

Kraków, 10.10.2016.

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

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Mgr Oliwii Bocheńskiej
pt. *"Podatność ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych na działanie proteaz aspartylowych wydzielanych przez patogenne drożdżaki z gatunku Candida albicans"*

Dysertacja, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pana Prof. dr hab. Andrzeja Kozika, dotyczy zagadnienia naturalnej obrony organizmu ludzkiego przed infekcjami grzybiczymi. Problem ten można postrzegać znacznie szerzej w aspekcie zakażeń przez inne drobnoustroje, w tym bakterie. Wytwarzająca się lekooporność drobnoustrojów staje się bardzo poważnym problemem medycznym, a efektywne mechanizmy, za pomocą których bakterie blokują działanie antybiotyków, są fascynującym przykładem bardzo szybko zachodzących zmian ewolucyjnych. Okazuje się, że poza światem bakterii, także grzyby wytwarzają mechanizmy obronne, chroniące je przed ew. osłabionym działaniem w organizmie gospodarza.

Doktorantka przebadła działanie 10 enzymów proteolitycznych drożdżaka *Candida albicans* na trawienie szeregu peptydów o działaniu antybakteryjnym, w tym m.in. defensyn, katelicyn i histatyn. Eksperymenty umożliwiły ocenę aktywności przeciwgrzybiczej uwalnianych fragmentów i zbadanie ich oporności na proteolizę.

Celem rozprawy było:

- ekspresja i oczyszczanie 10 rekombinantowych aspartylowych enzymów proteolitycznych *C. albicans*;
- zbadanie procesu proteolizy wybranych peptydów o znanym działaniu antibakteryjnym;
- zbadanie właściwości grzybobójczych uwalnianych fragmentów peptydów.

Cele pracy zostały jasno sformułowane i prawidłowo uzasadnione.

Do zrealizowania założeń projektu Doktorantka posługiwała się bardzo szerokim wachlarzem technik, od biologii molekularnej, poprzez enzymologię, do zaawansowanych metod analitycznych. Metody badawcze zostały dobrane poprawnie a ich klarowny opis oraz uzyskane rezultaty nie budzą zastrzeżeń.

Dysertacja ma klasyczny układ, liczy 151 stron, adekwatną do treści liczbę tabel i rycin, oraz bogatą część literaturową i napisana jest dobrym językiem. Prezentowany dorobek jest oryginalny i stanowi nowość naukową, co poparte jest 3 publikacjami, opisującymi część uzyskanych w projekcie doktorskim wyników.

Do najważniejszych osiągnięć Pani Mgr Oliwii Bocheńskiej niewątpliwie należą:

- ✓ uzyskanie 10 rekombinantowych proteaz aspartylowych, będących głównym "narzędziem" inwazji *C. albicans*
- ✓ określenie profilu trawienia sekwencji antibakteryjnych, uwalnianych pod wpływem tych proteaz
- ✓ szczegółowa identyfikacja uwalnianych fragmentów
- ✓ określenie właściwości przeciwgrzybiczych uwolnionych fragmentów.

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

- ✓ jakie, zdaniem Doktorantki, może być fizjologiczne uzasadnienie obecności wielu zasadowych aminokwasów w antybakteryjnych sekwencjach NAT26 i HKH20, skoro właśnie te miejsca są podatne na trawienie przez enzymy *C. albicans*?
- ✓ czy liofilizacja frakcji HPLC była efektywnym sposobem zagęszczania próbek, mając na uwadze wysokie stężenie ACN?
- ✓ w jakim celu prowadzono odrębne rozdziały HPLC, skoro w kolejnym etapie stosowano technikę LC/MS/MS do identyfikacji uzyskanych fragmentów?
- ✓ czy byłoby celowe oznaczenie produktów degradacji wybranych peptydów w obecności *C. albicans*?

Z obowiązku recenzenta zanotowałem drobne nieścisłości, zauważone w pracy:

- ✓ FPLC nie jest wysokorozdzielczą formą chromatografii
- ✓ RP HPLC - powinno być "reversed" a nie "reverse"
- ✓ HPLC jest skrótem High Performance... a nie High Pressure
- ✓ Pomiarów nie wykonuje się "na" spektrometrze tylko "w" spektrometrze lub "przy użyciu spektrometru";
- ✓ czytelność Rys. 11-13 znacznie poprawiłoby podanie sekwencji peptydowych;
- ✓ szkoda, że dla porównania zdolności grzybobójczych nie zamieszczono wyników z udziałem defensyn, które jako jedyne, nie ulegały degradacji.

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają wartości dysertacji, którą cechuje wysoki poziom merytoryczny, a na podkreślenie zasługuje bardzo duży wkład pracy w uzyskanie takiej liczby rezultatów.

Dorobek naukowy Pani Mgr Oliwii Bocheńskiej obejmuje 18 prac, opublikowanych pomiędzy 2012-2016r., co jest liczbą imponującą i świadczy zarówno o bardzo dobrych kompetencjach, pracowitości, jak i umiejętności pracy w zespołach badawczych, w tym międzynarodowych.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia z naddatkiem wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim i stanowi nowość naukową. Spełnione są również 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 w Krakowie o dopuszczenie Pani Mgr Oliwii Bocheńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają znacznie szerszy aspekt i wskazują nowe kierunki badań nad mechanizmami lekooporności, cechującymi nie tylko grzyby, uwzględniając działanie proteaz oraz inaktywację endogennych peptydów antybakteryjnych. Dodatkowo, znaczący dorobek Doktorantki, potwierdzający Jej wysokie kompetencje naukowe, w pełni uzasadnia zaproponowanie Wysokiej Radzie wyróżnienia rozprawy doktorskiej, co niniejszym z przyjemnością czynię.

Prof. dr hab. Jerzy Silberring

