

Łódź, dnia 26.11.2023 r.

Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ  
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii,  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Łódzki

## RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej mgr Darii Derkacz**

**„Rola błony i ściany komórkowej *Candida albicans* w odpowiedzi zapalnej”**

Podstawą formalną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo dr hab. inż. Marcina Kadeja, prof. Uwr, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, z dnia 2.10.2023 r., w którym zostałam poinformowana o powierzeniu mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Darii Derkacz zatytułowanej „Rola błony i ściany komórkowej *Candida albicans* w odpowiedzi zapalnej”.

### **Ocena formalna rozprawy**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Darii Derkacz została wykonana w Zakładzie Biotransformacji Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Anny Krasowskiej, prof. UW. r.

Praca została przygotowana w formie monografii, z zachowaniem struktury zgodnej z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim. Tytuł dysertacji jest zgodny z jej treścią. W rozprawie złożonej z dziesięciu rozdziałów, Autorka zamieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp obejmujący 7 podrozdziałów, w których Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała patogen

042 635 41 48

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

uni.lodz.pl

*Candida albicans*, opisała możliwości jego zwalczania jak również w sposób jasny przedstawiła mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, za pomocą których patogen jest zwalczany w organizmie człowieka. Następnie Doktorantka jasno przedstawiła cel oraz cztery główne założenia rozprawy. Część materiały i metody stanowi bardzo obszerny rozdział złożony z 17 podrozdziałów, w których opisano szczepy grzybowe, linie komórkowe i odczynniki wykorzystane podczas realizacji prac badawczych, jak również bardzo szczegółowo scharakteryzowano metody badawcze wykorzystane podczas realizacji zadań badawczych. W następnej części rozprawy mgr Daria Derkacz przedstawia w atrakcyjnej i przejrzystej formie graficznej uzyskane wyniki oraz opisuje je w szczegółowy sposób. W rozdziale Dyskusja, Doktorantka interpretuje uzyskane wyniki oraz przeprowadza ich analizę w kontekście dostępnej literatury naukowej. W kolejnych częściach Doktorantka przedstawia wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, implikacje jakie mają uzyskane wyniki oraz sugeruje możliwe rozwiązania zaobserwowanych przez nią problemów. Ponadto w skład rozprawy wchodzi dobrze dobrana bibliografia, spis rycin i tabel oraz dorobek naukowy Doktorantki. Całość dysertacji obejmuje 114 stron. Rozprawa doktorska została napisana bardzo dobrze pod względem gramatycznym, stylistycznym i leksykalnym i stanowi uporządkowane opracowanie charakterystyczne dla tego typu prac naukowych.

## **Ocena merytoryczna**

### **Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej**

Tematyka badawcza pracy doktorskiej mgr Derkacz dotyczy interesującego zagadnienia jakim jest rola ściany i błony komórkowej *C. albicans* w odpowiedzi zapalnej. Grzyb stanowiący przedmiot rozprawy doktorskiej jest patogenem oportunistycznym powodującym częste zakażenia u ludzi z deficytami odporności. Bardzo poważnym problemem jest występowanie wielolekooporności mikroorganizmów, która może pojawiać się w wyniku mutacji materiału genetycznego. Dane literaturowe sugerują, że zależność między mutacjami punktowymi, a opornością powiązana jest z miejscem wystąpienia zmiany. W literaturze naukowej opisano już ponad 140 różnych mutacji u klinicznych izolatów *C. albicans*, które skutkują substytucjami w obrębie sekwencji aminokwasowej demetylazy 14- $\alpha$ -lanosterolu, co sugeruje, że enzym ten jest wyjątkowo podatny na różne zmiany.

Większość z opisywanych mutacji zgrupowana jest w trzech regionach tzw. hot spot i są to między innymi pozycje od 105 do 165 (kodujące fragment białka formujący kanał, dzięki któremu substraty i inhibitory docierają do centrum aktywnego). Inne miejsca to 266 do 287 oraz 405 do 488 (kodujące fragmenty białka odpowiedzialne za wiązanie grupy prostetycznej – hemu z atomem żelaza, który jest bezpośrednim celem molekularnym azoli). Do najczęściej spotykanych substytucji w białku Erg11p szczepów opornych zaliczamy K143R, S405F, G464S, R467K oraz I471T.

Istotę tej problematyki Doktorantka opisuje w 21 stronicowym wprowadzeniu cytując aktualne doniesienia literaturowe. Następnie mgr Daria Derkacz definiuje cztery hipotezy badawcze i cel rozprawy, który brzmi: „Określenie czy zmiana ilości ergosterolu w błonie komórkowej grzyba powoduje modyfikację struktury ściany komórkowej oraz czy zaistniałe, potencjalne zmiany wpływają na odpowiedź zapalną ludzkich linii komórkowych.” W przeprowadzonych badaniach Doktorantka stosowała dwa szczepy *C. albicans*, jeden pozbawiony ergosterolu na drodze delekcji genu *ERG11* oraz drugi niosący mutację polegającą na substytucji lizyny na argininę w pozycji 143 sekwencji aminokwasowej Erg11 (*ERG11*<sup>K143R/K143R</sup>).

Materiały i metody zaprezentowane są w sposób bardzo szczegółowy i przejrzysty. Doktorantka dokładnie opisała wykorzystane szczepy *C. albicans*, linie komórkowe oraz odczynniki użyte w badaniach. Zastosowane przez Doktorantkę metody i techniki badawcze, które posłużyły do realizacji poszczególnych etapów badań, są opisane w 14 podrozdziałach. Należy podkreślić, że metody są dobrane w sposób odpowiedni, umożliwiając przeprowadzenie kompleksowych badań, w wyniku których mgr Daria Derkacz uzyskała szereg interesujących wyników umożliwiających jej uzyskanie odpowiedzi na pytania badawcze. Różnorodność metod badawczych świadczy o bogatym warsztacie Doktorantki.

W kolejnej części rozprawy mgr Daria Derkacz opisała uzyskane wyniki udokumentowane w postaci tabelarycznej i graficznej. W tej części pracy, Doktorantka przeanalizowała i omówiła efekty przeprowadzonych badań. Mgr Daria Derkacz wykazała, że mutacja w białku Erg11 polegająca na substytucji lizyny arginina powoduje obniżenie wrażliwości badanego szczepu na flukonazol, ale nie na amfoterycynę, natomiast delekcja skutkuje opornością na oba antybiotyki przeciwgrzybicze. Mutant *ERG11*<sup>K143R/K143R</sup> wykazuje podwyższoną ekspresję genu *ERG11*, co skutkuje wyższą produkcją ergosterolu w osłonach komórkowych. Z kolei

zaobserwowana u mutantów z delecją kompensacja braku ergosterolu nadprodukcją lanosterolu i eburikolu wydaje się być oczywista biorąc pod uwagę przebieg biosyntezy ergosterolu (Ilustracja 5). Za dużo bardziej interesujący wynik uważam nasiloną ekspozycję chityny i beta glukanu na powierzchni komórek badanych mutantów raz powiązanie tego zjawiska z różnicami strukturalnymi pomiędzy badanymi szczepami. Zaobserwowane zmiany w składzie ściany komórkowej i wirulencji badanych szczepów prowadziły do różnic w odpowiedzi zapalnej badanych linii komórkowych, a za interesujący i wymagający dalszych badań uważam wynik wskazujący, że szczep z delecją, pomimo obecności wzorców molekularnych (PAMPs) na komórkach, słabo stymulował odpowiedź zapalną.

W tym miejscu chciałam podkreślić, że uzyskane przez Panią mgr Derkacz wyniki wnoszą nowe informacje na temat roli ściany i błony komórkowej *C. albicans* w odpowiedzi zapalnej.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w dojrzaly sposób omówiła uzyskane przez siebie wyniki porównując je do wyników dostępnych w publikacjach naukowych innych badaczy, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. W rozdziale tym mgr Derkacz przedstawiła właściwą i wyważoną interpretację uzyskanych wyników. Należy również zaznaczyć, że Doktorantka omawia potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych przez siebie wyników, co świadczy o jej obszernej wiedzy w tematyce rozprawy. Merytoryczną część rozprawy kończą wnioski. W tej części Doktorantka podsumowała wyniki badań formułując pięć wniosków. Bardzo wysoko oceniam zamieszczoną w końcowej części rozprawy ilustrację przedstawiającą graficzne podsumowanie wyników uzyskanych przez mgr Darię Derkacz. W rozdziale „Bibliografia” doktorantka zamieściła 201 pozycji literaturowych w większości z ostatnich 10 lat, co potwierdza aktualność podjętej tematyki badawczej.

Ze względu na powszechne stosowanie w lekach przeciwgrzybiczych hamujących aktywność enzymów szlaku syntezy steroli lub wiążących się do ergosterolu błonowego grzybów, jak również na pojawianie się mutantów opornych na te leki, uzyskane przez mgr Darię Derkacz wyniki są niezwykle istotne, gdyż umożliwiają zrozumienie wirulencji mutantów oraz zmian w odpowiedzi zapalnej gospodarza a tym samym dostarczają nowych informacji dotyczących mechanizmów infekcji mutantów *C. albicans* opornych na antybiotyki.

Podczas analizy rozprawy nasunęły mi się pewne sugestie, pytania i uwagi, które w tym miejscu chciałabym przytoczyć.

1. Ponieważ zidentyfikowano liczne mutacje u klinicznych izolatów *C. albicans* opornych na azole, chciałam zapytać czym podyktowany był wybór szczepów do badań?
2. Zastosowana metoda oceny formowania biofilmu budzi moje zastrzeżenia. Nie spotkałam się do tej pory z metodą oceny zdolności szczepów grzybowych lub bakteryjnych do formowania biofilmu poprzez pomiary OD. Najczęściej wykonuje się znakowanie fluorescencyjne lub w najprostszej wersji - test redukcji MTT, natomiast wizualizację przeprowadza się z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Proszę o wyjaśnienie czym był podyktowany wybór tej metody.
3. W przeprowadzonych badaniach w p. 2.1.1 dotyczących analiz komponentów ściany komórkowej za pomocą obrazowania mikroskopowego Doktorantka nie badała komórek strzępkowych. Komórki charakteryzujące się takim wzrostem są formą inwazyjną, tak więc należałoby sprawdzić organizację ściany komórkowej również w tego typu formach morfologicznych *C. albicans*. Proszę o komentarz.
4. W oznaczeniach płynności błony komórkowej szczepów *C. albicans* Doktorantka zastosowała laurdan (p.1.2.3.). Jednak, w tego typu badaniach, najczęściej stosuje się oprócz tego fluoroforu jeszcze prodan i DPH. Z jakiego powodu wybrano tylko jeden barwnik w przeprowadzanych analizach?
5. W analizie statystycznej (str. 45) zastosowano test t-Studenta oraz jednoczynnikową analizę wariancji. Warunkiem wykonania takich testów jest sprawdzenie normalności rozkładu. Takiej informacji w pracy nie podano. Bardzo proszę o komentarz.
6. Skąd pochodzą sekwencje starterów wykorzystywanych w pracy w reakcjach Real-Time qPCR? Czy doktorantka skorzystała z danych literaturowych czy zaprojektowała startery samodzielnie? Chciałam także zapytać czy geny referencyjne zostały dobrane eksperymentalnie?
7. W „Dyskusji” na str. 79, Doktorantka używa słowa ksenobiotyki w odniesieniu do stosowanych w pracy antybiotyków. Głównym producentem

amfoterycyny B jest *Streptomyces nodosus*. W związku z tym antybiotyk ten nie jest uznawany za substancję obcą dla środowiska, co wynika z definicji ksenobiotyków. Chciałam poznać opinię doktorantki na ten temat.


8. Na zakończenie dysertacji Doktorantka wspomina, że określenie zmian w biosyntezie ergosterolu drożdży wymaga dalszych analiz. W związku z tym chciałam zapytać jakie badania mogłaby Pani zaproponować? Czy mogłaby Pani podzielić się informacjami na temat planowanych kierunków badań, które zamierza Pani eksplorować w najbliższej przyszłości?

Przedstawione uwagi nie wpływają na mój pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej.

### **Konkluzja końcowa**

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Darii Derkacz przedstawia bardzo dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej wysoki poziom merytoryczny. Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała warsztat badawczy oraz wykazała się zdolnością do omówienia i interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Darii Derkacz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, że względu na wysoki poziom merytoryczny, wnoszę do Rady Dyscypliny o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ