



## O C E N A

pracy doktorskiej Pani mgr Doroty Satała, zatytułowanej: „**Oddziaływanie białek adhezyjnych występujących na powierzchni komórek drożdżopodobnych grzybów zaliczanych do grupy *Candida* „non-albicans” z ludzkimi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz komórkami nabłonka**”

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Andrzeja Kozika. Praca współfinansowana była z grantu: NCN Opus 4 nr 2012/07/B/NZ1/02867.

Praca obejmuje 164 strony, włączając w to 17 tabel, 46 rysunków, 30 wykresów i 274 pozycje literatury.

Wysoce zakaźne infekcje grzybicze stanowią bardzo poważny problem kliniczny. Najbardziej rozpowszechniona jest grzybica stóp, w tym paznokci. Szacuje się, że około 30-40% populacji cierpi z tego powodu. Jednak zakażenia te, choć uciążliwe nie stanowią największego zagrożenia zdrowotnego u ludzi. Zdecydowanie groźniejsze są grzybice atakujące błony śluzowe, których zaniedbanie prowadzi do poważnych komplikacji zdrowotnych. Najgroźniejsze i najtrudniejsze do leczenia są grzybice głębokie atakujące narządy wewnętrzne człowieka. Grzybice są wynikiem ataku mikroorganizmów należących do królestwa grzybów, głównie dermatofitów i grzybów drożdżopodobnych. Właśnie te ostatnie powodują schorzenia określane mianem drożdżycy lub kandydozy, a ich typowym przedstawicielem jest *Candida albicans* (bielnik biały) – oportunistyczny mikroorganizm będący składnikiem flory fizjologicznej przewodu pokarmowego przeważającej większości populacji ludzkiej. Z tego też powodu gatunek ten jest stosunkowo dobrze poznany i opisany w literaturze. Ostatnio zwrócono jednak uwagę na wzrastający udział innych gatunków drożdżaków z rodzaju *Candida*, często określanych mianem *Candida* „non-albicans”, stosunkowo słabo poznanych i opisanych w literaturze. W świetle powyższego zainteresowanie Doktorantki oddziaływaniem białek obecnych na powierzchni ścian komórkowych gatunków *Candida* „non-albicans” z ludzkimi białkami macierzy pozakomórkowej i z komórkami ludzkiego nabłonka należy określić jako bardzo dobrze wpisujące się w aktualny trend badawczy dotyczący zapobiegania i zwalczania infekcji grzybiczych.

Manuskrypt przygotowany został w prawie klasycznej formie i zawiera: Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję i Piśmiennictwo. Lektura manuskryptu utrudniona była brakiem spisu rysunków i tabel, podsumowania i wniosków. Zabrakło także powszechnie dołączanej informacji o dorobku Doktorantki, co w pewnym momencie lektury przyczyniło się do poważnej konsternacji. Otóż autorką rozprawy doktorskiej jest Pani Dorota Satała i taka informacja zawarta jest zarówno na stronie tytułowej rozprawy, jak i w piśmie przewodnim podpisanym przez Dziekana Wydziału. Tymczasem rysunek opatrzony w rozprawie numerem 22 odnalazłem w pracy „Binding of human plasminogen and high-molecular-mass kininogen by cell surface-exposed proteins of *Candida parapsilosis*” opublikowanej w Acta Biochimica Polonica, 2017, Vol. 64, str. 6., a wśród współautorów nie znalazłem nazwiska Satała. Sytuacja taka natychmiast nasuwa myśl o popełnionym plagiacie. Szczęśliwie, wśród współautorów ww. pracy znalazłem Dorotę Zając. Zbieżność imion nasunęła mi myśl, że to może być ta sama osoba. Dalsze poszukiwania pokazały, że chyba nie myliłem się. Poszukując autorki Doroty Satała trafiłem do ResearchGate i tam znalazłem tę samą pracę co powyżej, ale wśród współautorów zamiast Doroty Zając znalazłem Dorotę Satała. Sytuacja w dalszym ciągu nie jest klarowna. W załączeniu recenzji znajduje się zrzut z ekranu researchgate.net oraz fragment tytułowej strony publikacji. Która z tych informacji jest poprawna i czy Pani Dorota Zając to ta sama osoba, co Dorota Satała?

Wstęp pracy napisany jest bardzo komunikatywnie, z wykorzystaniem aktualnej literatury i dobrze przedstawia mechanizmy pośredniczące w inwazji organizmu przez drobnoustroje w ogólności, a drożdżaki w szczególności. Wstęp stanowi dobry punkt wyjścia do sformułowania celu pracy, który wydaje się być jasno zaprezentowany, choć wyjaśnienia wymaga, co Doktorantka rozumie pod pojęciem „bezpośredniej biochemicznej charakterystyki interakcji ...” Czy nie wystarczyłoby tylko „charakterystyki interakcji”? Czy metodę wykorzystującą biosensory SPR można zaliczyć do metod stricte biochemicznych? Zadania zakreślone tak sformułowanym celem pracy są bardzo obszerne i ambitne, ale warte realizacji.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka kolejno przedstawiła:

- Materiały biologiczne, którymi były wybrane szczepy organizmów *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*, a także linia nowotworowych komórek epitelialnych A431. Wszystkie organizmy pochodziły z kolekcji ATCC.
- Białka wykorzystane w trakcie realizacji pracy, głównie fibronektyna, vitronektyna i lamininy, a także trypsyna, albumina wołowa, glukanaza i streptawidyna związana z HRP. We wszystkich przypadkach podano źródło pochodzenia białek.
- Spis użytych odczynników chemicznych uszeregowanych alfabetycznie z podaniem źródła pochodzenia.
- Metody badawcze, w tym:
  - hodowlę komórkową,

- biotynylację i znakowanie fluoresceiną wybranych białek,
- izolowanie białek eksponowanych na powierzchni *Candida* spp.,
- testy dotyczące wiązania znakowanych białek ściany komórkowej *Candida* z białkami ECM, i znakowanych białek ECM z komórkami *Candida*,
- wiązanie białek powierzchniowych *Candida* spp. z komórkami epitelialnymi z wykorzystaniem sieciowania chemicznego,
- typowania białek powierzchniowych *C. glabrata* wiążących fibronektynę metodą „shavingu”,
- oczyszczenie białek powierzchniowych *Candida* spp. z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej i filtracji żelowej,
- elektroforeza SDS-PAGE,
- identyfikacja peptydów metodą spektrometrii masowej LC-MS/MS,
- analiza oddziaływania białek z wykorzystaniem biosensorów SPR,
- analiza oddziaływania białek z wykorzystaniem pomiarów anizotropii fluorescencji,
- statystyczna analiza wyników.

Przedstawiony i wykorzystany przez Doktorantkę zestaw metod badawczych jest bardzo bogaty i podziw budzi poziom ich opanowania i wykorzystania. Metody te dobrane zostały w sposób uzasadniony i mogą dostarczyć wielu bardzo istotnych wyników. Z obowiązku recenzenta i z pewnej ciekawości chciałbym jednak zadać w tym miejscu kilka szczegółowych pytań:

1. Czy temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$  jest wystarczająca dla bankowania komórek ludzkich (str. 52)?
2. Czym podyktowany był wybór ilości immobilizowanych białek (3 pmole VTR i 5 pmoli FN) (str. 55)? Biorąc pod uwagę rozmiary tych białek (masa cząsteczkowa FN jest około 6 razy większa od masy cząsteczkowej VTR) i liczbę zastosowanych do immobilizacji cząsteczek, VTR była znacznie ubożej reprezentowana na powierzchni mikroplitek niż FN.
3. Od czego zależał wybór barwienia żeli po rozdiale elektroforetycznym (str. 63 i 64)?
4. Na stronie 67 jest mowa o podaniu do studzienki 24 pmoli nieznakowanych oczyszczonych białek pochodzących ze ścian komórkowych *Candida* spp. Z jaką dokładnością dokonano oszacowania molarnego stężenia oczyszczonych białek?
5. Czy rozważano metodę chromatografii powinowactwa dla izolowania białek powierzchniowych *Candida* spp., a jeżeli tak, to dlaczego zdecydowano jednak wybrać mniej selektywne metody chromatografii jonowymiennej?
6. Jak rozumieć określenie „składowa elektromagnetyczna wiązki” w opisie zasady działania systemu SPR (str. 68)?
7. Skąd pochodzi informacja, że wartość 1 R.U. odpowiada ilości 1 ng liganda na powierzchni biosensora (str. 98)? W manualu Biacore Sensor Surface Handbook 2003, na stronie 31 znajduje się informacja: „An SPR response 1,000 RU corresponds to a surface concentration of  $1\text{ng}/\text{mm}^2$  for an average protein ligand on Sensor Chip CM5.” Biorąc pod uwagę, że powierzchnia celki przepływowej SPR utworzonej przez sensor i system mikrofluidalny wynosi około  $1\text{mm}^2$  to 1 RU odpowiada masie 1 pg białka na powierzchni sensora. Rozbieżność jest raczej duża.

Rozdział wyniki dość szczegółowo prezentuje uzyskane wyniki badań. Wyniki te przedstawione są w sposób przemyślany i uporządkowany, nie nastroczając większych problemów z ich analizą. Pewien niedosyt budzi wcześniej niezapowiedziane, a w kilku miejscach widoczne ograniczenie badań tylko do FN i VTR z ominięciem LAM, a w niektórych wypadkach ograniczenie badań tylko do FN (przykład – metoda „shavingu”). Podobnie, pomimo zapowiedzi w tytule pracy, Autorka często skupiała się tylko na jednym gatunku drożdżaka, najczęściej *C. glabrata*. W trakcie lektury nasunęło mi się kilka krytycznych uwag:

1. Ilościowa analiza wiązania biotynylowanych białek izolowanych ze ściany komórkowej *C. glabrata* jest utrudniona z powodu różnej gęstości powierzchniowej unieruchomionych białek FN i VTR (str. 75).
2. Nie jest jasne jak zidentyfikowane białka, przedstawione w Tabeli 6, korespondują z prążkami rozdziału elektroforetycznego z Rysunku 19.
3. Dlaczego tylko białko Tdh3 zidentyfikowano przy pomocy różnych metod typowania, to jest chromatografii powinowactwa, sieciowania chemicznego i shavingu? Co z innymi białkami? Dlaczego ich zestaw zależy od metody użytej do typowania?
4. Białko Epa6 ma masę cząsteczkową około 78,5k. W rozdziale elektroforetycznym białko to reprezentowane jest przez prążek położony powyżej 200k. Wyjaśnienie rozbieżności mas cząsteczkowych silną glikozylacją białek z rodziny Epa (str. 89) jest mało prawdopodobne. Oznaczałoby to, że reszty cukrowe generują 2/3 masy białka uwidocznionego w elektroforezie. Czy nie rozpatrywano możliwości oligomeryzacji tych białek?
5. Dlaczego analizy oddziaływania białek ECM i izolowanych białek z organizmów drożdżaków dokonano metodą SPR w temperaturze 25°C, a nie w fizjologicznej temperaturze organizmu atakowanego przez drożdżaki (str. 99 i następne)?
6. Wartości stałych dysocjacji dla analizowanych par białek uzyskane w różnych eksperymentach dobrze ze sobą korelują i wskazują na stosunkowo silne oddziaływania tych białek. Szkoda jednak, że Doktorantka nie wykorzystwała w pełni informacji uzyskanych z wykorzystaniem metody SPR. Metoda ta dostarcza nie tylko równowagowych stałych dysocjacji  $K_D$ , ale także kinetycznych stałych szybkości powstawania  $k_a$  i rozpadu  $k_d$  kompleksów. Dla tej samej wartości równowagowej stałej dysocjacji kinetyka powstawania i rozpadu kompleksu mogą być diametralnie różne. Widać to choćby w parach FN – Hyr i FN – Gpm1 (Tabela 12), dla których wartości stałej  $K_D$  są zbliżone (odpowiednio:  $3,61 \times 10^{-8}$  M i  $3,13 \times 10^{-8}$  M), natomiast stałe szybkości powstawania kompleksu różnią się znacznie (odpowiednio:  $1,21 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> i  $2,27 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Siłą rzeczy dotyczy to także szybkości dysocjacji powstałych kompleksów.

W dyskusji wyników Doktorantka dokonała bardzo obszernego podsumowania uzyskanych wyników i porównania ich z danymi dostępnymi w literaturze przedmiotu. W mojej subiektywnej ocenie jest to najmniej przyjaźnie dla czytelnika napisany fragment pracy. Dopiero kilkukrotne wczytanie się w tekst umożliwiło mi zrozumienie zawartego tam przekazu. Zabrakło mi krótkiego podsumowania oraz wyraźnie wyeksponowanych wniosków. Przyznaję, że liczne fragmenty dyskusji zawierają namiastki podsumowania, ale nie są one wystarczająco czytelne. Poproszę, żeby Doktorantka w trakcie publicznej obrony sformułowała najważniejsze wnioski wypływające z wykonanej pracy.

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i uwag krytycznych stwierdzam, że praca jest bardzo wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze, oraz dokumentuje bardzo dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki do owocnej pracy badawczej. Oceniana praca spełnia wymagania stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami zamieszczonymi w Ustawie z dnia 21 kwietnia 2017 roku.

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Doroty Satała do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową rozprawy, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

Dobra Nowiny, 10 września 2018 roku

*Bogdan Walikowicz*