



INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Warszawa 24.10.2023r

Prof. dr hab. Joanna S. Kruszewska
Kierownik Pracowni Biologii Grzybów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Darii Derkacz pt. „Rola błony i ściany komórkowej
Candida albicans w odpowiedzi zapalnej”.**

Recenzję rozprawy doktorskiej mgr Darii Derkacz wykonałam zgodnie z wymogami art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

Ogólny opis pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Darii Derkacz została wykonana na Wydziale Biotechnologii w Zakładzie Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem pani dr hab. Anny Krasowskiej, Prof. UW r.

Praca w formie monografii zawiera takie elementy jak streszczenie, wstęp w formie przeglądu literaturowego, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię i załączniki. Układ pracy i wszystkie przedstawione elementy są prawidłowe i zgodne z wymogami stawianymi rozprawom doktorskim.

Cel pracy jest przedstawiony jasno a założenia pracy przedstawione w czterech punktach pozwalają określić w jakim kierunku będą prowadzone badania. Metody opisane w pracy są nowoczesne i adekwatne do prowadzonych badań i osiągnięcia założonych celów. Wyniki są opisane prawidłowo, wykresy i zdjęcia są dobrej jakości i umożliwiają śledzenie toku eksperymentów. Wykaz piśmiennictwa zawiera 201 pozycji i jest znakomitą podporą do dyskusji i pozostałych elementów rozprawy.

Zagadnienia prezentowane w rozprawie doktorskiej

Dane Światowej Organizacji Zdrowia zakażenia *Candida albicans* przedstawiają jako zagrażające życiu i będące przyczyną zgonu wielu hospitalizowanych pacjentów. Biorąc pod uwagę globalne występowanie *Candida*, rosnącą oporność na

leki przeciwgrzybowe, rosnącą częstotliwość zakażeń i ich śmiertelność istotne jest koncentrowanie badań na poszukiwaniu mechanizmów nabywania oporności na leki co może pomóc w walce z zakażeniami grzybiczymi.

W rozprawie Doktorantka najpierw charakteryzuje patogen *Candida albicans*. Zwraca uwagę, że jest to patogen oportunistyczny, który pozostając w równowadze z ludzkim mikrobiomem i nie wywołuje choroby ale w przypadku zachwiania tej równowagi doprowadza do zakażeń. Doktorantka zwraca uwagę, że głównym czynnikiem wpływającym na rozwój infekcji jest upośledzenie funkcji układu immunologicznego, zaburzenie funkcji mikrobiomu poprzez terapie antybiotykowe ale także cukrzyca, i zabiegi medyczne z użyciem wyrobów medycznych jak np. stenty i inne na których może rozwijać się biofilm *Candida*.

Następnie Doktorantka charakteryzuje błony komórkowe pod kątem składu lipidowego i biosyntezy steroli oraz ścianę komórkową *Candida* i poszczególne jej komponenty wraz z krótkim omówieniem ich syntezy. Doktorantka zwraca uwagę na β -glukan który eksponowany na powierzchni komórki *Candida* silnie stymuluje układ immunologiczny ale może być maskowany na co wpływa skład błony komórkowej a także obecność mleczanu w środowisku. Podobnie mannany odgrywają rolę w lekooporności i inicjowaniu odpowiedzi zapalnej.

W następnym rozdziale Doktorantka opisuje leki przeciwgrzybicze, oporność wielolekową i mechanizmy tej oporności u *C. albicans* a także niektóre czynniki wirulencji.

Na końcu Doktorantka umieszcza rozdział dotyczący odpowiedzi immunologicznej na infekcję *C. albicans*.

Wyniki rozprawy doktorskiej

Na wstępie Doktorantka przedstawiam charakterystykę szczepów *C. albicans*. Jeden szczep niesie delecję obu kopii genu *ERG11* a drugi posiada mutację punktową w tym genie powodującą zamianę lizyny 143 na argininę w obu kopiach genu (*ERG11^{K143R}*). Szczep z mutacją punktową reprezentuje częstą sytuację kliniczną gdzie mamy do czynienia ze szczepami opornymi na terapię lekami z grupy azoli. Doktorantka skupia się na analizie parametrów związanych z syntezą ergosterolu jak wrażliwość szczepów na flukonazol i amfoterycynę B, ekspresja genu *ERG11* i *ERG11^{K143R}* i poziom ergosterolu.

Doktorantka pokazuje jak kształtuje się poziom lanosterolu którego przekształcanie jest hamowane przez flukonazol oraz poziom eburolu reprezentującego alternatywną ścieżkę przemiany lanosterolu oraz końcowego produktu tej ścieżki metylergostadienolu.

Różnice w poziomie poszczególnych steroli prowadzą Doktorantkę do dalszych badań związanych z płynnością błony komórkowej szczepów. W związku z pokąźnymi różnicami w ilości steroli w błonach Doktorantka zaobserwowała różnice

w płynności błon komórkowych (obniżona płynność błon mutantów po 8 godz. hodowli).

Następnym krokiem było zbadanie składu ściany komórkowej szczepów. Badania mikroskopowe szczepów wybarwionych odpowiednio odczynnikami łączącymi się z chityną, β -glukanem i mannanem pokazały, że w szczepach mutantów chityna jest bliżej warstwy glukanów, glukan akumulują się w obrębie blizny podziałowej a sygnał pochodzący od mannanów jest słabszy. Analiza ilościowa pokazała, że podwójna delecja genu *ERG11* prowadzi do wzrostu ilości chityny i β -glukanu natomiast ilość mannanu w tym szczepie jest na poziomie szczepu dzikiego za to mutant z substytucją K do R posiada mniej mannanu w ścianie. Ważna jest także znaczna ekspozycja chityny i β -glukanu na powierzchnie komórki w obu mutantach i różnice jakościowe glukanów.

Naturalnym krokiem było określenie wirulencji szczepów poprzez badanie czynników wirulencji takich jak zdolność do tworzenia strzępek i biofilmu. Oba mutanty wykazały wyższą hydrofobowość a szczep z delecją *ERG11* upośledzenie tworzenia biofilmu i brak strzępek podczas hodowli. Mutant z delecją *ERG11* wykazał zwiększoną ekspresję adhezyn po 8h hodowli a gen kodujący adhezynę *Hwp1* ulegał wyższej ekspresji w obu mutantach. Po 24h obraz ekspresji się zmieniał i ekspresja genu *HWP1* spadała do wartości kontrolnej.

Następnie Doktorantka przystąpiła do drugiej części badań dotyczącej wpływu zmian w błonie i ścianie mutantów na odpowiedź immunologiczną badaną na liniach komórkowych.

Jako wskaźnik odpowiedzi immunologicznej na zakażenie badanymi szczepami wybrała cytokiny wydzielane przez komórki linii komórkowych fibroblastów skóry i linię komórkową nabłonka pochwy. Linia komórkowa fibroblastów skóry produkowała zwiększoną ilość IL-6 i IL8 indukowana szczepem z mutacją punktową w porównaniu do szczepu dzikiego co widać także na poziomie zwiększonej ekspresji genów kodujących obie interleukiny. Okazało się, że obecność linii komórkowej fibroblastów indukowała także ekspresję adhezyn.

W przypadku linii komórkowej nabłonka pochwy Doktorantka obserwowała wzrost ekspresji IL-1 α , IL-6, IL8 i chemokiny MCP1 pod wpływem mutantu punktowego a przy dłuższej inkubacji rosła ekspresja IL-1 α i IL-6 także pod wpływem mutantu z delecją *ERG11*. Wyraźny efekt widać także we wzroście ekspresji odpowiednich genów kodujących cytokiny. W tym przypadku ekspresja adhezyn rośnie najbardziej w szczepie dzikim a przy dłuższej inkubacji w mutantach.

Wyniki Doktorantka poddała obszernej dyskusji. Doktorantka przedstawia fakty będące powodem wybrania mutantu punktowego do badań. Szczep jest wrażliwy na Amfoterycynę B natomiast dobrze rośnie w obecności flukonazolu a szczep z delecją *ERG11* nie wykazuje wrażliwości na żaden z tych antybiotyków. To pozwala spodziewać się różnic w badanych parametrach.

Za najważniejsze wyniki pracy uważam

Wykazanie znacząco podwyższonej ekspresji genu *ERG11*^{K143R} i znacząco podwyższonego poziomu ergosterolu w mutancie punktowym co tłumaczy wrażliwość szczepu na Amfoterycynę B.

Wykazanie spadku poziomu ekspresji genu *ERG11*^{K143R} i poziomu ergosterolu pod wpływem flukonazolu w stosunku do warunków kontrolnych i wzrostu ekspresji genu pod wpływem Amfoterycyny B

Wykazanie kompensowania braku ergosterolu w mutancie z delecją *ERG11* zwiększoną syntezą innych steroli ze ścieżki alternatywnej

Wykazanie zmian w błonie komórkowej mutantów i powiązanie tych zmian z ekspozycją chityny i β -glukanu na powierzchni komórki

Wykazanie różnic w budowie ściany komórkowej, zwiększonej ekspresję genów związanych z syntezą chityny i β -1,3 i β -1,6 glukanu

Wykazanie obniżenia zdolności do tworzenia strzępek i biofilmu przez szczep z delecją genu *ERG11* w przeciwieństwie do szczepu z mutacją punktową

Wykazanie różnic w profilu ekspresji adhezyn w mutantach

Wykazanie związku wykrytych różnic między mutantami na różnice w odpowiedzi immunologicznej.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że szczep z delecją genu *ERG11* słabiej indukował odpowiedź immunologiczną niż szczep z mutacją punktową. Przyczyny tego zjawiska są dobrze udokumentowane wynikami badań Doktorantki.

Dorobek naukowy Doktorantki

Doktorantka jest współautorem 7 publikacji. Prace zostały opublikowane w latach 2020- 2023. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Są to prace zawierające wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej. Doktorantka nie podała danych bibliometrycznych więc sama policzyłam, że całkowity IF publikacji wynosi 36,202 co jest imponującym osiągnięciem. Doktorantka jest także współautorem 3 doniesień zjazdowych, w jednym doniesieniu jest pierwszym autorem.

Uwagi do pracy i pytania do Doktorantki

Str. 16 rozdział 4.3. Doktorantka pisze: „Mannany obecne w ścianie komórkowej *C. albicans* posiadają modyfikację potranslacyjną, która polega na N- i O-glikozylacji tego polimeru. I dalej „N-glikozylowane mannany”

Następnie str. 17 „O-glikozylowane mannany są ściśle związane z”
Modyfikacja potranslacyjna jak sama nazwa wskazuje dotyczy peptydów i białek a nie mannanu.

Str. 27 niezbyt zřęcznie .. formacja fagosomu – powinno być formowanie fagosomu

Pytanie do Doktorantki

Dlaczego do badań Doktorantka wybrała szczep z mutacją punktową w genie *ERG11* gdzie lizynę zastąpiono arginina? Oba aminokwasy są zasadowe. Wydaje się, że nie dadzą dużych różnic konformacyjnych.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że praca zawiera ogrom ciekawych i dobrze udokumentowanych wyników i że na ich podstawie Doktorantka zrealizowała całkowicie cel który przed sobą postawiła. Metody jakie zostały użyte w pracy są nowoczesne, adekwatne do realizacji postawionych zadań i pokazują wszechstronne przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej i genetyki drożdży. Dyskusja jest rozległa a najcenniejsze wydaje się podsumowanie wyników i wnioski. Doktorantka także pokusiła się o graficzne podsumowanie które bardzo dobrze przedstawia uzyskane wyniki.

Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w ustawie z dn. 20 lipca 2018 roku o stopniach i tytule naukowym (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Cel pracy został osiągnięty, wyniki są oryginalne a praca ma niepodważalny walor poznawczy. Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr. Darii Derkacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na pokaźny całkowity dorobek naukowy Doktorantki i wysoki IF prac zawierających wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej, szerokie ujęcie tematu, zwięzłe, jasne przedstawienie wyników, nie budzące wątpliwości podsumowanie i wnioski stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr Darii Derkacz.

Z poważaniem

Joanna Kruszewska

