

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 29.04.2014
L.dz. nr 15/2014

Gdańsk, 25.04. 2014 r.

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Łukasza Rąbalskiego
pt. „Zastosowanie technik elektroforetycznych rozdzielania DNA
oraz Real-time PCR (qPCR) do detekcji i różnicowania zakażeń wirusem
rzekomego pomoru drobiu”
(Promotor: prof. dr hab. Bogusław Szewczyk)**

Tematyka badań, którą realizował mgr Łukasz Rąbalski, a których wyniki opisał w przedstawionej do recenzji pracy, mieści się w głównym nurcie zainteresowań zespołu naukowego promotora, prof. dr hab. Bogusława Szewczyka, jakim jest biologia molekularna wirusów zwierzęcych i ludzkich i zastosowanie wyników tych badań do konstruowania nowych metod diagnostycznych i rekombinowanych szczepionek.

Pan Łukasz Rąbalski realizował temat związany z opracowaniem metod diagnostyki molekularnej umożliwiających patotypowanie i wykrywanie zakażeń wieloszczepowych wirusa ND – wirusa rzekomego pomoru drobiu. Epidemie powodowane przez wysokopatogenne wirusa rzekomego pomoru drobiu z rodziny *Paramyxoviridae* stanowią obecnie jedno z większych zagrożeń dla hodowli ptactwa domowego na świecie. Szeroko zakrojona akcja szczepień teoretycznie zapewniała ochronę przed kolejnymi epidemiami. Jednakże okazało się, że niegroźne i powszechnie występujące szczepy wirusa rzekomego pomoru drobiu mogą poprzez nabycie tylko dwóch mutacji punktowych przekształcić się w typ o wysokiej zjadliwości. Obserwacje te zostały potwierdzone w doświadczeniach, w których wykazano, że kilkukrotne pasażowanie niskopatogenne wirusa w workach powietrznych oraz mózgu kurcząt może doprowadzić do znacznego zwiększenia wirulencji. Ponadto, ciągle zmieniająca się struktura genetyczna populacji wirusów była wielokrotnie przedstawiana dla wielu niespokrewnionych gatunków patogenów. Ta zmienność jest szczególnie widoczna w wirusach RNA ze względu na brak mechanizmów naprawczych w trakcie replikacji genomu. W związku z powyższym uzasadnione jest wprowadzenie badań przesiewowych pozwalających na szybkie określenie wirulencji, jak i wykrycie nowych potencjalnie groźnych szczepów NDV. Aktualnie stosowane metody diagnostyki molekularnej oparte na wykrywaniu specyficznych sekwencji nukleotydowych poprzez zastosowanie sond typu TaqMan w real-time PCR nie nadają się do tego celu z powodu bardzo małych i trudnych do

przewidzenia zmian w genomie, wymaganych do transformacji patotypu wirusa. Mutacje te uniemożliwiają hybrydyzację sond do badanego kwasu nukleinowego, co skutkuje błędnym odczytem. Z drugiej strony zastosowanie sekwencjonowania dużej ilości izolatów jest zarówno czasochłonne jak i kosztowne, nawet przy wykorzystaniu techniki pyrosekwencjonowania. W związku z powyższym uzasadnionym było podjęcie się w ramach pracy doktorskiej badań nad opracowanie ulepszonych metod diagnostyki molekularnej, które umożliwiłyby rozwiązanie powyżej wspomnianych problemów.

Praca doktorska mgr Łukasza Rąbalskiego przygotowana została w postaci 2 dołączonych publikacji, poprzedzonych tekstem komputerowym zawierającym streszczenie pracy w j. polskim i angielskim, wprowadzeniem do podjętej tematyki obejmującym omówienie paramyksowirusów, ich taksonomią, strukturą winionu, charakterystyką i budową białek kodowanych przez geny wirusów z rodziny Paramyxoviridae, opisem cyklu życiowego paramyksowirusów, opisem rzekomego pomoru drobiu, obejmującego zagadnienia związane z transmisją zakażeń, objawami i przebiegiem zakażeń, różnicami w wirulencji, a także profilaktyką i zwalczaniem. Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy jest klarownie przedstawione i zawiera praktycznie wszystkie najważniejsze informacje, popierając je cytatami z jak najbardziej aktualnego piśmiennictwa. Tekst ten jednak nie jest wolny od sformułowań żargonowych czy też błędów merytorycznych. Jedno najbardziej rażące sformułowanie to na str 15 cytuję „...delecja tego białka nie wpływa na replikację wirusa...”.

W pierwszej z dołączonych publikacji, z 2011 w Journal of Virological Methods (IF=1,9; 20 pkt MNiSW), zaprezentowano możliwość odróżniania patogennych szczepów NDV od szczepionkowych poprzez wykorzystanie zdegenerowanych starterów do powielenia fragmentów odpowiadających za wirulencję wirusa za pomocą techniki RT-PCR z dodatkiem barwnika interferującego do DNA (SYBR Green I) i analizą krzywych topnienia. Ciekawym wynikiem było wydzielenie dwóch grup izolatów NDV charakteryzujących się odmiennymi punktami topnienia. Dla szczepów niskopatogennych był to przedział 81,62°C-82,35°C, a dla średnio i wysoko patogennych 85,22°C-87,52°C. To odkrycie z pewnością daje ciekawe podstawy do opracowania komercyjnego biomarkera badania patogenności wirusa ND. W badaniach wykazano też specyficzność zastosowanych, zdegenerowanych starterów do wykrywania wirusa ND (na podstawie badań między innymi na grupie najbliższej

spokrewnionych wirusów z pozostałych serotypów APMV (ang. avian paramyxovirus)). Opracowana metoda umożliwia szybkie patotypowanie izolatów NDV bez konieczności stosowania klasycznych technik, takich jak ustalanie domózgowego indeksu zjadliwości.

W drugiej z załączonych publikacji, z 2014 w BioMed Research International (IF=2,88), przedstawiono metodę opartą o technikę SSCP (ang. single-stranded conformational polymorphism) wykorzystującą zmienną ruchliwość elektroforetyczną pojedynczej nici DNA w żelu poliakrylamidowym w zależności od sekwencji tej nici przy jej jednakowej długości oraz prowadzenie elektroforezy w zmiennych warunkach temperaturowych co dodatkowo poprawia możliwości rozdzielcze techniki (odmiana SSCP nazywana MSSCP, ang. multitemperature single-stranded conformational polymorphism) do specyficznego rozróżniania poszczególnych szczepów, czy izolatów NDV oraz wykrywania ich mieszanek w jednej próbce. Nieosiągalna dla techniki real-time PCR specyficzność w tym przypadku pozwala na śledzenie rozprzestrzeniania się wirusa w populacji, jak również na monitorowanie jego stabilności genetycznej. Symulowane badania zakażenia quasispecies-NDV, które miały miejsce w Australii w latach 1998-2002 oraz potencjalny rozwój infekcji wysokopatogennym szczepem wirusa u wcześniej zaszczepionej kury wykazały, że zastosowanie metody MSSCP przynosi bardzo dobre rezultaty i może stać się alternatywą dla sekwencjonowań.

Podsumowując w pracy opracowano dwie metody wysoce specyficzne dla wirusów ND, bazujące na technikach znacznie tańszych i szybszych od aktualnie wykorzystywanych, dla których mogą stać się alternatywą.

Nie mam żadnych uwag merytorycznych w stosunku do opublikowanych danych. Są to rzetelne badania, jak sądzę również pozytywnie ocenione przez recenzentów publikacji. Można z pewnością stwierdzić, że Doktorant podjął się realizacji tematu bardzo ważnego i znakomicie poradził sobie z trudnym problemem badawczym i uzyskał bardzo wartościowe wyniki. Jednakże mam duże wątpliwości związane z rzeczywistym udziałem Doktoranta w tych badaniach, szczególnie jeśli chodzi o publikację nr 1, w której Doktorant jest drugim autorem. Jak wynika z oświadczeń współautorów, to pan Dawid Nidzworski (pierwszy i korespondencyjny autor) miał dominujący udział w badaniach zamieszczonych w omawianej publikacji.

Proszę Doktoranta o szczegółowe przedstawienie jego udziału w tej pracy w czasie publicznej obrony dysertacji. Takich wątpliwości nie mam w stosunku do publikacji nr 2.

Podsumowując, praca doktorska mgr Łukasza Rąbalskiego wnosi znaczący wkład do diagnostyki molekularnej pozwalającej na wykrywanie oraz genotypowanie wirusów ND rzekomego pomoru drobiu. Jestem przekonany, że uzyskane wyniki mogą pomóc w opracowaniu komercyjnych testów diagnostycznych opartych o analizę materiału genetycznego wirusów ND, czyniąc diagnostykę tych wirusów tańszą i bardziej efektywną.

Stwierdzam, że uzyskane przez Doktoranta rezultaty są jednoznaczne, przekonujące i stanowią cenny wkład w światowe badania nad diagnostyką molekularną wirusów. Pan mgr Łukasz Rąbalski wykazał się przy tym wiedzą teoretyczną w zakresie tematyki prowadzonych badań, a także umiejętnością interpretacji wyników doświadczeń. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 11 Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. nr 65/90 poz. 386). Na podstawie powyższego wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Rąbalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Józef Kur