Kraków, 28.08.2018.

Prof. dr hab. Jerzy Silberring
Katedra Biochemii i Neurobiologii
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Mgr Doroty Satały
pt. *"Oddziaływanie białek adhezyjnych występujących na powierzchni komórek drożdżopodobnych grzybów zaliczanych do grupy Candida non-albicans z ludzkimi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz komórkami nabłonka"*

Rozprawa, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pana Prof. Dr hab. Andrzeja Kozika, dotyczy charakterystyki białek powierzchniowych drożdżaków z grupy *Candida* non-albicans. Częstotliwość występowania kandydoz znacząco wzrasta w ostatniej dekadzie a szacunki wskazują, że jest to już czwarta powszechna przyczyna zakażeń krwi w USA, przy czym zakażenia spowodowane przez *Candida* non-albicans odpowiadają już za ok. 50% tego schorzeń, wywołując m.in. neutropenię oraz prowadząc, w skrajnych przypadkach, do zgonów. W Europie liczba infekcji jest niewiele niższa. Przyczyną zakażeń tego typu jest oporność komórek na powszechne stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania, wiek, leki immunosupresyjne, wprowadzanie do organizmu cewników, wenflonów, implantów, itp., w szczególności na oddziałach intensywnej terapii. Ze względu na rosnącą oporność na fluconazol, lek z wyboru stosowany w przypadku kandydoz, poszukuje

się intensywnie nowych strategii terapeutycznych, co wiąże się z rozpoznaniem molekularnych mechanizmów inwazyjnego działania drożdżaków.

Zważywszy dotychczas zidentyfikowane ok. 150 gatunków *Candida*, z czego jedynie 15 zostało nieco lepiej poznanych, Doktorantka, pod kierunkiem Promotora, Prof. dr hab. Andrzeja Kozika podjęła ambitne zadanie scharakteryzowania białek powierzchniowych grzybów z grupy *Candida* non-albicans.

Dysertacja ma klasyczny układ, obejmujący Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusję. Całość poparta jest adekwatnym piśmiennictwem (274 pozycje), uwzględniającym najnowsze doniesienia literaturowe. Rozprawa, napisana w języku polskim, liczy 164 numerowane strony. Prezentowany dorobek jest oryginalny i stanowi nowość naukową. Brakuje, moim zdaniem, odrębnej informacji o osiągnięciach Doktorantki, poza podaniem numeru grantu NCN Opus 4, dzięki któremu sfinansowano badania. Dyskusja, obejmująca 20 stron przeprowadzona jest rzetelnie i w oparciu o aktualne piśmiennictwo. Pani Mgr Satała zachowuje tu ostrożność w wyciąganiu wniosków i ma też świadomość, że uzyskane wyniki mogą być obarczone niepewnością, wynikającą z natury takich badań.

Cele pracy zostały prawidłowo określone i stanowią oryginalny wkład do nauki międzynarodowej. Wymienić tu należy:

- ✓ izolację i identyfikację białek powierzchniowych patogenów grzybiczych z należących do grupy *Candida* non-albicans, biorących udział w procesach adhezji;
- ✓ ilościowe określenie powinowactwa tych białek do składników macierzy zewnątrzkomórkowej komórek ludzkich w hodowli;

Pani Mgr Satała umiejętnie wykorzystała w swoich badaniach szereg zaawansowanych i trudnych technik analitycznych, w tym m.in. spektrometrię mas w połączeniu z chromatografią cieczową, anizotropię fluorescencji oraz powierzchniowy rezonans plazmonowy. Dodatkowo, projekt wymagał dobrej znajomości prowadzenia hodowli komórkowych, izolacji białek i sporej liczby metod podstawowych (biotynylacja, znakowanie fluoresceiną, techniki proteomiczne, itp.).

Metody badawcze zostały dobrane poprawnie a ich klarowny opis oraz uzyskane rezultaty poparte są odpowiednią liczbą rycin, wykresów i tabel, nie budzą zastrzeżeń a ich opisy są rzetelne. Liczba technik i prezentowane wyniki świadczą o dobrej znajomości analityki biochemicznej i sprawności Doktorantki w posługiwaniu się nimi.

Do najważniejszych osiągnięć Pani Mgr Doroty Satały zaliczyć należy:

- identyfikację białek powierzchniowych drożdżaków z grupy *Candida* non-albicans
- ilościowe przebadanie oddziaływania tych białek z fibronektyną i witronektyną
- oszacowanie siły oddziaływań białek atypowych na powierzchni patogenów z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej
- przebadanie adsorpcji wyizolowanych białek z komórkami epitelialnymi.

Zadania, postawione przed Doktorantką, zostały zrealizowane w całości a uzyskane wyniki są rzetelne i cechują się oryginalnością naukową. W pracy nie zauważyłem poważniejszych błędów. Chciałbym w tym miejscu podkreślić dużą roztropność i ostrożność Eksperymentatorki w wyciąganiu wniosków. Pani Mgr Satała przezornie sprawdziła także specyficzność wiązania biotynylowanych białek (1.2.3, str. 76) wyizolowanych z C. glabrata, do immobilizowanej fibronektyny i witronektyny. Badanie powinowactwa oparte na biotynylowanych białkach nie należy do swoistych, a uzyskane wyniki obarczone są rozrzutem i znaczną niepewnością. Potwierdzają to prezentowane efekty kompetycji fibronektyny i witronektyny z białkami powierzchniowymi, gdzie wykazano 40-50% udział wiązań niespecyficznych. Problem ten przypomina, opublikowane w 1975r., wyniki P. Cuatrecasasa nt. interakcji ligand-receptor, gdzie autor wykazał kompetycyjne wiązanie znakowanych peptydów opioidowych m.in. do kulek szklanych.

W związku z interesującymi wynikami, uzyskanymi w trakcie realizacji projektu doktorskiego, nasuwa się kilka pytań, które chciałbym omówić z Doktorantką w trakcie publicznej obrony:

- Szczegółowa analiza białek powierzchniowych wykazała, że atypowe białka identyfikowane są ze znaczenie lepszym prawdopodobieństwem (score oraz pokrycie sekwencji) niż klasyczne adhezyny (str. 89-91). Czy wskazuje to na wyższe stężenie atypowych białek na powierzchni komórek, czy należałoby uwzględnić też inne przyczyny tego faktu?
- W Tabeli 8, str. 84 zidentyfikowano ludzką fibronektynę na powierzchni C. glabrata. Mając na uwadze fakt, że hodowla prowadzona była w obecności dużego stężenia fibronektyny (200 ug/ml), nasuwa się pewna wątpliwość czy obecność tego białka jest potwierdzeniem rzeczywistego wiązania do powierzchni komórek, czy raczej wynika z niespecyficznej adsorpcji do powierzchni komórek w trakcie inkubacji?

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie formalne wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011r. nr 84, poz. 455). Zatem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani Mgr Doroty Satały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Siłberring

Uwagi

Poniższe uwagi nie pomniejszają w żaden sposób wysokiego poziomu merytorycznego dysertacji i wymienione zostały celem wykorzystania w ew. przyszłych badaniach.

- Jak Pani Mgr Satała sama wzmiankuje (str. 31), jednym z istotnych mechanizmów inicjacji zakażeń grzybiczych jest zdolność adhezji patogenu do różnych powierzchni. Wymieniono tu szereg sztucznych powierzchni

materiałów (tworzywa sztuczne), ale w rozprawie nie podjęto choćby wstępnych badań na ten temat.

- str. 53: mając na uwadze budowę ściany komórkowej, glukany są trudno dostępne dla hydrolaz ze względu na efekty steryczne. Czy Doktorantka podjęła próbę oszacowania wydajności izolacji białek powierzchniowych? Czy wydajność miała wpływ na ew. niepewność identyfikacji białek?
- w rozprawie zauważyłem brak wykazu osiągnieć Doktorantki
- W Tabeli 16, str. 116 wykazano listę zidentyfikowanych białek ze ścian komórkowych poszczególnych rodzajów komórek patogennych. Nie pojawia się tu nigdzie wspominane wcześniej i wyizolowane przez Doktorantkę białko Hyr. Wskazana byłaby przynajmniej wzmianka na ten temat w Dyskusji wyników.
- Czy zakładano różnice w wynikach "po nocnej dializie..." (str. 139) i ew. "dziennej" dializie? Czy wybór pory dnia dla przebiegu dializy miał znaczenie metodologiczne?