

dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG

Gdańsk, dnia 21.09.2021r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Marceliny Dworaczek

pt. „Strukturalna i immunochemiczna charakterystyka polisacharydów O-swoistych

Aeromonas sp. serogrupy O6”

Praca doktorska została przygotowana pod opieką dr hab. Anny Turskiej-Szewczuk, prof. UMCS, w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Pałeczki *Aeromonas* są najczęściej identyfikowanymi bakteriami wywołującymi zakażenia ryb hodowlanych nie tylko w Polsce, ale praktycznie w całej Centralnej Europie. Bakterie *Aeromonas*, powodując choroby MAI/MAS (motile *Aeromonas* infection / motile *Aeromonas* septicaemia), znacząco przyczyniają się do zwiększenia śmiertelności w populacjach karpia i pstrąga, a przez to do istotnych strat ekonomicznych. Najważniejszym etapem w początkowej fazie zakażenia jest adhezja bakterii do tkanek ryby. Bakterie przylegają do tkanek żywiciela, zmieniają jego mechanizmy obronne i inicjują kolonizację. Za proces ten odpowiedzialne są liczne struktury znajdujące się na powierzchni bakterii w tym lipopolisacharydy (LPS).

Praktycznie każda hodowla zwierząt, w tym i oczywiście ryb, prowadzona „na skalę przemysłową” narażona jest na duże ryzyko związane z pojawieniem się zakaźnych chorób bakteryjnych. Stosunkowo prostym, ale zdecydowanie nie najlepszym rozwiązaniem jest podanie antybiotyków, czy wręcz hodowla ryb w osłonie antybiotykowej. Jak powszechnie wiadomo takie rozwiązanie prowadzi do problemu nadużywania antybiotyków w hodowlach zwierząt i wynikających z tego konsekwencji. W związku z tym ewentualne leczenie powinno być zastąpione profilaktyką, a w przypadku chorób wywołanych przez bakterie immunoprofilaktyką. W wielu sytuacjach praktycznie niemożliwe jest dobranie odpowiedniej

szczepionki, ze względu na bardzo dużą różnorodność szczepów bakteryjnych i ich stosunkowo lokalne występowanie. W takich przypadkach celowe jest przygotowanie autoszczepionek opartych na bazie szczepów występujących w danym rejonie. Szczepionki przygotowane na bazie całych komórek bakteryjnych, białkach błony zewnętrznej lub LPS-ach zwiększają odporność na zakażenia danymi bakteriami. Do przygotowywania szczepionek stosunkowo często wykorzystuje się O-antygeny „będące fragmentem” LPS-u.

W opisaną problematykę bardzo dobrze wpisują się badania przeprowadzone przez mgr Katarzynę Marcelinę Dworaczek podczas przygotowania rozprawy doktorskiej.

Recenzowana praca nie została napisana w klasyczny sposób, lecz zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) jest spójnym tematycznie zbiorem artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, uzupełnionym opisem podjętej tematyki i uzyskanych wyników.

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w dwóch oryginalnych publikacjach naukowych oraz jednej pracy przeglądowej dotyczącej wykorzystania magnetycznego rezonansu jądrowego w analizie polisacharydów bakteryjnych:

1. **Dworaczek Katarzyna**, Kurzylewska Maria, Karaś Magdalena A., Janczarek Monika, Pękala-Safińska Agnieszka, Turska-Szewczuk Anna. A unique sugar L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose) is a compound building two O-chain polysaccharides in the lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila* strain JCM 3968, serogroup O6. *Marine Drugs*, 2019, 17(5), 254. IF₂₀₁₉: 4,073 Punkty MNiSW₂₀₁₉: 100.
2. **Dworaczek Katarzyna**, Drzewiecka Dominika, Pękala-Safińska Agnieszka, Turska-Szewczuk Anna. Structural and serological studies of the O6-related antigen of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* strain K557 isolated from *Cyprinus carpio* on a Polish fish farm, which contains L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose), a unique sugar characteristic for *Aeromonas* serogroup O6. *Marine Drugs*, 2019, 17(7), 399. IF₂₀₁₉: 4,073 Punkty MNiSW₂₀₁₉: 100.
3. **Dworaczek Katarzyna**, Kurzylewska Maria, Turska-Szewczuk Anna. Interpretacja widm magnetycznego rezonansu jądrowego polisacharydów bakteryjnych. *Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie*. ISBN 978-83-227-9370-1. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2020. Punkty MNiSW₂₀₂₀: 20.

Zasadnicza część pracy doktorskiej liczy 38 stron i rozpoczyna się od wykazu skrótów stosowanych w rozprawie oraz od streszczeń w języku polskim i angielskim, które dobrze opisują zawartość rozprawy doktorskiej.

Pierwszym numerowanym rozdziałem jest liczący 6 stron *Wstęp*, w którym Doktorantka charakteryzuje bakterie *Aeromonas* sp., krótko przedstawia dotychczasowe informacje na temat lipopolisacharydów i jego elementów strukturalnych wyizolowanych z bakterii *Aeromonas* sp. oraz opisuje zagadnienia dotyczące immunoprofilaktyki, jako metody alternatywnej dla antybiotykoterapii. Tematyka poruszona we *Wstępie* jest ściśle związana z badaniami opisanymi w dalszych częściach rozprawy doktorskiej. Fragment ten napisany jest bardzo przystępnie i zawiera liczne odnośniki literaturowe.

Kolejnym rozdziałem jest *Hipoteza i cel pracy*. Celem podjętych badań było strukturalne i immunochemiczne scharakteryzowanie lipopolisacharydów oraz antygenów O-swoistych bakterii *Aeromonas* należących do serogrupy O6, z wykorzystaniem metod chemicznych, spektroskopowych oraz serologicznych. Zaplanowano również wykorzystanie wyników badań do wytypowania szczepów reprezentujących serogrupę O6 jako składników poliwalentnej szczepionki dedykowanej dla gospodarstw rybackich na terenie Polski, która w dłuższej perspektywie znajdzie zastosowanie w profilaktyce infekcji MAI i posocznicy MAS karpia.

Trzeci rozdział zatytułowany *Omówienie wyników z uwzględnieniem zastosowanych metod badawczych* stanowi w zasadzie zwarte przedstawienie wyników zawartych w obu pracach. Nie mam w zasadzie większych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace to zostały bowiem gruntownie ocenione przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. W rozdziale tym można wyróżnić cztery zasadnicze części:

- charakterystyka LPS-ów szczepów *A. hydrophila* JCM3968 i *A. veronii* bv. *sobria* K557 – ze szczegółowym opisem pochodzenia szczepów bakterii, hodowli bakterii, izolacji LPS oraz jego analizy za pomocą elektroforezy;
- badania serologiczne - analizy immunochemiczne obu LPS-ów techniką Western blotting oraz testem immunoenzymatycznym ELISA;
- analiza chemiczna i strukturalna LPS szczepów *Aeromonas* z wykorzystaniem GC-MS oraz MALDI-TOFF;

- badania strukturalne polisacharydów O-swoistych z wykorzystaniem GC-MS oraz NMR.

W rezultacie przeprowadzonych badań Doktorantka uzyskała szereg interesujących wyników, z których najważniejsze zostały wymienione poniżej.

- Kompozycja rdzenia LPS:

JCM3968 - $\text{Hep}_6\text{Hex}_1\text{HexN}_2\text{Kdo}_{anh}\text{P}$

K557 - $\text{Hep}_6\text{Hex}_2\text{HexN}_1\text{Kdo}$

- Skład kwasów tłuszczowych w lipidzie A:

zbliżony skład w obu szczepach: dominujące kwas 3-hydroksytetradekanowy [$\text{C}_{14}:0(3\text{-OH})$] i dodekanowy ($\text{C}_{12}:0$), również obecny kwas 3-hydroksyzopentadekanowy [$\text{C}_{15}:0(3\text{-OH})$], dodatkowo w szczepie K557 nasycony kwas tetradekanowy ($\text{C}_{14}:0$).

- Skład cukrowy:

na szczególne podkreślenie zasługuje zidentyfikowanie przez Doktorantkę 4-amino-4,6-dideoksy-mannozy należącej do szeregu konfiguracyjnego L (L-perozamina), która dotychczas, jako składnik polisacharydów O-swoistych bakterii Gram-ujemnych, zawsze była przypisywana do szeregu konfiguracyjnego D.

- Struktura jednostek powtarzalnych O-polisacharydów:

w każdym ze szczepów stwierdzono obecność dwóch różnych O-polisacharydów, przy czym jeden z nich (zbudowany tylko z reszt $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow$) był zidentyfikowany w LPS-ach obu szczepów, natomiast drugi z nich różnił się obecnością reszty $\alpha\text{-D-GalpNAc}$ oraz innymi podstawieniami dwóch reszt cukrowych.

JCM3968 –

$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow$

$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow$

K557 –

$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow$

$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow$

- Wyniki badań immunochemicznych:

zasugerowano podział serogrupy O6 na dwie podgrupy:

O6a - dla szczepów posiadających w antygenie O szerszy zakres dwucukrowych epitopów: $\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc}$, $\alpha\text{-L-Rhap4NAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap4NAc}$

oraz $\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc - jako szczep referencyjny zaproponowano *A. hydrophila* JCM3968,

O6b - dla szczepów zawierających jedynie determinanty antygenowe: α -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap4NAc oraz α -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap4NAc - jako szczep referencyjny zaproponowano *A. veronii* bv. *sobria* K557.

Podsumowując ten fragment pracy należy stwierdzić, iż wszystkie postawione cele zostały przez Doktorantkę zrealizowane.

Bardzo ważnym rozdziałem w rozprawie jest *Dyskusja*, w którym Doktorantka wyniki swoich badań porównuje z doniesieniami literaturowymi. Kolejne części to *Podsumowanie i wnioski* oraz licząca 67 pozycji *Literatura*. Integralną częścią rozprawy są również 3 publikacje wchodzące w skład opisywanego w pracy cyklu.

Praca zakończona jest oświadczeniami współautorów, z których wynika, iż udział Doktorantki w przeprowadzonych badaniach sięga 65-67 % w przypadku prac oryginalnych i aż 90 % w przypadku pracy przeglądowej. Warto tutaj wspomnieć, iż w ocenie należy brać pod uwagę nie „oszacowany udział procentowy”, a rzeczywisty wkład, w postaci opisu wykonanych konkretnych działań przez poszczególnych współautorów. Nie ulega wątpliwości, iż udział Doktorantki w powstaniu wszystkich prac był wiodący.

W ramach uzupełnienia należy dodać, iż dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący i składa się z 7 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach z tzw. listy JCR. Na podkreślenie zasługuje najnowsza publikacja Doktorantki, która dotyczy strukturalnych badań lipopolisacharydu wyizolowanego z bakterii *Aeromonas veronii* bv. *sobria* strain K133 i wydaje się, iż z powodzeniem mogłaby znaleźć się w cyklu prac będących podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Pracę przeczytałem z przyjemnością. Jest ona napisana logicznie, poprawnie gramatycznie, a formatowanie tekstu jest bardzo dobre. Tekst zawiera nieliczne „literówki”, których nie warto przytaczać w recenzji (zaznaczone w pracy). Chciałbym zwrócić tylko uwagę na użyte w pracy sformułowania „silne/wyższe/słabsze pole” w odniesieniu do położenia sygnałów na widmach NMR. Wyrażenia te bywają ciągle wykorzystywane w literaturze (high-field, low-field), ale nawiązują do nieużywanego już od wielu lat sposobu rejestracji widm, przez co są niezrozumiałe dla osób niezorientowanych w fizycznych podstawach NMR. Moim zdaniem lepiej jest posługiwać się określeniami „duże/małe wartości przesunięć chemicznych”.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Zawiera wiele elementów nowości naukowej, wnosi oryginalny wkład do wiedzy o strukturze LPS-ów i polisacharydów O-swoistych wyizolowanych ze szczepów *A. hydrophila* JCM3968 i *A. veronii* bv. *sobria* K557 oraz o ich potencjalnym wykorzystaniu w produkcji szczepionek. Doktorantka wykazała się rozległą znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane. Sprawnie posługuje się technikami separacyjnymi i spektroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do wyizolowania LPS-ów, otrzymania polisacharydów O-swoistych, a następnie określenia ich struktury chemicznej. Ponadto wykorzystuje szereg metod do immunochemicznej charakterystyki badanych LPS-ów.

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 powyższym **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Katarzyny Marceliny Dworacek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

2. Kaczmarski