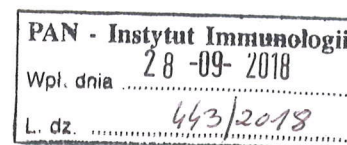


dr hab. Dorota Hoja-Łukowicz

Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48) 12 664 64 66
E-mail: dorota.hoja-lukowicz@uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE



Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. **AGATY ZERKI**

pt.

**„Badanie swoistości rekombinowanych ligandów EBA merozoitów
zarodźca *Plasmodium*”**

wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Ewy Jaśkiewicz

w Laboratorium Glikobiologii, Zakładu Immunochemii, Instytutu Immunoterapii
Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się trzy oryginalne prace eksperymentalne oraz dwie prace przeglądowe – wszystkie opublikowane w renomowanych czasopismach kategorii A ujednoliconej listy czasopism punktowanych MNiSW o łącznej wartości współczynnika wpływu 13,333; a zatem przedstawione wyniki były już poddane surowej ocenie recenzentów. Zbiór artykułów poprzedzony jest ośmioma rozdziałami, m. in. STRESZCZENIAMI w języku polskim i angielskim, następnie WPROWADZENIEM, w którym Doktorantka przedstawia rozpatrywane w literaturze hipotezy co do początków ewolucji zarodźca *Plasmodium falciparum* – najbardziej zjadliwego gatunku pośród zarodźców pasożytujących w organizmie człowieka, przedstawia aktualny stan wiedzy nt. molekularnych podstaw wysokiej swoistości homologicznych ligandów EBA-140 z blisko spokrewnionych zarodźców tj. ludzkiego *P. falciparum* i szympaniego *P. reichenowi* oraz wykazuje, że zmiany w genomie zarodźca *Plasmodium* stanowią doskonały przykład presji ewolucyjnej wywołanej przez patogen na organizm ludzki

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

w celu wytworzenia nowych szlaków inwazji i ograniczenia skuteczności działania leków. Szczegółowe i wyczerpujące rozszerzenie do tej części WPROWADZENIA stanowi pierwsza publikacja przeglądowa zatytułowana "Ewolucja *Plasmodium falciparum* – z punktu widzenia zarodźca malarii" [1]. W dalszej części WPROWADZENIA Doktorantka wymienia szczegółowe cele badawcze, uzasadnia wybór modelu badawczego, wyjaśnia znaczenie uzyskanych wyników oraz skrótowo omawia publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej. Rozdział WPROWADZENIE zakończony jest podsumowaniem uzyskanych osiągnięć i wnioskami końcowymi. Deklarowany udział procentowy oraz zakres zrealizowanych przez Doktorantkę zadań badawczych, przyczyniających się do powstania każdej z publikacji (we wszystkich publikacjach eksperymentalnych i jednym artykule przeglądowym jest pierwszym autorem), są znaczące i świadczą o posiadaniu dogłębnej wiedzy tematycznej oraz bardzo dobrym opanowaniu złożonego i nowoczesnego warsztatu badawczego z zakresu inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, biochemii, hodowli komórkowej czy technik spektroskopowych. Kolejny rozdział to OMÓWIENIE DALSZYCH, NIEOPUBLIKOWANYCH BADAŃ ZWIĄZANYCH Z ZAPREZENTOWANYM OSIĄGNIĘCIEM NAUKOWYM ORAZ PRZEDSTAWIENIE PLANÓW BADAWCZYCH WRAZ Z ICH ZNACZENIEM. Informacje zawarte w tym rozdziale nie wchodzą w zakres przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, a zatem nie podlegają ocenie recenzenta. Warto jedna zauważyć, że wskazują one na umiejętności Doktorantki w nawiązywaniu współpracy z innymi badaczami oraz na skuteczność w pozyskiwaniu funduszy na badania.

Proces inwazji erytrocytów przez jednokomórkowego pierwotniaka z rodzaju *Plasmodium* ma kluczowe znaczenie w patogenezie malarii i rozwoju zarodźca, i obejmuje szereg etapów, z których najbardziej krytycznym dla powodzenia inwazji jest etap adhezji merozoitów do powierzchni erytrocytu. Adhezja ta jest kontrolowana przez zależne oraz niezależne od kwasu sjałowego interakcje pomiędzy wieloma ligandami pasożyta i swoistymi dla nich receptorami na komórkach gospodarza. Ta różnorodność ligandów umożliwia wykorzystanie alternatywnych dróg inwazji, w zależności od dostępności receptorów na erytrocytach, a w konsekwencji zapewnia skuteczność inwazji. Jednym z ligandów jest antygen wiążący erytrocyt EBA-140, który od wielu lat jest przedmiotem badań prowadzonych przez Panią Prof. Ewę Jaśkiewicz i współpracowników nad wyjaśnieniem molekularnych podstaw swoistego rozpoznania erytrocytów człowieka przez

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Regionu II liganda EBA-140 zarodźca *P. reichenowi* wykorzystując w tym celu bakulowirusowy system ekspresji w komórkach owadzych linii High Five. Metodę chromatografii metalopowinowactwa użyła do oczyszczenia rekombinowanego białka, a jego czystość potwierdziła metodą sączenia molekularnego. Następnie dowiodła, że rekombinowane białko jest w pełni funkcjonalne, gdyż posiada drugorzędową strukturę α -helisy (technika dichroizmu kołowego; CD) oraz swoiście wiąże się do erytrocytów szympanśich, a wiązanie zależne jest od obecności kwasu sjałowego na cząsteczce wówczas jeszcze nieznanego receptora (technika cytometrii przepływowej oraz technika powierzchniowego rezonansu plazmonowego; SPR). Szkoda, że na podstawie otrzymanych sensogramów, Doktorantka nie pokusiła się o przeprowadzenie pogłębionej analizy oddziaływania region wiążący-receptor wyliczając kinetyczne i termodynamiczne parametry charakteryzujące mechanizm tego oddziaływanie takie jak stała asocjacji (k_a), stała dysocjacji (k_d), czy stała równowagi (K_D). Uzyskując analogiczne dane dla oddziaływania region wiążący-receptor dla *P. falciparum* i erytrocytów ludzkich oraz dla oddziaływań mieszanych mogłaby dokładniej scharakteryzować mechanizmy tych oddziaływań i wyciągnąć wnioski co do różnic w ich powinowactwie czy swoistości.

W trzeciej pracy eksperymentalnej [4], Pani mgr inż. Zerka przytoczyła powszechnie uznaną teorię, iż glikoforyna C, receptor dla liganda EBA-140 *P. falciparum*, występuje tylko u ludzi i brak jej u małp człekokształtnych. W toku ewolucji w linii ludzkiej doszło do mutacji w genie *GYPC* co skutkowało pojawieniem się dodatkowego miejsca inicjacji translacji. W konsekwencji u ludzi z pojedynczego transkryptu mRNA powstają dwa produkty białkowe tj. glikoforyna C oraz krótsza o 21 N-końcowych aminokwasów glikoforyna D. Następnie, Doktorantka postawiła hipotezę, że to właśnie glikoforyna D może być receptorem dla liganda EBA-140 zarodźca *P. reichenowi*. Ponadto, na podstawie analizy porównawczej sekwencji aminokwasowych ludzkich glikoforyn C i D oraz szympanśiej glikoforyny D, wysunęła przypuszczenie, iż w przeciwieństwie do ludzkich glikoforyn, które są wrażliwe na trawienie trypsyną, szympanśia glikoforyna D powinna podlegać trawieniu chymotrypsyną. W celu potwierdzenia swoich przypuszczeń, Doktorantka analizowała metodami cytometrii przepływowej oraz Western blot overlay oddziaływanie rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140 zarodźca *P. reichenowi* z szympanśimi erytrocytami nietrawionymi oraz trawionymi trypsyną lub chymotrypsyną. Stosując

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

zarodziec sierpowaty *P. falciparum*. W wiązaniu bierze udział Region II, wysoce uporządkowana dwudomenowa struktura zewnątrzkomórkowa liganda EBA-140, a receptorem w błonie erytrocytów jest sialoproteina – glikoforyna C, w szczególności dwa obszary łańcucha polipeptydowego oraz klaster utworzony z usjalowanych O-glikanów i N-glikanu w jej N-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego. Zasadniczo, swoistość gatunkowa oddziaływań gospodarz-pasożyt może być badana przy użyciu rekombinowanych białek, ale techniczne wyzwania związane z ekspresją w pełni funkcjonalnych białek *Plasmodium* w formie rekombinowanej sprawiły, że dotychczas ten model badawczy opisany został w stosunkowo niewielu pracach. Zespół Pani Prof. Jaśkiewicz opracował wydajną metodę otrzymywania rekombinowanego Region II liganda EBA-140 *P. falciparum* w komórkach owadzych, i wykazał, iż jest on prawidłowo sfałdowany i w pełni funkcjonalny.

W pierwszej pracy eksperymentalnej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej [2], Pani mgr inż. Agata Zerka potwierdziła właściwości antygenowe i immunogenne rekombinowanego Regionu II otrzymanego w systemie bakulowirusowym stosując metodę Western blot oraz test immunoenzymatyczny (ELISA) z użyciem wcześniej otrzymanej poliklonalnej surowicy króliczej skierowanej przeciwko rekombinowanemu Regionowi II liganda EBA-140 *P. falciparum*. Szczególnie cenne są wyniki analizy metodą cytometrii przepływowej dowodzące, iż rekombinowany Region II wykazuje właściwości biologiczne, tj. posiada zdolność swoistego wiązania się do powierzchni ludzkich erytrocytów. Zatem może być potencjalnym immunogenem w wieloskładnikowej szczepionce przeciwmalarycznej. Z kolei test ELISA, wykonany z użyciem surowic pacjentów z historią malarii wywołanej przez *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. malariae*, potwierdza rozpoznanie rekombinowanego Regionu II przez seropozytywne surowice. Wyniki te sugerują, że rekombinowany region wiążący, potencjalnie może być wykorzystany w celu monitorowania postępu choroby czy odpowiedzi na leczenie.

Sekwencje aminokwasowe białek EBA-140 ludzkiego zarodźca *P. falciparum* i szympaniego *P. reichenowi* są w ponad 80% identyczne, a najwyższy stopień pokrycia sekwencji obu białek obserwowany jest w regionach wiążących receptory erytrocytów gospodarzy. W drugiej pracy eksperymentalnej [3], Doktorantka przedstawiła opracowaną przez siebie metodę otrzymywania na dużą skalę rozpuszczalnego rekombinowanego

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

immunodetekcję na blocie przy użyciu przeciwciał MoAb 2G11 zasugerowała, że glikoforyna D w błonie erytrocytów szympansi jest receptorem dla regionu wiążącego liganda EBA-140 zarodźca *P. reichenowi*. Co ciekawe, Doktorantka wykazała, że Region II liganda EBA-140 *P. reichenowi* rozpoznaje również ludzkie glikoforyny C i D, podczas gdy Region II liganda EBA-140 *P. falciparum* wiąże się wyłącznie do ludzkiej glikoforyny C. Na podstawie tak zinterpretowanych wyników oraz w oparciu o uznane fakty co do ewolucyjnie wcześniejszego pojawienia się zarodźca *P. reichenowi* w stosunku do zarodźca *P. falciparum*, Doktorantka skonkludowała, że glikoforyna D jest receptorem pierwotnym rozpoznawanym przez *P. reichenowi*, natomiast *P. falciparum* przystosował się do bogatych w glikoforynę C erytrocytów ludzkich, zapewniając sobie wysoką swoistość oraz szczególną zjadliwość względem gospodarza.

Ostatnia z przedstawionych do recenzji praca to artykuł przeglądowy dotyczący antygenów grupowych układu Gerbich, których nośnikami są glikoforyny C i D. Została omówiona struktura i funkcja obu glikoforyn oraz serologiczne znaczenie antygenów Gerbich, zarówno tych bardziej jak i mniej rozpowszechnionych. Ponadto, omówiono podstawy molekularne oddziaływania ligandów *Plasmodium* z ich swoistymi receptorami na erytrocytach gospodarza ze szczególnym uwzględnieniem obu glikoforyn oraz omówiono przypadki mutacji prowadzących do utraty bardziej rozpowszechnionych antygenów Gerbich jako przykłady ewolucyjnie wykształconego fenotypu obronnego u mieszkańców z terenów endemicznych malarii.

Pani mg inż. Agata Zerka przedstawiła wyniki swoich badań w postaci zbioru publikacji, co tłumaczy dość mało szczegółowy opis metodyczny przeprowadzonych badań, a przez to generuje szereg pytań.

Pytania:

- 1) Z cytowanego przez Doktorantkę artykułu [5] oraz z innych pozycji literaturowych [np. 6] wiadomo, że epitopem rozpoznawanym przez przeciwciało NAM89-2G11 (używany skrót MoAb 2G11) jest sekwencja LEGPDP, w której kluczową rolę odgrywa reszta leucyny. Z tego powodu przeciwciało MoAb 2G11 wiąże się do ludzkiej glikoforyny C i nie rozpoznaje ludzkiej glikoforyny D. Zatem na jakiej podstawie, w publikacji [3] Fig. 6 oraz w publikacji [4] Fig.2, Autorka twierdzi, że pozytywna reakcja z przeciwciałem MoAb 2G11 dowodzi obecności GPD na szympansi erytrocytach? Skoro GPC występuje

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

tylko u ludzi, dlaczego do detekcji nie użyto np. przeciwciała MoAb 1F6, o którym wiadomo, że rozpoznaje epitop zlokalizowany w wysoce konserwatywnym C-końcu obu glikoforyn. W rozprawie doktorskiej brakuje odpowiedniego komentarza.

- 2) Posiłkując się trawieniami enzymami proteolitycznymi (trypsyna i chymotrypsyna) oraz metodą Western blot, Doktorantka doszła do wniosku, że glikoforyna D (prążek białkowy o względnej masie cząsteczkowej ok. 35 kDa) jest receptorem na erytrocytach szympanich dla rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140 *P. reichenowi*, natomiast pozostałe prążki o wyższych masach cząsteczkowych, widoczne w przypadku erytrocytów szympanich nietrawionych i trawionych trypsyną, są pozytywne względem Regionu II liganda EBA-140 *P. reichenowi* ze względu na przypuszczalną obecność kompleksów między glikoforyną D a cząsteczkami innych glikoforyn (publikacja [4] Fig.2). Dlaczego zatem, po immunodetekcji z użyciem MoAb 2G11 (pomijając ich specyfikę wiązaniową) na blocie dla próbek nietrawionej i trawionej trypsyną nie widać prążków o wyższych masach cząsteczkowych? Czy nie należało wykonać identyfikacji białek, np. metodą spektrometrii mas, we wszystkich prążkach RII-pozytywnych? Dlaczego Autorka uznała, że obserwowany w immunodetekcji prążek białkowy zawiera glikoforynę D, skoro używała przeciwciał rozpoznających glikoforynę C?
- 3) Dlaczego w doświadczeniu z użyciem cytometrii przepływowej [3] Doktorantka nie wykonała prób kontrolnych tj. blokowania glikoforyny D specyficznymi przeciwciałami lub blokowania rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140 *P. reichenowi* otrzymaną wcześniej specyficzną surowicą szczurzą celem potwierdzenia specyficzności oddziaływania pomiędzy Regionem II liganda a GPD na erytrocytach? Podobne blokowania można było wykonać w teście ELISA. Pozytywny wynik prób kontrolnych były mocniejszym potwierdzeniem, iż szympania glikoforyna D jest receptorem dla liganda EBA-140 *P. reichenowi*.
- 4) Jak wytłumaczyć otrzymanie przeciwstawnych wyników co do niewiązania się [3] (metoda cytometrii przepływowej) oraz wiązania się [4] (metoda Western blot) rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140 *P. reichenowi* do erytrocytów ludzkich? W podrozdziale 6.3

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

rozprawy doktorskiej omawiającym te dwie publikacje brakuje odpowiedniego komentarza.

- 5) Dlaczego w cytometrii przepływowej nie wykonano właściwej próby kontrolnej do reakcji erytrocytów z przeciwciałami MoAb 2G11, tj. reakcji erytrocytów z przeciwciałami izotypowymi (publikacja [3] Fig. 6)?
- 6) W trzecim artykule eksperymentalnym [4] Doktorantka sugeruje, że tryptofan W27 w szympansej glikoforynie D stanowi miejsce cięcia łańcucha polipeptydowego przez chymotrypsynę. Mimo, że Trp w pozycji P1 jest preferencyjnym miejscem cięcia dla chymotrypsyny, to obecność Met w pozycji P1' silnie blokuje aktywność chymotrypsyny [7]. Czy bardziej prawdopodobnymi miejscami cięcia proteolitycznego nie są jednak metioniny M20 i M28?

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych błędach literowych i edytorskich, które jednak nie mają wpływu na merytoryczną stronę pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę ważność tematyczną przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz uzyskane wyniki mogę z pełną odpowiedzialnością stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Zerki pt. „Badanie swoistości rekombinowanych ligandów EBA merozoitów zarodźca *Plasmodium*” spełnia wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595) oraz w Rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 roku zatem zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Zerki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

Doktor Agata Zerka

Kraków, 19 września 2018 r.

Literatura

- [1] Zerka A, Kaczmarek R, Jaśkiewicz E. Ewolucja *Plasmodium falciparum* – z punktu widzenia zarodźca malarii. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1519-1529.
- [2] Zerka A, Rydzak J, Lass A, Szostakowska B, Nahorski W, Wroczyńska A, Myjak P, Krotkiewski H, Jaskiewicz E. Studies on Immunogenicity and Antigenicity of Baculovirus-Expressed Binding Region of *Plasmodium falciparum* EBA-140 Merozoite Ligand. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016;64:149-156.
- [3] Zerka A, Olechwiec A, Rydzak J, Kaczmarek R, Jaskiewicz E. Baculovirus-expressed *Plasmodium reichenowi* EBA-140 merozoite ligand is host specific. *Parasitol Int.* 2016; 65: 708-714
- [4] Zerka A, Kaczmarek R, Czerwinski M, Jaskiewicz E. *Plasmodium reichenowi* EBA-140 merozoite ligand binds to glycophorin D on chimpanzee red blood cells, shedding new light on origins of *Plasmodium falciparum*. *Parasit & Vectors* 2017;10:554
- [5] Jaskiewicz E, Czerwinski M, Colin Y, Lisowska E. Recombinant forms of Gerbich blood group antigens: expression and purification. *Transfus Clin Biol* 2002; 9:121-129.
- [6] The molecular immunology of complex carbohydrates – 2 [red. Albert M. Wu] Springer Science+Business Media New York.[7] Keil, B., Specificity of proteolysis. Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg-NewYork, 1992.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>