Dr hab. Małgorzata Cytryńska, prof. nadzw. UMCS
Zakład Immunobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

Ocena rozprawy doktorskiej
pt. „Wpływ proteaz aspartylowych drożdżaków *Candida albicans* na potencjał grzybobójczy zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych i generację prozapalnych peptydów – kinin"
przedstawionej przez Pana magistra MARIUSZA GOGÓLA

Candida albicans, będący częstym składnikiem mikroflory komensalnej człowieka, zaliczany jest do patogenów oportunistycznych. U osób zdrowych jego obecność zwykle nie wywołuje infekcji, natomiast zaburzenie równowagi mikroflory, czy spadek odporności organizmu może prowadzić do rozwoju infekcji powierzchniowych, a nawet niebezpiecznych dla życia infekcji systemowych. Kolejne etapy rozwoju infekcji, ze strony grzyba warunkowane są wytwarzaniem wielu czynników wirulencji, wśród których istotną rolę pełnią enzymy proteolityczne z rodziny proteaz aspartylowych Sap.
Rekrutacja neutrofili i uwalnianie przez nie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET), stanowią wczesne etapy odpowiedzi immunologicznej uruchamiane w reakcji na infekcję *C. albicans*. Te złożone struktury, zawierające m.in. białka i peptydy o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, enzymy proteolityczne i ich inhibitory, enzymy przeprowadzające cytrulinację białek, a także składniki układu kontaktu, zatrzymują komórki patogena i stają się polem walki *C. albicans*-gospodarz, w której proteazy Sap pełnią ważną rolę.

Głównym celem badań podjętych w pracy była analiza efektów działania proteaz aspartylowych *C. albicans* na wybrane składniki białkowe NET, z uwzględnieniem wpływu cytrulinacji substratów na efektywność degradacji z udziałem Sap. Analiza ta pozwoliła na ocenę, w jaki sposób proteazy aspartylowe *C. albicans* są zaangażowane w przeciwdziałanie grzybobójczej aktywności NET.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorant przedstawił dotychczasową wiedzę dotyczącą czynników wirulencji *C. albicans*, ze szczególnym uwzględnieniem roli proteaz aspartylowych w patogenezie kandydoz. Wiele uwagi poświęcił również udziałowi NET w odpowiedzi na infekcje, podkreślając zagrożenia

dla organizmu gospodarza wynikające z uwalniania pułapek przez neutrofile. Ponadto, dokonał charakterystyki układu kontaktu i dróg generacji prozapalnych peptydów – kinin. Informacje zawarte we Wstępie zaprezentowano w kompetentny sposób, świadczący o bardzo dobrej znajomości literatury w zakresie podejmowanych badań. Część teoretyczna stanowi doskonałe wprowadzenie w tematykę realizowanych zadań badawczych oraz podstawę do dyskusji.

W części doświadczalnej pracy można wyróżnić trzy główne nurty badawcze, które zostały dobrze zaplanowane i konsekwentnie realizowane z wykorzystaniem bardzo dużego arsenału metod i technik eksperymentalnych. W pierwszym z nich dokonano analizy możliwości degradacji wybranych białkowych składników NET (histony, kalprotektyna, laktoferyna, mieloperoksydaza, azurocydyna, peptyd LL-37), z uwzględnieniem cytrulinacji niektórych z tych substratów. W badaniach tych Autor wykorzystywał zarówno oczyszczone rekombinowane proteazy Sap, jak i płyny pohodowlane uzyskane z hodowli *C. albicans* w formie drożdżopodobnej i strzępkowej, a także z hodowli mutantów *C. albicans* z delecją odpowiednich grup genów kodujących określone proteazy Sap. Ten nurt badań pozwolił wykazać, że spośród przebadanych składników NET, najbardziej podatne na działanie Sap są histony oraz peptyd LL-37, a także kalprotektyna i laktoferyna w niskim zakresie pH. Cytrulinacja spowalniała degradację histonów oraz obniżała aktywność przeciwgrzybową peptydu LL-37. Wyniki przedstawione w tej części pracy wskazują na udział proteaz Sap w przeciwdziałaniu grzybobójczej aktywności LL-37 wobec *C. albicans* uwięzionych w NET. Proteazy te biorą również udział w osłabianiu struktury NET poprzez degradację histonów pełniących rolę ochronną wobec DNA, co może ułatwiać ucieczkę komórek grzyba z sieci NET. Analizując tę część rozprawy pewną wątpliwość wzbudziła interpretacja wyników przedstawionych na Rys. 15B, dotycząca udziału proteazy Sap8 w degradacji histonu H3 w pH 7. Zastanawiam się również, czy metoda barwienia komórek przy użyciu FUN1 jest w pełni wystarczająca do oceny aktywności grzybobójczej, jako, że na jej podstawie oceniana jest aktywność metaboliczna. Dobrym uzupełnieniem byłaby tu metoda oparta na zliczaniu kolonii, pozwalająca wprost określić poziom przeżywalności komórek.

Drugi nurt prowadzonych badań dotyczył analizy udziału proteaz Sap *C. albicans* w degradacji tkanek gospodarza, która może zachodzić na skutek utraty kontroli nad aktywnością niektórych składników NET, np. elastazy neutrofilowej. Aktywność tej elastazy regulowana jest głównie przez alfa-1 inhibitor proteaz (A1PI). W pracy wykazano, że proteazy Sap1-4 oraz Sap9 są zdolne do degradacji A1PI poprzez odcięcie 51-aminokwasowego fragmentu z C-końca cząsteczki, czego skutkiem jest częściowa utrata

zdolności do hamowania aktywności elastazy neutrofilowej. Brak pełnego hamowania aktywności elastazy może prowadzić do uszkodzenia okolicznych komórek gospodarza ułatwiając przez to zasiedlenie ich przez komórki grzyba. A1PI odgrywa też zasadniczą rolę w kontroli chemotaksji neutrofili i aktywacji uwalniania NET. Oba procesy są regulowane przez IL-8, której dostępność jest kontrolowana m.in. przez tworzenie kompleksu z A1PI. W takim układzie, degradacja A1PI przez proteazy *C. albicans* może więc prowadzić do wzrostu poziomu wolnej IL-8 i rekrutacji kolejnych neutrofili do miejsca infekcji, co z jednej strony może działać przeciwko patogenowi, ale z drugiej (poprzez uszkodzenia okolicznych tkanek w wyniku działania np. elastazy neutrofilowej) ułatwiać zasiedlenie przez komórki grzyba. Tu należy zwrócić uwagę na fakt, że proteazy Sap były też zdolne do uwalniania z IL-8(77aa) bardziej aktywnej chemotaktycznie i stabilnej formy IL-8(72aa), co może powodować dalszy wzrost napływu neutrofili uwalniających NET, a co za tym idzie dalsze uszkodzenia tkanek sprzyjające inwazji grzyba. W tej części nasunęło mi się pytanie związane z występowaniem A1PI w postaci ośmiu form różnie modyfikowanych przez glikozylację. Czy wiadomo, które z tych form mogą być związane ze strukturami NET? Może warto byłoby w przyszłości przeanalizować podatność różnie glikozylowanych form A1PI na działanie proteaz Sap.

Trzeci nurt badań dotyczył analizy udziału proteaz Sap *C. albicans* w uwalnianiu kinin z kininogenów. Autor wykazał, że większość analizowanych proteaz aspartylowych (z wyjątkiem Sap7) uwalnia Met-Lys-bradykininę z niskocząsteczkowego kininogenu (NK) oraz z syntetycznego peptydu odpowiadającego domenie D4 wielkocząsteczkowego kininogenu (HK-D4-1), a najbardziej wydajną w tym zakresie jest proteaza Sap3. W odróżnieniu od pozostałych proteaz, proteaza Sap9 w zależności od długości sekwencji substratu uwalniała dużą ilość nieaktywnej des-Arg^1-bradykininy, ale również Met-Lys-bradykininę. Ponadto, z użyciem komórek HEK293 wykazujących nadprodukcję receptorów B2 udowodniono, że kininy uwalniane z niskocząsteczkowego kininogenu przede wszystkim przez Sap3 i Sap9 cechuje aktywność biologiczna. W pracy wskazano potencjalne miejsca cytrulinacji wielkocząsteczkowego kininogenu oraz możliwość cytrulinacji bradykininy przez deiminazy obecne w NET. Cytrulinacja HK-D4-1 hamowała uwalnianie kinin przy udziale Sap3, a cytrulinacja bradykininy prowadziła do spadku wiązania z receptorami B2. Ta część badań pozwala wysunąć przypuszczenie, że uwalnianie kinin przez proteazy Sap w miejscu infekcji może ułatwiać rozsiewanie komórek *C. albicans* poprzez zwiększanie przepuszczalności naczyń krwionośnych, co jest konsekwencją oddziaływania kinin z ich receptorami. Natomiast cytrulinacja zarówno kininogenu, jak i kinin może pełnić rolę regulacyjną w stanie zapalnym. Tutaj nasuwa się pytanie, czy na skutek działania proteaz Sap na

wielkocząsteczkowy kininogen (taki jest składnikiem NET) byłyby uwalniane takie same produkty jak przy degradacji HK-D4-1 oraz LK zastosowanych w pracy? Ponadto, jaki mógłby być efekt cytrulinacji wykazanej w innych niż D4 domenach HK na uwalnianie kinin przez proteazy Sap *C. albicans*?

Rozdział Dyskusja zawiera wnikliwą analizę przedstawionych wyników na tle bardzo obszernego i prawidłowo dobranego piśmiennictwa naukowego. W opracowaniu Dyskusji, a także teoretycznego Wstępu, Doktorant wykorzystał imponującą liczbę 315 pozycji literaturowych. Na uwagę zasługuje zaproponowany przez Autora „model unikania właściwości bójczych NET", opracowany na podstawie wyników zawartych w rozprawie w połączeniu z dostępnymi danymi literaturowymi. Ponadto, doskonałym odzwierciedleniem wielokierunkowości badań podjętych przez Doktoranta i jego dojrzałości w interpretacji danych eksperymentalnych jest schemat zaprezentowany na Rys. 43, który jednocześnie stanowi bardzo dobre podsumowanie całości pracy.

W rozprawie doktorskiej zauważyłam pewne wątpliwe sformułowania oraz drobne uchybienia, czy błędy redakcyjne, które są nieuniknione przy tak obszernym opracowaniu i w żaden sposób nie wpływają na ocenę merytoryczną całości pracy.

- Zastosowanie terminu 'forma komórkowa" dla określenia formy drożdżopodobnej *C. albicans* nie jest w pełni prawidłowe. Termin ten, szczególnie użyty dla odróżnieniu od „formy strzępkowej" sugeruje, że strzępki nie są rodzajem komórek.
- We Wstępie (str. 22) pojawił się termin „pleśnie". W pracach naukowych należałoby raczej stosować termin „grzyby strzępkowe" lub „grzyby nitkowate".
- Gramatyczne potknięcia skutkujące pojawieniem się błędu merytorycznego, np.: „Łańcuch ciężki, składający się z trzech pierwszych domen (D1-D3) oraz domeny kininowej (D4) posiada sekwencję..." – powinno być „...oraz domena kininowa (D4)..." (str. 42); „Chemokina ta oddziałuje z glikozaminoglikanami inhibitora..." (str. 127).
- Pewne braki, czy błędy w opisach rysunków, m.in.: brak wyjaśnienia +/- SD i liczby powtórzeń; brak określenia, co stanowi 100%; niewłaściwa legenda (Rys. 18A); brak na rysunku danych, o których mowa w opisie pod rysunkiem (Rys. 13 – brak pH 6-7; Rys. 20 – brak amfoterycyny B; Rys. 34 – brak Sap4); błędy w opisie (Rys. 23, 24 – aktywność badana wobec BCIP).
- Rozpoczynanie zdań, a zwłaszcza akapitów od wyrazów „oprócz', „ponieważ", „aby".
- Brak dwóch pozycji w spisie literatury, które zostały zacytowane w tekście (Kobayashi, 2015 – str. 36, 118; Mądry i Torlińska, 1999 – str. 45).

W podsumowaniu mojej oceny pragnę podkreślić, że praca Pana magistra Mariusza Gogóla prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Wyniki zostały przedstawione w sposób kompetentny i przeanalizowane w świetle aktualnych danych z piśmiennictwa naukowego, co świadczy o wysokich kwalifikacjach naukowych Doktoranta. Podkreślić należy również fakt, że część wyników została już opublikowana w postaci trzech artykułów w czasopismach o zasięgu światowym. W mojej ocenie praca stanowi ważny wkład w poznanie mechanizmów patogenezy infekcji wywoływanych przez *C. albicans* i roli, jaką w niej pełnią zewnątrzkomórkowe proteazy aspartylowe.

Uważam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pana magistra Mariusza Gogóla pt. „Wpływ proteaz aspartylowych drożdżaków *Candida albicans* na potencjał grzybobójczy zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych i generację prozapalnych peptydów – kinin" spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pana magistra Mariusza Gogóla do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy ocenianej rozprawy, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

Dr hab. Małgorzata Cytryńska, prof. nadzw. UMCS

Lublin, 10 czerwca 2016 r.