

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Derkacz

### **Rola błony i ściany komórkowej *Candida albicans* w odpowiedzi zapalnej**

W opublikowanym w roku 2022 raporcie WHO uznano infekcje grzybowe za jedno z poważnych zagrożeń zdrowia publicznego w skali ogólnoswiatowej, o ewidentnie narastającym znaczeniu. W przywołanym raporcie, cztery gatunki drobnoustrojów grzybowych patogennych dla człowieka wyróżniono jako grupę o krytycznym znaczeniu. W grupie tej znalazły się dwa gatunki drożdżaków z rodzaju *Candida*. Jeden z nich, *Candida auris*, to tzw. „*emerging pathogen*”, po raz pierwszy wyizolowany z materiału klinicznego w roku 2009, szczególnie groźny z powodu wrodzonej oporności na większość chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Drugi, to dobrze znany od wielu lat *Candida albicans*, czynnik etiologiczny około 30% przypadków grzybic układowych, dla których śmiertelność pacjentów przekracza 40%. W terapii tych grzybic stosowane są m.in. leki syntetyczne, pochodne imidazolu lub triazolu, znane pod zwyczajową nazwą „leki azolowe”, z których najpopularniejszymi są Flukonazol i Worykonazol. Leki azolowe są inhibitorami biosyntezy ergosterolu, ważnego składnika grzybowej błony cytoplazmatycznej, a ich celem molekularnym jest enzym katalizujący jeden z etapów tego szlaku, zależna od cytochromu P<sub>450</sub> demetylaza lanosterolowa, kodowana przez gen *ERG11*. Niestety, oporność *C. albicans* na leki azolowe ma charakter narastający, a mechanizmy tej oporności obejmują mutacje genu *ERG11*, jego nadekspresję oraz oporność wielolekową związaną z aktywnością błonowych pomp Cdr1 i Mdr1. Mechanizmy te oraz możliwe sposoby jej przełamania są przedmiotem intensywnych badań w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Do tego grona zalicza się także grupa badawcza pod kierunkiem p. dr hab. Anny Krasowskiej z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, do której należy autorka recenzowanej rozprawy doktorskiej, p. mgr Daria Derkacz.

W badaniach, których wyniki p. Derkacz opisała w swojej rozprawie doktorskiej, zajmowała się Ona zmianami w składzie błony cytoplazmatycznej *C. albicans* zachodzącymi w wyniku delekcji genu *ERG11* lub mutacji tego genu skutkującej substytucją K143R w łańcuchu polipeptydowym Erg11 i konsekwencjami tych zmian dla składu i struktury ściany komórkowej, ekspresji niektórych genów oraz kilku czynników wirulencji tego drobnoustroju. Doktorantka porównywała w tym celu właściwości dwóch linii zmutowanych komórek *C. albicans*, KS058 o genotypie *erg11Δ/erg11Δ* oraz 10C1B1M1 (*ERG11<sup>K143R</sup>/ERG11<sup>K143R</sup>*). Porównana została także odpowiedź zapalna dwóch linii ludzkich komórek epidermalnych na infekcję komórkami *C. albicans* typu dzikiego i obu mutantów.

Za najistotniejsze dokonania p. Derkacz poczynione w trakcie realizacji doktorskiego projektu badawczego, którego wyniki opisano w recenzowanej rozprawie uważam:

a) Określenie zmian składu i parametrów błony cytoplazmatycznej obu mutantów, w tym zwiększoną zawartość ergosterolu w błonie komórek 10C1B1M1, będącą konsekwencją zwiększonej ekspresji *ERG11* oraz oczekiwaną kompensację braku ergosterolu w błonie KS058 poprzez zastąpienie lanosterolem i innymi sterolami powstającymi w szlaku alternatywnym. Co wydaje się szczególnie interesujące, zarówno zastąpienie ergosterolu przez 14 $\alpha$ -metylowane sterole, jak i jego zwiększony poziom skutkują zwiększeniem płynności błony komórkowej.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że w badaniach właściwości mutantu KS058 prowadzonych uprzednio w grupie prof. Krasowskiej, głównie przez dr. Jakuba Suchodolskiego, wykazano wpływ zastąpienia ergosterolu w błonie cytoplazmatycznej *C. albicans* przez 14 $\alpha$ -metylowane sterole, głównie 14 $\alpha$ -metyloergosta-8-24(28)-dienol, na inne parametry błony cytoplazmatycznej, w tym skład fosfolipidów oraz asymetrię błony. Wyniki uzyskane przez p. Derkacz, dopełniają obraz kompleksowych zmian struktury i właściwości błony zachodzących w wyniku delekcji *ERG11*.

b) Ważnym spostrzeżeniem jest mechanizm swoistej kompensacji zwiększenia płynności błony poprzez wzmocnienie ściany komórkowej będące konsekwencją nadekspresji genów syntaz chitynowych i syntaz glukanowych oraz zmian w składzie oligosacharydów ściany. Z kolei, stwierdzone zmiany hydrofobowości powierzchni komórek są prawdopodobną konsekwencją ekspozycji chityny i glukanu na tej powierzchni.

c) Wykazanie, że delekcja *ERG11* skutkuje utratą zdolności komórek KS058 do wzrostu w postaci biofilmu oraz do filamentacji. Obie te cechy są ważnymi czynnikami wirulencji *C. albicans*. Komórki 10C1B1M1 wykazują odwrotne właściwości, co może sugerować ich zwiększoną wirulencję. Pewnym zaskoczeniem w tej sytuacji może być stwierdzona w komórkach obu mutantów nadekspresja genów adhezyn, będących również jednym z czynników wirulencji.

d) Stwierdzenie, że wykryte zmiany we właściwościach powierzchni komórek oraz poziomach czynników wirulencji znajdują odzwierciedlenie w odmiennej odpowiedzi zapalnej ludzkich komórek epidermalnych indukowanej infekcją komórek mutantów, której miarą był poziom wydzielanych cytokin – zmniejszony w przypadku infekcji komórkami KS058 i zwiększony dla infekcji komórkami 10C1B1M1.

Wyniki badań prowadzonych przez Doktorantkę i wynikające z nich wnioski mają w mojej opinii oczywisty charakter nowości naukowej, czego potwierdzeniem jest opublikowanie dużej części uzyskanych wyników w postaci dwóch artykułów w *International Journal of Molecular Sciences*, w których pierwszą autorką jest Pani Derkacz.

Nie ulega dla mnie wątpliwości, że realizując swój projekt doktorski Doktorantka wykazała się biegłością laboratoryjną jako eksperymentatorka, stosując szeroki zakres metod badawczych z zakresu mikrobiologii, biologii komórki, biologii molekularnej, biochemii i immunologii. Uzyskane wyniki zostały opracowane i opisane w sposób profesjonalny. Ich analiza i dyskusja przeprowadzona przez p. Derkacz jest dojrzała i kompetentna. W konkluzji mogę z przekonaniem stwierdzić, że Pani mgr Daria Derkacz wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Sama rozprawa doktorska została przygotowana starannie, poziom edytorski tego dzieła jest wysoki. Została spisana na 110 stronach + 11 stron dodatkowych zawierających wykaz ilustracji i tabel, spis dorobku naukowego Autorki oraz dodatkowe informacje w formie suplementu. Ilustrowana jest licznymi wykresami, schematami i zdjęciami, zawiera cytaty z 201 pozycji literaturowych. Układ pracy jest zasadniczo standardowy. Główne jej rozdziały to kolejno: streszczenie w j. polskim i

angielskim, przegląd literatury, założenia i cel pracy, opis materiałów i metod eksperymentalnych, opis uzyskanych wyników, dyskusja, wnioski i podsumowanie oraz spis piśmiennictwa.

*Uwagi szczegółowe do poszczególnych części rozprawy.*

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy, zatytułowane jako **Przegląd literatury** zajmuje 22 strony i składa się z 7 podrozdziałów poświęconych charakterystyce *C. albicans*, błony i ściany komórkowej tego drobnoustroju oraz czynników warunkujących jego wirulencję, omówieniu głównych rodzajów leków przeciwgrzybowych i zjawiska oporności wielolekowej *C. albicans* oraz odpowiedzi immunologicznej na infekcję powodowaną przez tego drożdżaka.

Układ i kolejność podrozdziałów tej części rozprawy uważam za logiczny, a zakres przedstawionych tam informacji za adekwatny dla zrozumienia głównych treści tej pracy. Ta część rozprawy zawiera szereg cennych, interesujących danych, wspartych cytatami do 138 pozycji literaturowych, z których jedynie 8 pochodzi sprzed roku 2000, a znakomita większość z ostatnich kilku lat, co bardzo dobrze świadczy o wysokim poziomie ogólnej wiedzy teoretycznej Autorki, a w szczególności o znajomości aktualnej literatury. Nie znalazłem w **Przeglądzie literatury** istotnych błędów merytorycznych, pozwalam sobie jedynie na kilka drobnych uwag.

Str. 6. Ilustracja 1. Wyszczególnienie „transplantacji organów” jako czynnika predestynującego do rozwoju infekcji *C. albicans* wydaje się nieco nieprecyzyjne. Takim czynnikiem jest niewątpliwie stosowanie leków immunosupresyjnych po przeprowadzonej transplantacji.

Str. 7. Co Autorka rozumie jako „indeks glikemiczny pacjenta”? Pojęcie indeksu glikemicznego odnosi się do składników pożywienia.

Str. 8/9.

Triacyloglicerole nie wchodzi w skład błony cytoplazmatycznej *C. albicans*. Związki te mogą występować w komórkach, jednakże wyłącznie jako lipidy zapasowe.

Str. 14. ...struktur połączonych atomem wodoru...

Zapewne chodziło o połączenia wiązaniami wodorowymi?

Echinokandyny nie są inhibitorami CHS (syntazy chitynowej) lecz syntazy glukanowej.

Str. 16.

*N*- lub *O*-glikozylacja nie dotyczy mannanów lecz mannoprotein, czyli białek *N*- lub *O*-glikozylowanych oligomerami mannozy czyli mannanami.

Str. 19. 5-Fluorocytozyna jest stosowana w terapii grzybic wyłącznie w połączeniu z Amfoterycyną B, a nie jak pisze Autorka „często”. Lek ten nie jest stosowany jako samodzielny czynnik terapeutyczny.

Omawiając działanie alliloamin jako leków przeciwgrzybowych warto wspomnieć, że główną podstawą ich selektywnej toksyczności jest znacząco większa podatność grzybowej epoksydazy skwalenowej na działanie alliloamin (m.in. terbinafiny) w porównaniu ze ssaczą (w tym ludzką) wersją tego enzymu.

Tworzenie transbłonowych kanałów składających się z kompleksów AmB z ergosterolem jest uznawane na podstawie mechanizmu działania tego antybiotyku, jednakże istnieje także inna hipoteza, określana jako „gąbka sterolowa” (*ang. sterol sponge*), zgodnie z którą cząsteczki AmB lokując się na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej w swoisty sposób „ekstrahują” cząsteczki ergosterolu z błony i w efekcie na powierzchni tworzą się aglomeraty AmB i ergosterolu. Niewykluczone, że rzeczywisty mechanizm działania AmB obejmuje oba zjawiska.

Str. 29. Do najczęściej spotykanych mechanizmów oporności na Flukonazol i inne leki z grupy pochodnych azolu i triazolu należy także (oprócz dwóch wymienionych) wyrzut w wyniku działania pomp typu ABC i MFS.

Rozdział zatytułowany **Założenia i cel pracy** sformułowany na jednej stronie zawiera, dość nietypowo, cztery hipotezy badawcze, określone jako założenia pracy. Osobiście uważam, że formułowanie hipotez przed rozpoczęciem badań jest nieco niebezpieczne. W tym przypadku, na szczęście postawione hipotezy zostały potwierdzone uzyskanymi wynikami, ale nie zawsze tak bywa.

Opisy metod eksperymentalnych zostały przez Autorkę rozprawy umieszczone w rozdziale **Materiały i Metody**. Są to opisy generalnie precyzyjne i kompletne.

Uwagi do tej części rozprawy:

1. Wyznaczanie krzywych wzrostu w hodowlach prowadzonych w formie mikroplitek nie wydaje się sposobem optymalnym. W tych warunkach wzrost komórek odbywa się w dużym stopniu w postaci biofilmu, co może fałszować odczyt przy użyciu czytnika mikroplitek.
2. W opisie procedury wyznaczania MIC brak określenia rodzaju tego parametru, który wyznaczano (MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, inny rodzaj?).
3. Będę wdzięczny za wyjaśnienie, w jaki sposób można wyznaczyć OD<sub>600</sub> osadów (opis procedury 2.3.1.). Jest mi znany jedynie sposób określania tego parametru dla zawiesin.
4. Procedura 2.7.2. Brak informacji o wartościach długości fali wzbudzenia i emisji dla obrazowania z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego.

Uzyskane rezultaty przedstawione zostały w głównym rozdziale **Wyniki** o objętości 32 stron. Odpowiednia analiza statystyczna została zastosowana wszędzie, gdzie było to konieczne. W opisie wyników wplecione zostały elementy komentarza w stopniu uprawnionym, a niekiedy nawet koniecznym. Jakość zamieszczonych zdjęć i wykresów nie budzi wątpliwości. **Dyskusja** oraz **Podsumowanie i wnioski** zajmują 13 stron.

Uwagi do tych części rozprawy

1. W opisie wyników eksperymentów przeprowadzonych w celu określenia fenotypu wzrostowego szczepów *C. albicans* (VI.1.1.) brak informacji o wartościach MIC wyznaczonych dla Flukonazolu i Amfoterycyny B. Uważam

ponadto, że warto było określić ten fenotyp nie tylko w podłożu YPD, lecz także w podłożu RPMI-1640, którego skład odpowiada składowi frakcji rozpuszczalnej osocza krwi oraz w podłożu RPMI-1640 + surowica. Takie warunki odpowiadałyby najbardziej tym, które mają miejsce podczas infekcji wywołanej przez *C. albicans* w organizmie pacjenta, co byłoby korzystne z uwagi na kontekst badań prowadzonych przez Doktorantkę.

2. Str. 64. W opisie interpretacji widm ATR-FTIR  $\beta$ -glukanu pasmo w zakresie 1667-1672  $\text{cm}^{-1}$  jest interpretowane jako pochodzące od drgań rozciągających C=C. Brak wyjaśnienia, jaki element strukturalny  $\beta$ -glukanu, który jest oligosacharydem zbudowanym z podjednostek D-glukozy nie zawierającym wiązań C=C, miałyby być odpowiedzialny za ten sygnał.
3. Komórki *C. albicans* szczepu KS058 (delecja obu kopii genu *ERG11*) nie posiadają w swojej błonie cytoplazmatycznej ergosterolu, ale w jego miejsce wbudowywane są  $14\alpha$ -metylowane sterole, w tym lanosterol, eburikol oraz  $14\alpha$ -metyloergosta-8-24(28)-dienol, co zresztą Pani Derkacz jednoznacznie w swoich badaniach wykazała. W efekcie, badając jakiegokolwiek cechy fenotypowe takiego mutantu i porównując go z fenotypem komórek typu dzikiego, określa się nie „wpływ braku ergosterolu w błonie na...” lecz „wpływ zastąpienia ergosterolu przez  $14\alpha$ -metylowane sterole na...”. Pani mgr Derkacz wydaje się tego świadoma, gdyż w miarę konsekwentnie wspomina o „wpływie delecji genu *ERG11* na...”, lecz w **Dyskusji** pojawia się stwierdzenie, że szczep KS058 może stanowić model w badaniu wpływu braku ergosterolu w błonie na...”. Z drugiej strony, komórki KS058 stanowią izogeniczny model badawczy odpowiadający sytuacji, w której aktywność genu *ERG11* jest w stabilny sposób wyłączona, co odpowiada funkcjonalnie całkowitemu zahamowaniu aktywności demetylazy lanosterolowej przez leki przeciwgrzybowe z grupy pochodnych imidazolu lub triazolu. To bardzo cenny model, szczególnie w aspekcie możliwości badania konsekwencji skojarzonego działania inhibitorów demetylazy lanosterolowej z innymi związkami wspomagającymi lub działającymi synergistycznie. Uważam, że jest to warte podkreślenia w aspekcie możliwości uzyskania dodatkowych informacji o mechanizmach i konsekwencjach działania Flukonazolu i jego analogów na komórki grzybowe.
4. Wyniki badań prowadzonych przez p. Derkacz nie dają podstaw do jednoznacznego twierdzenia, że badane mutanty *C. albicans* wykazują zmienioną w stosunku do szczepu dzikiego wirulentność. Rzeczywistą wirulentność można ocenić jedynie na podstawie wyników badań prowadzonych na modelu infekcji *in vivo* (zwierzęcym). Doktorantka wykazała jedynie różnice pomiędzy mutantami a szczepem dzikim w zakresie niektórych cech uważanych za czynniki wirulencji (tworzenie biofilmu, zdolność do transformacji morfologicznej, ekspresja genów kodujących adhezyny).

Rozprawa napisana jest generalnie dobrym językiem, czyta się ją z zainteresowaniem. Tym niemniej, napotkałem w tym tekście kilka błędów nomenklaturowych oraz edytorskich, które pozwalam sobie wymienić.

Str. 1, wiersz 9 od góry. Jest: „...ograniczoną ilością grup leków...”. Powinno być: ‘...ograniczoną liczbą grup leków...’.

Wiersz 11-12 od dołu. Wymienione w nawiasie elementy nie stanowią same w sobie wirulencji *C. albicans*, co, zapewne w sposób niezamierzony, wynika z układu zdania. Są to jedynie niektóre z czynników o tej wirulencji stanowiących.

Str. 6, wiersz 6 od góry: „*C. albicans* określa się mianem oportunistycznego patogenu grzybiczego<sup>9</sup>.”

*C. albicans* nie jest jedynym oportunistycznie patogennym drobnoustrojem grzybowym, tak więc można ewentualnie mówić o przynależności *C. albicans* do grupy oportunistycznie patogennych drobnoustrojów grzybowych.

Str. 8., wiersz 17 od góry: ...wpływa bezpośrednio na parametry fizykochemiczne wpływające.... (styl)

Str. 10. Wiersz 2 od dołu: „acetoacetylu-CoA”. Powinno być „acetoacetylo-CoA”

Str. 11., wiersz 3 od dołu i w kilku innych miejscach w tekście. Określenie „azole” dla grupy leków przeciwgrzybowych ma charakter slangowy. Prawidłowo powinno się mówić o „pochodnych azolu” lub „pochodnych triazolu”, natomiast dopuszczalne jest zwyczajowe określenie „przeciwgrzybowe leki (lub związki) azolowe.

Str. 14., wiersz 8 od góry. „Difosforanu urydyny-N-acetyloglukozaminy”. Powinno być „Difosforanu urydino-N-acetyloglukozaminy”

Str. 17, wiersz 3 od góry. „...oligomannoza połączona wiązaniem  $\alpha$ -glikozydowym...” Powinno być: „...oligomannoza połączona jest wiązaniem  $\alpha$ -glikozydowym...”

Str. 19, wiersz 17. Jest: „Konsekwencją zahamowania białka Erg11...”. Powinno być: „Konsekwencją zahamowania aktywności białka Erg11...’.

Str. 22, wiersz 14 od góry. „...zamiany aminokwasu w sekwencji...” Powinno być „...zamiany reszty aminokwasowej w sekwencji...”. Podobnie na str. 29, wiersz 7 od góry.

Str. 27., wiersz 2-3 od góry. Nie wszystkie powszechnie stosowane leki przeciwgrzybicze opierają swój mechanizm działania na oddziaływaniu z ergosterolem lub hamowaniu jego biosyntezy, co jest, zapewne mimowolnie, sugerowane w tym zdaniu.

Str. 27, wiersz 11 od góry. „...chemoatraktantem dla neutrofilów...”. Powinno być „...chemoatraktantem dla neutrofilii...”

Str. 32, wiersz 2 od dołu i w kilku innych miejscach. Jest: konakawalina A. Powinno być: konkanawalina A.

Str. 34. Wiersz 5 od góry i w kilku innych miejscach. Jest: „zwirowano”. Powinno być: „odwirowano”

Str. 44, wiersz 5 od dołu. Jest: „niezaadherowanych komórek”. Może jest to poprawne językowo, ale brzmi strasznie.

Str. 61. „...przeprowadzono analizę ekspresji genów zaangażowanych (w) biosyntezę chityny oraz  $\beta$ -glukanu eksponowanych na powierzchni błony komórkowej...” Nieco niefortunne stylistycznie sformułowanie, które można odczytywać w ten sposób, że chodzi o „geny...eksponowane na powierzchni błony”, co nie ma sensu.

Str. 64. Niezrozumiałe określenie: „...wiązania asymetrycznego nożycowego grup  $\text{CH}_2$ ...”. Zapewne chodziło o asymetryczne drgania nożycowe grup  $\text{CH}_2$ .

Dorobek publikacyjny Pani Derkacz jest stosunkowo bogaty. Jest Ona współautorką siedmiu wieloautorskich publikacji w czasopismach z listy JCR, w tym w dwóch z nich, niewątpliwie dotyczących tematyki rozprawy doktorskiej, autorką pierwszą. Ponadto, w dorobku Doktorantki znajdują się trzy doniesienia konferencyjne.

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag i zastrzeżeń wyraźnie wskazuje, że większość kwestii, do których się one odnoszą, wynika prawie na pewno z niedokładności lub niezręczności opisu, a nie rzeczywistych błędów. Część uwag ma natomiast charakter dyskusji naukowej, odzwierciedlającej inne niż Autorki rozprawy zdanie recenzenta dotyczące interpretacji wyników opisanych w rozprawie doktorskiej. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa spełnia warunki ustawowe, tj. prezentuje wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej, stanowi dowód na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz zawiera istotne elementy nowości naukowej, innymi słowy – oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Moja jednoznacznie pozytywna ocena jej zawartości skłania mnie do sformułowania wniosku o dopuszczenie p. Derkacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jestem także całkowicie przekonany, że dorobek naukowy Doktorantki, w tym znacząca wartość ocenianej przeze mnie Jej rozprawy doktorskiej, uzasadniają nadanie mgr Darii Derkacz stopnia naukowego doktora.

