



UNIwersytet Warszawski WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+22) 55-41-304, FAX: (+22) 55-41-304

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR ALEKSANDRY ŻELAZNEJ „Występowanie i dodatkowa funkcja fosfogliceromutazy na powierzchni komórek drożdżopodobnych grzybów z rodzaju *Candida*”

Grzyby z rodzaju *Candida* spp. występują naturalnie w naszym otoczeniu od zawsze. Te zwykle niegroźne grzyby w przypadku naruszenia równowagi związanej z odpornością immunologiczną bądź zaburzeniami w mikrobiomie naszego organizmu nagle stają się niezwykle aktywne prowadząc do groźnych infekcji powierzchniowych lub nawet infekcji systemowych. Za kandydozę czyli chorobę grzybiczą wywołaną przez nadmierne namnażanie się drożdżaków z rodzaju *Candida* odpowiada głównie *Candida albicans* (50–70% przypadków) i w mniejszym zakresie także gatunki, takie jak: *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* czy *Candida tropicalis*. Prace badawcze prowadzące do poznawania mechanizmów molekularnych procesu patogenezy są niezwykle ważne, albowiem pozwalają na zrozumienie powstawania i przebieg zakażeń grzybiczych, pozwalają także na znalezienie drogi prowadzącej do eradykacji tych, jak się w końcu okazuje, bardzo groźnych patogenów drożdżoidalnych. Problem oporności tych drobnoustrojów na stosowane leki jest obecnie podobny jak w przypadku bakterii, dlatego też jeszcze większego znaczenia nabierają badania nad molekularnymi mechanizmami patogenezy grzybów chorobotwórczych. Praca doktorska Pani mgr inż. Agaty Żelaznej doskonale wpisuje się właśnie w ten nurt badań naukowych, które dążą do poznania mechanizmów patogenezy spowodowanej przez grzyby drożdżoidalne, a tym samym w konsekwencji do nowych skutecznych rozwiązań w walce z opornymi na leki drobnoustroje. Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej są drożdżopodobne grzyby z rodzaju *Candida*, w tym *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, a także wcześniej zaliczany do rodzaju *Candida* gatunek *Nakaseomyces glabrata*. Rozprawę doktorską zrealizowano w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Pana Profesora Andrzeja Kozika. Praca powstała w ramach badań naukowych prowadzonych w Zakładzie, wynikających z realizacji projektów badawczych dotyczących badań prowadzących do poznawania molekularnych mechanizmów procesu patogenezy powodowanej przez

drożdżaki. Badania te są niezwykle istotne z punktu widzenia medycyny, szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę to, że szczepy *Candida albicans* zajmują w kraju czwarte miejsce wśród wszystkich patogenów wywołujących zakażenia pacjentów przebywających na oddziałach intensywnej opieki medycznej. Drugim w kolejności patogenem z tego rodzaju jest *Candida glabrata*. Z kolei *Candida tropicalis* występuje najczęściej u chorych na białaczkę, a *Candida parapsilosis* wywołuje kandydozy towarzyszące długotrwałemu cewnikowaniu lub stosowaniu urządzeń protetycznych. Szczepy *Candida spp.* charakteryzują się różnorodną aktywnością enzymatyczną – grzyb wytwarza liczne enzymy hydrolityczne, które atakują błony komórkowe gospodarza, co ułatwia adhezję i kolonizację błon śluzowych oraz trawienie komórek odpornościowych i przeciwciał. Szczepy, które nie mają zdolności do produkcji enzymów, pozbawione są właściwości chorobotwórczych. Dodatkowo jeden ze składników ściany komórkowej grzyba – mannan – zaburza funkcję ludzkich neutrofilów, hamuje uwalnianie mieloperoksydazy oraz działa niszcząco na tkanki gospodarza. Z tego powodu wybór jako obiektu badawczego fosfogliceromutazy (Gpm1), kofaktoro-zależnej izomerazy zaangażowanej w szlak glikolizy było w szczepach *Candida* jak najbardziej uzasadnione. Dotychczas zostało opisanych kilka zewnątrzkomórkowych funkcji Gpm1, pełnionych na powierzchni komórek drożdżaków, a zalicza się do nich oddziaływanie z ludzkimi białkami: prekalikreina, wielkocząsteczkowym kininogenem (HMWK), czynnikiem XII i plazminogenem, a także czynnikami H i FHL układu dopełniacza oraz wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) takich jak fibronektyna (Fn), witronektyna (Vtr) czy laminina. Szczegółowa analiza molekularna Gpm1 stała się przedmiotem przedstawionej do oceny dysertacji. Na podstawie licznych wyników w pracy wykazano obecność Gpm1 na powierzchni komórek badanych drożdżaków poprzez obserwacje mikroskopowe po wizualizacji za pomocą przeciwciał skierowanych na Gpm1 z *S. cerevisiae* (anty-Gpm1) oraz w ekstraktach ściany komórkowej przy użyciu techniki Western blotting. Oprócz tego, porównanie aktywności enzymatycznej rekombinowanych preparatów Gpm1 z enzymami wyizolowanymi i oczyszczonymi ze ściany komórkowej drożdżaków wykazało, że rekombinowana Gpm1 wykazuje znacznie wyższą aktywność niż pozyskana z powierzchni drożdżaków. Następnie mikropłytkowymi testami wiązania potwierdzono oddziaływanie Gpm1 z wybranymi białkami ludzkimi (Fn, Vtr i HMWK). Oprócz tego, blokując powierzchnię komórek *Candida spp.* oraz *Nakaseomyces glabrata* przeciwciałami anty-Gpm1, oszacowano udział Gpm1 w całkowitym wiązaniu ludzkich białek przez całe komórki drożdżaka na około 25% w stosunku do wszystkich składników ściany komórkowej. Wykonano także mapowanie miejsc oddziaływań Gpm1 – białka ludzkie przy zastosowaniu

sieciowania chemicznego i spektrometrii mas, z potwierdzeniem przy użyciu mikropłytkowych testów konkurencji z zastosowaniem syntetycznych peptydów, odpowiadających wskazanym odcinkom sekwencji białek – zarówno w Gpm1 jak i w białkach ludzkich. Opisano także szczegółowo konkretne peptydy w białkach ludzkich wiążące Gpm1. Świetnym pod względem eksperymentalnym było wykazanie zdolności Gpm1 do oddziaływania z powierzchnią komórek badanych drożdżaków poprzez dodatek znakowanego biotyną Gpm1 do monowarstwy komórek drożdżaków *Candida spp.* oraz *N. glabrata*. W ekstraktach ściany komórkowej drożdżaków, posługując się metodą sieciowania chemicznego, ujawniono białka potencjalnie oddziałujące z Gpm1 na powierzchni drożdżaków, a wśród nich inne białka zwane „moonlighting”, jak i typowe białkowe składniki ściany komórkowej. Kolejnym wynikiem wskazującym na oddziaływanie Gpm1 z adhezynami był wynik eksperymentu z oddziaływania Gpm1 na adhezyny jako potencjalne „platformy dokujące” dla białek „moonlighting przy użyciu mutantów *Saccharomyces cerevisiae* eksponujących na powierzchni komórki adhezyny *C. albicans*. Następnie wyizolowano i oczyszczono adhezynę Als3 ze ściany komórkowej *C. albicans* oraz wykazano, że Als3 oddziałuje z Gpm1 poprzez podobne miejsca jak w przypadku wiązania ludzkich białek. Wszystkie wyniki uzyskane przez doktorantkę mają duże znaczenie dla procesu poznawczego w zakresie mechanizmów patogenezы grzybów drożdżoidalnych. Jestem w pełni przekonany, że w wyniku realizacji planu badawczego na podstawie ocenianej rozprawy doktorskiej powstanie lub już powstało kilka publikacji dotyczących charakterystyki molekularnej cytoplazmatycznego enzymu Gpm1. Program badawczy doktorantki z całą pewnością wnosi do nauki nowe spojrzenie na działanie czynników patogenezы i wyjaśnia szereg mechanizmów w łańcuchu powiązań między patogenem a komórką gospodarza. Wynik wskazujący na fakt, że adhezyna Als3 występująca głównie w strzępkach *C. albicans* stanowi platformę dla Gpm1, ale w momencie pojawienia się ludzkiego ligandu pełni dla niego rolę ekspozycyjną należy uznać za odkrycie naukowe i mocno podkreślić w doktoracie. Jednak mimo uzyskania wielu wyników o charakterze odkrywczym, pewnie z powodu wrodzonej skromności, doktorantka nie podkreśla zbyt mocno. Szkoda, bo rzeczywiście wyniki uzyskane przez doktorantkę na to zasługują. Dalsza charakterystyka właściwości Gpm1 wymaga zapewne użycia mutantów o zmienionych właściwościach poszczególnych domen białkowych i oceny tych zmian dla procesu patogenezы. Zakładam, że takie badania molekularne są planowane, co może przyczynić się do uzyskania kolejnych informacji o właściwościach Gpm1. Przedstawiona do oceny praca doktorska ma klasyczny układ, tj. składa się z obszernego wstępu na temat patogenezы

drożdżaków po czym następuje opis zaawansowanych metod używanych w zakresie biologii komórki, biologii molekularnej, genetyki i mikrobiologii. Właściwy dobór metodyki gwarantuje jakość uzyskanych wyników. Doktorantka bardzo szczegółowo i rzetelnie omówiła wyniki swojej pracy i ich znaczenie, konfrontując swoje obserwacje z danymi literaturowymi w rozdziale dyskusja. Sposób przedyskutowania i interpretacji wyników dowodzi znakomitej orientacji i dużej wiedzy w zakresie tematyki badawczej. Zarówno dyskusja jak i cały tekst rozprawy doktorskiej jest bardzo dobrze udokumentowany starannie dobranym piśmiennictwem. Cała praca jest starannie zredagowana, a przejrzyste sformułowany tekst został napisany poprawnie. Nieliczne przypadki błędów literowych czy językowych nie mają wpływu na wysoką jakość pracy. Do osiągnięć rozprawy wśród licznie przedstawionych wyników należy także zaliczyć udane przygotowanie warsztatu badawczego w postaci realizowanych zadań badawczych oraz ocena i wyjaśnienie mechanizmów działania Gpm1. Zaprojektowanie eksperymentów oraz pełna charakterystyka biologiczna badanych procesów wymagała dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba eksperymentów i liczba wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej jest duża. Szczegółowa analiza eksperymentów realizowanych przez Doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej pozwala z całą pewnością na ostateczne stwierdzenie, iż była ona świetnie przygotowana do eksperymentów prowadzących do powstania dysertacji. Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Żelaznej daje podstawę do dalszej pracy nad mechanizmami patogenezы grzybów drożdżoidalnych. Doktorantka nie rozważa jednak konkretnie o perspektywach dalszych badań będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy, nie dyskutuje także o ewentualnych kolejnych eksperymentach prowadzących do możliwości poznania innych czynników patogenezы. Chciałbym jednak poznać jej plany i opinię na ten temat podczas obrony pracy.

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Aleksandry Żelaznej, w tym szczególnie wartości naukowej wyników oraz istotnych wniosków o charakterze poznawczym stwierdzam, że oceniana praca doktorska w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim i stanowi świetną podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Dlatego z pełnym, naukowym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Aleksandry Żelaznej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 01. 09. 2023.


Prof. dr hab. Jacek Bielecki