



Dr hab.n.med. Magdalena Górską-Ponikowska

Gdańsk, 22.02.2020 r.

Katedra i Zakład Chemii Medycznej

Wydział Lekarski

Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Eweliny Anny Kuny

pod tytułem

„Rola nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek w promowaniu chromosomowej niestabilności *Candida albicans*”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Anny Kuny pod tytułem „Rola nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek w promowaniu chromosomowej niestabilności *Candida albicans*” została wykonana pod promotorstwem dr hab. Macieja Wnuka, profesora Uniwersytetu Rzeszowskiego. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy doktorskiej jest dr Leszek Potocki, również z Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Candida albicans jest oportunistycznym patogenem o szerokim zakresie inwazyjności. Powoduje łagodne zakażenia powierzchniowe oraz zagrażające życiu zakażenia układowe, które powiązane są z upośledzeniem funkcji układu immunologicznego, m.in. u pacjentów zarażonych HIV/AIDS, czy też podczas terapii przeciwnowotworowej. Często leczenie nie przynosi spodziewanego efektu, dlatego wciąż poszukiwane są nowe leki i ich kombinacje mające na celu zwiększenie efektywności terapii. Stąd, poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za lekooporność szczepów *Candida albicans* ma kluczowe znaczenie z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Z wyżej wymienionych powodów wybór tego tematu badań przez Doktorantkę uważam za bardzo trafny i cenny.

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Anny Kuny liczy 168 numerowanych stron i posiada typowy układ dla rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska została podzielona na następujące rozdziały: I. Wstęp, II. Hipoteza Badawcza i Cel Pracy, III. Materiały i Metody, IV. Wyniki, V. Dyskusja, VI. Wnioski oraz VII. Piśmiennictwo. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści, wykazami zastosowanych skrótów, oraz streszczeniami w języku polskim oraz angielskim.



Bibliografia obejmuje 286 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska jest ilustrowana przez 47 rycin i 11 tabel. Niestety, zabrakło jednak spisu rycin oraz tabel.

We Wstępie liczącym 35 stron Doktorantka logicznie oraz konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Charakteryzuje cechy genetyczne i fenotypowe gatunku *Candida albicans*. Kolejno, Autorka omawia główne mechanizmy odpowiedzialne za lekooporność komórek *Candida albicans* na azole. Doktorantka przedstawia również mechanizmy utraty proteostazy w wyniku nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek, skupiając się na nieenzymatycznej potranslacyjnej karbonylacji, glikacji, nitracji oraz chlorowaniu białek. W ostatnim punkcie charakteryzuje natomiast mechanizmy starzenia się komórek drożdży.

Przy tej części rozprawy doktorskiej proszę Doktorantkę o doprecyzowanie i wyjaśnienie kilku kwestii:

- Na stronie 30, Doktorantka pisze „Inną reakcją istotną z punktu widzenia biologicznego jest reakcja z anionorodnikiem nadrtlenkowym, prowadząca do powstania nadrtlenoazotynu: $\bullet\text{NO} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$, który może uczestniczyć m.in. w generacji nitrotyrozyny”. W tym miejscu proszę o doprecyzowanie jakie reaktywne formy azotu/wolne rodniki odpowiedzialne są za powstawanie 3-nitrotyrozyny w komórkach.
- Kolejno, na stronie 31, (...) „badania wykonane na *S.cerevisiae* wskazują na możliwość endogennej produkcji NO z argininy przy udziale flawoproteiny Tah18 [196]. Zaproponowany mechanizm, może mieć również odniesienie do drożdży *C. albicans*, gdyż w genomie tego gatunku również zidentyfikowano gen TAH18 [178]”. Proszę o rozwinięcie opisu potencjalnych mechanizmów wewnątrzkomórkowej generacji tlenu azotu w komórkach drożdży.

Należy podkreślić, że informacje we „Wstępie” są przedstawione w sposób niezwykle klarowny ułatwiający czytelnikowi zrozumienie tematyki badań Doktorantki. Treść tego rozdziału wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i znajomość tematu obszaru badań. Omawiane zagadnienia zostały zobrazowane przez 12 rycin oraz 2 tabele.

Następstwem powyższego rozdziału są postawione przez Doktorantkę hipoteza badawcza i cel pracy. Doktorantka postawiła sobie cztery szczegółowe cele badawcze:

1. Analiza związku zmienności fenotypowej oraz chromosomowej *Candida albicans*.
2. Charakterystyka zmian genetycznych, biochemicznych oraz fenotypowych zachodzących podczas procesu hodowli długoterminowej komórek *Candida albicans* o różnym stopniu ploidalności DNA.



3. Ocena zależności pomiędzy poziomem nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek: karbonylacją, glikacją, nitracją, chlorowaniem, a zmianami chromosomowymi, uszkodzeniami DNA oraz ploidalnością DNA komórek *Candida albicans* poddanych długoterminowej hodowli bez i w obecności induktorów stresu komórkowego.

4. Analiza lekowrażliwości komórek *Candida albicans* poddanych długoterminowej hodowli bez i w obecności induktorów stresu komórkowego.

Zarówno hipoteza badawcza, jak i cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie i odzwierciedlają postawione przez Doktorantkę zadania do wykonania w ramach zaplanowanych badań.

Rozdział „Materiały i Metody” jest napisany przejrzysto i starannie. Doktorantka dokładnie opisała użyte materiały, włączając dostępne zestawy komercyjne, aparaturę oraz wykorzystane oprogramowanie. Następnie, przedstawiła materiał badawczy oraz czytelnie opisała zastosowane układy badawcze. Należy podkreślić, że do badań wykorzystane zostały szczepy kliniczne *Candida albicans*, co niewątpliwie zwiększa potencjał kliniczny recenzowanej rozprawy doktorskiej. Ponadto, aby odzwierciedlić warunki, które mogą występować *in vivo* podczas infekcji grzybiczych, Doktorantka zastosowała układ starzenia chronologicznego i związki stresogenne, takie jak: flukonazol, metyloglioksal, nadtlenuk wodoru, podchloryn sodu, donor tlenu azotu.

W rozdziale „Materiały i Metody” zawarto opis następujących procedur badawczych: hodowla komórek *Candida albicans*, wyznaczanie IC₅₀, analiza morfologiczna, ocena wrażliwości na czynniki stresogenne, analiza poziomu białek, analiza glikozylacji, ocena końcowych zaawansowanych produktów glikacji, ocena zdolności białek do tworzenia agregatów, analiza markerów uszkodzeń oksydacyjnych (tj. ocena poziomu grup karbonylowych w białkach, pomiar produkcji reaktywnych form tlenu i anionorodnika ponadtlenkowego, pomiar oksydacyjnych uszkodzeń DNA), elektroforeza w zmiennym polu pulsacyjnym, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* sond specyficznych do chromosomów *Candida albicans*, analiza ilości DNA w jądrze komórkowym, analiza metylacji DNA, test kometowy pojedynczych chromosomów, test kometowy, analiza uszkodzeń DNA metodą TUNEL, analiza zawartości glikogenu, ocena tempa proliferacji, ocena żywotności komórek, test na lekowrażliwość, analiza komórek w cytometrze przepływowym, analiza statystyczna oraz analiza klastrowania hierarchicznego.

Podsumowując, rozdział ten w sposób skrupulatny i wyczerpujący opisuje całość zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, pozwalając na odtworzenie warunków i weryfikację uzyskanych wyników przez innych badaczy. Zdaniem recenzenta wybór oraz zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod i technik badawczych z dziedzin genetyki, biologii molekularnej, biologii komórki oraz biochemii jest imponujący i świadczy o ogromie



poświęconej pracy oraz bardzo dużym potencjale naukowym Doktorantki. Jedyną moją uwagą do tej części jest niejednolite nazewnictwo poszczególnych podpunktów części metodycznej np. podpunkty „(...) 2.3 Wyznaczanie IC_{50} , 2.4 Hodowla komórek *Candida albicans*, 2.7 Analiza poziomu białek (...)”, podczas gdy w podpunktach - „(...) 2.5 Morfologia komórek, 2.6 Wrażliwość na czynniki stresogenne, 2.8 Glikozylacja (...)”. Zdaniem recenzenta warto ujednolicić nazewnictwo poszczególnych podpunktów i zmienić ich nazwę np. na odpowiednio: Analiza morfologii komórek, Ocena wrażliwości na czynniki stresogenne, czy też Analiza glikozylacji.

Kolejną częścią przedstawioną mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest rozdział „Wyniki”. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań przedstawione zostały na 55 stronach i zobrazowane przez 33 ryciny. Rozdział „Wyniki” został podzielony na 5 głównych punktów dotyczących kolejno: „Charakterystyki zmienności fenotypowej oraz chromosomowej wybranych szczepów gatunku *Candida albicans*” (1); „Charakterystyki zdolności kumulowania nieenzymatycznych modyfikacji białek przez wybrane szczepy *Candida albicans* podczas długoterminowej hodowli komórek w fazie stacjonarnej” (2); „Oceny stabilności genetycznej szczepów *Candida albicans* w długoterminowych hodowlach komórek w fazie stacjonarnej” (3); „Charakterystyki zmienności fenotypowej szczepów podczas długoterminowej hodowli komórek w fazie stacjonarnej” (4) oraz „Analizy klastrowania hierarchicznego – integracji danych eksperymentalnych” (5).

W pierwszym punkcie rozdziału „Wyniki” Doktorantka charakteryzuje zmienność morfologii komórek poszczególnych szczepów *Candida albicans* oraz przedstawia ich wrażliwość na wybrane czynniki stresogenne. Przedstawiona jest również zróżnicowana wrażliwość poszczególnych szczepów *Candida albicans* na flukonazol, lek pierwszego rzutu w infekcjach grzybiczych. Przy tym punkcie brakuje mi jednak tabelarycznego podsumowania otrzymanych wartości IC_{50} dla poszczególnych szczepów *Candida albicans*, to znacznie ułatwiłoby interpretację wyników przez recenzenta. W kolejnym etapie badań Doktorantka wykazała wysoką zmienność szczepów *Candida albicans* pod względem liczby i wielkości chromosomów obserwowaną na poziomie międzypopulacyjnym oraz międzykomórkowym, a także ich niestabilność genomową. Ze względu na fakt, iż aberracjom chromosomowym towarzyszy stres komórkowy jako konsekwencja zaburzenia homeostazy wewnątrzkomórkowej, Doktorantka kolejno skupiła się na regulacji markerów utraty komórkowej homeostazy, tj. na poziomie nieenzymatycznych modyfikacji białkowych typu karbonylacji oraz nitracji. Co ciekawe, we wszystkich badanych szczepach *Candida albicans* wykazano zwiększoną zdolność do kumulowania karbonylowanych białek, jak również 3-nitrotyrozyny, w porównaniu do szczepu referencyjnego (SC5314). Otrzymane wyniki Doktorantka porównała z endogennym poziomem reaktywnych form tlenu. Podczas analizy tego punktu nasunęło mi się kilka uwag: 3-nitrotyrozyna stanowi swoisty „odcisk palca” dla reaktywnych form azotu, dlatego, zdaniem recenzenta warto byłoby zbadać endogenne poziomy



reaktywnych form azotu, takich jak tlenek azotu oraz pochodne – dwutlenek azotu, nadtlenoazotyn, w poszczególnych szczepach *Candida albicans*, jak również zanalizować wpływ czynników stresogennych wykorzystanych przez Doktorantkę w swoich badaniach na pulę stresu nitro-oksydacyjnego. Byłabym wdzięczna za wyjaśnienie jakich metod/technik badawczych Doktorantka użyłaby w tym celu. Moja drobna uwaga dotyczy również ryciny nr 23C. Doktorantka nie wskazała jaki prążek na przedstawionej analizie Western blot odpowiada 3-nitrotyrozynie oraz jaka jest jej masa molekularna.

W kolejnej części pracy Doktorantka postanowiła scharakteryzować zdolności kumulowania nieenzymatycznych modyfikacji białek przez wybrane szczepy *Candida albicans* podczas długoterminowej hodowli komórek w fazie stacjonarnej. Należy podkreślić trafny wybór modelu eksperymentalnego, który naśladuje mikro-środowisko obecne w organizmie podczas infekcji grzybiczych. Istotne światło na potencjał kliniczny pracy rzuca dodatkowo fakt, iż flukonazol znacząco obniżał pulę 3-nitrotyrozyny w badanych modelach eksperymentalnych. Tym bardziej cenne byłoby scharakteryzowanie zmian poziomu stresu nitro-oksydacyjnego jako istotnego czynnika w infekcjach *Candida albicans*.

Doktorantka podjęła się również zbadania zmian poziomu agregatów białkowych oraz końcowych produktów glikacji oraz glikozydacji ekstraktów białkowych otrzymanych ze szczepów *Candida albicans* różniących ilością DNA. Na stronie 85 rozprawy doktorskiej, Doktorantka pisze: „Należy jednak zaznaczyć, że wykorzystany do badań zestaw był dedykowany do oznaczenia *N*-acetyloglukozaminy za pomocą przeciwciał. W związku z czym należy uwzględnić możliwe ograniczenia procedury niepozwalające na rozróżnienie czy reszta *N*-acetyloglukozaminy przyłączona jest wiązaniem α czy β [283].” Należy docenić, że Doktorantka krytycznie wskazuje ograniczenia użytych przez siebie metod, co świadczy o jej dojrzałości naukowej. Ostatnim podpunktem w tej części eksperymentalnej była ocena odpowiedzi adaptacyjnej komórek w oparciu o poziom dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) oraz jednego z najważniejszych białek szoku termicznego, Hsp70. W tym miejscu mam prośbę do Doktorantki o wytłumaczenie wyboru tych dwóch bio-markerów. Czy Doktorantka dokonując wyboru brała również pod uwagę ich lokalizację wewnątrzkomórkową?

W następnych etapach badań Doktorantka oceniła stabilność genetyczną *Candida albicans* w długoterminowych hodowlach komórek w fazie stacjonarnej. Autorka pracy wykazała, iż podczas wybranych warunków eksperymentalnych dochodzi do utraty integralności DNA pojedynczych chromosomów oraz indukcji podwójnych pęknięć DNA w komórkach *Candida albicans* zależnie od użytych czynników stresogennych. Co ważne, wykazano, iż w odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach *Candida albicans* w zastosowanych modelach eksperymentalnych bierze udział dimetylacja histonu H3 oraz metylacja N⁶-adenozyny RNA.

Kolejno, Doktorantka scharakteryzowała zmienność fenotypową szczepów *Candida albicans* podczas długoterminowej hodowli komórek w fazie stacjonarnej. W ostatnim etapie badań



wykonała analizę klastrowania hierarchicznego otrzymanych danych eksperymentalnych dla każdego z badanych szczepów *Candida albicans*.

W liczącej 21 stron Dyskusji Doktorantka krytycznie analizuje wyniki swoich badań i konfrontuje je z dostępnymi danymi literaturowymi. Dyskusja jest dojrzała i została opracowana w sposób wyczerpujący. Rozdział ten w sposób adekwatny i logiczny odzwierciedla kontekst badań i potwierdza dużą znajomość problematyki roli nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek w promowaniu chromosomowej niestabilności *Candida albicans*. Należy zwrócić uwagę, że Doktorantka zaznacza w odpowiednich miejscach nowatorskie aspekty swoich badań oraz przewagę technologiczną zastosowanych przez Nią narzędzi badawczych.

Rozprawę doktorską Doktorantka kończy 6 wnioskami. Należy podkreślić, że wysunięte wnioski są odpowiedzią na cele szczegółowe pracy.

W swojej pracy doktorskiej Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych błędów edytorskich np. niekonsekwencją użytych skrótów. Ponadto, kolejność numeracji referencji w tekście nie jest chronologiczna począwszy od „Wstępu”. Te uwagi jednak nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno merytoryczna jak i metodyczna strona rozprawy doktorskiej zasługuje na uznanie. Sugestie recenzenta wskazane w poszczególnych częściach recenzji, pozostawiam Doktorantce do rozważenia przy ewentualnej publikacji wyników badań. Jednocześnie zaznaczam, iż moje uwagi nie umniejszają wartości poznawczej oraz klinicznej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Anny Kuny pod tytułem „Rola nieenzymatycznych potranslacyjnych modyfikacji białek w promowaniu chromosomowej niestabilności *Candida albicans*” spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Anny Kuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i potencjał kliniczny dociekań naukowych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Anny Kuny.

Magdalena Górską-Ponikowską

Dr hab.n.med. Magdalena Górską-Ponikowska