Wydział Chemii
Zakład Fizyki Chemicznej
Zespół Obrazowania Ramanowskiego
www2.chemia.uj.edu.pl/zor/

Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków
Grupa Badawcza Spektroskopii Ramanowskiej
http://www.jcet.eu/

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Małgorzata Barańska
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel.+48 12 686 2389
m.baranska@uj.edu.pl

Kraków, 2 września 2023

Recenzja pracy doktorskiej

Wpływ zmian w składzie błony zewnętrznej Agrobacterium tumefaciens na proces infekcji roślin na modelu pomidora

wykonanej przez Panią Katarzynę Suśniak
pod opieką promotorską Pani dr hab. Iwony Komanieckiej, prof. UMCS

Agrobacterium tumefaciens to bakteria glebowa, która ma zdolność transformowania roślin, co może prowadzić do ich choroby, ale jest też wykorzystywane do kontrolowanej modyfikacji genetycznej. Patogeniczne działanie tej bakterii objawia się w postaci guzowatych narośli, które są wynikiem transformacji komórek i ich wymuszonego podziału. Transformacja komórek wynika ze zdolności *A. tumefaciens* do przenoszenia fragmentu swojego DNA (T-DNA) do wnętrza komórki roślinnej. Biotechnologia wykorzystuje powszechnie zmodyfikowane szczepy *A. tumefaciens* do transformowania roślin cząsteczkami DNA o zadanej, pożądanej sekwencji. Skład zewnętrznej błony zmodyfikowanej bakterii może mieć wpływ na jej patogenne działanie i właśnie ta kwestia stanowiła motywację badań podjętych w recenzowanej pracy.

Praca była wykonana w ramach projektu OPUS z Narodowego Centrum Nauki oraz projektu dla Młodych Naukowców finansowanego przez Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Recenzowana rozprawa napisana jest w języku polskim na 114 stronach maszynopisu, dodatkowo załączono Aneks zawierający życiorys naukowy Doktorantki. Układ pracy jest klasyczny, otwiera go *Streszczenie i Abstract,* po czym jest *1. Wstęp, 2. Cel pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, 7. Bibliografia, 8. Spis rycin, 9. Spis tabel.*

Wstęp to ogólna charakterystyka *Agrobacterim tumefaciens* od strony biologicznej i jej biotechnologicznego wykorzystania, po czym opisany jest skład lipidowy jej zewnętrznej błony. Lipidy błonowe to m.in. fosfatydyloetanolamina, fosfatydylocholina, kardiolipina, fosfatydyloglicerol. Kluczowym składnikiem są też lipopolisacharydy, których strukturę opisała Doktorantka. Następnie omówione zostały pokrótce metody spektroskopowe, wykorzystywane w pracy, tj. obrazowanie metodą spektrometrii mas (MALDI MSI), obrazowane metodą spektroskopii absorpcyjnej FT-IR, oraz mikroskopia ramanowska. Czytając tę część odczuwałam niedosyt informacji połączony z dość ogólnikowym opisem poszczególnych technik.

Cel pracy został sformułowany jako zbadanie czy zmiany w składzie błon lipidowych *A. tumefaciens* mają wpływ na proces infekcji roślin. Wytypowano do badań szczep dziki i dwa mutanty bakterii. Celem szczegółowym było określenie składu mikrobiomu rośliny zdrowej oraz rośliny zarażonej. Tę część kończy opis izolacji DNA bakteryjnego z tkanek zakażonych roślin oraz bardzo krótki opis stosowanych narzędzi bioinformatycznych.

Następnie przedstawiono szczegółowo stosowane szczepy bakteryjne, odczynniki, warunki hodowli bakterii i przygotowania preparatów do badań, oraz warunki prowadzenia pomiarów.

Wyniki i *Dyskusja* opisane są na stronach 52-102, zostały podzielone na 2 części. Część I obejmuje analizę elektroforetyczną mutantów, zmian struktury kalusa i ich zdolności do zakażania. Część II to analiza zmian w mikrobiomie pomidora po zakażeniu *A. tumefaciens* metodami klasycznymi oraz sekwencjonowaniem materiału genetycznego.

Zastąpienie kwasu 27-OH-28:0 krótszym kwasem tłuszczowym 16:0 lub 18:0 w zewnętrznej błonie bakterii miało niewielki wpływ na wirulencję. Ponadto, wiedząc jakie znaczenie w tym procesie odgrywa fosfatydylocholina, zbadano wpływ fosfatydyloetylenoaminy. Badania Doktorantki pokazały, że odpowiednie mutacje (*pssA* w locus *Atu1062* i *acpXL-msbB*) pozwalają na wniknięcie bakterii do skaleczonej tkanki, ale nie prowadzą do efektywnej transformacji komórek (kalus jest szczątkowy). Odpowiedź rośliny na zakażenie monitorowano metodami obrazowania spektroskopowego (MALDI, spektroskopia FT-IR i ramanowska). Do analiz MALDI wykorzystano rosliny na różnym etapie dojrzewania i utworzono mapy dystrybucji wielu metabolitów, m.in. glutaminianu, monofosforanu adenozyny, jabłczanu, alfa-tomatyny i esculeosidu. Podobne analizy wykonano dla kalusa i zainfekowanej łodygi pomidora. Analizy spektralne pokazały wysokie nagromadzenie alfa-tomatyny w tkance kalusowej indukowanej szczepem dzikim, zaś mniejsze w tkankach infekowanych mutantami. Podobną obserwację zanotowano dla dehydrotomatyny, inne metabolity występowały w kalusie na niskim poziomie. Ciekawym aspektem badań było śledzenie dynamiki zmian w tkance zakażonej patogenem. Klasyczne techniki pokazały tendencję zmian mikrobiomu, zmianę równowagi pomiędzy Gram-

dodatnimi i Gram-ujemnymi bakteriami, na rzecz tych pierwszych. Końcowe analizy wykonano metodą MALDI Biotyper.

Wnioski zamykają zasadniczą część pracy i obejmują 9 punktów. Doktorantka stwierdza tu m.in., że zmodyfikowana bakteria wciąż jest zdolna do infekowania roślin i formowania kalusa, choć słabiej w porównaniu do zakażenia dzikim szczepem. Stwierdzono zwiększoną syntezę alfa-tomatyny jako mechanizmu obronnego rośliny. Punkty 4 i 5 nie są dla mnie w pełni zrozumiałe, ale o tym pisze później w **Uwagach Szczegółowych**. Podsumowanie obejmujące szczegółowe zmiany mikrobiomu pomidora pod wpływem zakażenia to ważny wniosek tej pracy.

UWAGI SZEGÓŁOWE

Poniżej wymieniam kilka pytań, komentarzy i uwag, które nasunęły mi się podczas czytania rozprawy:

1/ Doktorantka składa podziękowania wielu osobom za wykonanie pomiarów, analiz, i widząc tę długą listę nasuwa się pytanie, które pomiary i analizy wykonała Doktorantka sama?

2/ Doktorantka używa w pracy skrótowych określeń, czasem żargonowych, np. techniki Ramana (str.102), jak sądzę chodzi o techniki spektroskopii ramanowskiej a nie o techniki Pana Ramana? Pisząc o spektroskopii ramanowskiej, czasem „ramanowska" jest małą literą, a czasem wielką. Ponieważ to przymiotnik to piszemy małą literą, choć oczywiście powszechnie też używa się określenia "spektroskopia Ramana" (ale nie spektroskopia Ramanowska). Kolejny przykład skrótu myślowego to np. opis Rys 23. (str.65), gdzie Doktorantka pisze, że „dystrybucja wybranych pasm w tkankach jest podoba" - w tkankach nie ma pasm.

3/ Z pracy dowiadujemy się, że badania wykonano w ramach projektu OPUS, ale nie podano kto jest/był jego kierownikiem.

4/ Praca wydaje się grubsza niż jest, bo strony 23-57 powtarzają się w pracy. To dość duży błąd edytorski, mniejsze też się pojawiają, np. brak przecinków, zlepione wyrazy, wyrazy pisane wielką litera po „tzw." (np. str. 34)

5/ Doktorantka podała spis swoich staży naukowych i konferencji, na jednej i drugiej liście pojawia się ta sama pozycja, pobyt w Dubrowniku. Czy był to staż naukowy czy udział w konferencji międzynarodowej?

6/ Lista publikacji własnych Doktorantki jest długa, ale w większości są to prace wydawnictwa MDPI lub TYGIEL, co do których ostatnio pojawiło się wiele kontrowersji. Jaki był powód wyboru publikowania głównie w tych oficynach?

7/ Wniosek nr 5 (str. 102) jest niezrozumiały, prosiłabym o szersze wyjaśnienie. Zaś wniosek nr 4 mówiący o „mniejszych zmianach w rozmieszczeniu przestrzennym tomatyny…w tkance tumorowej i w łodydze w porównaniu do szczepu dzikiego" jest moim zdaniem zbyt daleko idący. Pomiary wykonywano na małych fragmentach próbek, odmienne rozmieszczenie tomatyny czy innych metabolitów nie musi być wskaźnikiem zmian, w moim odczuciu to przypadkowe fragmenty tkanek i przypadkowe rozmieszczenie składników.

8/ Czy dobrze zrozumiałam, że w badaniach wykorzystano 3 skrawki każdej zdrowej rośliny (N=30) oraz zainfekowanej (N=3)? Dlaczego N dla zainfekowanych roślin było tak małe?

9/ Analiza widm uzyskanych metodą spektroskopii absorpcyjnej FT-IR oraz ramanowskiej oparta na integracji wybranych zakresów spektralnych może być obarczona błędem, jeśli widma nie zostały odpowiednio przygotowane wcześniej. Np. próbki mogły się różnić zawartością wody, co miałoby wpływ zarówno na zakres wysokich liczb falowych jak i tych wybranych dla Amidu. Wydaje się, że liczenie stosunku pasm byłoby bezpieczniejsze.

10/ Opis stosowanych narzędzi bioinformatycznych jest bardzo zwięzły, stosowana metoda UPGMA wymieniona jest tylko z nazwy. Proszę omówić ją szerzej i czym podyktowany był wybór? Czy testowała Pani również inne metody?

11/ Rozdział *Spektroskopia ramanowska* (str. 34) zawiera stwierdzenie, że po odfiltrowaniu promieniowania elastycznego „reszta zebranego światła jest rozpraszana na detektorze". Światło jest rozpraszane na próbce, nie na detektorze. Podobnie nie jest dla mnie zrozumiałe inne stwierdzenie w tym samym rozdziale, że „Światło lasera oddziałuje… powodując przesuniecie energii fotonów laserowych w górę lub w dół stanów energetycznych."

12/ Nie rozumiem dlaczego rozdziały 4.3.2. *Obrazowanie tkanki kalusa techniką spektroskopii FT-IR* i 4.3.3 *Obrazowanie tkanki kalusa techniką spektroskopii Ramana* są podrozdziałami 4.3. *Analiza tkanki kalusa technika spektrometrii mas MALDII MS*. To trzy niezależne techniki. Ponadto, brakuje tych rozdziałów w spisie treści.

13/ Dlaczego Doktorantka wybrała do analizy celulozy tylko zakres 1478-1439 cm^{-1} (str. 66) podczas gdy ma ona bardzo charakterystyczny dublet ok. 1090-1120 cm^{-1}?

14/ Zaskakuje mnie stwierdzenie, że „w tkance zakażonej szczepem dzikim pasma Amidu I są skoncentrowane w konkretnych punktach, natomiast w pomidorach zakażonych mutantami są bardziej rozproszone w całej tkance". Czy Doktorantka sugeruje, że w jednej tkance białka występują lokalnie a w drugiej globalnie?

Choć powyższa lista jest długa to i tak nie obejmuje wszystkich pytań jakie mi się nasunęły czytając pracę, ale jest polem do dyskusji, która mam nadzieje będzie miała miejsce na obronie. Wiele z tych kwestii wynika z niezbyt precyzyjnego opisu lub skrótu myślowego, inne mam nadzieję będą wskazówką na przyszłość.

PODSUMOWANIE

Mimo wielu pytań i uwag, które wymieniam, rozprawę Pani Katarzyny Suśniak oceniam pozytywnie. Uważam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim. Jest to praca interdyscyplinarna, na pograniczu biologii, biotechnologii i chemii. Wymagała rozległej wiedzy i umiejętności, jak również współpracy z wieloma laboratoriami. Doktorantka świetnie sobie z tym poradziła, widać, że swobodnie porusza się w zakresie zagadnień biotechnologicznych, sięga po odpowiednie, sprawdzone metody (MALDI), ale też stosuje nowatorskie podejścia (obrazowanie metodami spektroskopii oscylacyjnej). Te ostatnie traktowałabym jako tzw. *proof-of concept*, oczekując, że badania zostaną rozszerzone i pogłębione, zarówno pod katem ilości zmierzonego materiału jak i metod analizy.

Dorobek naukowy jest bogaty, niedosyt pozostawia fakt, że Doktorantka publikuje głównie w czasopismach wydawnictwa MDPI i TYGIEL, które mimo dość wysokiego współczynnika oddziaływania nie są powszechnie rekomendowane. W pracach tych Doktoranta zajmuje czasem pozycje pierwszą, co pokazuje jej wiodącą rolę, w innych pracach jest jednym z wielu współautorów. Pani Suśniak jest też współautorem patentu przyznanego w roku 2021.

Podsumowując, uważam, że złożona rozprawa spełnia w pełni wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku, prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami)* i wnioskuję do Rady Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani Katarzyny Suśniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Barańska