

Dr hab. Małgorzata Cytryńska, prof. nadzw. UMCS
Zakład Immunobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

Ocena rozprawy doktorskiej

**pt. „Podatność ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych na działanie proteaz aspartylowych wydzielanych przez patogenne drożdżaki z gatunku *Candida albicans*”
przedstawionej przez Panią magister OLIVIĘ BOCHEŃSKĄ**

Rodzina dziesięciu proteaz aspartylowych Sap1-Sap10 stanowi istotny element warunkujący wirulencję drożdżaka *Candida albicans*, wchodzącego często w skład mikroflory komensalnej człowieka. Przy obniżonym poziomie odporności gospodarza, czy też na skutek zachwiania równowagi mikroflory w wyniku terapii antybiotykowej, ten oportunistyczny patogen może powodować infekcje powierzchniowe, a nawet zagrażające życiu infekcje systemowe. W pierwszej linii obrony przed drobnoustrojami organizm uruchamia mechanizmy odporności wrodzonej, której ważnymi składnikami są peptydy przeciwdrobnoustrojowe (odpornościowe). Dlatego też można się spodziewać, że przynajmniej część arsenału składającego się na czynniki wirulencji patogena skierowana będzie na unieszkodliwienie właśnie tej składowej reakcji obronnych gospodarza.

Głównym celem badań, których wyniki zaprezentowano w pracy, była szczegółowa analiza podatności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych człowieka (LL-37, HNP-2, histatyny 5, DCD-1L oraz NAT26 i HKH20 uwalnianych z kininogenów) na działanie dziesięciu proteaz aspartylowych *C. albicans*. Przedstawiono identyfikację produktów degradacji proteolitycznej poszczególnych peptydów, dokonano analizy kinetyki procesów degradacji peptydów przeprowadzanych przez proteazy Sap, uwzględniając różne warunki pH reakcji, a także przeprowadzono analizę aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych produktów degradacji. W badaniach wykorzystano rekombinowane proteazy aspartylowe *C. albicans* uzyskane przy użyciu systemu ekspresyjnego *Pichia pastoris*. Analizy przeprowadzone *in vitro* pozwoliły ocenić, czy i w jakim stopniu proteazy aspartylowe *C. albicans* mogą być zaangażowane w przeciwdziałanie grzybobójczej aktywności peptydów odpornościowych w miejscu infekcji. Autorka podjęła się, w moim odczuciu, tytanicznej pracy, która zaowocowała bardzo dobrymi i wartościowymi wynikami.

Recenzowana praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 151 stron zawierających 5 rozdziałów, obszerny spis literatury (244 pozycje), wykaz skrótów, a także streszczenia w języku polskim i angielskim. W tekście zamieszczono 36 rysunków i 13 tabel.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorantka, opierając się na w większości aktualnych danych z piśmiennictwa naukowego, przedstawiła charakterystykę wybranych peptydów odpornościowych człowieka, mechanizmy ich przeciwdrobnoustrojowego działania, inne poznane funkcje tych peptydów, a także wybrane mechanizmy oporności patogenów na działanie peptydów odpornościowych. Ponadto, scharakteryzowała czynniki wirulencji *C. albicans*, ze szczególnym uwzględnieniem sekrecjonowanych proteaz aspartylowych. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy i zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, świadczący o bardzo dobrej znajomości literatury w zakresie podejmowanych badań.

W części doświadczalnej pracy można wyróżnić dwa główne nurty badawcze. W pierwszym z nich Doktorantka poddała szczegółowej analizie możliwość degradacji wybranych peptydów odpornościowych człowieka – LL-37, HNP-2, histatyny 5 i DCD-1L – przez każdą z sekrecjonowanych proteaz aspartylowych *C. albicans* otrzymanych w formie białek rekombinowanych w systemie *P. pastoris*. Drugi nurt badań miał odpowiedzieć na pytanie, czy proteazy Sap *C. albicans* zdolne są do degradacji dwóch wielodomenowych białek, wielko- i drobnocząsteczkowego kininogenu, oraz peptydów NAT26 i HKH20, potencjalnie z nich generowanych przez proteazy gospodarza podczas infekcji. Ponadto, wspomniane analizy były skorelowane z analizą aktywności przeciwgrzybowej powstających mieszanin produktów, a także wybranych otrzymanych produktów degradacji wobec *C. albicans*. Tak poprowadzone badania pozwoliły, z jednej strony, określić możliwość udziału poszczególnych proteaz Sap w degradacji peptydów odpornościowych człowieka, a z drugiej strony pozwoliły spojrzeć na układ patogen-gospodarz z szerszej perspektywy, pokazując jak złożone są to zależności. Doktorantka wykazała zróżnicowany potencjał proteaz aspartylowych *C. albicans* w zakresie degradacji ludzkich peptydów odpornościowych. Na podstawie szczegółowych analiz kinetycznych procesów degradacji proteolitycznej wybranych peptydów stwierdzono, że najbardziej aktywna wobec wszystkich badanych substratów była zakotwiczona w błonie proteaza Sap9 oraz uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej Sap3 i Sap2, a w dalszej kolejności Sap1, Sap4, Sap8, Sap7, Sap6 i Sap5. Co ciekawe, wykazano, że HNP-2, przedstawiciel α -defensyn, nie był wrażliwy na działanie żadnej proteazy Sap. Doktorantka wykazała ponadto, że w wyniku działania na niektóre z badanych peptydów, proteazy Sap mogą uwalniać produkty mające aktywność

przeciw *C. albicans*. Reasumując, przedstawione przez Doktorantkę wyniki wskazują na możliwość udziału poszczególnych proteaz Sap *C. albicans* w degradacji peptydów odpornościowych oraz kininogenów w różnych niszach organizmu człowieka, co niewątpliwie stanowi bardzo istotny wkład w wyjaśnienie skomplikowanej zależności *C. albicans* (patogen) – organizm ludzki (gospodarz). Zagadnienia te zostały wnikliwie przeanalizowane przez Doktorantkę w bardzo dobrze napisanej, liczącej 19 stron Dyskusji.

Chciałabym prosić o wyjaśnienia, czy odniesienie się do następujących kwestii:

- Wg Tabeli 4 proteaza Sap7 nie jest wrażliwa na pepstatynę A, dlaczego więc używano tego inhibitora wobec tej proteazy (Materiały i Metody, str. 63, punkt 5.4.)? Czy w związku z tym działanie Sap7 na histatynę 5 (rysunek 10) mogło wynikać z braku inaktywacji proteazy?
- Materiały i Metody, str. 66, punkt 5.8 – Do testów przeżywalności używano komórek *C. albicans* z hodowli całonocnej. Jak sprawdzano poziom ich żywotności? (licząc w komorze Bürkera zliczamy wszystkie komórki, wśród których mogą być zarówno żywe, jak i martwe). Jak określano stężenia peptydów używanych do testów przeżywalności w mieszaninach po trawieniu proteazami i analizie HPLC?
- Wyniki, str. 75 – Jak można wytłumaczyć prawie 3-krotny wzrost przeżywalności *C. albicans* w obecności HNP-2 traktowanego Sap1 i Sap9 (rysunek 12B) oraz kilkukrotny w obecności histatyny 5 traktowanej Sap5 i Sap6 (rysunek 12C), przy braku widocznych oznak degradacji przedstawionych na rysunkach 9B i 10A?
- Wyniki, str. 80 i dalsze – W wyniku działania proteaz Sap na peptyd LL-37 pojawiał się peptyd LL9-37 (SK...), natomiast dużą część pracy oparto na doświadczeniach z użyciem handlowo dostępnego peptydu LL8-37 (KSK...), którego obecności nie stwierdzono po działaniu żadnej z badanych proteaz na LL-37. Stąd nieuprawnione wydaje mi się stwierdzenie, że proteazy Sap generowały peptyd LL8-37 z LL-37, co przewija się w kilku miejscach pracy. Oba peptydy nie są tożsame; różni je co prawda tylko jedna reszta aminokwasowa, ale ta dodatkowa reszta lizyny jest źródłem dodatkowego ładunku dodatniego, co może mieć znaczenie w przypadku oddziaływania z komórkami drobnoustrojów. Czy podjęto może próby porównania aktywności przeciwgrzybowej obu tych peptydów (LL9-37 i LL8-37)?
- Wyniki, str. 96 – W tekście pada stwierdzenie, że peptyd NAT26 ulegał rozpadowi w wyniku działania wszystkich Sap za wyjątkiem Sap10. W tabeli 10 prezentowane są produkty degradacji tego peptydu powstające na skutek inkubacji z Sap10 (peptydy 12 i 13), a rysunek

29A przedstawia wyższy poziom przeżywalności grzybów traktowanych NAT26 poddanemu działaniu Sap10 w porównaniu do kontroli. Jak można wytłumaczyć te rozbieżności?

- Wyniki, str. 103 – Na jakiej podstawie założono, że to peptyd (2) powstający na skutek działania Sap9 na HKH20 może mieć właściwości przeciwgrzybowe, a równocześnie z nim generowany peptyd (4) nie?

- Wyniki, str. 106 – Dlaczego reakcje degradacji kininogenów prowadzono w pH 5 dla każdej z proteaz Sap, a nie w pH optymalnym dla poszczególnych proteaz?

W trakcie analizy rozprawy doktorskiej zauważyłam też pewne braki, niezręczne sformułowania, czy błędy, których trudno uniknąć w tak obszernym opracowaniu i które w żaden sposób nie wpływają na ocenę merytoryczną całości pracy.

- dla skrótowego oznaczenia histatyny 5 skłaniałabym się raczej do użycia skrótu Hst5 zamiast His5, głównie ze względu na to, że skrót His kojarzony jest głównie z histydyną; geny kodujące histatyny człowieka wg aktualnej nomenklatury oznaczane są *HTN1* i *HTN3*

- niepełny wykaz skrótów; skrót LB pochodzi od lysogeny broth

- Wstęp, str. 16 – nie wszystkie peptydy anionowe można określić jako „bogate w kwas glutaminowy i asparaginowy”

- Wstęp – wielokrotnie „ampifacyjny” zamiast „amfipacyjny”

- Wstęp, str. 28/29 – niezręczne sformułowania – „...do ujemnie naładowanych lipidami błon komórkowych bakterii...”; „obojętny ładunek błony”; „hydrofilowe grupy lipidów” – raczej głowy lipidów

- Wstęp, str. 35 – bakterie *Staphylococcus* należą do Gram-dodatnich

- Wstęp, str. 42 – „przejściowe routki” – raczej strzępki rostkowe

- Materiały i Metody, str. 56 – nie uwzględniono *E. coli* DH 5 α , jako materiału biologicznego

- Materiały i Metody, str. 57 – w punkcie 5.1.1. nie podano liczby komórek bakterii oraz stężenia plazmidu

- Materiały i Metody, str. 58 – w punkcie 5.1.2. nie podano aktywności enzymu Fast Digest SacI, a w punkcie 5.1.3 ilości μ g plazmidu

- Materiały i Metody, str. 68 – opis metody barwienia solami srebra jest zbędny, gdyż żele po barwieniu tą metodą nie są prezentowane w wynikach

- gramatyczne potknięcia, czy nieścisłości w tłumaczeniu tekstu angielskiego skutkujące pojawieniem się błędów merytorycznych, np.: „Wkłęsa, hydrofobowa strona jest otoczona głównie przez dodatnio naładowane reszty,...” (str. 19); „Dimer HNP-1, który budują trzy nici...” (str. 22, rys. 2); „...czy w wyniku specyficznego wiązania się z budującymi ścianę

komórkową bakterii lipidami II...” (str. 30); „lipid A polisacharydu” – raczej lipid A lipopolisacharydu (str. 35); „...zakotwiczone w zewnętrznej błonie komórkowej O-polisacharydy” – zapewne chodzi o łańcuchy O-specyficzne lipopolisacharydu (str. 37); „Dyspersja ...jest bezpośrednią przyczyną wirulencji” – w cytowanej pracy chodzi o to, że dyspersja komórek drożdży z dojrzałego biofilmu przyczynia się bezpośrednio do wirulencji (str. 43); „...wewnątrzkomórkowej adhezyny...” – chodziło o międzykomórkową adhezynę (intercellular, a nie intracellular) (str. 74)

- pewne braki, czy błędy w opisach rysunków i tabel, m.in.: Rys. 1 – brak zgodności między kształtem a kolorem w oznaczeniu charakteru reszt aminokwasowych; Rys. 3 – brak źródła, a może opracowanie własne?; Rys. 4 – schemat przedstawia raczej strukturę ścian komórkowych; w opisie niezręczne sformułowanie – „błony bakteryjne wypełnione są różnymi białkami” – raczej zawierają białka; Rys. 8 – przedstawia strukturę przestrzenną w postaci diagramu wstążkowego; Rys. 9, 10, 28 – powinien być zamieszczony obraz elucji peptydów kontrolnych, nie poddanych traktowaniu proteazami; Rys. 11 – podpis niezręczny, słupki poprzesuwane; Rys. 13 (i dalsze tego typu) – opis osi X w części D jest niejednoznaczny; Rys. 17 (i inne tego typu) – żywe komórki *C. albicans* prezentowane w kolorze szarym są bardzo słabo widoczne; ponadto, przydałby się obraz komórek kontrolnych; Rys. 36 – zdecydowanie zbyt małe oznaczenia; Tabela 1 – brak źródła przytoczonych sekwencji; - wielokrotnie – „ilość zabitych kolonii” – raczej „liczba zabitych komórek”, kolonie na płytce są żywe

- brak w spisie literatury kilkunastu pozycji, które pojawiają się w tekście; i odwrotnie, w spisie znajduje się kilka pozycji, które nie są cytowane w tekście.

Niezależnie od powyższych uwag, w podsumowaniu mojej oceny pragnę podkreślić, że praca Pani magister Oliwii Bocheńskiej prezentuje wysoki poziom naukowy i stanowi niebagatelny wkład w poznanie roli jaką pełnią zewnątrzkomórkowe proteazy aspartylowe *C. albicans* w mechanizmach patogenezы zakażeń wywoływanych przez tego drożdżaka. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że część wyników została już opublikowana w formie trzech artykułów w czasopismach o zasięgu światowym, a większość badań była finansowana z projektu badawczego NCN Preludium 5 Doktorantki.

Uważam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pani magister Oliwii Bocheńskiej pt. „Podatność ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych na działanie proteaz aspartylowych wydzielanych przez patogenne drożdżaki z gatunku *Candida albicans*” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca

2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani magister Oliwii Bocheńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Małgorzata Cytryńska, prof. nadzw. UMCS

Lublin, 02 listopada 2016 r.