

**Dr hab. Agnieszka Zdybicka-Barabas**

Lublin, 06 wrzesień 2023 r.

Katedra Immunobiologii

Instytut Nauk Biologicznych

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**pt. „Występowanie i dodatkowa funkcja fosfogliceromutazy
na powierzchni komórek drożdżopodobnych grzybów z rodzaju *Candida*”,
przedstawionej przez Panią magister ALEKSANDRĘ AGATĘ ŻELAZNĄ**

Rosnąca oporność drożdżaków z rodzaju *Candida* na leki przeciwgrzybowe może prowadzić do ciężkich trudnych do wyleczenia zakażeń nazywanych kandydozami. W grupie największego ryzyka są osoby o obniżonej oporności po długotrwałej chemioterapii lub antybiotykoterapii oraz pacjenci z zaburzoną funkcją układu immunologicznego. W inwazji grzybów *Candida* spp. ważną rolę odgrywają czynniki wirulencji patogena, w tym adhezja do komórek gospodarza, w której uczestniczą białka powierzchniowe obu organizmów, zwłaszcza adhezyny obecne w ścianie komórkowej drożdżaków. Na powierzchni komórek obecne są również białka „moonlighting”, które należą do cytoplazmatycznych białek zaangażowanych m.in. w szlaki metaboliczne lub inne procesy wewnątrzkomórkowe niezbędne do funkcjonowania komórki. Dane literaturowe wskazują, że wiele z tych białek poza główną rolą mogą pełnić również inne funkcje związane z lokalizacją na powierzchni komórek drożdżaków w tym wiązać się z ludzkimi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) czy składnikami układu dopełniacza. Jednym z takich wielofunkcyjnych białek jest fosfogliceromutaza (Gpm1), której główna rola polega na uczestniczeniu w szlaku glikolizy. Z kolei obecność Gpm1 na powierzchni komórek *Candida* spp. może zwiększać skuteczności inwazji wobec człowieka poprzez hamowanie mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dotychczasowa wiedza na temat roli powierzchniowej Gpm1



drożdżaków w interakcji patogen-gospodarz podczas zakażenia jest fragmentaryczna i wymaga uzupełnienia. Dlatego poznanie mechanizmów stosowanych przez drożdżaki *Candida* spp. do zakażenia człowieka oraz reakcji odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza jest niezwykle ważne ponieważ może przyczynić się do opracowania skutecznych metod leczenia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Agaty Żelaznej została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Andrzeja Kozika w Zakładzie Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania były częściowo finansowane w ramach projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych Nr 2016/23/B/NZ6/00089. Część wyników przedstawionych w ocenianej pracy została opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie *Acta Biochemica Polonica* 68(4): 515-525, gdzie Doktorantka jest drugim współautorem. Oceniana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy 136 stron, zawiera 6 rozdziałów (Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis literatury (202 pozycji). W pracy zamieszczono 13 tabel i 35 rysunki, z czego 19 rysunków oraz 5 tabel ilustrują wyniki badań prowadzonych przez Doktorantkę.

Część doświadczalną pracy poprzedza Wstęp oparty na starannie wyselekcjonowanych danych z piśmiennictwa naukowego, co świadczy o bardzo dobrej znajomości podjętej problematyki badawczej. Wstęp zawiera opis zagadnień związanych z celem i częścią doświadczalną w podrozdziałach scharakteryzowano m.in. fosfogliceromutazę (Gpm1), chorobotwórcze drożdżaki z rodzaju *Candida* w tym istotne dla kandydoz *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapslosis* oraz *C. glabrata* (wyodrębniony jak nowy gatunek *Nakaseomyces glabrata*), białka obecne na powierzchni drożdżaków w tym adhezyny z trzech rodzin 1) z sekwencjami aglutynino-podobnymi (Als), 2) białka ściany komórkowej strzępek (Hwp) oraz 3) białka o zwiększonej przyczepności do polistyrenu (Eap). Ponadto opisano ludzkie białka zaangażowane w oddziaływanie z czynnikami wirulencji patogenów należące do ECM m.in. fibronektynę (Fn) i witronektynę (Vtr) jak również układ aktywacji kontaktowej (CAS) i układ kinina-kalikreina (KKS) w tym wielkocząsteczkowy kininogen



(HMWK). Zamieszczone we Wstępie dane zostały przedstawione w sposób kompetentny, wskazujący na dobre merytoryczne przygotowanie Doktorantki do postawienia celów badawczych oraz ich realizacji w części doświadczalnej. Cel pracy główny, jak również cele szczegółowe zostały dobrze sprecyzowane. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza wymagała do realizacji postawionych celów badawczych zastosowania dużej liczby różnorodnych technik z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej i biochemii. Eksperymenty zostały właściwie zaplanowane. Pokazuje to wysokie kompetencje i opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego przez mgr Aleksandrę Agatę Żelazną umożliwiające wykonanie eksperymentów, które pozwoliły wyjaśnić założone problemy badawcze. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały szczegółowo przeanalizowane na 26 stronach.

Wykazano, między innymi, że:

1. fosfogliceromutaza 1 (Gpm1) jest obecna na powierzchni drożdżaków *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* i *Nakaseomyces glabrata*,
2. „powierzchniowa” Gpm1 zaangażowana jest w oddziaływanie z Vtr i Fn ludzkimi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz HMWK składnikiem układu dopełniacza,
3. miejscem oddziaływania Gpm1 z Vtr jest domena wiążąca heparynę (HBD), w Fn uczestniczy domena fibronektynowa typu III, a w HMWK i drobnocząsteczkowym kininogenu (LMWK) jest to rejon domeny 3 oraz domeny 6 obecnej tylko w HMWK,
4. potencjalnym miejscem kotwiczenia Gpm1 w ścianie komórkowej *C. albicans* na powierzchni drożdżaków są m.in. kinaza fosfoglicerynianowa, czynnik elongacyjny 2 oraz adhezyny z rodziny Als-Als3 oraz w mniejszym stopniu Hwp1 i Eap1,
5. miejsca oddziaływania z Als3 *C. albicans* oraz ludzkich białek ECM czy HMWK/LMWK w strukturze Gpm1 są podobne,
6. Gpm1 chętniej oddziałuje z HMWK niż Als3.

Wyniki przedstawione w recenzowanej pracy wskazują, że Gpm1 oddziałuje ze ścianą komórkową drożdżaków za pomocą różnych białek m.in. adhezyny Als3, dzięki którym jest

prezentowana podczas interakcji patogen-gospodarz. Pokazują również, że podobne miejsca w strukturze Gpm1 *Candida* spp. odpowiadają za oddziaływanie z białkami ludzkimi oraz grzybową Als3. Rozprawę doktorską podsumowuje Dyskusja licząca 14 stron, w której Doktorantka omawia i interpretuje uzyskane wyniki na tle aktualnych, odpowiednio dobranych danych literaturowych, co wykazuje na dobre zrozumienie tematyki. Praca została napisana poprawnym językiem, z dużą precyzją i klarownością w formułowaniu myśli i wniosków, szata graficzna rozprawy jest staranna.

Po analizie całości pracy, nasuwa się pytanie o możliwość aplikacyjnego wykorzystania Gpm1 w ograniczeniu zakażeń wywoływanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida*? Czy fosfogliceromutaza może regulować interakcję patogen-gospodarz np. ułatwić rozpoznanie intruza przez układ odpornościowy gospodarza i ułatwić jego eliminację?

Z obowiązku recenzenta chciałabym w tym miejscu wskazać drobne niedociągnięcia zauważone w przedstawionej pracy o wyjaśnienie, których proszę Doktorantkę:

MATERIAŁY I METODY

- str. 60; punkt 2.13 - Na jakiej podstawie ustalono stężenie ludzkich białek znakowanych biotyną Fn-Bt; Vtr-Bt; HMWK-Bt stosowanych w doświadczeniach badających konkurencję o wiązanie z Gpm1 obecną na powierzchni komórek drożdżaków a przeciwciałami anti-PMGI?

- str. 62, 64, 66; punkty 2.15; 2.17; 2.19 - Na jakiej podstawie wybrano stężenia dla białek immobilizowanych do mikropłytkowych testów badających oddziaływania par białek?

Czy były prowadzone badania gdzie ludzkie białka były w takim samym stężeniu?

- str. 49; punkt 2.2 - oznaczano żywotność komórek, jednak w wynikach brak jest informacji na ten temat otrzymanych rezultatów,

- str. 51; punkt 2.6 - jakość produktów PCR sprawdzano przy użyciu elektroforezy w 1% agarze jednak nie zamieszczono opisu metody oraz nie pokazano wyników,

- str. 49, 50, 57, 65; punkty 2.2, 2.3, 2.4, 2.10, 2.18 jednym z etapów procedury jest dializa, dlatego warto zamieścić informację o jakich rozmiarach porów stosowano membrany dializacyjne, brak tej informacji również w materiałach punkt 1.4,



- brak informacji str. 45 z czym sprzężona była streptowidyna ; str. 54 Tabela 2 ilu procentowy bis-akrylamid i APS był używany do przygotowania żeli; str. 93, Rysunek 29 o jednostce sygnału.

WYNIKI

- str. 70, Rysunek 16 - Czy identyfikowano obecność Gpm1 również na powierzchni komórek w formie planktonicznej *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*? Jeśli tak, to czy była jakaś różnica w jej rozmieszczeniu? Szkoda, że nie przedstawiono dla porównania zdjęć wykonanych w świetle przechodzącym.

- str. 75, Rysunek 17 - Czy można wytłumaczyć dlaczego Gpm1 jest obecna tylko na nielicznych komórkach *N. glabrata*?

- str. 80, Rysunek 20 - Czy badano również wiązanie znakowanej biotyną rekombinowanej Gpm1 *N. glabrata* z białkami ludzkimi? Ponieważ na podstawie wyników uzyskanych dla całych komórek (Rysunek 19) widać, że oddziałują one z powierzchnią komórek drożdżaka.

- str. 79, Tabela 9 - Czy oznaczono aktywność dla Gpm1 oczyszczonej i rekombinowanej z *N. glabrata*? Jeśli tak to jak kształtowała się na tle preparatów otrzymanych z pozostałych gatunków drożdżaków?

- str. 76, Rysunek 18; str. 94, Rysunek 30 – nie podano mas cząsteczkowych markerów, Rys. 30 - brak oznaczenia żelu w figurze oraz wyjaśnienia co znajduje się w ścieżkach 1 i 2,

- ponieważ oczyszczanie Gpm1 oraz Gpm1R jest ważnym etapem pracy warto było zamieścić przykładowe chromatogramy i żele po rozdzielach SDS-PAGE,

- analizę wyników ułatwiłoby gdyby prezentowane rysunki były większe, a na osiach wykresów umieszczono bardziej szczegółową podziałkę np. rysunki 21, 22, 26. Zabrakło podpisach do rysunków 24, 25, 32 wyjaśnienia co jest kontrolą.

Pragnę zaznaczyć, że drobne niedociągnięcia edytorskie czy błędy literowe, nieporadności stylistyczne są nieliczne i nie wpływają na pozytywny odbiór oraz ocenę całej rozprawy, a przedstawione wyżej uwagi i pytania mają jedynie charakter dyskusyjny lub porządkowy i nie obniżają wysokiej wartości poznawczej recenzowanej pracy doktorskiej.



Pani mgr Aleksandra Agata Żelazna w ocenianej pracy wykazała znajomość piśmiennictwa naukowego, umiejętność rozwiązywania postawionych problemów badawczych oraz opanowanie różnorodnych metod badawczych właściwie dobranych do zaplanowanych eksperymentów.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że praca doktorska Pani mgr Aleksandry Agaty Żelaznej prezentuje wysoki poziom naukowy, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w wyjaśnienie roli powierzchniowej fosfogliceromutazy w oddziaływaniach zarówno z adhezyną Als3 *C. albicans*, jak i ludzkimi białkami tj. Fn, Vtr oraz HMWK uczestniczącymi w obronie gospodarza.

Uważam, że mgr Aleksandra Agata Żelazna zrealizowała założone cele badawcze, a przedstawiona do recenzji praca pt. „Występowanie i dodatkowa funkcja fosfogliceromutazy na powierzchni komórek drożdżopodobnych grzybów z rodzaju *Candida*” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Agaty Żelaznej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom ocenianej pracy oraz wartość naukową przeprowadzonych doświadczeń oraz wkład w rozwój nauk biologicznych wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Agaty Żelaznej.

Agnieszka Zdybicka-Barabas
Dr hab. Agnieszka Zdybicka-Barabas

