



Kraków, 30 grudnia 2012 r.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI

WYDZIAŁ BIOCHEMII,

BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 7

Dr hab. Jacek Międzobrodzki, prof. UJ

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Karkowskiej-Kulety.

Tytuł rozprawy: „Adsorpcja i aktywacja składników osocznego układu produkcji kinin na powierzchni grzybów z rodzaju *Candida*”.

Praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Kozika.

Drobnoustroje wchodzą w różne relacje z organizmem ludzkim. Efekty tych oddziaływań zależą od cech drobnoustrojów oraz od reakcji układu immunologicznego człowieka. Precyzyjne poznanie struktur i funkcji drobnoustrojów, ich uwarunkowań genetycznych oraz systemów regulacji ekspresji i supresji genów umożliwia poznanie czynników chorobotwórczości i sposobów ich oddziaływania na białka i komórki gospodarza kolonizacji i zakażenia. Wiedza w tym zakresie stale i szybko się rozszerza dzięki nowym technikom badawczym.

Tematem przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest poznanie mechanizmów biochemicznych na poziomie molekularnym zjawisk adsorpcji i aktywacji składników osocznego układu produkcji kinin zachodzących na powierzchni grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. Są to pospolite drobnoustroje komensalne rozpowszechnione na całym świecie. Kolonizują skórę i błony śluzowe jamy ustnej oraz układ pokarmowy jako przedstawiciele mikroflory fizjologicznej przejściowej u kilkudziesięciu procent populacji ludzkiej (różni autorzy podają wartości od 25% do 80%) występując w charakterze oportunistycznych patogenów.

Wprowadzenie, cel oraz ogólna charakterystyka pracy. Drożdżopodobne grzyby z rodzaju *Candida* są oportunistycznymi patogenami, więc są zdolne do zmiany charakteru z saprofitycznego na patogenny, jeśli zaistnieją ku temu odpowiednie warunki ze strony gospodarza kolonizacji zwane „czynnikami sprzyjającymi zakażeniu” lub „predysponującymi do zakażenia”. Stają się wówczas groźnymi patogenami ludzi i zwierząt, powodującymi zakażenia zwane kandydozami, o lokalizacji powierzchownej lub głębokiej (narządowej), o charakterze lokalnym lub uogólnionym. Ogromna plastyczność biochemiczna i morfologiczny polimorfizm związane są z fenotypowym przełączaniem tych drobnoustrojów w zmieniających się środowiskach *in vivo* czy *in vitro*. Mechanizmy tego zjawiska nie są jeszcze poznane. Grzyby *Candida* znane są z powodu zjawiska mimikry antygenowej, ułatwiającej drobnoustrojom unikanie rozpoznania przez układ obronny i umożliwiającej rozwój populacji w obrębie organizmu gospodarza zakażenia. W takim zjawisku bardzo ważną rolę pełnią

białka powierzchniowe komórek *Candida* sp., system genetycznej regulacji ich ekspresji oraz środowisko biochemiczne niszy, w sensie oddziaływań białek gospodarza. Natomiast ze strony gospodarza kolonizacji, w regulację mechanizmów homeostazy a także za rozwój stanu zapalnego podczas zakażenia odpowiada osoczowy układ generacji kinin, tzw. układ kontaktu, do którego należą zymogeny dwóch proteinaz serynowych – czynnik XII (FXII) i prekalikreina (pHPK) oraz białkowy prekursor kinin – wysokocząsteczkowy kininogen (HK). Składniki tego systemu ulegają adsorpcji zarówno na powierzchniach komórek gospodarza (neutrofili, monocytów, trombocytów, astrocytów i in.) jak i chorobotwórczych bakterii. Aktywacja układu kontaktu prowadzi do syntezy kinin, uniwersalnych mediatorów zapalenia odpowiadających za występowanie objawów zapalenia – rumienia, obrzęku, bólu, obniżenia ciśnienia krwi, wysięku osocza i zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, co ma bardzo duży wpływ na rozwój zakażenia w organizmie gospodarza. Zjawisko takie jest już dobrze poznane w zakażeniach bakteryjnych, natomiast nie było badane w zakażeniach oportunistycznymi grzybami z rodzaju *Candida*, pomimo, że są one odpowiedzialne za rosnącą co roku liczbę poważnych zakażeń, ogólnoustrojowych i narządowych. I to właśnie zjawisko było celem badań doktorantki. Ze względu na zaangażowanie kininogenu, czynników kaskady krzepnięcia krwi, białek wiążących białynę i innych, badania doktorantki interesującej się oddziaływaniem z białkami ściany komórkowej grzybów drożdżopodobnych *Candida* sp., wpisują się w tradycyjną tematykę badawczą Zakładu Biochemii Analitycznej, grupy prof. Andrzeja Kozika (która odnosi duże sukcesy w badaniach mechanizmów wiązania białek), na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Oceniany doktorat to opracowanie liczące 154 strony tekstu napisanego bardzo ładnym polskim językiem, zredagowane wg zasad tradycyjnych dla tego typu prac, z konwencjonalnym układem tekstu. Zawiera 6 rozdziałów, zilustrowane jest 38 rysunkami, 5 tabelami i udokumentowane 287 trafnie wybranymi pozycjami cytowanego piśmiennictwa, w większości pochodzącego z kilku ostatnich lat. Objętość rozprawy, jak i liczba cytowanych pozycji były w pierwszym odbiorze recenzenta zdecydowanie za obszerne, jednak po bliższym zapoznaniu się z badaną tematyką, licznymi metodami i technikami użytymi do poznania badanych mechanizmów, a potem przedstawienia oryginalnych wyników i przedyskutowaniu ich, recenzent stwierdza, że ta interdyscyplinarna praca nie mogła być zredagowana w krótszej formie edytorskiej bez poważnego uszczerbku dla jej wartości merytorycznej.

Wstęp poprzedzony jest wykazem skrótów zajmującym 2 strony, przygotowanym bardzo rzetelnie z podanym źródłosłowiem. W tym rozdziale rozprawy na 34 stronach autorka dokonała szczegółowej charakterystyki oportunistycznych patogenów z rodzaju *Candida*, a ze strony makroorganizmu białek układu produkcji kinin, roli aktywacji układu generacji kinin w zakażeniach bakteryjnych, bezpośredniej i pośredniej, a także gromadzenia i aktywacji białek tego układu na powierzchni komórek bakteryjnych. Uwagę zwraca szerokie spojrzenie autorki umożliwiające czytelnikowi stopniowe przejście od poziomu komórkowego do biochemii molekularnej. Natomiast brakuje informacji o rezerwuarze drobnoustrojów *Candida*, o egzogennym i endogennym charakterach zakażeń (str. 14); a zjawiska i kategorie współzależności drobnoustrojów – gospodarz są przemieszane i zebrane nieracjonalnie (str. 11). Zamieszczone barwne fotografie na str. 12 i 16 są cennym urozmaicheniem rozprawy, ale nie są czytelne (w tej skali rozdzielczości wymagają dodatkowego wyjaśnienia).

Celem badań, których wyniki są prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej była charakterystyka molekularna i biologiczna zjawiska adsorpcji białek układu kontaktu (wymienionych powyżej) do powierzchni komórek grzybów z gatunków *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* oraz zbadanie możliwości aktywacji tego układu, i co dalej, ewentualnej produkcji aktywnych biologicznie kinin z wysokocząsteczkowego kininogenu. Cel ten jest nowatorski i w pełni zasadny. Badane związki – dwa zymogeny proteinaz serynowych: czynnik XII (FXII) i prekalikreina

(pHPK) oraz białkowy prekursor kinin – wysokocząsteczkowy kininogen (HK) nie były do tej pory badane pod tym kątem. Zjawisko ich adsorpcji jest kluczowym ogniwem wirulencji, a białka ścian komórkowych grzybów promują zakażenia tkanek i mogą chronić komórki *Candida* sp. przed szkodliwym działaniem mechanizmów obronnych gospodarza, co może umożliwiać przeżywalność grzybów wewnątrz gospodarza. Autorka przedstawiając zwięźle i logicznie cel badań powinna użyć pojęcia „zaplanowane” w miejsce „przeprowadzone”.

Aby zrealizować ten cel zastosowano **materiały i metody** opisane szczegółowo na 28 stronach pracy. Metody badawcze wybrane były adekwatnie do założonego planu badań eksperymentalnych. Są to podstawowe metody biologii molekularnej takie jak: biotynylacja wielkocząsteczkowego kininogenu, czynnika XII i prekalikreiny; fragmentacja kininogenu z wykorzystaniem gingipainy R; deglikozylacja, fragmentacja drobnocząsteczkowego kininogenu przez kalikreinę, karboksymetylacja papainy, oznaczanie aktywności papainy, analizy elektroforetyczne w kilku różnych układach, oczyszczanie przeciwciał z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, oznaczanie adsorpcji biotynylowanych białek, izolacja i biotynylacja białek ścian komórkowych grzybów *Candida*, izolacje z tych ścian glukanu i mannanu, badania wiązania biotynylowanych białek układu kontaktu na powierzchniach komórek *Candida* spp., wiązanie tych białek przez imobilizowane na mikropłytkach białko układu kontaktu, analiza wpływu peptydu HKH333-352 na wiązanie biotynylowanego wysokocząsteczkowego kininogenu do powierzchni komórek *Candida albicans*, innych gatunków pozbawionych głównych składników ściany komórkowej. Doktorantka opanowała metody przygotowania złoża chromatograficznego z imobilizowanym wielkocząsteczkowym kininogenem oraz izolacji białek powierzchniowych *C. albicans* wiążących wielkocząsteczkowy kininogen. Wykorzystała metodę spektrometrii masowej. Badała produkcję kinin z wielkocząsteczkowego kininogenu związanego z powierzchnią komórek *C. spp.*, a także podczas inkubacji grzybów z osoczem ludzkim. Opanowała immunoenzymatyczne testy ELISA do detekcji zawartości kinin. Oprócz wymienionych zaawansowanych metod badawczych inną kategorią opanowanych przez doktorantkę metod to niełatwe hodowle grzybów drożdżopodobnych, w różnych formach morfologicznych, odbiegające trudnościami od hodowli bakterii właściwych.

Najważniejszymi rozdziałami pracy są **Wyniki i Dyskusja**. Oba te rozdziały są właściwie rozdzielone i napisane przejrzysto. **Wyniki** są opisane szczegółowo na 41 stronach. Ilustruje je 26 rysunków i 2 tabele. Z ważniejszych osiągnięć należy podkreślić następujące: i) wykazanie silnego wiązania czynnika FXII krzepnięcia krwi i wielkocząsteczkowego kininogenu (HK), oraz wiązania ludzkiej prekalikreiny osoczowej (pHPK) przez komórki grzybów w obydwu wykorzystanych modelach badawczych, form strzępkowych gatunków *Candida* i wyizolowanych białek powierzchniowych; ii) wykazanie kompetencji o wiązanie z powierzchnią *C. albicans* i *C. tropicalis* pomiędzy poszczególnymi białkami układu kontaktu, co dowodzi że niektóre miejsca wiążące na powierzchni patogenów mogą być wspólne dla trzech badanych czynników; iii) wykazanie produkcji aktywnych biologicznie kinin w wyniku gromadzenia na powierzchni form strzępkowych *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* wszystkich składników układu generacji kinin, a także podczas kontaktu tych komórek z ludzkim osoczem; iv) precyzyjne wskazanie fragmentów wielkocząsteczkowego kininogenu odpowiadających za adsorpcję na powierzchni komórek *Candida* sp.; v) wskazanie łańcucha ciężkiego jako głównego fragmentu odpowiedzialnego za wiązanie zymogenów FXII i pHPK przez białka izolowane ze ściany komórkowej *C. albicans*.

W rozdziale **Dyskusja** liczącym 18 stron, wyniki uzyskane we wszystkich kolejno prowadzonych doświadczeniach zostały logicznie i konsekwentnie zinterpretowane. W oparciu o wyniki Autorka wytypowała główne receptory występujące na powierzchni *C. albicans* i wiążące kininogen wielkocząsteczkowy (HK) – oprócz frakcji białek izolowanych ze ściany komórkowej a pełniących najważ-

niejszą rolę w badanych oddziaływaniach, rozważa, że nie można wykluczyć również częściowego udziału mannanu i glukanu w tym zjawisku. Doktorantka wykorzystała złożę do chromatografii powinowactwa z unieruchomionym wielkocząsteczkowym kininogenem (HK) wyizolowała z puli białek pochodzących ze ściany komórkowej i zidentyfikowała receptory wiążące HK, na podstawie czego określiła lokalizację charakterystycznej adhezyjny Als3p a także enzymów: enolazy, mutazy fosfoglicerynianowej i izomerazy triofofosforanowej. Recenzent uważa, że podjęcie badań aktywacji składników osocznego układu produkcji kinin i adsorpcji na powierzchni grzybów rodzaju *Candida* było decyzją słuszną. Szeroki zakres eksperymentów, dobór wysoko specjalistycznych technik molekularnych pozwolił doktorantce na uzyskanie cennych informacji na temat białek uczestniczących w bardzo ważnym etapie zakażenia. W dojrzałej dyskusji autorka kompleksowo scharakteryzowała oddziaływania pomiędzy białkami układu generacji kinin a powierzchnią komórek patogennych grzybów z rodzaju *Candida* dowodząc, że aktywacja układu kontaktu i związana z nią produkcja prozapalnych i wazoaktywnych kinin przy powierzchni patogenu jest dodatkowym mechanizmem patogenezы zakażeń powodowanych przez te drobnoustroje. Z „Dyskusji” wynika, że doktorantka spełniła założone cele, zrealizowała badania pomyślnie i sprawnie je zredagowała. Podsumowując uważam pracę za bardzo wartościową, z celnie zaadresowanym problemem badawczym, prezentującą szeroki zakres badań zmierzających do naświetlenia podjętego tematu. Wyniki pracy mają znaczenie zarówno poznawcze jak i duże znaczenie praktyczne.

Uwagi krytyczne. Czytelnikowi rozprawy nasuwa się pytanie, jaka może być aplikacja uzyskanych oryginalnych wyników badań, zwłaszcza że autorka wspomina na str. 130 o silnie immunogennym antygenie brany pod uwagę jako przyszły składnik szczepionek. W zakończeniu „Dyskusji” lub w „Podsumowaniu” brakuje krótkiego komentarza dotyczącego wykorzystania wyników w przyszłej strategii terapii przeciugrzybiczej, w opracowaniu leków nowej generacji, użytecznych w leczeniu kandydoz. Recenzent będzie oczekiwał rozwinięcia i pogłębienia tego wątku podczas obrony doktoratu.

W ocenianej pracy nie ma odrębnego rozdziału „Wnioski”, który by zawierał syntetycznie sformułowane główne konkluzje wynikające po przedyskutowaniu wyników. Praca ma charakter analityczny, więc przedstawienie percepcji czytelnika na inny system myślenia – syntetyczny, naukowy, otwierający nowe perspektywy, znalazło by ułatwienie, gdyby mógł przeczytać wyodrębnione wnioski w punktach. Inna rzecz, że zostały one sformułowane w „Dyskusji”, w poszczególnych akapitach komentujących uzyskane wyniki. Jednak ze względu na poważną objętość rozprawy byłoby zdecydowanie wygodniej dla czytelnika gdyby wnioski zostały ujęte w osobnym rozdziale. Już nie w formie eseju ale w punktach jako tezy. Uwagi techniczne. Pomimo wysokiego poziomu redakcji i bardzo ładnego języka, a także opanowania swoistej terminologii mykologicznej oraz z dziedziny mikrobiologii zakaźnej, autorka nie wystrzegła się serii usterek i uchybień. Zjawiska nie będące patologicznymi określa się nazwą „prawidłowe” lub „fizjologiczne”, a nie „normalne”, jak autorka podaje na str. 41. Zdania w języku polskim nie zaczyna się od wzoru, ani od skrótu, jak to ma miejsce na str. 24, 39 i 119. Liczba jest „wyższa” (lub może być „niższa”), ale nie „większa”, jak na str. 113. Także pojęcie, cyt. „ilość komórek” (str. 121, 122 x2) jest niewłaściwe, gdyż zjawiska policzalne określa się mianem „liczba”. Autorka nie wystrzegła się też pojęć żargonowych, w dwóch miejscach: na str. 60 jest „zdjęcie”, a powinno być „fotografia”, i na str. 36 jest „zaczernienie”, powinno być „rumień”. Na str. 116 brakuje nazw rodzajowych drobnoustrojów (a wy mieniane są one jeden raz), na str. 130 błąd literowy w nazwie gatunkowej. Są to drobne usterki, które nie mają wpływu na ogólną ocenę rozprawy.

Podsumowanie oceny. Przedstawiona rozprawa doktorska napisana jest przejrzysto, ma logiczny układ a wyniki uzyskane w szczegółowych analizach są trafnie opisane i przedyskutowane. Całość dowodzi dużego zaangażowania autorki w problemy badawcze, umiejętności posługiwania się zaawansowanymi molekularnymi metodami badawczymi i praktycznym ich wykorzystaniem. Na uwagę zasługuje ogrom włożonej pracy, obszerna wiedza i umiejętności posługiwania się nią. Należy podkreślić, że jest to praca nowatorska a jej wartość merytoryczna jest bardzo wysoka. Na tej podstawie pracę doktorską Pani mgr Justyny Karkowskiej-Kulety pt. „Adsorpcja i aktywacja składników osoczkowego układu produkcji kinin na powierzchni grzybów z rodzaju *Candida*” oceniam jako wyróżniającą się i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego **wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także o jej wyróżnienie.**

Kraków, 30 grudnia 2012 r.

