



Wrocław, 31.07.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Borkowskiej pod tytułem
"Oddziaływanie pomiędzy peptydem fuzyjnym a domeną transbłonową
hemaglutyniny" zrealizowanej w Pracowni Biofizyki Komórki
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
pod kierunkiem Promotora dr. hab. Remigiusza Worchy**

Hemaglutynina (HA) jest głównym antygenem powierzchniowym wirusa grypy, który wiąże się z receptorami umożliwiając bezpośrednie interakcje wirusa z błoną komórkową, co w dalszej kolejności zapoczątkowuje endocytozę. W endosomie, wskutek zakwaszenia środowiska, dochodzi do zmian konformacyjnych HA i fuzji błony endosomalnej z otoczką wirusa. To właśnie ostatni z wymienionych procesów jest kluczowy dla skutecznej infekcji, dlatego od wielu lat jest on przedmiotem bardzo intensywnych badań. Siłą napędową tych badań jest nie tylko chęć zrozumienia bardzo interesującego zjawiska biologicznego, ale także próba otwarcia nowych perspektyw terapeutycznych. Dotychczas nie opracowano żadnej komercyjnie dostępnej strategii terapeutycznej wykorzystującej HA jako cel działania lub zapobiegającej przedostawaniu się wirusa do komórek gospodarza, co pozwoliłoby na zahamowanie infekcji na jej początkowym etapie. W ogromnej mierze jest to następstwem trudności technicznych w badaniach bardzo dynamicznego procesu biologicznego, w którym zmiany konformacyjne integralnych białek błonowych są sprzężone czasowo i przestrzennie z gwałtownymi zmianami strukturalnymi dwuwarstwy lipidowej. Chociaż przegląd dostępnej literatury naukowej wskazuje na duży postęp w poznawaniu ważnych szczegółów fuzji błon jako wczesnego etapu infekcji, to jednak zarówno w przypadku wirusa grypy jak i innych wirusów kompletny obraz całości tego procesu wciąż nie został uzyskany.

Potrzeba zmiany takiego stanu rzeczy stała się fundamentem przedstawionej do recenzji dysertacji naukowej. Jej Autorka podjęła się niełatwego zadania polegającego na zbadaniu funkcjonalnych zależności dwóch fragmentów HA, mianowicie peptydu fuzyjnego (FP) i domeny przezbłonowej (TMD), które zostały już wcześniej zidentyfikowane jako kluczowe odpowiednio w fuzji błon lipidowych i zakotwiczeniu białka w dwuwarstwie lipidowej. W tym celu posłużyła się zarówno syntetycznymi peptydami odpowiadającymi wspomnianym fragmentom jak i pełnej długości HA w modelowych układach błonowych o uproszczonym



składzie lipidowym. Biofizyczne scharakteryzowanie aktywności tych białek i peptydów w dwuwarstwach lipidowych było możliwe dzięki właściwie dobranym technikom spektroskopii fluorescencyjnej a także zaawansowanej mikroskopii czasów życia fluorescencji (FLIM), także w połączeniu z fluorescencyjnym rezonansem przeniesienia energii (FRET-FLIM). Założenia i cele pracy są trafnie sformułowane i wynikają z faktu, że rola TMD w procesie fuzji wymaga dogłębnego oszacowania w perspektywie niejednoznacznych danych literaturowych. Te ostatnie wskazują, że do pełnej fuzji otoczki wirusa z błoną endosomalną oprócz FP wymagana jest obecność TMD, jednak charakter interakcji FP i TMD pozostaje kwestią sporną. W tym miejscu należy zaznaczyć, że opisywane w pracy doktorskiej podejścia eksperymentalne pozwalają na badania wzajemnych zależności funkcjonalnych pomiędzy FP a TMD, a nie bezpośrednich oddziaływań pomiędzy nimi. Z tego względu tytuł pracy oraz niektóre frazy w tekście mogą być odbierane jako nieco mylące i nieprecyzyjne. Nie obniża to jednak wartości merytorycznej całości, a bardzo dobra orientacja Autorki w tematyce w połączeniu z rzetelnością naukową pozwoliły uzyskać interesujące i oryginalne wyniki, które istotnie przyczyniają się do uzupełnienia obrazu wspomnianych procesów biologicznych na poziomie molekularnym.

Doktorantka przedstawiła meritum zrealizowanego przez siebie projektu naukowego w postaci zwięzłego opracowania o klasycznym układzie rozprawy doktorskiej. Niemniej, godnym podkreślenia jest fakt, iż część przedstawionych w pracy wyników została już opublikowana na łamach międzynarodowego czasopisma naukowego o wysokim współczynniku oddziaływania IF (Worch, R., Dudek, A., Borkowska, P., & Setny, P. International Journal of Molecular Sciences, DOI: 10.3390/ijms22105301), chociaż większość uzyskanych danych jest w końcowej fazie opracowywania i została opublikowana w formie tzw. preprintu. Te dwie pozycje literaturowe stanowią tylko część dorobku publikacyjnego Doktorantki, który obejmuje jeszcze dwa artykuły w czasopismach o wysokim lub bardzo wysokim IF oraz artykuł popularnonaukowy z 2024 roku, który jest ściśle związany z tematyką pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska przygotowana jest w języku polskim, a jej treść obejmująca niemal 100 stron (nie wliczając spisu literatury i załączników) została podzielona na sześć głównych rozdziałów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Całość opatrzona jest także listą skrótów, bibliografią obejmującą w sumie aż 231 pozycji oraz załącznikami w postaci ryciny, tabeli i spisu osiągnięć naukowych Autorki. Treść ułożona jest na ogół w



sposób logiczny i konsekwentny, a każdy rozdział stanowi kompletną jednostkę. Pierwszy rozdział to wstęp literaturowy, w którym w sposób rzeczowy i stosunkowo zwięzły przedstawiono nie tylko dotychczas zdeponowaną wiedzę na temat wirusa grypy i indukowanej przez niego fuzji błon, ale także podstawy wybranych metod badawczych używanych do testowania założonych w pracy hipotez. Warto podkreślić, że wstęp jest przygotowany w sposób przystępny i atrakcyjny, a wrażenie to jest potęgowane odpowiednim doborem rycin. Z drugiej strony, utrzymanie tej części dysertacji w lakonicznej formie skutkuje powstaniem pewnych drobnych luk i nieścisłości. Przykładowo, w rozdziale 1.3.1 zabrakło rozwinięcia wątku asymetrii błon komórkowych, chociaż zjawisko to może mieć kapitalne znaczenie w procesach odkształcania i fuzji błon podczas infekcji wirusem grypy (por. Halder i wsp. 2020, DOI: 10.1128/jvi.01982-20; Klotz i Stegmann 1996, DOI: 10.1074/jbc.271.5.2383). Nieprecyzyjny jest także sposób definiowania krzywizny błony. W pracy zagadnienie to prezentowane jest z perspektywy monowarstw lipidowych (s. 21 oraz ryc. 6), podczas gdy w przypadku dwuwarstwowych błon komórkowych pojęcie krzywizny ma charakter względny, dlatego wymaga doprecyzowania (np. Cail i Drubin 2023, DOI: 10.1016/j.tcb.2022.09.004; Jarsch i wsp. 2016, DOI: 10.1083/jcb.201604003). Sformułowanie sugerujące, że TMD wpływa na skład lipidowy błony (s. 31) także wymagałoby wyjaśnienia, szczególnie w kontekście całego rozdziału 1.5. Wspomniane nieścisłości nie mają jednak charakteru błędów merytorycznych, a tym samym nie wpływają znacząco na pozytywny odbiór tej części pracy.

Bardzo dobrym posunięciem jest przedstawienie celów pracy w postaci osobnego rozdziału. Autorka w odpowiedni sposób przedstawia tok myślowy prowadzący do zbudowania hipotezy badawczej oraz definiuje ścieżkę jej weryfikacji za pomocą celów szczegółowych. Kolejnych piętnaście stron zawiera opis materiałów i metod wykorzystanych do osiągnięcia tych celów. Na ogół ta część pracy przygotowana jest w sposób jednoznaczny i logiczny, z zachowaniem dbałości o szczegóły niezbędne do zagwarantowania całkowitej odtwarzalności opisywanych eksperymentów. Podobnie jak we wstępie bardzo pomocne w tym kontekście są informatywne tabele oraz rycina. Jedynie kilka elementów wymagałoby dodatkowych uściśleń. Przede wszystkim w wielu miejscach brakuje danych dotyczących temperatury, m.in. przechowywania pęcherzyków LUV i SUV (r. 3.3.2 i 3.3.3), inkubacji przy formowaniu SLB (r. 3.3.4) i obserwacji wycieku fluoroforu z pęcherzyków (r. 3.4.4 i 3.4.5). Brakuje także informacji na temat długości łańcucha glikolu polietylenowego w lipidzie PEG PE jak również struktury łańcuchów acylowych tego



lipidu oraz niektórych fluorescencyjnych analogów lipidowych. Nie jest jasne dlaczego zrezygnowano z operowania wartością indeksu polidispersyjności (PDI) przy pomiarach wielkości liposomów i cząsteczek wirusopodobnych metodą dynamicznego rozpraszania światła, co utrudnia bardziej obiektywną ocenę stopnia homogenności zawiesin i tym samym wpływu cząstek na przebieg eksperymentów z ich udziałem.

Centralnym punktem rozprawy jest rozdział czwarty poświęcony przedstawieniu uzyskanych przez Autorkę wyników. Badania, które przeprowadziła mgr Paulina Borkowska w ramach realizacji projektu doktorskiego zaowocowały wygenerowaniem danych o dużej wartości poznawczej, a całość jest dobrym przykładem właściwego ukierunkowania prac w kontekście badań z wykorzystaniem modeli błonowych. Przeprowadzone testy wbudowywania peptydów reprezentujących TMD w błonę pęcherzyków jednoznacznie wskazały na oddziaływania tych peptydów z dwuwarstwą lipidową, chociaż topologia ich kotwiczenia w błonie nie została jednoznacznie określona (szczególnie w przypadku wydłużonych wersji peptydów), co jest skutkiem niedoskonałości metody opartej o wygaszanie fluorescencji reszt aminokwasowych W lub Y. Rozwiązaniem byłoby zastosowanie do tego celu alternatywnych metod (np. opartych o wygaszanie sond spinowych wprowadzanych w sposób ukierunkowany do peptydów, por. Hervis i wsp. 2019, DOI: 10.1016/j.jsb.2019.07.008), jednak podejścia tego typu są trudne i czasochłonne, dlatego wykraczają poza ramy omawianego projektu doktorskiego. W dalszej kolejności Doktorantka przedstawia wyniki testów indukowania przez badane peptydy wycieku barwnika fluorescencyjnego z liposomów. Proste metodologicznie, a jednocześnie skuteczne podejście pozwoliło na stwierdzenie, że badane peptydy TMD nie naruszają integralności dwuwarstw lipidowych i nie wzmagają aktywności peptydów FP w tym zakresie. Podobną inercję peptydów TMD, także w obecności peptydów FP, wykazano w testach indukcji hemifuzji pęcherzyków lipidowych. W tym kontekście uzasadniona wydaje się rezygnacja z testowania potencjalnego indukowania procesu pełnej fuzji pęcherzyków. W zamian Autorka podjęła się oceny wpływu badanych peptydów na stopień uporządkowania błon za pomocą techniki mikroskopowego obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM). W tych eksperymentach także nie stwierdzono synergistycznego wpływu peptydów TMD na aktywność peptydu FP. Z drugiej strony, diametralne różnice w aktywności TMD pochodzących z dwóch różnych podtypów HA (H1 i H3) względem dwuwarstw lipidowych bez cholesterolu oraz brak efektu w przypadku błon zawierających ten steryd są niezwykle interesujące, chociaż do wyciągnięcia jednoznacznych konkluzji potrzeba dalszych badań z użyciem błon o różnym składzie lipidowym zawierających różne



fluorofory wrażliwe na stopień uporządkowania. Tego typu eksperymenty mogłyby być przedmiotem osobnego projektu, jednak w ramach ocenianej pracy pomocne w interpretacji byłoby bardziej systematyczne i ujednolicone prezentowanie wyników (np. podanie wartości średniego czasu życia fluorescencji i wartości dla poszczególnych składowych, por. ryc. 31 i 32) i odniesienie ich do danych literaturowych (np. wartości składowych i średnich czasów życia dla sondy C6-NBD-PE w błonach modelowych podane w poz. lit. [134] i [185]). W ostatnim etapie Doktorantka postanowiła zbadać funkcję fragmentu TMD w kontekście pełnego białka HA z wykorzystaniem cząstek wirusopodobnych (VLP). Ostatnie z wymienionych były przygotowywane przez współpracowników, natomiast Doktorantka podjęła się optymalizacji przygotowywania dwuwarstw lipidowych na podłożu (SLB) oraz ich charakterystyki metodami obrazowania konfokalnego oraz spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Zaskakującą obserwacją są niehomogenności przygotowywanych błon, chociaż wartości współczynnika dyfuzji fluorescencyjnego analogu lipidowego w rejonach większej intensywności sygnału jest na wskroś zgodna z danymi literaturowymi. SLB były wykorzystane do oceny aktywności fuzyjnej cząstek VLP z wykorzystaniem techniki FRET-FLIM. Chociaż uzyskane w tym eksperymencie dane nie wykluczają wpływu TMD na aktywność fuzyjną całego białka HA, to jednak Doktorantka nie uzyskała jednoznacznej wskazówki na temat roli TMD w tej aktywności ani na zależność wydajności fuzji od podtypu, do którego należy TMD. Wątpliwości budzą jednak pewne aspekty techniczne tego eksperymentu i nie do końca zrozumiała rola barwnika fluorescencyjnego Atto 488 (s. 83) w kontekście informacji zawartej w r. 3.5.3. Czy wykorzystywany układ donor-akceptor nie powinien składać się z pary NBD-PE i Rh-PE? Jeśli tak to jak interpretować stosunkowo krótkie czasy życia donora w porównaniu do danych literaturowych (por. [134])? Jak wskazano powyżej, w kilku przypadkach wciąż istnieje pole do zwiększenia przejrzystości wyników i dodatkowego wzmocnienia siły ich przekazu, chociaż na ogół zaproponowane i zrealizowane przez Doktorantkę eksperymenty pozwalają zachować umiarkowaną ufność względem obranej kierunkowości interpretacji. Co więcej, w kilku miejscach tekst rozdziału wymagałby dodatkowego komentarza bądź sprostowania. Przykładowo, czy rzeczywiście zastosowanie liposomów SUV o wskazanym na ryc. 15 stosunkowo szerokiej dystrybucji wielkości cząstek „[...] pozwoliło na całkowitą redukcję rozpraszania światła [...]” (s.60) w zakresie pośredniego ultrafioletu? Jaki był stosunek FP:TMD w poszczególnych eksperymentach? Czy podawane pod rycinami stosunki peptyd:lipid są stosunkami wagowymi czy molowymi? Jaki był stosunek białko:lipid w przypadku VLP? Czy „brak mobilności” w niektórych regionach błon SLB wynika z rzeczywistej immobilizacji



fluoroforów czy raczej może wynikać ze zmniejszonej intensywności fluorescencji uniemożliwiającej wykonanie pomiaru FCS?

Zaproponowane przez mgr Paulinę Borkowską podejście eksperymentalne oraz wygenerowany przez nią zestaw danych miał przede wszystkim posłużyć do poszerzenia wiedzy na temat synergizmu funkcjonalnego pomiędzy dwoma rejonami wirusowego białka HA: domeny przezbłonowej (TMD) i peptydu fuzyjnego (FP). W rozdziale 5 Doktorantka w sposób systematyczny konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi. Chociaż w toku dyskusji wyłania się kilka istotnych kontradykcji utrudniających wyciągnięcie jednoznacznych wniosków, wyniki opisane w pracy z pewnością posiadają potencjał by wpłynąć na ścieżki dalszej eksploracji tego obszaru badawczego. Ta część dysertacji napisana została ciekawie i stanowi dobre podbudowanie całego prezentowanego osiągnięcia. Z drugiej strony, brakuje tu nieco bardziej krytycznego podejścia do oceny jednoznaczności prezentowanych wyników w kontekście niedoskonałości podejść metodologicznych oraz oczywistych uproszczeń wykorzystywanych modeli badawczych względem naturalnych układów biologicznych. Szczególnie istotną kwestią do przedyskutowania jest charakter obserwowanych przez Doktorantkę interakcji TMD i FP, gdyż w przeciwieństwie do niektórych źródeł literaturowych (np. [29]) w recenzowanej pracy brakuje danych potwierdzających bezpośrednie oddziaływanie tych dwóch fragmentów białka HA.

Dysertacja zwięzła jest syntetycznym przedstawieniem najważniejszych osiągnięć i wniosków wpływających z uzyskanych wyników. Ta część utwierdza w przekonaniu, że dokonania Doktorantki, choć nie przyniosły potwierdzenia założonej hipotezy, mają istotny wpływ na rozwój reprezentowanej dziedziny naukowej i mogą być dobrym wyznacznikiem kierunku przyszłych badań. Podsumowując trzy ostatnie rozdziały pracy warto jeszcze raz podkreślić, że ich konstrukcja logiczna jest spójna i pozwala na bardzo dobrą ocenę wagi poczynionych obserwacji, co w dużym stopniu jest zasługą nie tylko poprawności wyводу naukowego, ale także prawidłowo opracowanych danych prezentowanych w formie ilustracji i tabel. Niemniej, pojawia się kilka opisanych poniżej kwestii, które w opinii recenzenta godne są bardziej dogłębnej dyskusji.

1. Czy z perspektywy doniesień literaturowych wskazujących na silną zależność aktywności fuzyjnej fragmentu FP od jego struktury drugorzędowej (co opisano na s.25), należy się spodziewać podobnych zależności dla fragmentów TMD? Jaką strukturę



przyjmują wykorzystywane w pracy peptydy TMD? Czy ich wydłużenie (do tzw. wersji „long”) może wpływać na ich strukturę drugorzędową?

2. W przedstawionych badaniach posługiwano się syntetycznymi peptydami reprezentującymi FP i TMD oraz ich mutantami, a wszystkie te peptydy były pozbawione potencjalnych modyfikacji potranslacyjnych. Jednak istnieją przesłanki literaturowe (opisane na s. 33) wskazujące na ważną rolę S-acylacji HA w modulacji interakcji tego białka z błonami i domenami błonowymi. Czy w obrębie badanych peptydów (szczególnie w przypadku bogatych w reszty C peptydów H3) można się spodziewać miejsc acylacji (np. palmitylacji) lub innych modyfikacji potranslacyjnych? Czy takie potencjalne modyfikacje mogłyby wystąpić w białkach zawartych w cząsteczkach wirusopodobnych izolowanych z materiału roślinnego?

3. Czy zaobserwowany przez Doktorantkę sposób interakcji z błoną i brak synergizmu funkcjonalnego pomiędzy FP i TMD może, przynajmniej częściowo, wynikać ze specyficznego składu lipidowego zastosowanych w badaniach modelowych systemów błonowych? Naturalne błony komórkowe wzbogacone są lipidami o ujemnym wypadkowym ładunku, a niektóre (np. opisywane na s. 91) dane literaturowe uzyskane na modelach błonowych zawierających takie lipidy, m.in. fosfatydyloglicerol, wskazują na przeciwny do obserwowanego przez Doktorantkę wpływ peptydów H3 na uporządkowanie błony.

W ujęciu formalnym praca wywiera na ogół pozytywne wrażenie zarówno pod względem stylu wypowiedzi, poprawności gramatycznej i merytorycznej jak i formatowania oraz edycji tekstu, tabel oraz rycin. Stosunkowo nielicznie występują błędy typograficzne (np. źle rozlokowane odstępki na s. 14, 34 i 59; zbędne „P” oraz niepełne nazwisko w odnośniku literaturowym na s.27; błąd w nazwie fluoroforu na s. 53; błędne oznaczenie parametru na s. 72; błędny rok w odnośniku literaturowym na s. 92, itp.), gramatyczne (np. pierwsze zdanie na s.18; ostatnie zdanie na s.22; drugie zdanie pierwszego akapitu na s. 33, itp.) oraz edytorskie (np. anglojęzyczna zawartość ryc. 4 i 12; zwroty łacińskie (np. *in vitro*, *in vivo*) nie zapisane kursywą; brak jednolitości w oznaczeniach reszt aminokwasowych – jednoliterowe (np. s. 32) vs trzyliterowe (np. s. 59); niekompletny wykaz skrótów, który nie zawiera rozwinięcia m.in. NBD, Rh, PE, PEG, DMPC, DMPG, itd.). Z drugiej strony w tekście pojawiają się frazy i sformułowania, które lokują się na granicy błędu merytorycznego. Przykładowo, enzymy restrykcyjne nie są w stanie przeprowadzić reakcji cięcia, o której mowa na s.27. Z kolei acetylacja to specyficzny typ modyfikacji potranslacyjnych białek określanych bardziej ogólnie jako acylacja, do których zalicza się



palmitylację jako jedną z kluczowych modyfikacji białka HA (wg. poz. lit. [128] oraz Naim i wsp. 1992, DOI: 10.1128/JVI.66.12.7585-7588.1992). Choć niektóre z nich nieco utrudniają odbiór całości, nie ma potrzeby by bardziej szczegółowo omawiać je w niniejszej recenzji. Tym samym pragnę podkreślić, że wszelkie wspomniane niedociągnięcia nie mają większego wpływu na pozytywny odbiór pracy, która z pewnością stanowi dopracowaną całość o niebagatelnych walorach naukowych.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Borkowskiej spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). Jak wykazano powyżej, rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz poświadcza nabycie przez Doktorantkę ogólnej wiedzy teoretycznej w reprezentowanej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę moją jednoznacznie pozytywną ocenę wnoszę o dopuszczenie mgr Pauliny Borkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

prof. dr hab. Aleksander Czogalla

Kierownik Zakładu Cytobiochemii,

tel. +48 71 375 63 56, e-mail: aleksander.czogalla@uwr.edu.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 12 września 2025

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biofizyki

Dr hab. Anna Wiśniewska-Becker, prof. UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Pauliny Borkowskiej

pt. „Oddziaływanie pomiędzy peptydem fuzyjnym a domeną transbłonową hemaglutyniny”

Tematyka rozprawy

Mimo postępów współczesnej medycyny choroby wirusowe wciąż stanowią poważne zagrożenie dla ludzkości, o czym niedawno mieliśmy okazję się przekonać w związku z wybuchem pandemii COVID-19. Grypa zwykle nie ma aż tak dramatycznego przebiegu, ale jest chorobą powszechną występującą nie tylko wśród ludzi, ale też innych gatunków, w tym ptaków, świń czy koni. W tym kontekście nie dziwi duże zainteresowanie badaczy różnych specjalności wywołującym tę chorobę wirusem. Poznanie szczegółowych mechanizmów jego działania stanowi wyzwanie nie tylko dla wirusologów i biologów molekularnych, ale też biofizyków, którzy stosując zaawansowane biofizyczne techniki próbują zbadać podstawowe oddziaływania między makrocząsteczkami będącymi składowymi wirusa, lub ich fragmentami, i scharakteryzować ich aktywność w błonie. Właśnie takie badania przeprowadziła i opisała w swej pracy doktorskiej pani mgr Paulina Borkowska. Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Remigiusza Worchy w Pracowni Biofizyki Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, a głównym jej celem było zweryfikowanie możliwości oddziaływania w obrębie jednego z głównych białek otoczki wirusa grypy – hemaglutyniny (HA), pomiędzy jej fragmentem fuzyjnym (FP) a domeną transbłonową (TMD) oraz zbadanie jego roli w procesie fuzji wirusa z późnymi endosomami. Pani Borkowska przedstawiła następującą hipotezę badawczą: Domena transbłonowa oddziałuje z peptydem fuzyjnym hemaglutyniny w sposób synergiczny, co prowadzi do zwiększonej aktywności fuzyjnej peptydu fuzyjnego. By zrealizować cel pracy Doktorantka wykonała szereg eksperymentów stosując różne odmiany technik fluorescencyjnych, w tym FRET (rezonansowe przeniesienie energii Förstera, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*), FCS (spektroskopia korelacji fluorescencji, ang. *fluorescence correlation spectroscopy*), FLIM (obrazowanie czasów życia fluorescencji, ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*), czy FLIM-FRET. Uzyskane wyniki niestety nie potwierdziły zakładanej hipotezy, ponieważ nie zaobserwowano synergicznego oddziaływania między FP i TMD, które prowadziłoby do wzrostu aktywności

fuzyjnej FP. Udało się za to pokazać różnice w działaniu TMD z dwóch różnych grup filogenetycznych oraz wyciągnięto wnioski o wpływie TMD na aktywność fuzyjną hemaglutyniny poprzez oddziaływanie z lipidami.

Szczegółowa recenzja rozprawy obejmująca ocenę ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki, jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań, oraz oryginalności rozwiązania problemu naukowego

Praca doktorska pani mgr Borkowskiej ma formę typowej rozprawy, liczy 115 stron maszynopisu, zawiera 39 rysunków i 13 tabel. Dodatkowo, w Załączniku umieszczono jeden rysunek i jedną tabelę. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 231 pozycji. Tak duża liczba cytowanych pozycji świadczy o dobrej znajomości literatury naukowej przez Doktorantkę i jej odpowiednim przygotowaniu teoretycznym. O jej dobrej znajomości tematyki badawczej świadczy też liczący 28 stron Wstęp, w którym Doktorantka opisuje strukturę wirusa grypy, jego cykl replikacyjny oraz strukturę i funkcje białka wirusowego, które jest przedmiotem jej zainteresowań, czyli hemaglutyniny. We Wstępie opisany jest też szczegółowo kluczowy dla badań pani Borkowskiej proces fuzji wirusowej, poprzedzony dość skrótowym opisem błony lipidowej. Tekst ilustrowany jest na ogół dobrej jakości rysunkami i schematami. W ostatniej części Wstępu znajduje się opis technik stosowanych do badania błony lipidowej wraz z niezbędnymi wzorami i schematami. Choć rysunki są czytelne i staranne, w przypadku Ryc. 8 przedstawiającej schemat fuzji wirusa grypy z późnymi endosomami, rysunek byłby łatwiejszy w odbiorze, gdyby w jakiś sposób odróżniono od siebie dwie błony – błonę wirusa i błonę endosomu. Do tej części pracy mam uwagę merytoryczną dotyczącą sformułowania „acetylacja” hemaglutyniny. Z opisu wynika, że do reszt cysteiny w TMD i w ogonie cytoplazmatycznym przyłączane są reszty kwasu palmitynowego lub stearynowego, a nie reszty acetylowe, tak więc nie jest poprawnym określenie tej modyfikacji potranslacyjnej acetylacją. Zamiast niego powinno się użyć terminu „acylacja”. Podobnie (str. 34) nie powinno się używać określenia „cząstki” a cząsteczki, bo wzbudzenie i przekaz energii następuje z cząsteczki donora na cząsteczkę akceptora. Kilkakrotnie też w tekście pojawia się błędne określenie „funkcja eksponentyjna”. Nie istnieje takie wyrażenie, funkcja jest eksponencjalna, czyli inaczej wykładnicza. Niepoprawną kalką z języka angielskiego jest określenie „pulsowe” źródło światła, gdy chodzi o źródło impulsowe, czy też niezręczne sformułowanie na str. 26 „charakteryzacja” zamiast charakterystyki. Pomimo tych błędów czy niedociągnięć, uważam, że Wstęp jest dobrze i logicznie napisany, i stanowi wystarczające tło dla opisanych w dalszej części pracy metod i wyników.

Opis materiałów i metod stosowanych przez Doktorantkę, zajmujący 15 stron, zawiera najważniejsze informacje umożliwiające w większości przypadków odtworzenie stosowanych procedur i warunków doświadczalnych. Szczegółowy opis procedur, w tym przygotowania liposomów i dwuwarstw typu SLB (ang. *supported lipid bilayer*), testów aktywności peptydów oraz metod mikroskopowych pozwala przypuszczać, że Doktorantka opanowała techniki w stopniu wystarczającym do samodzielnego przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów. Jedynie cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particles*) nie zostały przygotowane przez Doktorantkę, ale udostępnione jej w ramach współpracy. Być może to jest powodem, dla którego nie omówiono ich składu lipidowego, a jedynie skupiono się na sekwencji podjednostek HA. Jak później wynika z Dyskusji, skład lipidowy VLP jest istotny, więc można było go podać w rozdziale poświęconym metodom. Choć opis metod, jak już wspomniałam, jest z reguły wystarczający, w niektórych miejscach brakuje istotnych informacji. I tak np. w

opisie testu aktywności fuzyjnej (str. 50) Doktorantka nie napisała, który ze stosowanych barwników jest donorem, a który akceptorem w procesie FRET. Nie napisała też, jak długo liposomy były inkubowane z peptydami (przy opisie badania wbudowywania peptydów w błonę techniką FRET) (str. 48).

Opis wyników, liczący 29 stron, został podzielony na kilka logicznie powiązanych podrozdziałów. Czytelne rysunki i logiczny układ pozwalają na śledzenie toku eksperymentów, ale brak szczegółów w niektórych opisach utrudnia dogłębne zrozumienie otrzymanych wyników. W opisie eksperymentu z wbudowywaniem peptydów TMD w błonę, jak i w podpisach do odpowiednich rysunków, brakuje ważnej informacji o długości fali światła użytego do wzbudzenia donora. Co prawda w rozdziale Materiały i Metody jest ta informacja, ale zdecydowanie łatwiej czytałoby się pracę, gdyby informacja została powtórzona również przy opisie wyników. Nie wyjaśniono tu też skąd bierze się fluorescencja barwnika dansyl-PE w liposomach nie zawierających peptydów, czyli pozbawionych donora dla zjawiska FRET. Czy barwnik ten absorbuje światło o takiej samej długości fali jak Tyr i Trp? Jeśli tak, to nie jest to dobry układ do badania zjawiska FRET. Idealnym rozwiązaniem byłoby użycie takiego układu, w którym przy wzbudzaniu tryptofanu lub tyrozyny obserwuje się emisję barwnika-akceptora, a w nieobecności tych aminokwasów emisji barwnika się nie obserwuje. W omawianym przypadku, emisja dansylu-PE w obecności peptydów wydaje się być efektem addytywnym, a zaobserwowane różnice w wartościach emisji nie są duże i niekoniecznie muszą wynikać z przeniesienia energii w zjawisku FRET. Czy badano również emisję Tyr i Trp w badanym układzie? Dodatkową informację mógłby wnieść kontrolny pomiar emisji tych aminokwasów w liposomach w obecności i pod nieobecność akceptora. Nawiasem mówiąc, barwnik dansyl-PE to barwnik przyłączony do fosfatydyloetanolaminy, a nie, jak błędnie napisała Doktorantka, fosfatydyloseryny.

W opisie eksperymentu z wygaszaniem fluorescencji Tyr i Trp akrylamidem nie podano długości fali wzbudzenia ani emisji. Zastanawia mnie także, jakie jest faktyczne stężenie peptydów w błonie. Czy można to w jakiś sposób ocenić? Zmniejszenie stałej ksv dla wygaszania fluorescencji Trp i Tyr w obecności liposomów wskazuje na wbudowywanie się peptydów w błonę. Nie jest jednak jasne, jaki procent peptydów obecnych w roztworze rzeczywiście uległ wbudowaniu.

Przy opisie aktywności błonowej peptydów nie napisano, jaki barwnik fluorescencyjny wyciekał z liposomów. Ponownie, informacji trzeba szukać w rozdziale Materiały i Metody. Kolejna nieścisłość dotyczy opisu aktywności fuzyjnej w teście mieszania lipidów. W przypadku mieszania lipidów dwóch błon ulegających fuzji powinno się obserwować spadek transferu energii FRET, bo donor i akceptor się oddalają od siebie, czyli w efekcie powinien nastąpić spadek intensywności fluorescencji akceptora, a nie donora.

W przypadku opisu wpływu peptydów na uporządkowanie lipidów też znajdujemy nieścisłe informacje. Mowa jest o zmianie uporządkowania lipidów, ale bez wskazania czy uporządkowanie to się zwiększa czy zmniejsza (str. 71). Nie jest również jasne, dlaczego skala czasów życia fluorescencji barwnika C6-NBD-PE na Ryc. 32, przedstawiającej zdjęcia liposomów GUV (zakres 6,1–6,7 ns), nie odpowiada wartościom czasów życia zaprezentowanym na wykresie 31 (ok. 4,4–5,2 ns). W przypadku liposomów GUV zawierających cholesterol analogiczne ryciny przedstawiają już zgodne wartości czasów życia fluorescencji.

Na uwagę zasługuje wykorzystanie cząstek wirusopodobnych (VLP) w badaniu aktywności fuzyjnej białka pełnej długości. Wykorzystano dwie wersje VLP zawierające HA podtypu H1 oraz H3. Umożliwiło to zbadanie TMD pochodzących z różnych grup filogenetycznych. Eksperyment ten wymagał przygotowania bardzo precyzyjnego, dobrze zdefiniowanego układu

i wykonania wielu kontroli. Co prawda same cząstki VLP Doktorantka pozyskała w ramach współpracy, ale przygotowanie odpowiedniej błony na podłożu stałym (SLB) i jej optymalizacja przy użyciu techniki FCS, a następnie wykonanie szeregu eksperymentów FLIM-FRET było niewątpliwie pracochłonne i wymagające, co należy docenić. Jedynie podany skład lipidowy błony SLB, a konkretnie obecność w niej dodatkowego barwnika Atto 488 budzi moją wątpliwość. O ile jego obecność jest uzasadniona przy optymalizacji błony SLB metodą FCS, o tyle w przypadku analizy FRET, gdzie do układu dodawano NBD-PE jako donor oraz RH-PE jako akceptor, dodatkowy barwnik tylko utrudniłby pomiar i jego interpretację. Należy więc chyba uznać, że wymienienie Atto 488 w tym kontekście to pomyłka, zwłaszcza, że w tabeli 7 w rozdziale Materiały i Metody, przedstawiającej skład lipidowy próbek, tego barwnika nie ma?

Warto na koniec podkreślić, że większość przedstawionych w rozprawie wyników znalazła się w pracy „Transmembrane domains of H1 and H3 hemagglutinin contribute to membrane fusion in a different manner”, gdzie Doktorantka jest pierwszą autorką. Choć nie jest to jeszcze pełna, recenzowana publikacja, a tzw. *pre-print*, to bycie pierwszym autorem świadczy o istotnym wkładzie Doktorantki w uzyskanie wyników i ich interpretację.

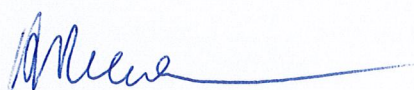
Pracę kończy 10 stronicowa Dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski końcowe. Dyskusja podzielona została na dwa podrozdziały, z których pierwszy, obszerniejszy, skupia się na podsumowaniu i interpretacji wyników dotyczących lokalizacji i aktywności badanych fragmentów peptydowych w błonie, a drugi analizuje różnice pomiędzy TMD z różnych grup filogenetycznych. Ciekawym aspektem aktywności fuzyjnej peptydu FP na jaki zwróciła uwagę Doktorantka jest rola cholesterolu. Otrzymane wyniki wskazują, że proces fuzji indukowany przez FP przebiega inaczej w błonie zawierającej cholesterol niż w błonie go pozbawionej. Z kolei jak chodzi o rolę TMD, to wyniki sugerują, że peptydy te nie mają aktywności fuzyjnej i są pasywne w błonie. Wyniki dotyczące uporządkowania lipidów w dwuwarstwie są niejednoznaczne, i przez to dość trudne w interpretacji. Wpływ na uporządkowanie był inny dla FP niż dla TMD, gdzie jeszcze dodatkowo zależał od podtypu tego peptydu. Dodatkowo, efekt obydwu peptydów był zauważalny w błonie pozbawionej cholesterolu, a nie był widoczny w błonie z cholesterolem. Nie wszystkie wyniki zgadzały się też z danymi literaturowymi. Doktorantka poradziła sobie jednak bardzo dobrze z interpretacją tych wyników, tłumacząc różnice m.in. stosowaniem różnych metod pomiarowych czy składów lipidowych. Zaproponowała też wykonanie symulacji dynamiki molekularnej, które pozwoliłyby na lepsze zrozumienie wpływu TMD na lokalne uporządkowanie błony. Takie badania oczywiście wykraczają poza ramy przedstawionej pracy. Najważniejszym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych eksperymentów był brak synergicznego oddziaływania pomiędzy FP i TMD hemaglutyniny. Jest to ważny wniosek, choć będący zaprzeczeniem postawionej w pracy hipotezy, ponieważ rozstrzyga jednoznacznie kwestię różnie przedstawianą w poprzednich badaniach. Kolejnym ważnym wnioskiem było wskazanie, że efektywność fuzji HA zależy od sekwencji TMD, która może wpływać na odmienne oddziaływanie TMD z lipidami. Tak więc TMD może wpływać na aktywność fuzyjną całego białka, ale nie przez bezpośrednie oddziaływanie z peptydem FP a poprzez oddziaływanie z lipidami i zmiany konformacyjne w obrębie ektodomeny HA.

Liczne, wykonane z użyciem zaawansowanych technik biofizycznych eksperymenty, dogłębna analiza otrzymanych wyników oraz zaproponowane przez panią mgr Borkowską wnioski pozwalają na stwierdzenie, że jej rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wymienione powyżej niedociągnięcia nie mają wpływu na wysoką ocenę recenzowanej przez mnie rozprawy doktorskiej. Duży nakład pracy Doktorantki, jej dojrzałość naukowa i samodzielność w rozwiązywaniu problemów naukowych są niezaprzeczalne.

Ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Borkowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024, poz. 1571 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Pauliny Borkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Kraków, 12.09.2025



Anna Wiśniewska-Becker

Dr hab. Ewa Szolajska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Borkowskiej

pt. „Oddziaływanie pomiędzy peptydem fuzyjnym a domeną transbłonową hemaglutyniny”

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Pracowni Biofizyki Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie pod naukowym kierunkiem dr hab. Remigiusza Worchy. Projekt doktorski Pani mgr Pauliny Borkowskiej dotyczył mechanizmów molekularnych procesu fuzji otoczki lipidowej wirusa grypy z błoną infekowanej komórki. Tematyka badawcza jest konsekwentnie rozwijana od wielu lat przez Promotora rozprawy. Moim zdaniem oceniana rozprawa doktorska prezentuje istotny postęp w tych badaniach.

Fuzja błonowa, która umożliwia uwolnienie materiału genetycznego patogenu do wnętrza komórki gospodarza i tym samym dalsze etapy infekcji, jest kluczowym procesem cyklu namnażania wirusów otoczkowych. A zahamowanie procesu fuzji jest obiecującą antywirusową strategią terapeutyczną. Ze względu na realne zagrożenie wystąpieniem kolejnej pandemii proces fuzji wirusa grypy jest intensywnie badany w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie.

W przypadku wirusów grypy typu A fuzja otoczki wirusowej oraz błony infekowanej komórki następuje w późnych endosomach z udziałem powierzchniowego białka hemaglutyniny (HA), konkretnie podjednostki HA2. Mimo, że HA wirusa grypy typu A jest jednym z najlepiej przebadanych wirusowych białek fuzyjnych wciąż jednak mechanizmy molekularne samego procesu fuzji błon lipidowych, nie zostały w pełni poznane. Większość badań skupiała się na N-końcowej domenie podjednostki HA2, tak zwanym peptydzie fuzyjnym (FP). Podczas gdy rola i mechanizm działania niezbędnej dla zajścia pełnej fuzji domeny transbłonowej (TMD), znajdującej się w C-końcowym fragmencie HA2, pozostają niewystarczająco zbadane. Brak jednoznacznych danych literaturowych na temat oddziaływania pomiędzy TMD i peptydem fuzyjnym.

Głównym celem badań zaprezentowanych w rozprawie było zweryfikowanie możliwości oddziaływania peptydu fuzyjnego z domeną transbłonową oraz zbadanie jego roli w procesie fuzji.

Wcześniejsze badania skupiały się na domenie transbłonowej hemaglutyniny podtypu H3 należącej do 2 grupy filogenetycznej. Doktorantka uwzględniła w swoich badaniach również TMD hemaglutyniny podtypu H1 (reprezentującej 1 grupę). Wybór uzasadnia częste występowanie w populacji ludzkiej wirusów zawierających hemaglutyniny obu podtypów. Hemaglutyninę H1 zawierają wirusy powodujące między innymi gripę sezonową u ludzi, które w przeszłości były przyczyną kilku światowych pandemii.

Realizację projektu doktorskiego Pani mgr Borkowska rozpoczęła od zbadania czy syntetyczne peptydy, których sekwencje aminokwasowe odpowiadały domenom transbłonowym HA2 podtypów H1 i H3 wbudowują się w błonę lipidową. W tym celu przeanalizowała fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (FRET) pomiędzy pełniącymi funkcję donora aromatycznymi resztami aminokwasów obecnymi w peptydach, a lipidami w postaci liposomów typu SUV o składzie POPC z wbudowanym barwnikiem fluorescencyjnym dansyl. Doktorantka wykorzystywała dwa warianty peptydów TMD. Ich dłuższe wersje zawierały reszty aminokwasowe mogące oddziaływać z cholesterolem, podczas gdy krótsze były ich pozbawione. Wyniki eksperymentów potwierdziły, że wszystkie badane peptydy TMD wbudowują się w błonę liposomów.

Następnie, w celu określenia głębokości wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową, Doktorantka przeprowadziła analizę wygaszania fluorescencji reszt tryptofanu lub tyrozyny za pomocą akrylamidu. Eksperyment wykazał, że krótsze wersje peptydów TMD podtypów H1 i H3 były głęboko wbudowane w błonę liposomów. Natomiast w przypadku dłuższych wersji peptydów, zawierających w swojej strukturze dwie reszty odpowiednio Tyr lub Trp, uzyskane wyniki nie

pozwołyły na jednoznaczne stwierdzenie czy obie reszty aminokwasowe były głęboko wbudowane w błonę lipidową.

Kolejnym etapem badań była ocena funkcjonalności peptydów TMD. Pierwszą z zastosowanych przez Doktorantkę metod był test wyciekania zawartości z liposomów (ang. leakage assay). Test nie wykazał destabilizacji błony prowadzącej do wyciekania kalceiny z liposomów typu LUV, zarówno o składzie lipidowym POPC jak również POPC/cholesterol. Sugerowało to, że peptydy TMD są pasywne w błonie. Eksperymenty z zastosowaniem mieszanki FP z peptydami TMD nie wykazały wzrostu wyciekania barwnika fluorescencyjnego w porównaniu z aktywnością samego peptydu fuzyjnego. Doktorantka zaobserwowała natomiast przeciwny efekt. W obu składach lipidowych aktywność błonowa FP była niższa w obecności dłuższej wersji peptydu TMD podtypu H1. Różnice obserwowane w obu błonach pomiędzy aktywnością mieszanek peptydu FP z dłuższymi wersjami TMD były istotne statystycznie. W każdym przypadku mieszanka FP z TMD podtypu H3 wykazywała wyższą aktywność niż mieszanka FP z dłuższą wersją TMD podtypu H1.

Drugim testem zastosowanym przez Doktorantkę do oceny aktywności fuzyjnej peptydów był oparty na FRET test mieszania lipidów (ang. lipid mixing) pozwalający na wykrycie hemifuzji oraz fuzji pomiędzy liposomami. Doktorantka do pomiarów wykorzystywała dwie partie liposomów LUV: zawierające NBD-PE i N-Rh-PE oraz niebarwione. Peptydy odpowiadające domenom transbłonowym nie wykazywały aktywności fuzyjnej. Podczas gdy mieszanki peptydów FP/TMD wykazywały taką samą lub niższą aktywność fuzyjną w porównaniu do samego FP. Zarówno w błonie o składzie POPC jak i POPC/cholesterol Doktorantka obserwowała spadek aktywności fuzyjnej FP w obecności dłuższej wersji TMD H1, analogiczny do wykazanego wcześniej spadku aktywności błonowej. W błonie z cholesterolem odnotowała istotne statystycznie różnice pomiędzy aktywnościami mieszanek FP z dłuższą wersją TMD H1 i FP z dłuższą wersją TMD H3. Zatem wyniki obu testów funkcjonalnych nie potwierdziły synergicznego działania pomiędzy peptydami FP i TMD, w wyniku którego mogłaby zwiększyć się aktywność fuzyjna FP.

W celu dokładniejszego zbadania wpływu peptydów na strukturę dwuwarstwy lipidowej, Doktorantka przeprowadziła eksperymenty z wykorzystaniem liposomów typu GUV z wbudowanym fluoroforem C6-NBD-PE, którego czas życia fluorescencji wzrasta wraz ze wzrostem uporządkowania błony lipidowej. Dłuższy peptyd TMD H1 indukował wzrost uporządkowania lipidów o składzie POPC, podczas gdy dłuższy peptyd TMD H3 powodował przeciwny efekt na błonę lipidową. Natomiast w eksperymentach z wykorzystaniem liposomów GUV o składzie POPC/cholesterol (60/40 mol %) Doktorantka nie obserwowała istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi czasami życia fluorescencji barwnika w liposomach bez peptydów i w liposomach po dodaniu FP lub dłuższych peptydów TM.

Ostatnim etapem wykonanych przez mgr Paulinę Borkowską badań była analiza wpływu TMD na aktywność fuzyjną pełnej długości podjednostki HA2. W tym celu Doktorantka wykorzystwała cząstki wirusopodobne VLP (ang. virus-like particles) przygotowane przez Zespół współpracowników z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Były to cząstki zawierające natywną pełną długość hemaglutyninę podtypu H1 (H1-TMD-H1) oraz wariant hemaglutyniny H1 z fragmentem TMD zastąpionym domeną należącą do podtypu H3. Jako modelu błony Doktorantka użyła dwuwarstwy lipidowej na podłożu (SLB, ang. supported lipid bilayer). Właściwy eksperyment poprzedziła pracochłonna optymalizacja warunków otrzymywania funkcjonalnej błony SLB, która obejmowała między innymi potwierdzenie mobilności lipidów w błonie, z zastosowaniem metody spektroskopii korelacji fluorescencji FCS (ang. fluorescence correlation spectroscopy). Do oceny aktywności fuzyjnej cząstek VLP Doktorantka wykorzystała test oparty na FRET-FLIM. Test wymagał od Doktorantki przygotowania odpowiednich kontroli eksperymentalnych, które pozwoliły na interpretację wyników FRET-FLIM i ocenę fuzji VLP. W eksperymentach wykorzystwała błonę SLB z wbudowanym donorem w postaci NBD-PE, a aktywowane proteolitycznie cząstki wyznakowała fluorescencyjnym fosfolipidem N-Rh-PE pełniącym rolę akceptora. W przypadku obu wariantów VLP Doktorantka zaobserwowała spadek średniego czasu życia fluorescencji, świadczący o zajściu fuzji z błoną SLB. Chociaż test nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy

H1-TMD-H3 a H1-TMD-H1, występowały różnice w krzywych zaniku, dodatkowo średnia wartość τ_{avr} była niższa dla H1-TMD-H3.

Pani mgr Paulina Borkowska zrealizowała więc z sukcesem cele ambitnego projektu doktorskiego. Przeprowadzone badania wykazały brak synergistycznego oddziaływania pomiędzy peptydem fuzyjnym i domeną transbłonową hemaglutyniny, które prowadziłyby do wzrostu aktywności fuzyjnej FP. Co bardzo interesujące, wykazała różnice pomiędzy TMD pochodzącymi z dwóch różnych grup filogenetycznych, obserwowane na poziomie peptydów, jak i w kontekście całego białka. Doktorantka na podstawie uzyskanych danych oraz doniesień literaturowych zaproponowała alternatywną hipotezę do hipotezy tworzenia kompleksów FP z TMD, zakładającą, że domena transbłonowa razem z łącznikiem wpływa na nachylenie ektodomeny i pośrednio na aktywność fuzyjną białka.

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona w formie monografii naukowej. Napisane w języku polskim opracowanie, ma poprawny układ i strukturę. Rozprawa zawiera: *Spis treści*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (*Abstract*), *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusję*, *Podsumowanie i wnioski*, *Literaturę*, *Załączniki* oraz wykaz osiągnięć naukowych. Autorka uwzględniła także *Wykaz skrótów*.

Zawarty na 28 stronach *Wstęp* stanowi kompetentne wprowadzenie w tematykę rozprawy i uzasadnia potrzebę podjęcia przez Doktorantkę prac badawczych. Autorka w przystępnej formie przedstawiła zagadnienia stanowiące tło dla prezentowanych w rozprawie rezultatów. Cytowane prace źródłowe zostały odpowiednio dobrane, co świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Pani Pauliny Borkowskiej do realizowanych badań.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła hipotezę badawczą, której weryfikacji się podjęła, oraz precyzyjnie sformułowany główny cel badań i cele szczegółowe.

Rozdział *Materiały i metody* został starannie zredagowany. Autorka uwzględniła wszystkie zastosowane metody oraz materiały badawcze. Szczegółowość opisu umożliwia innym badaczom powtórzenie opisanych doświadczeń. W mojej opinii zastosowane metody badawcze zostały odpowiednio dobrane do realizacji zamierzonych celów pracy, a ich szeroki zakres świadczy o dużych umiejętnościach praktycznych Doktorantki.

Liczący 29 stron maszynopisu rozdział *Wyniki* zawiera starannie skonstruowany opis przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów oraz uzyskanych danych doświadczalnych zaprezentowanych w postaci poprawnie opracowanych rycin i tabel. Racjonalnie zaprojektowane doświadczenia, układają się w logiczny ciąg badań wykonanych z wymaganymi kontrolami. Realizacja projektu doktorskiego wymagała od Pani Pauliny Borkowskiej opanowania między innymi metod otrzymywania różnych typów liposomów, zaawansowanych technik obrazowania mikroskopowego oraz analizy statystycznej danych. Wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego wachlarza metod świadczy o Jej dużych umiejętnościach praktycznych i samodzielności w prowadzeniu badań.

Zawarta na 10 stronach tekstu *Dyskusja* jest opracowana w sposób logiczny i rzeczowy. Rozdział jest podzielony na sekcje tematyczne, w których Doktorantka szczegółowo analizuje i interpretuje rezultaty projektu doktorskiego w świetle aktualnego stanu wiedzy, prezentowanego w literaturze. Należy docenić wnikliwość i krytyczną ocenę własnych wyników, świadczącą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Ten rozdział podobnie jak całą rozprawę przeczytałam z dużym zainteresowaniem.

Sformułowane w postaci zwięzłych stwierdzeń wnioski z przeprowadzonych badań, przedstawione w kolejnym rozdziale *Podsumowanie i wnioski*, znajdują poparcie w wynikach zaprezentowanych w rozprawie.

Rozdział *Literatura* zawiera zestawienie 231 pozycji cytowanych w tekście rozprawy. Dobór prac świadczy o dobrej znajomości tematyki badawczej.

Rozprawa zawiera również materiał uzupełniający. Autorka jako *Załącznik* zamieściła jedną rycinę i tabelę.

Rozprawę kończy wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki. Zgodnie z informacją część

wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej została już upowszechniona w środowisku międzynarodowym w formie artykułu naukowego opublikowanego w *International Journal of Molecular Sciences*, 2021 (5 letni Impact Factor 5,7) oraz manuskryptu zdeponowanego w 2024 roku w repozytorium preprintów BioRxiv. Pani Borkowska jest jego pierwszą autorką.

Pragnę podkreślić, że rozprawa została bardzo starannie przygotowana pod względem merytorycznym i redakcyjnym, zawiera bardzo nieliczne błędy mające charakter pomyłek pisarskich. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na potrzebę korekty na str. 27:

„Mniejsze upakowanie homotrimeru TMD hemaglutyniny z podtypu H6 (grupa 1) umożliwiło cięcie proteolityczne białka przez enzym restrykcyjny w tym regionie...[Kordyukova i wsp., 2011].”

W cytowanej pracy zastosowano enzymy proteolityczne: bromelainę i subtilizinę Carlsberg.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

- W celu zbadania wpływu cholesterolu na aktywność lipidów Doktorantka wykorzystywała sztuczne błony o składzie POPC/cholesterol (60/40 mol%). Proszę o komentarz dlaczego nie uwzględniono również sfingomieliny?
- Czy dostępne są metody umożliwiające odróżnienie hemifuzji od pełnej fuzji błonowej.
- Na podstawie wyników eksperymentów nie zaobserwowano różnicy w oddziaływaniu z błoną zawierającą cholesterol pomiędzy krótkimi oraz długimi wersjami peptydów TMD. Proszę o ustosunkowanie się do tego wyniku w kontekście obecności w dłuższych wariantach peptydów motywów aminokwasowych oddziałujących z cholesterolem.
- Jestem ciekawa czy doktorantka rozważała wykorzystanie w badaniach pęcherzyków błony plazmatycznej otrzymywanych z komórek (tzw. GPMV). Czy ich użycie mogłoby mieć przewagę nad wykorzystaniem sztucznych modeli błon, czy wręcz przeciwnie?
- Chciałam poznać opinię Doktorantki czy przeprowadzony w formie płytki 96 dołkowej test wyciekania barwnika fluorescencyjnego z liposomów mógłby być wykorzystany w przyszłości do przesiewowego badania potencjalnych kandydatów na leki blokujące proces fuzji błonowej wirusa grypy?
- Wykorzystywane cząstki VLP były otrzymywane w roślinach tytoniu. Czy lipidy roślinne zawarte w cząstkach mogły mieć wpływ na aktywność fuzyjną VLP?
- Jak zróżnicowana była wielkość wykorzystywanych liposomów typu GUV?

Wnioski końcowe

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wysoko oceniam znaczenie poznawcze i w dalszej perspektywie aplikacyjne uzyskanych przez Doktorantkę danych. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętności praktyczne Doktorantki, świadczące o Jej bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań. Pani mgr Paulina Borkowska wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnościami współpracy. Podsumowując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Borkowskiej zatytułowana „*Oddziaływanie pomiędzy peptydem fuzyjnym a domeną transbłonową hemaglutyniny*” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 z póź. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Pauliny Borkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Warszawa, dnia 18 września 2025 r.



Dr hab. Ewa Szolajska

Środowiskowa pracownia Hodowli Komórkowych
i Produkcji Białek Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN