Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

PRACOWNIA BIOLOGII MEDYCZNEJ
ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Teresa Olczak
Tel. 71 3752 612
E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 8.11.2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marcina Zawrotniaka pt. „Wpływ czynników wirulencji *Candida albicans* oraz promieniowania ultrafioletowego i wybranych leków na proces formowania neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych"

Rozprawa doktorska mgr Marcina Zawrotniaka została zrealizowana w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalityki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Marii Rąpała-Kozik. Promotor Doktoranta od wielu lat zajmuje się badaniami skoncentrowanymi m.in. na mechanizmach związanych z infekcjami grzybiczymi z udziałem *Candida albicans*. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktoranta wpisuje się w nurt tych badań i jest jej istotną kontynuacją. Doktorant w swojej pracy doktorskiej skoncentrował się na szeroko badanym aspekcie tworzenia neutrofilowych zewnątrzkomórkowych pułapek (NET) w przebiegu chorób wywołanych przez mikroorganizmy. Oprócz analizy wpływu wybranych czynników wirulencji *C. albicans* na uwalnianie NET, czyli proces netozy, Doktorant badał także udział promieniowania ultrafioletowego oraz wybranych leków w tym procesie.

Rozprawa doktorska liczy 141 stron i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie.

Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki pracy badawczej, zwłaszcza dla osób, które na co dzień nie zajmują się tą problematyką. Teoretyczny wstęp do pracy doktorskiej został już w części opublikowany z istotnym udziałem Doktoranta.

Doktorant w swojej pracy doktorskiej przedstawił 3 główne cele badawcze: wpływ wybranych czynników biologicznych na przykładzie *C. albicans* na proces netozy, wpływ czynników fizycznych na przykładzie promieniowania ultrafioletowego na proces netozy oraz wpływ wybranych leków na modulację netozy. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane, a część uzyskanych wyników została już nawet opublikowana z istotnym udziałem Doktoranta.

W rozdziale Materiały i metody zostały szczegółowo przedstawione odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane w pracy doktorskiej, a także metody analizy statystycznej. Bardzo dobre jest m.in. przedstawienie protokołu zawierającego poszczególne etapy złożonego doświadczenia w postaci schematu (Rys. 3, str. 43). Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Recenzent wnioskuje, że mgr Marcin

Zawrotniak do realizacji prowadzonych badań wykorzystał różnorodne, nowoczesne metody badawcze, bardzo dobrze dobrane do rozwiązania postawionych problemów naukowych. Zastosowanie interdyscyplinarnych metod i technik, m.in. z zakresu biologii molekularnej, biochemii, immunologii, mikrobiologii, mikroskopii świadczy nie tylko o dobrej wiedzy teoretycznej Doktoranta, który potrafi do realizacji postawionych zadań dobrać odpowiednie metody badawcze, ale także o szerokich umiejętnościach praktycznych. Opisane w pracy wyniki bardzo często zostały uzyskane przy zastosowaniu kilku metod badawczych, co wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta i/lub podatność na korzystanie z wiedzy i doświadczenia promotora pracy doktorskiej. Do realizacji określonych celów badawczych Doktorant wykorzystał np. nie tylko metody biochemiczne z zastosowaniem oczyszczonych białek Sap, ale także metody z zastosowaniem odpowiednich szczepów *C. albicans*, w tym szczepów pozbawionych określonych genów kodujących białka Sap. Świadczy to o rozważnym podejściu do zadań badawczych oraz przedstawiania ostatecznych wniosków.

W rozdziale Wyniki Doktorant w sposób bardzo klarowny przedstawił efekty swojej pracy, a nie jest to proste przy tak rozległym zakresie prowadzonych badań. Bardzo pomocny jest krótki teoretyczny wstęp na początku każdego rozdziału, wprowadzający czytelnika w kolejną część wyników. Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna część to wyniki nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę charakterystyki tak skomplikowanego procesu, jakim jest netoza. Doktorant wykazał, że forma strzępkowa *C. albicans* jest bardziej narażona na tworzenie NET, przy istotnym udziale powierzchniowych β-glukanów i mannanów w porównaniu z białkami powierzchniowymi drożdżaka. Interesujące jest także stwierdzenie, że indukcja netozy przy udziale glukanów i mannanów zachodzi poprzez zaangażowanie odpowiednich, zidentyfikowanych przez Doktoranta receptorów neutrofilowych. Doktorant wykazał udział reaktywnych form tlenu (ROS) tylko w przypadku netozy w odpowiedzi na glukany *C. albicans*. Spośród istotnych dla wirulencji *C. albicans* enzymów Sap, 7 z nich wykazywało zdolność do indukcji netozy, z największym udziałem białka Sap6. Aktywacja netozy przy udziale białek Sap zachodziła niezależnie od ich aktywności proteolitycznej poprzez oddziaływanie z odpowiednimi receptorami. Jak wykazał Doktorant, oddziaływania te mogą być charakterystyczne dla poszczególnych receptorów i korelować z odpowiednimi enzymami. Potwierdza to m.in. fakt, że receptor CD11b był stymulowany głównie przez proteazy form strzępkowych, czyli białka Sap4 i Sap6, a receptory CD16 i CD18 przez proteazy błonowe, czyli białka Sap9 i Sap10. Ciekawe wyniki zostały także uzyskane w doświadczeniach, w których Doktorant analizował wybrane mediatory przekazywania sygnału w ścieżkach netozy, zapoczątkowujące pełne wyjaśnienie tego procesu. Do nowych wyników Doktorant zalicza także wykazanie, że odpowiedź neutrofili jest zależna od liczby komórek oraz formy morfologicznej *C. albicans*, a także istotny udział białek Sap w procesie chemotaksji. Doktorant udowodnił też, że promieniowanie ultrafioletowe bardzo silnie indukuje netozę w mechanizmie zależnym od ROS, ale nie indukuje apoptozy i gwałtownej śmierci neutrofili. Analizowane w ramach pracy doktorskiej wybrane leki z grupy leków mukolitycznych, przeciwuczuleniowych, przeciwzapalnych i hemostatycznych wykazały różny wpływ na proces netozy.

W obszernym rozdziale Wyniki Recenzent nie zauważył błędów merytorycznych, a uzyskane dane (z wyjątkiem kilku drobnych wątpliwości wskazanych poniżej) są przedstawione w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są interesujące nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale mogą one także dostarczyć informacji dla badaczy poszukujących nowych celów do opracowania w przyszłości nowej generacji metod terapeutycznych, stosowanych m.in. w leczeniu chorób wywołanych przez *C. albicans* lub też odmiennego zastosowania znanych obecnie leków.

W rozdziale Dyskusja Doktorant krytycznie ocenia swoje wyniki i ich potencjalne znaczenie oraz odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze. Na uwagę zasługuje rozważne podejście do interpretacji uzyskanych wyników, biorące pod uwagę m.in. mechanizmy kompensacyjne, zachodzące poprzez zmiany w ekspresji genów. W ramach ogólnego podsumowania głównej, obszernej części dyskutowanych wyników, Doktorant przedstawia bardzo pomocny schemat aktywacji netozy przez czynniki wirulencji *C. albicans* (Rys. 42, str. 118). Brak jest w tym rozdziale jedynie zaznaczenia własnego udziału Doktoranta w dostępnej literaturze poprzez częściowe opublikowanie własnych wyników.

Pomimo obszernej i bardzo dobrej dyskusji oraz klarownego przedstawienia uzyskanych wyników, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktoranta do kilku pytań, nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej:

1) We wstępie (str. 28) Doktorant pisze: „Proces generacji NET rozpoczyna się, gdy do jądra komórkowego przemieszczone zostaną elastaza oraz mieloperoksydaza." W jaki sposób zachodzi przemieszczanie tych białek do jądra ? Czy proces transportu tych białek jest specyficzny i/lub regulowany, czy też może być taki sam dla innych białek ?
2) W rozdziale Wyniki (str. 51) Doktorant pisze „Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane, natomiast stymulacja roztworem PMA o stężeniu 25 nM odpowiadała kontroli pozytywnej, dającej maksymalny poziom uwalnianych NET." Podobnie w legendach, m.in. pod Rys. 5, Doktorant pisze „Kontrolę negatywną stanowiły neutrofile niestymulowane, natomiast 25 nM roztwór PMA indukował maksymalny poziom uwalniania NET. Wyniki prezentujące średnią wartość z trzech powtórzeń każdej próbki przedstawiono jako procentowy stosunek sygnału dla badanej próbki do kontroli indukowanej PMA." „Kontrola PMA" pojawia się na niektórych rysunkach (m.in. Rys. 5, 7, 9, 15), a na innych nie jest ona przedstawiona w postaci graficznej (m.in. Rys. 11, 12), chociaż na osi OY jest odniesienie „% kontroli PMA". Recenzent prosi o bardziej szczegółowe wyjaśnienia dotyczące sposobu pomiaru, obliczania i przedstawiania tych danych na rysunkach, szczególnie odniesienie tzw. prób badanych do kontroli PMA podane w % tej kontroli.
3) Czy uwalnianie NET pod wpływem kontaktu z *C. albicans* zmniejszało przeżywalność komórek drożdżaka w warunkach prowadzonych doświadczeń ?
4) Która z form występowania *C. albicans* analizowana w pracy doktorskiej oraz jej wpływ na uwalnianie NET odpowiada komórkom *C. albicans* tworzących biofilm ? Jak Doktorant odniesie swoje wyniki do wyników przedstawionych w opublikowanej niedawno przez Johnson i wsp. pracy (PLoS Pathogens, 2016, 12: e1005884). Praca ta ukazała się po przygotowaniu pracy doktorskiej mgr Marcina Zawrotniaka, więc nie mogła być w niej uwzględniona, ale Recenzent prosi o ustosunkowanie się także do zamieszczonych w niej wyników.
5) W rozdziale Wyniki (str. 85) Doktorant pisze „Zamknięcie zinternalizowanych cząsteczek w pęcherzykach otoczonych błoną świadczy o aktywnym mechanizmie endocytozy badanego enzymu." Zdanie to dotyczy wykazanego przez Doktoranta oddziaływania Sap6 z powierzchnią neutrofili przy udziale receptora CD11b. Ten wynik został uzyskany przez zastosowanie trzech niezależnych metod i jego wartość nie podlega dyskusji. Neutrofile lub makrofagi pobierają ze środowiska na drodze endocytozy wiele białek, znajdujących się w ich otoczeniu. Wiele z tych białek jest następnie transportowane w komórce i obserwuje się je często skupione w pęcherzykach wokół jądra komórkowego. Czy zdaniem Doktoranta taki proces zawsze odbywa się poprzez oddziaływanie ze specyficznymi, określonymi i charakterystycznymi dla danego białka receptorami, czy też komórki układu immunologicznego gospodarza zezwalają „na wejście" do ich wnętrza praktycznie każdego białka wytwarzanego przez patogeny ?

Piśmiennictwo obejmuje 232 pozycje literaturowe, z czego większość to doniesienia z ostatnich lat. Jest to lista, która pozwala na bardzo wyczerpujące przedstawienie badanego problemu. Recenzent nie znajduje w spisie literatury prac opublikowanych przez Doktoranta, czego jednak nie zalicza do błędów.

Pod względem edytorskim praca jest napisana znakomicie i praktycznie nie można znaleźć w niej błędów, a wybrane przykłady Recenzent prezentuje tylko z obowiązku. Bardzo znikome przejęzyczenia (np. pojedyncze zastosowania słowa medium zamiast pożywka, czy też zapis *Vibrio cholera* zamiast *Vibrio cholerae*) są praktycznie niezauważalne. Brak jest również odniesienia do źródła literaturowego dotyczącego metody oczyszczania białek Sap w rozdziale 6.2.4.3 (str. 48).

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Marcina Zawrotniaka nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 4 opublikowane już prace (Acta Biochim Pol, Mini Rev Med Chem, Infect Immun; całkowity współczynnik oddziaływania opublikowanych prac ok. 9). Na uwagę zasługuje także fakt, że część wstępu teoretycznego oraz część wyników pracy doktorskiej zostały właśnie w tych pracach przedstawione. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w pracy doktorskiej, wyniki częściowo już opublikowane oraz pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktoranta, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marcina Zawrotniaka pod względem naukowym całkowicie spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami z dnia 30 października 2015 roku. Dlatego też, wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz ich częściowe opublikowanie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marcina Zawrotniaka stosowną nagrodą.

Teresa Olczak