Dr. hab. Elżbieta Czarniewska, prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt

Poznań, 7 marca 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Jakuba Kordaczuka

Pt. „Interakcja *Galleria mellonella* z bakterią entomopatogenną *Pseudomonas entomophila*. Związki bioaktywne w hemolimfie zakażonych owadów"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Jakuba Kordaczuka została wykonana pod kierunkiem dr hab. Iwony Wojdy, prof. UMCS w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Badania były realizowane w ramach projektu badawczego NCN: projekt OPUS2020/37/B/NZ6/00167 pt. „Związki bioaktywne w reakcji odpornościowej *Galleria mellonella* zakażonej bakterią entomopatogenną *Pseudomonas entomophila*. Modulacja reakcji odpornościowej w piętnowaniu immunologicznym", którego kierownikiem jest dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS oraz w ramach projektu badawczego pt. „Analiza ekspresji genów kodujących nowoodkryte polipeptydy larw barciaka większego *Gallieria mellonella* w przebiegu infekcji bakteriami *Pseudomonas entomophilla*" przyznanego mgr. Jakubowi Kordaczukowi w konkursie na projekty badawcze dla młodych naukowców w macierzystym Instytucie. Część wyników przedstawionych w ocenianej rozprawie została opublikowana w 2022 r. w czasopiśmie Scientific Reports i Doktorant jest pierwszym autorem tego artykułu (Scientific Reports 2022, 12(1), e11737).

Owady, w odróżnieniu od kręgowców, nie wykształciły mechanizmów odporności nabytej. Powszechnie uważa się, że ewolucyjny sukces owadów jest wynikiem wysokiej efektywności ich wrodzonych mechanizmów odporności. U tych zwierząt pierwszą linię obrony przed wniknięciem patogenów do organizmu stanowią złożona morfologicznie i biochemicznie bariera integumentu, wyścielona kutikulą ściana przedniego i tylnego jelita, błona perytroficzna jelita środkowego oraz wyścielona kutikulą ściana tchawek. Po uszkodzeniu bariery ochronnej i wniknięciu patogenów do hemocelu owada dochodzi do zakłócenia homeostazy, uruchamiane są mechanizmy prowadzące do rozpoznania czynnika zakaźnego i zapoczątkowania reakcji odpornościowej, która obejmuje komórkową oraz konstytutywną i indukowaną humoralną odpowiedź immunologiczną. Niezwykle istotnym aspektem badań w zakresie immunologii owadów jest więc poznawanie złożonych interakcji gospodarz-patogen, podczas których system obrony przed zakażeniem gospodarza ewoluuje tak aby jak najefektywniej przełamywać zdolności adaptacyjne patogenu, natomiast z drugiej strony patogen dąży do efektywnego przełamania zdolności obronnych gospodarza. Poznanie toczonych nieustannie przez gospodarza i patogeny „działań wojennych" stanowi wyzwanie dla badaczy zgłębiających to zagadnienie i równocześnie daje możliwość odkrywania nowych

molekularnych mechanizmów obrony przed patogenami oraz odkrywania nieznanych dotąd bioaktywnych cząsteczek zaangażowanych w reakcje odpornościowe, które ze względu na szerokie spektrum działania na patogenne mikroorganizmy mogą znaleźć zastosowanie w medycynie bądź stanowić punkt wyjścia do opracowania efektywnych bioinsektycydów. Pan mgr Jakub Kordaczuk podjął to wyzwanie o czym świadczy przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska, której jest autorem.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Kordaczuka posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych, liczy ogółem 180 stron, zawiera obszerny spis piśmiennictwa dobrze korespondującego z tematyką rozprawy, wykaz skrótów, spis tabel i rycin ilustrujących w przeważającej liczbie (22 ryciny) wyniki z eksperymentów wykonanych przez Doktoranta oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca jest napisana językiem poprawnym i zrozumiałym. Treść pracy jest tematycznie spójna, podzielona na rozdziały i podrozdziały właściwie do prezentowanych w rozprawie treści. Obszerny wstęp wskazuje na dobre merytorycznie przygotowanie Doktoranta do realizacji badań, zawiera opis zagadnień związanych z celem i częścią doświadczalną pracy. Zawiera charakterystykę modelu badawczego jakim w badaniach immunologicznych jest barciak większy, *Galleria mellonella* oraz charakterystykę bakterii *Pseudomonas entomophila*. Doktorant stopniowo wprowadza czytelnika w tematykę związaną z mechanizmami odpornościowymi funkcjonującymi u owadów i z zagadnieniami związanymi z interakcją owad-patogen oraz wskazuje na znaczenie entomopatogenów w projektowaniu bioinsektycydów. Cel pracy został przez Doktoranta sformułowany prawidłowo i przejrzyście. Metody napisane są poprawnie, zostały dobrane prawidłowo do postawionych w pracy celów. Ten rozdział ujawnia wysokie kompetencje i bardzo bogaty warsztat metodyczny Doktoranta począwszy od umiejętności prowadzenia hodowli *Galleria mellonella* i wykorzystanych w badaniach mikroorganizmów patogennych poprzez umiejętności zastosowania w badaniach metod elektroforetycznych, chromatograficznych, spektrometrii mass, różnorodnych metod badania biologicznej aktywności oczyszczonych polipeptydów, metod biologii molekularnej, metod mikroskopowych (w tym znajomość techniki mikroskopii sił atomowych) oraz umiejętność nawiązywania współpracy naukowej z innymi badaczami w celu rozwiązania określonych problemów badawczych. Z kolei zaprezentowane przez Doktoranta w sposób spójny i logiczny wyniki badań są dobrze udokumentowane na licznych wykresach i rycinach. W Dyskusji, Doktorant umiejętnie interpretuje własne wyniki z wynikami opublikowanymi przez innych autorów, a także omawia otrzymane wyniki w kontekście wyznaczenia kierunków dalszych badań i możliwości wykorzystania zdobytej wiedzy w praktyce. Prowadzenie przez Doktoranta Dyskusji wyników świadczy o swobodzie z jaką porusza się On w ramach podjętego w rozprawie zagadnienia.

Ocena merytoryczna

Badania przedstawione w rozprawie dotyczą poszerzenia wiedzy odnośnie mechanizmów interakcji owad–bakterie *Pseudomonas entomophila*, w których jako model owadzi wykorzystano larwy *Galleria mellonella*. Wcześniej poznano oddziaływanie tego patogenu z

Drosophila melanogaster i wykazano, że do zakażenia owada *Pseudomonas entomophila* dochodzi drogą pokarmową lub w wyniku uszkodzenia kutikuli. Doktorant w toku badań zrealizował postawione w pracy cele:

1. potwierdził u *Galleria. mellonella* patogenność bakterii *Pseudomonas entomophila* względem owadów i wykazał dawko-zależny spadek przeżywalności larw *Galleria mellonella* po ich zakażeniu bakteriami drogą pokarmową (do dalszych analiz wytypował dwie dawki zakaźne *P. entomophila*: mniejszą i większą)
2. wykazał, że podobnie jak u *Drosophila*, u *Gallieria* bakterie *Pseudomonas entomophila* uszkadzają ścianę jelita, a proces destrukcji jelita pogłębia się wraz z upływem czasu i wzrostem dawki bakterii. Patogen otwiera w jelicie wrota zakażenia i przedostaje się do hemolimfy owada, gdzie indukuje odpowiedź immunologiczną
3. wykrył niskocząsteczkowe polipeptydy w hemolimfie owadów zakażonych niską i wysoką dawką bakterii, przy czym aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie wykazał jedynie w grupie larw zakażonych niską dawką patogenu - Doktorant sugeruje, że brak tej aktywności u larw zakażonych wysoką dawką patogenu jest skutkiem działania czynników wirulencji *Pseudomonas entomophila*
4. potwierdził ten wynik na poziomie molekularnym – Doktorant wykazał, że w wyniku infekcji larw niższą i wyższą dawką bakterii w komórkach jelita i ciała tłuszczowego dochodzi do zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu odpornościowych: genu kodującego cekropinę D, genu kodującego peptyd defensynopodobny, genów kodujących galleriamycynę i galiomycynę, genu kodującego hemolinę oraz genu kodującego lizozym
5. wykrył i zidentyfikował 11 odpornościowych polipeptydów i białek, których stężenie w hemolimfie larw zakażonych bakteriami zmieniała się lub różniła się pomiędzy grupą larw zakażonych niską i wysoką dawką – u larw zakażonych wysoką dawką bakterii wykrył grupę polipeptydów, których stężenie w hemolimfie znacząco spadało w porównaniu z larwami zakażonymi niską dawką bakterii – ten wynik korelował z wcześniejszą obserwacją zmniejszonej aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie larw zakażonych wysoka dawką bakterii
6. odkrył nową przeciwdrobnoustrojową funkcję opisanego wcześniej u owadów peptydu GmCP8 działającego jako opsonina i zaangażowanego w fagocytozę oraz przeprowadził analizę poziomu ekspresji genu kodującego ten peptyd u zarażonych bakteriami larw *Gallieria* w ciele tłuszczowym i jelicie. Udowodnił, że przeciwdrobnoustrojowe działanie GmCP8 związane jest z perforacją błon biologicznych oraz ze zmianą topografii i właściwości nanomechanicznych powierzchni komórek bakterii *Pseudomonas entomophila, Bacillus thuringiensis* i drożdżaka *Candidia albicans,* które zachodzą pod wpływem GmCP8
7. w hemolimfie larw *Galleria* zakażonych bakteriami *Pseudomonas entomophila* zidentyfikował peptyd wiążący feromony, Ebsp3. Wykazał, że stężenie Ebsp3 w hemolimfie zmniejszało się wraz ze wzrostem dawki bakterii oraz przeprowadził analizę poziomu ekspresji genu kodującego Ebsp3 u zarażonych bakteriami larw *Gallieria* w ciele tłuszczowym i jelicie. Doktorant podjął badania nad mechanizmem działania Ebsp3 u *Galleria* i wykazał, że już przy bardzo niskich dawkach działa on bakteriostatycznie wobec bakterii Gram-ujemnych *Pseudomonas enterophila* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz bakterii Gram-dodatnich *Bacillus thuringiensis* i jest nieaktywne wobec *Staphylococcus aureus*. Aktywność bakteriostatyczna Ebsp3 była najwyższa bezpośrednio po podaniu tego peptydu do hodowli bakterii i wraz z upływem czasu

stopniowo malała, co prawdopodobnie związane jest z aktywnością proteolityczną wykrytą w płynach pohodowlanych. Doktorant wykazał również, że obniżenie poziomu ekspresji genu kodującego ten peptyd w ciele tłuszczowym i jelicie korespondowało z obniżeniem stężenia Ebsp3 w hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką bakterii, co może świadczyć o tym, że jest on celem czynników wirulencji *Pseudomonas entomophila*.

8. w hemolimfie larw *Galleria* zakażonych bakteriami *Pseudomonas entomophila* zidentyfikował inny peptyd wiążący cząsteczki zapachowe, OBP 7, którego funkcja związana jest z komunikacją seksualną. Stwierdził, że ma on aktywność przeciwbakteryjną wobec *Pseudomonas entomophila* i *Bacillus thuringiensis*. Doktorant wykazał zmniejszenie stężenia OBP7 w hemolimfie larw zakażonych większą dawką bakterii oraz wzrost poziomu ekspresji genu kodującego ten peptyd w ciele tłuszczowym i jelicie po zakażeniu różnymi dawkami bakterii i na podstawie efektów powodowanych przez niskie i wysokie dawki bakterii wnioskuje, że podobnie jak peptydy Ebsp3, OBP7 jest on celem czynników wirulencji *Pseudomonas entomophila*.

Podsumowując ocenę merytoryczną stwierdzam, że Pan mgr Jakub Kordaczuk w pełni zrealizował postawiony w rozprawie cel udowadniając, że *Pseudomonas entomophila* wykazuje właściwości entomopatogenne u *G. mellonella*. Doktorant prześledził mechanizmy interakcji tej bakterii z gospodarzem po zakażeniu drogą pokarmową, czego efektem jest wykazanie wpływu *Pseudomonas entomophila* na morfologię, żywotność i zachowanie zainfekowanych larw *Gallieria*, prześledzenie drogi zakażenia bakterią u larw, wykazanie aktywacji reakcji odpornościowej u zakażonych owadów i identyfikacja w ich hemolimfie peptydów, polipeptydów i białek indukowanych zakażeniem oraz poznanie nowych aktywności trzech peptydów w odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Oceniana rozprawa doktorska zawiera odkrycia, które nie tylko poszerzają naszą wiedzę odnośnie mechanizmów interakcji owad-patogen, ale mogą mieć także znaczenie aplikacyjne (peptydy: GmCP8, Ebsp3 i OBP7), co niewątpliwie stanowi atut tej pracy.

W tym miejscu chciałabym poprosić Doktoranta o odpowiedź na uwagi i pytania, które nasunęły mi się podczas czytania tej rozprawy:

1. W mojej ocenie, treść Wstępu jest zbyt obszerna. Wstęp, podobnie jak Wyniki, liczy 42 strony a Dyskusja 16 stron. Czytelnik zanim dotrze do najważniejszej części rozprawy obejmującej oryginalne osiągnięcie naukowe Doktoranta może być nieco znużony długością Wstępu. Czy dla odbioru rozprawy nie byłoby korzystne, gdyby ta część była nieco krótsza i czy wtedy Wyniki i Dyskusja wyników nie wysuwałyby się na pierwszy plan?
2. Ryciny 1-8 mogłyby być lepszej jakości – są nieostre i mogłyby mieć bardziej wyraziste kolory, co ułatwiłoby czytelnikowi ich analizę
3. W wielu miejscach pracy wobec tych samych cząsteczek peptydowych wymiennie używa Pan takich pojęć jak: peptyd, polipeptyd i białko. Czy jest to właściwe?
4. Czy może Pan wyjaśnić, które czynniki wirulencji *Pseudomonas entomophila* scharakteryzowane we Wstępie mogą być odpowiedzialne za obniżenia stężenia

Ebsp3 i OBP7 w hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką bakterii? W Dyskusji wspomina Pan w tym kontekście o metaloproteazie AprA obecnej w płynie pohodowlanym *Pseudomonas entomophila*, ale czy jest to jedyny czynnik wirulencji, który może być „podejrzewany" o wywołanie immunoinhibicyjnego efektu wyższej dawki bakterii?

5. Rozdział Materiały i metody: opis procedury przygotowania preparatów histologicznych jelit do badania w mikroskopie konfokalnym powinien się znaleźć na początku a nie na końcu tego rozdziału; po opisie metody wyznaczania krzywych przeżywalności zainfekowanych larw – taka kolejność wynika z kolejności prezentacji wyników i ich omówienia w Dyskusji. Umieszczenie w rozprawie tego podrozdziału na końcu rozdziału może sprawiać wrażenie, że Doktorant zapomniał o opisie tej metody i w pośpiechu dopisał ten opis na końcu rozdziału
6. Zdjęcia preparatów histologicznych przekrojów poprzecznych jelit larw kontrolnych i po infekcji, dokumentujące zmiany w tym narządzie powodowane przez bakterie, są mało czytelne. Powinny być większe, bardziej wyraźne i porządnie opisane, aby w sposób bezsprzeczny pokazać zmiany powodowane przez bakterie w tym narządzie np. wspomnianą przez Doktoranta w tekście: (1) kolonizację komórek Gobleta przez bakterie i ich zaokrąglenie (2) obecność bakterii poza światłem jelita w przyległych tkankach: mięśniach otaczających jelito i w naczyniach krwionośnych - na zdjęciach preparatów histologicznych nie widzę opisanych efektów, obrazy są dla mnie nieczytelne. (3) Doktorant opisuje także obecność komórek apoptotycznych w świetle jelita owadów, którym podano płyn fizjologiczny – na zdjęciu wskazano strzałką jakąś komórkę, ale powiększenie jest tak małe, że nie widzę zmian, które mogłyby wskazywać na apoptozę. Autor nie tłumaczy również na jakiej podstawie wnioskuje o apoptozie tych komórek. Dlaczego nie wskazano komórek apoptotycznych na preparacie jelita larw nietkniętych, a są one „wskazane" na preparacie jelita larw, którym podano PBS? To tylko niektóre przykłady wskazujące na fakt, że Doktorant mógł bardziej starannie przedstawić wyniki badań histologicznych.
7. Proszę również Doktoranta o wskazanie, który z wyników rozprawy uważa za najciekawszy i wyjaśnienie dlaczego?

PODSUMOWANIE

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko. Autor rozprawy wykazał się umiejętnością rozwiazywania problemów badawczych i nawiązywania współpracy naukowej, dobrze wykorzystał wiele różnorodnych metod biochemicznych, immunologicznych i molekularnych w celu realizacji postawionych w pracy zadań badawczych oraz wykazał się znajomością literatury przedmiotu. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego, maja dużą wartość poznawczą odnośnie mechanizmów złożonych interakcji owad-patogen, otwierają nowe perspektywy badawcze i mają aplikacyjny potencjał. Realizacja badań, przedstawienie wyników doświadczeń i prawidłowo przeprowadzona dyskusja w rozprawie oraz opublikowanie części wyników w renomowanym czasopiśmie (Scientific Reports) świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy naukowej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Kordaczuka w pełni spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Wnoszę zatem o dopuszczenie Doktoranta przez Wysoką Radę Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysokie walory poznawcze rozprawy i jej wkład w rozwój nauk biologicznych wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy i jej Autora stosowną nagrodą.

E. Czarniewska