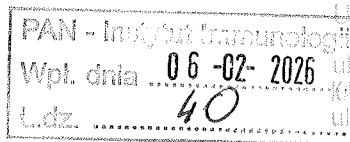




UNIwersytet
PRzyrodniczy
WE WROcławiu



UNIwersytet PRzyrodniczy
WE WROcławiu
ul. C.K. Norwida 25, 50-125 Wrocław
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
ul. C.K. Norwida 31, 50-875 Wrocław
tel. 71 320 52 09

Dr hab. Krzysztof Grzymajło, prof. UPWr
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Przyrodniczy We Wrocławiu

Wrocław, 06.02.2026 rok

Recenzja rozprawy doktorskiej pt:

„Molekularne podstawy swoistości zarodźców malarii (*Plasmodium*)”

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Jaśkiewicz.

Przeprowadzone badania były częścią tematu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, realizowanego w ramach projektu Harmonia (2018/30/M/NZ6/00653) i zatytułowanego: ”Molekularne podstawy swoistości zarodźców malarii z rodzaju *Laverania*” pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Jaśkiewicz.

Malaria pozostaje jedną z najpoważniejszych chorób pasożytniczych na świecie, stanowiąc istotne wyzwanie zarówno dla zdrowia publicznego, jak i dla współczesnej nauki. Złożona biologia zarodźców malarii oraz mechanizmy molekularne leżące u podstaw ich swoistości wobec żywicieli i określonych tkanek wciąż są przedmiotem intensywnych badań, gdyż ich lepsze poznanie ma kluczowe znaczenie dla opracowania nowych strategii terapeutycznych, diagnostycznych i profilaktycznych. W tym kontekście recenzowana praca podejmuje aktualny i ważny problem badawczy, wpisując się w nurt poszukiwań nowoczesnych rozwiązań w walce z malarią.

Jednym z najistotniejszych, a jednocześnie ciekawych z punktu widzenia naukowca etapów zakażenia jest interakcja pomiędzy patogenem i gospodarzem, a poznanie molekularnych mechanizmów i aspektów tego procesu stanowi niewątpliwie ciekawy temat badawczy. Ilość doniesień zgłębiających ten aspekt w kontekście zarodźców malarii rośnie, co sprawia że z ciekawością przeczytałem i przeanalizowałem przedstawione przez Doktorantkę badania. Niewątpliwie wartym podkreślenia jest fakt, że praca została zrealizowana w kooperacji z zespołem profesora Juliana Raynera z University of Cambridge, gdzie sama doktorantka w trakcie rocznego pobytu przeprowadzała część eksperymentów ujętych w przedstawionej mi do recenzji pracy. Co również warto podkreślić na początku, praca z wykorzystaniem zarodźców malarii jest z jednej



strony ciekawa, ale również trudna w rozumieniu technicznym, stąd podjęte próby identyfikacji receptorów odpowiedzialnych za specyficzność gatunkową zarodźców malarii uważam za podejście ambitne, co niejako powinno być wymogiem przy realizacji pracy na poziomie doktoratu.

Licząca 130 stron praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. W treści pracy wyróżnione zostały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, oraz osobny rozdział poświęcony wnioskowi końcowemu. Całość uzupełniona jest o liczącą 162 pozycje Bibliografię (odpowiednio rozbudowaną, uwzględniającą zarówno podstawy wiedzy jak i najbardziej aktualne prace), spisy rysunków, tabel, oraz rozdział podsumowujący jej dotychczasowy dorobek naukowy doktorantki. Mgr Patrycja Burzyńska ma w swoim dorobku 3 publikacje naukowe i 5 doniesień zjazdowych. Warto podkreślić, że w dwóch pracach Doktorantka jest pierwszą autorką, zaś wszystkie prace tematycznie są mocno powiązane z tematyką pracy doktorskiej.

Merytoryczną część pracy poprzedzają szczegółowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Streszczenie napisane jest poprawnie i dobrze wprowadza do omawianego tematu. Natomiast w mojej opinii należałoby rozwijać skróty, kiedy pojawiają się po raz pierwszy w danym rozdziale, a już zwłaszcza jeśli pojawiają się pierwszy raz w całej pracy.

W szczegółowym i ciekawym wstępie doktorantka przechodzi od ogólnych informacji nakreślających globalną sytuację związaną z malarią i planami jej eradykacji, poprzez przedstawienie aktualnych metod diagnostyki, leczenia, czy nowo wprowadzanych szczepień. W dalszych podrozdziałach wstępu doktorantka omawia różne rodzaje zarodźców malarii, cykl życiowy oraz etapy wiązania i wnikania do erytrocytów. Tutaj na pierwszy plan wysuwają się ligandy rozpoznające białka powierzchniowe merozoitów, a zatem element który stanowi główny temat zainteresowań autorki. To na podstawie różnicowego wiązania ligandów przez białka specyficzne do różnych gatunków zarodźców chce ona wykazać przyczyny swoistości tychże co do różnych gospodarzy. Doktorantka w usystematyzowany sposób omawia czynniki odpowiadające bądź potencjalnie odpowiadające za oddziaływanie pomiędzy zarodźcami (merozoitami) a komórkami gospodarza, szczegółowo omawiając struktury za to odpowiedzialne zarówno od strony patogenu jak i komórek gospodarza.

Chciałbym prosić tylko o zaspokojenie mojej ciekawości – bazując na wspomnianych doniesieniach literaturowych, temat kwasów sjałowych jako potencjalnych receptorów dla zarodźców malarii, które to mogą wpływać na specyficzność gatunkową został opisany w pracach datowanych na



początek bieżącego stulecia. Czy i jak różni się aktualne podejście doktorantki w ramach jej badań, do wyników i teorii przedstawionych wcześniej?

Podsumowując ten rozdział, stwierdzam że przygotowany został on w sposób poprawny, systematycznie i w odpowiedniej kolejności wprowadzając czytelnika w zagadnienia dotyczące tematyki pracy. Doktorantka przechodzi od ogólnych informacji dotyczących malarii jako choroby, kończąc na elementach odpowiadających potencjalnie za specyficzność konkretnych zarodźców co do gospodarza, a tym samym płynnie przedstawiając Cel Pracy.

W rozdziale Cel Pracy, doktorantka przedstawia hipotezę, której podstawą jest zależność swoistości gatunkowej zarodźców malarii od wiązania ligandów EBL do kwasów sjałowych. Hipoteza postawione jest we właściwy sposób, a próba jej potwierdzenia odbywała się poprzez badanie oddziaływań jednego z ligandów (EBA-140) pochodzącego z trzech różnych gatunków zarodźca do dwóch typów kwasów sjałowych Neu5Ac oraz Neu5Gc. Niemniej jednak, w mojej opinii cele pracy nie są wystarczająco jasno określone, ponieważ potwierdzenie lub obalenie hipotezy nie powinno być celem samym w sobie. Powinno nim być wniesienie nowych elementów do szeroko rozumianej gałęzi wiedzy w danej dyscyplinie i klarowne ich przedstawienie. Sugerowałbym również przedstawienie celów cząstkowych, których realizacja pozwalałaby krok po kroku monitorować postęp pracy i ewentualnie korygować zaplanowane ścieżki i eksperymenty.

Zarówno rozdział Materiały jak i następujący po nim rozdział Metody zostały przygotowane starannie i przejrzysto. Autorka pozwala zapoznać się czytelnikowi z poszczególnymi metodami wykorzystanymi w pracy w sposób zorganizowany i w odpowiedniej kolejności. Niepokoi jednakże duża rozbieżność w poziomie szczegółowości opisu poszczególnych metod. Niektóre z nich opisane są w najdrobniejszych detalach, pozwalając czytelnikom na wierne odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów. Tak być powinno, zwłaszcza w przyjętej tutaj formie monografii. Jednakże, inne opisane są zdawkowo, ze zdecydowaną niewystarczającą ilością szczegółów i danych – dotyczy to przede wszystkim rozdziałów poświęconych wiązaniu rekombinowanych ligandów metodami SPR oraz BLI. W obu przypadkach metodologia przedstawiona jest w sposób który w mojej opinii co najmniej utrudnia, jeśli nie uniemożliwia wierne odtworzenie eksperymentu. Biorąc pod uwagę, że obie metody stanowią istotny element pracy, jest to element na który niestety muszę zwrócić uwagę i zasugerować poprawę.



Przechodząc do najistotniejszego elementu pracy doktorskiej - części pracy która wychodzi poza obecną wiedzę i jest przyczynkiem do nadania stopnia doktora. W rozdziale Wyniki, doktorantka przedstawia szereg eksperymentów, poczynając od badań skupionych na oddziaływaniach białek, skończywszy na modyfikowanych genetycznie liniach zarodźców malarii. Pierwszym etapem pracy doktorantki była optymalizacja ekspresji ektodomen białka EBA-140 pochodzącego z czterech różnych zarodźców. Tu od razu uwaga: w tekście rozdziału doktorantka przedstawia 4 warianty, natomiast tytuł mówi jedynie o trzech z nich. Warto to doprecyzować, mimo informacji na końcu rozdziału o wykluczeniu EBA-140 *P. gaboni* z dalszych analiz. Może po prostu warto było użyć bardziej ogólnego tytułu rozdziału? Ze względu na widoczną w analizie SDS-PAGE jak i Western blot degradację rekombinowanych ligandów, doktorantka zdecydowała się na zmianę systemu ekspresyjnego na Freestyle. Biorąc pod uwagę fakt, że po użyciu wcześniejszego systemu ekspresji (Expi293) doktorantka analizowała otrzymane rekombinowane ektodomeny zarówno z wykorzystaniem SDS-PAGE jak i Western Blot, zastanawia fakt, że w przypadku nowego systemu ekspresyjnego czystość otrzymanych produktów analizowana była jedynie za pomocą SDS-PAGE. Zastanawia brak testu Western blot w tym przypadku, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt że czystość i homogenność próbki stanowi niezbędny próg wejścia do dalszych analiz. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie i ewentualne uzupełnienie tego braku.

W rozdziale 5.2.1 wykorzystane zostały białka oczyszczane we wcześniej porzuconym systemie ekspresji Expi293, który to umożliwiał otrzymanie nie homogennych, częściowo zdegradowanych białek. Biorąc pod uwagę specyfikę techniki SPR, w której to do określania stałych wiązania niezbędna jest informacja o stężeniu ligandów, uważam że można było całkowicie zrezygnować z przeprowadzania eksperymentów opartych o ten system ekspresji i nie wyciągać w mojej opinii dość pochopnych wniosków bazując na niepewnych podstawach. Biorąc pod uwagę rezygnację z pierwszego z systemów ekspresji na rzecz drugiego z nich z uwagi na homogenność otrzymywanych białek rekombinowanych, raczej powstrzymałbym się z porównywaniem wyników otrzymanych w analizie oddziaływań przy użyciu preparatów otrzymanych z tych dwóch systemów. Co istotne, doktorantka sama zauważa ten problem, wspominając o nim w rozdziale dyskusja.

Opis rysunku 29 jest nieprecyzyjny, w tekście doktorantka wspomina o rysunku 29B, natomiast na samym rysunku poszczególne jego elementy nie są oznaczone literami. Stąd też nawigowanie po wynikach jest znacząco utrudnione. Wyjaśnienia wymaga też określanie różnic wiązania na podstawie wyników przedstawionych w „RU”. Czy jest to maksymalny punkt wiązania (wysycenie)? Jeśli tak,



warto to doprecyzować, pokazując przy okazji dane wskazujące na wysycenie w zależności od stężenia liganda. Przy okazji Rysunku 31 i porównania stałych dysocjacji. Czy dobrze rozumiem, że porównane są wartości dla 4 różnych prób, a do stwierdzenia istotności statystycznej wykorzystano test t-Studenta? Jeśli tak, jest to błąd. Jeśli nie, proszę o sprostowanie w sposobie prezentacji wyników. Dość nietypowe jest również wskazywanie różnic statystycznych w oparciu o powtórzenia techniczne. Rozumem ograniczenia metody oraz ograniczenia związane z kosztami eksperymentu – stąd w mojej opinii należałoby jedynie podać otrzymane stałe dysocjacji i zaniechać analizy statystycznej.

Bardzo ciekawym uzupełnieniem pracy jest stworzenie zmodyfikowanych genetycznie linii *P. falciparum* ze zmodyfikowanym fragmentem wiążącym liganda EBA-140. Należy docenić podjęcie się próby uzyskania modyfikowanych linii zarodźców, a z uwagi na poziom trudności docenić te z prób, które okazały się udane i pozwoliły przyjemniej częściowo rolę EBA-140. Szkoda natomiast że ostatecznie nie potwierdzono rzeczywistej roli i udziału BA-140 w specyficzności co do gospodarza. Na koniec omawiania tego rozdziału drobny komentarz edytorski. Niezbyt szczęśliwe w mojej ocenie stwierdzenie że ligandy „nie nauczyły się wiązać do ludzkiego kwasu sjalowego”. Sugeruję unikać podobnych stwierdzeń i nie personifikować cząsteczek biologicznie aktywnych. Natomiast zdanie „Skierowaliśmy, więc teorię do rewaluacji” – brzmi dziwnie i jest nieprawidłowo skonstruowane. Rozdział 5.4.2 oraz 5.4.3: pierwsze akapity w obu rozdziałach w większości powinny zostać przeniesione do rozdziału Metody, opisuje bowiem techniczną stronę doświadczenia a nie jego wynik.

Podsumowując rozdział Wyniki, chcę podkreślić że napisany jest on w ciekawy sposób, kolejne eksperymenty wynikają z poprzednich, w logiczny sposób budując historię prezentowaną w pracy. Przedstawione krytyczne uwagi nie niwelują wielu ciekawych aspektów wykonanej pracy.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka sprawnie podsumowuje uzyskane wyniki, krytycznie konfrontując je z aktualnymi danymi literaturowymi. W tym miejscu sugerowałbym, aby analiza sekwencji i potencjalnych różnic aminokwasowych mogących wpłynąć na wiązanie pojawiła się w rozdziale Wyniki, na etapie omawiania eksperymentów dotyczących oddziaływań, a tylko odniesienie do tejże analizy powinno znaleźć swoje miejsce w dyskusji.

Opracowanie kończy 6 poprawnie sformułowanych wniosków. Autorka krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, w niektórych przypadkach ostrożnie, a może nawet zbyt ostrożnie podsumowuje swoją pracę.



Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca porusza ciągle ważny i aktualny problem związany z rozprzestrzenianiem się malarii. Mimo że wydawało się, że jest to problem ograniczony geograficznie, postępujące zmiany klimatu wciąż poszerzają strefy zagrożenia. Mimo coraz bardziej skutecznych szczepień, każde opracowanie pozwalające lepiej zrozumieć biologiczne podstawy zakażeń oraz oddziaływań z gospodarzami są cenne zarówno ze względów poznawczych, jak i medycznych. Autorka podjęła się trudnego wyzwania, korzystając w swojej pracy zarówno z modeli białek rekombinowanych, stanowiących prostszy do zrozumienia, ale zarazem ograniczony biologicznie układ, a także z modyfikowanych linii komórkowych pozwalających na szersze spojrzenie na biologiczne tło oddziaływań. Należy jeszcze raz podkreślić, że zadania których się podjęła są trudne technicznie, tym bardziej należy docenić uzyskane rezultaty. Mimo wspomnianych w trakcie recenzji niedociągnięć, oraz fakty że pewnie sama autorka wolałaby, aby badanie przez nią białko okazało się bardziej spektakularnym czynnikiem decydującym o specyficzności gatunkowej, uważam że przedłożona praca zasługuje na uznanie. Stąd też, poniższy wniosek końcowy:

Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Patrycji Burzyńskiej pt. „**Molekularne podstawy swoistości zarodźców malarii (*Plasmodium*)**” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dr hab. Krzysztof Grzymajło

UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu
ul. C.K. Norwica 25, 50-375 Wrocław
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda
ul. C.K. Norwica 31, 50-375 Wrocław
tel. 71 320 52 09