



Prof. dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 30 maja 2023 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kowalczyk pt. „*Struktury chemiczne O-polisacharydów wybranych szczepów bakterii z rodzajów Dickeya i Pectobacterium*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego w Pracowni Biochemii Strukturalnej w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedłożona do oceny praca miała na celu ustalenie struktury chemicznej polisacharydów O-swoistych (OPS, antygenów O) lipopolisacharydów (LPS) *Dickeya aquatica* IFB0154 i IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *Pectobacterium aquaticum* IFB5637 oraz *P. versatile* IFB5636. Praca jest przykładem kompleksowych analiz chemicznych obejmujących metody analityczne, spektrometrię mas i spektroskopię NMR, których wykorzystanie było poprzedzone hodowlami bakterii i preparacją oraz oczyszczaniem antygenów O.

Bakterie rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium* należą do fitopatogenów wywołujących choroby roślin uprawnych (np. ziemniaków, pomidorów, ryżu) i ozdobnych (np. chryzantem, pelargonii), takie jak czarna nóżka, czy mokra zgnilizna. Problem szkód w uprawach wywołowany przez zakażenia spowodowane ww. bakteriami jest globalny i prowadzi do ogromnych strat gospodarczych i ekonomicznych, co opisano we *Wstępie* rozprawy doktorskiej. Szczepy bakteryjne wybrane do badań objętych niniejszą pracą pochodziły ze środowisk wodnych Polski (jezioro), Francji (jezioro), Finlandii (drogi wodne) lub wielkiej Brytanii (rzeka). Źródło ich izolacji wskazuje na jeszcze jeden problem, który wiąże się z tymi fitopatogenami – ich bytowanie w środowisku wodnym stanowi rezerwuar tych bakterii i niesie poważne ryzyko ich przenoszenia na uprawy, np. podczas nawadniania. Znaczenie badań obejmujących wybrane przez mgr Agnieszkę Kowalczyk gatunki bakterii podkreślają aktualne europejskie *regulacje ochronne zapobiegające rozprzestrzenianiu się chorób roślin w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2019/2072 z dnia 28 listopada 2019 r.*



ustanawiającym jednolite warunki wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/2031 w sprawie środków ochronnych przeciwko agrofagom roślin (tj. patogenom, szkodnikom i chwastom obniżającym plony roślin uprawnych). Przywołany dokument zawiera wytyczne obejmujące fitopatogeny z rodzajów *Dickeya* oraz *Pectobacterium* w odniesieniu do leśnego materiału rozmnożeniowego, innego niż nasiona, materiału siewnego warzyw oraz do sadzeniaków ziemniaka.

Przedłożona do oceny praca doktorska ma formułę hybrydową, która jest zgodna z obowiązującymi wymogami ustawowymi i interpretacją Rady Doskonałości Naukowej w tym zakresie. Integralną część pracy doktorskiej stanowi cykl trzech oryginalnych publikacji opublikowanych w specjalistycznym i prestiżowym w obszarze analizy węglowodanów czasopiśmie *Carbohydrate Research*, w których Pani mgr Agnieszka Kowalczyk pełni rolę pierwszego autora. Oświadczenia współautorów tych publikacji wyraźnie wskazują na dominującą rolę Doktorantki w realizacji celów objętych projektem doktorskim. Podstawę ocenianego opracowania stanowią publikacje oryginalne oznaczone symbolem D1-D3:

**Publikacja D1.** Kowalczyk, A. i wsp. (2020). The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species. *Carbohydr Res*, 497, 108135.

**Publikacja D2.** Kowalczyk, A. i wsp. (2022). The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr Res*, 522, 108696.

**Publikacja D3.** Kowalczyk, A. i wsp. (2023). The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydr Res*, 524, 108743.

Publikacje te zawierają pełen zestaw wyników opisujący struktury chemiczne powtarzających się podjednostek OPS *Dickeya aquatica* IFB0154, *Pectobacterium aquaticum* IFB5637 i *Pectobacterium versatile* CFBP6051T. Publikacjom D1 i D2 towarzyszy w wersji internetowej materiał uzupełniający zawierający wyniki dodatkowych analiz wykonanych metodą spektroskopii NMR, gdzie część z nich umieszczono w



poprzedzającej wskazany cykl publikacji części opisowej mającej charakter monografii. Część opisowa rozprawy zawiera rozdziały typowe dla form monograficznych takie jak *Wstęp Literaturowy*, *Cel Pracy*, *Cześć Eksperymentalna* opisująca materiały i metody wykorzystane w badaniach, *Cześć Wynikowa*, *Dyskusja*, *Streszczenia* w j. polskim i angielskim, *Bibliografia* oraz kopie oświadczeń współautorów publikacji D1-D2. Hybrydowa formuła pracy doktorskiej przełożyła się na uzasadnione potraktowanie roli *Wstępu* jako forum do ogólnego przedstawienia wybranych gatunków bakterii i ich znaczenia biologicznego, a także omówienia ogólnego schematu budowy LPS. Pozytywnie oceniam takie podejście, przy czym **za wadę tego rozdziału uznaję to, że opisując LPS nie posłużono się przykładami patogenów i/lub symbiontów roślinnych, a prezentowane przykłady struktur chemicznych nie zostały przypisane konkretnym gatunkom/szczepom bakterii.** Takie podejście do napisania *Wstępu* stawia uzyskane wyniki dla fitopatogenów trochę w oderwaniu od opisanej różnorodności i przytoczonych przykładów LPS.

Rozdział pracy zatytułowany *Cześć Eksperymentalna* jest doskonałym przykładem wprowadzenia czytelnika w świat metod analitycznych wykorzystywanych w analizie LPS i OPS. Taka formuła zasługuje na wyróżnienie, gdyż w przypadku publikacji kwestia rutynowych metod traktowana jest zwyczajowo pobieżnie i oparta na cytowaniu źródłowych doniesień. Jest to też rozdział, który podparty pierwszymi rozdziałami *Części Wynikowej* dopełnia całości omówienia procesu analityczno-interpretacyjnego wyników oraz napotkanych przez Doktorantkę wyzwań analitycznych, takich jak identyfikacja rzadkich reszt cukrowych, labilność składników, ustalanie poziomu *O*-acetylacji cukrów i heterogenność *O*-acetylowanych OPS.

Przejście do *Części Eksperymentalnej* pozwala w pełni dostrzec zakres wykonanych prac. Sam cykl publikacji przedstawia 3 unikatowe podjednostki cukrowe OPS lipopolisacharydów wybranych do badań strukturalnych. Natomiast część eksperymentalna dopełnia tę wiedzę o dodatkowe dane analityczne.



W publikacji D1 opisano strukturę chemiczną OPS *Dickeya aquatica* IFB0154 składającego się z reszt Fuc i częściowo O-acetylowanej (OAc) Rha w pozycjach 2 (40%) i 3 (30%), natomiast w ramach realizacji założonych celów rozprawy doktorskiej uzupełniono badania o identyfikację OPS *D. aquatica* IFB0694 (15% pozycji 2 i 3 Rha podstawionych grupami OAc) i *D. lacustris* IFB8647 (brak grup O-acetylowych), które mają identyczny szkielet cukrowy powtarzającej się podjednostki, a różnią się jedynie poziomem podstawienia reszty Rha grupami O-acetylowymi. Rozdział 4.4.3 *Części Wynikowej* zawiera nieopublikowane widma  $^1\text{H}$  NMR OPS ww. szczepów oraz wyczerpujący opis sposobu ustalania poziomu podstawienia grupami OAc. **Dane i wyniki w zakresie tematyki dotyczącej publikacji D1 powinny być dopelnione przez umieszczenie za publikacją D1 materiałów dodatkowych, które to są dostępne dla czytelników jedynie na stronie internetowej *Carbohydrate Research*.** Analiza porównawcza dotychczas zidentyfikowanych struktur OPS bakterii rodzaju *Dickeya* wykazała, że zidentyfikowane antygeny O tych trzech izolatów ze środowisk wodnych w istotny sposób odróżniają się pod względem struktury od dotychczas opisanych OPS bakterii rodzaju *Dickeya* izolowanych z zakażonych roślin, które zbudowane są z homopolimerów D-6dAltp. **Przy tak małej liczbie zidentyfikowanych struktur OPS (11 szczepów rodzaju *Dickeya*) trudno wnioskować na temat znaczenia zaobserwowanej różnicy i ewentualnych powodów jej występowania. Tą kwestię poddaje pod dyskusję.**

Publikacja D2 prezentuje pentasacharydową strukturę podjednostki OPS *P. aquaticum* IFB5637 składającą się z reszt Man i Glc oraz bardzo rzadkiej reszty cukrowej - abekozy, którą po raz pierwszy zidentyfikowano w OPS LPS *Pectobacteriaceae*. Kompletne wyniki analiz strukturalnych zawarte są w publikacji D2, natomiast **podobnie jak w przypadku pracy D1 Doktorantka powinna umieścić w opracowaniu materiały dodatkowe, które są dostępne jedynie w wersji internetowej**, a które to zawierają dwuwymiarowe widma NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC i  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY i ich interpretację.

Publikacja D3 przedstawia OPS *P. versatile* IFB5636 (CFBP6051T) zbudowany z pentasacharydowej powtarzającej się podjednostki zawierającej 2 reszty Man, jedną resztę



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirszfeld.pl

Glc oraz dwie reszty kolejnego cukru rzadko spotykanego w przyrodzie –  $\alpha$ -D-erwiniozy ( $\alpha$ -D-Erwp). Dotychczas zidentyfikowano ją jako anomer  $\beta$  jedynie w dwóch innych OPS *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* GSPB9205 oraz *P. atrosepticum* SCRI1043. Ze względu na ten rzadki składnik oraz wyzwanie analityczne jakim jest natrafienie na rzadko spotykany cukier, w przypadku którego dostęp do wzorców jest mocno utrudniony (wymaga indywidualnej preparacji z OPS) oraz labilność Erw w warunkach analizy cukrowej, metylacyjnej i absolutnej konfiguracji, Pani mgr Agnieszka Kowalczyk właśnie tą publikację wybrała jako temat szeroko rozbudowanej *Części Eksperymentalnej* (rozdziały 4.1-4.3), gdzie krok po kroku opisuje metodologię analizy tego OPS z dużym naciskiem na sposób identyfikacji reszt Erw, ich anomerii oraz przypisania do szeregu konfiguracyjnego D lub L. **Ta część pracy z racji przyjętej strategii wprowadzenia w tematykę badawczą nie jest wolna od wielu powtórzeń biorąc pod uwagę przywołaną dalej publikację D3, przy czym komentarz ten nie jest zarzutem wobec rozprawy, a raczej rodzajem przemyśleń na temat tego jaki rodzaj opisu praca doktorska w formule hybrydowej powinna zawierać, gdyż ta forma dostępna jest dla doktorantów od niedawna i nie w każdej jednostce naukowej.** Identyfikacja reszt Erw wymagała od Doktorantki wykazania się dodatkowymi umiejętnościami korzystania z danych NMR opublikowanych dla *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* GSPB9205, interpretowania widm ROESY, znaczenia wartości stałych sprzężeń  $J_{H,H}$  oraz efektów glikozyłowania ( $\delta$ ), w sytuacji kiedy cząsteczka wzorcowa występowała w OPS w konfiguracji anomerycznej  $\beta$ . Pewność co do interpretacji zaobserwowanych systemów spinowych uzyskano posługując się dodatkowym wzorcem – kariofilozą, cukrem bardzo podobnym do  $\alpha$ -Erwp. W tym kontekście należy podkreślić, że identyfikacja rzadkich lub unikatowych składników jest dużym wyzwaniem analitycznym i często znacznie opóźnia skompletowanie wyników, tym bardziej na wyróżnienie zasługuje sposób w jaki z tym problemem analitycznym poradziła sobie Pani mgr Agnieszka Kowalczyk. **Jeden aspekt budzi pewien niedosyt Recenzenta, dlaczego nie podjęto próby izolacji tego ciekawego monosacharydu na potrzeby pozyskania cennego wzorca i jego analizy w formie anomeru  $\alpha$  i  $\beta$ ? A za tym pytaniem formułuję drugie pytanie dotyczące tego, jak**



**preparacja takiego wzorca wyglądałaby w opinii Doktorantki i czy jest możliwa do wykonania?**

Wszystkie wyżej opisane badania obejmowały hodowle bakteryjne, preparacje i degradacje LPS, w tym frakcjonowanie metodą chromatografii wykluczania oraz wykonanie kompletu analiz klasycznymi metodami, takimi jak analiza cukrowa, metylacyjna, analiza absolutnej konfiguracji cukrowych i niecukrowych składników oraz interpretacje widm NMR.

Całość opisu zwieńczona jest krótką dyskusją poświęconą podsumowaniu aktualnej wiedzy na temat różnorodności dotychczas poznanych antygenów O bakterii rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium* oraz prawidłowo przywołanymi pozycjami literaturowymi w rozdziale *Bibliografia*. **Ciekawi mnie rozwinięcie postawionej przez Doktorantkę ogólnej hipotezy przełożenia się wyników badań strukturalnych LPS na zapobieganie zakażeniom roślin wywoływanym przez te fitopatogeny.**

Podsumowując moją ocenę zakres analiz przeprowadzonych przez mgr Agnieszkę Kowalczyk i ich wynik w postaci 5 struktur antygenów O oceniam bardzo wysoko. Do głównych uwag merytorycznych wyróżnionych powyżej należy dodać: (i) brak stosowania kursywy w przypadku wskazywania konfiguracji *manno* pierścienia w cząsteczce Kdo (*Wstęp*), (ii) stwierdzenie na str. 13 *Wstępu*, że lipooligosacharydy (LOS) na ogół nie są wirulentne (proszę o wyjaśnienie z jakich cech strukturalnych LOS/LPS wynika wirulencja i podanie przykładów patogenów posiadających LOS a nie LPS), (iii) mylący dla czytelnika schemat (Rys. 4) i określenie procesu ekstrakcji LPS z bakterii obejmującego ekstrakcję PCP i wodno-fenolową jako „ekstrakcje w tandemie”, co sugeruje wykorzystywanie tej samej wyjściowej masy bakteryjnej i produktów ekstrakcji PCP w kolejnym etapie ekstrakcji wodno-fenolowej (nie potwierdzają tego opisy metod zawarte w publikacjach), (iv) stosowanie symboli jednostek h i rpm, (v) nieprawdziwość stwierdzenia, że liczba sygnałów na widmie  $^1\text{H}$  NMR w regionie anomerycznym wskazuje na liczbę reszt cukrowych (str. 22), czy też (vi) zasadność stwierdzenia „czysty OPS” w kontekście możliwości udziału w tej frakcji regionu rdzeniowego.



W rozprawie dość często stosowany jest żargon laboratoryjny („podobne rozpuszcza się w podobnym”, „kolba sercówka”, „mleczna interfaza”, stosowanie formy osobowej w postaci przykładowych stwierdzeń „dodałam”, „czekałam”, „odczekałam”, „szczypta”, „buteleczka”, „nieznana glukoza”, „końcowy monosacharyd”), wyrażenia wynikające z próby dosłownego tłumaczenia wyrażen i ich składni w j. angielskim (podjednostka O-antygenowa) lub wyrażenia o niepotrzebnie rozbudowanej formule (O-specyficzny łańcuch polisacharydowy, lipidowo-polisacharydowe heteropolimery, jednostka powtarzalna OPS).

Do nielicznych uchybień technicznych zaliczyłabym: (i) brak informacji specyfikujących użyte złoża Superdex 75 i Bio-Gel P-30 (wielkość ziaren, wymiary kolumny) i (ii) nieprecyzyjne złożenie tekstu powodujące obecność kilku stron w połowie niezapełnionych.

**Zdaje sobie sprawę, że praca powstała w dyscyplinie nauki chemiczne, przy czym ponieważ część współautorów deklarowała w oświadczeniach „udział w przygotowaniu eksperymentów biologicznych” nasuwa to pytanie jakiego typu były to eksperymenty i czy dotyczą może wirulencji wybranych fitopatogenów.**

Niezależnie od uwag powyżej, jakość zaprezentowanych wyników popartych bogatym opracowaniem danych pomiarowych, ich kompleksowość, komplementarność i poddanie krytycznej dyskusji oceniam bardzo wysoko. Pani mgr Agnieszka Kowalczyk mając dominujący udział w przedłożonych do recenzji badaniach zidentyfikowała 3 oryginalne podjednostki polisacharydów O-swoistych LPS wybranych gatunków fitopatogenów oraz 2 warianty jednej z nich różniące się poziomem podstawienia grupami OAc, każdorazowo natrafiając na wyzwania analityczne (rzadkie monosacharydy, obecność grup OAc, labilność składników) wymagające poszerzenia panelu doświadczeń i interpretowanych danych.

W podsumowaniu, wysoko oceniam jakość i oryginalność uzyskanych wyników. Potwierdzam, że cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte, a formuła hybrydowa w sposób poprawny zaprezentowała podjętą tematykę badawczą na tle aktualnej wiedzy dopełniając wyniki badań oryginalnymi publikacjami z wiodącym udziałem mgr Agnieszki Kowalczyk.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska odpowiada ustawowo określonym warunkom określonym dla stopni naukowych. Wnoszę o przyjęcie ocenianej rozprawy



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirszfeld.pl

doktorskiej i dopuszczenie mgr Agnieszki Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze jakość wykonanych eksperymentów, kompleksowość analiz i osiągnięcie ogólnego celu jakim było poszerzenie wiedzy na temat różnorodności antygenów O fitopatogenów z rodziny *Dickeya* i *Pectobacterium*, jak również wytyczne udostępnionego przez macierzystą jednostkę regulaminu wyróżniania doktorantów stawiam również wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

Prof. dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz