

Prof. dr hab. Joanna Rzeszowska
Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów
Politechnika Śląska
44-100 Gliwice, Akademicka 16

Gliwice, 19.02.2015

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Karoliny Gołąbek „Wybrane molekularne mechanizmy oporności szczepów
Candida albicans na leki azolowe”

1. Tematyka i zakres rozprawy

Tytuł przedstawionej do recenzji rozprawy dobrze oddaje jej zawartość, dotyczy ona poszukiwania mechanizmów oporności niektórych szczepów drożdżakowych na stosowane w terapii leki azolowe. Oporność na te leki jest problemem ważnym w praktyce lekarskiej ponieważ zakażenia drożdżakami o różnym stopniu nasilenia zdarzają się często, a także stanowią czasem poważne powikłania w leczeniu innych schorzeń. Badany w pracy *Candida albicans* jest najbardziej rozpowszechnionym drożdżakiem w środowisku człowieka i stanowi florę fizjologiczną przewodu pokarmowego u mniej więcej połowy populacji ludzkiej. Do jego namnażania i groźnych w skutkach zakażeń dochodzi w sytuacjach kiedy występuje obniżenie odporności organizmu towarzyszące innym chorobom lub przy intensywnej terapii antybiotykowej. Nadmierne namnażanie i grzybica może wystąpić przy tworzeniu przez ten organizm biofilmu m.in. na sztucznych zastawkach, cewnikach a także po dostaniu się do wnętrza organizmu w trakcie zabiegów inwazyjnych. Oporność na leki azolowe które są lekami pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń grzybiczych jest dużą komplikacją a znajomość mechanizmu lub mechanizmów, które leżą u jej podłoża może przyczynić się do rozwoju nowych metod diagnostycznych i terapii.

W pracy Autorka podjęła próbę powiązania zjawiska oporności na leki z mutacjami i zmianami ekspresji niektórych genów kodujących białka uczestniczące w aktywnym transporcie błonowym, oraz genu *ERG11* kodującego demetylazę lanosterolu, na którą leki azolowe działają. Wiele wyników wcześniejszych badań opisywanych w literaturze sugeruje, że białka błonowe kodowane przez wybrane przez Autorkę geny mogą uczestniczyć w usuwaniu leków azolowych z traktowanych nim komórek. Praca wykonana została na 120

uzyskanych z próbek klinicznych, szczepach chorobotwórczych *Candida albicans*, których połowa była oporna na leki azolowe. Autorka postawiła tezę, że oporność w badanych przez nią szczepach może zależeć od zmian w ekspresji wybranych genów, których produkty uczestniczą w usuwaniu leku lub są jego molekularnym celem. W pracy przyjęła metodologię, w której porównywała obecność mutacji, poziomy transkryptów, stopień metylacji cytozyn w DNA między szczepami różniącymi się wrażliwością na leki azolowe a także starała się sprawdzić, które mutacje genu *ERG11* mogą wpływać na poziom jego transkryptu. Rozprawa ma charakter eksperymentalny, jest ukierunkowana na określony ważny cel i prezentuje interesujące podejście do problemu oporności na leki.

2. Ocena zawartości rozprawy

Rozprawa z wszystkimi dodatkami liczy 83 strony, ma klasyczny dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym układ, i mieści się w przeciętnym zakresie objętości prac doktorskich. Jej treść podzielona jest na osiem rozdziałów, obszernego wstępu teoretycznego, zwięźle podanych założeń i celu pracy, szczegółowo opisanych materiałów i użytych metod, opisu wyników, dyskusji i wniosków oraz streszczenia, uzupełnionych spisem piśmiennictwa, wykazami skrótów, tabel i rycin.

We wstępie zawarty został dobry przegląd znanych faktów dotyczących *Candida albicans*, ich cech, tworzonych przez nie form, właściwości stosowanych leków, poznanych dotychczas i sugerowanych mechanizmów oporności na leki a także metod detekcji i rozpoznawania różnych szczepów w diagnostyce medycznej i laboratoriach. Ta część wraz z opisem celu i wykazami rycin i tabel stanowi w przybliżeniu połowę rozprawy. Opis metod w kolejnym, rozdziale rozprawy zwraca uwagę dużą dokładnością i piękną formą, szczególnie bardzo dobrze są przygotowane schematy przebiegu eksperymentów. Wstęp i rozdział opisujący metody są skonstruowane bardzo jasno i logicznie, tak że nawet czytelnik nie zaznajomiony z problematyką czyta go z zainteresowaniem i będzie to dobry materiał dydaktyczny dla kolejnych pokoleń studentów.

Kolejna część dotycząca badań eksperymentalnych rozpoczyna się od analizy RNA pochodzącego ze szczepów opornych i wrażliwych na azole. Metodą PCR zostały zbadane poziomy transkryptów genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* i *ERG11* i wykazano że poziom trzech z tych transkryptów różni się znamienne w szczepach opornych i wrażliwych, a największą różnicę obserwowano w przypadku transkryptu genu *ERG11*. Transkrypt tego genu miał znamienne wyższy poziom w szczepach opornych na leki. W dalszej kolejności Autorka

próbowała sprawdzić czy i które mutacje genu *ERG11*, zaobserwowane w badanych szczepach, mogą korelować z wrażliwością na leki i poziomem transkryptu tego genu. Jest to najciekawszy element rozprawy rzucający światło na mechanizmy regulacji genów uczestniczących w powstawaniu zjawiska oporności. Mutacja genu *ERG11*, która w szczepach badanych w ramach niniejszej rozprawy koreluje z wrażliwością na leki i jednocześnie ze zmianą poziomu transkryptu, to wg Autorki zamiana nukleotydu A na C w pozycji 945 transkryptu, pociągająca zamianę kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy w produkcie białkowym. O ile można stosunkowo łatwo wyobrazić sobie, że zamiana aminokwasu w białku może wpłynąć na funkcję i oddziaływanie tego białka, to nieco trudniej jest znaleźć mechanizm, który wytłumaczyłby zmianę poziomu transkryptu przy zamianie nukleotydu. W opisanym w rozprawie projekcie nie podjęto próby oznaczenia poziomu białka *ERG11*, a poziom ekspresji odnoszony był jedynie do poziomu transkryptu. Poziomy różnych transkryptów wykazują często wahania związane z cyklem komórkowym, dobowym, wiekiem hodowli i różnymi innymi czynnikami a niekoniecznie jest to związane ze zmianą poziomu kodowanego przez nie białka. W rozprawie nie charakteryzowano bliżej hodowli z których izolowany był RNA do oznaczeń a w Dyskusji brakuje mi odniesienia jak Autorka łączy poziom transkryptu z opornością.

W kolejnej części rozprawy zbadany został poziom metylacji DNA w szczepach opornych i wrażliwych na azole. Wyniki tych oznaczeń wskazywały na brak różnic w globalnej metylacji DNA między szczepami różniącymi się wrażliwością na leki. Jest to także istotna informacja dotycząca mechanizmu regulacji genów, chociaż również tu, można było pójść jeden krok dalej i podjąć próbę zbadania metylacji genu *ERG11*, którego transkrypty miały inny poziom w szczepach opornych i wrażliwych. Recenzent rozumie, że badania na poziomie sekwencji nukleotydowej mogą w przypadku *Candida albicans* nastęrczać trudności, ponieważ bazy danych dla tego organizmu są jeszcze nieuporządkowane, występuje w nich po kilka sekwencji referencyjnych podających sekwencję nukleotydową badanego genu (nr identyfikacyjne X13296, XM_711729, XM_711668, NW_139482), które różnią się dość znacznie obecnością nukleotydów w różnych pozycjach. Wydaje się, że *Candida albicans* ma wiele alleli polimorficznych występujących w populacji i trudno nazywać któryś z nich mutacją. Wśród przebadanych przez Autorkę 19 pozycji genu *ERG11* wykazujących tzw. mutacje, 8 rzeczywiście wykazuje zmianę nukleotydu obecnego w sekwencji referencyjnej o numerze X13296 na nukleotyd nie występujący w żadnej innej sekwencji referencyjnej, jedna opisywana zmiana (A354G) jest pomyłką ponieważ nukleotyd A, przyjęty jako forma referencyjna, nie występuje w żadnej z obecnych w bazach danych

wersji sekwencji referencyjnej tego genu. Ważna dla uzyskanych wyników, wymieniana we wnioskach końcowych zmiana G1309A nie odnosi się do sekwencji referencyjnej X13296, bo w niej właśnie występuje nukleotyd A, a w innych sekwencjach referencyjnych G, niemniej niezależnie od nazwy jakiej używa Autorka, jest to różnica w sekwencji występująca między szczepami opornymi i wrażliwymi i jest to ważny wynik.

W rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” większość miejsca zajmuje powtórzenie opisu wyników i opisy tego jakie wyniki uzyskali inni w odniesieniu do tych samych genów (co mogłoby być częścią wstępu) natomiast bardzo mało jest interpretacji wyników i choćby spekulacji jakie mechanizmy mogłyby być związane z poczynionymi przez Autorkę obserwacjami. Rozdział ten jest miejscem, w którym mogłyby znaleźć się spekulacyjne hipotezy, nawet jeśli obecnie trudno je eksperymentalnie udowodnić i szkoda, że interesujące wyniki nie znalazły odzwierciedlenia w głębszej dyskusji ich znaczenia.

3. Wniosek końcowy

Mimo opisanych wyżej niedociągnięć praca wydaje mi się bardzo wartościowa, łączy w sobie badania eksperymentalne i studia literaturowe, ma spore znaczenie poznawcze a jej wyniki dostarczają nowych elementów wiedzy o organizmach odpowiedzialnych za powszechnie występujące zakażenia. Ogólna redakcja pracy, sposób wykorzystania źródeł i opis przeprowadzonych badań oraz otrzymanych rezultatów nie budzą zastrzeżeń, praca napisana jest bardzo starannie, prawie nie zawiera błędów literowych. Moje zastrzeżenia budzi głównie słaba dyskusja.

Reasumując stwierdzam, że wszystkie sformułowane przeze mnie uwagi krytyczne nie mają zasadniczego charakteru a przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi istotny wkład do problematyki zakażeń drożdżakowych i wskazuje kierunki badań które mogą ostatecznie wyjaśnić mechanizmy oporności na leki azolowe. Praca także zawiera dużo wiedzy ogólnej i świadczy o znajomości problemu przez kandydata. W mojej opinii praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie rozprawy mgr Karoliny Gołąbek do publicznej obrony.

