



Prof. dr hab. Wiesław Wątopek
Tel. 71 3752 712
E-mail wieslaw.watorek@uwr.edu.pl

Wrocław, 10.06.2016

Ocena

pracy doktorskiej mgr Mariusza Gogóla zatytułowanej "Wpływ proteaz aspartylowych drożdżaków *Candida albicans* na potencjał grzybobójczy zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych i generację prozapalnych peptydów - kinin"

Oceniana praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Marii Rapały-Kozik

Tematyka pracy dotyczy osłabiania mechanizmów obrony immunologicznej i zakłócania homeostazy gospodarza przez oportunistycznego patogena *Candida albicans* w wyniku działania sekrecjonowanych przez tego drożdżaka proteaz aspartylowych. Doktorant koncentruje się na badaniu wpływu tych proteaz na efektywność działania jednego z mechanizmów niespecyficznej obrony immunologicznej, jakim są zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (NET). Mechanizm ten, opisany po raz pierwszy w 2004 roku, jest intensywnie badany (ponad 25 tysięcy publikacji do chwili obecnej) pod kątem jego aktywności bójczej wobec atakujących patogenów jak i wpływu na homeostazę gospodarza. Zaburzenia w mechanizmie działania NET mogą prowadzić do różnego typu patologii, między innymi szeregu chorób autoimmunologicznych.

Recenzowana rozprawa liczy 159 stron z typowym dla tego typu opracowań podziałem na wstęp, opis celu pracy, opis materiałów i metod, wyniki badań i ich dyskusję. Pracę rozpoczyna spis treści, obszerny wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, a kończy licząca 317 pozycji bibliografia. W tekście zamieszczone jest 43 rysunki i 3 tabele.

We wstępie doktorant omawia dotychczasową wiedzę o proteazach aspartylowych *C. albicans* będących czynnikami wirulencji tego drożdżaka i przedstawia jeden z mechanizmów obronnych gospodarza, jakimi są zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe NET aktywowane przez infekcję różnego typu patogenami. Czytelnik zapoznawany jest również z działaniem układu kontaktu produkującego kininy, jako potencjalnego elementu zaburzenia homeostazy gospodarza w wyniku infekcji.

Rozdział poświęcony celowi pracy jasno i precyzyjnie przedstawia zamierzenia badawcze doktoranta. Celem strategicznym jest poznanie wpływu proteaz aspartylowych *C. albicans* na różne aspekty funkcjonowanie NET i układu generacji kinin, które jako mediatory stanu zapalnego, zwiększając przepuszczalność naczyń krwionośnych, mogą ułatwić infekcję. Cel ten ma być osiągnięty między innymi przez sprawdzenie, które z białek i peptydów wchodzących w skład NET są degradowane przez proteazy aspartyłowe *C. albicans*, jak zmienia się aktywność inhibitorowa degradowanego przez aspartyłowe proteazy α 1-inhibitora proteaz, głównego czynnika zabezpieczającego otoczenie NET przed niekontrolowaną i destrukcyjną aktywnością elastazy neutrofilowej. Analiza produktów degradacji kininogenów przez proteazy aspartyłowe *C. albicans* ma pozwolić na określenie roli tych enzymów w produkcji kinin. Ponieważ w trakcie powstawania NET dochodzi do cytrulinacji szeregu białek w wyniku działania deiminaz peptydyloargininowych, jednym z celów badań było sprawdzenie jak ta modyfikacja wpływa na efekty działania proteaz aspartylowych drożdżaka. Analiza szczegółowych celów przedstawionych przez doktoranta świadczy o wszechstronnym i przemyślanym podejściu do badanego problemu.

W rozdziale Materiały i Metody doktorant zamieszcza wszechstronny i precyzyjny opis materiałów i metod użytych w części eksperymentalnej pracy.

Lektura opisu wyników badań pozwala na stwierdzenie, że zamierzone przez doktoranta cele badawcze zostały osiągnięte. Wykazano, że składnikami NET degradowanymi przez proteazy aspartyłowe *C. albicans* są kalprotektyna, laktoferyna, histony i peptyd LL-37. W warunkach eksperymentalnych ustalonych w pracy doktorskiej, degradacji połączonej z utratą aktywności inhibitorowej wobec elastazy neutrofilowej ulegał α 1-inhibitor proteaz. Degradacja inhibitora znosiła jego ochronny efekt wobec destrukcyjnego działania elastazy związanej z NET na linię komórkową śródbłonna. Doktorant wykazał również, że aktywność proteaz aspartylowych może

wpływać na proces chemotaksji neutrofilów, zarówno poprzez obróbkę IL-8 (77aa) do posiadającej wyższą aktywność chemotaktyczną IL-8 (72 aa) jak i poprzez słabsze kompleksowanie tej interleukiny przez częściowo zdegradowany α 1-inhibitor proteaz, powodujące zwiększenie jej lokalnego stężenia. Badanie wpływu proteaz aspartylowych na układ kontaktu udowodniło zdolność tych enzymów do generowania kinin z kininogenów. Powstałe w ten sposób kininy poprzez swą aktywność wazodylatacyjną mogą ułatwiać rozprzestrzenianie się komórek *C. albicans* w organizmie gospodarza. W prowadzonych eksperymentach uwzględniono potencjalny wpływ cytrulinacji – modyfikacji białek gospodarza prowadzonej przez związane z powstawaniem NET deiminazy peptydyloargininowe. Cytrulinacja histonów prowadziła do częściowego osłabienia ich proteolizy przez proteazy aspartylowe, w wypadku LL-37 następowało zwiększenie intensywności jego degradacji proteolitycznej. Modyfikacja ta nie miała wpływu na aktywność inhibitorową i proteolityczną degradację α 1-inhibitora proteaz, spowalniała natomiast zdolność generowania kinin z kininogenu przez proteazy *C. albicans*.

Na wyróżnienie zasługuje licząca 25 stron wydruku rzeczowa, wyczerpująca i dobrze napisana dyskusja świadcząca o bardzo dobrej znajomości literatury dotyczącej przedmiotu dysertacji. Dobrym pomysłem jest podsumowanie otrzymanych wyników badań w formie graficznej (rys. 43).

Lektura pracy nasuwa recenzentowi szereg pytań i uwag różnej wagi:

1. Eksperymenty przedstawione w pracy pokazują, że neutrofilowa elastaza związana z NET jest hamowana przez α 1-inhibitor proteaz. Istnieją jednak doniesienia literaturowe z badań *in vivo* wskazujące na brak hamowania NET-elastazy przez osoczowe inhibitory proteaz (Kołaczkowska i inni, *Nature Commun.* 2015, 6, 6673). Jak wytłumaczyć tę rozbieżność?
2. Doktorant przedstawia hipotezę zniesienia ochronnej roli histonów dla NET- DNA jako rezultatu ich cytrulinacji i proteolitycznej degradacji przez aspartylowe proteazy *C. albicans*. Odsłonięta struktura kwasu nukleinowego byłaby łatwym celem dla DNA-zy I, co powodowałoby likwidację bójczej aktywności NET. Halverson i inni donoszą jednak, że poluźnienie oddziaływań między cytrulinowanymi histonami a DNA umożliwia bójcze działanie kwasu nukleinowego, poprzez kontaktowe chelatowanie dwuwartościowych kationów z powierzchni kontaktującego

się z NET mikroorganizmu (*Halverson i inni, PLoS Pathog. 2015, 11, e1004593*).

3. Laktoferyna, mieloperoksydaza i azurocydyna nie są głównymi białkami NET (str. 13). W profilu białkowym dominują histony, co doktorant potwierdza na str. 122 i 123.
4. MPO nie produkuje H_2O_2 , Produktem reakcji enzymatycznej jest HOCl (str.38).
5. W jaki sposób α 1-inhibitor proteaz hamuje aktywność mieloperoksydazy (str. 40)?
6. W opinii recenzenta wyrażenia „nadaktywna proteaza” (str.49), „nadaktywność PAD” (str.121) czy „nadaktywność elastazy neutrofilowej” (str.128) lepiej zastąpić sformułowaniem o niekontrolowanej aktywności enzymu.
7. Na rys. 18 podpisy powinny dotyczyć peptydu LL-37 a nie histonu H3.
8. Fragment łańcuch polipeptydowego α 1-inhibitora proteaz istotny dla jego aktywności nosi nazwę pętli reaktywnej, a nie reakcyjnej (rys. 7, str.126).
9. Chemokiny oddziałują z glikanami, a nie glikozaminoglikanami α 1-inhibitora proteaz (str. 127).

W podsumowaniu, w opinii recenzenta oceniana dysertacja wnosi znaczący element nowości naukowej do wiedzy na temat roli jaką pełnią proteazy aspartyłowe *Candida albicans* w trakcie infekcji i spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Mariusza Gogóla przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiesław Wysocki