



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Seweryn-Ożóg pt.
„Rola białek powierzchniowych *Candida albicans* w aktywacji układu
generacji kinin i wychwytywaniu drożdżaków przez zewnątrzkomórkowe
pułapki neutrofilowe”**

Zakażenia drożdżakami *Candida* są obecnie częstym i trudnym problemem medycznym, stąd też badania nad interakcją tych drożdżaków z organizmem gospodarza, mogące służyć identyfikacji nowych celów terapeutycznych, są aktualne i cenne. Takie właśnie badania przeprowadziła mgr Karolina Seweryn-Ożóg pod promotorską opieką dr hab. Marii Rapały-Kozik i zostały one podsumowane w Jej rozprawie doktorskiej.

Świetnie napisana rozprawa doktorska mgr Karoliny Ożóg ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją kompetentnie napisane *Wprowadzenie*, w którym Autorka pracy przedstawia charakterystykę drożdżaków z rodzaju *Candida*, typy infekcji wywoływanych przez te drożdżaki, czynniki wirulencji *Candida albicans* (zmiennosc fenotypowa, dymorfizm morfologiczny, enzymy hydrolityczne, zjawisko adhezji), białka związane kowalencyjnie ze ścianą komórkową jako podstawę dla opracowania leków przeciwgrzybiczych, receptory człowieka biorące udział w reakcji z drożdżakami *Candida*, układ produkcji kinin (białka układu kontaktu, aktywację układu kontaktu) oraz zjawisko netozy.

Komórki *Candida* otoczone są ścianą komórkową, zatem to ściana komórkowa jest głównym elementem oddziałującym z organizmem gospodarza. Można oczekiwać, że zasadniczą rolę w tych oddziaływaniach odgrywają białka drożdżaków obecne w ścianie komórkowej, a ze strony gospodarza - białka błon komórkowych i składniki macierzy pozakomórkowej oraz białka układu obronnego, a także białka sieci zewnątrzkomórkowych neutrofilii stanowiących istotny element obrony organizmu przed mikroorganizmami. Celem pracy była szczegółowa charakterystyka

oddziaływania białek ściany komórkowej *Candida* z układem obronnym człowieka oraz w procesie netozy. Zadanie to nie było proste, bowiem musiało obejmować identyfikację głównych białek związanych ze ścianą komórkową drożdżaków oraz ich izolowanie lub ekspresję w układzie heterologicznym.

Rozległość przeprowadzonych badań znajduje odzwierciedlenie w liczbie stosowanych metod i procedur, obejmujących m. in. biotynylację i izolowanie białek ściany komórkowej formy strzępkowej *C. albicans*, izolowanie głównych białek drogą chromatografii jonowymiennej na złożu MonoQ i sączenia molekularnego, oczyszczanie enolazy z frakcji cytoplazmatycznej *C. albicans*, otrzymywanie rekombinowanych białek drożdżowych, identyfikację oczyszczonych białek techniką spektrometrii mas, typowanie białek ściany komórkowej *C. albicans* uczestniczących z białkami NET i ilościową charakterystykę ich oddziaływań techniką powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) i kompetycyjnym testem mikroplótkowym (ELLSA). Opisane metody obejmują 41 procedur (a można byłoby rozbić niektóre opisy na kilka odrębnych pozycji) obejmujących metody biochemii i biofizyki białek, biologii komórki, i biologii molekularnej. Zastosowany warsztat metodyczny był bardzo bogaty, a wkład pracy Doktorantki bardzo duży. Materiały i metody przedstawione są w rozprawie należycie szczegółowo (marginalne uwagi zamieszczam w dalszej części recenzji).

Użyty warsztat metodyczny był, w moim przekonaniu, optymalny dla realizacji celu pracy, nowoczesny i odpowiadający współczesnym światowym standardom badań w tej dziedzinie. Opis wyników jest jasny, precyzyjny, przejrzysty i przedstawiony w atrakcyjnej formie graficznej.

Doktorantce udało się wyizolować ze ścian komórkowych *C. albicans* adhezynę Als3 oraz dwa białka wielofunkcyjne: izomerazę glukozy-6-fosforanową i izomerazę triozofosforanową. Inne białko wielofunkcyjne, enolazę, Doktorantka wyizolowała z ekstraktu cytoplazmatycznego drożdżaków, gdyż sekwencja białka związanego ze ścianą komórkową była identyczna z sekwencją białka cytoplazmatycznego. Ze względu na trudność wyizolowania potrzebnych ilości mutazy fosfoglicerynianowej, białko to otrzymała metodą inżynierii genetycznej drogą ekspresji w komórkach *E. coli* genu *GP11* *C. albicans* wzbogaconego o sekwencję metki histydynowej. Niepowodzeniem zakończyła się próba pozyskania w analogiczny sposób czynnika elongacji 2.

Strategia badawcza zastosowana w badaniach polegała na charakterystyce oddziaływania izolowanych białek drożdżaka z wybranymi białkami gospodarza: kininogenem, czynnikiem

Hagemana i prekalikreina, za pomocą techniki SPR oraz ich oddziaływania z białkowymi składnikami NET (mieloperoksydazą, laktoferyną, azurocydyną, elastazą neutrofilii, histonami H2A, H3 i H4), a także peptydem antybakteryjnym LL-37 za pomocą techniki SPR i enzymatycznego testu na wiązanie ligandu. Cenne było zbadanie konkurencji o immobilizowane białko adhezyjne Als3 pomiędzy kininogenem a syntetycznymi peptydami mapującymi jego sekwencję, które wykazało najsilniejsze oddziaływanie peptydu HK358-383 i umożliwiło identyfikację innych fragmentów cząsteczki kininogenu istotnych dla oddziaływania z białkiem Als3.

Doktorantka wytypowała główne białka sieci zewnątrzkomórkowych neutrofilii (NET) uczestniczące w wiązaniu białek ściany komórkowej *C. albicans* metodą ligand blotting oraz partnerów białek ściany komórkowej dla białkowych składników NET techniką sprzęgania fotoreaktywnego, zbadala wiązanie frakcjonowanych białek ściany komórkowej drożdżaka z białkowymi składnikami NET i ilościowo scharakteryzowała oddziaływania oczyszczonych białek ściany komórkowej *C. albicans* z izolowanymi składnikami NET technikami SPR i enzymatycznego testu na wiązanie ligandu. Stałe dysocjacji kompleksów białek okazały się być rzędu 10^{-5} - 10^{-8} M. Najniższe wartości stałych dysocjacji [rzędu $(1-2) \cdot 10^{-8}$ M] cechowały oddziaływanie adhezyny Als3 z mieloperoksydazą, mutazy fosfoglicerynianowej z laktoferyną i peptydu LL-37 z enolazą.

Interesujące było wykazanie istotnej roli reszt cukrowych w oddziaływaniach adhezyny Als3 *C. albicans* z białkowymi składnikami NET oraz obniżenia wiązania białek ściany komórkowej *C. albicans* przez peptyd LL-37 w wyniku cytrulinacji tego peptydu.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są pierwszymi w piśmiennictwie jednoznacznymi danymi charakteryzującymi ilościowo oddziaływanie wybranych białek ściany komórkowej *C. albicans* z szeregiem białek układu kontaktu uczestniczącymi w produkcji wazoaktywnych i prozapalnych kinin oraz szeregiem białek NET. Wyniki te mogą wskazać nowe cele terapeutyczne w poszukiwaniach nowych leków przeciwgrzybiczych. Z tego względu oceniam je wysoko.

Podjęcie badawcze zastosowane przez Doktorantkę ma swoje ograniczenia. Dane ilościowe zostały uzyskane tylko dla wybranych białek zarówno drożdżaka, jak i gospodarza, nie uwzględniają one interakcji białek gospodarza z niebiałkowymi składnikami ściany komórkowej

patogena. Interesująca byłaby możliwość stworzenia modelu pozwalającego przewidzieć miejsce wiązania danego białka z powierzchnią komórki drożdżaka, choć biorąc pod uwagę ogólnie nieduże różnice wartości stałych dysocjacji kompleksów różnych białek *Candida* z białkami gospodarza oraz zmienność antygenową mikroorganizmu, przydatność takiego modelu mogłaby być ograniczona. Nie taki był zresztą cel pracy.

Inny problem dotyczy możliwości wystąpienia artefaktów związanych z wpływem izolowania białek (usunięcia ich z otoczenia ściany komórkowej), derywatywacji i unieruchomienia na stałym podłożu na oddziaływanie z białkami gospodarza. Procedury te mogą z jednej strony maskować rejony cząsteczek białek mogące brać udział w oddziaływaniach *in situ*, a z drugiej odsłaniać bądź generować nowe miejsca wiązania, niedostępne *in situ*. Na pierwszą możliwość wskazują m. in. różnice wartości stałych dysocjacji kompleksu enolaza-mieloperoksydaza i mutaza fosfoglicerynianowa-mieloperoksydaza wyznaczone metodą ELLSA i techniką SPR, które Doktorantka tłumaczy, moim zdaniem w pełni słusznie, udziałem w immobilizacji fragmentów cząsteczek białek ważnych dla interakcji z białkiem gospodarza (s. 114). Przykładem drugiej możliwości jest zwiększenie wiązania czynnika XII układu krzepnięcia krwi przez adhezynę Als3 w następstwie jej deglikozylacji, co zapewne prowadzi do pojawienia się nowych miejsc wiążących w cząsteczce adhezyny (s. 101). Można zastanawiać się, czy analogiczna sytuacja nie może dotyczyć oddziaływań białek izolowanych w porównaniu z białkami związanymi ze ścianą komórkową. Te uwagi w żadnej mierze nie deprecjonują wyników przedstawionych w rozprawie, uzyskanych z zastosowaniem optymalnej dla obranego celu, nowoczesnej metodyki.

Mam kilka uwag natury głównie edycyjnej. W opisie metod Doktorantka pominęła procedurę otrzymywania NET. Na s. 73 winien być chyba użyty termin „liza hipotoniczna” (zamiast „hipertoniczna”). Z uznaniem zauważam stosowanie właściwego terminu „przyspieszenie” na określenie wielkości mierzonej liczbą g, choć na s. 51 pojawia się jednak nie do końca precyzyjny termin „prędkość wirowania”, a na s. 73 nie w pełni jednoznacznie scharakteryzowane są warunki wirowania (podanie *rpm* nie definiuje jednoznacznie przyspieszenia, bowiem ta wielkość zależy od typu wirówki, konkretnie od odległości od osi obrotu).

Prezentacja doświadczenia wskazującego na aktywację enolazy przez mieloperoksydazę winna zawierać wynik doświadczenia kontrolnego wskazującego na brak aktywności enolazy w stosowanym preparacie mieloperoksydazy (lub choćby odnośną wzmiankę w legendzie ryciny). Na s. 26 chochlik komputerowy zamienił keratynę w kreatynę, a na s. 89 „własności” winny być zastąpione na „właściwości”. Nieco nieprecyzyjne jest stwierdzenie na s. 102, iż

„prążek o masie cząsteczkowej 60 kDa odpowiada mieloperoksydazie będącej dimerem o masie cząsteczkowej około 150 kDa”; należałoby raczej powiedzieć, że ten prążek odpowiada podjednostce ciężkiej mieloperoksydazy (trzeba jednak przyznać, że kwestia ta jest dalej wyjaśniona). Na s. 126 Autorka rozprawy pisze, że białko Tpi1 „zaangażowane jest w adhezję do komórek Caco-2, w związku z tym odgrywa istotną rolę w kolonizacji organizmu gospodarza”. To skrót myślowy, pomijający fakt, że Caco-2 to linia komórkowa hodowana *in vitro*, a nie typ komórek występujący w organizmie. Doktorantka tłumaczy termin „moonlighting proteins” jako „białka niezwiązane kowalencyjnie ze ścianą komórkową” (s. 10), co nie w pełni odzwierciedla sens tego terminu; moim zdaniem polski termin „białka wielofunkcyjne” nie jest wprawdzie tak dowcipny jak angielski, ale zupełnie trafny. Wykaz skrótów mógłby być wzbogacony o kilka pozycji, np. ASL i BPI. Ogólnie jednak - poza tymi drobnymi usterkami – edycja pracy jest świetna i zasługuje na wysokie uznanie.

Znakomicie napisana 17-stronicowa *Dyskusja* zawierająca krytyczną analizę własnych wyników i ich konfrontację z danymi piśmiennictwa jest dowodem dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Bogata *Bibliografia* obejmuje około 300 pozycji. Rozprawa jest bardzo dobrze, logicznie, zrozumiale napisana i czyta się ją łatwo, nawet gdy porusza niełatwe kwestie.

W podsumowaniu uważam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Seweryn-Ożóg spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Seweryn-Ożóg do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wyrażam też przekonanie, że ze względu na aktualność podjętego problemu badawczego, wysoki poziom metodyczny badań, wagę uzyskanych wyników, bardzo duży nakład pracy Doktorantki i staranną edycję, rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

Łódź, dnia 5 stycznia 2017