepionki nowej generacji. Nową propozycją w schemacie dotychczasowych badań jest próba wskazania białek wirulentnych właściwych dla ostrej oraz dla chronicznej fazy zarażenia w jej wczesnym okresie, scharakteryzowanie których mogłoby być kluczowe dla zdiagnozowania przebiegu choroby i podjęcia leczenia.

W przedstawionej pracy zastosowanie warsztatu molekularnego, immunologicznego oraz bioinformatycznego wskazuje na przygotowania doktoranta do prowadzenia badań parazytologicznych na bardzo wysokim poziomie. Wybór tematu pracy uważam za wysoce uzasadniony o ważnym znaczeniu aplikacyjnym.

2. Przedmiot badań

Przedstawiona rozprawa doktorska przedstawia badania nad konstrukcją szczepionki nowej generacji przeciw *T. gondii*. Wybrano dwa białka tego pasożyta, które wyprodukowano metodami biotechnologicznymi w komórkach rekombinowanych bakterii *E. coli*. Są to białka sekrecyjne organelli cytoplazmatycznych aparatu apikalnego - roptrii, biorące udział podczas wnikania *T. gondii* do komórek żywiciela. Formy rekombinowane białek ROP5 i ROP18 oceniono pod względem ich przydatności do immunodiagnostyki oraz wprowadzenia ich do wieloskładnikowej szczepionki przeciw toksoplazmozie. Wybrane białka oceniono pod względem zachowania właściwości antygenowych, przydatnych do diagnozowania zarażenia *T. gondii* u człowieka. Właściwości immunogenne tych białek badano także u myszy laboratoryjnej w celu określenia poziomu odpowiedzi immunologicznej, komórkowej i humoralnej. Wykorzystując różne szczepy pasożyta i myszy, badania prowadzono w okresie ostrej oraz przewlekłej toksoplazmozy. Zatem w badaniach uwzględniono zarówno materiał ludzki jak i eksperymentalny układ modelowy, co umożliwiło obszerną ocenę właściwości otrzymanych białek. Jest to istotne, gdyż ostatnie badania (Niedelman et al. 2012, PLOS Pathogens e1002784) wskazują na odmienne sygnały pasożyta wzbudzające mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej przez pierwotniaka u człowieka i u myszy.

Tak ustawione badania świadczą o zrozumieniu przez doktoranta biologicznej funkcji antygenów pierwotniaka i uwarunkowań zróżnicowania wrażliwości żywiciela na zarażenie różnymi szczepami pasożyta.

3. Ocena formalnej strony pracy

Pod względem formalnym układ i treści rozprawy są jest poprawnie zaplanowane.

Recenzowana rozprawa liczy 107 stron z typowym dla tego typu opracowań podziałem na wstęp, opis celu pracy, opis materiałów, metod, wyników badań i ich dyskusję. Pracę rozpoczyna spis treści, wykaz źródeł finansowania, wykaz skrótów, a kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz licząca 169 pozycji bibliografia. W tekście zamieszczone jest 25 rycin i 20 tabel.

W liczącym 18 stron i składającym się z pięciu rozdziałów wstępie doktorant przedstawia kluczową wiedzę dotyczącą biologii pasożyta, odpowiedzi immunologicznej w zarażeniu *T. gondii* w tym odpowiedzi Th1 zależnej, cytokin regulatorowych oraz odpowiedzi humoralnej, wirulencji ROP5 i ROP18, wskaźników immunologicznych i pasożytniczych w tym białek rekombinowanych przydatnych do diagnostyki toksoplazmozy oraz obecnych badań nad opracowaniem szczepionki przeciw pierwotniakowi.

Jasno i precyzyjnie przedstawiony jest cel pracy, który zakłada próbę oceny przydatności otrzymanych białek rekombinowanych ROP5 i ROP18 do wykorzystania w diagnostyce a także w profilaktyce toksoplazmozy z propozycją dołączenia ich do poliwalentnej szczepionki. Analiza szczegółowych celów przedstawionych przez doktoranta świadczy o wszechstronnym i przemyślanym podejściu do badanego problemu. Szkoda jednak że **zabrakło postawionej hipotezy badań**, której weryfikacja nadałaby biologiczny, a nie tylko aplikacyjny charakter otrzymanym wynikom. Możliwe przecież było połączenie oceny aktywacji immunologicznej z poziomem zaindukowanej lub nie, reakcji obronnej po immunizacji białkami rekombinowanymi.

Realizując cele: w procesie biosyntezy w komórkach *E.coli* otrzymano rekombinowane białka *T.gondii* ROP5 i ROP18; oceniono właściwości antygenowe tych białek i ich przydatność do wykrywania zarażenia *T. gondii* u człowieka w swoistym wiązaniu z przeciwciałami klasy IgM i IgG surowicy pacjentów; oceniono potencjał rekombinowanych ROP5 i ROP18 do generowania antygenowo swoistej komórkowej i humoralnej odpowiedzi odpornościowej przeciw *T. gondii* u myszy; analizowano efektywność doświadczalnych szczepionek zawierających rekombinowane ROP5 i ROP18. Lektura opisu wyników pozwala na stwierdzenie, że **zamierzone przez Doktoranta cele badawcze zostały osiągnięte**. Otrzymano cztery rekombinowane formy białek ROP5, ROP5-C, ROP18, ROP8-C *T. gondii* w prokariotycznym systemie ekspresji. Białka te były rozpoznawane przez przeciwciała swoiste wobec natywnych antygenów *T. gondii*. Reagowały zarówno z przeciwciałami surowicy pacjentów chorujących na toksoplazmozę ostrą i przewlekłą. Białko ROP18 zostało wskazane jako wiążące się z IgM, czyli przydatne do diagnozowania ostrej toksoplazmozy. Oceniono także immunogenność i skuteczność obronną szczepionki doświadczalnej z ROP5 i ROP18, osobno i łącznie. Immunogenność tych białek miała być znacząco wzmocniona po podaniu z adiuwantem poli(I:C). Badania te były oryginalne i wykonano je na szczepach myszy wykazujących odmienną wrażliwość na zarażenie. Immunizacja białkami rekombinowanymi wprawdzie nie doprowadziła do wywołania pełnej odporności na zarażenie zarówno w fazie ostrej jak i przewlekłej, ale ze względu na potencję wzbudzania odpowiedzi immunologicznej oba białka zdaniem doktoranta mogą być uwzględnione przy opracowaniu wieloskładnikowej szczepionki przeciw toksoplazmozie. Coraz częściej podkreśla się, że wzbudzenie efektywnej odporności jest bardziej prawdopodobne poprzez szczepionki poliwalentne, pomimo że w przypadku szczepionek monowalentnych początkowo odpowiedź pierwotna jest silniej zaznaczona.

Dyskusja licząca 13 stron maszynopisu jest bardzo krytyczna w ocenie uzyskanych wyników. W kolejnych częściach dyskutowane są odrębne wątki. W części poświęconej klonowaniu i ekspresji genów *rop5* i *rop18* *T.gondii*, omawiana jest wydajność biosyntezy białek. W części „Właściwości antygenowe i immunoreaktywność” zwrócono uwagę na różnice w odpowiedzi przeciwciał IgM i IgG wobec różnych białek u pacjentów oraz na modelu mysim. W fazie ostrej i chronicznej zarażenia omówiono wartość diagnostyczną uzyskanych białek rekombinowanych zwracając uwagę na możliwość reakcji krzyżowych rzutuujących na swoistość i czułość odczytów. Najobszerniej omówiono immunogenność otrzymanych białek. W rozdziale tym przedyskutowano przydatność rekombinowanych ROP5 i ROP18 w konstruowaniu szczepionki, po uwzględnieniu ich właściwości określonych w przeprowadzonych badaniach. Wskazano także nieznaczną przydatność adiuwantu poli (I:C) do wzmocnienia immunogenności białek w badanym modelu mysim i zwrócono uwagę na potrzebę poszukiwania bardziej wydajnych immunostymulatorów. Omówiono znaczenie IFN- γ i IL-10, ale zawiązując ten wątek do odpowiedzi Th1/Th2 i cytotoksycznej, które miałyby wyznaczać poziom odporności. Kończąc dyskusję doktorant omawia aktywność ochronną białek uzyskaną po immunizacji myszy i podkreśla umiarkowaną przydatność rekombinowanych antygenów ROP5 i ROP18 do celów diagnostycznych i immunoprofilaktycznych.

Dyskusja świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu, ale jest bardzo oszczędna. W opinii recenzenta znaczenie odpowiedzi regulatorowej mogłoby być lepiej podkreślone, gdyż wyniki poziomu badanych cytokin i ekspresji receptorów mogą na nią wskazywać.

Walorem pracy jest syntetyczny opis wszystkich jej części, który był możliwy po umieszczeniu wielu danych w tabelach. To sprawia, że pracę czyta się łatwo mimo, że zgromadzono dużo informacji źródłowych. Szczególnie przejrzyste są przedstawione materiały oraz metody i wyniki. **Na wyróżnienie zasługuje bardzo elegancka szata graficzna pracy.**

4. Uwagi krytyczne

W badaniach odpowiedzi komórkowej w układzie kontrolnym zastosowano konkanawalinę a aktywacja komórek przez tę lektynę zachodzi poprzez ściśle określone reszty cukrowe. Ponadto aktywacji podlegają różne populacje limfocytów, w tym supresorowe. Ponieważ oceniano immunogenność białek określając aktywację limfocytów T CD4+ i CD8+, użycie przeciwciał przeciw receptorowi limfocytów T – TCR oraz cząsteczkom kostymulującym byłoby bardziej odpowiednie. Nie wiemy także czy stężenie antygenów rekombinowanych było wymiarczkowane, i czy antygeny były użyte w najbardziej optymalnych stężeniach stymulujących wydzielanie cytokin i proliferację splenocytów. Nadmiar antygeny zwykle wzbudza stan anergii komórek, co może być wyrażone w słabej proliferacji komórek i niskiej ekspresji receptorów czy produkcji cytokin lub obniżonym poziomie przeciwciał.

Doprecyzowania wymaga informacja czy tachyzoity izolowano z mózgowia czy z mózgu, W skład mózgowia, które jest częścią ośrodkowego układu nerwowego znajdującego się w czaszce wchodzi mózg, mózdzek i rdzeń przedłużony. Czy zatem pierwotniaki izolowano z wszystkich tych części.

W rozdziale analiza statystyczna nie podano jak liczne były grupy zwierząt lub w ilu powtórzeniach wykonano testy, chociaż liczba myszy dla różnych szczepów jest podana w kilku miejscach pracy.

Wiele schematów i diagramów nie ma odnośników do prac źródłowych. We wstępie Doktorant przedstawia diagramy, do których nie ma odwołania w tekście (rycina 1.2; rycina 1.3; rycina 1.4; rycina 3.1), zatem sens tej numeracji traci znaczenie. Numeracja 4 rycin na stronach 69-74 jest zdublowana.

Na stronie 68 rozdział 5.7.1., dyskusyjny jest opis dla IL-10. IL-10 nie jest cytokiną specyficzną wyłącznie dla odpowiedzi Th2 zależnej. Jej pojawienie się należy raczej kojarzyć z odpowiedzią regulatorową, począwszy już od niepełnej aktywacji komórek dendrytycznych. Ponadto, stwierdzam niepełną dyskusję poziomu cytokin tym bardziej, że wyniki poziomu IFN- γ i IL-10 oznaczają słabą aktywację splenocytów u myszy BALB/c, a więc szczepu opornego na zarażeniu tym pierwotniakiem. Omówienia wymaga także synergistyczny wpływ obu białek na poziom IL-10 u myszy wrażliwych CH3/HeOuJ.

Nie wyjaśniono dlaczego poziom odpowiedzi humoralnej jest przedstawiony w formie współczynnika IgG1/IgG2 i nie podano interpretacji tych wyników.

Interpretacja ekspresji powierzchniowych receptorów CD69 wymaga pełniejszej dyskusji. Receptor CD69 należący do rodziny receptorów lektynowych typu C, działa jak cząsteczka stymulująca limfocyty T i ich proliferację. Cząsteczka ta także występuje na innych klasach komórek i jest uważana za czynnik pojawiający się podczas aktywacji i różnicowania różnorodnych komórek hematopoetycznych, także na limfocytach regulatorowych. Zatem w puli limfocytów rozpoznanych na nadstawie receptorów CD69 CD4+ mogły się znaleźć także populacje innych komórek. Jeśli zamierzamy oznaczyć typ zachodzącej aktywacji immunologicznej to wymagane jest dalsze różnicowanie receptorowe komórek. Wydaje się, że ten wątek badań może być dalej badany pod kątem właściwości immunogennych antygenów.

Doktorant nie uniknął niezręczności stylistycznych oraz używania sformułowań hermetycznych, żargonowych jak np. odpowiedź limfoproliferacyjna splenocytów. Proszę o uzasadnienie używania terminu białka „rekombinantowe”, zamiast „rekombinowane”. Na stronie 27 zamiast „propagowanych” proponuję „namnażanych”; i dalej zamiast suplementowano – uzupełniono; aeracje – napowietrzenie; niepotrzebny jest termin „komórki toksoplazm.” gdyż w tym przypadku mamy do czynienia z jednokomórkowym organizmem więc naturalne będzie użycie terminu formy rozwojowej - trofozoit; na stronie 40 nieścisłość opisu dotyczy wirowanego materiału; wirowano zawiesiny komórek, zatem w czasie

wirowania nie tkanki, a komórki mózgowia lokalizują się w interfacie gradientu. Niezręcznie brzmi zdanie „szczep *T. gondii* pasażowano in vivo przy użyciu myszy” Poprawnie brzmi zapis: pasaż był prowadzony na myszach szczepu...

Treść akapitu drugiego na stronie 86 jest powtórzona i znajduje się po raz pierwszy a stronie 83.

Mam też uwagę dotyczącą kategorii szczepów myszy; ponieważ stopień wrażliwości na zarażenie wynika z genotypu żywiciela i wielogenowej regulacji z tego powodu zamiast stopniowania „wrażliwość” niska, średnia i wysoka, szczepy określa się jako odporne, odporne, i wrażliwe (Lee i Kasper, *Parasite*, 2004 Mar;11(1):89-97. Immune responses of different mouse strains after challenge with equivalent lethal doses of *Toxoplasma gondii*).

Obowiązkiem recenzenta jest przedstawienie krytycznych uwag dotyczących pracy, ale nie wpływają one na ocenę merytorycznej wartości przedstawionej rozprawy, i stanowią jedynie wątki które mogłyby przyczynić się do rozszerzenia dyskusji, ale wówczas powodując zapewne odstępianie od jej głównej kanwy.

W podsumowaniu, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Marcina Grzybowskiemu przez Wysoką Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę moją wysoką ocenę merytoryczną pracy, jej nowoczesny charakter jak i fakt, że wyniki pracy zostały opublikowane w *Experimental Parasitology* wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej dysertacji.

M. Bolesławska