

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

21.02.2024r. Gdańsk

Dr hab. Joanna Nakonieczna, prof. UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej
Antoniego Abrahama 58
80-307 Gdańsk
Tel: (58) 523-63-27
joanna.nakonieczna@biotech.ug.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Sułka
pt. „Przebieg infekcji i modulacja humoralnych mechanizmów odpornościowych *Galleria mellonella* po
zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila*. Identyfikacja nowych związków przeciwbakteryjnych”

Praca została wykonana pod kierunkiem naukowym dr hab. Iwony Wojdy, prof. UMCS w Zakładzie
Immunobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Problem badawczy:

Galleria mellonella, czyli barciak większy, jest bardzo interesującym organizmem, który spełnia kryteria organizmu modelowego. Jest to organizm prosty, łatwy w hodowli, posiada krótki cykl życiowy, dlatego wykorzystywany jest powszechnie, m. in. w badaniach układu immunologicznego. A ze względu na podobieństwo do systemu immunologicznego wyższych organizmów, w tym ludzi, organizm ten jest wykorzystywany jako model zwierzęcy w badaniach mikrobiologicznych, co jest dobrze uzasadnione ze względu na wszystkie cechy wymienione wyżej. Badanie interakcji mikroorganizmów, w tej rozprawie przede wszystkim *Pseudomonas entomophila*, czyli znanego patogenu owadów, może dostarczyć istotnych informacji na temat mechanizmów patogennych drobnoustroju i odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Poznanie przebiegu infekcji bakteryjnej u owadów ma potencjalne implikacje dla zrozumienia mechanizmów odpornościowych w szerszym kontekście, w tym dla ludzi. Ponadto, identyfikacja nowych związków przeciwbakteryjnych może prowadzić do rozwoju skuteczniejszych strategii zwalczania infekcji bakteryjnych, co jest szczególnie ważne w kontekście rosnącej oporności bakterii na wykorzystywane w lecznictwie antybiotyki.

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pana mgr Michała Sułka dotyczy istotnego problemu badawczego i przedstawia wyniki wypełniające lukę w obecnej wiedzy dotyczącej interakcji *P. entomophila* z *G. mellonella*, zwłaszcza w kontekście humoralnych mechanizmów odpornościowych. Ponadto dostarcza nowych informacji na temat potencjalnych związków przeciwbakteryjnych, co uznaję za adekwatną motywację do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Forma rozprawy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma klasyczną dla tego typu opracowań naukowych formę. Napisana jest w języku polskim, składa się z 223 stron, podzielonych na rozdziały: Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Analiza Wyników, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Literatura. Autor zamieścił w pracy wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim wraz ze słowami kluczowymi. W rozprawie Autor zamieścił również informację o opublikowaniu części wyników wraz z podaniem stosownych danych bibliometrycznych oraz informację o finansowaniu badań z dwóch projektów: OPUS NCN, kierowanego przez promotora recenzowanej rozprawy, dr hab. Iwonę Wojdę oraz projektu dla młodych naukowców ze środków Instytutu Nauk Biologicznych UMCS, kierowanego przez dr J. Kordaczuka, który jest również pierwszym równocennym z mgr Michałem Sułkiem współautorem publikacji naukowej, zawierającej część wyników opisanych w recenzowanej rozprawie.

Rozdział "Wstęp" jest długi, ale dzięki zachowanemu logicznemu ciągłowi i spójności poszczególnych jego części, czyta się go bardzo dobrze. Autor na 53 stronach opisał wykorzystany model owadzi, jego układ odpornościowy oraz przebieg zakażenia, wraz z kluczowymi elementami odpowiedzi na zakażenie. Przedstawił również wyczerpująco patogen i jego interakcję z gospodarzem, przede wszystkim w kontekście ewolucyjnym (odniesienia do Darwina, hipotezy Czerwonej Królowej, wraz ze zgrabnym cytatem z oryginału „Alicji w Krainie Czarów”). Autor w sposób szczegółowy opisuje zjawisko pamięci immunologicznej i przedstawia dokładny schemat badania piętnowania immunologicznego. Na szczególną uwagę zasługuje staranność przygotowania rycin i doskonałe opisy, umożliwiające ich analizę bez konieczności szukania w tekście rozprawy. Metody badań opisane zostały w sposób prawidłowy i z pewnością wystarczający do oceny uzyskanych wyników. W tym rozdziale również zwracam uwagę na dużą dbałość Autora o graficzne opracowanie tabel. W kolejnej części "Analiza wyników", autor na 58 stronach opisuje uzyskane wyniki. W przypadku każdego eksperymentu Autor poprzedza właściwy wynik wprowadzeniem, a kończy podsumowaniem, co ułatwia analizę wyników przez czytającego. Sposób graficznego przedstawienia wyników jest niezwykle staranny a ich opis nie pozostawia niedosytu. W 28-stronicowej dyskusji Autor skupił się na omówieniu dotychczasowej wiedzy i skonfrontowaniu jej z uzyskanymi przez siebie wynikami. W moim odczuciu rozdział ten mógłby być skrócony, bez straty dla jakości całego rozdziału. Autor mógłby pominąć niektóre fragmenty powtarzające wyniki (np. str. 151-152), zastępując je stosownym odnośnikiem do wcześniejszego rozdziału.

Autor kończy rozprawę krótkim rozdziałem Podsumowanie, gdzie podkreśla uzyskane nowe wyniki, a także wskazuje te o charakterze nowatorskim. Za ciekawy uważam pomysł graficznego podsumowania wyników, który dodatkowo je porządkuje i pozwala lepiej zrozumieć.

Dokonanie naukowe:

Doktorant w ramach pracy doktorskiej wyznaczył do realizacji cztery cele, które przedstawił na str. 69, w skrócie: (i) ocena przebiegu zakażenia (iniekcja bakterii do hemocelu), (ii) analiza parametrów odpornościowych gospodarza po zakażeniu, (iii) identyfikacja efektorów odpowiedzi odpornościowej i poszukiwanie nowych związków bioaktywnych i (iv) analiza aktywności nowych związków o charakterze białkowym po infekcji. Wszystkie zaplanowane cele pracy Doktorant zrealizował. Przede wszystkim wyznaczył odpowiednie dawki infekcyjne, tj. niską (10 CFU), wysoką (50 CFU) oraz letalną (500 CFU), do dalszych eksperymentów. Scharakteryzował morfologię oraz obrazy histologiczne tkanek gospodarza po infekcji, a także pokazał, że nawet iniekcja do hemocelu powoduje, że bakterie penetrują jelita owada. Tutaj nasunęło mi się kilka pytań.

1. Która struktura organizmu gospodarza jest kluczowa dla zakażenia? Czy stosowano lub jeśli nie, to jak można zbadać innymi metodami, niż mikroskopia świetlna, obecność bakterii? Czy bakterie były żywe i czy namnażają się w organizmie gospodarza? Czy można ilościowo ocenić liczbę komórek bakteryjnych w gospodarzu *in vivo*? Analizując Ryc. 19 muszę uwierzyć autorowi na słowo, że znajdują się tam bakterie, być może zastosowanie większego przybliżenia dawałoby lepszy obraz.

Po potwierdzeniu infekcji organizmu gospodarza, Autor analizował hemolimfę zakażonych owadów wykazując wzrost (lub zmianę) aktywności enzymów zaangażowanych w procesy odpornościowe, tj. lizozymu i oksydazy fenolowej, wzrost aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy względem *E. coli* i *P. entomophila*. Zidentyfikowaną aktywność Autor skorelował z małymi białkami/peptydami (migrującymi w żelu SDS-PAGE na wysokości <10kDa) i pojawiającymi się wyłącznie u zwierząt zakażonych. Badania te Autor uzupełnił o analizę ekspresji genów, kodujących znane peptydy przeciwdrobnoustrojowe, występujące u *G. mellonella*, wykazując ich podwyższony i zależny od dawki infekcyjnej poziom, co wskazuje na indukcję odpowiedzi odpornościowej.

W kolejnym etapie pracy, Autor wykazał istnienie zjawiska piętnowania immunologicznego w badanym układzie gospodarz-patogen, który objawiał się zwiększoną przeżywalnością osobników *G. mellonella* zakażonych *P. entomophila* po wcześniejszym kontakcie z patogenem. Obserwowane zjawisko piętnowania Autor zidentyfikował w układzie homologicznym (1-sze zakażenie *P. entomophila* vs 2-gie zakażenie *P. entomophila*), ale nie heterologicznym (1-sze zakażenie *P. entomophila* vs 2-gie zakażenie *P. aeruginosa*/B. *thuringiensis*/C. *albicans* lub 1-sze zakażenie *P. aeruginosa*/B. *thuringiensis*/C. *albicans* vs 2-gie zakażenie *P. entomophila*), co wskazuje na wysoce specyficzny charakter zidentyfikowanego zjawiska. Nasunęło mi się pytanie dotyczące tej części wyników:

2. Na jakiej zasadzie Autor dobierał dawki infekcyjne i liczebność grup, ponieważ różniły się one dla każdego doświadczenia.

Stosując analogiczne podejście, jak w przypadku analizy pierwotnej infekcji, tj. pomiar (i) aktywności lizozymu i oksydazy fenolowej, (ii) aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy, analiza (iii) profili białkowych hemolimfy oraz (iv) względnego poziomu ekspresji genów zaangażowanych w procesy odpornościowe owadów, Autor porównał organizmy piętnowane z tymi niepoddanymi piętnowaniu immunologicznemu. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazały na wyższą i szybciej pojawiającą się aktywność przeciwdrobnoustrojową hemolimfy owadów piętnowanych w stosunku do niepiętnowanych, a także korelację z szybciej pojawiającymi się białkami/peptydami o masie <10 kDa u owadów piętnowanych. Obserwacje te miały potwierdzenie w badaniu ekspresji genów kodujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe, w szczególności galleriomycyny, hemoliny i cekropiny.

3. Dlaczego do analizy pierwotnej infekcji pobierano próbki w czasie 4 godz. i 8 godz., natomiast w czasie badania piętnowania 3 godz. i 6 godz. Oraz czemu mierzony poziom ekspresji genów różni się w przypadku obserwowanej 'krotności' (por. dane Ryc. 33 vs Ryc. 25), szczególnie dla cekropiny i galleriomycyny.

Naturalna konsekwencja uzyskanych przez Doktoranta ciekawych obserwacji była próba identyfikacji białek/peptydów zaangażowanych w reakcję odpornościową. Stosując metodę RP-HPLC (wskazana przez Autora współpraca naukowa) Autor zanalizował uzyskane po rozdziale hemolimfy chromatogramy, identyfikując te frakcje, których wielkość ulegała zmianom pomiędzy grupami: owady zakażone vs niezakażone, piętnowane vs niepiętnowane. Wykorzystując klasyczną metodę sekwencjonowania białek

(degracja Edmana) Autor zidentyfikował kilkanaście białek, głównie peptydów odpornościowych, które pojawiały się w hemolimfie owadów po infekcji lub takich białek, których ilość po infekcji rosła, co wskazywało na ich udział w zjawisku piętnowania immunologicznego, czy też zwiększonej przeżywalności po ponownym kontakcie z patogenem, np. lizozym, peptyd prolinowy-1, peptyd prolinowy-2 czy anhidraza węglanowa.

Na szczególną uwagę zasługuje ta część badań, która pokazuje nowe związki białkowe o potencjalnym znaczeniu w odporności *G. mellonella*, czyli peptyd kazalowy Pr13a, białko homeoboksowe 5-podobne, czy też inhibitor proteaz serynowych IPSD. Autor scharakteryzował poziomy ekspresji genów kodujących wymienione białka, wykazując w głównej mierze wzrost poziomu ekspresji badanych genów po infekcji, a następnie badał właściwości oczyszczonych preparatów białkowych pod kątem aktywności inhibitorowej względem znanych proteaz serynowych, wykazując takową jedynie dla białka IPSD. Z kolei każde z analizowanych białek wykazało się właściwością redukcji liczby żywych bakterii do poziomu ok 40% po 60-minutowej inkubacji z badanymi białkami. Nie jest to zatem efekt silnie bakteriobójczy, natomiast efekt biologiczny jest znaczący. Uzupełnieniem zaobserwowanego efektu redukcji liczby kolonii bakteryjnych było badanie struktury powierzchni komórek bakteryjnych, której zmiany Autor obserwował stosując mikroskopię sił atomowych.

Poproszę Doktoranta o wyjaśnienie, czemu w przypadku analizy mikroskopowej AFM zastosowano trzy kontrole, które są takie same: *P. entomophila* + H_2O , czy nie wystarczyła jedna wraz z obrazami komórek traktowanych poszczególnymi białkami. Na ile wyniki komórek kontrolnych A, B, C (Ryc. 41) można ze sobą porównać, a następnie porównać z komórkami traktowanymi badanymi białkami?

Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że mgr Michał Sułek wykazał się ogólną wiedzą z dziedziny nauk biologicznych, a przeprowadzone i opisane przez niego analizy oraz zinterpretowane wyniki wskazują, że jest samodzielnym naukowcem, przygotowanym do prowadzenia prac badawczych. Zastosowanie szeregu technik z dziedziny histologii, biochemii, bioinformatyki, biologii molekularnej, a także umiejętność nawiązywania współpracy w obszarach, w których Doktorant nie jest ekspertem, wskazuje na jego dojrzałość naukową.

Podsumowując stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktoranta stanowią istotny i oryginalny wkład naukowy w zakresie prezentowanej tematyki badawczej. Doktorant osiągnął wszystkie zamierzone cele. Pozytywnie oceniam wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy i osiągnięcia naukowego w niej opisanego, w szczególności za cenne uważam zidentyfikowanie czynników biorących udział w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* na zakażenie *P. entomophila*, a także scharakteryzowanie ich własności biochemicznych. Na istotną uwagę zasługuje fakt, że uzyskane przez mgr Michała Sułkę wyniki mają wysoki potencjał aplikacyjny. W mojej opinii przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki stawiane tego typu opracowaniom wymaganym do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej o dopuszczenie mgr Michała Sułkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Joanna Nakonieczna