



Olsztyn, 20.02.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Sułka**

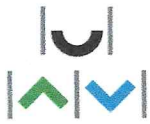
pt. „Przebieg infekcji i modulacja humoralnych mechanizmów odpornościowych *Galleria mellonella* po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila*. Identyfikacja nowych związków przeciwbakteryjnych”

wykonanej w Instytucie Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,  
pod kierunkiem dr hab. Iwony Wojdy, prof. UMCS.

Szybkie pojawienie się bakterii wielolekoopornych przyczynia się do tego, że każdego roku na całym świecie zakażają się miliony ludzi, a tysiące umierają (Prestinaci i in. 2015). Leki odkryte w „złotym wieku” antybiotyków, w latach 60. i 70. XX wieku, a nawet ostatnio, są mniej znaczące przez gwałtowny wzrost oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, co wymaga opracowania nowych klas z alternatywnymi mechanizmami zabijania, ale w rzeczywistości spotyka się ze zmniejszonym zainteresowaniem ze względu na przemysł farmaceutyczny. Liczba obiecujących związków w przygotowaniu jest dość ograniczona (Draenert i in. 2015), a tylko kilka z nich ma naprawdę różne mechanizmy działania. Od 2017 r. Światowa Organizacja Zdrowia umieściła na krótkiej liście gatunki bakterii, w przypadku których pilnie potrzebne są nowe, silne leki, w tym odporne na karbapenemy i cefalosporyny trzeciej generacji, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacteriaceae*. W związku z powyższym, pilną potrzebą jest prowadzenie intensywnych badań nad innymi możliwościami, jakimi są związki bioaktywne bezkręgowców. Prace te wymagają dogłębnego poznania odpowiedzi organizmów na czynniki środowiskowe, w tym na stresory biotyczne. Nadal, mimo poznania wielu peptydów przeciwdrobnoustrojowych, pozostaje otwarte podstawowe zagadnienie – identyfikacja nowych, bezpieczeństwa i skuteczności tych związków. Na te kluczowe pytania stara się od wielu lat znaleźć odpowiedź także Zespół, którym kieruje Pani dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS badając odpowiedź immunologiczną w układzie gospodarz-patogen na poziomie transkrypcji i translacji u owada *Galleria mellonella* -*Pseudomonas entomophila*.

W recenzowanej pracy badano humoralne mechanizmy odpornościowe *Galleria mellonella* po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila*. Dysertacja jest niezwykle interesująca i ważna z wielu powodów.





Po pierwsze materiałem badawczym były owady *Galleria mellonella*, które zyskały sławę jako organizmu modelowego ze względu na swoje zalety etyczne, niskie koszty utrzymania, szybki czas reprodukcji, krótki cykl życiowy, dużą liczbę potomstwa, tolerancję temperatury ciała człowieka, odporność wrodzoną i podobieństwa do modeli żywicieli ssaków. Owady te coraz częściej są wykorzystywane do oceny toksyczności i skuteczności *in vivo* związków chemicznych i środków przeciwdrobnoustrojowych, modelowania patogeniczności drobnoustrojów (bakteryjnej, grzybiczej i wirusowej) oraz oceny interakcji żywiciel-patogen podczas infekcji. Obecnie w dobie bogactwa narzędzi badań molekularnych, genomowych, transkryptomicznych, proteomicznych i genetycznych manipulacji, pogłębia się zrozumienie patogeniczności drobnoustrojów oraz interakcji gospodarz-patogen. Przyszłość *G. mellonella* w epoce molekularnej rysuje się w jasnych barwach, z mnóstwem nowych podejść i zastosowań tego modelu od klinicznych po biotechnologiczne. Amerykańska federacja leków (FDA), postuluje o brak konieczności testowania nowych leków na zwierzętach (Wadman 2023). Tu wpisuje się bardzo dobrze model Barciała większego. Obecnie potwierdzono, że *G. mellonella* stanowi model infekcji dla ponad 65 szczepów bakterii i grzybów. Publikacje na temat *G. mellonella* wzrosły ~18-krotnie w ciągu ostatnich 10 lat (źródło: PubMed z wyszukiwaniem przeprowadzonym w lutym 2024 r. przy użyciu słów kluczowych „Galleria mellonella”).

Po drugie badania zakażenia patogenami poprzez iniekcje, określenie dawki bakterii do wzbudzenia odpowiedzi humoralnej oraz prześledzenie modulacji odpowiedzi układu odpornościowego po ponownym zakażeniu owada to ważne ciągle słabo poznane zagadnienie. Do badań wybrano organizmy patogenne, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas entomophila*, *Bacillus thuringiensis* i *Candida albicans* badane w układzie hetero i homologicznym. Doktorant porównywał zmiany odpowiedzi na poziomie proteomicznym i transkrypcyjnym. Metodykę rozszerzył także o analizę zmian i identyfikację białek odpowiedzi immunologicznej z mikroskopią sił atomowych i dokumentację histologiczną w zjawisku piętnowania immunologicznego. Jest to zagadnienie niepoznane i wymagające nowych badań, wprowadzające zrozumienie różnic w aktywności translacyjnej poszczególnych frakcji białkowych w odpowiedzi na powtórne zakażenie. Badania pamięci immunologicznej to obszar, który jest przedmiotem rosnącego zainteresowania naukowców. Zjawisko to ma miejsce w przypadku wcześniejszej ekspozycji na nieśmiertelną dawkę patogenu, materiału pochodzącego od patogenu lub stres po krótkim czasie uodpornienia na śmiertelną dawkę (Cooper i Eleftherianos 2017, Sheehan i in. 2020). Wzbudzanie odporności bezkręgowców stanowi wyzwanie dla poglądu na temat odmiennego charakteru odporności nabytej i wrodzonej kręgowców i bezkręgowców. Jednak „koszty” gospodarza podczas wywoływania pobudzenia





immunologicznego to słabo zbadane kwestie, a których poznanie pozwoli poszerzyć i pogłębić nasze zrozumienie fizjologicznego mechanizmu pobudzania układu odpornościowego, ich regulacji metabolicznych. Powszechnie wiadomo, że bezkręgowce nie mają komórek T i B i nie mogą produkować specyficznych przeciwciał. Dlatego ich układ odpornościowy nie ma cech pamięci. Jednak nadal są zdolne do wygenerowania dodatkowej ochrony, zwanej wzmocnieniem odpornościowym, przeciwko patogenom, z którymi miały już do czynienia. Badania nad immunologią w *Galleria mellonella* dostarczają cennych informacji na temat ewolucyjnie zachowanych zasad odporności wrodzonej i mechanizmów obronnych gospodarza. Badania te nie tylko przyczyniają się do zrozumienia biologii odporności owadów, ale mają także wpływ na rozwój nowych strategii immunoterapeutycznych i szczepionek w medycynie i weterynarii. Dlatego temat podjęty przez mgra Michała Sułka uważam za bardzo istotny.

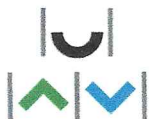
Badania przeprowadzono w ramach dwóch projektów badawczych: NCN OPUS oraz projektu badawczego młodych naukowców Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS. Warto nadmienić, że mgr Michał Sułek jest także współautorem czterech prac eksperymentalnych i dwóch przeglądowych. W sumie jest współautorem aż 6 publikacji o sumarycznym współczynniku IF 17,476, opublikowanych w latach 2019-2023. Według mnie jest to duże osiągnięcie zasługujące na pochwałę. Szczególnie ważną pozycję stanowi publikacja z 2023 w *Developmental and Comparative Immunology*, pt.: „Defence response of *Galleria mellonella* larvae to oral an intrahemocoelic infection with *Pseudomonas entomophila*”, która zawiera część wyników badań rozprawy Doktoranta.

Przedstawiona do oceny dysertacja mgra Michała Sułka to obszernie 223 stronicowe opracowanie. Zawiera 9 tabel i aż 43 rycin, w tym zbiorcze zestawienia wyników, co bardzo dobrze świadczy o pełnym analitycznym rozumieniu zagadnienia. Tu chcę podkreślić dokumentacje rycin, ale też zdjęć histologicznych, po których jestem pod wielkim wrażeniem. Piśmiennictwo pracy liczy 288 pozycji bibliograficznych.

Dysertacja ma układ typowy. Składa się z następujących rozdziałów: Wykaz skrótów, Streszczenia (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, oraz Literatura. Praca napisana jest dobrą polszczyzną, łatwą w czytaniu. Chociaż problematyka jest skomplikowana, narracja jest prowadzona w sposób logiczny i przejrzysty.

Wstęp, obejmujący przegląd literatury, liczący 53 str., podzielono na 5 podrozdziałów, w których mgr Michał Sułek przedstawiła wyczerpująco przegląd aktualnego stanu piśmiennictwa, dotyczącego wielostronnej charakterystyki modelu badawczego, układu odpornościowego owadów, interakcji





gospodarz-patogen, oraz dotychczasowej wiedzy na temat pamięci immunologicznej owadów. Doktorant korzystał głównie z oryginalnych prac naukowych opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat.

Cel pracy został jasno sformułowany. Wyraźnie wyodrębniono w nim zadania badawcze prowadzące do jego realizacji.

Zakres podjętych zadań wymagał od Doktoranta właściwego doboru i znajomości nowoczesnych technik i metod, które zostały bardzo precyzyjnie i wyczerpująco opisane w rozdziale Materiał i metody, liczącym 21 stron. Jestem pod wrażeniem precyzji i ułożenia całego schematu eksperymentu, świadczącym o wielkiej dojrzałości badawczej Autora. Należą do nich techniki wykonania preparatów histologicznych, techniki elektroforetyczne, densytometryczne, bioautografii oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). Dodatkowo analizy chromatograficzne RP-HPLC, frakcjonowania, typowanie i oczyszczanie białek i peptydów za pomocą odpowiednich buforów oraz spektrofotometryczne badanie aktywności inhibitorowej białek. Doktorant dopracował warunki izolacji ogółu białek, a także białek związanych z uzyskanymi frakcjami. Zastosował technikę elektroforezy trycynowej SDS-PAGE do rozdziału i wstępnej charakterystyki białek, a także do wyszukania wśród nich tych najbardziej interesujących, zmieniających ekspresję w warunkach eksperymentu. Czasochłonne, musiało być przeprowadzenie analiz tytu elektroforegramów i selekcja na ich podstawie białek wybranych do dalszej identyfikacji. Techniki biologii molekularnej i praca z kwasami nukleinowymi została także wykonana właściwie. Należy podkreślić, że zarówno zestaw zastosowanych metod, jak również sposób analizy uzyskanych wyników, były trafnie dobrane.

Wyniki, to najobszerniejszy rozdział dysertacji, liczy 58 stron. Jest doskonale ilustrowany, zawiera 3 tabele i 28 rycin. Pochwalić trzeba Doktoranta szczególnie za układ rycin, zdjęć grupujących pod względem układu doświadczalnego, których poziom zmieniał się istotnie w warunkach niskiej i wysokiej dawki bakterii. Zmiany te zostały udokumentowane w dwojaki sposób; poprzez mikrografie frakcji białkowych i w postaci barów. Taką dokumentację uważam za niezwykle trafną, bo na zamieszczonych zdjęciach elektroforegramów, z uwagi na ich pomniejszenie, czasami, poza odautorską strzałką, frakcja jest słabo widoczna (przykładowo ryc. 32, 36). Rezultaty każdego zadania badawczego zostały omawiane najpierw oddzielnie dla każdego układu eksperymentalnego, a w końcowym akapicie zestawione i porównane ze sobą. Podkreślono najważniejsze podobieństwa i różnice w reakcjach białek i ich transkryptów w obu układach. Wyniki pracy opracowywano statystycznie w sposób prawidłowy.

Autor osiągnął wyznaczony cel pracy. Najwartościowsze jej wyniki, zdaniem recenzenta, to;





a) wykazanie i charakterystyka humoralnej reakcji odpornościowej *G. mellonella* po zakażeniu bakteriami *P. entomophila* drogą iniekcji. Prześledzenie zmiany morfologicznych, aktywności przeciwbakteryjnej oraz indukcji peptydów i białek na poziomie transkrypcji i translacji: lizozymu, oksydazy fenolowej, peptydu prolinowego 1,2, peptydu anionowego 1, peptydu defensyno-podobnego, galiomycyny, cerkopino D-podobnego peptydu i nowych białek IPSD i homeoboksowego 5-podobnego.

b) Doktorant wykazał, udział efektorów humoralnych w fenomenie pamięci immunologicznej w układzie homologicznym *G. mellonella* -*P. entomophila*, a tym samym znaczenie specyficzności niskiej dawki bakterii (10 CFU). Zróżnicowana odpowiedź transkrypcyjna i translacyjna peptydów anionowych-1,2, anhidrazy węglanowej i peptydu Pr13a także wskazuje na interesującą regulację odpowiedzi humoralnej przy dwukrotnej infekcji.

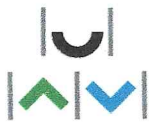
c) Ważna była identyfikacja, oczyszczenie i uzyskanie sekwencji AA po raz pierwszy w hemolimfie *G. mellonella* trzech białek, inhibitora proteaz serynowych dipetalogastino-podobnego IPSD, peptydu kazalowego Pr13a, oraz białka homeoboksowego 5-podobnego z domeną Kazalową. Były to głównie białka związane z aktywnością przeciwbakteryjną względem *P. entomophila*, występujące konstytutywnie, jak i indukowane zakażeniem. Szczególnie ciekawe są peptydy z domeną kazalową, które mogą być zaangażowane w różnorodne funkcje biologiczne, takie jak regulacja wzrostu komórek, różnicowanie się komórek, migracja komórkowa, oraz wiele innych procesów fizjologicznych. Ich zdolność do interakcji z określonymi receptorami na powierzchni komórek umożliwia im przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki i wywoływanie konkretnych odpowiedzi komórkowych.

Rozdział „Dyskusja” liczy 28 stron. Na tle danych z piśmiennictwa mgr Michał Sułek przeprowadza analizę własnych rezultatów, dyskutując po kolei wyniki każdego zadania. Najobszerniej, krok po kroku, omawia rolę i znaczenie nowych białek i peptydów, indukowanych w czasie infekcji *Pseudomonas entomophila* i podczas ponownego zakażenia. Na jej podstawie Doktorant sformułował 8 punktów, w rozdziale, Podsumowanie i wnioski.

## KOMENTARZE, PYTANIA I ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

W pracy znalazłam tylko jedno niedociągnięcie i zbyt daleko idących skrót myślowy, które przytaczam poniżej:





- str. 173 rozdział Dyskusja, anhidrazy węglanowe (CA) nie biorą udziału w metabolizmie węgla, to duży skrót myślowy, a tym bardziej Cytowana tutaj publikacja Wu i in. (2022) wskazuje na decydujący udział metabolizmu aminokwasów nad metabolizmem węgla dotyczącego wydatkowania energii (**metabolitów węglowodanów**), a nie aktywności CA, dlatego uważam to za niefortunne cytowanie.

Anhidrazy węglanowe (CA) to wszechobecne metaloenzymy, które odgrywają podstawową rolę fizjologiczną rolę w regulacji stosunku protonów do wodorowęglanów w komórkach i tkankach poprzez katalizowanie konwersji  $H_2O$  i  $CO_2$  do  $H^+ + HCO_3^-$ . Pełni rolę w ważnych procesach biologicznych, takich jak oddychanie i transport  $CO_2$  i wodorowęglanów pomiędzy metabolizującymi tkankami, zapewnia homeostazę pH i  $CO_2$  w różnych narządach i jest kluczowa do przeżycia owadów (Francis i in. 2016, Soydan i in. 2019). Ich kluczowa rola w osmoregulacji gruczołów odbytniczych i prawidłowym utrzymaniu pH jelit została stwierdzona u larw komarów (Smith i in. 2010). Zanotowano, że u *Bemisia tabaci* odgrywają one rolę w procesie oporności (Dai i in. 2017, 2018). Możliwość poszukiwania prawdopodobnego znaczenia tego enzymu, na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym stwierdzonego w odpowiedzi immunologicznej tej pracy, może być jego rola jako kluczowego regulatora adaptacji temperaturowej u *Bemisia tabaci* (Shen i in. 2021). Potwierdzono, że geny *BtCar3* są kluczowymi czynnikami regulacyjnymi zaangażowanymi w adaptację temperatury regulowaną dostępnością chromatyny, zapewniając nowe spojrzenie na mechanizmy molekularne regulujące tolerancję temperatury o podłożu epigenetycznym.

Praca nie jest wolna całkowicie od drobnych uchybień natury redakcyjnej. Najważniejsze z nich podaję poniżej:

- **str. 37** podrozdział 1.2.4.4, **str. 49** podrozdział 1.4 – brak cytowań literatury pierwsze akapity podrozdziałów, - **str. 40** – opis transkryptomu, czyli geny kodujące lizozym, nie białka, **str. 48**. nazwy genów zawsze piszemy kursywą „*etlA*”, **str. 72**- prawidłowe określenie „masa” a nie waga (urządzenie, a pojawia się, gdy tłumaczymy angielskie „weight”), **str. 76** – metoda oznaczania aktywności lizozymu i oksydazy fenolowej, brak cytowań (Sao et al. 2015; Adamo 2004; Azambuj et al. 1991), **str. 83**- zaleca się stosowanie przynajmniej 2 dwóch genów referencyjnych w metodzie real time PCR.





UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

KATEDRA BIOCHEMII

Po przeczytaniu przedstawionej mi do recenzji pracy nasunęło mi się następujące zagadnienie do dyskusji, proszę więc Doktoranta o ustosunkowanie się do niego:

- Proszę o opinię na temat praktycznego aspektu otrzymanych wyników rozprawy doktorskiej, szczególnie w jaki sposób „kopalnię” AMP *G. mellonella* można wykorzystać w badaniach biomedycznych, jakie wady i zalety mają peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Według bazy CAMP R3, jest ponad 8000 zidentyfikowanych AMP (Waghu i in. 2016)!

Podsumowując stwierdzam, że mgr Michał Sułek wywiązał się bardzo dobrze z podjętego zadania, przeprowadził badania o bardzo szerokim zakresie i umiejętnie przedstawił ich rezultaty. Trzeba podkreślić, że przygotowanie dysertacji w oparciu o tak dużą liczbę wyników było bardzo trudne i dużą sztuką było powiązanie ich w jedną interesującą i przejrzystą całość.

Uważam, że przedstawiona do oceny praca zatytułowana „Przebieg infekcji i modulacja humoralnych mechanizmów odpornościowych *Galleria mellonella* po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila*. Identyfikacja nowych związków przeciwbakteryjnych” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne. Zawiera elementy nowości, przynosi konkretne wyniki oraz stanowi punkt wyjścia dla dalszych badań odporności humoralnej i komórkowej w modelowym układzie gospodarz-patogen.

Stwierdzenie to upoważnia mnie do zwrócenia się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej z wnioskiem o dopuszczenie jej Autora, mgr Michała Sułka, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 20.02. 2024 r.

Z poważaniem  
*Lopuńska-Bikmet E.*



KATEDRA BIOCHEMII  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

ul. Oczapowskiego 1a, 10-719 Olsztyn  
tel. (89) 523 39 90 d.filipiak@uwm.edu.pl  
fax (89) 535 20 15 www.uwm.edu.pl/biolbioch