



Wrocław 12 luty 2026 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Burzyńskiej

"Molekularne podstawy swoistości zarodźców malarii (*Plasmodium*)"

Malaria jest jednym z najpoważniejszych wyzwań dla systemu ochrony zdrowia na świecie. Szacuje się, że w obecnym wieku na malarię zmarło ponad 14 milionów ludzi. Pomimo olbrzymich wysiłków włożonych w profilaktykę oraz terapię, corocznie na malarię choruje prawie 300 mln osób, co prowadzi ponad pół miliona zgonów. Chorobą dotknięci są głównie mieszkańcy subsaharyjskich regionów Afryki, a w mniejszym stopniu Ameryki Środkowej i Południowej oraz Azji Południowo - Wschodniej. Olbrzymim problemem w globalnej walce z malarią jest wzrost oporności na leki przeciwmalaryczne, szczególnie na artemizyninę i jej pochodne.

Pomimo lat badań, wiele aspektów cyklu życiowego zarodźców malarii (*Plasmodium*) jest nadal nie w pełni poznane. Zrozumienie molekularnych podstaw inwazji pasożytów, w tym specyficzności cząsteczek uczestniczących w rozpoznaniu oraz oddziaływaniu z ludzkimi białkami może przyczynić się do opracowania nowych terapii.

Celem pracy Pani mgr Patrycji Burzyńskiej było zbadanie molekularnych postaw swoistości zarodźców malarii wobec erytrocytów człowieka i małop człękoksztalnych. Badania zostały przeprowadzone pod opieką prof. dr hab. Ewy Jaśkiewicz w renomowanym Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Bardzo dobre zaplecze naukowe oraz aparaturowe znacząco przyczyniło się do powstania tej wartościowej pracy.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 139 stron. Dysertacja jest podzielona w tradycyjny sposób na rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Bibliografia. Ponadto praca zawiera rozdział: Streszczenia w języku polskim oraz angielskim, Dorobek naukowy, Źródła finansowania, Spis tabel oraz Spis Rysunków. Układ pracy jest logiczny

i dobrze prowadzi czytelnika przez rozprawę. Bibliografia zawiera 162 pozycje, a cytowania są adekwatne do treści pracy.

Rozdział Wstęp liczy 29 stron i jest napisany bardzo dobrze. Autorka pracy wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze swoimi badaniami rozpoczynając od opisu zarodźców malarii z rodzaju *Plasmodium*. Następnie przedstawia kluczowe informacje o filogenetyce tych pierwotniaków, ich skomplikowany cykl życiowy oraz skrupulatnie opisuje etapy inwazji erytrocytów przez merozoity. W kolejnych podrozdziałach Pani Burzyńska szczegółowo przedstawia białka merozoitów i erytrocytów zaangażowane w rozpoznanie i wnikanie patogenów do wnętrza infekowanych komórek. Oprócz białek w końcowej części rozdziału Wstęp doktorantka opisała kwasy sialowe Neu5Ac i Neu5Gc oraz ich rolę w procesie infekcji przez *P. falciparum*. Wstęp do pracy jest napisany w sposób wzorowy. Doktorantka z należytą szczegółowością, ale bez nadmiaru zbędnych informacji przedstawiła kluczowe aspekty molekularne stojące za oddziaływaniami patogen:erytrocyt. Opisy są precyzyjne, wzbogacone w klarowne ilustracje i w bardzo dobry sposób naprowadzają czytelnika na problem naukowy stojący za podjęciem badań przez doktorantkę.

Cel pracy jest dobrze zdefiniowany. Doktorantka zajęła się próbą odpowiedzi na problem dotyczący podstaw gatunkowej swoistości zarodźców malarii wobec człowieka i małych człokształtnych. Pani mgr Burzyńska stawia sobie pięć pytań dotyczących roli białek EBA-140 z merozoitów *Plasmodium* w tworzeniu oddziaływań z erytrocytami oraz udziale w tym procesie kwasów sialowych i galaktozy. Badania przedstawione w rozprawie są zgodne z założonym celem pracy.

Metodyka jest właściwie dobrana do zaplanowanych badań. Doktorantka bardzo dobrze porusza się w swoim warsztacie badawczym. Opis metod badawczych jest przygotowany starannie i na tyle szczegółowo, że pozwala na odtworzenie przeprowadzonych prac lub wykonanie podobnych badań z użyciem analogicznych cząsteczek. Doktorantka użyła bardzo szerokiego wachlarza metod w swojej pracy: hodowla linii komórkowych *Plasmodium*, modyfikacja genetyczna *Plasmodium* metodą CRISPR/Cas9 oraz analiza genotypowa i fenotypowa otrzymanych organizmów, nadekspresja białek w systemach ssaczych, oczyszczanie białek metodą powinowactwa, PCR, klonowanie DNA, izolacje DNA, elektroforezy agarozowa i SDS-PAGE, western blotting, pomiary oddziaływania metodami SPR i BLI.

Do najważniejszych wyników przedstawionych w pracy Pani mgr Patrycji Burzyńskiej zaliczam:

Otrzymanie rekombinowanych fragmentów białek EBA-140 pochodzących z merozoitów *P. falciparum*, *P. praefalciparum* i *P. reichenowi*. Białka otrzymano w ssaczym systemie ekspresyjnym opartym o komórki HEK293. Po optymalizacji warunków nadprodukcji udało się otrzymać pełne, nie ulegające degradacji ektodomeny, które następnie zostały oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa. Analizy obrazu rozdziatu SDS-PAGE otrzymanych preparatów wskazuje na powodzenie tego etapu badań.

Pomiary oddziaływania rekombinowanych homologów EBA-140 z kwasami sialowymi występującymi na ludzkich (Neu5Ac) i małpich (Neu5Gc) erytrocytach. Do analiz doktorantka użyła techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Zastosowane przez mgr Burzyńską komplementarne podejścia pomiarowe doprowadzały do niespodziewanych rezultatów. Wszystkie białka preferencyjnie wiązały się do kwasu Neu5Gc. Dodatkowo pomiary z wykorzystaniem interferencji biowarstwowej (BLI) potwierdziły, że swoistość EBA-140 z *P. falciparum* jest odwrotna do oczekiwanej. Ponadto doktorantka zbadała istotność galaktozy dla wiązania EBA-140 *P. falciparum* do kwasów sialowych.

Otrzymanie transgeniczných wariantów *Plasmodium*. Doktorantka z użyciem metody CRISPR/Cas9 zaprojektowała warianty EBA-140 różniące się sekwencją w obrębie Regionu II. Po otrzymaniu i zweryfikowaniu odpowiednich konstruktów DNA mgr Burzyńska wykonała transfekcje *P. falciparum* a następnie, po odpowiednim czasie wykonała genotypowanie oraz selekcję otrzymanych organizmów. Dodatkowo obecność zmienionych sekwencji potwierdziła z użyciem metody western blotting. Pomimo olbrzymiego wysiłku włożonego w otrzymanie transfektantów z powodzeniem doktorantka otrzymała tylko 4 linie. Dla transfektantów mgr Burzyńska określiła wewnątrzkomórkową lokalizację zmodyfikowanego białka EBA-140 metodą mikroskopową. Analiza fenotypowa potwierdziła, że zmiany w obrębie Regionu II nie wpływają negatywnie na ekspresję i transport białka.

Przeprowadzenie testów wzrostu w warunkach statycznych i dynamicznych oraz testów inwazji erytrocytów traktowanych chymotrypsyną i neuraminidazą. Otrzymane linie transgeniczne porównano z liniami posiadającymi knock-out białka EBA-140 oraz liniami szczepu dzikiego. Analizy prowadzono z użyciem cytometrii przepływowej, zliczając ilość zakażonych krwinek. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów mgr Burzyńska wnioskuje, że zamiana Regionu II EBA-140 z *P. falciparum* na RII pochodzący z małpiego zarodźca *P. praefalciparum* wpływa na utratę zdolności rozpoznawania ludzkich erytrocytów. Jest to nowa

i nieznana w literaturze obserwacja. Kolejne analizy inwazji merozoitów były prowadzone wobec erytrocytów traktowanych enzymami. Wyniki doświadczeń pozwoliły doktorantce na postawienie wniosku, że EBA-140 nie jest kluczowym ligandem w rozpoznawaniu erytrocytów ludzkich przez merozoity *P. falciparum* i jego mutacje lub knock-out nie zmienia istotnie poziomu inwazji.

Rozdział Dyskusja stanowi bardzo dobry komentarz mgr Patrycji Burzyńskiej do wyników otrzymanych w trakcie realizacji pracy. Doktorantka w wyczerpujący sposób opisuje powód podjęcia badań oraz bardzo starannie i dogłębnie komentuje otrzymane wyniki. Widać bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu oraz zrozumienie na poziomie molekularnym mechanizmów stojących za patogenezą *Plasmodium*. Dyskusja jest prowadzona krytycznie, na wysokim poziomie szczegółowości, co odzwierciedla dojrzałość naukową doktorantki.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag oraz pytań:

Niestety w rozprawie nie znalazłem wykazu skrótów, nie ukrywam utrudniło to czytanie rozprawy. Glikoforyna A jest w pracy oznaczana skrótami GPA lub GYP A. Białko pasma 3 jest określane jako BAND3 lub Band3. Czasami nazwy białek są pisane kursywą. Zamiast „chipy” powinno być użyte słowo „sensory”.

Czy na rysunku 10b zamieszczono obraz modelowania oddziaływania z kwasem sjałowym czy fragment struktury krystalicznej białka w kompleksie z kwasem sjałowym?

Określenie homologiczne białka (np. str. 27) oznacza domniemanie wspólnego przodka na podstawie np. analizy filogenetycznej i nie może być wyrażona w wartościach procentowych. W przeciwieństwie do tego, podobieństwo sekwencji wyraża się procentami.

Na stronie 32 znajduje się informacja, że geny kodujące glikoproteiny mają „długość około 120 pz”.

Na stronie 86 znajduje się stwierdzenie „wszystkie wyznaczone wartości KD oscylują w podobnych, mikromolarnych zakresach” (podobnie na stronie 111), stąd zamieszczone w rozprawie są w zakresach nanomolarnych.

Co oznacza „(+)-” w Tabeli 11, czym jest bufor kolumnowy (strona 67)?

Jaki był zakres sekwencji, która była nadprodukowana w komórkach HEK293, oraz jaka była szacunkowa wydajność produkcji białka?

Czy przeprowadzono analizę równowagową (ang. *steady state*) krzywych kinetycznych dla pomiarów SPR lub BLI. Jak regenerowano sensory?

Proszę o krótką informację, które białka *P. Plasmodium* wydają się najbardziej istotne dla inwazji erytrocytów.

Podsumowując, badania przeprowadzone przez Panią mgr Patrycję Burzyńską dostarczają wartościowe wyniki, wnoszą nową wiedzę w zrozumienie oddziaływań pomiędzy *Plasmodium* a erytrocytami. Doktorantka jest współautorem trzech publikacji, w dwóch jest pierwszym autorem, w trzeciej równorzędnym pierwszym autorem. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Burzyńskiej "Molekularne podstawy swoistości zarodźców malarii (*Plasmodium*)" jest bardzo wysoka. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoką jakość rozprawy oraz dorobek publikacyjny doktorantki wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

