



Warszawa 28.08.2020r

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

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Jakuba Suchodolskiego pt. „Wpływ ergosterolu na aktywność transportera Cdr1 i wybrane parametry błony plazmatycznej u *Candida albicans*.” wykonanej pod opieką Pani dr hab. Anny Krasowskiej profesora UW.

Celem pracy było określenie roli ergosterolu w funkcjonowaniu transportera Cdr1 i wpływu na stan błon komórkowych u *Candida*.

Aby to zrealizować Doktorant sprecyzował kilka celów pośrednich takich jak: skonstruowanie narzędzia do badań poprzez wykonanie podwójnej delecji genu *ERG11*

określenie wpływu delecji genu *ERG11* na wzrost mutantów także w kombinacji z delecją genu *ERG3*

szczegółową charakterystykę wpływu delecji *ERG11* na profil sterolowy błon i transport steroli a także płynność błon i asymetrię

dalej zaplanował badanie funkcjonowania transportera Cdr1

a na koniec przetestowanie modelu ograniczonego poziomu ergosterolu u *C. albicans* do typowania potencjału przeciwwgrzybowego kombinacji leków

Podjęcie tego tematu ma duże znaczenie praktyczne jako, że szlak syntezy ergosterolu jest jednym z istotnych celów terapii przeciwwgrzybowej związanej z zastosowaniem antybiotyków z grupy azoli hamujących syntezę ergosterolu i polienów bezpośrednio wiążących ergosterol w błonach plazmatycznych. Obserwowana lekooporność szczepów *Candida* dotyczy rosnącej liczby izolatów szpitalnych a jednym z mechanizmów lekooporności jest aktywność transporterów usuwających lek z komórki. Wyniki prac Zespołu prof. Anny Krasowskiej oraz dane literaturowe wskazują na powiązanie aktywności transportera Cdr1 z obecnością ergosterolu w komórce.

Mgr Suchodolski w swojej pracy zamieścił obszerny wstęp opisując skład lipidowy błony komórkowej, jej właściwości fizykochemiczne, szlak syntezy ergosterolu i przemieszczanie ergosterolu w komórkach a także leki przeciwwgrzybowe związane z ergosterolem, jego syntezą i frakcją błonową.

Przedstawił też stan wiedzy na temat oporności wielolekowej u *Candida* związanej z transporterami ABC i MSF. Wszystko to pozwala śledzić pracę doświadczalną przedstawioną w dalszej części rozprawy.

Pierwszym etapem pracy było skonstruowanie szczepu *C. albicans* pozbawionego obu kopii genu *ERG11* a tym samym uniemożliwienie syntezy ergosterolu w tym szczepie. Badanie wrażliwości szczepu na Amfoterycynę B wiążącą się do ergosterolu błonowego oraz azole hamujące aktywność Erg11 (którego nie ma w komórkach mutanta) wykazało spodziewany brak hamowania wzrostu mutanta *erg11Δ/Δ*.

Wykonując badania wzrostu szczepu *erg11Δ/Δ* na pożywkach płynnych Doktorant stwierdził, że mutant nie rośnie na pożywce minimalnej a rośnie na pełnej. Badanie ekspresji genów kodujących enzymy szlaków biosyntezy aminokwasów i nukleotydów metodą RNA-Seq ujawniły możliwość auktotrofii mutanta wobec metioniny, cysteiny, tryptofanu, treoniny, asparaginy, izoleucyny, lizyny oraz uracylu i cytozyny. Uzupełnienie pożywki minimalnej aminokwasami i nukleotydami spowodowało nieznaczny wzrost mutanta na pożywce z uracylem i adeniną.

Jest to bardzo interesujące spostrzeżenie i jednocześnie brakujący element, który umożliwił Doktorantowi wykonanie podwójnej delecji genu *ERG11*.

Dodatkowa mutacja *erg3Δ/Δ* w mutancie *erg11Δ/Δ* nie polepszała wzrostu mutanta.

Dalsza część pracy to wszechstronna charakterystyka mutanta *erg11Δ/Δ* z uwzględnieniem procesów i struktur potencjalnie zależnych od ergosterolu.

Badania zawartości dominujących steroli w błonach pokazały przewidywany obraz nagromadzania lanosterolu w mutancie oraz uruchomienie alternatywnej ścieżki utylizacji lanosterolu.

Badania ekspresji genów szlaku mewalonowego i odnogi sterolowej wskazały na wzmożoną utylizację acetylo CoA w szlaku mewalonowym oraz zwiększenie aktywności odnogi sterolowej (wzrost ekspresji genu *ERG11*) i alternatywnej utylizacji lanosterolu (wzrost ekspresji genu *ERG3*). Badania ekspresji genów w czasie hodowli pokazało, że sterole są syntetyzowane we wczesnych fazach wzrostu *Candida*.

Doktorant stwierdził też, że nadmiar steroli w mutancie może być deacylowany i gromadzony w błonie plazmatycznej. Stwierdził też, że zmieniony obraz steroli w szczepie *erg11Δ/Δ* skutkuje mniejszą płynnością błon od szczepu wyjściowego.

Doktorant precyzyjnie prześledził dalsze losy nagromadzanych steroli. Sprawdził jak są transportowane, gdzie się lokalizują, czy są acylowane, estryfikowane, wyrzucane z komórki. Wszystkie te badania rozpoczął od określenia ekspresji genów kodujących transportery oraz enzymy modyfikujące. Przeanalizował bazę *C. albicans* w poszukiwaniu ortologów stosując odpowiednie sekwencje białkowe *S. cerevisiae*. Stwierdził brak niektórych ortologów białek związanych z estryfikacją steroli.

Doktorant spojrział również szerzej na profil lipidowy oznaczając zawartość frakcji fosfolipidowej słusznie przypuszczając, że komórka pozbawiona ergosterolu może kompensować jego brak zmianą obrazu fosfolipidów i stopniem nasycenia kwasów tłuszczowych. Stwierdził zwiększony stosunek PC/PE co powinno wpływać porządkująco na dwuwarstwę lipidową. Jednak obok zmian stosunku PC/PE zaobserwował także zmiany nasycenia kw. tłuszczowych i dalej różnice w lokalizacji fosfolipidów w monowarstwach.

Wyniki analizy składu fosfolipidowego błon oraz stwierdzona zwiększona ilość aminofosfolipidów w błonach skłoniły Doktoranta do wykonania pomiaru potencjału błonowego. Do tego celu zaadaptował metodę stosowaną do pomiarów potencjału w neuronach i komórkach mięśniowych. Obiecujące wyniki opisano w literaturze także dla *S. cerevisiae*. Badania oparł o fakt, że wnikanie sondy do komórki zależy od potencjału błony a potem jest ona wyrzucana przez transportery. Do pomiaru Doktorant użył sondę di-4-ANEPPS po upewnieniu się, że nie jest toksyczna dla *Candida* i stwierdzeniu, że nie jest ona substratem dla transporterów MDR co upraszcza pomiar. W wyniku pomiaru stwierdzono, że potencjał błonowy mutanta *erg11Δ/Δ* jest niższy niż szczepu dzikiego.

Doktorant bardzo logicznie założył, że obniżony potencjał błon w mutancie może wpływać na stan energetyczny komórki i badając poziom ATP w komórkach mutanta stwierdził, że jest on znacznie obniżony szczególnie w fazie stacjonarnej. Stwierdził też ucieczkę H⁺-ATPazy do wakuoli we wczesnej fazie wzrostu, powiązaną z obniżoną aktywnością ATPazy i wyraźnie niższą ekspresją genu kodującego ten enzym.

Wracając do głównego celu pracy którym było określenie wpływu braku ergosterolu na funkcjonowanie transportera Cdr1, Doktorant zbadał lokalizację, aktywność transportera oraz ekspresję genu *CDR1* w mutancie *erg11Δ/Δ*. Transporter lokalizował się nieprawidłowo w wakuolach, ekspresja genu *CDR1* i ilość białka Cdr1 była znacząco wyższa a jego aktywność wyraźnie niższa. Mimo niskiej aktywności transportera Cdr1, mutant pozostawał bardziej odporny na antybiotyki celujące w syntezę ergosterolu i w sam ergosterol błonowy.

Praca doktorska posiada również aspekt praktyczny. Doktorant zbadał dwie nieoczywiste kombinacje związków przyglądając się efektom ich działania na *Candida*. Do badań wytypował antybiotyk przeciwbakteryjny gentamycynę i kwas kaprynowy który hamuje adhezję komórek *Candida* obniżając ekspresję genów związanych z tym procesem, ponieważ zauważył zwiększoną wrażliwość mutanta *erg11Δ/Δ* na te związki. Zbadał wpływ gentamycyny w kombinacji z flukonazolem na żywotność *Candida*. Okazało się, że gentamycyna hamuje wzrost szczepu *erg11Δ/Δ* i wspomaga działanie hamujące flukonazolu. Okazało się, że gentamycyna powodowała cały szereg zmian w komórce *Candida*. Zwiększała ekspresję genu *ERG11*, zmieniała poziom ergosterolu z bardzo wysokiego obniżała a z niskiego podwyższała a efekt był pogłębiany w skojarzonym działaniu z flukonazolem. Kombinacja gentamycyny i flukonazolu zwiększała stosunek PC/PE. Zwiększała też

ekspresję genu *CDR1* jednak aktywność transportera obniżała co prawdopodobnie wiązało się z rozproszeniem transportera po całej komórce.

Drugą badaną kombinacją to Amfoterycyna B i kwas kaprynowy. Kwas kaprynowy obniżał skuteczność działania Amfoterycyny B. Amfoterycyna B w komórkach inkubowanych z kw. kaprynowym powodowała zmniejszoną przepuszczalność błon dla jodku propidyny mimo, że nie obserwowano zmian wbudowywania Amfoterycyny B do błon. Doktorant stwierdził, że oporność na Amfoterycynę B jest spowodowana zwiększonym poziomem ergosterolu w błonach wywołanym przez kw. kaprynowy. Okazało się też, że przy pewnych stężeniach kw. kaprynowego obserwowana jest wyższa aktywność transportera *Cdr1*.

W dyskusji Doktorant odnosi się do każdego wykonanego eksperymentu i na Rysunku 49 podsumowuje swoje wyniki. Wyniki są przedstawione jasno, dobrze udokumentowane, kolejne doświadczenia stanowią ciąg logiczny i nie pozostawiają wątpliwości, że dane zagadnienie jest rozwiązane do końca i porównane z właściwie zaplanowanymi kontrolami. Doktorant przy tym posłużył się szeregiem metod a niektóre z nich dopracował do użytku w pracy z *Candida*.

Rozprawa przedstawiona do recenzji jest zbiorem bardzo ciekawych i znaczących wyników, które dodatkowo dotyczą niezwykle istotnego problemu mechanizmów lekooporności i dzięki temu poszukiwania nowych kombinacji leków, które zablokują te mechanizmy. Niezwykle istotny problem wzrastającej liczby lekoopornych *Candidoz* wymaga podejmowania wysiłku aby poznać mechanizmy uodparniania się szczepów na dotychczas używane leki. Zespół prof. Anny Krasowskiej może pochwalić się dużymi osiągnięciami w tej dziedzinie.

Rozprawę doktorską mgr Jakuba Suchodolskiego oceniam bardzo wysoko. Daje się zauważyć, że realizowane zadania są przemyślnie i ustawione logicznie poprzedzone niewielkimi wstępami przed omówieniem każdego doświadczenia. Doktorant posługuje się szerokim wachlarzem nowoczesnych metod. Praca zawiera ogromną ilość wyników umieszczonych w 25 tabelach i 49 ilustracjach a do tego jeszcze 9 tabel i 4 ilustracje uzupełniające. Do klarownego opisu podejmowanych w pracy problemów oraz do dyskusji wyników posłużyła obszerna bibliografia licząca 260 pozycji.

Wyniki uzyskane przez Doktoranta zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Suchodolskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ujęciu ustawy z dnia 18.03.2011r o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Dorobek naukowy Doktoranta całkowicie uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych.

Wnioskuje więc do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych UWr o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Jakuba Suchodolskiego do publicznej obrony.

Jednocześnie wnioskuje o wyróżnienie pracy.

W uzasadnieniu pragnę podkreślić nie tylko znakomitą rozprawę doktorską ale też pokaźny dorobek naukowy Doktoranta. Ogółem mgr Jakub Suchodolski jest współautorem 9 publikacji już opublikowanych i 2 następnych wysłanych do druku, 20 doniesień zjazdowych oraz jednego patentu. W dorobku Doktoranta widać też umiejętne łączenie nauk podstawowych z praktyką co zasługuje na uznanie.

Uwagi:

W pracy znalazłam nieliczne błędy językowe jak np.

transport przez błonowy str. 15

inkorporuje

dowodzą tego nie temu str. 136

szczep CAF4-2 charakteryzował się zwiększonymi od szczepu wyjściowego CAF2-1: opornością... produkcją, ekspersją str. 136

dowodzą tego a nie temu str. 136

Ilustracja 25 C brak legendy (co oznaczają poszczególne kolory słupków?).

Nie wpływa to w żaden sposób na moją bardzo wysoką ocenę pracy.

Pytania do Doktoranta

Czy pojawiła się już jakaś informacja na temat powiązania szlaków syntezy ergosterolu i syntezy nukleotydów? Czy Doktorant ma jakieś podejrzenie jak te szlaki się ze sobą wiążą?

Czy wiadomo w jaki sposób stan ściany komórkowej wpływa na wnikanie sondy chodzi o sondę di-4-ANEPPS? Ściana komórkowa zmienia się z wiekiem komórki czy ma to wpływ na wnikanie?

Z poważaniem



prof. dr hab. Joanna Kruszewska