



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Kierownik

Prof. dr hab. HANNA ROKITA

5 lutego 2015 r.

Recenzja

**pracy doktorskiej p. mgr Grażyny Braś
pt „Charakterystyka działania głównych proteinaz aspartyłowych
produkowanych przez patogenne drożdżaki *Candida albicans* i *Candida
parapsilosis* na ludzkie kininogeny”**

Zakażenia drożdżakami z rodzaju *Candida* są obecnie główną przyczyną kandydoz diagnozowanych u pacjentów z obniżoną odpornością a śmiertelność w przypadku niektórych gatunków z tego rodzaju jest niepokojąco wysoka. Jednym z wielu mechanizmów wirulencji tych drożdżaków jest produkcja i wydzielanie różnych enzymów hydrolitycznych. Do najważniejszych enzymów tego typu zalicza się proteinazy aspartyłowe (SAPs), które nie tylko są zdolne do trawienia tkanek gospodarza, co zabezpiecza patogenowi dostęp do składników odżywczych i umożliwia kolonizację organizmu gospodarza, ale także mogą trawić białka głównych układów regulatorowych organizmu gospodarza takich jak układ krzepnięcia, dopełniacza i kalikreina-kinina.

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy mechanizmów działania proteinaz aspartyłowych izolowanych z drożdżaków z rodzaju *Candida* na ludzkie kininogeny, których pochodne w postaci kinin są powszechnymi mediatorami stanu zapalnego. O ile aktywność kininogenazowa proteinaz bakteryjnych została lepiej scharakteryzowana, to w przypadku drożdżaków z rodzaju *Candida* wytwarzanie kinin z udziałem wydzielniczych proteinaz jest słabo poznane. Z tego względu Autorka kontynuowała badania nad kininogenami, uwalnianymi z nich peptydami oraz kininogenazami rozpoczęte wcześniej przez swego promotora, prof. Andrzeja Kozika, stosując nie tylko enzymy izolowane i oczyszczone z *C. albicans* ale także z drugiego gatunku, *C. parapsilosis*. Należy podkreślić, że wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w dwóch pracach oryginalnych, w *Biological Chemistry* (2012) i *Peptides* (2013).

Rozprawa doktorska Pani mgr Grażyny Braś zawiera rozległy 29 stronicowy **wstęp** obejmujący opis typów i funkcji kininogenów, funkcji, wytwarzania, metabolizmu i receptorów kinin oraz specyficznych kininogenaz. W rozdziale tym przedstawiono także kininogenazową aktywność proteinaz bakteryjnych ale przed wszystkim szczegółowo omówiono proteiny wytwarzane przez drożdżaki z rodzaju *Candida* uwzględniając ich rolę w patogenezie kandydoz. Rozdział ten jest bardzo dobrze ilustrowany siedmioma kolorowymi rysunkami oraz sześcioma tabelami. W tej części pracy znaleziono tylko jedną niejasną informację przedstawioną skrótem „NZ” („nie znaleziono” ?) w tabeli 6 (str. 37).

Obszerny, liczący 22 strony rozdział „**Materiały i metody**” zawiera szczegółowe opisy stosowanych materiałów i metod. Metody te obejmują hodowle trzech różnych ludzkich linii komórkowych oraz drożdżaków, oczyszczanie trzech różnych proteinaz z dwóch gatunków *Candida* oraz badanie ich aktywności i identyfikację metodą spektrometrii mas (MS) sekwencji aminokwasowych peptydów rozdzielonych za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) uzyskanych po trawieniu trypsyną oczyszczonych proteinaz. Analiza trawienia syntetycznych peptydów oraz drobno- i wielkocząsteczkowego kininogenu oraz kinin prowadzona była metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, barwienia solami srebra oraz HPLC i MS. Do ilościowego oznaczenia kinin a także cytokin prozapalnych zastosowano z kolei test ELISA a do wiązania kinin przez specyficzne receptory metodę radioizotopową ze znakowanymi trytem kininami. Z kolei kompetycyjny test ELLSA posłużył do analizy oddziaływania wielkocząsteczkowego kininogenu zmodyfikowanego przez proteinazę SAP2 z *C. albicans* z ludzką prekalikreina.

Wyniki badań stanowią największy rozdział pracy, zostały przedstawione na 38 stronach w postaci 21 złożonych rysunków oraz jednej tabeli. Autorka kolejno omawia poszczególne etapy doświadczeń poprzedzając je właściwym wprowadzeniem a także krótko je w każdym podrozdziale podsumowując. Należy tu podkreślić, że we wszystkich testach zastosowano odpowiednie kontrole, np. kontrolę pozytywną hamowania papainy przez zmodyfikowany HK stanowiła próbka nietrawionego HK.

W pierwszej części pracy dokonano analizy elektroforetycznej produktów degradacji drobno- i wielkocząsteczkowego kininogenu przez trzy oczyszczone enzymy drożdżowe, SAP2 z *C. albicans* oraz SAPP1 i SAPP2 z *C. parapsilosis*, co pozwoliło przypuszczać, że badane enzymy biorą udział w trawieniu łańcucha ciężkiego tych białek. Następnie pokazano, że modyfikowany przez proteiny *Candida* (a zwłaszcza proteinazę SAPP1)

HK traci zdolność do hamowania aktywności papainy względem syntetycznego substratu (BAPNA) skąd wysnuto wniosek, że wycięta została część wielkocząsteczkowego kininogenu obejmująca domeny 2 i 3. Przedstawiając wyniki w postaci Rysunku 9 (str. 68) nie wspomniano o liczbie wykonanych oznaczeń. Wzmianka o wykonaniu dwóch niezależnych powtórzeń doświadczeń pojawia się dopiero przy omawianiu Rysunku 10 i 11 (str. 70-71).

W dalszej części pracy scharakteryzowano udział proteinaz z *C. albicans* i *C. parapsilosis* w powstawaniu kinin z ludzkich kininogenów. Analiza ilościowa powstałych kinin pokazała, że SAP2 uwalnia kininy głównie z LK, podobnie jak oba enzymy z *C. parapsilosis*. Oznaczenie zakresu optymalnego pH dla tych enzymów wskazuje, że enzym SAP2 produkuje kininy w bardzo niskim pH równym 3,5 a SAPP1 i 2 wycinają kininy w szerokim zakresie pH: 3,5-7,0.

Kolejną istotną obserwacją doktorantki było stwierdzenie, że trawienie przez trzy charakteryzowane w tej pracy proteiny syntetycznego, 26-aminokwasowego peptydu obejmującego zawierającą sekwencje kinin domenę 4 kininogenu, prowadzi do powstania różnych peptydów. Niektóre z nich posiadają koniec C typowy dla kinin Leu-Met-Lys-BK i Met-Lys-BK co czyni je potencjalnym źródłem kinin. Przeprowadzona następnie identyfikacja metodą RP-HPLC kinin uwalnianych przez trzy badane proteiny z LK i HK pokazała, że uwalniane peptydy nie są identyczne z peptydami uwalnianymi przez ludzkie kalikreiny, czyli bradykininą i Lys-bradykininą. Dla SAP2 były to Met-Lys-BK i BK. Metoda ESI-MS pozwoliła ustalić masy cząsteczkowe i sekwencje peptydów uwalnianych z LK przez poszczególne enzymy i potwierdzić wyniki z dwóch poprzednich metod: trawienia syntetycznego peptydu i analizy metodą RP-HPLC.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza oddziaływania peptydów powstających z kininogenów przez proteiny z *C. albicans* i *C. parapsilosis* z receptorami kinin dowodzi, że produkty trawienia wiążą się zarówno do receptora B₂R, jak i B₁R. Większe wiązanie powstałych po trawieniu peptydów do receptora B₂R sugerowało udział w tym procesie peptydów z C-kończącą sekwencją charakterystyczną dla BK, podczas gdy receptor B₁R przypuszczalnie wiązał kininy pozbawione argininy w pozycji 9-tej (des-Arg⁹-kininy). Co ważne, użycie w teście radio-receptorowym wiązania z B₂R i B₁R produktów proteolizy LK rozdzielonych za pomocą RP-HPLC, pozwoliło zidentyfikować te same peptydy, które ujawniła już metoda ELISA i MS. Charakterystyka powinowactwa powstałych z trawienia kininogenów peptydów do obu typów receptorów, choć wykonana na czystych, syntetycznych peptydach, wykazała, że powstałe kininy są słabszymi

ligandami dla B₂R niż kininy uwalniane pod wpływem ludzkich kalikrein, gdyż IC₅₀ peptydu Leu-Met-Lys-BK do B₂R jest znacznie (o 2 rzędy wielkości) wyższa niż IC₅₀ Met-Lys-BK a o 3 rzędy wielkości wyższa niż IC₅₀ kinin powstających z kininogenów pod wpływem ludzkiej kalikreiny. Podobnie przeanalizowano interakcję Lys-BK z B₁R i pokazano, że Met-Lys-BK jest równie dobrym ligandem dla B₁R, co Lys-BK.

W celu oceny wpływu kinin powstających w wyniku aktywności trzech badanych proteinaz na indukcję cytokin prozapalnych, Autorka testowała syntetyczne peptydy jako induktory syntezy i wydzielania IL-1 β i IL-6 przez komórki ludzkiego śródbłonna naczyń krwionośnych (HMEC-1). Analiza ta pozwoliła pokazać różnice w rozmiarze i czasie stymulacji badanych cytokin przez BK i jej pochodne. Wyniki te są ważne, gdyż świadczą o potencjale pro-zapalnym enzymów z *Candida* w kontekście infekcji bakteryjnych reprezentowanych w tym układzie doświadczalnym przez LPS. Druga ludzka linia komórkowa, promonocytna U937, posłużyła do pokazania, że to TNF α i IL-1 β a nie IL-6 są syntetyzowane pod wpływem Met-Lys-BK. Do tej części wyników mam pytanie odnośnie interpretacji spadku stężenia IL-1 β po inkubacji komórek HMEC-1 z BK (Rysunek 21A, str. 89). Mam także bardziej ogólną uwagę dotyczącą użytych linii komórkowych. Wydaje się, że zastosowanie monocytów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców lub makrofagów wyprowadzonych z tych komórek byłoby bardziej właściwe niż użycie linii promonocytarnej U937, która jest jednak linią nowotworową.

Ciekawych wyników dostarczyła analiza wpływu osocza na kininy powstające pod wpływem trzech badanych proteinaz z *Candida*, gdyż pokazano, że w obecności osocza peptydy te są szybko metabolizowane do stabilniejszych form kinin: BK i des-Arg⁹-BK a enzymami osocзовymi odpowiedzialnymi za rozkład kinin są enzym konwertujący angiotensynę 1 (ACE) oraz karboksypeptydaza M.

W ostatniej części wyników przedstawiono udział trzech proteinaz w powstawaniu dwułańcuchowej formy wielkocząsteczkowego kininogenu (HKa) czyli pozbawionej sekwencji bradykininy. Pokazano, że zmodyfikowany przez SAP2 HK zachowuje integralną domenę 6 i wiąże się z prekalikreina osocзовą. Z kolei dwułańcuchowa forma HKa stymulowała trzy cytokiny: IL-1 β , TNF- α i IL-6 w komórkach U937. W tej części (str. 98) oraz ponownie w Dyskusji (str. 116) znalazło się niejasne sformułowanie: „wytypowanie modelu komórkowego, który w wyniku interakcji z HKa zdolny byłby do uruchamiania sekrecji prozapalnych cytokin”, gdyż model nie może uruchomić wydzielania cytokin. W tym samym układzie komórkowym pokazano, że trawienie generowanych przez SAP2 fragmentów HK za pomocą ACE pozostaje bez wpływu na wydzielanie badanych cytokin

a więc za stymulację komórek odpowiadają inne niż kininy fragmenty HK. Pokazano, że te niekininowe fragmenty HK uwalniane przez dwa enzymy, SAP2 i SAPP1, stymulowały w komórkach U937 IL-1 β i TNF- α w sposób zależny od czasu.

Licząca 18 stron **Dyskusja** pracy jest obszerna i napisana w sposób dojrzały, świadczący o dogłębnej znajomości tematu badań oraz została poparta wieloma danymi z piśmiennictwa. Autorka kolejno odnosi się do każdej grupy uzyskanych wyników i szczegółowo je analizuje. Cenną obserwacją Autorki jest wykazanie indukcji TNF α i IL-1 β nie tylko przez kininy ale także przez niekininowe fragmenty HK uzyskane przy pomocy enzymu SAP2 i SAPP1. Wyniki te wskazały na możliwość indukcji stanu zapalnego przez zakażenia drożdżakami na drodze receptorowej (z udziałem kinin i ich receptorów) oraz niezależnej od tych receptorów - z udziałem innych niż kininy mediatorów stanu zapalnego. Trudno nie zgodzić się z wyrażoną na zakończenie Dyskusji myślą, że przedstawione w rozprawie wyniki rozszerzają naszą wiedzę na temat aktywności proteinaz drożdżowych i w przyszłości mogą przyczynić się do pełnego wyjaśnienia mechanizmów zakażeń drożdżakami z rodzaju *Candida* oraz opracowania skuteczniejszych metod leczenia tych zakażeń.

Praca jest napisana poprawnym językiem, bardzo starannie zredagowana i ilustrowana. Praktycznie (poza kilkoma błędami literowymi i niejasnymi sformułowaniami wymienionymi powyżej) nie znaleziono żadnych usterek.

W podsumowaniu, wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani **Grażyny Braś** do następnych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na znaczną wagę uzyskanych wyników i znakomite ich przedstawienie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną **nagroda**.



Hanna Rokita