

Kraków, 5 maja 2019

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

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr ANNY SIEMIŃSKIEJ-KUCZER
„Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic *Galleria mellonella* po
zakażeniu bakterią *Pseudomonas aeruginosa*”

Od lat głównym modelem badawczym Zakładu Immunobiologii UMCS są larwy barciaka większego, *Galleria mellonella*, eksperymentalnie zakażane patogenami w kontrolowanych warunkach zewnętrznych. Tym razem patogenem jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to patogen oportunistyczny współodpowiedzialny za zakażenia szpitalne, często izolowany z trudno gojących się ran, będący czynnikiem etiologicznym stopy cukrzycowej, czy zakażeń rogówki. Śmiertelność osób zakażonych tą bakterią wiąże się z jej opornością na wiele antybiotyków, zatem nowoczesne strategie zmierzają do opracowania alternatywnych terapeutyków, wśród nich zastosowania owadzych peptydów odpornościowych. Badania zespołu z Zakładu Immunobiologii UMCS mają zatem nie tylko charakter czysto poznawczy, lecz mogą stać się zaczątkiem badań wdrożeniowych.

Pani mgr Anna Siemińska (potem Siemińska-Kuczer) jest już współautorką czterech publikacji Zespołu, wymienionych poniżej w porządku chronologicznym, z których wątki pojawiły się w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej.

Andrejko M., **Sieminska A.** The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae. ISJ, 2017; 13: 269-280.

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.

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.

Andrejko M, **Siemińska-Kuczer A**, Janczarek M, Janik E, Bednarczyk M, Gagoś M, Cytryńska M. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability. Acta Biochim Pol. 2019 Mar 4;66(1):91-100. doi: 10.18388/abp.2018_2741. PubMed PMID: 30831574.

Publikacje te nie są integralną częścią doktoratu, zatem rozprawa doktorska Pani mgr Anny Siemińskiej-Kuczer, obejmująca 172 strony maszynopisu, przygotowana jest w sposób tradycyjny. Po spisie treści znajdujemy rozwinięcie 46 stosowanych w niej skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, a następnie obszerny WSTĘP (str. 15-47) zawierający charakterystykę *Pseudomonas aeruginosa* jako patogenu oportunistycznego, ze szczególnym uwzględnieniem czynników wirulencji, w tym enzymów proteolitycznych. Dużą część WSTĘPU stanowi opis *Galleria mellonella* jako modelu badawczego w badaniach patogenności drobnoustrojów, z uwzględnieniem odpowiedzi komórkowej i humoralnej, z naciskiem na peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe w szczególności te, które będą analizowane w trakcie pracy eksperymentalnej.

Rozdział ten prowadzi do jasnego sformułowania CELÓW PRACY (str. 48-49), którymi była identyfikacja i analiza poziomu peptydów przeciwdrobnoustrojowych pojawiających się w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych szczepem entomopatogennym lub izolatem klinicznym *P. aeruginosa* albo poddanych iniekcji proteazy alkalicznej, będącej czynnikiem wirulencji tego patogenu.

Rozdział MATERIAŁY I METODY STOSOWANE W BADANIACH (str. 50-71) obejmuje cztery podrozdziały. Trzy pierwsze to wykaz i pochodzenie odczynników, buforów i drobnoustrojów stosowanych w pracy. Czwarty podrozdział obejmuje 28 podpunktów dotyczących hodowli owadów i bakterii, sposobów immunizacji gąsienic oraz analizy pobranych z nich próbek hemolimfy pod względem aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwwgrzybowej, w tym aktywności typu lizozymu i oksydazy fenolowej; aktywności enzymatycznej mierzonej techniką zymografii i bioautografii in situ; analizy jakościowej i ilościowej peptydów i białek hemolimfy.

ANALIZA WYNIKÓW (str. 72-121) podzielona jest na podrozdział dotyczący humoralnej odpowiedzi gąsienic *G. mellonella* na zakażenie szczepem entomopatogennym lub klinicznym *P. aeruginosa*, oraz podrozdział o roli proteazy alkalicznej *P. aeruginosa* w indukowaniu i przełamaniu odpowiedzi humoralnej gąsienic.

Wyniki otrzymane metodą dyfuzji radialnej, zaprezentowane na bardzo czytelnych wykresach ukazują, że zarówno hemolimfa jak i – w mniejszym stopniu - ekstrakt hemolimfy

gąsienic zakażonych szczepem entomopatogennym lub klinicznym indukuje bardzo silną aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, a niższą, lecz wciąż istotną, przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, w obu przypadkach istotną już po ośmiu godzinach od zakażenia, podczas gdy aktywność typu lizozymu jest istotna dopiero po 15 godzinach. Również aktywność przeciwgrzybowa hemolimfy jest istotna po 15 i 18 godzinach, natomiast w przypadku ekstraktu pojawia się ona dopiero po 18 godzinach od zakażenia. Te wyniki sugerują pewien stopień specyfiki reakcji, badanej względem hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych lub nakłutych igłą. Aktywność przeciwbakteryjną potwierdzono metodą bioautoradiografii *in situ*.

W profilach białkowo-peptydowych hemolimfy zakażonych gąsienic zidentyfikowano kilka białek i peptydów i wykazano albo zróżnicowaną kinetykę ich aktywność, lub stabilność ich poziomu w stosunku do hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych lub nakłutych igłą, co zilustrowano na bardzo czytelnych wykresach.

W trakcie realizacji drugiego celu badawczego doktorantka skoncentrowała się na enzymie zewnątrzkomórkowym *P. aeruginosa*, alkalicznej proteazie, której wysokie dawki powodują śmiertelność gąsienic, natomiast po dawce 0,8 mikrograma przeżywa prawie 100% gąsienic w ciągu 72-godzinne go eksperymentu. Wykazano, że enzym ten wykazuje unikatową zdolność do renaturacji, którą wykorzystano w pomysłowym eksperymencie. Gąsienicom podawano albo oczyszczoną alkaliczną proteazę, albo zabite termicznie bakterie *P. aeruginosa* i monitorowano poziom aktywności fenoloksydazy w hemolimfie. W obu przypadkach okazało się, że aktywność mierzona spektrofotometrycznie była po ośmiu godzinach statystycznie wyższa, niż w grupach kontrolnych i pozostawała na wysokim poziomie w hemolimfie gąsienic potraktowanych martwymi bakteriami, natomiast powracała do poziomu kontrolnego w hemolimfie gąsienic zawierającej renaturowany enzym, czyli aktywną proteazę alkaliczną *P. aeruginosa*. Sugeruje to, że proteaza alkaliczna hamuje aktywność oksydazy fenolowej przez co utrudnia odpowiedź organizmu przeciw patogenowi i podjęto próby wyjaśnienia mechanizmów tego zjawiska.

Stosując ten sam schemat eksperymentu (podanie gąsienicom zabitych bakterii lub oczyszczonej proteazy alkalicznej) porównano aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową hemolimfy. Okazało się że podanie enzymu w niewielkich dawkach wydłuża aktywność skierowaną przeciwko patogenom w stosunku do tej indukowanej przez bakterie zabite termicznie. Przeanalizowano też profile białek i peptydów hemolimfy gąsienic poddanych działaniu alkalicznej proteazy. Rezultaty cyklu eksperymentów prowadziły do

wniosku, że alkaliczna proteaza *P. aeruginosa* nie tylko inicjuje reakcje immunologiczne organizmu, związane z pojawieniem się peptydów przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych, lecz również ‘przełamuje’ (spowalnia, wydłuża) odpowiedź humoralną gąsienic *G. mellonella*, być może między innymi przez hamowanie energetycznie kosztownego procesu melanizacji. (Osobiście mam wątpliwości co do używanego w pracy terminu ‘przełamania’ odpowiedzi odpornościowej, lecz jest to sprawa do dyskusji).

Dwa wątki pracy wyróżniono też w DYSKUSJI (str. 122-134), w której wyodrębniono indukcję białek i peptydów odpornościowych po zakażeniu gąsienic bakteriami *P. aeruginosa*, a oddzielnie omówiono efekt działania proteazy alkalicznej jako czynnika wirulencji tej bakterii, w obu przypadkach nawiązując do sytuacji opisanych w innych układach gospodarz-patogen, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności szczepu klinicznego w organizmie człowieka.

WNIOSKI z pracy (str. 135-137) zawarto aż w dwunastu punktach, co można potraktować jako PODSUMOWANIE WYNIKÓW, natomiast WNIOSKOM należy nadać formę bardziej syntetyczną.

LITERATURA (str. 138-165) obejmuje 278 pozycji piśmiennictwa (w tym 7 stron internetowych), po której następuje SPIS 50 RYCIN i 7 TABEL.

Większość tekstu napisana jest potoczystym stylem, który czyta się z przyjemnością, są jednak fragmenty wymagające korekty, więc – z obowiązku recenzenta – wyliczę niektóre usterki.

Termin ‘immunoblotting’ wszedł już na stałe do polskojęzycznej literatury fachowej, więc nie ma powodu wprowadzania apostrofu w dopełniaczu, jak to Autorka zrobiła zarówno na stronie 97 i w podpisie Ryc. 29 (str. 98), jak i w STRESZCZENIU na stronie 9, pisząc „Alkaliczną proteazę oczyszczono ... i potwierdzono jej obecność ... metodą LC-MS-Ms/Ms oraz metodą immunoblotting’u”. Natomiast, przy pierwszym pojawieniu się zawilego akronimu LC...MS/MS, metody opisanej dopiero na stronie 56, nadal bez wyjaśnienia pochodzenia skrótów, należałoby rozkodować jego znaczenie, odwołując się do chromatografii cieczowej (*LC-liquid chromatography*) i spektrometrii masowej (*MS – mass spectrometry*), jak to zrobiono we WSTĘPIE w odniesieniu do profenolooksydazy (proPO), oksydazy fenolowej (PO), czy enzymu aktywującego profenolooksydazę (czy profenolooksydazę?) (PPAE, ang. *prophenoloxidase activating enzyme*).

W kilku miejscach, zapewne w pośpiechu, nie dopracowano stylu. Jako przykład posłuży fragment zdania ze strony 27: „... wykazano pozytywną korelację między odpowiedzią gospodarza a wirulencją w modelach ssaków oraz bezkręgowców wielu drobnoustrojów, w tym *P. aeruginosa*, *S. aureus*...”.

Błąd wkraść się w Ryciny 42 i Ryc. 43 (str. 112 i 113). W podpisach obu rycin Autorka pisze, że „Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności..”, podczas gdy gwiazdek nie ma na tych rycinach, a istotność różnic oznaczono brakiem wspólnych liter.

W trakcie lektury pracy najbardziej zaintrygował mnie wątek zdolności do renaturacji inaktywowanej termicznie proteazy alkalicznej i chętnie posłucham zdania doktorantki na temat ewolucyjnego znaczenia takiego zjawiska.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do zaopiniowania **rozprawa doktorska „Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic *Galleria mellonella* po zakażeniu bakterią *Pseudomonas aeruginosa*”** 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 ANNY SIEMIŃSKIEJ-KUCZER** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Płytycz