

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Szczepaniak

## Wpływ wybranych czynników na aktywność transporterów ABC *Candida albicans*

Narastające zjawisko oporności drobnoustrojów patogennych dla człowieka na działanie chemoterapeutyków stanowi jeden z najważniejszych problemów współczesnej chemoterapii. Szczególnie groźna jest oporność wielolekowa, czyli utrata wrażliwości na działanie wielu, strukturalnie różnych leków, zarówno pochodzenia naturalnego (antybiotyków), jak i syntetycznego. Głównym mechanizmem oporności wielolekowej jest działanie tzw. transporterów wielolekowych, tj. zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej białek, które wykorzystując energię metaboliczną pochodzącą z hydrolizy ATP lub transbłonowego gradientu protonowego, efektywnie usuwają z komórek drobnoustrojów cząsteczki leków. Oporność wielolekowa dotyczy także drobnoustrojów grzybowych patogennych dla człowieka, w tym drożdżaków z rodzaju *Candida*, spośród których największe znaczenie jako czynnik etiologiczny grzybic układułowych ma *Candida albicans*. Mechanizmy oporności wielolekowej tego drobnoustroju oraz możliwe sposoby przełamania tej oporności są przedmiotem intensywnych badań w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Do tego grona należy także grupa badawcza pod kierunkiem p. dr hab. Anny Krasowskiej z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, do której należy Autorka recenzowanej rozprawy, p. mgr Joanna Szczepaniak.

Przedmiotem prac badawczych prowadzonych przez Doktorantkę w ramach Jej projektu doktorskiego były dwa transportery wielolekowe typu ABC z *C. albicans*, Cdr1p i Cdr2p. Autorka recenzowanej rozprawy opracowała metodę pomiaru aktywności tych białek z wykorzystaniem jodku 3,3'-dipropylotiakarbocyaniny /diS-C<sub>3</sub>(3)/ jako fluorescencyjnej sondy molekularnej i wykorzystwała opracowaną przez siebie metodę do badania wpływu różnych czynników, takich jak faza wzrostu hodowli drożdżaków czy też stężenie glukozy w podłożu oraz wybranych efektorów małowcząsteczkowych na aktywność obu transporterów. Sonda ta, wprowadzona do literatury światowej przez Karla Siglera i Danę Gaškovą z Uniwersytetu Karola w Pradze jako narzędzie do badania potencjału błonowego i procesów depolaryzacji błony komórkowej drożdży i drożdżaków, została przez Doktorantkę umiejętnie wykorzystana do monitorowania aktywności CdCpr1p i CaCdr2p. Zaproponowana metoda nie jest całkowicie uniwersalna, i w przypadku gdy badane inhibitory są fluorogenne, a sygnały w ich widmach emisyjnych pokrywają się z maksimum emisji sondy, nie może zostać zastosowana. W badaniach Doktorantki taka sytuacja miała miejsce w przypadku styrylochinolin jako potencjalnych inhibitorów transporterów ABC. Tym niemniej, zastosowanie diS-C<sub>3</sub>(3) jako narzędzia do badania aktywności transporterów wielolekowych typu ABC może być stosunkowo szerokie.

Stosując opracowaną przez siebie metodę oraz bogatą gamę innych technik badawczych, Doktorantka poczyniła interesujące spostrzeżenia dotyczące roli czynników środowiskowych, w tym szczególnie glukozy lub innych sacharydów w regulacji aktywności CaCdr1p i CaCdr2p, w tym ekspresji kodujących te białka

genów. Ważnym wątkiem prac p. Szczepaniak było także badanie wpływu enniatyny A i beauwerycyny oraz związków z grupy styrylochinolin na wzrost *C. albicans* oraz funkcjonowanie transporterów wielolekowych typu ABC tego drożdżaka.

Wyniki badań p. Szczepaniak opisane w Jej rozprawie doktorskiej mają w mojej opinii oczywisty charakter nowości naukowej i istotne znaczenie poznawcze. Pragnę wyrazić duże uznanie dla Doktorantki i Pani Promotor za opracowanie i pomyślną realizację ambitnego, kompleksowego programu badawczego. Pani Szczepaniak wykonała serię dobrze zaplanowanych eksperymentów, wykorzystując bogaty zestaw metod badawczych z zakresu mikrobiologii, biologii komórki, biologii molekularnej i biochemii. Wiele z zastosowanych technik wymaga od eksperymentatora dużej biegłości laboratoryjnej, którą się p. Szczepaniak niewątpliwie wykazała.

Za najistotniejsze dokonania Doktorantki poczynione w trakcie realizacji doktorskiego projektu badawczego uważam:

- a) opracowanie metody badawczej umożliwiającej badanie aktywności transporterów CaCdr1p i CaCdr2p w czasie rzeczywistym, w której wykorzystywany jest diS-C<sub>3</sub>(3) jako specyficzna dla nich fluorescencyjna sonda molekularna;
- b) stwierdzenie zależności pomiędzy poziomem glukozy w środowisku, a wrażliwością komórek *C. albicans* na Flukonazol. Uważam, że ten wątek badawczy szczególnie warto kontynuować z uwagi na jego potencjalne znaczenie praktyczne;
- c) określenie zróżnicowanego wpływu glukozy na aktywność CaCdr1p i CaCdr2p, w tym na ekspresję genów kodujących te białka;
- d) wykazanie, że enniatyna A jest selektywnym niekompetycyjnym inhibitorem CaCdr1p, a beauwerycyna hamuje aktywność Cdr1p i Cdr2p;
- e) wykazanie synergistycznego z Flukonazolem działania przeciwgrzybowego niektórych związków z grupy styrylochinolin oraz ich wpływu na aktywność i lokalizację transporterów wielolekowych typu ABC w komórkach *C. albicans*.

Wszystkie te dokonania mają istotne znaczenie poznawcze, czego potwierdzeniem jest opublikowanie dużej części uzyskanych wyników w postaci artykułów w renomowanych czasopismach naukowych.

Dysertacja p. Szczepaniak spisana została na 138 stronach, ilustrowana jest licznymi wykresami, schematami i zdjęciami, zawiera cytaty z aż 240 pozycji literaturowych. Układ pracy można uznać za standardowy. Główne jej rozdziały to kolejno: streszczenie w j. polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp teoretyczny, cel pracy, opis materiałów i metod eksperymentalnych, opis uzyskanych wyników, dyskusja oraz spis piśmiennictwa, tabel i rycin.

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy, zatytułowane jako **Wstęp** zajmuje 29 stron. Jest to w mojej opinii ciekawe i dobrze opracowane omówienie najważniejszych informacji dotyczących przede wszystkim grzybowych transporterów wielolekowych (szczególnie u *Candida albicans*) i ich inhibitorów. Ta część rozprawy zawiera szereg cennych, interesujących danych, wspartych cytatami do jak najbardziej aktualnej literatury. Zapoznanie się z nią znakomicie ułatwia zrozumienie kolejnych części pracy. Nie znalazłem we **Wstępie** istotnych błędów merytorycznych, a jedynie nieco kilka nieścisłości.

Legenda do Ryc. 1. Calcofluor White jest barwnikiem fluorescencyjnym wiążącym się przede wszystkim z chityną, a nie beta-glukanem. Dowodem na to są także zaprezentowane zdjęcia, na których najintensywniej wybarwione obszary zlokalizowane są w tzw. pierwotnym septum, zbudowanym wyłącznie z chityny.

Str. 18, wiersze 11-13 od dołu. Amfoterycyna B jako lek, także w formie liposomalnej, nie jest podawana doustnie (przez przewód pokarmowy), ale wyłącznie dożylnie, zatem jej ewentualna wchłanianość z przewodu pokarmowego nie ma znaczenia (jest faktycznie lepsza niż Nystatyny, która nie wchłania się w ogóle i dlatego jest stosowana do leczenia grzybic układu pokarmowego).

Str. 18, wiersze 2-3. Nie mogę zgodzić się z przytoczoną opinią na temat roli mykozaminy. Cukier ten, a szczególnie jego grupa 2'-OH, odgrywa istotną rolę w wiązaniu Amfoterycyny B ze sterolami, jednakże tego wiązania nie byłoby w ogóle bez aglikonu cząsteczki antybiotyku i to on odgrywa podstawową rolę w tym wiązaniu, natomiast grupa 2'-OH ma znaczenie dla selektywności wiązania z ergosterolem lub cholesterolem, co wykazali Burke i wsp.

Str. 30, wiersze 12-13 od góry. Nie rozumiem sformułowania: „...związki, które charakteryzują się wyższą energią wiązania wodoru...” Czy chodzi o wiązania wodorowe, czy też o wiązanie protonu?

Str. 35, wiersze 2-4 od góry. „...Amfoterycynę B, która nie jest substratem dla transporterów dzięki swej wielkości lub niskiej hydrofobowości...”. Amfoterycyna B jest związkiem amfoterycznym, jednakże przeważa zdecydowanie charakter hydrofobowy.

Str. 38, wiersze 1 - 6 od góry i str. 40, wiersze 4 – 12 od dołu. O synergistycznym efekcie inhibitorów pomp lekowych typu ABC ze związkiem przeciwgrzybowym można mówić tylko wówczas, gdy inhibitory te same w sobie hamują wzrost grzybów. W przypadku związków nie wykazujących działania przeciwgrzybowego mówimy o „uwrażliwieniu” lub „chemosensytyzacji” (brzydkie słowo, kalka z angielskiego).

Str. 44, wiersze 3 – 6 od góry. Nie podzielam opinii Doktorantki, która dopatruje się analogii strukturalnych pomiędzy styrylochinolinami a ewentualnym koniugatem naftyfiny z mykozaminą. Zgoda co do tego, że chinolinowy fragment styrylochinolin przypomina naftalenowy fragment naftyfiny, jednakże nie sądzę, aby coś z tego wynikało. Naftyfina jest inhibitorem epoksydazy skwalenowej, a nie wydaje się aby ten enzym był celem molekularnym styrylochinolin.

Drobne błędy edytorskie, w tym stylistyczne.

Str. 17, wiersz 11 od dołu. Zamiast „frekwencja” chyba jednak lepiej w tym przypadku brzmi „częstotliwość”

Str. 18, wiersz 5 od góry. Zamiast „leki alloaminowe” powinno być „leki alliloaminowe”.

Str. 18, tytuł podrozdziału 4.2.1. Amfoterycyna B należy do grupy leków polienowych, tak więc tytuł powinien być sformułowany np.: „Amfoterycyna B i inne leki polienowe”.

Str. 20, wiersz 15 od dołu. Zamiast „metabolity drugorzędowe” lepiej używać określenia „metabolity wtórne”.

Str. 26, wiersze 8 – 9 od góry. Określenie „naładowane” w odniesieniu do reszt aminokwasowych jest niejednoznaczne. Lepiej – „obdarzone ładunkiem”.

Str. 27, wiersze 4 – 5 od dołu. „...co odzwierciedla się na ilości...” (styl.)

Str. 28, wiersze 6 – 8 od dołu. Styl. Struktury nie mogą „obejmować kilku etapów”

Str. 43. - fluorochinolony zostały nazwane parę linijek dalej fluorochinolinami;

- gyraza DNA to bakteryjna topoizomeraza II, tak więc sformułowanie ...aktywności topoizomerazy oraz gyrazy DNA... jest niefortunne.

Cel pracy został przez Doktorantkę sformułowany w sposób nieco złożony. Pani Szczepaniak nie określiła jednego celu głównego, lecz wymienia co najmniej trzy cele cząstkowe: opracowanie metody pomiaru aktywności transporterów ABC w czasie rzeczywistym, zbadanie wpływu enniatyny i beauwerycyny na aktywność tych transporterów oraz określenie wpływu związków z grupy styrylochinolin na działanie transporterów ABC oraz poziom białka Cdr1. Wydaje mi się, że można było jednak sformułować jeden cel, gdyż opracowana metoda była stosowana w badaniach ukierunkowanych na określenie wpływu inhibitorów na aktywność transporterów ABC, natomiast wątki cząstkowe potraktować jako zadania badawcze.

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

- brak podania źródła pochodzenia związków styrylochinolinowych;
- fragment z tytułowany 6.1.6. *Bufory* zawiera opisy składu szeregu roztworów, które nie są buforami, np. 0,85% NaCl, roztwory chlorku magnezu i wapnia, czy też roztwór zawierający 1 M sorbitol, 0,1 M EDTA i 1%  $\beta$ -merkaptotoetanol.

- określenie „zwirować” to slang laboratoryjny. Powinno być „odwirować”.
- mogę się jedynie domyślać, że określenie „lodowata sterylna woda destylowana” oznacza odpowiednią wodę o temperaturze 4°C?

- p. 6.2.16. Za pomocą techniki RT-PCR można badać ekspresję genów, a nie białek.

- brak źródła pochodzenia przeciwciał stosowanych w technice Western Blot.
- p. 6.2.26. Tytuł niefortunny. Powinno być np. „wyznaczanie krzywej wzrostu”. Pierwsze zdanie opisu: „Krzywą wzrostu *C. albicans* przygotowano przez dodanie...” także niezbyt fortunate. Krzywa wzrostu była wynikiem wykreślenia w odpowiednim układzie współrzędnych wyników pomiaru gęstości zawiesiny komórkowej dokonywanych w odstępach czasowych.

Uzyskane rezultaty przedstawione zostały w głównym rozdziale **Wyniki** o objętości 38 stron. Sposób przedstawienia jest w pełni profesjonalny. Odpowiednia analiza statystyczna została zastosowana wszędzie, gdzie było to konieczne. W opisie wyników wplecione zostały elementy komentarza i dyskusji w stopniu całkowicie uprawnionym, a niekiedy nawet koniecznym. Jakość zamieszczonych zdjęć i wykresów nie budzi wątpliwości.

Drobne uwagi do tej części rozprawy :

Tabela 11, str. 69. Brak komentarza do faktu, że skonstruowany przez Doktorantkę szczep *C. albicans* z wklonowanym genem kodującym białko fuzyjne Cdr1-GFP, które jest poprawnie zlokalizowane z błonie komórkowej, wykazuje identyczną jak szczep dziki wrażliwość na Flukonazol, co wydaje się sugerować, że białko fuzyjne było niefunkcjonalne.

Str. 71. Opis i wykres (ryc. 14) eksperymentów dotyczących badania wpływu fazy wzrostu *C. albicans* na aktywność transporterów Cdr1p i Cdr2p. Doktorantka nie podaje jaka była gęstość zawiesiny komórek na początku eksperymentu. Z opisu warunków na str. 66, gdzie podano, że 150  $\mu$ l całonocnej hodowli rozcieńczano 20 ml świeżej pożywki oraz z faktu, że gęstość całonocnej hodowli oscyluje zwykle w granicach  $10^8$  –  $10^9$  komórek/ml, można przypuszczać, że wynosiła ona około  $10^6$  -  $10^7$  komórek/ml. W takim przypadku, gęstość optyczna takiej zawiesiny ( $OD_{600}$ )

powinna wynosić 0,1 – 0,3, a tymczasem na wykresie (ryc. 14, str. 71) wynosi ona 0 (?), a ponadto nie ulega zmianie przez 9 h inkubacji. Tak długi okres bez mierzalnego wzrostu jest zastanawiający. Oczekiwałbym jakiegoś wyjaśnienia tej kwestii, jak również odnośnie skali na osi pionowej wykresu. Klasyczne badanie kinetyki wzrostu drobnoustrojów grzybowych poprzez pomiar OD<sub>600</sub> przeprowadza się zwykle w zakresie od około 0,1 do 1-1,5. Zakres 0 – 50 podany na ryc. 14 wydaje się mocno nietypowy.

Wykresy na ryc. 16 (str. 76) – brak danych dla szczepu WT.

Sprzeczność pomiędzy stężeniem glukozy podanym w opisie wyników na stronie 76, wiersz 20 od dołu (2%, czyli 20 mg/ml), a wartością w tabeli 15 na str. 63 (20 µg/ml).

Str. 83. 7.7.2.4. Wpływ glukozy na zwiększenie poziomu Cdr1p. Wyniki analizy Western Blot są dość przekonujące, ale SDS-PAGE już nie. Wydaje się, że byłoby lepiej, gdyby analizie poddano frakcję białek błonowych, a nie ekstrakty ogólnej puli białek

Ryc. 38, str. 103. Brak informacji, jaki szczep wykorzystywany był w badaniu blokowania wyrzutu Rodaminy 6G przez związki styrylochinolinowe. Zakładając najbardziej prawdopodobną sytuację, że był to szczep typu dzikiego, można wyrazić pewien żal, że analogicznego eksperymentu nie wykonano z komórkami szczepów delecyjnych. Takie badanie mogłoby dostarczyć bezpośrednich dowodów na działanie niektórych styrylochinolin jako inhibitorów konkretnych transporterów wielolekowych.

Końcowa część rozprawy zatytułowana **Dyskusja**, obejmuje 10 stron. Dyskusja jest dojrzała i wszechstronna. Doktorantka umiejętnie unika zbyt daleko idących interpretacji (z dwoma małymi wyjątkami podanymi poniżej), a jednocześnie formułuje najbardziej prawdopodobne wyjaśnienia zaobserwowanych zjawisk i zależności, korzystając przy tym bardzo umiejętnie z danych literaturowych.

Uwagi do tej części rozprawy:

Str. 108, wiersze 12 – 22. Niefortunny sposób napisania tego fragmentu. Czytelnik może zrozumieć, że analiza poziomu ekspresji genów *CDR1* i *CDR2* w klinicznych izolatach *C. albicans* została przeprowadzona przez Autorkę rozprawy. Cytat do pracy Lyonsa i White'a powinien być podany zdecydowanie wcześniej.

Str. 111, wiersze 10 – 11 od dołu oraz str. 114, wiersze 16 – 18 od dołu. Podane tutaj wnioski i ich uzasadnienie nie są przekonujące. Nie można twierdzić, że w szczepie  $\Delta cdr1$  białko Cdr2p jest jedynym transporterem w komórce. A co z Mdr1p? Także faktu, że związek WK86B wykazywał działanie synergistyczne z flukonazolem tylko wobec szczepu  $\Delta cdr1$  nie można tłumaczyć jako dowodu na działanie tego związku jako specyficznego inhibitora Cdr2p. Należałoby to udowodnić, np. poprzez blokowanie przez ten związek wyrzutu Rodaminy 6G z komórek szczepu  $\Delta cdr1 \Delta mdr1$  (Doktorantka nie dysponowała takim szczepem).

Str. 116. Cytat „Romanowicz, 2015” . Odpowiedniej publikacji nie ma w spisie literatury.

Str. 114, wiersze 3 – 5 od góry. Doktorantka słusznie stwierdza, że spośród badanych styrylochinolin najwyższą aktywność przeciwgrzybową wykazywały związki posiadające 2 grupy hydroksylowe. Dalej jednak formułuje zbyt daleko idące uogólnienie dotyczące istotności obecności grupy –OH dla działania przeciwgrzybowego, z cytatem do 3 publikacji dotyczących polifenoli i proantocyjanidyn. Jest wiele związków przeciwgrzybowych nie posiadających grup OH, a dla wielu innych takie grupy posiadających, nie mają one znaczenia dla ich aktywności przeciwgrzybowej.

Lista skrótów zawiera 40 pozycji. Są to w znakomitej większości skróty często stosowane w teście rozprawy, a jednocześnie niekoniecznie powszechnie znane, co jednoznacznie potwierdza trafność ich wyboru. Doktorantka uniknęła, dość często się zdarzającego w pracach doktorskich, wymieniania skrótów pospolitych znanych, uważanych za standardowe i jako takich nie wymagających tłumaczenia. To kolejny plus Jej pracy.

Sporządzając spis cytowanej literatury Doktorantka zadbała o jednolity styl układu cytatów. Dość trudno zorientować się jedynie jaką cezurę przyjęto dla limitu ilości nazwisk współautorów, od którego stosowany jest zapis „et al.”. Niekiedy jest to np. Shukla et al., a innym razem Sharma M., Manoharlal R., Negi A.S., et al. Cytowana literatura jest bardzo aktualna, prawie wszystkie cytowane prace ukazały się po roku 2000, a znakomita większość w ostatnich 10 latach.

Rozprawa napisana jest generalnie dobrym językiem, czyta się ją z zainteresowaniem. Nie znalazłem w tekście rozprawy istotnych błędów nomenklaturowych i w zakresie słownictwa specjalistycznego (kilka mniej istotnych zostało wymienionych powyżej), natomiast występuje nieco błędów edytorskich, w tym tzw. literówek.

Pani Szczepaniak jest współautorką dwóch publikacji w czasopiśmie z listy ISI (*Frontiers in Microbiology*), których tematyka jest związana z tematyką rozprawy doktorskiej i jednej publikacji w *Chemistry Letters* w tematyce nie związanej z rozprawą. W wykazie na str. 3 wspomniana jest jeszcze publikacja „in press” o tytule jednoznacznie wskazującym na związek z tematyką rozprawy, jednakże nie jest jasne w jakim ma się ona ukazać czasopiśmie. Nie jest znane czasopismo o skrócie *Int. J. Antimicrob.* Zapewne chodzi o *International Journal of Antimicrobial Chemotherapy* lub o *International Journal of Antimicrobial Agents*, przy czym oba czasopisma cieszą się bardzo dobrą renomą. W dwóch już opublikowanych pracach i w manuskrypcie „in press” dotyczących tematyki rozprawy, Doktorantka jest pierwszym współautorem. Z ogólnej puli 14 doniesień konferencyjnych (4 ustnych i 10 posterowych), współautorstwa Doktorantki, w jednym przypadku p. Szczepaniak osobiście przedstawiała komunikat ustny na konferencji międzynarodowej. W dorobku Doktorantki znajdują się także 2 zgłoszenia patentowe dotyczące tematyki spoza zakresu rozprawy. Pani Szczepaniak była także trzykrotnie wyróżniana przez Rektora UWr i raz przez Prezydenta Wrocławia.

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag i zastrzeżeń wyraźnie wskazuje, że większość z nich wynika prawie na pewno z niedokładności lub niezręczności opisu, a nie rzeczywistych błędów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa spełnia warunek ustawowy, tj. zawiera istotne elementy nowości naukowej, a moja jednoznacznie wysoce pozytywna ocena jej zawartości skłania mnie do sformułowania wniosku o dopuszczenie p. mgr Joanny Szczepaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jestem także całkowicie przekonany, że dorobek naukowy Doktorantki, w tym szczególnie oceniana przeze mnie Jej rozprawa doktorska, uzasadnia nadanie Pani Szczepaniak stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Biorąc pod uwagę własną ocenę poziomu rozprawy oraz fakt publikacji znaczącej części wyników w dwóch artykułach w czasopiśmie z kwartyłu Q1 w swojej dziedzinie, w których p. Szczepaniak jest pierwszym ze współautorów, uważam, że Jej rozprawa doktorska jest godna wyróżnienia. Ostateczne sformułowanie odpowiedniego wniosku uzależniam od oceny przebiegu publicznej obrony.

