



Warszawa, 6.11.2024

dr hab. Elżbieta Nowak  
Laboratorium Struktury Białka  
Międzynarodowy Instytut Biologii  
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie  
e-mail: enowak@iimcb.gov.pl  
tel.: (+48) 22 5970721

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Bierwagen**

Przedmiotem recenzji jest praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Bierwagen zatytułowana „**Strukturalne i funkcjonalne badania białek kluczowych dla oddziaływań pomiędzy kleszczem, ssakiem i patogenem na przykładzie białka OspC z krętka *Borrelia***”. Praca ta została wykonana w Pracowni Inżynierii Białek w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN pod kierunkiem dr hab. Anny Urbanowicz.

Tematyka badawcza przedstawionej pracy doktorskiej dotyczy zagadnienia, które jest interesujące nie tylko z naukowego punktu widzenia, lecz również z uwagi na lepsze poznanie mechanizmów patogenyzy boreliozy i potencjalnie opracowanie skuteczniejszych sposobów walki z chorobami odkleszczowymi. Za ich występowanie odpowiedzialne są głównie bakterie z rodzaju *Borrelia*, w tym krętka *Borrelia burgdorferi*, powodujące wieloukładową chorobę zapalną – boreliozę (choroba z Lyme). Z uwagi na zwiększającą się liczbę zachorowań na boreliozę na terenach endemicznych, zagadnienie, którego dotyczy niniejsza rozprawa, ma szczególne znaczenie. Ponieważ choroba ta jest wywoływana przez różne gatunki krętków z rodzaju *Borrelia*, utrudniona jest zarówno jej diagnostyka, jak i późniejsza terapia, dlatego istotnym jest lepsze poznanie elementów strukturalnych patogenu, które mogłyby stać się celem terapeutycznym, np. białek powierzchniowych. Ich ekspozycja umożliwia rozpoznanie przez komórki układu odpornościowego żywiciela, ale także stanowi dogodny cel, między innymi dla związków małocząsteczkowych, których zwiążanie mogłoby wpłynąć na zredukowanie patogenności bakterii. Obiektem zainteresowania Doktorantki jest lipoproteina OspC - białko powierzchniowe, kluczowe m.in. we wczesnych etapach infekcji, gdy krętka z rodzaju *Borrelia* rozprzestrzeniają się w krwiobiegu żywiciela.

Doktorantka przedstawiła swoją rozprawę doktorską w formie klasycznej. 190 stron tekstu zawiera część literaturową, cel pracy, wykaz stosowanych materiałów i metod, wyniki badań własnych oraz dyskusję. Wstęp oraz dyskusja wyników oparte są na 172 pozycjach literaturowych. Pracę wzbogaca 35 rysunków oraz 34 tabele, a dodatkowo na końcu opracowania Autorka zamieściła

podsumowanie, streszczenie pracy w j. polskim i angielskim, wykaz cytowanych publikacji, a także spis rycin i tabel.

Wstęp, od którego rozpoczyna się praca został przedstawiony bardzo klarownie i starannie z uwzględnieniem najważniejszych zagadnień niezbędnych do zapoznania czytelnika z podjętą tematyką badawczą. Doktorantka opisuje stan wiedzy dotyczący boreliozy, przedstawia zagadnienia związane z wektorem patogenu, jak również z białkami powierzchniowymi OspC, wprowadzając tym samym czytelnika do kolejnych części rozprawy doktorskiej jakim są badania własne.

Po tym wprowadzeniu mgr Bierwagen sformułowała cel swojej pracy, który określiła jako poszerzenie wiedzy na temat białek OspC pochodzących z różnych gatunków krętków *Borrelia* oraz ustalenia ich roli w oddziaływaniach z czynnikami wektora oraz żywiciela. Aby zrealizować zamierzony cel Doktorantka sformułowała zadania szczegółowe, w których zaplanowała uzyskanie rekombinowanych białek OspC, produkcję ligandów OspC (homologi białka Salp15 z *I. scapularis*) oraz wykonanie badań mających określić oddziaływanie białko-ligand z uwzględnieniem badań strukturalnych.

Część pracy opisująca stosowane materiały i metody została opracowana bardzo dokładnie, umożliwiając ocenę jakości badań i ewentualne ich powtórzenie. Dobór stosowanych metod do założonego celu jest właściwy. Doktorantka opisuje w szczegółowy sposób otrzymanie konstruktów ekspresyjnych badanych białek, produkcję i procedurę oczyszczania makromolekuł, a także opisuje techniki wykorzystane do zbadania oddziaływań pomiędzy białkami OspC a wybranymi ligandami. W większości opisy te nie budzą moich zastrzeżeń, jednakże Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych błędów, które zakładam są natury edytorskiej. Przykładowo:

- Strona 48: objętości składników buforu ekstrakcyjnego nie sumują się do 1000 ml.
- Strona 48: bufor dializacyjny 2,5% M glicerol.
- Strona 52: wydaje mi się, że wkradła się tu pewna nieścisłość dotycząca stężenia antybiotyków: "...dodawano odpowiedni antybiotyk do stężenia końcowego 100 µg/ml", podczas gdy we wcześniejszym tekście mowa jest o stężeniach 100 µg/ml dla ampicyliny i 50 µg/ml dla kanamycyny.
- Strona 53: podane wartości objętości użytych do przygotowania 8 ml żelu zagęszczającego są niewłaściwe.
- Pomiar stężenia preparatów DNA czy białkowych dokonywany był przez pomiar absorbancji światła przy odpowiedniej długości fali. Doktorantka używa zamiennie absorbancji i absorbcji, co nie jest prawidłowe.

Część pracy przedstawiająca wyniki i dyskusję badań jest dość obszerna. W moim odczuciu część rezultatów, jak np. wyniki sekwencjonowania plazmidów czy sekwencje badanych białek można było zamieścić w suplementie. Doktorantka wykonała szereg eksperymentów z zakresu biologii molekularnej, strukturalnej oraz biofizyki. Rezultaty tych doświadczeń moim zdaniem mogłyby zostać przedstawione z większą dbałością.

Wyniki badań opisujące interakcje białka OspC z ludzkim fibrynogenem zostały opublikowane w 2019 r. w *FEBS Journal*. Doktorantka jest autorem wiodącym tego artykułu. Warto zaznaczyć, że praca ta została uhonorowana nagrodą prof. Kazimierza Bassalika przyznawaną za najlepsze prace mikrobiologiczne wykonane w polskich laboratoriach przez Komitet Biologii Molekularnej PAN. Druga część wyników zaprezentowana w dysertacji dotycząca oddziaływań białek OspC z ligandami produkowanymi przez gruczoły ślinowe kleszcza *Ixodes ricinus* – Iric1, Iric2, Iric3 również została opublikowana w 2020 r w *Ticks Tick Borne Dis*. Również w tej publikacji mgr Bierwagen jest pierwszym autorem.

Warto podkreślić, że Doktorantka podjęła próby otrzymania kryształów kompleksów OspC-Iric1, jednak napotkała na szereg problemów związanych z krystalizacją, co dla mnie, jako krystalografa, jest w pełni zrozumiałe; proces krystalizacji niestety w dużej mierze jest nieprzewidywalny.

Czytając tę część pracy nasunęło mi się kilka uwag i komentarzy, które przedstawiam poniżej:

- Większość prezentowanych w pracy żeli, zarówno agarozowych jak i poliakrylamidowych, nie ma opisanych standardów mas cząsteczkowych.
- Rezultaty badań wykonane metodą termoforezy mikroskalowej (MST) przedstawione na rysunkach 4.27, 4.29, 4.30 i 4.31 nie mają zmienionych na j. polski opisów wykresów. Ponadto nie ma jednostek określających stężenie ligandu na rysunku 4.29 oraz 4.30.
- W opisie rezultatów uzyskanych przy wykorzystaniu metody niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS), Doktorantka zaznacza, iż były wykonane pomiary dla samego białka OspC oraz fibrynogenu. Wyniki te nie są jednak zawarte w pracy. Proszę by zostały one przedstawione i omówione podczas prezentacji. Ponadto Autorka używa nazwy metody SAXS jako małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego, podczas gdy prawidłowym określeniem jest rozpraszanie niskokątowe.
- Czy w przypadku kompleksu OspC-fibrynogen Doktorantka brała pod uwagę wykonanie badań strukturalnych z zastosowaniem mikroskopii krioelektronowej? Kompleks ten wydaje się idealnym kandydatem do tego typu badań, a w przypadku ich powodzenia, charakter oddziaływań pomiędzy białkami mógłby zostać opisany bardziej szczegółowo.
- Niezrozumiałym dla mnie jest, dlaczego Doktorantka mimo uzyskania kryształów rozpraszających promieniowanie X i później struktur białek OspC nie opisała ich w swojej pracy doktorskiej? Proszę o krótkie przedstawienie tej części rezultatów podczas prezentacji.
- Doktorantka w dyskusji pisze o wysokim stopniu podobieństwa uzyskanych w ramach pracy struktur krystalicznych (PDB ID: 7NEN i 7BML) oraz struktury krystalicznej białka OspC (PDB ID: 1GGQ). Jakie jest RMSD pomiędzy nimi?
- Doktorantka w swojej pracy używa określenia struktura krystalograficzna zamiast struktura krystaliczna.
- Doceniam, że Doktorantce udało się opracować metodę otrzymywania białek Iric 1-3 w systemie bakteryjnym, ale jak sama wspomina białka eukariotyczne produkowane w bakteriach

nie są modyfikowane potranslacyjnie, np. poprzez glikozylację. Czy takie modyfikacje obserwuje się dla homologów Salp15 i czy mogłyby one mieć znaczenie dla oddziaływań z białkami OspC? Czy Doktorantka rozważała użycie innego systemu ekspresyjnego do produkcji tych białek, np. w komórkach owadzych lub ludzkich?

Powyższe uwagi i komentarze nie powinny przesłonić najważniejszych osiągnięć mgr inż. Pauliny Bierwagen, które niewątpliwie zawierają elementy nowości naukowej. A mianowicie:

1. Opracowanie wydajnych metod ekspresji białek OspC
2. Wykazanie wysokiego powinowactwa białek OspC do homologów białka Salp15, Iric1, Iric2, Iric3, o czym świadczą wyznaczone stałe dysocjacji metodą MST na poziomie nanomolarnym.
3. Potwierdzenie wiązania ludzkiego fibrynogenu przez białka OspC z różnych gatunków *Borrelia* w badaniach *in vitro*.
4. Określenie składu kompleksu OspC-fibrynogen, w którym dimer lipoproteiny wiąże dwa dimery fibrynogenu oraz zaproponowanie modelu struktury powyższego kompleksu.

Podsumowując: uzyskane wyniki oceniam pozytywnie, podkreślając, że badania Doktorantki, mające na celu zrozumienie struktury i funkcji lipoproteiny OspC, mają zasadnicze znaczenie dla postępu badań nad boreliozą i opracowania skutecznych środków terapeutycznych lub zapobiegawczych. Wkład wniesiony przez Doktorantkę i zespół badawczy, w którym pracowała został doceniony przez przyznanie prestiżowej nagrody prof. K. Bassalika.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Bierwagen do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Nowak