

Prof.dr hab. Bogusław Szewczyk
Zakład Szczepionek Rekombinowanych UG
ul.Kładki 24
80-822 Gdańsk

Gdańsk, 20.10.2014 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr Moniki Olech zatytułowanej
„Charakterystyka molekularna lentiwirusów małych przeżuwaczy
oraz diagnostyka serologiczna zakażeń tymi wirusami”**

Praca doktorska mgr Moniki Olech stanowi bardzo ważny element tematyki badawczej prowadzonej w Zakładzie Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Podstawowym celem pracy mgr Olech było opracowanie diagnostyki lentiwirusów małych przeżuwaczy, owiec i kóz, oraz lepsze poznanie tych wirusów na poziomie molekularnym.

Rozprawa doktorska zawiera obszerny wstęp, gdzie w pierwszej części w sposób wyczerpujący Autorka omawia historię rozwoju wiedzy na temat wirusa choroby maedi visna i wirusa zapalenia stawów i mózgu u kóz, co w efekcie doprowadziło do zmian taksonomicznych i objęcia tych dwóch wirusów jedną nazwą - lentiwirusy małych przeżuwaczy (SRLV). W dalszej części wstępu Autorka krótko opisuje aktualny podział filogenetyczny lentiwirusów małych przeżuwaczy i w sposób wyczerpujący charakteryzuje SRLV od strony molekularnej i cyklu życiowego. Następnie dość szeroko omówiona jest charakterystyka zakażeń wywoływanych przez SRLV. Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy na temat tropizmu SRLV do określonych tkanek i komórek i opisuje stan badań dotyczących poszukiwania receptorów komórkowych. Kolejne podrozdziały opisują drogi rozprzestrzeniania się zakażeń i patogenezę zakażeń SRLV. W ostatnich częściach wstępu Autorka przedstawia stan wiedzy na temat tych elementów, które bezpośrednio są związane z jej pracą doktorską, tzn. diagnostyki zakażeń SRLV i pochodnym aspektem dobrej diagnostyki czyli zwalczaniem zakażeń wirusowych.

Mam bardzo niewiele krytycznych uwag dotyczących początkowych części rozprawy. Są to przeważnie drobne niedociągnięcia językowe lub błędy edytorskie:

- str. 1, l.7 od góry – powinno być „*Orthovirinae*”
- str.3, l.6 od dołu – powinno być „transkryptazą”
- na tej samej str. 3 u dołu są 2 słowa, które mają lepsze odpowiedniki w języku polskim, a Autorka tłumaczy je niezbyt fortunnie z języka angielskiego: - „membrana komórki” to prostu „błona komórkowa”; „macierz” (ang.matrix) to po polsku „rdzeń”. Te określenia są później używane wielokrotnie w całej pracy doktorskiej
- str.6, l.12 od góry – uwaga analogiczna do poprzedniej – „linearne epitopy” to po prostu „epitopy liniowe”
- str.21, l.2 od dołu – powinno być „challenge” jeśli używamy określenia angielskiego

Kolejny rozdział to prezentacja głównych celów pracy – przedstawione są one logicznie i w sposób syntetyczny. Nie mam tutaj żadnych uwag.

Nie mam też żadnych poważnych uwag do rozdziału „Materiały i Metody”. Drobne uwagi wymieniam poniżej:

- str. 28, l.1 od góry i l.3 od dołu – powinno być „merkaptotoetanol” a nie po angielsku „mercaptoethanol”; pełna nazwa ABTS powinna też zostać podana po polsku tak jak pozostałe nazwy odczynników
- str. 39, podrozdział dotyczący SDS-PAGE – wcześniej Autorka używała właściwych polskich nazw „żel zagęszczający” i „żel rozdzielający”; w tym podrozdziale żele te zostały nazwane „koncentrujący” i „separujący”. Ponadto nie tylko tam jest popełniany drobny błąd w nazewnictwie – w języku polskim właściwa chemiczna nazwa to „żel poliakryloamidowy”. Opuszczanie „o” w środku nazwy jest bardzo częste w wielu pracach polskich, ale oczywiście nie jest to właściwe
- str. 42, l.7 od góry – „wizualizacja żelu” to nie jest zbyt szczęśliwe określenie na uwidocznienie prążków. Chyba, że Autorce chodzi o coś innego – proszę o wyjaśnienie

- str. 50, l.16 od góry – „pelet” po polsku nazywa się „osad”; trzy linijki dalej Autorka używa nazwy „sześciohistydynowoasparaginowy znacznik” Czy to oznacza, że jest tam sześć histydyn i sześć asparagin? Proszę o wyjaśnienie.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na osiem podrozdziałów, w których opisane są środki eksperymentalne jakie stosowała Autorka, aby mogła osiągnąć dwa główne cele pracy, czyli:

- scharakteryzowanie zmienności genetycznej SRLV w Polsce
- uzyskanie fragmentów niektórych białek SRLV metodami inżynierii genetycznej i zastosowanie ich do diagnostyki serologicznej, przede wszystkim metodą ELISA

Do wykonania pierwszego zadania badawczego użyła ona najpierw metodę polegającą na analizie heterodupleksów (HMA). W metodzie tej miesza się produkty reakcji PCR odcinków genomów referencyjnych i badanych, czyli odpowiednie fragmenty cDNA, denaturuje się termicznie DNA, a następnie zostawia się próbki w niskiej temperaturze, żeby pozwolić na hybrydyzację nici komplementarnych. Taką mieszaninę heterodupleksów i homodupleksów analizuje się metodami elektroforetycznymi. Druga metoda to bezpośrednie sekwencjonowanie fragmentów wirusowego cDNA. W mojej opinii metoda HMA daje niewiele informacji; właściwie tylko mamy przesłanki, że są różnice w sekwencji badanych fragmentów szczepu badanego i referencyjnego (większe lub mniejsze w zależności od ruchliwości elektroforetycznej). Sekwencjonowanie, mimo że tak w jak poprzedniej metodzie nie analizujemy genomu RNA, a tylko fragmenty genów przepisane na cDNA, jest metodą nieporównanie lepszą. Sekwencjonowanie daje solidne podstawy do analizy filogenetycznej na podstawie sekwencji fragmentów DNA, jak i polipeptydów kodowanych przez te fragmenty. W swojej pracy Autorka przedstawia zalety metody HMA, ja jednak uważam, że jest to metoda odchodząca ze względu na lawinowy rozwój metod sekwencjonowania. Szybkość sekwencjonowania, pewność uzyskanych wyników i przede wszystkim coraz niższe ceny sekwencjonowania czynią ją w tej chwili bezkonkurencyjną. Bardzo proszę Autorkę o ustosunkowanie się do mojej opinii; być może nie jestem świadomy wszystkich zalet HMA. Dla przykładu metoda SSCP, o której też jest wzmianka w pracy doktorskiej, w pewnych określonych sytuacjach (np. koinfekcji wirusowej) może dawać informacje, których sekwencjonowaniem ciągle nie jesteśmy w stanie uzyskać.

W wyniku użycia wspomnianych wyżej metod Autorka stwierdziła, że istnieje znacząca różnorodność genetyczna SRLV w stadach polskich. Izolaty wirusowe należą do trzech znanych typów B1, B2 i A1, ale okazało się, że wykryto trzy nowe typy w obrębie grupy A, które występują tylko na terenie Polski. Zostały one oznaczone jako A12, A13 i A16. Wyniki Pani Moniki Olech wskazują również na pokonywanie bariery międzygatunkowej i zakażanie konkretnym wirusem zarówno owiec jak i kóz. Wskazują one również na możliwość koinfekcji zarówno wirusem z grupy A jak i z grupy B.

Drugie zadanie badawcze polegało na uzyskaniu fragmentów niektórych białek SRLV metodami inżynierii genetycznej i zastosowanie ich do diagnostyki serologicznej. W tym celu doktorantka próbowała sekwencje aminokwasowe wybranych polskich izolatów wirusowych, a następnie na bazie typów genetycznych A1, A13, B1 i B2, otrzymała metodami inżynierii genetycznej fragmenty białka rdzenia i białka kapsydu, oraz domeny SU1 i SU5 w postaci fuzji polipeptydowej. Polipeptydy te zostały oczyszczone, a następnie użyte do testów immunochemicznych. Mam kilka uwag do tej części pracy:

- Schemat doboru fragmentów i klonowania jest dość złożony. Proszę o zwrócenie uwagi na jasne ale dość szczegółowe przedstawienie tej części pracy podczas prezentacji
- Ryc.13 – nie zaznaczono mas cząsteczkowych przy wzorcach (a to pozwala na oszacowanie masy cząsteczkowej produktu); dla A1 ekspresja nie jest przekonująca – silniejszy prążek może być po prostu efektem większej ilości próbki niż w kontroli.
- Ryc.14 – brak mas wzorców jak i na poprzedniej rycinie
- Str.69 – podrozdział 5 dotyczy immunoblottingu – oczekiwałbym rycin z replikami żeli, ale ich niestety nie ma

Część dotycząca wykonania testów ELISA i analiza wyników tych testów jest wykonana bardzo porządnie i nie mam tutaj żadnych zastrzeżeń.

Nie mam też zastrzeżeń do omówienia wyników i dyskusji, poza wspomnianym wcześniej opisem zalet metody HMA. Zgadzam się też, że stosowane dotychczas testy ELISA oparte o jeden izolat wirusowy mają ograniczone zastosowanie.

Podejście naukowe Autorki polegające na użyciu mieszanki antygenów

pochodzących od różnych typów genetycznych jest jak najbardziej zasadne, szczególnie w aspekcie uzdrawiania stad.

Wymienione przeze mnie drobne krytyczne uwagi nie zmieniają faktu, że rozprawę mgr Moniki Olech oceniam bardzo wysoko. Stwierdzam, że doktorantka opanowała nowoczesne techniki analizy genetycznej, rekombinacji genetycznej i immunodiagnostyki w stopniu pozwalającym na samodzielną pracę w tej dziedzinie. Wyniki badań są bardzo ważne dla dalszego rozwoju tego obszaru wiedzy. Wnioskuje o dopuszczenie mgr Moniki Olech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(Prof. dr hab. Bogusław Szewczyk)