



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

Prof. dr hab. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 21 maja 2019 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani Małgorzaty Pac-Sosińskiej zatytułowanej „Charakterystyka antygenów O, glukanów i egzopolisacharydów bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Chomy w Zakładzie Mikrobiologii i Genetyki Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy częściowej charakterystyki strukturalnej powierzchniowych antygenów cukrowych, takich jak lipopolisacharydy (LPS) i egzopolisacharydy (EPS) oraz wewnątrzkomórkowe glukany u mało poznanych pod tym kątem symbiontów roślin motylkowatych *Ochrobactrum cytisi* i *O. lupini*. Oba mikroorganizmy mają znaczenie dla prawidłowego obiegu azotu w przyrodzie oraz pełnią funkcje pomocnicze w biodegradacji insektycydów (*O. lupini*) lub biosorpcji metali ciężkich (*O. cytisi*). Prowadzone badania dotyczą integralnych składników osłony komórkowej tych Gram-ujemnych bakterii, które mają istotne znaczenie dla tworzenia wyspecjalizowanych układów symbiotycznych z roślinami. EPS i LPS modulują oddziaływanie tych mikrosymbiontów z korzeniami rośliny, które prowadzą do powstania wydajnej nici infekcyjnej, a w konsekwencji brodawek z bakteroidami wiążącymi i przekształcającymi azot atmosferyczny. To bardzo ciekawe zagadnienia współczesnej biologii istotne również z punktu widzenia wyjaśniania podstaw immunologii roślin. Poznanie struktur chemicznych jest tutaj kluczem do zrozumienia mechanizmów interakcji bakteria-roślina. Badania te wychodzą naprzeciw współczesnym



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

wyzwaniom rolnictwa i poszukiwaniu nowych skutecznych nawozów w obliczu obserwowanych zmian klimatycznych i wyzwań ekologicznych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi zwartą monografię obejmującą 192 strony, 343 pozycje piśmiennictwa oraz prawidłowo opracowane rozdziały typowe dla tego typu opracowań.

Wstęp jest bardzo obszerny i porusza wszelkie aspekty symbiozy roślin motylkowatych z ryzobiami. Wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne Pani Małgorzaty Pac-Sosińskiej w zakresie tematyki objętej doktoratem, wykraczające daleko poza aspekty bezpośrednio związane z badaniami strukturalnymi. Przyjęło się jednak zachowywać racjonalne proporcje między wstępem teoretycznym a wynikami, które w ocenianej pracy są zdecydowanie zaburzone – 76 stron wstępu względem 55 stron samych wyników. W opinii recenzenta, biorąc pod uwagę fakt, że celem i efektem przeprowadzonych badań nie było kompletne określenie struktur lipidów A, zbyt dużo uwagi poświęcono strukturom różnych typów tych regionów LPS, począwszy od klasycznych lipidów entrobakteryjnych. Tak duży do opracowania materiał przełożył się na częste niedociągnięcia edytorskie i stylistyczne spotykane we Wstępie. Częstym przypadkiem jest brak rozwinięć skrótów na rycinach (np.: Ryc. 2, 25). Przyjęte jest, że opisy do tabel i rycin powinny być na tyle wyczerpujące, aby czytelnik nie musiał wspomagać się tekstem w interpretacji używanych symboli. Zwyczajowo po pierwszym użyciu pełnej nazwy gatunku powinno się stosować odpowiednie skróty (Patrz np.: str. 24, 36, Ryc. 2). Uwaga ta dotyczy również skrótów takich jak LPS, EPS, skróty dla reszt cukrowych (Glc, Gal, DAG, Fuc itp.). Inne drobne niedociągnięcia to nazwy genów pisane w niektórych przypadkach normalną czcionką (np.: str. 25). W pracy pojawiają się również skróty myślowe, wyrażenia anglojęzyczne lub elementy żargonu laboratoryjnego (np.: środowisko kwasowe, acetyl, „*Nod factor*”, GlcNate, O-polisacharyd, KPSy). Na części rycin zapożyczonych z piśmiennictwa nieprawidłowo zachowano opisy anglojęzyczne (np.: Ryc. 9, 14, 16). W opinii recenzenta nieprawidłowe jest użycie wyrażenia „domena LPS” (str. 28) w stosunku do oligocukru rdzenia czy antygeny O, gdzie lepszym słowem byłby np. „region”.



Podobnie określenia heptamer czy pentamer w odniesieniu do hepta- i pentasacharydu rdzenia zostały użyte nieprawidłowo (str. 40-41). Zidentyfikowano również drobne błędy w nomenklaturze zapisywania nazw reszt cukrowych: niestosowanie kursywy w opisie absolutnej konfiguracji cukrów czy podstawników „manno”, „glicero” (np. str. 31, Ryc. 15). Czy struktura na Ryc. 10 to na pewno produkt O-deacylacji LPS? Pewne problemy edytorskie w zakresie symboliki dla wskazania wiązań glikozydowych zdiagnozowano w Tabelach 5 i 7. Pomimo wskazanych niedociągnięć wynikających niewątpliwie z bardzo ambitnego podejścia Doktorantki do wstępu teoretycznego, tematyka Wstępu stanowiła bardzo ciekawą lekturę i z pewnością może posłużyć jako załączek do kolejnej pracy przeglądowej rodzimego laboratorium, które znane jest z propagowania tematyki cukrowych antygenów ryzobiów. Na pochwałę zasługuje również koncepcja zebrania najbardziej reprezentatywnych struktur antygenów ryzobiów w formie tabelarycznej. Na koniec oceny tej części pracy, pozwolę sobie poprosić Doktorantkę o rozwinięcie i stosowny komentarz do stwierdzenia ze str. 39, że „chemiczna analiza oligosacharydu rdzenia jest jednak dość utrudniona ze względu na występujące w nim podatne na obróbkę chemiczną reszty Kdo (...)”.

Po tak rozbudowanym wstępie Pani mgr Małgorzata Pac-Sosińska jasno formułuje cele swojej pracy doktorskiej, które dotyczą ustalenia struktur chemicznych polisacharydów O-swoistych LPS *O. lupini* LUP21^T i *O. cytisi* ESC1^T, glukanów tych symbiontów oraz wstępnych analiz składu i właściwości ich EPS. W opisie celów brakuje kilku zdań podsumowujących zasadność prowadzonych badań. Lektura Wstępu oraz piśmiennictwa wyraźnie pokazuje, że główną i zasadną przesłanką jest mała wiedza na temat struktur wybranych antygenów w obrębie rodzaju *Ochrobactrum*. Cele postawione w tym świetle wyraźnie demonstrują oryginalność podjętych badań i ich znaczenie dla głębszego zrozumienia interakcji wybranych symbiontów z roślinami.

Opis stosowanych Materiałów i Metod został poprawnie i wyczerpująco opisany. Rozdział ten niewątpliwie pokazuje jak szeroki wachlarz klasycznych i wyspecjalizowanych metod analitycznych opanowała doktorantka podczas realizacji swojej pracy doktorskiej. Do



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI 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

najważniejszych należy analiza jakościowa i ilościowa składników cukrowych, kwasów tłuszczowych oraz niecukrowych podstawników. Wśród metod instrumentalnych kluczową rolę odegrały analizy techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, spektroskopii NMR i spektrometrii mas MALDI-TOF. Małym mankamentem jest jedynie sporadyczny brak pewnego podejścia, które na etapie przygotowywania pracy doktorskiej jest dość pożądane – wyczerpujących opisów części procedur analitycznych, które umożliwiłyby powtórzenie tych analiz bez wspomagania się cytowaną literaturą (np. naważki materiału, objętości niektórych odczynników, czy sposób przygotowania próbki do pomiarów techniką FT-IR itp.). Jest ważną rolą recenzenta wskazać również na elementy żargonu laboratoryjnego: „wzrost do 150 °C” zamiast użycie wyrażenia „gradient temperatury” (str. 98) w opisie prowadzenia analiz metodą GC-MS. Dodatkowo część informacji zawartych w Materiałach i Metodach jest zbędna. Przykładowo, na poziomie pracy doktorskiej zbędne jest opisywanie sposobu otrzymywania 1M NaOH (str. 90).

W kolejnym rozdziale pracy przedstawiono jasno opisane i udokumentowane licznymi rycinami i tabelami wyniki. Badania są przykładem kompleksowej analizy strukturalnej bazującej na klasycznych metodach analizy węglowodanów i glikolipidów obejmujących analizy chemiczne i instrumentalne (spektrometrię mas i spektroskopię NMR, czy GC-MS). Pani mgr Małgorzata Pac-Sosińska postawiła sobie bardzo ambitny cel kompleksowego podejścia do analizy struktur bakteryjnych składników cukrowych mających znaczenie w tworzeniu przez ryzobia wyspecjalizowanych układów symbiotycznych. Nie dość, że na cel badań strukturalnych wybrała aż 3 typy tak mocno zróżnicowanych cząsteczek – LPS, EPS i peryplazmatyczne glukany, to dodatkowo cel ten postawiła sobie względem aż dwóch gatunków (szczepów) z rodzaju *Ochrobactrum*. Jeśli weźmiemy pod uwagę możliwość heterogenności frakcji, konieczność monitorowania kilku faz z ekstrakcji wodno-fenolowej (faza wodna, faza fenolowa, międzyfaza), niską rozpuszczalność EPS i inne czynniki warunkujące pełny obraz otrzymywanych preparatów, postawione do realizacji zadania z pewnością nie należały do prac rutynowych. W tym kontekście recenzenta nie dziwi fakt, że



część celów pośrednich została założona i osiągnięta w kompletnej formie, jak np. opisanie kompletnej struktury podjednostki łańcucha O-swoistego *O. cytisi* ESC1^T, które zaowocowało publikacją z pierwszym autorstwem Doktorantki (Pac M. i wsp. Carbohydr. Res. 2015). Struktura, a właściwie 2 różne struktury podjednostek łańcucha O-swoistego *O. lupini* szczepu LUP21^T nastęrczyła Doktorantce więcej trudności, gdyż co jest częstą cechą ryzobiów, uzyskane wyniki wskazały na obecność dwóch typów polisacharydów O-swoistych i labilny podstawnik – ketozydowo związaną D-*altro*-heptulozę, których wstępne struktury zaproponowano w przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej.

Doktorantka skrupulatnie przedstawiła większość wyników potwierdzających zidentyfikowaną strukturę dwucukrowej podjednostki O-PS w LPS *O. cytisi* ESC1^T charakteryzującej się niestechiometrycznymi podstawieniami grupą O-metylową i resztą pirogronową. Zidentyfikowana heterogenność pod względem niecukrowych podstawników była istotną trudnością analizy tej z pozoru prostej podjednostki antygeny O. Do ważniejszych uwag, które nasunęły mi się podczas czytania tej części wyników są: (i) pewne różnice w czasach retencji tych samych pochodnych cukrów na różnych chromatogramach (Ryc. 32 i 34); (ii) brak widma masowego dla schematu fragmentacji przedstawionego na Ryc. 33, (iii) mylące wprowadzenie określenia „*degradowany polisacharyd*” dla frakcji polisacharydów O-swoistych (frakcji A), które może sugerować degradację w obrębie poszczególnych podjednostek, (iv) brak informacji, jaką pochodną reprezentuje pik na chromatogramie z Ryc. 39 o t_R 25.72. Ponadto, skoro do analiz wybrano LPS izolowany z międzyfazy, to czy w oparciu o swoje wyniki Doktorantka może wyciągnąć jakieś wnioski co do różnic strukturalnych w odniesieniu do LPS izolowanych z fazy wodnej i fenolowej?

W kontekście badań nad O-PS *O. lupini* LUP21^T recenzent dostrzega trudności napotkane przez doktorantkę, które związane są z labilnym terminalnym podstawnikiem podjednostki antygeny O w postaci ketozydowo związanej heptulozy. Analiza tego typu struktur wymaga zastosowania dodatkowych metod analitycznych, stąd komentarza Doktorantki wymagają dalsze plany doświadczalne mające na celu ustalenie kompletnej



struktury opisanych podjednostek. W pracy nie wyjaśniono w jaki sposób wykluczono obecność di-, tri- i wyższych oligocukrów we frakcji C (str. 124). Czy uzyskano dla niej widma MALDI-TOF? Dodatkowo komentarza wymaga obserwacja poczyniona dla etapu ultrawierowania tego LPS. Czy w opinii Doktorantki etap ten był dobrze zoptymalizowany skoro większość składników antygeny O zidentyfikowano w supernatancie po wirowaniu? Czy pośród wyizolowanych frakcji możemy spodziewać się oligocukrów rdzenia LPS?

W dalszej części Doktorantka przedstawia rzetelny zestaw wyników (analizy chemiczne, widma masowe GC-MS i MALDI-TOF, analizy TLC) potwierdzający istnienie i struktury cyklicznych heterogennych glukanów przestrzeni peryplazmatycznej u obu badanych szczepów. W tej części brakuje wyjaśnienia, na jakiej podstawie założono obecność szorstkiej frakcji LPS w preparacie glukanu szczepu *O. cytisi* (Ryc. 52). Część dotyczącą badań strukturalnych kończy wstępna analiza EPS izolowanych od obu badanych szczepów.

Należy nadmienić, że EPS i glukany stały się przedmiotem analiz, które można określić jako pilotowe i wymagające dalszych badań strukturalnych. Przedstawiona do oceny praca nie obejmuje analizy strukturalnej regionów rdzeniowych i lipidów A badanych LPS. Jest to zrozumiałe z racji położenia nacisku na analizy wysokocząsteczkowych frakcji polisacharydowych. Skoro jednak Doktorantka zamieściła w pracy część Wyników opisujących kompleksowe analizy obu LPS pod kątem zawartości kwasów tłuszczowych i reszt cukrowych obecnych w lipidzie A, pewien niedosyt recenzenta budzi brak wykonania podstawowych widm masowych lipidów A badanych LPS i ich wstępnej interpretacji, które pokazałyby zapewne interesującą heterogenność badanych preparatów i były ważnym uzupełnieniem pracy. Komentarza Doktorantki wymaga kilka dodatkowych aspektów Wyników. Jakie przesłanki kierowały Doktorantką przy wyborze frakcji do analiz chemicznych? Uwagę zwraca fakt, że w przypadku *O. cytisi* badania składu prowadzono na jednej frakcji LPS, a w przypadku *O. lupini* analizom poddano LPS fazy wodnej, fenolowej, międzyfazy i supernatantu po ultrawierowaniu.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI 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

Dopełnieniem badań strukturalnych jest wstępna ocena właściwości sorpcyjnych badanych szczepów względem jonów kadmu i ołowiu. Ta część wyników ma charakter ściśle pilotażowy, łącznie z próbami ustalenia metodą FT-IR grup funkcyjnych zaangażowanych w wiązanie tych metali ciężkich przez EPS.

Przedłożoną do oceny pracę wieńczy zwięzła dyskusja polegająca w głównej mierze na zestawieniu otrzymanych wyników z danymi opublikowanymi dla innych gatunków ryzobiów. Wnioski skonstruowano prawidłowo zwracając uwagę na kompletne wyniki analiz i elementy o charakterze analiz wstępnych. W opinii recenzenta cele pracy doktorskiej założone przez Panią Małgorzatę Pac-Sosińską zostały osiągnięte. W tego typu opracowaniach wątpliwości może budzić fakt włączenia do pracy wyników cząstkowych, które wymagają dalszych prac doświadczalnych w celu ustalenia kompletnych struktur badanych antygenów. Argumentem, który broni jakości i oryginalności przeprowadzonych badań jest fakt, że założona liczba i różnorodność cząsteczek wybranych do charakterystyki strukturalnej niewątpliwie przekracza pojemność jednej pracy doktorskiej, a wybrane gatunki charakteryzowane są pod tym kątem po raz pierwszy.

Podsumowując stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty, a część wyników zostało opublikowana w postaci pracy oryginalnej. Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Pac-Sosińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Tulwiniewicz