

Autoreferat w języku polskim

*Charakterystyka oddziaływań pomiędzy wybranymi białkami
powierzchniowymi krętków *Borrelia* i białkami kleszczy
oraz kręgowców*

dr Anna Urbanowicz

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

1. Imię i nazwisko		Anna Urbanowicz
2. Stopnie naukowe	2006	Doktor nauk chemicznych IChB PAN w Poznaniu Rozprawa doktorska pt. <i>Identyfikacja rejonów aktywnych rekombinacyjnie, występujących w genomowych cząsteczkach RNA wirusa mozaiki stokłosa</i> Promotor pracy: prof. dr hab. Jozef J. Bujarski
	2000	Magister biologii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii Praca magisterska pt. <i>Badanie udziału polimerazy RNA w procesach replikacji i rekombinacji cząsteczek genomowych wirusa mozaiki stokłosa</i> Promotor pracy: prof. dr hab. Marek Figlerowicz
3. Historia zatrudnienia	2016 – teraz	Kierownik Pracowni Inżynierii Białek, IChB PAN
	2015 – 2019	Adiunkt, Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej
	2015 – 2016	Starszy Specjalista, Pracownia Inżynierii Białek, IChB PAN
	2006 – 2015	Adiunkt, Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej, IChB PAN
	2001	Półroczny staż doktorski, Department of Biological Sciences, Northern Illinois University, DeKalb, USA
	2000 – 2006	Asystent Zakład Biologii Molekularnej Roślin, IChB PAN Słuchacz Studium Doktoranckiego przy IChB PAN

4. Omówienie osiągnięcia naukowego, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

*Charakterystyka oddziaływań pomiędzy wybranymi białkami powierzchniowymi krętków *Borrelia* i białkami kleszczy oraz kręgowców*

4.2. Wykaz publikacji i patentów stanowiących osiągnięcie naukowe

H1. Bierwagen Paulina, Sliwiak Joanna, Jaskolski Mariusz, **Urbanowicz Anna***

*Strong interactions between Salp15 homologues from the tick *I. ricinus* and distinct types of the outer surface *OspC* protein from *Borrelia**

Ticks and Tick-borne Diseases, 2021, 12 (2): 101630

- doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101630
- IF₂₀₁₉ **2.749**, Punktacja MNiSW **100**, Cytowania **0/0**

H2. Bierwagen Paulina, Szpotkowski Kamil, Jaskolski Mariusz, **Urbanowicz Anna***

**Borrelia* outer surface protein C is capable of human fibrinogen binding*

FEBS Journal, 2019, 286 (12): 2415-2428

- doi: 10.1111/febs.14810
- IF₂₀₁₉ **4.392**, Punktacja MNiSW **100**, Cytowania **3/2**
- Praca uzyskała nagrodę im. prof. Kazimierza Bassalika za najlepszą pracę eksperymentalną w roku 2019, przyznawaną przez Komitet Biologii Molekularnej Komórki PAN

H3. **Urbanowicz Anna[^]**, Lewandowski Dominik[^], Szpotkowski Kamil, Figlerowicz Marek

*Tick receptor for outer surface protein A from *Ixodes ricinus* - the first intrinsically disordered protein involved in vector-microbe recognition*

Scientific Reports, 2016, 6: 25205

- doi: 10.1038/srep25205
- IF₂₀₁₆ **4.259**, Punktacja MNiSW **40**, Cytowania **4/2**
- Publikacja jest efektem realizacji grantu własnego

H4. **Urbanowicz Anna[#]**, Lewandowski Dominik, Jodynys-Liebert Jadwiga, Sadowski Czesław, Figlerowicz Marek

*Functional Insights into Recombinant TROSPA Protein from *Ixodes ricinus**

PLoS One, 2013, 8 (10): e76848

- doi: 10.1371/journal.pone.0076848
- IF₂₀₁₃ **3.534**, Punktacja MNiSW **40**, Cytowania **11/9**
- Publikacja jest efektem realizacji grantu własnego

H5. Lewandowski Dominik, **Urbanowicz Anna**, Figlerowicz Marek

*Molekularne podłoże oddziaływań pomiędzy *Borrelia burgdorferi*, kleszczem i kręgowcem*

Postępy Mikrobiologii, 2013, 52(1): 9-16

- IF₂₀₁₃ **0.271**, Punktacja MNiSW **15**, Cytowania **4/2**
- Publikacja jest efektem realizacji grantu własnego

H6. Urbanowicz Anna, Figlerowicz Marek

Patent polski pt. *Szczepionka przeciw boreliozie, konstrukt genetyczny, rekombinowane białko, sposób otrzymywania konstrukt genetycznego, sposób otrzymywania szczepionki, sposób otrzymywania rekombinowanych białek, zastosowanie rekombinowanych białek do wytwarzania szczepionki*

Patent nr **PL 223175**, data udzielenia patentu 31.10.2016

H7. Urbanowicz Anna, Figlerowicz Marek, Lewandowski Dominik

Patent europejski pt. *Lyme disease vaccine*

Patent nr **EP 2 908 852**, data udzielenia patentu 14.06.2017

H8. Urbanowicz Anna, Figlerowicz Marek, Lewandowski Dominik

Patent amerykański pt. *Lyme disease vaccine, genetic construct, recombinant protein, method for designing genetic construct, method for producing vaccine, method for producing recombinant proteins, use of recombinant proteins in the production of Lyme disease vaccine*

Patent nr **US 9 562 080**, data udzielenia patentu 07.02.2017

- Patenty **H6, H7, H8** są efektem realizacji grantu własnego

* - autor korespondencyjny, ^ - równorzędny pierwszy autor

- podczas procesu publikacyjnego pracy H4 wprowadzono niewłaściwą kolejność autorów (Figlerowicz Marek, Urbanowicz Anna, Lewandowski Dominik, Jodynis-Liebert Jadwiga, Sadowski Czesław). Po ukazaniu się pracy poprawiono kolejności autorów poprzez dodanie korekty, której kopia znajduje się w załączniku nr 7, razem z publikacją H4.

Sumaryczny Impact Factor (IF) czasopism, w których opublikowano cykl publikacji: **15,205**

Sumaryczna punktacja MNiSW czasopism, w których opublikowano cykl publikacji: **295**

Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań) z dn. 22.03.2021: **15**

Kopie powyższych publikacji i patentów umieszczono w załączniku nr 7.

Oświadczenia współautorów publikacji **H3, H4 i H5** i patentów **H6, H7 i H8** znajdują się w załączniku nr 5.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

4.3.1. Wprowadzenie i zaprezentowanie celu naukowego

Krętki z rodzaju *Borrelia* powodują niebezpieczną chorobę nazywaną boreliozą, chorobą z Lyme lub krętkowicą kleszczową. Jest to najczęściej występująca w Europie i Ameryce Północnej choroba odkleszczowa. Charakteryzuje się ona szerokim spektrum objawów i jest stosunkowo łatwa do wyleczenia we wczesnej fazie. Niestety, mała specyficzność objawów wczesnej boreliozy utrudnia jej diagnostykę i z tego powodu u znacznej liczby zakażonych osób borelioza przechodzi w trudną do wyleczenia i znacznie obniżającą jakość życia fazę przewlekłą¹. W Unii Europejskiej bakterie *Borrelia* są odpowiedzialne za największą liczbę zakażeń u ludzi spośród wszystkich chorób przenoszonych przez wektory, przy czym szacuje się, że rocznie przybywa około 100 000 przypadków^{2,3}. W Polsce, wg danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, zapadalność na boreliozę wynosi około 5 przypadków na każde 10 000 osób. Równie niepokojące dane pochodzą ze Stanów Zjednoczonych, gdzie borelioza wykrywana jest w ilości około 300 000 przypadków rocznie^{2,3}.

Borelioza jest chorobą roznoszoną przez kleszcze, zwykle z rodzaju *Ixodes*. W Polsce głównym wektorem krętków jest kleszcz pospolity (*Ixodes ricinus*)². Naturalnym rezerwuarem kleszczy są wolnożyjące zwierzęta, przeważnie różne gatunki ssaków i ptaków⁴. Człowiek natomiast jest przypadkowym żywicielem krętków i nie ma znaczenia dla cyklu krążenia krętków w środowisku naturalnym.

Diagnostyka i terapia boreliozy jest utrudniona ze względu na to, że do rodzaju *Borrelia* należą liczne gatunki krętków, które są zróżnicowane serologicznie i wykazują powinowactwo do różnych tkanek. Grupa krętków wywołujących różne formy boreliozy obejmuje obecnie 21 gatunków, z których co najmniej 8 jest patogennych dla ludzi, i nazywana jest zbiorczo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.)^{1,4}. Serologiczne zróżnicowanie *Borrelia burgdorferi* s. l. jest wynikiem tego, że patogen produkuje dużą gamę lipoprotein powierzchniowych występujących w różnych wariantach, zależnie od gatunku i szczepu bakterii. Przykładowo, białko powierzchniowe OspC (outer surface protein C), które jest jednym z interesujących mnie obiektów badawczych, występuje w postaci co najmniej 19 wariantów genotypowych w ramach jednego tylko gatunku – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s. s.)^{5,6}.

Białka powierzchniowe, nazywane także lipoproteinami powierzchniowymi, są zakotwiczone w zewnętrznej lub periplazmatycznej błonie bakterii za pomocą lipidowej modyfikacji obecnej na końcu aminowym. Tworzą one swego rodzaju interfejs, za pomocą którego bakterie kontaktują się z otaczającym ją w danym momencie środowiskiem. Białka powierzchniowe odgrywają kluczowe role w takich procesach jak adhezja do nabłonka, kolonizacja różnych tkanek czy obrona przed układem odpornościowym⁷. Aby umożliwić krętkom funkcjonowanie w odmiennych od siebie warunkach panujących w organizmach kręgowca-żywiciela oraz kleszcza-wektora, kompozycja białek pokrywających powierzchnię krętka zmienia się w zależności od etapu ich cyklu życiowego⁸. Ponadto, wiele białek powierzchniowych wykazuje bardzo niską homologię do białek z innych organizmów, co jest związane z faktem, że genom krętków *Borrelia* ewoluował pod wpływem bardzo specyficznych warunków związanych z ich pasożytniczym stylem życia⁷. Powyżej opisane cechy białek powierzchniowych sprawiają, że są one trudnymi obiektami badań, co odzwierciedla się w słabej znajomości molekularnych podstaw pasożytniczego cyklu życiowego krętków *Borrelia*. To z kolei spowalnia rozwój prewencji, diagnostyki i terapii boreliozy i powoduje ciągle zwiększającą się zapadalność na tę chorobę.

Oddziaływania pomiędzy krętkami *B. burgdorferi* s. l., kleszczami i kręgowcami stanowią niezwykle interesujący i skomplikowany przykład wzajemnego dopasowania pomiędzy pasożytem, wektorem i żywicielem. Celem badań prowadzących do niniejszego osiągnięcia naukowego było

pogłębienie wiedzy o tych oddziaływaniach na poziomie molekularnym. Cel ten realizowałam prowadząc wraz z zespołem badania funkcjonalne i strukturalne białek powierzchniowych krętków z grupy *Borrelia burgdorferi* s. l. oraz ich białkowych ligandów pochodzących z organizmów kleszczy i kręgowców, jak również badania oddziaływań zachodzących pomiędzy tymi białkami.

Badania prowadziłam w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, początkowo w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej kierowanym przez prof. dr hab. Marka Figlerowicza, gdzie realizowałam własny grant badawczy pt. „Opracowanie szczepionki chroniącej zwierzęta przed infekcją *Borrelia burgdorferi*” przyznany przez MNiSW. Grant ten realizowałam we współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W tym okresie powstały publikacje **H3**, **H4** i **H5** wchodzące w skład osiągnięcia. Wyniki uzyskane podczas realizacji tego etapu badań pozwoliły także na zaproponowanie praktycznego zastosowania kleszczowych białek jako składników szczepionki przeciw boreliozie dla dzikich zwierząt i opatentowanie go w postaci patentów **H6**, **H7** i **H8**, dzięki realizacji grantu pt. „Ochrona patentowa szczepionki przeciwko boreliozie” przyznanego mi przez NCBR. Kolejne dwie publikacje, **H1** i **H2**, powstały po objęciu przeze mnie stanowiska kierownika Pracowni Inżynierii Białek działającej w Zakładzie Krystalografii IChB PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego. W tejże pracowni realizowałam, jako główny wykonawca, projekt pt. „Strukturalne badania białek kluczowych dla oddziaływań pomiędzy kleszczem, ssakiem i patogenem”, którym kierował prof. Jaskólski. Współpraca z dwoma zakładami w IChB PAN i Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu umożliwiła mi korzystanie z szerokiego spektrum technik badawczych z zakresu biochemii, biologii molekularnej i strukturalnej, inżynierii genetycznej, biofizyki oraz bioinformatyki, dzięki czemu publikacje przedstawione jako osiągnięcie naukowe zyskały charakter interdyscyplinarny.

Wchodząca w skład niniejszego opracowania publikacja **H5** to praca przeglądowa opisująca specyficzne dla krętków białka związane z pasożytniczym trybem życia tych organizmów. Publikacja ta stanowi wprowadzenie do tematyki oddziaływań pomiędzy krętkami, wektorem i gospodarzem na poziomie interfejsu białkowego, ze szczególnym uwzględnieniem procesu kolonizacji organizmu kleszcza przez krętka *Borrelia* oraz wykorzystania czynników białkowych kleszcza podczas inwazji krętka *Borrelia* w organizmie kręgowca. Przybliżyła ona także wiedzę na temat obiektów badawczych opisanych w niniejszym osiągnięciu – białek powierzchniowych OspA (Outer surface protein A) i OspC (Outer surface protein C) z krętków *B. burgdorferi* s. l. oraz białek TROSPA (Tick Receptor for OspA) i Salp15 (Salivary protein 15 kDa) z kleszczy z rodzaju *Ixodes*. Oddziaływanie pomiędzy białkiem OspA i TROSPA zostało zidentyfikowane przez amerykańskich badaczy u szczepów *B. burgdorferi* s. s. i kleszczy *I. scapularis* występujących w Ameryce Północnej¹¹. Wykazano, że zachodzi ono w układzie pokarmowym kleszcza pobierającego skażoną krętkami krew i jest niezbędne do kolonizacji kleszcza przez krętka. W pracach **H3** i **H4** scharakteryzowałam oddziaływanie pomiędzy białkami OspA z *B. burgdorferi* s. l. i homologiem TROSPA z *I. ricinus*, czyli z gatunków występujących w Europie. Ponadto, przy współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu opisałam właściwości immunogenne białka TROSPA oraz białka fuzyjnego TROSPA-Salp15, umożliwiające wykorzystanie ich w roli antygenów w szczepionce przeciw boreliozie. W oparciu o uzyskane wyniki przygotowane zostały wnioski patentowe **H6**, **H7** i **H8**. Prowadząc badania strukturalne słabo poznanego białka TROSPA z kleszcza, scharakteryzowałam je jako białko immanentnie nieuporządkowane (Intrinsically Disordered Protein, IDP) tzn. o bardzo niskiej zawartości struktur drugorzędowych. Kolejne dwie prace, **H1** i **H2**, dotyczą białka powierzchniowego OspC z *B. burgdorferi* s. l., które jest produkowane podczas najwcześniejszej fazy infekcji i niezbędne do jej efektywnego przebiegu. Białko OspC umożliwia krętkom inwazję w organizmie gospodarza, dzięki szeregowi interakcji z ligandami pochodzącymi zarówno od wektora jak i od żywiciela. W pracy **H2** opisuję zaobserwowane podczas badań *in vitro* zupełnie nowe oddziaływanie pomiędzy białkami OspC z różnych gatunków krętków *Borrelia* i ludzkim fibrynogenem, przedstawiam wstępną charakterystykę strukturalną kompleksu tych białek oraz proponuję funkcję biologiczną tego oddziaływania. Praca **H1**

dotyczy oddziaływania białek OspC z ligandami produkowanymi przez gruczoły ślinowe kleszcza *I. ricinus* – białkami Iric1, Iric2 i Iric3. Białka Iric są słabo poznanymi homologami białka Salp15 z *I. scapularis*, które jest stosunkowo dobrze opisane i wykazuje ciekawe właściwości immunosupresyjne. W pracy **H1** charakteryzuję oddziaływania pomiędzy białkami OspC i Iric1 – 3, jak również proponuję lokalizację miejsca wiązania Iric1 – 3 na powierzchni OspC w obrębie epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała anti-OspC. Prace **H1** i **H2** opisują wyniki uzyskane z zastosowaniem dwóch biofizycznych metod pomiaru siły oddziaływania między biomolekułami: termoforezy w skali mikro (microscale thermophoresis, MST) oraz interferometrii warstwowej (biolayer interferometry, BLI). Są to pierwsze publikacje powstałe w IChB PAN z wykorzystaniem tych nowoczesnych technik.

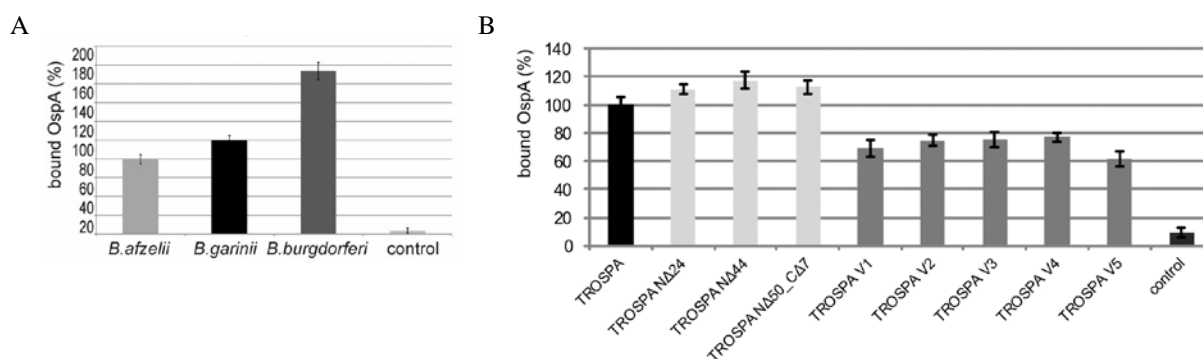
4.3.2. Oddziaływanie pomiędzy białkami OspA i TROSPA – kluczowy etap kolonizacji organizmu kleszcza przez krętki *Borrelia*

Do kolonizacji kleszcza przez *B. burgdorferi* dochodzi podczas jego żerowania na zakażonym kręgowcu. W procesie tym uczestniczą powierzchniowe białka bakterii, między innymi lipoproteina OspA, która oddziałuje z receptorem TROSPA obecnym na powierzchni komórek nabłonka jelita kleszcza. Gen *ospA* umiejscowiony jest w plazmidowym DNA krętka a jego ekspresję indukują bliżej niezidentyfikowane czynniki uwalniane przez kleszcza bądź gospodarza podczas ukąszenia⁹. Udział białka OspA w kolonizacji kleszcza przez bakterie potwierdzono w eksperymencie, w którym kleszcze *I. scapularis* żerowały na myszach immunizowanych wcześniej antygenami OspA, a następnie zakażonych *B. burgdorferi* s. s. W eksperymencie tym obserwowano, że obecność przeciwciał anti-OspA uniemożliwia adhezję krętków do nabłonka jelitowego kleszcza. Zaobserwowano też, że mutanty *Borrelia* pozbawione genu *ospA* infekują myszy w takim samym stopniu jak typ dziki, nie są jednak w stanie skolonizować kleszcza, ani w nim przetrwać¹⁰. Białko OspA było także aktywnym składnikiem pierwszej szczepionki przeciwko boreliozie dla ludzi którą opracowano w USA pod nazwą Lymerix. Szczepionka ta została dopuszczona do użytku przez FDA w 1998 roku, lecz w roku 2002 została wycofana ze względu na częste efekty uboczne. Receptor dla białka OspA, czyli białko TROSPA z *I. scapularis*, został zidentyfikowany z zastosowaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego ekspresyjnego bibliotekę sekwencji kodujących kleszcza i białko OspA. Wykazano ponadto, że zarówno przeciwciała anti-TROSPA jak i wyciszenie ekspresji sekwencji kodującej TROSPA uniemożliwiały efektywną kolonizację kleszcza *I. scapularis* przez *B. burgdorferi* s. s.¹¹.

Obiektami moich badań opisanych w pracy **H4** są trzy rekombinowane białka OspA, z *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* i *B. garinii* oraz białko TROSPA pochodzące z gatunku kleszcza który jest głównym wektorem krętków *Borrelia* w Europie – *I. ricinus* (kleszcz pospolity). Sekwencje kodujące białka powierzchniowe krętków pozyskałam dzięki uprzejmości dr hab. Beaty Wodeckiej z Katedry Genetyki Ogólnej i Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego, natomiast sekwencję kodującą TROSPA zamplifikowałam samodzielnie na podstawie DNA wyizolowanego z kleszczy zebranych w Wielkopolsce. Sekwencja ta została opublikowana w GenBank pod numerem referencyjnym KF041821. Porównanie zamplifikowanej przeze mnie sekwencji kodującej TROSPA z dostępną sekwencją referencyjną z tego gatunku kleszcza i innych gatunków pokazało bardzo dużą zachowawczość genu *trospa*, szczególnie w rejonie kodującym (gen posiada 1 intron).

Natywne białko TROSPA z *I. scapularis* jest glikozylowane, natomiast wykazano, że rekombinowane białko produkowane w bakteriach zachowuje zdolność do oddziaływania z OspA^{11,12}. Analizy bioinformatyczne wskazywały także na obecność transbłonowej domeny w części N-końcowej TROSPA. Mając na uwadze modyfikacje potranslacyjne białka TROSPA, podjęłam próbę ekspresji sekwencji kodującej w *N. benthamiana* za pomocą systemu do przejściowej ekspresji w roślinach opartego o wektory wirusowe TVCV (Tobacco Vein Clearing Virus). Niestety próba ta zakończyła się niepowodzeniem, ponieważ niska wydajność produkcji białka w tytoniu nie pozwalała na jego izolację

w ilościach pozwalających na dalsze badania. cDNA został więc sklonowany w wektorze do ekspresji w systemie bakteryjnym, w którym udało się uzyskać zadowalające ilości rekombinowanego białka TROSPA. Ponieważ inni badacze wykazali, że rekombinowane białko TROSPA z *I. scapularis* produkowane w systemie bakteryjnym zachowuje zdolność do oddziaływania z OspA, zdecydowałam się wykorzystać do dalszych badań rekombinowane białko TROSPA z *I. ricinus* otrzymane w bakteriach. Białko to zostało zastosowane w testach ELISA, których celem było porównanie jego powinowactwa do rekombinowanych białek OspA z *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii* i *B. garinii*. Do badań oddziaływania OspA – TROSPA przygotowano także warianty delecyjne oraz substytucyjne TROSPA. Warianty delecyjne były pozbawione części lub całej domeny transbłonowej (pierwsze 24, 44 i 50 reszt aminokwasowych z końca aminowego) i stosowałam je w celu określenia długości domeny transbłonowej niezaangażowanej w oddziaływanie. Warianty substytucyjne białka TROSPA przygotowałam kierując się założeniem, że badane oddziaływanie ma charakter elektrostatyczny, jako że w pH 7.4 całkowity ładunek TROSPA wynosi -12, a całkowity ładunek OspA wynosi +5. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych metodą ELISA przedstawiłam na rysunku 1.

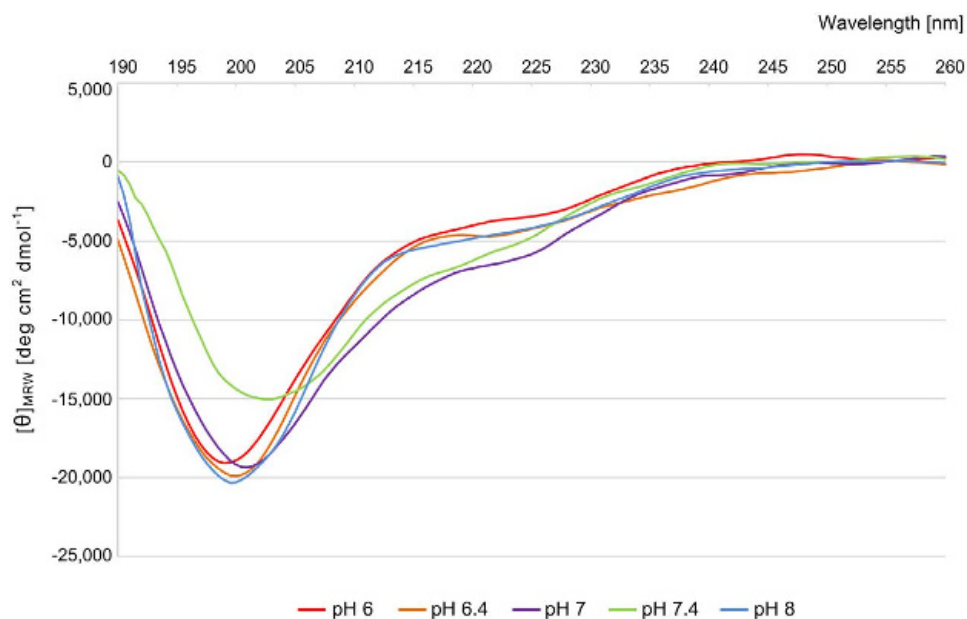


Rysunek 1. Powinowactwo wariantów rekombinowanych białek TROSPA z *I. ricinus* do białek OspA z *B. burgdorferi s. l.* **A** – Powinowactwo między pełnej długości TROSPA i OspA pochodzącym z trzech gatunków *Borrelia*. **B** – Powinowactwo między różnymi wariantami TROSPA i OspA z *B. garinii*. Powinowactwo oszacowano metodą ELISA na płytkach pokrytych wariantami białka TROSPA, które po uprzednim zablokowaniu inkubowano z serią rozcieńczeń białka OspA. Ilościowej detekcji związanego OspA dokonywano za pomocą pierwszorzędowych przeciwciał anti-OspA i drugorzędowych przeciwciał sprzężonych z alkalizną fosfatazą (AP). Na osi Y wykresów przedstawiono poziom odczytu średniej absorbancji dla produktu AP znormalizowany względem oddziaływania między pełnej długości białkiem TROSPA i białkiem OspA z *B. garinii*. W reakcjach kontrolnych używano płytek opłaszczonych białkiem powierzchniowym OspC.

Analiza wyników testów ELISA pokazała, że białko TROSPA z różnym powinowactwem oddziałuje z białkami OspA z trzech gatunków krętków *Borrelia* (Rys. 1A). Mutanty białka TROSPA pozbawione fragmentów oraz całej przewidywanej domeny transbłonowej zachowywały wysokie powinowactwo do OspA, co wskazuje, że rejony wiążące OspA zlokalizowane są w części C-końcowej TROSPA (Rys. 1B). Mutanty substytucyjne TROSPA natomiast wykazywały znaczącą redukcję powinowactwa do OspA, jednak nie znosiły go całkowicie. Najprawdopodobniej więc oddziaływania elektrostatyczne nie są jedyną determinantą oddziaływania pomiędzy badanymi białkami. Kolejnym etapem badań opisanym w pracy **H4** była wstępna ocena potencjału białka TROSPA do zastosowania w szczepionce dla zwierząt stanowiących rezerwuar krętka *Borrelia*. Zasada działania proponowanej szczepionki opiera się na blokadzie oddziaływania TROSPA – OspA przez przeciwciała anti-TROSPA obecne we krwi immunizowanych zwierząt. Takie działanie szczepionki uniemożliwiłoby zakażenie kolejnych kleszczy żerujących na zaszczepionym nosicielu krętka, w konsekwencji prowadząc do zmniejszenia się ilości krętków krążących w środowisku naturalnym. Aby ocenić, czy rekombinowane białko TROSPA jest dobrym kandydatem na szczepionkę, dokonano analizy jego właściwości

immunogennych poprzez immunizację zwierząt laboratoryjnych i następnie potwierdzono metodą ELISA obecność specyficznych przeciwciał anti-TROSPA w surowicy immunizowanych zwierząt. Ten etap prac został wykonany we współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Ponadto wykazano, że zawarte w surowicy immunizowanych zwierząt przeciwciała anti-TROSPA zastosowane w kompetycyjnych testach ELISA w sposób istotny obniżają zdolność wiązania się białka OspA do białka TROSPA. Wyżej opisane badania dotyczące potencjalnego zastosowania białka TROSPA jako szczepionki przeciw boreliozie dla zwierząt stanowiących naturalny rezerwuuar krętka *Borrelia* stały się podstawą uzyskania ochrony patentowej dla szczepionki w postaci patentów **H6**, **H7** i **H8**. W ramach badań nad białkowymi kandydatami na szczepionkę przeciwko boreliozie przetestowano metodą ELISA i potwierdzono także właściwości immunogenne hybrydy białek TROSPA-Salp15. Wyniki tych badań zostały także ujęte w patentach **H6**, **H7** i **H8**. Patenty te obejmują ochroną opracowane przeze mnie: konstrukty genetyczne kodujące białka TROSPA i TROSPA-Salp15, sposób wytwarzania białka TROSPA i białka fuzyjnego TROSPA-Salp15 w układzie bakteryjnym oraz zastosowanie w/w białek jako szczepionki przeciw boreliozie. Koncepcja szczepionki zakłada zastosowanie jej wobec zwierząt będących naturalnym rezerwuarem krętka w celu zmniejszenia ilości krętków krążących w środowisku naturalnym. Pod wpływem kontaktu z zawartymi w szczepionce antygenami organizmy zwierząt powinny wyprodukować przeciwciała, które oddziałują z białkami TROSPA i Salp15 i blokują kluczowe etapy cyklu życiowego krętka *Borrelia* czyli kolonizację kleszcza oraz przenikanie z organizmu kleszcza do krwi kręgowca.

Podczas realizacji badań, których wyniki opublikowano w pracy **H3**, starałam się scharakteryzować strukturalnie białko TROSPA. W trakcie wcześniejszej pracy z tym białkiem zaobserwowałam, że wykazuje ono szereg interesujących cech. Zaobserwowano min. mniejszą mobilność elektroforetyczną w żelu poliakrylamidowym zarówno pełnej długości białka jak i jego skróconej formy pozbawionej N-końcowej domeny transbłonowej. Jednym z czynników wpływających na mobilność elektroforetyczną białek jest ich nietypowy skład aminokwasowy co charakteryzuje min. domeny transbłonowe lub nieuporządkowane. Obserwowałam także znacznie większą masę cząsteczkową białka szacowaną w pomiarze dynamicznego rozpraszania światła (Dynamic Light Scattering, DLS) niż masa wyliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej. Obserwacje te nie wynikały z agregacji preparatu, ponieważ w pomiarze DLS białko występowało w postaci wysoce monodispersyjnej. W celu wyjaśnienia tych ciekawych spostrzeżeń przeprowadziłam szereg analiz bioinformatycznych sekwencji TROSPA, które jednoznacznie wskazały, że jest ono białkiem immanentnie nieuporządkowanym (IDP) o niewielkiej zawartości struktury drugorzędowej w łańcuchu polipeptydowym. W białku tym obecna jest stosunkowo duża duplikacja obejmująca 23-aminokwasowy motyw, co jest też częstą cechą białek IDP^{13,14}. Wyniki analiz *in silico* zostały wkrótce potwierdzone poprzez eksperymentalną analizę właściwości fizykochemicznych TROSPA. Parametrem typowym dla białek IDP jest silnie wydłużony kształt i stosunkowo duży promień hydrodynamiczny^{13,14}. Ten parametr dla TROSPA określiłam poprzez analizę metodą DLS uzyskując wartość 2.9 – 3.5 nm w zakresie temperatur 4 – 80 °C. Takie wielkości promienia hydrodynamicznego obserwuje się w białkach globularnych o masie 41 – 63 kDa. Dodatkowo, porównanie profilu elucji TROSPA podczas sączenia molekularnego w warunkach denaturujących i niedenaturujących wykazało niewielką różnicę, co wskazuje na niskie ustrukturyzowanie łańcucha polipeptydowego. Zawartość struktur drugorzędowych w białku przeanalizowano stosując pomiary dichroizmu kołowego w buforach o różnych wartościach pH. Zaobserwowałam, że w każdym z badanych pH widmo CD ma postać krzywej o charakterystycznym dla IDP kształcie, tzn. z dużym minimum przy długości fali 195 nm (Rys. 2).



Rysunek 2. Widmo UV CD białka TROSPA w zakresie pH 6 – 8 w 37 °C. W pH 7.4 zaobserwowano największą zawartość struktury drugorzędowej, o czym świadczy najwyższa wartość MRW (średnia molowa eliptyczność na resztę aminokwasową – mean residual ellipticity) przy długości fali 195 nm (zielona krzywa).

Dalsza analiza wyników pomiarów CD przeprowadzonych w różnych pH i w gradencie temperatury za pomocą dedykowanych narzędzi bioinformatycznych pozwoliła na określenie procentowej zawartości struktur drugorzędowych w białku TROSPA w określonych warunkach. Zaobserwowano, że największa zawartość struktury drugorzędowej (niemal 50%) występuje w pH 7.4 w zakresie temperatur 35 – 40 °C. W pozostałych przebadanych warunkach pH w tym zakresie temperatury zawartość struktur drugorzędowych wynosiła: 30% w pH 7, 25% w pH 8 i 20% w pH 6.4. Zmiany strukturalne dotyczyły zarówno zawartości helis α jak i nici β . Obserwacja ta jest bardzo interesująca, ponieważ do oddziaływania pomiędzy białkami TROSPA i OspA dochodzi w warunkach zbliżonych do tych w których białko TROSPA wykazuje największe ustrukturyzowanie (pH 7.4 i temperatura około 37 °C). Ostatni etap badań struktury TROSPA i kompleksu TROSPA – OspA przeprowadziłam we współpracy z ośrodkami synchrotronowymi w Lund (MAX-Lab) i Hamburgu (EMBL/DESY), gdzie dokonano pomiarów preparatów białkowych metodą SAXS. Pomiarzy te potwierdziły przynależność TROSPA do IDP i pokazały, że w roztworze białko to występuje w postaci 2 – 4 populacji konkretnych konformerów strukturalnych (uwzględniając parametry strukturalne: promień żyracji R_g oraz maksymalną odległość wewnątrzcząsteczkową D_{max}). Analiza danych SAXS dla kompleksu TROSPA – OspA pozwoliła na wyznaczenie parametrów kompleksu, takich jak jego masa i objętość oraz ustalenie, że stechiometria badanego oddziaływania wynosi 1:1.

4.3.3. Superzmiennie białko powierzchniowe OspC, jego plejotropowe działanie i różnorodne ligandy białkowe

Patogenne bakterie wykorzystują przeróżne strategie, aby przetrwać atak mechanizmów obronnych organizmów żywicieli, w których pasożytują. Jedną z takich strategii, obserwowaną m.in. u krętków *Borrelia*, jest produkcja szerokiego spektrum białek powierzchniowych, zdolnych do zakłócania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, czy rekrutowania czynników gospodarza i opłaszczania się nimi w celu upodobnienia się do otoczenia^{15,16}. Do tej właśnie grupy białek należy lipoproteina powierzchniowa OspC (Outer surface protein C), będąca przedmiotem badań opisanych w niniejszym osiągnięciu naukowym. Białko OspC jest najliczniej produkowanym przez krętka białkiem powierzchniowym we wczesnym etapie infekcji organizmu gospodarza. Ekspresja sekwencji kodującej OspC z kolistego plazmidu cp26 indukowana jest pod wpływem zmiany warunków panujących w ciele

kleszcza (między innymi temperatury) wywołanej rozpoczęciem żerowania przez kleszcza. Pod wpływem tego bodźca, krętki zmieniają profil ekspresji białek powierzchniowych i kolonizują ślinianki kleszcza. Następnie, wraz z wydzieliną ślinianek, wstrzykiwane są w miejsce ukąszenia. Produkcja białka OspC trwa przez okres około 3 tygodni. W tym czasie *Borrelia* dostaje się do krwi i rozpoczyna kolonizację tkanek żywiciela^{17,18}. Sekwencja kodująca OspC jest bardzo zmienna. Przykładowo, istnieje co najmniej 19 genotypów *ospC* w ramach jednego tylko gatunku *B. burgdorferi* s. s., przy czym większość infekcji powodowanych przez ten gatunek krętków u ludzi koreluje z konkretnymi typami *ospC* (A, B, I, H i K)^{5,6}. Obserwuje się więc bardzo ciekawą korelację pomiędzy genotypem *ospC* a specyficznością gatunkową żywiciela. Średnia różnica sekwencji nukleotydowej pomiędzy typami *ospC* to 20% (a nawet do 45%), natomiast w ramach typów różnice wynoszą średnio 5%. Podobne różnice obserwowane są na poziomie sekwencji aminokwasowej¹⁹. Jeżeli chodzi o dotychczas poznane funkcje OspC zaobserwowano, że białko to jest niezbędne do zapoczątkowania infekcji w myszach. Krętki pozbawione sekwencji kodującej *ospC* niezdolne są do wywołania efektywnej infekcji i znikają z organizmów zwierząt po 48 godzinach od jej rozpoczęcia²⁰. Wykazano także, że białko to wiąże czynnik dopełniacza C4b, blokując układ dopełniacza¹⁶. OspC wiąże także na powierzchni krętka białko Salp15 produkowane przez śliniaki kleszczy *Ixodes* i wykazujące silne właściwości immunosupresyjne. Wykazano, że oddziaływanie to chroni krętka przed neutralizacją przez przeciwciała²¹. Kolejnym ligandem OspC jest plazminogen, do którego powinowactwo koreluje z inwazyjnością danego szczepu krętków²². OspC chroni też krętka przed unieszkodliwieniem przez makrofagi, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest bliżej znany²⁰. Pomimo ochronnej roli OspC na pierwszych etapach infekcji gospodarza przez krętka *Borrelia*, OspC wykazuje silnie immunogenne właściwości⁸. Właściwości te sprawiają, że OspC jest obiektem badań nakierowanych na poszukiwanie szczepionki przeciw boreliozie^{23,24}.

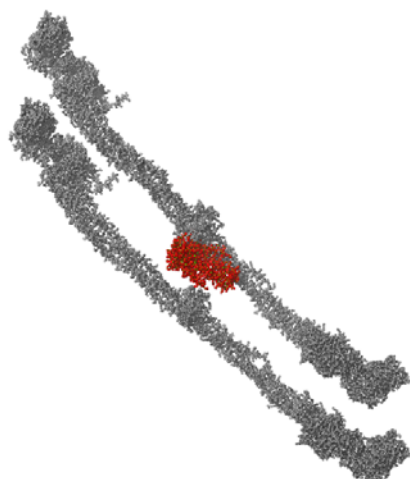
Te niezwykle interesujące doniesienia dotyczące białka OspC skłoniły mnie do podjęcia badań mających na celu poszukiwanie jego kolejnych właściwości i dalszego wyjaśniania jego pleiotropowego sposobu działania. W rezultacie tych badań opublikowałam prace **H2** i **H1**. Biorąc pod uwagę to, że białko OspC jest bardzo obficie produkowane podczas początkowych etapów infekcji gdy krętek przebywa min. w krwiobiegu, zadałam pytanie, czy białko to może oddziaływać z występującym w dużych ilościach we krwi fibrynogenem. Podobne zjawisko obserwuje się u innych patogennych bakterii, takich jak gronkowce czy pasożytnicze krętki z rodzaju *Leptospira*²⁵⁻²⁷. Aby odpowiedzieć na postawione pytanie, przeprowadziłam badania powinowactwa i badania strukturalne w roztworze, których wyniki stały się podstawą publikacji **H2**. Aby zweryfikować istnienie i określić siłę oddziaływania *in vitro* pomiędzy OspC i fibrynogenem zastosowałam tradycyjną technikę ELISA oraz nowoczesną technikę badania oddziaływań wykorzystującą pomiary termoforezy w skali mikro (Microscale Thermophoresis, MST). Praca **H2** jest pierwszą pracą powstałą w IChB PAN z zastosowaniem techniki MST. Biorąc pod uwagę dużą zmienność OspC oraz wcześniejsze doniesienia o korelacji pomiędzy typem OspC, inwazyjnością oraz powinowactwem do ligandów, postanowiłam dodatkowo sprawdzić, czy powinowactwo ludzkiego fibrynogenu do różnych typów OspC pochodzących z różnych gatunków krętków *Borrelia* koreluje z przebiegiem infekcji u człowieka. W badaniach powinowactwa pomiędzy fibrynogenem i OspC zastosowałam białka OspC pochodzące z czterech gatunków krętków: *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. spielmanii*, których sekwencje aminokwasowe różniły się od siebie w zakresie 26 – 40%. Dodatkowo, aby określić lokalizację miejsca wiązania białka OspC na silnie wydłużonej cząsteczce fibrynogenu, w pomiarach MST zastosowałam także komercyjnie dostępne fragmenty ludzkiego fibrynogenu: fragment E obejmujący centralny rejon wydłużonej cząsteczki fibrynogenu oraz rejon D obejmujący dystalne odcinki cząsteczki^{28,29}. Wyniki poszczególnych analiz powinowactwa między różnymi typami OspC i fibrynogenem zamieściłam w tabeli 1.

Para białek	Średnia Kd (nM)	Technika pomiaru
Fibrynogen* i OspC z <i>B. afzelii</i>	76	MST
Fibrynogen* i OspC z <i>B. burgdorferi</i>	48	
Fibrynogen* i OspC z <i>B. garinii</i>	130	
Fibrynogen* i OspC z <i>B. spielmanii</i>	408	
OspC z <i>B. burgdorferi</i> * i fibrynogen	26	
OspC z <i>B. burgdorferi</i> * i fragment E fibrynogenu	34	
OspC z <i>B. burgdorferi</i> * i fragment D fibrynogenu	145	ELISA
OspC z <i>B. burgdorferi</i> i fibrynogen	210	

Tabela 1. Stałe Kd oszacowane na podstawie pomiarów MST i ELISA dla różnych wariantów OspC i ludzkiego fibrynogenu. Częsteczki znakowane w pomiarze MST zaznaczono gwiazdką. Kd wyliczono na podstawie trzech pomiarów MST dla każdej pary białek lub 16 powtórzeń testu ELISA.

Wyniki otrzymane dwoma niezależnymi metodami (MST i ELISA) potwierdziły powinowactwo OspC do ludzkiego fibrynogenu. Oddziaływanie to badane w warunkach *in vitro* jest silne, o czym świadczą nanomolowe wartości Kd (Tabela 1). Wartości Kd dla poszczególnych typów OspC różnią się w zakresie kilkudziesięciu do kilkuset nM. Co ciekawe, najsilniej z fibrynogenem oddziaływały te białka OspC, które produkowane są przez szczepy bakteryjne wykazujące małą specyficzność objawów i powodujące rozsianą infekcję u ludzi: *B. burgdorferi* s. s. i *B. afzelii* (Kd 48 i 76 nM). W przypadku OspC z *B. garinii* stała Kd wyniosła 130 nM a w przypadku OspC z *B. spielmanii* Kd wyniosła 408 nM. Te dwa szczepy bakterii wywołują objawy w obrębie ludzkiego układu nerwowego (*B. garinii*) oraz powodują lokalne infekcje w skórze (*B. spielmanii*). Istnieje więc pewna korelacja pomiędzy siłą powinowactwa OspC – fibrynogen a specyficznością objawów infekcji. Jeżeli chodzi o oddziaływanie z fragmentami fibrynogenu, to pomiary MST wskazują, że oba fragmenty mogą uczestniczyć w oddziaływaniu, natomiast fragment E (rejon centralny cząsteczki) wykazuje silniejsze powinowactwo do OspC.

Kolejnym etapem badań białka OspC i kompleksu OspC-fibrynogen była próba scharakteryzowania struktury tego kompleksu w roztworze za pomocą pomiarów SAXS. Pomiary przeprowadzono we współpracy z ośrodkiem synchrotronowym EMBL/DESY w Hamburgu. Dotychczas opisane dane strukturalne dotyczące białka OspC pochodzą z badań krystalograficznych i wskazują, że białko to występuje w postaci dimerycznej, dzięki interakcji hydrofobowych interfejsów dwóch monomerów. Co ciekawe, w utworzonym dimerze na zewnątrz wyeksponowane są w większości rejony zmienne OspC, co jest zgodne z plejotropowym sposobem działania tego białka. Uzyskane w trakcie pomiarów SAXS wyniki dotyczące białka OspC są zgodne z danymi krystalograficznymi i stanowią ich uzupełnienie. Pomiary SAXS kompleksu OspC-fibrynogen dostarczyły wielu informacji o jego strukturze (m.in. o masie i objętości), a analiza danych za pomocą odpowiednich algorytmów pozwoliła na wygenerowanie modelu kompleksu, który zaprezentowałam na rysunku 3.



Rysunek 3. Model kompleksu OspC-fibrynogen stworzony dzięki analizie krzywej rozpraszania SAXS. W modelu tym dimer OspC (zaznaczono kolorem czerwonym) wiąże dwa dimery fibrynogenu (zaznaczono kolorem szarym).

Uzyskane i przeanalizowane dane SAXS wskazują, że dimer OspC oddziałuje z resztami aminokwasowymi fibrynogenu w obrębie centralnie położonego rejonu E. Wynik ten jest zbliżony z wcześniej opisanymi wynikami uzyskanymi metodą MST, według których rejon E fibrynogenu najsilniej oddziaływał z białkiem OspC. Stechiometria wiązania wynosi 2:4. Ostatnim etapem badania kompleksu OspC-fibrynogen była próba odpowiedzi na pytanie, czy wiązanie OspC wpływa na proces, w którym główną funkcję odgrywa fibrynogen, czyli tworzenie skrzepu. W tym celu przeprowadzono pomiary tempa polimeryzacji fibrynogenu pod wpływem trombiny w obecności i przy braku białka OspC. Pomiary te pokazały, że przy molowym stosunku OspC do fibrynogenu 1:1 i więcej obserwowane jest znaczne spowolnienie polimeryzacji fibrynogenu i powstawania skrzepu.

Jak wspominałam wcześniej, białko OspC oddziałuje z różnymi ligandami. Jednym z nich jest glikoproteina Salp15 i jej homologi produkowane przez gruczoły ślinowe kleszczy. Ślinianki kleszczy produkują szereg czynników ułatwiających kleszczom efektywne żerowanie. Glikoproteina Salp15 jest jednym z takich czynników i posiada ciekawe właściwości, takie jak zdolność hamowania aktywacji i proliferacji limfocytów CD4+ T, inhibicji produkcji cytokin przez komórki dendrytyczne, czy wpływ na podwyższenie produkcji nukleotydu CD73 w regulatorowych limfocytach CD4+ T³⁰⁻³³. Immunosupresyjne właściwości białka Salp15 sprawiają, że jest ono atrakcyjnym obiektem badań nad immunoterapią³³⁻³⁵.

Dzięki oddziaływaniu z OspC białko Salp15 wykorzystywane jest przez krętki w celu zwiększenia szans na przeżycie podczas wnikania do organizmu gospodarza i efektywną infekcję^{21,30}. Oddziaływanie to zostało zidentyfikowane u kleszcza *Ixodes scapularis* będącego głównym wektorem *B. burgdorferi* s. s. w Ameryce Północnej. Wykazano, że chroni ono krętki przed neutralizacją przez przeciwciała anti-OspC. Kolejne badania doprowadziły do identyfikacji homologów tej glikoproteiny u różnych gatunków kleszczy z rodzaju *Ixodes*.

W mojej pracy badawczej skupiłam się na homologach białka Salp15 produkowanych przez gruczoły ślinowe kleszcza *I. ricinus* który jest głównym wektorem kompleksu *B. burgdorferi* s. l. w Europie³⁶. Najlepiej poznany homolog Salp15 to glikoproteina Iric1 z *I. ricinus*, oddziałująca z OspC w podobny sposób³⁷. Opierając się na danych literaturowych, podjęłam badania mające na celu zweryfikowanie, czy dwa inne homologi Salp15, Iric2 i Iric3, również oddziałują z wyżej wymienionymi typami białek OspC w podobny sposób jak Iric1. Celem tej części badań było także dostarczenie informacji o elementach ważnych dla utworzenia kompleksu białkowego. Wyniki tych badań opisałam w pracy **H1**. Badania powinowactwa pomiędzy białkami OspC i Iric prowadziłam z zastosowaniem metody MST oraz interferometrii warstwowej (Biolayer Interferometry, BLI). Druga z tych technik została wprowadzona do zasobu metod w IChB PAN dzięki moim staraniom, pozyskaniu funduszy

z MNiSW na zakup sprzętu oraz organizacji szkoleń. Praca **H1** jest pierwszą pracą powstałą w IChB PAN, w której wykorzystano wyniki pomiaru oddziaływań międzybiałkowych z zastosowaniem BLI. Uzyskane na podstawie pomiarów metodą BLI stałe K_d dla poszczególnych par OspC – Iric potwierdziły, że we wszystkich przypadkach dochodzi do silnego oddziaływania, z K_d o wartościach nanomolowych (Tabela 2).

	OspC z <i>B. afzelii</i>	OspC z <i>B. burgdorferi</i> s. s.	OspC z <i>B. garinii</i>	OspC z <i>B. spielmanii</i>
Iric1	181.2 ± 80.0	71.75 ± 0.40	50.69 ± 0.40	27.05 ± 0.37
Iric2	231.5 ± 1.7	130.2 ± 0.6	853.7 ± 40.4	150.5 ± 0.9
Iric3	567.5 ± 21.4	109.4 ± 2.1	88.38 ± 0.57	60.13 ± 0.96

Tabela 2. Stałe K_d [nM] dla oddziaływań pomiędzy różnymi typami OspC i Iric obliczone na podstawie pomiarów BLI.

Wartości K_d oszacowane dla tych samych par białek metodą MST różniły się od wyników uzyskanych metodą BLI. W kilku przypadkach nie udało się potwierdzić oddziaływania i obliczyć K_d , natomiast wszystkie oszacowane wartości K_d były podobne lub nieco wyższe niż wynikające z pomiarów BLI (Tabela 2 i 3).

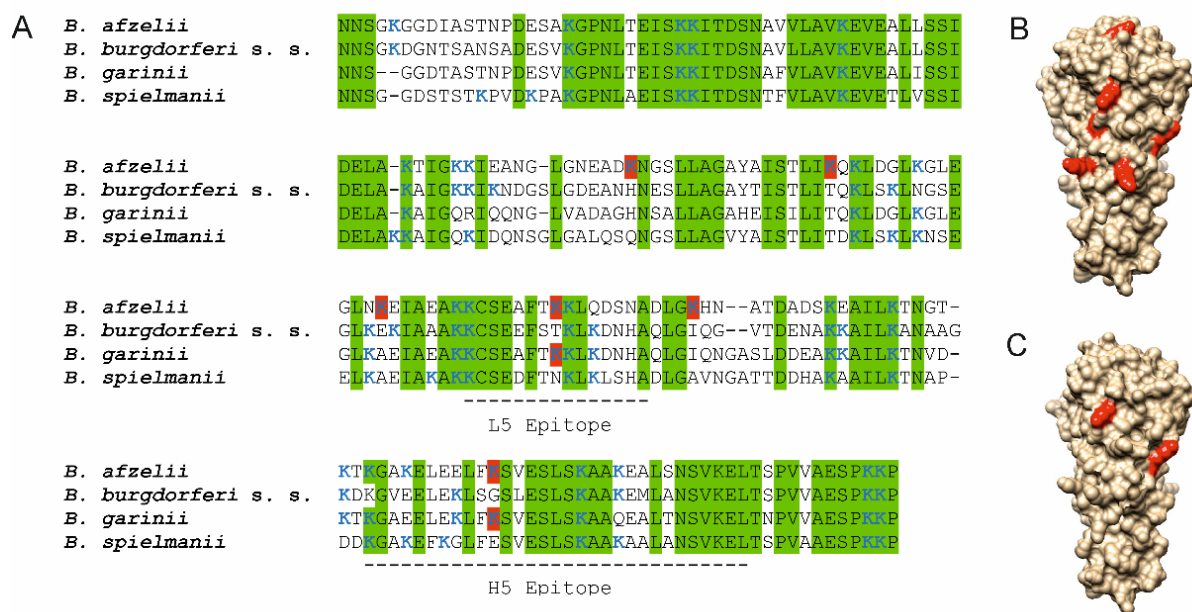
	OspC z <i>B. afzelii</i>	OspC z <i>B. burgdorferi</i> s. s.	OspC z <i>B. garinii</i>	OspC z <i>B. spielmanii</i>
Iric1	354.90 ± 80.11	272.66 ± 16.10	-	163.98 ± 18.61
Iric2	-	115.84 ± 17.00	-	211.64 ± 54.42
Iric3	-	299.50 ± 74.40	-	287.59 ± 77.85

Tabela 3. Stałe K_d [nM] dla oddziaływań pomiędzy różnymi typami OspC i Iric obliczone na podstawie pomiarów MST.

Zastosowanie dwóch technik pomiaru siły oddziaływań międzycząsteczkowych umożliwiło nie tylko określenie siły wiązania, ale także dostarczyło ciekawych informacji o tym, jak modyfikacje białek stosowane na potrzeby danej techniki pomiarowej wpływają na parametry wiązania. Informacje te pozwoliły mi na wyciągnięcie istotnych wniosków o kompleksie OspC-Iric. Technika BLI wymaga immobilizacji białka na sensorze. Podczas prowadzonych przeze mnie pomiarów zdecydowałam się na immobilizację białek OspC za pomocą etykiety His-tag na końcu aminowym zakładając, że takie podejście będzie imitowało naturalny układ w którym lipoproteina powierzchniowa OspC jest immobilizowana w błonie dzięki lipidowej modyfikacji końca aminowego. Uzyskane wyniki wskazywały na nieco silniejsze oddziaływanie w przypadku immobilizacji białka OspC (pomiar BLI) w porównaniu do nieimmobilizowanego białka (pomiar MST). Różnica ta mogła jednak wynikać z faktu, że w metodzie MST używano znakowanych fluorescencyjnie białek OspC i to obecność etykiety fluorescencyjnej wpłynęła na podwyższenie stałej K_d lub hamowała wiązanie. Aby zweryfikować hipotezę o dodatnim wpływie immobilizacji białka powierzchniowego na siłę oddziaływania z jego ligandem, przeprowadziłam dodatkowe eksperymenty BLI, w których jako ligand zastosowano fibrynogen. Jest to ligand OspC który został przeze mnie zidentyfikowany i opisany w pracy **H2**. Porównanie stałych K_d dla oddziaływań OspC – fibrynogen obliczone na podstawie pomiarów MST z nieznakowanymi typami OspC (praca **H2**) z wynikami uzyskanymi na podstawie pomiarów BLI potwierdziło pozytywny wpływ immobilizacji na powinowactwo OspC do ligandów.

Oddziaływanie OspC – Iric zaobserwowano we wszystkich pomiarach przeprowadzonych metodą BLI, natomiast nie we wszystkich parach białek w pomiarach przeprowadzonych metodą MST. Białka OspC używane w pomiarach metodą MST zostały wcześniej wyznakowane poprzez kowalencyjne dołączenie fluorescencyjnego znacznika do łańcuchów bocznych lizyny. Próbując wytłumaczyć przyczynę wymienionych różnic i biorąc pod uwagę fakt, że na powierzchni białek OspC znajduje się większość zmiennych reszt aminokwasowych, sformułowałam hipotezę, że typy OspC które nie tworzyły kompleksu w układzie badanym metodą MST, zawierały modyfikację (znacznik fluorescencyjny) w rejonie istotnym dla oddziaływania z białkami Iric. Aby zweryfikować tę hipotezę przeprowadziłam

analizę *in silico*, poszukując niekonserwatywnych lizyn na powierzchni tych białek OspC, które nie oddziaływały z Iric w układzie MST. Wyniki tej analizy zaprezentowałam na rysunku 4. Pokazują one, że niekonserwatywne reszty lizyny znajdują się w rejonach położonych w pobliżu epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała anty-OspC^{23,24,38}. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi mówiącymi o tym, że oddziaływania OspC – Salp15 chroni krętki przed zabijaniem przez przeciwciała anty OspC^{21,30}.



Rysunek 4. Niekonserwatywne reszty lizyny i położenie epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała w białku OspC. **A** – Porównanie sekwencji aminokwasowej czterech typów białka OspC używanych w badaniach powinowactwa OspC – Iric. Na zielono oznaczono rejony konserwatywne, na biało rejony zmienne, na czerwono niekonserwatywne reszty lizyny występujące w OspC z *B. afzelii* i *B. garinii*, które nie oddziaływały z białkami Iric w pomiarach MST. Linia przerywaną oznaczono położenie epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała anty-OspC^{23,24,38}. **B** – Położenie niekonserwatywnych reszt lizyn na powierzchni OspC z *B. afzelii*. **C** – położenie niekonserwatywnych reszt lizyn na powierzchni OspC z *B. garinii*.

4.3.4. Podsumowanie głównego osiągnięcia naukowego

Na podstawie wyników badań zawartych w moim osiągnięciu naukowym można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Białko TROSPA z kleszcza *I. ricinus* występującego w Europie wykazuje powinowactwo do białek OspA produkowanych przez bakterie z kompleksu *B. burgdorferi* s. l.
2. Białko TROSPA i białko fuzyjne TROSPA-Salp15 posiadają silne właściwości immunogenne umożliwiające wykorzystanie ich w roli antygenów w szczepionkach przeciw boreliozie dla wolnożyjących zwierząt.
3. Białko TROSPA to białko immanentnie nieuporządkowane (IDP). Jest to pierwsze tego typu białko zaangażowane w oddziaływania pomiędzy wektorem i patogenem.
4. Ludzki fibrynogen, białko występujące obficie we krwi, może być nowym ligandem oddziałującym z białkami powierzchniowymi OspC bakterii *B. burgdorferi* s. l. Świadczą o tym

nanomolowe wartości stałych K_d dla oddziaływań pomiędzy różnymi typami białek OspC oraz ludzkim fibrynogenem i jego fragmentami, obserwowane w badaniach *in vitro*.

5. Kompleks OspC – fibrynogen w roztworze zbudowany jest z dimeru OspC który oddziałuje z centralnie położonymi resztami aminokwasowymi dwóch dimerów fibrynogenu.
6. OspC wywiera hamujący wpływ na polimeryzację fibrynogenu w testach *in vitro*.
7. Białka OspC wykazują wysokie powinowactwo do białek Iric1, Iric2 i Iric3 z *I. ricinus*, o czym świadczą nanomolowe wartości stałych K_d obserwowane w badaniach *in vitro*.
8. Miejsce wiązania białek Iric 1 – 3 na powierzchni białka OspC położone jest w pobliżu epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała.

4.3.5. Literatura uzupełniająca

1. Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Oliver, J. H., Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* **2**, 123-128, doi:10.1016/j.ttbdis.2011.04.002 (2011).
2. Semenza, J. C. & Suk, J. E. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiol Lett* **365**, doi:10.1093/femsle/fnx244 (2018).
3. Moyer, M. W. The growing global battle against blood-sucking ticks. *Nature* **524**, 406-408, doi:10.1038/524406a (2015).
4. Franke, J., Hildebrandt, A. & Dorn, W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes-- updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis* **4**, 11-25, doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.007 (2013).
5. Wormser, G. P. *et al.* *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *J Infect Dis* **198**, 1358-1364, doi:10.1086/592279 (2008).
6. Wormser, G. P. *et al.* Association of specific subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. *J Infect Dis* **180**, 720-725, doi:10.1086/314922 (1999).
7. Dowdell, A. S. *et al.* Comprehensive Spatial Analysis of the *Borrelia burgdorferi* Lipoproteome Reveals a Compartmentalization Bias toward the Bacterial Surface. *J Bacteriol* **199**, doi:10.1128/JB.00658-16 (2017).
8. Liang, F. T. *et al.* *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect Immun* **72**, 5759-5767, doi:10.1128/IAI.72.10.5759-5767.2004 (2004).
9. Alverson, J., Bundle, S. F., Sohaskey, C. D., Lybecker, M. C. & Samuels, D. S. Transcriptional regulation of the *ospAB* and *ospC* promoters from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* **48**, 1665-1677, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03537.x (2003).
10. Yang, X. F. F., Pal, U., Alani, S. M., Fikrig, E. & Norgard, M. V. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J Exp Med* **199**, 641-648, doi:10.1084/jem.20031960 (2004).
11. Pal, U. *et al.* TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* **119**, 457-468, doi:DOI 10.1016/j.cell.2004.10.027 (2004).
12. Konnai, S. *et al.* Identification of TROSPA homologue in *Ixodes persulcatus* Schulze, the specific vector for human Lyme borreliosis in Japan. *Ticks Tick-Borne Dis* **3**, 75-77, doi:10.1016/j.ttbdis.2012.02.001 (2012).
13. Turoverov, K. K., Kuznetsova, I. M. & Uversky, V. N. The protein kingdom extended: Ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog Biophys Mol Bio* **102**, 73-84, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.01.003 (2010).
14. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Sci* **11**, 739-756, doi:10.1110/ps.4210102 (2002).

15. Marcinkiewicz, A. L., Kraiczy, P. & Lin, Y. P. There Is a Method to the Madness: Strategies to Study Host Complement Evasion by Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes. *Front Microbiol* **8**, 328, doi:10.3389/fmicb.2017.00328 (2017).
16. Caine, J. A. *et al.* Borrelia burgdorferi outer surface protein C (OspC) binds complement component C4b and confers bloodstream survival. *Cell Microbiol* **19**, doi:10.1111/cmi.12786 (2017).
17. Jonsson, M. & Bergstrom, S. Transcriptional and translational regulation of the expression of the major outer surface proteins in Lyme disease Borrelia strains. *Microbiology* **141** (Pt 6), 1321-1329, doi:10.1099/13500872-141-6-1321 (1995).
18. Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C. & Rosa, P. A. Induction of an outer surface protein on Borrelia burgdorferi during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2909-2913, doi:10.1073/pnas.92.7.2909 (1995).
19. Brisson, D. & Dykhuizen, D. E. ospC diversity in Borrelia burgdorferi: different hosts are different niches. *Genetics* **168**, 713-722, doi:10.1534/genetics.104.028738 (2004).
20. Carrasco, S. E. *et al.* Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects Borrelia burgdorferi from phagocytosis by macrophages. *Infect Immun* **83**, 4848-4860, doi:10.1128/IAI.01215-15 (2015).
21. Hovius, J. W. *et al.* Preferential protection of Borrelia burgdorferi sensu stricto by a Salp15 homologue in Ixodes ricinus saliva. *J Infect Dis* **198**, 1189-1197, doi:10.1086/591917 (2008).
22. Onder, O. *et al.* OspC is potent plasminogen receptor on surface of Borrelia burgdorferi. *J Biol Chem* **287**, 16860-16868, doi:10.1074/jbc.M111.290775 (2012).
23. Earnhart, C. G., Buckles, E. L. & Marconi, R. T. Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine* **25**, 466-480, doi:10.1016/j.vaccine.2006.07.052 (2007).
24. Earnhart, C. G. & Marconi, R. T. An octavalent Lyme disease vaccine induces antibodies that recognize all incorporated OspC type-specific sequences. *Hum Vaccines* **3**, 281-289, doi:DOI 10.4161/hv.4661 (2007).
25. Ko, Y. P. & Flick, M. J. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in Staphylococcus aureus Infection. *Semin Thromb Hemost* **42**, 408-421, doi:10.1055/s-0036-1579635 (2016).
26. Oliveira, R. *et al.* Adhesins of Leptospira interrogans mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2396, doi:10.1371/journal.pntd.0002396 (2013).
27. Rivera, J., Vannakambadi, G., Hook, M. & Speziale, P. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* **98**, 503-511 (2007).
28. Ferguson, E. W., Fretto, L. J. & McKee, P. A. A re-examination of the cleavage of fibrinogen and fibrin by plasmin. *J Biol Chem* **250**, 7210-7218 (1975).
29. Weisel, J. W., Stauffacher, C. V., Bullitt, E. & Cohen, C. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* **230**, 1388-1391 (1985).
30. Ramamoorthi, N. *et al.* The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**, 573-577, doi:10.1038/nature03812 (2005).
31. Anguita, J. *et al.* Murine Lyme arthritis development mediated by p38 mitogen-activated protein kinase activity. *J Immunol* **168**, 6352-6357, doi:10.4049/jimmunol.168.12.6352 (2002).
32. Garg, R. *et al.* Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *Journal of Immunology* **177**, 6579-6583, doi:DOI 10.4049/jimmunol.177.10.6579 (2006).
33. Wen, S. Y. *et al.* Salp15, a Multifunctional Protein From Tick Saliva With Potential Pharmaceutical Effects. *Frontiers in Immunology* **10**, doi:ARTN 306710.3389/fimmu.2019.03067 (2020).

34. Nuttall, P. A. Wonders of tick saliva. *Ticks Tick-Borne Dis* **10**, 470-481, doi:10.1016/j.ttbdis.2018.11.005 (2019).
35. Pavaglio, S. A. *et al.* The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *Journal of Immunology* **178**, 7064-7071, doi:DOI 10.4049/jimmunol.178.11.7064 (2007).
36. Hovius, J. W. *et al.* Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**, 296-303, doi:10.1089/vbz.2006.0624 (2007).
37. Kolb, P. *et al.* Soluble cysteine-rich tick saliva proteins Salp15 and Iric-1 from E.coli. *Febs Open Bio* **5**, 42-55, doi:10.1016/j.fob.2014.12.002 (2015).
38. Earnhart, C. G. & Marconi, R. T. OspC phylogenetic analyses support the feasibility of a broadly protective polyvalent chimeric Lyme disease vaccine. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 628-634, doi:10.1128/Cvi.00409-06 (2007).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Staże krajowe:

1. Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej, adiunkt w latach 2015-2019, wykłady pt. „Podstawy Biotechnologii” oraz laboratoria pt. “Projekt Biotechnologiczny” dla studentów III i IV roku

Staże zagraniczne:

1. Northern Illinois University, Plant Molecular Biology Center and Department of Biological Sciences, DeKalb, USA, marzec – sierpień 2001, staż doktorski i współpraca naukowa w laboratorium wirusologicznym kierowanym przez prof. dr hab. Jozefa J. Bujarskiego
2. North Carolina State University, Department of Chemistry and Department of Plant Pathology, Raleigh, USA, 1-20 grudzień, 2007, staż w laboratorium wirusologicznym kierowanym przez prof. Stevena Lommela

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

6.1. Wykaz publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje powstałe po doktoracie

N1. Strugała Aleksander, Jagielski Jakub, Kamel Karol, Nowaczyk Grzegorz, Radom Marcin, Figlerowicz Marek, **Urbanowicz Anna***

Virus-like particles produced using the brome mosaic virus recombinant capsid protein expressed in a bacterial system

International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 3098

- doi: 10.3390/ijms22063098
- IF₂₀₁₉ **4.556**, Punktacja MNiSW **140**, Cytowania **0/0**

- N2.** Sadoch Jan, Pyc Monika, **Urbanowicz Anna**, Iglewski Adam, Pilarski Radosław
High-throughput evolutionary optimization of the induction medium towards recombinant protein production in BY-2 tobacco
Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(2): 676-689
- doi: 10.1002/bit.27594
 - IF₂₀₁₉ **4.143**, Punktacja MNiSW **100**, Cytowania **1/1**
- N3.** Strugala Aleksander, Bierwagen Paulina, Rybka Jakub D., Giersig Michael, Figlerowicz Marek, **Urbanowicz Anna***
BMV propagation, extraction and Purification using chromatographic methods
Bio-Protocol, 2018, 8(14): e2935
- doi: 10.21769/BioProtoc.2935
 - Cytowania **0/0**
- N4.** Mieloch Adam A., Krecisz Monika, Rybka Jakub D., Strugala Aleksander, Krupinski Michal, **Urbanowicz Anna**, Kozak Maciej, Skalski Bohdan, Figlerowicz Marek, Giersig Michael
The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core
AIP Advances, 2018, 8(3): 035005
- doi: 10.1063/1.5011138
 - IF₂₀₁₈ **1.579**, Punktacja MNiSW **25**, Cytowania **9/7**
- N5.** Strugala Aleksander, Krecisz Monika, Rybka Jakub D., **Urbanowicz Anna^***; Szpotkowski Kamil, Bierwagen Paulina, Figlerowicz Marek, Kozak Maciej, Boettcher Christoph, Giersig Michael
Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method
Journal Of Chromatography B - Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, 2017, 1068: 157-16
- doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.022
 - IF₂₀₁₇ **2.441**, Punktacja MNiSW **15**, Cytowania **1/0**
- N6.** Tworak Aleksander; **Urbanowicz Anna^**, Podkowinski Jan, Kurzynska-Kokorniak Anna, Koralewska Natalia, Figlerowicz Marek
*Six *Medicago truncatula* Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules*
Plant Cell Reports, 2016, 35(5): 1043-1052
- doi: 10.1007/s00299-016-1936-8
 - IF₂₀₁₆ **2.896**, Punktacja MNiSW **35**, Cytowania **7/6**
- N7.** Kurzynska-Kokorniak Anna, Koralewska Natalia, Pokornowska Maria, **Urbanowicz Anna**, Tworak Aleksander, Mickiewicz Agnieszka, Figlerowicz Marek
The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities
Nucleic Acids Research, 2015, 43(9): 4365-4380
- doi: 10.1093/nar/gkv328
 - IF₂₀₁₅ **9.202**, Punktacja MNiSW **40**, Cytowania **57/54**

N8. Urbanowicz Anna, Lewandowski Dominik, Figlerowicz Marek
Oral Lyme disease vaccine

Biotechnologia, 2014, 95(4): 255-258

- doi: 10.5114/bta.2014.56595

N9. Lewandowski Dominik, **Urbanowicz Anna**, Figlerowicz Marek
*The fruitful coexistence of *Borrelia burgdorferi* and *Ixodes ticks**

Biotechnologia, 2013: 94(1) 31-33

- doi: 10.5114/bta.2013.46432

N10. Tworak Aleksander, **Urbanowicz Anna**, Podkowiński Jan, Figlerowicz Marek
Animal Dicer and plant Dicer-like proteins

Biotechnologia, 2013, 94(1): 22-26

- doi: 10.5114/bta.2013.46429

N11. Urbanowicz Anna, Kurzynska-Kokorniak Anna, Jankowska Anna, Alejska Magdalena, Figlerowicz Marek

Low recombination activity of R region located at both ends of the HIV-1 genome

Acta Biochimica Polonica, 2012, 59(4): 619-626

- doi: 10.18388/abp.2012_2101
- IF₂₀₁₂ **1.185**, Punktacja MNiSW **15**, Cytowania **1/0**

N12. Sztuba-Solinska Joanna, **Urbanowicz Anna**[^], Figlerowicz Marek, Bujarski Jozef J.

RNA-RNA Recombination in Plant Virus Replication and Evolution

Annual Review of Phytopathology, 2011, 49: 415-443

- doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095351
- IF₂₀₁₁ **9.876**, Punktacja MNiSW **50**, Cytowania **88/86**

Publikacje powstałe przed doktoratem

N13. Wierchoslawski Rafal, **Urbanowicz Anna**[^], Dzianott Aleksandra, Figlerowicz Marek, Bujarski Jozef J.

Characterization of a novel 5 ' subgenomic RNA3a derived from RNA3 of Brome mosaic bromovirus

Journal Of Virology, 2006, 80(24): 12357-12366

- doi: 10.1128/JVI.01207-06
- IF₂₀₀₆ **5.341**, Punktacja MNiSW **35**, Cytowania **13/11**

N14. Urbanowicz Anna, Alejska Magdalena, Formanowicz Piotr, Blazewicz Jacek, Figlerowicz Marek, Bujarski Jozef J.

Homologous crossovers among molecules of brome mosaic bromovirus RNA1 or RNA2 segments in vivo

Journal Of Virology 2005, 79(9): 5732-5742

- doi: 10.1128/JVI.79.9.5732-5742.2005
- IF₂₀₀₅ **5.178**, Punktacja MNiSW **35**, Cytowania **35/33**

N15. Alejska Magdalena, Malinowska Nelli, **Urbanowicz Anna**, Figlerowicz Marek

Two types of non-homologous RNA recombination in brome mosaic virus

Acta Biochimica Polonica, 2005, 52(4): 833-844

- doi: 10.18388/abp.2005_3395
- IF₂₀₀₅ **1.863**, Punktacja MNiSW **15**, Cytowania **6/4**

N16. Alejska Magdalena, Figlerowicz Magdalena, Malinowska Nelli, **Urbanowicz Anna**, Figlerowicz Marek

A universal BMV-based RNA recombination system – how to search for general rules in RNA recombination

Nucleic Acids Research, 2005, 33(12): e105

- doi: 10.1093/nar/gni106
- IF₂₀₀₅ **7.552**, Punktacja MNiSW **45**, Cytowania **11/9**

N17. **Urbanowicz Anna**, Alejska Magdalena, Figlerowicz Marek, Bujarski Jozef J.

Rekombinacja RNA w układzie wirus – roślina transgeniczna – ryzyko powstania nowego wirusa

Biotechnologia, 2003, 2: 129-139

* - autor korespondencyjny, ^ - równorzędny pierwszy lub korespondencyjny autor

Sumaryczny Impact Factor (IF) czasopism w których publikowałam: **71.017**

Sumaryczna punktacja MNiSW czasopism w których publikowałam: **845**

Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytoowań) z dn. 22.03.2021: **226**

6.2. Badania kapsydów wirusowych i cząstek wirusopodobnych oraz białek zaangażowanych w procesy związane z infekcją wirusową

Roślinne wirusy RNA były głównym obiektem moich badań podczas studiów doktoranckich. Prace prowadzone przeze mnie skupiały się w głównej mierze na badaniu procesów związanych ze zmiennością genomów wirusowych i badaniu rekombinacyjnej aktywności wirusowych polimeraz RNA (prace **N11** – **N17**). Po obronie doktoratu moje zainteresowania naukowe zogniskowały się na białkach, w tym białkach wirusowych oraz zawiązanych z infekcją wirusową.

Jednym z interesujących mnie zagadnień powiązanych z wirusami roślinnymi jest wykorzystanie nanotechnologicznego potencjału, jaki posiadają ich kapsydy. Struktury te, ze względu na swe rozmiary, zdolność samoorganizacji, responsywność względem warunków środowiska oraz wewnętrzną przestrzeń ładunkową, w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie jako nanokontenery czy nanoczuJNIKI. Wykorzystując wiedzę i metodykę dotyczącą pracy z wirusami roślinnymi zdobytą podczas doktoratu, podjęłam współpracę z grupą prof. dr hab. Michaela Giersiga realizującego projekt pt. „*Ukierunkowane nanocząstki o magnetycznym rdzeniu i wirusowej powłoce*” na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W ramach udziału w tym projekcie opracowałam z zespołem m.in. nową metodę oczyszczania natywnego wirusa roślinnego BMV opartą o chromatografię, która z powodzeniem może być zastosowana do oczyszczania innych preparatów wirusowych. Zaletą tej metody jest możliwość zastosowania dowolnej skali oczyszczania preparatu jak również przystępność. Nowa metoda produkcji i oczyszczania jak również charakterystyka otrzymanych z jej zastosowaniem wirionów została opisana w pracach **N3** – **N5**. W pracy **N1** opublikowanej w roku 2021 przedstawiam natomiast charakterystykę cząstek wirusopodobnych uzyskanych za pomocą metod inżynierii genetycznej. W trzech z w/w prac jestem autorem korespondencyjnym.

Ponadto zainteresowałam się grupą białek Dicer i Dicer-like (DCL), będącą kluczowym elementem w procesie biogenezy małych niekodujących RNA i obejmującą m.in. białka uczestniczące w obronie przed infekcjami wirusowymi. W projekcie badawczym, w którym uczestniczyłam, zidentyfikowano nowe sekwencje kodujące białka DCL w *Medicago truncatula* oraz przeanalizowano profil ekspresji tych białek. W rezultacie opisanych badań powstała praca N6 w której jestem pierwszym autorem. Moje zainteresowanie białkami typu Dicer znalazło wyraz także w publikacjach przeglądowych N7 i N10, których jestem współautorką.

6.3. Poszukiwanie nowych podejść do produkcji białek rekombinowanych w systemach heterologicznych

Jako kierownik Pracowni Inżynierii Białek w ICHB PAN jestem zainteresowana rozwijaniem nowych metod i narzędzi do produkcji białek rekombinowanych. Uczestniczę min. w projekcie mającym na celu zastosowanie wysokoprzepustowych metod do optymalizacji warunków produkcji białek heterologicznych w hodowlach zawiesinowych komórek roślinnych, w ramach współpracy z Pracownią Analiz Wysokoprzepustowych w IChB PAN kierowaną przez dr Radosława Pilarskiego. Jednym z rezultatów tej współpracy jest opracowanie zoptymalizowanej pożywki do produkcji białek w zawiesinowych hodowlach komórek tytoniu. W ramach realizacji tego projektu hodowle komórek roślinnych zawierających transgen *gfp* prowadzono na płytkach 96-dołkowych zawierających różne warianty 11-składnikowej pożywki. Dzięki zastosowaniu wysokoprzepustowego podejścia i algorytmów genetycznych przetestowano w sumie 4608 wariantów pożywki i wyłoniono wariant o zoptymalizowanym składzie i ponad 100% poprawy wydajności produkcji białka GFP. Wyniki opisanych badań opublikowano w pracy N2.

6.4. Plany badawcze

W przyszłości planuję kontynuację badań nad strukturą i funkcją białek powierzchniowych krętka *Borrelia*. Obecnie trwają prace nad ustaleniem struktury krystalicznej szeregu białek OspC z różnych gatunków krętka *Borrelia*, których sekwencje kodujące zgromadziłam w trakcie wcześniejszych badań. Jak wspomniałam wcześniej, białka OspC cechuje ogromna zmienność sekwencji aminokwasowej, przy czym większość rejonów zmiennych położona jest na powierzchni cząsteczki. Celem porównania struktur różnych białek OspC jest odpowiedź na pytanie, czy istnieją strukturalne typy białek OspC i czy istnieje zależność pomiędzy tymi typami a specyficznością objawów infekcji czy powinowactwem do ligandów lub gatunku gospodarza. Ponadto we współpracy z Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego Solaris realizowane są prace mające na celu określenie struktury kompleksu OspC – fibrynogen za pomocą techniki cryo-EM. Dodatkowo planuję poszerzyć grupę obiektów badawczych o nowe białka krętka *Borrelia*, m.in. o słabo poznane białka z grupy mlp (multicopy lipoproteins). Wniosek o finansowanie tych badań został przeze mnie złożony w ramach konkursu OPUS 20 NCN.

Drugi temat badawczy jaki będę rozwijać w przyszłości dotyczy badań procesu samoorganizacji cząstek wirusopodobnych zbudowanych z białka płaszcza wirusa BMV. W ramach tego projektu została opracowana metodyka produkcji rekombinowanego białka płaszcza BMV w układzie bakteryjnym. Korzystając z danych literaturowych dotyczących innych wirusów ikozaedrycznych oraz metod biofizycznych dostępnych w kierowanej przeze mnie Pracowni (MST, BLI, DLS) opracowałam z moim zespołem warunki eksperymentalne w których dochodzi do składania cząstek wirusopodobnych zbudowanych z otrzymanego białka. Zaobserwowaliśmy, że proces ten zachodzi etapowo, z utworzeniem formy początkowej (ang. *nucleus*) w fazie nukleacji, podobnie jak ma to miejsce przy składaniu natywnych wirusów. Przebieg procesu można regulować za pomocą doboru stężenia białka jak również i warunków buforowych, pH i siły jonowej. Wyniki tych badań zostaną opublikowane w najbliższym czasie. Ponadto, przy współpracy z Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego Solaris trwają prace nad określeniem struktury pustych cząstek wirusopodobnych, jak również cząstek

zawierających rdzeń tRNA. Trwają też prace nad rozwiązaniem struktury krystalicznej formy *nucleus*. Długofalowym celem projektu jest poznanie uwarunkowań procesu samoorganizacji wirionu BMV i cząstek wirusopodobnych zbudowanych z rekombinowanego białka płaszcza BMV, w celu zastosowania ich do racjonalnego projektowania cząstek wirusopodobnych.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

7.1. Osiągnięcia dydaktyczne

W okresie od września 2015 do sierpnia 2019 byłam zatrudniona jako adiunkt na Politechnice Poznańskiej, na Wydziale Technologii Chemicznej, gdzie prowadziłam wykłady pt. „Podstawy Biotechnologii” oraz laboratoria pt. “Projekt Biotechnologiczny” dla studentów III i IV roku.

Ponadto sprawowałam/sprawuję opiekę naukową nad doktorantami, studentami i stażystami, jako:

- Promotor prac inżynierskich:
 - 1) Wojciech Nawrocki
Przygotowanie konstruktów do ekspresji białka w roślinie zawierających sekwencje pochodzenia wirusowego
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2012
 - 2) Tomasz Szymański
Badanie biogenezy satelitarnych RNA towarzyszących infekcji PSV
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2012
 - 3) Paulina Bierwagen
Optymalizacja metody oczyszczania wirusów BMV i RCNMV izolowanych z tkanek roślinnych
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2014
 - 4) Dawid Owsian
Przygotowanie wektorów służących do produkcji roślinnych rybonukleaz DCL1 i DCL2 w komórkach owadziach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2014
- Recenzent prac inżynierskich:
 - 1) Jakub Reiter
*Przygotowanie konstruktów genetycznych do heterologicznej ekspresji genu kodującego białko czerwonej fluorescencji w *Chlamydomonas reinhardtii**
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2014
- Promotor prac magisterskich:
 - 1) Tomasz Szymański
Badanie biogenezy satelitarnych RNA towarzyszących infekcji PSV
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2013
 - 2) Paulina Bierwagen
Otrzymywanie cząstek wirusopodobnych zbudowanych z białka płaszcza wirusa roślinnego
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2015
 - 3) Dawid Owsian
*Produkcja i charakterystyka zmutowanego białka OspA z *Borrelia burgdorferi**
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2015

- Recenzent prac magisterskich:
 - 1) Katarzyna Sowińska
Analiza wybranych mechanizmów regulacji translacji przez produkty niepełnej degradacji RNA
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2015
 - 2) Angelika Lis
Identyfikacja białek wiążących produkty niepełnej degradacji RNA powstające w ludzkich komórkach wątroby
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2015
 - 3) Joanna Marzena Matuszek
*Wybrane elementy analizy funkcjonalnej genu MtPDR23 – potencjalnego transportera strigolaktonów w *Medicago truncatula**
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2018

- Promotor pomocniczy w przewodach doktorskich:
 - 1) Aleksander Tworak,
*Otrzymywanie i charakterystyka białek typu Dicer pochodzących z modelowej rośliny bobowatej *Medicago truncatula**
IChB PAN Poznań, 2014
 - 2) Dominik Lewandowski
*Strukturalne i funkcjonalne uwarunkowania oddziaływań pomiędzy kleszczem a patogenną bakterią na przykładzie białek TROSPA z *Ixodes ricinus* i OspA z *Borrelia burgdorferi**
IChB PAN Poznań, 2016
 - 3) Aleksander Strugała
*Otrzymywanie i charakterystyka cząstek wirusopodobnych bazujących na wirusie mozaiki stokłosa (ang. *Brome Mosaic Virus – BMV*)*
IChB PAN, **przewód doktorski w toku**
 - 4) Paulina Bierwagen
*Strukturalne i funkcjonalne badania białek kluczowych dla oddziaływań pomiędzy kleszczem, ssakiem i patogenem na przykładzie białka OspC z krętka *Borrelia* i jego ligandów*
IChB PAN, **przewód doktorski w toku**

- Opiekun naukowy:
 - 1) Maciej Langa, Politechnika Poznańska, staż studencki, 2016
 - 2) Konrad Maćkowiak, Politechnika Poznańska, staż studencki, 2016
 - 3) Karolina Zaworska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, staż studencki, 2018
 - 4) Jakub Szydłowski, I Liceum Ogólnokształcące Fundacji Społecznej EKOS w Swarzędzu, staż w ramach konkursu „Biesiady z myślą”, 2019

7.2. Osiągnięcia organizacyjne

7.2.1. Kierowanie projektami finansowanymi ze źródeł zewnętrznych

1) *Opracowanie szczepionki chroniącej zwierzęta przed boreliozą*

MNiSW, nr projektu N N302 041536

14.05.2009 – 14.05.2003, IChB PAN

Pełniona funkcja: **kierownik projektu**

2) ***Ochrona patentowa szczepionki przeciw boreliozie***

OPI, nr umowy WNP_POIG. 01.03.02-00-037

01.10.2012 – 30.06.2015, IChB PAN

Pełniona funkcja: **kierownik projektu**

3) ***Structural Biology of plants and microbes***

Program Międzynarodowe Projekty Doktoranckie (MPD) finansowany przez FNP, koordynowany przez prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego

01.09.2008 – 31.08.2015, IChB PAN

Pełniona funkcja: **sekretarz naukowy projektu**

4) ***Rozbudowa infrastruktury naukowo-badawczej Pracowni Inżynierii Białek działającej w pionie genomiki strukturalnej ECBiG o urządzenia pozwalające na strukturalną i fizykochemiczną charakterystykę oddziaływań zachodzących pomiędzy biomolekułami***

MNiSW, Przyznanie środków finansowych na rozbudowę aparatury naukowo-badawczej stanowiącej strategiczną infrastrukturę badawczą na lata 2019 – 2020

01.01.2019 – 31.12.2020, IChB PAN

Pełniona funkcja: **koordynator projektu**

7.2.3. Organizacja szkoleń i kursów dla środowiska naukowego

1) Warsztaty nt. zastosowania systemu Octet K2 firmy ForteBio do badań oddziaływań międzycząsteczkowych

16 – 18.05.2018, IChB PAN, Poznań

08 – 09.10.2019, IChB PAN, Poznań

2) Warsztaty nt. zastosowania systemów Tycho i Monolith firmy Nanotemper w badaniach jakości preparatów białkowych i oddziaływań międzycząsteczkowych

18.09.2018, IChB PAN, Poznań

3) Warsztaty nt. zastosowania systemu chromatografii wykluczania OMNISEC firmy Malvern wyposażonego w detektory: stężeniowy RI, UV-PDA, RALS/LALS wiskozymetryczny i 20-kątowy detektor MALS w badaniach jakości preparatów białkowych

01 – 04.10.2019, IChB PAN, Poznań

4) Warsztaty nt. zastosowania systemu XtaLAB Synergy-S firmy Rigaku w badaniach strukturalnych makrocząsteczek i małych cząsteczek

01 – 02.07.2020, IChB PAN, Poznań

7.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

1) Organizacja warsztatów dla dzieci, laureatów VIII Ogólnopolskiego Konkursu Plastycznego konkursu "Bezpiecznie na Wsi" organizowanego przez KRUS i PIP pod honorowym patronatem

Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi

23.05.2018, IChB PAN, Poznań

