



Prof. dr hab. Wiesław Wątopek

Tel. 71 3752 712

Fax. 71 3752 608

E-mail watorek@biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 7 stycznia 2013

Ocena

pracy doktorskiej mgr Justyny Karkowskiej-Kulety zatytułowanej
„Adsorpcja i aktywacja składników osocznego układu produkcji
kinin na powierzchni grzybów z rodzaju *Candida*.”

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 generacji kinin – wazoaktywnych,
prozapalnych peptydów zaangażowanych w szereg fizjologicznych
(takich jak regulacja ciśnienia krwi, działalności serca i nerek) i
patologicznych (stan zapalny) procesów.

W osoczu kininy generowane są przez tzw. układ kontaktu
składający się z zymogenów dwóch proteaz serynowych: czynnika
Hagemana (FXII - czynnika XII układu krzepnięcia krwi) i
prekalikreiny oraz wielkocząsteczkowego kininogenu będącego
prekursorem kinin.

Aktywacja 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 proteaz, 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 aktywacji kaskady generacji kinin przez patogeny bakteryjne jest stosunkowo dobrze poznany, natomiast niewiele wiadomo o aktywacji układu kontaktu przez patogenne grzyby. Bliższą charakterystykę tego procesu przedstawia oceniana dysertacja. Jej tematem jest analiza aktywacji osoczkowego układu produkcji kinin w wyniku infekcji powodowanej przez oportunistyczne patogeny – drożdżaki z rodzaju *Candida*. Poznanie związanego z aktywacją układu kontaktu mechanizmu wirulencji tych patogenów 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.

Recenzowana rozprawa liczy 164 strony 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 311 pozycji bibliografia. W tekście zamieszczone jest 38 rysunków i 5 tabel.

W liczącym 33 strony i składającym się z czterech rozdziałów wstępie doktorantka w wyczerpujący sposób charakteryzuje oportunistyczne patogeny z rodzaju *Candida*, omawia białka wchodzące w skład układu produkcji kinin, przedstawia mechanizmy aktywacji tego układu oraz analizuje rolę jego aktywacji w infekcjach bakteryjnych.

Jasno i precyzyjnie przedstawiony jest cel pracy. Jest nim charakterystyka procesu adsorpcji białek układu kontaktu na powierzchni komórek czterech gatunków z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* oraz analiza produkcji kinin przez zaadsorbowane białka. Analiza szczegółowych celów przedstawionych przez doktorantkę świadczy o wszechstronnym i przemyślanym podejściu do badanego problemu. Efektem badań ma być charakterystyka parametrów adsorpcji czynnika Hagemana, prekalikreiny i wielkocząsteczkowego kininogenu na powierzchni strzępkowych form komórek *C. albicans* i *C. tropicalis*, charakterystyka wiązania białek układu kontaktu do izolowanych uprzednio powierzchniowych białek ścian komórkowych *C. albicans* i *C. tropicalis*, znalezienie fragmentów cząsteczek czynnika Hagemana i prekalikreiny odpowiedzialnych za oddziaływanie z białkami powierzchniowymi ściany komórkowej *C. albicans*, analiza przebiegu produkcji kinin z wielkocząsteczkowego kininogenu zaadsorbowanego na powierzchni komórek drożdżaków wraz z innymi białkami układu kontaktu w obecności osocza ludzkiego, mapowanie fragmentów cząsteczki kininogenu odpowiedzialnych za wiązanie z powierzchnią form strzępkowych komórek *Candida* sp. oraz znalezienie występujących na powierzchni komórek *C. albicans* receptorów dla wielkocząsteczkowego kininogenu.

Lektura opisu wyników pozwala na stwierdzenie, że zamierzone przez doktorantkę cele badawcze zostały osiągnięte.

Wykazano adsorpcję składników układu kontaktu zarówno na powierzchni komórek drożdżaków jak i wiązanie tych białek z wyizolowanymi białkami powierzchniowymi ściany komórkowej grzybów. Najsilniej wiązany był czynnik Hagemana i kininogen, nieco słabiej adsorbowała prekalikreina. Dodatkową adsorpcję prekalikreiny stwierdzono na związanym wcześniej z powierzchnią komórek grzyba wielkocząsteczkowym kininogenie. Obserwowane częściowe współzawodnictwo pomiędzy poszczególnymi białkami układu kontaktu świadczy, że niektóre miejsca wiążące na powierzchni patogenu mogą być wspólne dla tych białek. Analiza oddziaływań układu kontaktu z elementami ściany komórkowej *Candida* pokazała, że oprócz białek powierzchniowych ściany w oddziaływaniach uczestniczyć mogą także polisacharydowe komponenty ściany komórkowej.

Adsorpcja białek układu kontaktu na powierzchni komórek *Candida* sp. powodowała aktywację proteaz wchodzących w skład kompleksu i generowanie kinin z kininogenu zarówno bez jak i w obecności ludzkiego osocza.

Użycie syntetycznych peptydów jak i przeciwciał specyficznych wobec określonych fragmentów cząsteczki kininogenu jako czynników konkurujących o wiązanie białek powierzchniowych *Candida* z kininogenem pozwoliło na identyfikację sekwencji aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie w trzeciej domenie ciężkiego łańcucha i piątej i szóstej domenie lekkiego łańcucha kininogenu. Ustalono też, że czynnik Hagemana i prekalikreina wiążą się z białkami ściany komórkowej *Candida* sp. poprzez swoje ciężkie łańcuchy.

Zastosowanie immobilizowanego wielkocząsteczkowego kininogenu pozwoliło na wytypowanie głównych receptorów dla układu kontaktu występujących w ścianie komórkowej drożdżaków. Wśród receptorowych białek stwierdzono obecność adhezyny Als3p,

enolazy, mutazy fosfoglicerynianowej i izomerazy triozofosforanowej.

Na wyróżnienie zasługuje licząca 19 stron maszynopisu rzeczowa, świadcząca o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu dyskusja analizująca otrzymane wyniki w odniesieniu do danych literaturowych dotyczących oddziaływania układu kontaktu z komórkami gospodarza i komórkami szeregu bakteryjnych patogenów. W opinii recenzenta szerzej należałoby przedyskutować występowanie w charakterze receptorów układu kontaktu enzymów glikolizy. Występowanie w tym charakterze enolazy, mutazy fosfoglicerynianowej i izomerazy triozofosforanowej jest ciekawym przykładem istnienia tzw moonlighting proteins (w wolnym przekładzie – białek chałturzących). Jest to coraz liczniejsza grupa białek związanych zwykle z konserwatywnym ewolucyjnie szlakiem metabolicznym, które po przemieszczeniu do innych elementów struktury komórki pełnią inną niż pierwotna funkcję. Do grupy tej należy między innymi siedem spośród dziesięciu enzymów szlaku glikolizy i siedem spośród ośmiu enzymów cyklu Krebsa.

Obowiązkiem recenzenta jest przedstawienie krytycznych uwag dotyczących pracy. Jest ich niewiele i dotyczą one głównie wstępu i nie wpływają na wysoką ocenę merytorycznej wartości przedstawionej dysertacji.

Występujące na str. 14 stwierdzenie, że lizozym, laktoferyna i laktoperoksydaza należą do mechanicznych i fizycznych czynników niespecyficznej obrony immunologicznej gospodarza jest nieprecyzyjne. Są to czynniki biochemiczne.

Informacja na str.18 mówiąca, że proteazy Sap9p i Sap10p wiążą się kotwicą GPI ze ścianą komórkową *Candida* jest niedokładna. Sap9p wiąże się z błoną komórkową, natomiast Sap10p związana jest z błoną jak i z białkami występującymi w ścianie komórkowej.

Rysunek 5 na str. 23 błędnie przedstawia umiejscowienie kotwicy GPI w strukturze adhezyny z rodziny Als. Z rysunku wynika, że

kotwica przytwierdzona jest do reszt aminokwasowych w okolicy C-końca łańcucha polipeptydowego. W naturze, kotwica wiąże się z C-końcową resztą polipeptydu, białko nie ma wolnego C-końca.

Na str. 26 i 34 doktorantka mówi o produkcji przez neutrofile zewnątrzkomórkowych sieci NET. Struktury te są efektem specyficznej śmierci komórek neutrofili zwanej przez analogię do nekrozy i apoptozy nettozą, trudno tu więc mówić o produkcji skoro struktury te powstają po śmierci komórki.

Na str. 31 błędnie podano ilość reszt aminokwasowych w sekwencji prekalikreiny osoczowej. Powinno być 619 a nie 609.

Na str. 33 występuje błędna numeracja reszt tworzących triadę katalityczną w lekkim łańcuchu czynnika XII krzepnięcia krwi. Powinno być His 393, Asp442 i Ser 544

W kilku miejscach pracy pojawia się sformułowanie o wydzielaniu zewnątrzkomórkowym lub sekrecjonowaniu na zewnątrz komórki. Pojęcie sekrecji (wydzielania) implikuje zewnątrzkomórkowy cel procesu.

Recenzent bardzo wysoko ocenia edytorską stronę pracy. Podczas lektury znaleziono tylko jeden błąd literowy.

W podsumowaniu, w opinii recenzenta przedstawiona dysertacja spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Justyny Karkowskiej-Kulety 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 czasopiśmie Biological Chemistry (2010) i Peptides (2011), a część wstępu przedstawiono w przeglądowym artykule w Acta Biochimica Polonica (2009) wnioskuję do Wysockiej Rady o wyróżnienie ocenianej dysertacji.

Wiesław Wysocki