

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Zamłyńskiej pt. „Charakterystyka struktury lipopolisacharydu *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy chemii biologicznej i charakterystyki strukturalnej glikolipidów bakteryjnych *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T, mikrosymbionta koniczyny i łubinu. Autorka podjęła się ustalenia struktury lipopolisacharydu - cząsteczek budujących struktury powierzchni tych bakterii, którym przypisuje się szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych rizobium - roślina. Recenzowana praca jest kontynuacją wieloletnich badań nad lipopolisacharydami bakterii zaangażowanych w symbiotyczne układy z roślinami, związane z biologicznym wiązaniem azotu. Rozwój symbiozy bakterii z roślinami to proces niezwykle złożony i kontrolowany, a poznanie powierzchniowych struktur lipopolisacharydowych umożliwić może 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 o symbiozie rizobia-rośliny bobowate, opisując również rolę lipopolisacharydu w procesie symbiozy. Ważną częścią tego rozdziału jest szczegółowe omówienie struktury i biosyntezy lipopolisacharydów z uwzględnieniem specyfiki bakterii symbiotycznych.

Ten fragment rozprawy doktorskiej napisany jest jasno i logicznie z uwzględnieniem szeroko cytowanych najnowszych pozycji literatury. Cytowanych jest ponad 200 pozycji obejmujących okres do 2017 roku. 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, spektrometria mas z jonizacją typu MALDI i ESI. Metodyka instrumentalna została uzupełniona przez klasyczne metody chemiczne i mikrobiologiczne. Należy zaznaczyć również podjęcie badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej oraz analiz i narzędzi bioinformatycznych. Takie połączenie metodyki czyni z rozprawy pracę multidyscyplinarną na pograniczu biologii, chemii i mikrobiologii. Bardzo dokładnie opisano skład wszystkich buforów, roztworów, odczynników oraz szczepy bakteryjne, wektory, plazmidy i enzymy. Szczegółowo opisana metodyka bardzo ułatwia śledzenie dalszych części pracy i umożliwia łatwe powtórzenie wykonanych eksperymentów. W końcowej części tego rozdziału autorka podaje narzędzia bioinformatyczne wykorzystane w pracy.

Czy w projektowaniu mutanta szorstkiego nie można było spróbować wykorzystać metod sekwencjonowania NG (nowej generacji) i bazować na sekwencji genomu szczepu bakterii z którym Doktorantka pracowała? Czy byłoby to możliwe i czy potencjalnie mogłoby ułatwić zaprojektowanie szorstkiego mutanta w celu określenia struktury oligocukru rdzenia LPS?

Umiejętne zastosowanie opisanych metod umożliwiło Doktorantce realizację zadań i osiągnięcie postawionych celów naukowych. Przedstawione w kolejnym rozdziale pracy wyniki są dobrze opisane i starannie 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. Prowadzone były też prace w kierunku uzyskania stabilnego szorstkiego mutanta, który umożliwiłby izolację fragmentu oligocukru rdzeniowego LPS.

Najważniejszymi osiągnięciami recenzowanej pracy są:

1. Ustalenie struktur dwóch różnych powtarzających się podjednostek łańcuchów O-swoistych *P. trifolii* PETP02^T. Doktorantka określiła budowę struktury sześć- i dwu- cukrowych powtarzających się podjednostek. Należy podkreślić wykrycie w obu strukturach oraz ustalenie absolutnej konfiguracji (wykorzystanie charakterystycznych zmian wartości węglowych przesunięć chemicznych wywołanych efektem glikozylacji) metodami NMR, bardzo rzadko występującego w przyrodzie cukru – D-Rha3CMe (3-C-metylo-ramnozy).

2. Bardzo szczegółowa analiza lipidu A metodami GC-MS, MALDI MS i MS/MS oraz jedno- i dwuwymiarowego NMR. Ustalono kompletną strukturę tego fragmentu LPS. Szkielet trójcukrowy zbudowany jest z 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy oraz kwasu D-galakturonowego. Autorka ustaliła sposób podstawienia tego szkieletu cukrowego kwasami tłuszczowymi i rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w rejonie lipidowym badanego lipopolisacharydu. Ustalono niesymetryczny sposób podstawienia badanej cząsteczki kwasami tłuszczowymi 27-oxo 28:0 (kwasem 27-oksooktakozanowym) i 19:0-cyc (kwasem laktobacillowym). Na uwagę zasługuje niezwykle dokładna i staranna analiza szeregu widm masowych MS i MS2 pozwalająca określić mikroheterogenność w obrębie struktury badanego lipidu A.

3. Badania mające na celu ustalenie struktury części rdzeniowej lipopolisacharydu. Autorka podjęła próbę uzyskania mutantu szorstkiego (nie produkującego polisacharydu O-swoistego podstawiającego oligocukier rdzeniowy. Zarówno metody mutagenезы przypadkowej jak i ukierunkowanej (w tym przypadku wykorzystującej opublikowane sekwencje bakterii rodzaju *Phyllobacterium* kodujące przypuszczalnie ligazę O-antygeny. Pomimo zastosowania różnych strategii mutagenезы i metod wprowadzania wektorów oraz różnych podłoży i markerów selekcyjnych nie udało się Doktorantce uzyskać delecji w przewidywanym genie dla ligazy O-antygeny. Z tego względu Autorka podjęła się analizy frakcji niskocząsteczkowej wyizolowanej po delipidacji cząsteczki LPS *P. trifolii* PETP02^T. Analiza tego materiału pozwoliła na ustalenie, że głównym składnikiem jest muropetyd *P. trifolii* którego strukturę wstępnie zaproponowano. Autorka ustaliła też prawdopodobne składniki oligocukru rdzenia – 2-podstawioną glukozę i terminalną N-acetyloglukozaminę.

Czy ze względu na bardzo niewielką produkcję rdzenia niepostawionego nie można było zastosować alternatywnych metod np. chromatograficznych w celu izolacji oligocukru rdzeniowego lub oligocukru rdzeniowego podstawionego jedną lub dwoma podjednostkami O-antygeny i podjąć próbę analizy tak uzyskanego oligocukru?

Oczywiście możliwe jest, że taka metodologia w przypadku *P. trifolii* PETP02[†] nie spełniłaby oczekiwań ze względu na prawie 100% podstawienie rdzenia wysokocząsteczkowymi O-antygenami?

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

Uważam, że recenzowana praca pani mgr Katarzyny Zamłyńskiej 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 sukcesem ustalając skomplikowane struktury glikolipidów obecnych w i na komórkach *Phylobacterium trifolii*, dowodząc tym samym dobrego opanowania warsztatu badawczego. Należy również podkreślić, że doktorantka jest pierwszym autorem 2. opublikowanych prac naukowych.

Nie mam uwag krytycznych dotyczących recenzowanej pracy.

Jestem przekonany, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach i tytule naukowym, wnosząc więc o jej przyjęcie i dopuszczenie pani mgr. Katarzyny Zamłyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stawiam również formalny wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.



dr hab. Wojciech Jachymek