



Prof. dr hab. Wiesław Wątopek  
Tel. 71 3752 712  
E-mail watorek@biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 1.02.2015

### Ocena

pracy doktorskiej mgr Grażyny Braś zatytułowanej "Charakterystyka działania głównych proteinaz aspartylowych produkowanych przez patogenne drożdżaki *Candida albicans* i *Candida parapsilosis* na ludzkie kininogeny"

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

Zespół prof. Kozika od szeregu lat zajmuje się badaniem różnych aspektów mechanizmu kininogenezy – produkcji wazoaktywnych, prozapalnych peptydów generowanych z prekursorów jakimi są wielko- i drobnocząsteczkowy kininogen. Kininy zaangażowane są w szereg fizjologicznych (takich jak regulacja ciśnienia krwi, działalności serca i nerek) i patologicznych (stan zapalny) procesów. Uogólniając, rolą kinin jest utrzymanie biochemicznej homeostazy w ludzkim organizmie.

W tkankach kininy generowane są z drobnocząsteczkowego kininogenu przez tkankowe kalikreiny. W osoczu kininy generowane są przez tzw. układ kontaktu składający się z zymogenów dwóch proteaz serynowych: czynnika Hagemana i prekalikreiny oraz wielkocząsteczkowego kininogenu. Aktywacja tego układu i generacja kinin następuje w wyniku kontaktu jego składników z powierzchnią komórek. Mogą to być komórki gospodarza (śródbłonek, granulocyty obojętnochłonne, płytki krwi, monocyty i makrofagi) lub komórki infekujących mikroorganizmów. W wypadku infekcji, aktywacja układu kontaktu, czy to przez adsorpcję na powierzchni patogena, czy to przez aktywność jego proteinaz, ułatwia rozprzestrzenianie się zakażenia i pozyskiwanie składników odżywczych i umożliwia patogenowi wpływ na aktywację innych kaskad proteolitycznych funkcjonujących w

organizmie gospodarza, takich jak kaskada krzepnięcia krwi i fibrynolizy czy układ dopełniacza, co w rezultacie może prowadzić do szoku septycznego.

Mechanizm generacji kinin przez patogeny bakteryjne jest stosunkowo dobrze poznany. Może on zachodzić przez aktywację układu kontaktu na powierzchni komórki bakteryjnej lub przez bezpośrednią akcję bakteryjnych proteinaz na kininogeny.

O wiele mniej informacji dostępnych jest na temat produkcji kinin w wyniku infekcji przez oportunistyczne patogeny – drożdżaki z rodzaju *Candida*. Poznanie mechanizmu wirulencji tych patogenów i jego ewentualnego związku z kininogenezą jest bardzo istotne w obliczu nasilającej się ilości zakażeń grzybiczych (głównie kandydoz), szczególnie w wypadku osób z upośledzoną odpornością. Efekty tych badań mogą wskazać nowe cele terapeutyczne, co ma duże znaczenie ze względu na coraz częściej występującą oporność na aktualnie aplikowane leki przeciwgrzybicze.

Zespół prof. Kozika już od kilku lat zajmuje się tą problematyką. Wykazał m. in. zdolność proteinaz aspartylowych *Candida* spp. do hydrolizy ludzkich kininogenów oraz możliwość generowania kinin z wielkocząsteczkowego kininogenu w wyniku adsorpcji białek układu kontaktu na powierzchni komórek *Candida* spp.

Mgr Grażyna Braś kontynuuje tę tematykę zajmując się w swojej pracy doktorskiej charakterystyką działania proteinaz aspartylowych z *Candida albicans* i *Candida parapsilosis* na ludzkie kininogeny.

Recenzowana rozprawa liczy 141 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, a kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz licząca 223 pozycje bibliografia. W tekście zamieszczone jest 28 rysunków i 9 tabel.

W pierwszej części wstępu doktorantka przedstawia stan wiedzy na temat budowy i funkcji kininogenów, opisuje mechanizm fizjologicznej kininogenezy, omawia mechanizm działania i metabolizm kinin. Druga część wstępu poświęcona jest omówieniu sekrecjonowanych przez *Candida* spp. proteinaz aspartylowych ze szczególnym uwzględnieniem enzymów z *C. albicans* i *C. parapsilosis* analizowanych głębiej w eksperymentalnej części pracy. Lekturę wstępu ułatwiają własne rysunki autorki i pożyteczne tabele gromadzące informacje o budowie i funkcji omawianych w tekście białek.

Rozdział poświęcony celowi pracy jasno i precyzyjnie przedstawia zamierzenia badawcze doktorantki. Celem strategicznym jest poznanie wpływu jednego z czynników wirulencji *Candida* spp. jakim są aspartyłowe proteiny na ludzką kininogenezę. Cel ten ma być osiągnięty przez analizę fragmentacji kininogenów przez proteinę SAP2 z *C. albicans* i proteiny SAPP1 i SAPP2 z *C. parapsilosis*. oraz określenie funkcji powstałych po trawieniu białek i peptydów. Analiza szczegółowych celów przedstawionych przez doktorantkę świadczy o wszechstronnym i przemyślanym podejściu do badanego problemu. Efektem zamierzonych badań ma być porównanie produktów degradacji obu typów kininogenów przez wyżej wymienione proteiny, analiza aktywności inhibitorowej zmodyfikowanych kininogenów wobec proteinaz cysteinowych, identyfikacja powstających w wyniku proteolizy kinin i peptydów zawierających kininowe sekwencje, sprawdzenie ich powinowactwa do kininowych receptorów i ich zdolności do aktywacji szlaków sygnałowych dla produkcji prozapalnych cytokin, analiza wpływu osoczowych kininaz na aktywność biologiczną powstałych kinin i peptydów oraz analiza potencjalnej aktywności biologicznej innych niż kininy fragmentów wysokocząsteczkowego kininogenu.

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

Lektura opisu wyników badań pozwala na stwierdzenie, że zamierzone przez doktorantkę cele badawcze zostały osiągnięte. Oczyszczone z *C. albicans* i *C. parapsilosa* proteiny fragmentowały kininogeny z preferencją wobec drobnocząsteczkowej formy. Działanie tych proteinaz powodowało zanik aktywności inhibitorowej kininogenów wobec proteinaz cysteinowych. Proteoliza domeny 4 kininogenów uwalnia szereg kinin jak i peptydów zawierających kininowe sekwencje w swej strukturze. Wykazano, że peptydy te w wyniku kontaktu z ludzkim osoczem stają się dodatkowym źródłem kinin. Zwalniane kininy są zdolne do aktywacji kininowych receptorów B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R na powierzchni komórek użytej w eksperymencie linii komórkowej HEK293. Uruchamiają tym samym szlak sygnałowy prowadzący do syntezy prozapalnych interleukin IL-1 $\beta$  i IL-6, co wykazano z użyciem śródbłonkowej linii HMEC-1 jak i komórek linii U937. Działanie SAP2 i SAPP1 na wielocząsteczkowy kininogen prowadziło do generowania niekininowych fragmentów HK aktywujących niezależne od receptorów B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R szlaki sygnałowe uruchamiające w komórkach U937 produkcję prozapalnych cytokin. Jest to ciekawa

obserwacja wskazująca na istnienie alternatywnej drogi inicjowania stanu zapalnego w trakcie infekcji drożdżakami *Candida*.

Zakres badań eksperymentalnych przeprowadzonych przez doktorantkę dobrze świadczy o jej sprawności warsztatowej. Efektywne oczyszczenie trzech proteinaz z hodowli *C. albicans* i *C. parapsilosis* pokazuje dobrą znajomość preparatyki biochemicznej. Dokładna identyfikacja peptydów otrzymanych w wyniku proteolitycznej fragmentacji kininogenów świadczy o dobrej znajomości technik analitycznych związanych ze spektrometrią mas. Eksperymenty na liniach komórkowych wymagały znajomości prowadzenia hodowli kultur tkankowych jak i szeregu technik immunochemicznych.

Na wyróżnienie zasługuje licząca 18 stron wydruku rzeczowa i wyczerpująca, świadcząca o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu dyskusja, analizująca otrzymane wyniki w odniesieniu do danych literaturowych.

Lektura pracy nasuwa recenzentowi pytanie do doktorantki na temat relacji między kininogenezą wywoływaną bezpośrednią aktywnością proteinaz *Candida* a generacją kinin przez aktywację układu kontaktu w wyniku oddziaływania ze ścianami komórkowymi tych drożdżaków. Bezpośrednia proteoliza aktywna jest raczej w kwaśnym pH, co mogłoby ograniczyć jej działanie to tych narządów gospodarza, w których takie pH jest obecne, aktywacja układu kontaktu zachodzi natomiast w fizjologicznym pH.

Obowiązek recenzenta nakazuje przedstawienie uwag i pytań wynikających z analizy ocenianego tekstu. Uwagi te mają głównie edytorski charakter i nie wpływają na wysoką merytoryczną ocenę rozprawy. Na str.12 wstępu sformułowanie „występujący wyłącznie w tkankach szczurzych kininogen T„ bezpiecznie zastąpić informacją, że kininogen T wykryto dotychczas tylko w tkankach szczura. Zawarta na str. 19 informacja o stymulacji przez kininy produkcji noradrenaliny i wydzielania katecholamin sprawia wrażenie, że są to dwa różne związki chemiczne, a przecież noradrenalina jest katecholaminą. Informacja na str. 34 mówiąca, że proteazy SAP9 i SAP10 wiążą się kotwicą GPI z błoną komórkową *Candida* jest niedokładna. SAP9 wiąże się z błoną komórkową, natomiast SAP10 związana jest z błoną jak i z białkami występującymi w ścianie komórkowej. Na str. 106 niezrozumiałe jest sformułowanie „przeanalizowano hamowanie enzymu gospodarza przez kininogen”, enzymem, który próbowano hamować jest przecież roślinna papaina. Na czym polegał wspomniany na str. 108 nieprzedstawiony w pracy test oddziaływania HK z

SAP2 i SAPP1? Zamieszczona na str. 116 informacja produkcji TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  w wyniku kontaktu komórek U937 z HKa ilustrowana jest przez rys. 26, a nie jak podaje autorka rys. 27. Tekst pracy 7-krotnie odnosi się do pracy Lalmanacha et al., z 2010 r., natomiast w bibliografii nie ma danych tej publikacji. Błędnie podany jest numer zeszytu Biological Chemistry z publikacją doktorantki. Przy cytowaniu w tekście odnośników literaturowych bezpieczniej zastąpić sformułowanie „X i wsp.” przez „X i in.”, często nie wiemy, kto jest kierownikiem zespołu, a kto jego współpracownikiem.

W podsumowaniu, w opinii recenzenta oceniana dysertacja wnosi znaczący element nowości naukowej do wiedzy na temat wirulencji oportunistycznych patogenów z rodzaju Candida i spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Grażyny Braś przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę moją wysoką ocenę merytoryczną pracy, jak i fakt, że wyniki pracy zostały opublikowane w dwóch artykułach w czasopismach Biological Chemistry (2012) i Peptides (2013) wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej dysertacji

Wiesław Myśliwski