



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; e-mail: gamian@iitd.pan.wroc.pl

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 20.03.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Kuny pt. „Rola nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek w promowaniu chromosomowej niestabilności *Candida albicans*”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Macieja Wnuka

Chorobotwórczość *Candida albicans*, jednego z ważniejszych patogenów ludzkich, jest ważnym i złożonym zagadnieniem pod względem naukowym i klinicznym. Do mechanizmów chorobotwórczości należy adaptacja do zmian środowiska, a w przypadku *Candida albicans* istotne są zmiany chromosomowe, czyli plastyczność genomowa. Uważa się, że w przypadku tego patogenu zmienność chromosomowa jest odpowiedzialna za oporność na leki grzybobójcze, dlatego poznanie molekularnych mechanizmów lekooporności, jest tak ważne przy poszukiwaniu nowych terapii przeciwgrzybiczych. Mimo licznych badań, prace nad lekami i szczepionkami przeciw *C. albicans* wciąż stawiają nowe pytania wymagające rozwiązania, dlatego podjęty przez doktorantkę temat niestabilności chromosomowej *Candida albicans* z możliwym udziałem nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek jest aktualny, ważny z punktu widzenia biochemicznego i biomedycznego i w pełni uzasadniony. Praca dotyczy badania szeregu takich modyfikacji białek w warunkach stresogennych wpływających na zmienność chromosomową. Wyniki poszerzają wiedzę nad mechanizmami lekooporności, mają znaczenie podstawowe i pozwolą na zastosowania praktyczne tej wiedzy w poszukiwaniu celów terapeutycznych. Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej, zawiera 168 stron maszynopisu, wstęp jest poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów, następnie określono cel pracy, po czym następuje spis użytych materiałów i metod, opis wyników, ich dyskusję i spis cytowanego piśmiennictwa. Praca zawiera 47 rysunków, 11 tabel i 286 pozycji piśmiennictwa. Wstęp pracy jest napisany zwięźle, klarownym językiem, obejmuje

charakterystykę cech genetycznych i fenotypowych *Candida albicans*, autorka opisuje cykl życiowy komórek tych drożdżaków, ich główne mechanizmy odpowiedzialne za lekooporność na azole, mechanizmy utraty homeostazy w wyniku nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek. Osobno opisuje nieenzymatyczną karbonylację białek, ich glikację, produkty zaawansowanego utleniania białek i nieenzymatycznej nitracji, czy chlorowania białek. Interesująca jest informacja podana przez autorkę na temat enolazy będącej głównym celem glikacji u drożdży. Jest to białko które poza aktywnością enzymatyczną posiada wiele innych funkcji, w tym jako alergen u niektórych grzybów, interesującym jest pytanie czy alergizujące właściwości może mieć drożdżowa enolaza zmodyfikowana nieenzymatycznie. Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy według której zmiany chromosomowe u *C. albicans* wiążą się z gromadzeniem nieenzymatycznie zmodyfikowanych białek pod wpływem czynników egzo- i endogennych. Sposobem rozwiązania postawionego zadania była analiza zmienności fenotypowej, chromosomowej, zmian biochemicznych, genetycznych zachodzących podczas hodowli długoterminowej komórek *C. albicans* o różnym stopniu ploidalności, uszkodzeń DNA, nieenzymatycznych modyfikacji białek oraz obecności induktorów stresu komórkowego. Zastosowano bogaty zestaw metod dla realizacji zadań, opisano odczynniki, przeciwciała i koniugaty, zestawy testowe, materiały do hodowli komórek i pożywki pochodzenia komercyjnego. Autorka analizowała białka metodą elektroforezy SDS-PAGE, oddziaływania z przeciwciałami oznaczała metodą immunoblotingu, także analizę glikozylacji i poziomu AGE. Oceniała wrażliwość komórek na czynniki stresogenne, oznaczała białko, glikogen, proliferację komórek, otrzymywała histony, DNA, RNA, stosowała odpowiednie zestawy odczynników do oceny żywotności komórek, lekowrażliwości, oznaczania grup karbonylowych białek, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny jako markera uszkodzenia DNA, testy do analizy metylacji RNA, kilka wariantów testu kometkowego do analizy uszkodzeń DNA, do tego celu też metodę TUNEL, elektroforetyczny rozdział chromosomów, fluorescencyjną hybrydyzację techniką FISH. W cytometrze przepływowym przeprowadziła analizę cyklu komórkowego, na końcu przeprowadziła analizę statystyczną wyników. Doświadczenia prowadzono z użyciem komórek *C. albicans* haploidalnego szczepu 302, diploidalnych szczepów T2, T6 opornego na azole, ATCC14053, dzikiego szczepu SC5314, oraz tetraploidu T15, z których 2 były szczepami referencyjnymi (ATCC14053 i SC5314), a pozostałe klinicznymi. Dokumentacja wyników nie budzi zastrzeżeń, jest starannie opracowana, na uwagę zasługuje przejrzysty sposób prezentacji wyników i wprowadzanie do poszczególnych etapów ich omawiania. Autorka opracowała metodę z użyciem specyficznych sond oligonukleotydowych do znakowania chromosomów

celem badania zmienności międzykomórkowej na poziomie pojedynczej komórki. Metoda ma przewagę nad innymi technikami, gdyż pozwala analizować zmiany chromosomowe między komórkami bez izolacji DNA z masy komórkowej. Charakterystyka genetyczna wykazała zmienność wzorów kariotypów i zawartości DNA w jądrze komórkowym *C. albicans*. Przy pomocy kilku doświadczeń wykazała różną zdolność gromadzenia potranslacyjnych nieenzymatycznych modyfikacji białek, jak karbonylacji, glikacji, nitracji, chlorowania, ponadto zależną od ploidalności zmienność zaburzeń genomowych takich jak chromosomowych, pęknięć DNA, tworzenia intermediat replikacyjnych. Częstość zmian chromosomowych i modyfikacji nieenzymatycznych, zmian jądrowego DNA, może się zmieniać w czasie hodowli z wiekiem chronologicznym komórek i w zależności od czynnika stresogennego. Uszkodzenia DNA i białek indukują zmienność międzykomórkową, co wpływa na potencjał adaptacyjny komórek w warunkach stresu, w tym lekooporność. Komórki stare są bardziej podatne na kumulowanie uszkodzeń, również zależnie od egzogennych stresogenów. Interesującym wynikiem jest zaobserwowana oporność na azole komórek szczepu 302 potraktowanych uprzednio przez czynnik glikujący MGO (metyloglioksal).

W dyskusji autorka bardzo dobrze przeprowadziła analizę wyników, które były potwierdzane kilkoma sposobami. Ta część pracy również jest napisana przejrzysto, zagadnienia są podzielone na podrozdziały tematyczne. Interesującą dyskusję przeprowadzono na temat glikozylacji, gdyż używano do jej wykrycia przeciwciała monoklonalne IgM any-O-GlcNAc z zestawu handlowego. Istotnie, przeciwciała monoklonalne charakteryzują się unikalną specyficznością i mogą nie odróżniać from anomerycznych GlcNAc. Autorka wysnuwa wniosek, że komórki *C. albicans* oznaczające się wysoką zmiennością genetyczną są heterogenną populacją odnośnie zmian chromosomowych, posiadają dużą zdolność gromadzenia nieenzymatycznych modyfikacji białek, które prowadzą do przejściowej utraty stabilności genetycznej prowadzącej z kolei do heterogenizacji populacji komórek. Autorka stawia tezę, że to zróżnicowanie chromosomowe populacji komórek decyduje o przetrwaniu komórek *C. albicans* podczas niekorzystnych warunków i starzenia populacji komórek.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią pracy. Pod względem formy wszystkie części pracy są przejrzysto napisane. Zauważyłem jedynie kilka drobniejszych nieścisłości, które warto zaznaczyć, mianowicie o ile wiele metod opiera się w pracy na gotowych zestawach odczynnikowych, czy własnych opracowanych metodach, to jednak brak piśmiennictwa do kilku metod. W tekście używano zapisu Western blot, podczas gdy metodą jest Western blotting, a blot to uzyskany obraz, jak na

str. 81. Daje się zauważyć szereg żargonowych sformułowań, jak pelet zamiast osad, kit zamiast zestaw, molekuly zamiast cząsteczki, eppendorfy zamiast probówki typu Eppendorf. Na str. 21 zamiast ...gatunek *Candida*... powinno być ...rodzaj *Candida*. Czy na rysunku 20 zawartość DNA można pokazać ilościowo, poza tym graficznym przedstawieniem, co poprawiłoby czytelność tych danych. Słabo widoczne są też wykresy na rysunku 31C. Zdanie ...GlcNAc może modyfikować przyjemniej dwa szlaki sygnalizacji... na str. 135 może stanowić propozycję wprowadzenia terminu enzymatycznej reakcji przyjemnej. Uwagi powyższe nie umniejszają wartości pracy, ale mogą być pomocne w redagowaniu manuskryptu.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, praca wnosi oryginalny wkład do wiedzy o mechanizmach lekooporności *Candida albicans*, stanowi podstawę do dalszych badań. Wyniki autorki wskazują na konieczność nowego podejścia, rianowicie kombinowanej terapii lekami z grupy azoli i senolityków usuwających komórki stare. Wykazała niekorzystne stosowanie nadmiaru związków powierzchniowo czynnych cytostatyków promujących zmienność międzykomórkową. Autorka uzyskała bardzo dobre wyniki dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i dużego wkładu pracy, co dowodzi bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje bardzo dobre opanowanie metod badań mikrobiologicznych, biochemicznych, immunochemicznych i genomicznych.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Anny Kuny zawiera oryginalny materiał doświadczalny, spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Eweliny Anny Kuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Prof. dr hab. Andrzej Gamian