

Kraków, 5 maja 2019

Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Emerytowany profesor zwyczajny Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
barbara.plytycz@uj.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr SYLWII KARINY STĄCZEK
„Indukcja odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella* przez α -1,3-
glukan wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger*”**

Zespół Zakładu Immunobiologii UMCS od lat wykorzystuje gąsienice barciaka większego, *Galleria mellonella* zainfekowane wybranymi gatunkami bakterii lub grzybów do badania interakcji gospodarz-patogen, przez analizę reakcji odpornościowych owada i czynników wirulencji patogenów. Pracując w tym Zakładzie, Pani mgr Sylwia Karina Stączek stopniowo poznawała rozmaite aspekty tych interakcji, a jej wkład w poszczególne osiągnięcia Zespołu był na tyle duży, że od roku 2012 zaowocował współautorstwem dziewięciu artykułów rejestrowanych w bazie PubMed, wśród których są zarówno oryginalne prace naukowo-badawcze jak i artykuły przeglądowe (wykaz poniżej).

1: Zdybicka-Barabas A, **Stączek S**, Pawlikowska-Pawłęga B, Mak P, Luchowski R, Skrzypiec K, Mendyk E, Wydrych J, Gruszecki WI, Cytryńska M. Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cecropin D with living bacterial cells. *Amino Acids*. 2019 Feb;51(2):175-191. doi: 10.1007/s00726-018-2641-4. Epub 2018 Aug 30. PubMed PMID: 30167962.

2: **Stączek S**, Grygorczuk K, Zdybicka-Barabas A, Siemińska-Kuczer A, Vertyporokh L, Andrejko M, Wojda I, Cytryńska M. [Different faces of phenoloxidase in animals]. *Postepy Biochem*. 2017;63(4):315-325. Polish. PubMed PMID: 29374432.

3: Siemińska-Kuczer A, Vertyporokh L, Andrejko M, Wojda I, **Stączek S**, Zdybicka-Barabas A, Grygorczuk K, Cytryńska M. [Metalloproteases and their inhibitors: role in pathogenesis of selected examples]. *Postepy Biochem*. 2017;63(4):269-276. Polish. PubMed PMID: 29374428.

4: Stączek S, Zdybicka-Barabas A, Mak P, Sowa-Jasiłek A, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Suder P, Wydrych J, Grygorczuk K, Jakubowicz T, Cytryńska M. Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipoprotein III during immune response against different pathogens. *J Insect Physiol*. 2018 Feb - Mar;105:18-27. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.12.009. Epub 2017 Dec 28. PubMed PMID: 29289504.

- 5: Sowa-Jasiłek A, Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Wydrych J, Skrzypiec K, Mak P, Deryło K, Tchórzewski M, Cytryńska M. *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells. *Microbiol Res*. 2016 Dec;193:121-131. doi: 10.1016/j.micres.2016.10.003. Epub 2016 Oct 14. PubMed PMID: 27825480.
- 6: Zdybicka-Barabas A, Sowa-Jasiłek A, Stączek S, Jakubowicz T, Cytryńska M. Different forms of apolipophorin III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides*. 2015 Jun;68:105-12. doi: 10.1016/j.peptides.2014.12.013. Epub 2015 Jan 9. PubMed PMID: 25579437.
- 7: Sowa-Jasiłek A, Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Wydrych J, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides*. 2014 Mar;53:194-201. doi: 10.1016/j.peptides.2014.01.012. Epub 2014 Jan 25. PubMed PMID: 24472857.
- 8: Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Mak P, Skrzypiec K, Mendyk E, Cytryńska M. Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1828(6):1449-56. doi: 10.1016/j.bbame.2013.02.004. Epub 2013 Feb 16. PubMed PMID: 23419829.
- 9: Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Mak P, Piersiak T, Skrzypiec K, Cytryńska M. The effect of *Galleria mellonella* apolipophorin III on yeasts and filamentous fungi. *J Insect Physiol*. 2012 Jan;58(1):164-77. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.11.003. Epub 2011 Nov 9. PubMed PMID: 22100292.

Żadna z wymienionych publikacji nie weszła w skład rozprawy doktorskiej „**Indukcja odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella* przez α -1,3-glukan wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger***”, gdyż w ramach doktoratu Pani mgr S. Stączek podjęła nowe wyzwanie. Głównym osiągnięciem doktorantki jest eleganckie wykazanie, że **α -1,3-glukan jest nie tylko determinantą antygenową grzyba *A. niger* indukującą odpowiedź immunologiczną gąsienicy, jak to zapowiada tytuł, lecz jest również czynnikiem wirulencji grzybów odpowiedzialnym za opóźnianie reakcji komórkowych i humoralnych owadów**. Wynik ten skłania do weryfikacji wcześniejszych poglądów, jakoby α -1,3-glukan jedynie maskował w ścianie komórkowej drożdży β -1,3-glukan, będący głównym wzorcem molekularnym (PAMP) tych patogenów rozpoznawanym przez receptory (PRR) gospodarza.

Całą rozprawę cechuje logiczny układ i precyzja, co uwidacznia się już w starannie rozplanowanym graficznie SPISIE TREŚCI (str. 4-6). WYKAZ SKRÓTÓW zawiera aż 102 pozycje (str. 7-10). STRESZCZENIE i SUMMARY (str. 11-16) trafnie ukazują tło i główne cele badań, a następnie istotę stosowanych metod, główne wyniki i wpływające z nich wnioski.

Dużą część rozprawy stanowi doskonale napisany WSTĘP (str. 17-66) podzielony na trzy podrozdziały (I.1. Wykorzystanie *Galleria mellonella* jako organizmu modelowego; I.2. Odpowiedź odpornościowa owadów; I.3. Grzyby jako czynniki chorobotwórcze), z piętnastoma instruktywnymi rycinami.

Głównym CELEM pracy (Rozdział II, str. 67-68) było prześledzenie reakcji układu odpornościowego gąsienic *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu wyizolowanego ze ściany komórkowej *A. niger*. W toku całej pracy reakcje te odnoszono do odpowiedzi na zarodniki *A. niger* i/lub laminarynę (β -1,3/1,6 glukan). W rozdziale tym wypunktowano również szczegółowe cele pracy, z których każdy znalazł swoje rozwinięcie w ANALIZIE WYNIKÓW.

MATERIAŁ I METODY (Rozdział III, str. 69-99) to rozdział znakomity z dydaktycznego punktu widzenia, gdyż Autorka zwięźle przybliżyła słownie lub przy użyciu ilustracji (ryc. 16-24) istotę każdej metody, choć Rycina 16 mogłaby też trafić do WYNIKÓW a Ryc. 24 do WSTĘPU. Bardzo trafne i czytelne są też trzy Tabele. Imponujące jest spektrum nowoczesnych metod badawczych, którymi dysponuje zespół zarówno w obrębie własnej placówki, jak i w ramach współpracy z innymi jednostkami.

Trzon rozprawy stanowi rozdział IV- ANALIZA WYNIKÓW (str. 100-148; Ryc. 25-53; Tabele 4-6). W pierwszej kolejności (IV.1) oceniono przeżywalność i zmiany morfologii (stopień melanizacji) gąsienic po podaniu α -1,3-glukanu, zarodników *A. niger* lub laminaryny i wybrano dawki odpowiednie do dalszych doświadczeń. Wśród badanych czynników humoralnych (podrozdział IV.2) - podanie α -1,3-glukanu wyzwało aktywność przeciwwgrzybową i przeciwbakteryjną w hemolimfie gąsienic, co – na profilach białek i peptydów hemolimfy – korespondowało z pojawieniem się nowych prążków peptydowych. Peptydy te zidentyfikowano i przeanalizowano ich poziom w hemolimfie i w cieple tłuszczowym. Szczególnie wydatny był wzrost ekspresji genów peptydów przeciwwgrzybowych, galiomycyny i gallerimycyny. W hemolimfie odnotowano też wzrost poziomu lizozymu, po jego krótkotrwałym spadku wkrótce po immunizacji α -1,3-glukanem, zarodnikami *A. niger* i laminaryną.

Dużo uwagi poświęcono pomiarom w hemolimfie gąsienic aktywności oksydazy fenolowej, enzymu kluczowego w procesie melanizacji, wspomagającej unieszkodliwienie ciał obcych. Enzym ten jest uaktywniany nawet przez iniekcje wody lub DMSO. W tym ostatnim przypadku jego aktywność zanika dopiero po 72 godzinach, natomiast po iniekcji

laminaryny aktywność ta jest zahamowana już po ośmiu godzinach, a podanie zarodników *A. niger* hamuje ją zarówno po ośmiu godzinach jak i wkrótce po iniekcji, tj. po 15 i 30 minutach. Najbardziej jaskrawa różnica dotyczy jednak gąsienic immunizowanych α -1/3-glukanem, gdyż wczesne zahamowanie aktywności enzymu trwało prawie dwie godziny (szkoda, że pomysłowych Rycin 41 i 42 nie udało się zmieścić na jednej stronie). Ten wątek szeroko rozbudowano w dyskusji.

W przeciwieństwie do czynników wcześniej wyliczonych, w hemolimfie immunizowanych gąsienic nie ulegał zmianie poziom apolipoforyny III, natomiast wykryto zmiany jej immunolokalizacji w hemocytach po iniekcji α -1,3-glukanu w stosunku do obrazów hemocytów gąsienic zainfekowanych zarodnikami grzyba.

W ramach badania odpowiedzi komórkowej (podrozdział IV.3) – przeanalizowano fluktuacje liczby i składu hemocytów hemolimfy oraz formowanie nodułów w hemocelu, pojawiających się u gąsienic immunizowanych DMSO, a szczególnie licznych po iniekcji α -1/3-glukanu. W tym ostatnim przypadku, po 24 godzinach noduły podlegały wyraźnej melanizacji. **Warto w trakcie obrony przedyskutować tę pozorną sprzeczność z wynikami dotyczącymi aktywności oksydazy fenolowej.**

Osobny podrozdział (IV.4) poświęcono identyfikacji białek oddziałujących z α -1,3-glukanem *A. niger*, które okazały się być podobne do zestawu białek wiążących β -1,3-glukan u *G. mellonella* i u innych motyli.

DYSKUSJA (Rozdział V, str. 148-168) zawiera wnikliwą analizę wszystkich otrzymanych wyników, które wskazują na to, że α -1,3-glukan ściany komórkowej *A. niger* pełni podwójną rolę. Po wnikięciu do komórki gospodarza prowadzi do aktywacji reakcji odpornościowych, zatem może być zaliczany, obok β -1,3-glukanu, do cząsteczek PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) tego grzyba, stanowiących determinanty antygenowe wiązane przez wyspecjalizowane białka PRR gospodarza (*pattern recognition receptors*). Z drugiej strony – odgrywa on rolę czynnika wirulencji, hamując pewne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej gospodarza, między innymi układ oksydazy fenolowej, i umożliwiając rozprzestrzenianie się patogenu.

Od lat uważa się, że β -1,3-glukan może służyć do nieswoistego wspomagania odporności przeciwgrzybowej i w weterynarii stosuje się go jako swoistą ‘szczepionkę’ dodawaną do paszy ssaków i ryb. **Ciekawe, czy i jaką rolę pełniłby w takim układzie α -1,3-glukan?**

Po DYSKUSJI następuje rozdział VI, PODSUMOWANE I WNIOSKI.

PODSUMOWANIE obejmuje siedem punktów (str. 169), a WNIOSKI – trzy punkty (str. 170), a rozdział VII, LITERATURA zawiera aż 435 pozycji. Pracę wieńczy SPIS 54 RYCIN (str. 209-211) i 6 TABEL (str. 212).

ROZPRAWA DOKTORSKA Pani Sylwii Kariny Stączek jest przygotowana niezwykle starannie i czyta się ją z prawdziwą przyjemnością. Z obowiązku recenzenta starałam się wyłapywać usterki i znalazłam ich bardzo niewiele. Na str. 61, wiersz 7 od dołu, powinno być 'syntaz' (zamiast 'syntez'). Na str. 110, linijka 7 od dołu: powinno być 'liczba' (zamiast 'ilość').

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do zaopiniowania **rozprawa doktorska „Indukcja odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella* przez α -1,3-glukan wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger*”** spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dn. 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. (poz. 1586) i zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie **Pani mgr SYLWII KARINY STĄCZEK** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Stawiam też wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.**

Barbara Płytycz