



**INSTYTUT
BIOCHEMII
I BIOFIZYKI
POLSKA
AKADEMIA NAUK**

Warszawa 24.04.2017r.

Prof. dr hab. Joanna Kruszewska
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa

RECENZJA

pracy doktorskiej pani mgr Joanny Szczepaniak pt.: „Wpływ wybranych czynników na aktywność transporterów ABC *Candida albicans*”.

Celem pracy było opracowanie metody pomiaru aktywności transporterów ABC w czasie rzeczywistym i zbadanie aktywności transporterów w czasie wzrostu *Candida*. Celem było także określenie wpływu cukrów na aktywność transporterów ABC i określenie mechanizmu tego wpływu na poziomie ekspresji genów kodujących transportery i na poziomie białka.

Następnymi celami było zbadanie wpływu inhibitorów na aktywność transporterów stosując znany inhibitor oraz szereg związków styrylochinolinowych w skojarzonym działaniu z

flukonazolem. Zbadano także wpływ potencjalnych inhibitorów na poziom białka Cdr1p oraz określono zależność siły działania od struktury tych związków.

We wstępie Doktorantka opisała sposoby leczenia grzybic, stosowane leki oraz mechanizm ich działania. Zwróciła uwagę na mechanizmy powstawania oporności na poszczególne grupy leków. Opisała mechanizmy modyfikacji celu działania leków jak mutacje genów czy posttranslacyjne modyfikacje. Najlepiej zbadanym przykładem mutacji w genach kodujących cele dla leków przeciwgrzybowych jest białko Erg11p biorące udział w syntezie ergosterolu i będące celem działania leków azolowych, dla którego zidentyfikowano ponad 140 mutacji. Mutacje dotyczą miejsc wiązania substratu lub inhibitora. Zmniejszenie ilości ergosterolu w błonach osłabia działanie innej grupy leków, leków polienowych do których należy amfoterycyna B. Zanotowano też szereg mutacji w genie *FKS1* kodującym syntazę β -1,3 glukanu cel działania echinokandyny.

Doktorantka wskazała na istotny mechanizm powstawania oporności na leki jakim jest aktywne usuwanie leku z komórki przez transportery typu ABC, (Cdr1p i Cdr2p) i typu MFS (Mdr1p). Następnie skupiła się na szczegółowym opisie transporterów ABC, ich budowy i wagi poszczególnych domen bezpośrednio dla funkcji wyrzucania antybiotyków z komórki a także dla aktywności ATP-azowej. Pokazała mechanizm działania transporterów ABC skonstruowany w oparciu o badania krystalograficzne oraz o badania mutantów niosących zmiany w sekwencjach transporterów. Ponieważ brak krystalicznej struktury grzybowych transporterów ABC, dalsze badania oparła na komputerowej predykcji właściwości potencjalnych inhibitorów. W ten sposób określiła cechy jakimi powinien charakteryzować się inhibitor takie jak grupy funkcyjne występujące w konkretnej odległości od siebie, powierzchnie polarne i hydrofobowe, geometria cząsteczki i jej wielkość.

Doktorantka opisała regulacje ekspresji genów kodujących transportery, zwracając uwagę na sekwencje promotorów odpowiedzialne za konstytutywną ekspresję, elementy biorące udział w obniżaniu ekspresji, elementy odpowiedzi na hormony sterydowe i elementy DRE (Drug Response Element) odpowiedzialne za regulację ekspresji w odpowiedzi na leki. Te ostatnie zostały opisane bardziej szczegółowo.

Doktorantka zwróciła też uwagę na inne czynniki regulujące aktywność transporterów ABC takie jak fosforylacja i zwiększenie czasu półtrwania mRNA. Wskazała sposoby przewyciężenia oporności na poziomie transporterów i opisała inhibitory i modulatory obecnie stosowane lub badane. Przyznała, że choć badania nad lekami przeciwgrzybowymi są

szeroko zakrojone jednak istotne jest opracowywanie nowych terapii i poznawanie mechanizmów działania leków stosowanych do tej pory i nowo opracowywanych oraz szczegółowe poznanie mechanizmów oporności na leki.

Doktorantka postawiła sobie cele mające doprowadzić do poznania wpływu wybranych czynników na aktywność transporterów ABC u *C. albicans*.

- Opracowała metodę pomiaru aktywności transporterów ABC z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy diS-C₃(3) umożliwiającej rozpoznanie ilości sondy wolnej i związanej w komórce po długości fali emitowanej fluorescencji.
- Skonstruowała szczep *C. albicans* z białkiem Cdr1p wyznakowanym fluorescencyjnym znacznikiem GFP, które posłużyło do badania wpływu związków styrylochinolinowych na lokalizację Cdr1p w komórce.
- Skonstruowała szczep z delecją trzech transporterów Cdr1p, Cdr2p i Mdr1p oraz mutanty z pojedynczymi i podwójnymi delecjami.
- Sprawdziła intensywność usuwania sondy z komórek szczepów zmutowanych.
- Wyeliminowała transporter Mdr1p jako nie biorący udziału w usuwaniu sondy
- Zbadała poziom ATP w komórkach jako istotny dla transporterów wymagających energii z ATP do aktywności.
- Zbadała wpływ glukozy na poziom ATP w komórce i na aktywację transporterów na poziomie transkrypcji i stężenia białek w komórce
- Zbadała wpływ innych cukrów na aktywność transporterów oraz na oporność *Candida* na flukonazol.
- Zbadała wpływ kilkunastu związków styrylochinolinowych na aktywność transporterów ABC

Najważniejszymi wynikami otrzymanymi przez Doktorantkę jest pokazanie, że Cdr2p preferencyjnie usuwa substrat diS-C₃(3) z komórki, i że intensywność wyrzutu sondy zależy od fazy wzrostu

- usunięcie genu *CDR2* nie podnosi transkrypcji genu *CDR1* i dopiero dodanie glukozy aktywuje transkrypcję
- pokazała różnice w aktywności transporterów Cdr1p i Cdr2p pod wpływem glukozy
- stwierdziła zwiększenie aktywności Cdr1p pod wpływem mannozy
- stwierdziła, że niekompetycyjny inhibitor Cdr1p, enniatyna hamował wyrzut sondy diS-C₃(3) z komórek a nie hamowały go leki azolowe znane substraty transporterów ABC

- inny związek z tej grupy, beauwerycyna hamował oba transportery Cdr1p i Cdr2p

Doktorantka przebadala też grupę 12 związków styrylochinolinowych pod kątem hamowania obu transporterów. Działanie hamujące aktywność transporterów powiązała z budową strukturalną badanych związków. Najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazały związki posiadające dwie grupy hydroksylowe. Związki rozgałęzione zwiększały ilość białka Cdr1p. Trzy związki okazały się substratami dla Cdr1p a dziewięć uwrażliwiało komórki *Candida* na flukonazol. Związek WK86B wykazywał specyficzność tylko wobec transportera Cdr2p. Trzy z badanych związków zostały wyeliminowane z dalszych badań ponieważ wykazywały fluorescencję i wiązały się do błony komórkowej.

Badanie zmian w lokalizacji Cdr1pGFP pod wpływem badanych związków napotkało na trudności w jednoznacznej interpretacji obserwowanego efektu, stwierdzono jednak metodą Western blot, że niektóre związki podnoszą poziom białka Cdr1p w komórce ale stosowanie ich z flukonazolem i tak hamuje działanie pomp.

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w dwóch artykułach w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology*.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka otrzymała dużo bardzo interesujących wyników. Doświadczenia ustawione są w doskonały ciąg logiczny pozwalający śledzić tok myślenia Doktorantki prowadzący do rozpracowania wpływu wybranych czynników na aktywność transporterów ABC u *C. albicans*. Wstęp daje dobrą podstawę teoretyczną a dyskusja jest jednocześnie podsumowaniem wyników na tle literatury światowej. Temat jaki realizowała Doktorantka pod opieką pani dr hab. Anny Krasowskiej jest tematem wielkiej wagi ze względu na rosnący problem uogólnionych zakażeń grzybowych i poszukiwanie nowych, skuteczniejszych i mniej toksycznych terapii. Praca ma charakter poznawczy i praktyczny. W wyniku przedstawionych badań powstały dwa zgłoszenia patentowe na kompozycje farmaceutyczne o działaniu przeciwgrzybiczym.

Praca napisana jest starannie, wstęp i dyskusja oparte są na ponad 220 publikacjach. Struktura pracy jest odpowiednia, opracowanie metodyczne bardzo dobre, przedstawione wyniki nie budzą zastrzeżeń, terminologia właściwa i bogate piśmiennictwo. Przedstawiona przez mgr Joannę Szczepaniak praca stanowi oryginalny dorobek naukowy i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w ujęciu ustawy z dnia 18.03.2011r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Dorobek naukowy kandydatki w pełni uzasadnia

nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnioskuje o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Joanny Szczepaniak do publicznej obrony. Jednocześnie zważywszy na duży dorobek publikacyjnej Doktorantki wynikający z rozprawy doktorskiej, aktywność w prezentowaniu wyników pracy na zjazdach w postaci doniesień ustnych i plakatowych oraz dokonane zgłoszenia patentowe wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem



Pytanie do Doktorantki

1. Ciekawe jest, że usunięcie genu *CDR2* nie prowadzi do nadekspresji genu *CDR1*. Ekspresja *CDR1* podnosi się pod wpływem glukozy. Wydaje się, że *CDR1* może być regulowany wspólnie z ekspresją czynników wirulencji. Czy coś wiadomo o wspólnej regulacji ekspresji *CDR1*, *CDR2* wraz z ekspresją adhezyn, tworzeniem strzępek i biofilmu?
2. Czy związki styrylochinolinowe oddziałują na transportery ludzkie?