

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG

Gdańsk, dnia 10.04.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Zamłyńskiej

pt. „Charakterystyka struktury lipopolisacharydu *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T”

Praca doktorska została wykonana pod opieką promotora prof. dr. hab. Adama Chomy oraz promotora pomocniczego dr hab. Iwony Komanieckiej w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Azot jest pierwiastkiem potrzebnym do istnienia w zasadzie wszystkich form życia. Wchodzi on nie tylko w skład białek i kwasów nukleinowych, ale również niezliczonej liczby związków, które są niezbędne do funkcjonowania żywych organizmów. Azot jest co prawda głównym składnikiem powietrza, ale w tej formie jest niedostępny dla większości organizmów żywych. Brak biologicznie dostępnego azotu jest czynnikiem ograniczającym wzrost roślin, co praktycznie zawsze przekłada się na znaczące obniżenie plonów. Niedobór azotu najczęściej jest uzupełniany poprzez stosowanie nawozów syntetycznych. Metoda ta jest jednak kosztowna, a w dłuższej perspektywie wykazuje negatywny wpływ na środowisko. Dlatego też bardzo dużo uwagi poświęca się procesowi biologicznego wiązania azotu, polegającemu na przekształceniu azotu atmosferycznego do jonów amonowych, które mogą być przyswajane przez rośliny. Zdolność taką wykazują w zasadzie dwie grupy bakterii: bakterie wolno żyjące (np. z rodzaju *Azotobacter*, *Azospirillum*) oraz bakterie wiążące N₂ w symbiozie z roślinami bobowatymi, tj. bakterie brodawkowe (np. z rodzaju *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*). Rozwinięcie symbiozy pomiędzy bakteriami, a roślinami bobowatymi składa się z kilku etapów. W tym złożonym procesie istotną rolę odgrywają struktury znajdujące się na powierzchni korzeni roślin i na powierzchni ściany komórkowej bakterii. Jednym z najbardziej wyeksponowanych elementów ściany komórkowej bakterii jest lipopolisacharyd. Znajomość jego struktury chemicznej pozwala zrozumieć część mechanizmów oddziaływań bakterie brodawkowate/rośliny bobowate.

W opisaną problematykę doskonale wpisują się badania opisane w pracy doktorskiej mgr Katarzyny Zamłyńskiej, poświęconej charakterystyce struktury chemicznej lipopolisacharydu wyizolowanego z bakterii *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T.

Rozprawa doktorska licząca 155 stron została podzielona na 8 numerowanych rozdziałów. Ich układ i zawartość są typowe dla tego typu pracy.

Praca rozpoczyna się od dwóch rozdziałów *Streszczenie* oraz *Abstract*, które napisane są bardzo przystępnie i dobrze oddają zawartość rozprawy doktorskiej, co można oczywiście stwierdzić po przeczytaniu całości.

Pierwszym numerowanym rozdziałem jest *Wstęp*. Tytuł ten jest moim zdaniem trochę mylący, ponieważ sugeruje krótkie wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, a w rzeczywistości jest to liczący 36 stron jej obszerny fragment. Wydaje się, że lepszym rozwiązaniem byłoby nazwanie tej części np. *Przegląd literaturowy*. Rozdział ten składa się z pięciu części, w których doktorantka szczegółowo opisuje:

- biologiczne wiązanie azotu i symbiozę rizobia-rośliny bobowate,
- budowę lipopolisacharydów bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem budowy lipidu A, regionu rdzeniowego oraz polisacharydów O-swoistych bakterii symbiotycznych,
- biosyntezę lipopolisacharydów,
- rolę lipopolisacharydów w procesie symbiozy,
- bakterie z rodzaju *Phyllobacterium*.

Wszystkie podrozdziały napisane są bardzo przystępnie i poparte są licznymi odnośnikami literaturowymi. Należy również podkreślić, iż tematyka poruszona we *Wstępie* jest ściśle związana z badaniami opisanymi w dalszych częściach rozprawy doktorskiej.

Doktorantka za cel badań postawiła sobie charakterystykę strukturalną lipopolisacharydu wyizolowanego z *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T, szczepu będącego mikrosymbiontem koniczyny i łubinu.

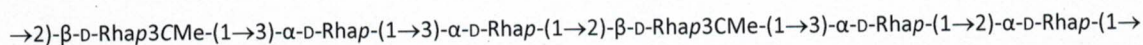
W rozdziale *Materiały i metody*, który liczy 22 strony, Doktorantka wymienia materiały wykorzystane podczas prowadzenia doświadczeń i bardzo szczegółowo opisuje wszystkie przeprowadzone analizy.

Rozdział *Wyniki*, liczący 53 strony, jest najobszerniejszą częścią rozprawy doktorskiej. Składa się on z 4 podrozdziałów, w których Doktorantka opisuje wyniki badań strukturalnych uzyskane dla całego LPS oraz otrzymanych w wyniku jego hydrolizy: polisacharydu O-swoistego, lipidu A oraz regionu rdzeniowego. Do określenia struktury badanych preparatów Kandydatka wykorzystwała metody chemiczne (analiza cukrowa, analiza składu kwasów tłuszczowych, analiza metylacyjna, przyporządkowanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L) oraz spektroskopowe (NMR, MS i GC-MS). Rozdział *Wyniki* zawiera liczne tabele i ryciny, które dokumentują szeroki zakres wykonanych badań.

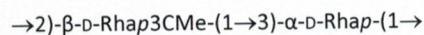
Analiza SDS-PAGE preparatu LPS wykazała, iż cechuje się on dużą heterogennością, wynikającą z różnej liczby jednostek powtarzalnych, z których zbudowane są polisacharydy O-swoiste. Na podstawie wyników analiz chemicznych określono skład cukrowy oraz skład kwasów tłuszczowych LPS-u. Stwierdzono, iż głównym składnikiem cukrowym jest ramnoza, ponadto w stosunkowo dużych ilościach występują: glukoza, 6-deoksy-3-C-metyloheksoza (zidentyfikowana później jako ewaloza), glukozamina oraz mannoza, natomiast dominującym kwasem tłuszczowym jest 19:0cyc oraz 3OH-14:0 i 3OH-16:0.

Na podstawie wyników analizy strukturalnej frakcji wielkocząsteczkowej, otrzymanej po sączeniu molekularnym, Doktorantka stwierdziła stosunkowo rzadko spotykaną u bakterii obecność dwóch polisacharydów O-swoistych, zbudowanych z α -D-ramnozy i β -3-C-metylo-D-

ramnozy. Jednostka powtarzalna O-PS-u, który był syntezowany przez bakterię w większej ilości, jest heksasacharydem o strukturze:



natomiast jednostka powtarzalna drugiego O-PS-u jest disacharydem o strukturze:



Doktorantka analizując lipid A wykazała, że jego szkielet cukrowy zbudowany jest z dwóch reszt 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy, połączonych wiązaniem β -(1 $\rightarrow$ 6) glikozydowym. Do redukującej reszty przyłączony jest D-GalpA w pozycji C-1, natomiast do reszty dystalnej może być przyłączona reszta fosforanowa w pozycji C-4. Do każdej reszt cukrowej przyłączone są dwa amidowo związane 3-hydroksykwas (3OH-14:0 i 3OH-16:0), do których z kolei przyłączone są estrowo związane tzw. drugorzędowe kwasy tłuszczowe: 19:0cyc i 27OH-28:0. Doktorantce jako pierwszej udało się potwierdzić obecność kwasu 19:0cyc w strukturze lipidu A.

Badania regionu rdzeniowego są możliwe dla szczepów, a właściwie mutantów, które pozbawione są polisacharydu O-specyficznego w lipopolisacharydzie. Liczne próby otrzymania takiego mutantu szczepu *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T zakończyły się niepowodzeniem. W związku z tym Doktorantka przeanalizowała frakcję o małej masie cząsteczkowej, otrzymaną po sączeniu molekularnym. Niestety okazało się, że zawiera ona głównie muropeptydy, czyli podstawowe jednostki strukturalne peptydoglikanu. Stwierdzono również obecność D-glukozy podstawionej w pozycji C-2 oraz końcowej N-acetyloglukozaminy, które najprawdopodobniej pochodzą z regionu rdzeniowego.

Bardzo ważnym i dobrze napisanym rozdziałem jest *Dyskusja*, w którym Doktorantka wyniki swoich badań porównuje z doniesieniami literaturowymi. Po przeczytaniu tego rozdziału można stwierdzić, iż postawiony w rozprawie cel zostały w pełni zrealizowany. Choć pozostaje pewien niedosyt, że nie udało się otrzymać odpowiedniego mutantu, co umożliwiłoby określenie struktury również regionu rdzeniowego. W wyniku czego możliwe byłoby stwierdzenie, iż Doktorantka określiła chemiczną strukturę całego lipopolisacharydu wyizolowanego ze szczepu *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T, a nie tylko dwóch jego regionów.

Kolejne rozdziały (VI-VIII) zawierają zestawienie wykorzystanej literatury, wykaz skrótów oraz spis rycin i tabel. Doktorantka wszystkie odnośniki literaturowe zestawiała alfabetycznie, a dodatkowo je ponumerowała. Zastanawiający jest cel ich ponumerowania, oczywiście nie licząc dużego ułatwienia dla recenzentów, którzy bez żmudnego liczenia mogą stwierdzić – Doktorantka wykorzystała 216 odnośników literaturowych w rozprawie doktorskiej. Dodam, iż zamieściła również 49 rycin oraz 16 tabel.

Pracę przeczytałem z dużą przyjemnością. Jest ona napisana logicznie, poprawnie gramatycznie, a formatowanie tekstu jest bardzo dobre. Jednak przy tak obszernym opracowaniu trudno jest ustrzec się drobnych niedociągnięć. Poniżej przedstawiam kilka wybranych uwag.

- W rozdziałach *Wyniki i Dyskusja* brakuje mi formy osobowej. Wszędzie jest napisane otrzymano, wyhodowano, rozdzielono, analizowano itp.. Recenzentowi nie pozostaje nic innego jak założyć, iż wszystkie eksperymenty, a następnie interpretacja wyników zostały przeprowadzone przez Doktorantkę. Choć nasuwa się pytanie, jaki jest udział prof. Andrzeja Mazura i mgr. Kamila Żebrackiego w próbie uzyskania mutantów?
- S.60.I.3-4. Czy na pewno 2 M roztwór TFA usuwano w eksykatorze?
- S.79.I.9-11. Z tekstu wynika, że Rha i Rha3CMe występują w proporcji 1 : 2. Patrząc na Ryc. 17. i opis sygnałów wydaje się, że powinno być 2 : 1. Przyglądając się uważniej można stwierdzić, że proporcja ta wynosi 3 : 1, a przy uwzględnieniu pola powierzchni sygnałów to może nawet 4 : 1.
- S.80. Czy na pewno określana była konfiguracja absolutna? Czy można mówić o formie D-GalA, czy lepiej jak w przypadku GlcN3N o przyporządkowaniu do szeregu konfiguracyjnego D? (s. 90)
- S.81.I.5. (d) W jaki sposób „redukcja otwiera pierścienie piranozowe”?
- S.85.I.15-16. Co oznacza określenie „grupy metylowe bezpośrednio związane do szkieletu cukrowego”? A właściwie co to jest szkielet cukrowy? Ponieważ jak wynika z opisu 3 linijki dalej, do szkieletu cukrowego nie należą atomy węgla C-1 i C-6.
- S.89.I.6-8. Praca napisana jest bardzo logicznie, dlatego nie należy się dziwić, że znalazł się jeden wyjątek potwierdzający powyższą regułę. Mianowicie jedno krótkie zdanie, w którym występują: reszty cukrowe, podstawniki cukrowe i cukry, które dodatkowo „przyłączone są” lub „przyłączają się”.
- S.90.I.1-4. Patrząc na widmo ^1H NMR na Ryc. 23 i porównując intensywności sygnałów anomerycznych od reszt H i G trudno jest zgodzić się z podanym stosunkiem ilościowym 20 : 3, czyli $\sim 7 : 1$, a w związku z tym z wnioskiem o dominującym udziale O-PS-u zbudowanego z heksooligosacharydowych jednostek powtarzalnych. Wydaje się, że ten stosunek bliższy jest do $\sim 2 : 1$.
- S.93.I.7. Dlaczego zmniejszenie lotności kwasów tłuszczowych poprzez przeprowadzenie w odpowiednie pochodne powoduje, iż „ich rejestracja na chromatogramie jest łatwiejsza”?
- S.101.I.4. Powinno być na Ryc. 35 i 36.
- W *Wykazie skrótów* na stronie 149 wyjaśnionych jest wiele skrótów, w tym wiele dosyć oczywistych np. MeOH. Moim zdaniem zdecydowanie brakuje wyjaśnienia: CDCl_3 , CDOD (CD_3OD) i D_2O , które wymienione są na stronie 66.
- Kilka literówek: „przez co glebę wzbogacana” (s.10), fukozyę (s.24) CDOD, zapewne chodziło o CD_3OD (s.66), przy podawaniu przesunięć chemicznych sygnałów wzorcowych użyto kropki zamiast przecinka (s.66).
- Kilka wyrażień żargonowych: „dokładna struktura LPS-u” (s.16), „ciężaru cząsteczkowego” (s.73, s.125), „derywat”, czy nie lepiej użyć „pochodna” (s.74), „ostra hydroliza” (s.90), węgli, węglami (s.85, s.86), jonogram (s.95), sodowany jon (s.101), ufosforylowanego lipidu (s.110).

- S.54. Brak jednostki przy stężeniu Na_2EDTA . Niekonsekwencja w używaniu spacji – przy stężeniu Glc przed „M” jest spacja, a trzy linijki niżej już spacji nie ma. Podobnie na s.57.1.4 jest spacja przed „stopniami Celsjusza”, a niżej spacji już nie ma.
- Na koniec chciałbym zwrócić uwagę na problem nazewnictwa dotyczącego spektrometrii mas. Bardzo mi się podoba, iż Doktorantka konsekwentnie w całej rozprawie używa, moim zdaniem jedynego słusznego określenia, „spektrometria mas” (z wyjątkiem s. 97 gdzie pojawia się określenie „spektrometria masowa”). W związku z tym nie bardzo rozumiem, dlaczego widma otrzymywane za pomocą „spektrometrii mas” to „widma masowe”. Pojawiło się też określenie „spektrum masowe” w opisie do Ryc. 14.

Wszystkie powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie pomniejszają bardzo dużej wartości poznawczej rozprawy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Wnosi oryginalny wkład do wiedzy o strukturze lipopolisacharydu bakterii *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T, ponieważ jak dotychczas w literaturze nie było informacji na temat struktury LPS-ów bakterii z rodzaju *Phyllobacterium*. Doktorantka wykazała się bardzo rozległą znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane, sprawnie posługuje się technikami separacyjnymi i spektroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do wyizolowania LPS, otrzymania lipidu A i polisacharydu O-swoistego, a następnie określenia ich struktury chemicznej. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż część otrzymanych wyników została opublikowana w dwóch dobrych czasopismach z listy JCR, a Doktorantka jest pierwszym autorem w obu artykułach.

Reasumując, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Katarzyny Zamłyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. Katarzyna