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.iitd.pan.wroc.pl

Dr hab. Wojciech Jachymek

Wrocław 24.06.2021

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Sylwii Szulty pt. „Badania strukturalne O-polisacharydów wyizolowanych z bakterii *Franconibacter helveticus, Pseudomonas donghuensis* oraz *Pectobacterium brasiliense*"

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy analitycznej chemii biologicznej i charakterystyki strukturalnej fragmentów cukrowych glikolipidów bakteryjnych trzech szczepów bakterii *Franconibacter helveticus, Pseudomonas donghuensis* oraz *Pectobacterium brasiliense* - z jednej strony endofitów bakteryjnych o nie znanym dokładnie mechaniźmie działania na rośliny a z drugiej groźnych potencjalnych patogenów roślinnych. Autorka podjęła się ustalenia struktury O-polisacharydów bakteryjnych, składników lipopolisacharydu - cząsteczek budujących struktury powierzchni tych bakterii, którym przypisuje się szczególne znaczenie w interakcji bakterii z otoczeniem - układów symbiotycznych, układów patogennych, oddziaływań roślina – bakteria - środowisko. Recenzowana praca wpisuje się w prowadzone w wielu ośrodkach badania nad lipopolisacharydami bakterii zaangażowanych w symbiotyczne i patogenne układy z roślinami. Rozwój symbiozy bakterii z roślinami oraz patogenności to procesy niezwykle złożone i kontrolowane, a poznanie powierzchniowych struktur lipopolisacharydowych umożliwić może

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.iitd.pan.wroc.pl

badania procesów oddziaływań bakterii z komórkami rośliny gospodarza na poziomie molekularnym.

Przedstawiona do oceny praca ma układ powszechnie przyjęty dla rozprawy doktorskiej i składa się z obszernego wstępu z wyodrębnionym celem pracy, w którym autorka przedstawia współczesny stan wiedzy , opisując również znaczenie lipopolisacharydów w procesie symbiozy i patogenności bakterii oraz ich oddziaływanie z fagami – potencjalnymi biologicznymi środkami ochrony roślin. Ważną częścią tego rozdziału jest szczegółowe omówienie struktury lipopolisacharydów.
Niezwykle istotną częścią rozprawy jest omówienie metod izolacji oraz analizy chemicznej tych niezwykle skomplikowanych wielocukrowych składników błony zewnętrznej bakterii.
Ten fragment rozprawy doktorskiej napisany jest jasno i logicznie z uwzględnieniem szeroko cytowanych najnowszych pozycji literatury.
Cytowanych jest ponad 150 pozycji obejmujących okres do 2020 roku (autorka odnosi się do klasycznych prac źródlowych autorów metod, a nie tylko do nowszych prac przeglądowych). Autorka wykazała się dobrą znajomością przedstawianej problematyki. Poszczególne zagadnienia omówione we wstępie zostały krytycznie omówione i mają bezpośredni związek z tematyką rozprawy.
Cele pracy zostały sformułowane w sposób precyzyjny i konsekwentnie realizowane.
Metodyka badań nie budzi zastrzeżeń. Metody wykorzystane w pracy są trafnie dobrane. Autorka zastosowała szereg nowoczesnych technik z zakresu analizy instrumentalnej takich jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego,

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.iitd.pan.wroc.pl

chromatografia gazowo-cieczowa połączona ze spektrometrią mas z jonizacją typu EI. Metodyka instrumentalna została uzupełniona przez klasyczne metody chemiczne i enzymatyczne.

Takie połączenie metodyki analitycznej z pracą nad poznaniem istotnych składników budowy bakterii czyni z rozprawy pracę multidyscyplinarną na pograniczu biologii, chemii i mikrobiologii. Bardzo dokładnie opisano szczepy bakteryjne oraz procedury ekstrakcji i izolacji badanych wielocukrów. Myślę, że niezwykle istotnym elementem rozprawy jest zastosowanie klasycznych metod analizy cukrowej, metylacyjnej i określania absolutnej konfiguracji uzyskanych pochodnych cukrowych pozwalających na identyfikację monocukrów budujących badane polimery, sposobu ich podstawiania i rozgałęzień. Tego typu niezwykle istotne i pracochłonne badania często są pomijane i opisywane dwoma zdaniami w publikowanych pracach strukturalnych a często bez pomocy tych klasycznych analiz struktury określane z użyciem NMR mogą prowadzić do błędnych interpretacji ze względu na często występujące jednakowe wartości przesunięć chemicznych sygnałów protonów i węgli w skomplikowanych strukturach. Recenzent spotkał się z poglądami naukowców ze znaczących ośrodków badań glikobiologicznych o braku ekspertyzy dotyczącej klasycznych metod chemicznych, ze względu na przesunięcie się nacisku na badania bioinformatyczne i genetyczne w glikobiologii.

Tak szczegółowo opisana metodyka bardzo ułatwia śledzenie dalszych części pracy i umożliwia łatwe powtórzenie wykonanych eksperymentów.

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.iitd.pan.wroc.pl

Mam dwa pytania:

1. Na stronie 35 w opisie metod pominięto znaną metodę określania anomerii. Jaką? Pytanie dotyczące analizowanej struktury: czy na podstawie danych zawartych w doktoracie i cytowanego piśmiennictwa spróbowała by doktorantka określić absolutną konfiguracje3-Quip3Nfo?
2. Na stronie 49. pracy przedstawiono metodę usuwania kwasów nukleinowych przez trawienie enzymatyczne DNAzą i RNAzą. Czy rzeczywiście prowadzono reakcję enzymatyczną w wodzie dejonizowanej?
3. strona 57 brakuje danych dotyczących prezentowanych ilustracji NMR: jaka była temperatura analiz dla poszczególnych wielocukrów?

Umiejętne zastosowanie opisanych metod umożliwiło Doktorantce realizację zadań i osiągnięcie postawionych celów naukowych. Przedstawione w kolejnym rozdziale pracy wyniki są dobrze opisane i staranie udokumentowane. Ilustracje są czytelne i wykonane w sposób umożliwiający swobodne śledzenie wyników i ich interpretację. Bardzo szeroki jest zakres prowadzonych badań: od hodowli bakteryjnych przez procedury izolacji lipopolisacharydów i ich fragmentów po analizy chemiczne i instrumentalne prowadzące do ustalenia struktur wyizolowanych makrocząsteczek.

Najważniejszymi osiągnięciami recenzowanej pracy są:

1. Ustalenie struktury powtarzającej się podjednostki łańcucha O-swoistego *Franicobacter helveticus* 1975. Doktorantka określiła budowę struktury czterocukrowych powtarzających się

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.iitd.pan.wroc.pl

podjednostek. Należy podkreślić wykrycie w badanej strukturze oraz ustalenie absolutnej konfiguracji, rzadko występującej L-d-Tal*p*.

2. Bardzo szczegółowa analiza wielocukru O-swoistego *Pseudomonas donghuensis* P482 metodami GC-MS, oraz jedno- i dwuwymiarowego NMR. Ustalono kompletną strukturę tego fragmentu LPS. Szkielet trójcukrowy zbudowany jest z N-acetylomannozoaminy, ramnozy i glukozy. Autorka ustaliła sposób podstawienia poszczególnych cukrów i ich sekwencję.

3. Badania mające na celu ustalenie struktury powtarzającej się podjednostki O-PS lipopolisacharydu *Pectobacterium brasiliense* 5527. Analiza tego materiału pozwoliła na ustalenie skomplikowanej sześciocukrowej powtarzającej się podjednostki wielocukru O-swoistego. Autorka ustaliła obecność w strukturze rzadko występującego cukru: terminalnej Qui3NFo (chinowozaminy-3N podstawionej grupą formylową). W tej części brakuje danych dotyczących absolutnej konfiguracji cukrów (domyślam się, że przeszkodą mogła być niedostępność standardów).

Pytanie: Tabela 3: wysokie wartości przesunięć chemicznych ^{13}C świadczące o podstawieniach taloz: w przypadku cukru A to wartości 73,8 i 70,21 ppm a w przypadku cukrów B i C to około 78,2 78,6 ppm. Dlaczego takie różnice? Jak określano i przypisywano sygnały w eksperymentach NMR i z jakimi danymi porównywano. Z jaką dokładnością ustalano przesunięcia chemiczne ^{13}C czy drugie miejsce po przecinku ma sens?

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.iitd.pan.wroc.pl

Cała praca napisana jest starannie, jasno i komunikatywnie, chociaż Autorka nie uchroniła się od nielicznych błędów językowych, literowych i usterek stylistycznych wynikających ze stosowania żargonu laboratoryjnego. Nie wpływa to jednak w żadnym stopniu na logikę wywodu i analizę wyników.

Uważam, że recenzowana praca pani mgr Sylwii Szulty jest bardzo dobrą i wartościową rozprawą doktorską. Została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosząc tym samym oryginalny i istotny wkład do wiedzy o lipopolisacharydach bakteryjnych. Doktorantka wykazała się znajomością literatury źródłowej, którą właściwie wykorzystała. Doktorantka posłużyła się też szeregiem nowoczesnych metod biologicznej chemii analitycznej z wielowymiarowym NMR na czele z sukcesem ustalając skomplikowane struktury O-polisacharydowych fragmentów glikolipidów obecnych na komórkach trzech szczepów bakterii, dowodząc tym samym dobrego opanowania warsztatu badawczego. Należy również podkreślić, że doktorantka jest pierwszym autorem 1. opublikowanej pracy oryginalnej oraz współautorką 2. innych prac doświadczalnych.

Nie mam uwag krytycznych dotyczących recenzowanej pracy.

Jestem przekonany, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach i tytule naukowym, wnoszę więc o jej przyjęcie i dopuszczenie pani mgr. Sylwii Szulty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech Jachymek

dr hab. Wojciech Jachymek