

Prof. dr hab. Teresa Olczak

Tel. 71 3752 612

E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 26.03.2024 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Surowiec pt. „Analiza zmian w biofilmie mieszanym bakteryjno-grzybiczym formowanym przez drożdżaki *Candida albicans* oraz bakterie *Porphyromonas gingivalis* w kontakcie z organizmem gospodarza”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Surowiec została zrealizowana w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik jako promotora oraz dr hab. Justyny Karkowskiej-Kulety jako promotora pomocniczego. Zespół prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik od wielu lat zajmuje się badaniami skoncentrowanymi m.in. na mechanizmach związanych z infekcjami z udziałem *C. albicans*. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę stanowi ich kontynuację i wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą infekcji człowieka, zwracając szczególną uwagę na problem mieszanych infekcji bakteryjno-drożdżowych, występujących m.in. w zachłystowym zapaleniu płuc.

Rozprawa doktorska to 200 stron drukowanego tekstu wraz z rysunkami i tabelami oraz materiał dodatkowy w formie tabel. Zawiera ona wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów i symboli oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki pracy badawczej. Obejmuje on opis zachłystowego zapalenia płuc oraz udział dwóch mikroorganizmów biorących udział w zachłystowym zapaleniu płuc, *C. albicans* i *P. gingivalis*, ze szczególnym uwzględnieniem ich czynników wirulencji oraz regulacji formowania biofilmu w modelu uwzględniającym wpływ środowiska płuc.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka szczegółowo i w sposób przejrzysty przedstawiła odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane podczas realizacji pracy doktorskiej. Zastosowanie szerokiego spektrum interdyscyplinarnych metod i technik z zakresu hodowli bakteryjnych i komórkowych, mikrobiologii, biologii molekularnej, biochemii, mikroskopii, świadczy nie tylko o dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki, która do

realizacji postawionych zadań potrafi samodzielnie lub we współpracy z promotorami dobrać lub zastosować odpowiednie metody badawcze, ale przede wszystkim o nabytych, szerokich umiejętnościach praktycznych. Istotne jest także wskazanie przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej, które doświadczenia zostały wykonane we współpracy.

Celem pracy doktorskiej była analiza transkryptomyczna i proteomiczna *C. albicans* w mieszanym biofilmie z bakteriami *P. gingivalis*, z uwzględnieniem kontaktu z surowicą, neutrofilami i nabłonkiem oskrzeli. Szczegółowe cele obejmowały:

1. zbadanie wpływu bakterii *P. gingivalis* na zmiany w proteomie *C. albicans* w tworzonym biofilmie mieszanym w warunkach tlenowych,
2. zbadanie wpływu surowicy i neutrofilów na proteom *C. albicans* w mieszanym biofilmie w warunkach tlenowych,
3. zbadanie zmian ekspresji genów kodujących w grzybach głównie białka należące do tzw. „master regulators”, białka biorące udział w adhezji, przebudowie ściany komórkowej grzybów, odpowiedzi na stres oraz białka biorące udział w regulacji istotnych procesów w komórkach grzybów w mieszanym biofilmie w warunkach tlenowych,
4. zweryfikowanie znaczenia wybranych grzybiczych białek w tworzeniu biofilmu mieszanego w warunkach tlenowych w odniesieniu do przeżywalności bakterii *P. gingivalis*,
5. wskazanie roli grzybiczej adhezyny Mp65.

Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały w pełni zrealizowane. Uzyskane wyniki pozwoliły na dogłębną charakterystykę potencjalnych oddziaływań zachodzących w modelowym biofilmie utworzonym przez *C. albicans* i *P. gingivalis* w odniesieniu do modelu zachłystowego zapalenia płuc.

W obszernym rozdziale Wyniki uzyskane dane, pomimo ich ogromnej liczby, są przedstawione w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Chociaż zdaniem Recenzenta, przy tak dużej liczbie różnorodnych wyników pomocne byłoby zamieszczenie krótkich podsumowań na końcu każdego podrozdziału opisującego wyniki. Praca doktorska zawiera wiele wartościowych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw patogenności *P. gingivalis* i *C. albicans* w infekcjach mieszanych. Istotny wynik tej rozprawy to także fakt, że wyniki uzyskane z globalnej analizy proteomicznej stanowią dobrą podstawę do dalszych badań. Nie chcąc dyskutować nad wszystkimi wynikami, do najciekawszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej, spośród tak ogromnej ich ilości, Recenzent zalicza:

1. wykazanie znaczenia genu *EFG1 C. albicans* w formowaniu biofilmu wspólnie z bakteriami *P. gingivalis* w odniesieniu do gospodarki żelazowej oraz w modelu uwzględniającym oddziaływanie z elementami środowiska oskrzeli,
2. charakterystykę adhezyny Mp65 *C. albicans*, zwłaszcza w odniesieniu do oddziaływania z nabłonkiem oskrzeli i potencjalnej interakcji z białkami gospodarza.

Obydwa geny wykazują znaczący wzrost ekspresji w biofilmach dwugatunkowych, ale co ciekawe, obecność składników surowicy zmniejsza ekspresję genu *EFG1* i nie ma wpływu na ekspresję genu *MP65*. Ciekawe jest wykazanie fenotypu formy drożdżowej mutantu *efg1Δ/Δ* w oddziaływaniu z bakteriami *P. gingivalis*, zależne od aktywności gingipain oraz zachowanie formy strzępkowej produkującej białko Mp65, sprzyjającej zaangażowania białka Mp65 w oddziaływanie z nabłonkiem oskrzeli, głównie poprzez zwiększenie liczby strzępek, ich wydłużenie i bardziej intensywne wnikanie grzybów do komórek nabłonka

W rozdziale Dyskusja Doktorantka ocenia uzyskane wyniki i ich potencjalne znaczenie, szeroko odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Jednak także tutaj, podobnie jak w rozdziale Wyniki, brakuje końcowego podsumowania całości uzyskanych wyników.

Piśmiennictwo obejmuje ok. 340 pozycji literaturowych, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego. Praca zawiera także spis opublikowanych prac i rozdziałów w monografiach, w których Doktorantka jest współautorem lub autorem, a także udział Doktorantki w projektach badawczych. Zamieszczenie wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej planowane jest w przygotowanym do wysłania do redakcji czasopisma manuskrypcie.

Pod względem merytorycznym i edytorskim praca doktorska jest napisana dobrze, a nieliczne błędy nie wpływają na jej wartość merytoryczną. Z obowiązku Recenzent wskazuje tylko niektóre nieścisłości. W całej pracy zamiennie stosowana jest nomenklatura „macierz” i „matrix”, „dopełniacz” i „komplement”, „chaperony” i „białka opiekuńcze”. W Tabeli 1 na str. 41 brakuje pełnych nazw gatunków mikroorganizmów. Na str. 50 jest „...RgpA, RgpB oraz K - ...”, a powinno być „...RgpA, RgpB oraz Kgp -...”. W pracy jest „metoda Bradforda”, a powinno być „metoda Bradford”. Na str. 54 jest „...przekształcane w furfural lub hydroksylofurfural.”, a powinno być „...przekształcane w furfural lub 5-hydroksymetylofurfural.”. Na str. 85 jest „...należą do rodziny glukozylotransferaz glukozy UDP...”, a powinno być „... należą do rodziny glukozylotransferaz UDP-glukozy...”. Na str.

149 jest „Stała dysocjacji jest o dwa rzędy niższa niż w przypadku przeciwciał i wynosi $3,1 \times 10^{-6}$ M, świadczy to o dużo niższym powinowactwie...”, a powinno być „Stała dysocjacji jest o dwa rzędy wyższa niż w przypadku przeciwciał i wynosi $3,1 \times 10^{-6}$ M, świadczy to o dużo niższym powinowactwie...” – dla porównania stała dysocjacji dla przeciwciał wynosi $3,8 \times 10^{-8}$ M. Na str. 160 Doktorantka sugeruje, że wszystkie gingipainy mają zdolność do wiązania hemu, PPIX i innych porfiryn i metaloporfiryn, a dotyczy to tylko gingipain z domenami hemaglutyninowymi. Na str. 160 Doktorantka sugeruje, że FBS jest dobrym źródłem hemu, ale nieshemolizowana surowica w stężeniu 10% w pożywce RPMI nie zawiera wystarczającej do wzrostu bakterii *P. gingivalis* ilości żelaza i hemu. Wysianie komórek na płytki agarowe z krwią, gdzie źródłem żelaza i hemu jest hemoglobina, pozwala na wzrost tylko tych bakterii, które były obecne w formie żywej w próbie przed ich wysianiem i nie zwiększy liczby komórek w przeciwieństwie do tego, co pisze Doktorantka „..., że ewentualny niedobór żelaza we wspólnym biofilmie powinien zostać zniwelowany podczas testu CFU, w którym zawieszona komórek wysiewana jest na szalki z krwawym agarem z dodatkiem heminy”.

Pomimo właściwego przedstawienia uzyskanych wyników, ich wysokiej wartości naukowej oraz szerokiej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu wyjaśnienia kilku kwestii i podsumowania dyskusji zawartej w pracy doktorskiej:

1. We wstępie na str. 30 Doktorantka pisze: „Biofilm *C. albicans* tworzony jest przez komórki mikroorganizmów osadzonych na wytworzonej przez siebie strukturze zwanej macierzą (matrix) biofilmu.”, a na str. 32: „Komórki tworzące biofilm, w trakcie jego dojrzewania, wytwarzają w przestrzeni międzykomórkowej macierz biofilmu, która buduje swego rodzaju rusztowanie dla osadzonych w niej komórek...” Doktorantka w całej pracy używa sformułowania „macierz”/„matrix” biofilmów mono- i dwugatunkowych w przypadku analizy biofilmu. Metoda otrzymywania takich preparatów opisana na str. 53 i 54 i raczej sugeruje, że są to komórki mikroorganizmów uzyskane po ich odplukaniu, a później sonikowane. Czy w składzie preparatów biofilmów analizowanych w tej pracy znajdują się komórki razem z macierzą pozakomórkową? Recenzent zakłada, że tak, ale nie jest to do końca jasne, o czym świadczą m.in. uwagi częściowo wskazane poniżej.
2. Na str. 102 Doktorantka pisze: „Kontakt z FBS wzmacnia poziom sekrecji do macierzy białek związanych z odpowiedzią na stres, ...” Jeśli za „macierz” przyjmie się odplukane i poddane sonikacji komórki, to w jaki sposób można zanalizować białka poddawane

„sekrecji do macierzy”, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza - czy w uzyskanych preparatach biofilmów zawarta jest też macierz pozakomórkowa ?

3. Na str. 91 na Rysunku 12 różnicę istotną statystycznie, ale dla wartości odwrotnych w przypadku pomiaru gęstości optycznej i biomasy biofilmu analizowanej poprzez barwienie fioletem krystalicznym, wykazano dla mutantu *efg1Δ/Δ* (z upośledzonym strzępkowaniem) tworzącego biofilm razem z bakteriami *P. gingivalis*. Czym to może być spowodowane ? Dlaczego tylko w tym przypadku gęstość optyczna nie koreluje z biomasa ? Czy ma to tylko związek z tym, że szczep ten będąc składnikiem biofilmu jest niewrażliwy na działanie gingipain (str. 92, Rys. 13) ? Dalej na str. 95 Doktorantka pisze: „działające enzymy mogą przyczyniać się do zmniejszonej żywotności drożdżaków *efg1Δ/Δ* w nadsączu, ..., wskazując na ich wrażliwość na działanie gingipain, w przeciwieństwie do komórek pozostających w biofilmie” (Rysunek 16). Jaki może być inny mechanizm takiego efektu ?
4. Recenzent prosi o wyjaśnienie sformułowania na str. 156: „Zmiany w CFU *P. gingivalis* ze znacznym spadkiem liczby żywych komórek bakteryjnych po zakłóceniu prawidłowej organizacji mannanów i glukanów wskazują, że mannany i cała struktura matrix są niezbędne bakteriom do ich przeżycia i mogą spełniać rolę protekcyjną względem tych beztlenowych patogenów.” Czy w tym zdaniu chodzi o „mannany” i „strukturę matrix” *C. albicans* ? Co Doktorantka ma na myśli pod pojęciem „roli protekcyjnej względem beztlenowych patogenów” ?
5. Co oznacza sformułowanie „niespecyficzność” na str. 136 (Rysunek 26), str. 140 (Rysunek 29), str. 144 (Rysunek 34) ? Pomocne byłoby umieszczenie takiego wyjaśnienia pod rysunkami.
6. Gdzie będą zdeponowane dane z analizy proteomicznej ?
7. Na czym polegały „trudności techniczne” podczas „syntezy przeciwciał” (str. 135) ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Magdaleny Surowiec nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 6 prac (opublikowanych m.in. w czasopismach *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *Yeast*, *Journal of Fungi*), w których Doktorantka jest współautorem. Dlatego też, pomimo że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane, zarówno wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej oraz pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Surowiec pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Teresa Olas