

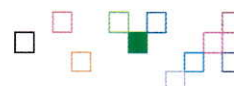
Lublin, 31.05.2023

dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS  
Katedra Genetyki i Mikrobiologii  
Instytut Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin  
e-mail: [iwona.komaniecka@mail.umcs.pl](mailto:iwona.komaniecka@mail.umcs.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kowalczyk,  
pt.: „Struktury chemiczne O-polisacharydów wybranych szczepów bakterii z rodzajów  
*Dickeya* i *Pectobacterium*”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Kowalczyk została wykonana w Pracowni Biochemii Strukturalnej, w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, prof. UG.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę trzech spójnych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w renomowanym czasopiśmie Carbohydrate Research, (wydawnictwo Elsevier), znajdującym się na liście JCR, o aktualnym współczynniku oddziaływania  $IF = 2.975$  pkt. Pierwsza z przedstawionych prac ukazała się w roku 2020, druga w roku 2022, zaś trzecia to publikacja najnowsza, datowana na rok 2023. Zamieszczone w rozprawie kopie ww. artykułów poprzedza kilka dość obszernych rozdziałów o układzie typowym dla klasycznych rozpraw doktorskich, a mianowicie (tytuły poszczególnych rozdziałów podaję wg oryginalnego brzmienia w pracy): 1) **Wstęp literaturowy** stanowiący wprowadzenie do tematyki badawczej, 2) **Cel pracy**, 3) **Część eksperymentalna**, w której opisano stosowane metody i techniki badawcze, 4) **Część wynikowa**, w której szczegółowo opisano tok badań w oparciu o wyniki zamieszczone w publikacji nr 3 (Załącznik D3), 5) **Dyskusja**, będąca zbiorczym opisem struktur O-PS-ów dotychczas opisanych dla rodzaju *Pactobacterium* oraz *Dickeya*, wraz z opisem zidentyfikowanych unikalnych reszt cukrowych;



6) **Streszczenie** rozprawy doktorskiej, 7) **Abstract**, oraz 8) **Bibliografię**. Do rozprawy dołączono również wykaz stosowanych skrótów, a także oświadczenia współautorów opublikowanych prac. Ponadto, na końcu rozprawy zamieszczono wykaz dorobku naukowego Doktorantki, który nie podlega ocenie, ale stanowi przydatną informację o dotychczasowej aktywności naukowej Pani mgr Agnieszki Kowalczyk. Rozprawa została napisana zwięźle, poprawnym językiem i starannie opracowana edytorsko.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy są wieloautorskie, przy czym pierwsza i druga praca została wykonana przez 7 autorów, natomiast trzecia przez 4 autorów. We wszystkich pracach Pani mgr A. Kowalczyk jest pierwszym autorem, co wskazuje, że była Ona głównym wykonawcą opisanych badań. W żadnej z tych prac Pani mgr A. Kowalczyk nie jest autorem korespondencyjnym.

Według zapisu zawartego w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku, prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami), rozprawę doktorską może stanowić „...zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych”. Wg załączonych oświadczeń Doktorantki oraz współautorów ocenianych prac, Doktorantka odegrała dominującą rolę w wykonaniu części eksperymentalnej opisanych w nich badań, a także miała znaczący wkład w analizę i interpretację uzyskanych wyników.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, uważam, że włączenie tych prac do rozprawy było uprawnione.

W ocenianej rozprawie badaniom poddano preparaty polisacharydów O-swoistych wyizolowane z wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, zasiedlających środowiska wodne. Bakterie te to groźne fitopatogeny powodujące choroby prowadzące do obumierania roślin. Należą one do rodziny *Pectobacteraceae* (SRP, ang. Soft Rot *Pectobacteraceae*), grupującej bakterie produkujące i wydzielające do otoczenia enzymy pektynolityczne i celulolityczne. Drobnoustroje te powodują choroby zwane czarną nóżką (ang. *black leg*) oraz mokrą zgnilizną (ang. *soft rot*) ziemniaka, a także wielu innych roślin uprawnych (w tym: zbóż i warzyw, m.in. pomidorów, cykorii, karczochów, kukurydzy, ananasa, bananowca, tytoniu, ryżu) oraz roślin ozdobnych, takich jak: chryzantemy, goździki, fiołki, pelargonie; na całym świecie, przyczyniając się do znacznych strat w uprawach. Bakterie z rodzaju *Dickeya*, początkowo izolowane głównie w regionach tropikalnych, obecnie są także notowane w regionach klimatu umiarkowanego, m.in. z powodu zmian klimatycznych, ale być może również zostały zawleczone wskutek gwałtownego rozwoju transportu i międzynarodowego handlu. Te fitopatogeny powodują

rozległe szkody przede wszystkim w uprawach ziemniaków, przyczyniając się do ogromnych strat gospodarczych i ekonomicznych. Bakterie z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* są zdolne do penetracji tkanki żywiciela dzięki wydajnej produkcji enzymów degradujących ścianę komórkową roślin, m. in. enzymów pektynolitycznych, celulozylitycznych, proteolitycznych i lipolitycznych. Ważnym czynnikiem wirulencji tych Gram-ujemnych bakterii jest także lipopolisacharyd (LPS), który ogrywa istotną rolę w adhezji bakterii do tkanki roślinnej oraz w oddziaływaniu na mechanizmy obronne rośliny-gospodarza. Znajomość struktury OPS tych fitopatogenów może przyczynić się do poznania mechanizmów oddziaływań roślina-bakteria, co z kolei może w dalszej perspektywie prowadzić do opracowania nowych metod identyfikacji patogenu, specyficznych dla gatunku, np. szybkich testów diagnostycznych (typowanie serologiczne), a następnie, do opracowania skutecznych metod zwalczania patogenów i zapobiegania infekcjom roślin uprawnych. Szybka identyfikacja drobnoustroju chorobotwórczego może z kolei przyczynić się do ograniczenia strat ekonomicznych na plantacjach roślin uprawnych podatnych na zakażenia.

Doktorantka podjęła się trudnego zadania zbadania struktur powierzchniowych tych fitopatogenów. Zaplanowane badania zostały wykonane w Zespole świetnie do tego przygotowanym i posiadającym wieloletnią, ugruntowaną publikacjami tradycję analiz struktur powierzchniowych bakterii - w Pracowni Biochemii Strukturalnej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, prof. UG i we współpracy z Zespołem Pani prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie struktur chemicznych polisacharydów O-swoistych (OPS-ów) - fragmentów LPS najbardziej wyeksponowanego do środowiska, dla wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*. Są to: *D. aquatica* IFB0154 I IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *P. aquaticum* IFB5637 oraz *P. versatile* IFB5636. Wszystkie szczepy zostały wyizolowane ze środowisk wodnych. Badania prowadzono z zastosowaniem analiz chemicznych i zaawansowanych technik spektroskopowych (2D NMR). Takie postępowanie pozwoliło na określenie szczegółowych struktur chemicznych powtarzających się podjednostek w polisacharydach O-swoistych wchodzących w skład lipopolisacharydu badanych szczepów.

W pierwszym artykule (Załącznik D1) zaprezentowanym w rozprawie, zatytułowanym: "The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species" Doktorantka szczegółowo opisała strukturę powtarzającej się podjednostki łańcucha O-swoistego LPS szczepu *Dickeya aquatica* IFB0154, zbudowanego z dwóch reszt cukrowych: fukozy ( $\alpha$ -D-Fucp),



podstawionej w pozycji 3, oraz ramnozy ( $\alpha$ -L-Rhap), podstawionej w pozycji 4. Reszty ramnozy są częściowo *O*-acetylowane (w 70-ciu %), w pozycji C-2 (40%) lub w pozycji C-3 (30%). Jak wykazała Doktorantka w części opisowej rozprawy, dwa inne szczepy bakterii należące do rodzaju *Dickeya*: *D. lacustris* IFB8647 i *D. aquatica* IFB0694 mają strukturę chemiczną OPS bardzo podobną do struktury określonej dla szczepu *D. aquatica* IFB0154, różni je jedynie stopień *O*-acetylacji: w szczepie *D. aquatica* IFB0694 wynosi on 30% (po 15% dla pozycji C-2 i C-3), natomiast w szczepie *D. lacustris* IFB8647 stwierdzono brak ugrupowań *O*-acetylowych. Ponadto, w omawianym artykule zamieszczono informację, że OPS-y wyizolowane ze szczepów *D. dianthicola* IFB0485 i *D. zea* IPO946 posiadają odmienną strukturę od tej opisanej dla *D. aquatica* IFB0154 ale identyczna z tą opisaną dla szczepów *D. solani* and *D. dadantii* 3937. Jednak w samym artykule jak też w suplemencie do niego (Supplementary) brak jest niestety wyników analiz potwierdzających tę tezę i przedstawiających analizy składu cukrowego w/w preparatów bądź choćby proste widmo  $^1\text{H}$  NMR.

W drugiej pracy (Załącznik D2) zatytułowanej: “The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637.” Doktorantka skupiła się na opisie struktury powtarzającej się podjednostki w szczepie należącym do gatunku *P. aquaticum*. Szczep ten jako pierwszy z ww. gatunku został wyizolowanym z polskich wód. Polisacharyd *O*-swoisty szczepu IFB5637 składa się z dwóch różnych heksoz (D-Man<sub>p</sub>, D-Glc<sub>p</sub>), a także abekozy (3,6-dideoksy-D-ksylo-heksozy). Doktorantka podkreśla, że jako pierwsza zidentyfikowała ten rzadko spotykany cukier w OPS pochodzącym od bakterii należącej do rodziny *Pectobacteriaceae*. W toku badań Doktorantka wykazała, że powtarzającą się podjednostkę łańcucha *O*-swoistego *Pectobacterium aquaticum* IFB5637 formują dwie reszty mannozy, dwie reszty glukozy i jedna reszta abekozy tworząc strukturę rozgałęzioną, przy czym abekoza jest cukrem terminalnym, formującym wraz z jedną resztą mannozy boczne odgałęzienie łańcucha, przyłączone w pozycji C-4 do reszty środkowej Man<sub>p</sub> liniowego trisacharydu:  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ . Tym samym Doktorantka wykazała, że opisana przez Nią powtarzająca się podjednostka polisacharydu *O*-swoistego *P. aquaticum* IFB5637 różni się znacznie od opisanych wcześniej struktur OPS innych przedstawicieli rodzaju *Pectobacterium*, wskazując, że w tej grupie bakterii istnieją wysoka naturalna różnorodność w strukturach OPS/LPS.

W trzeciej pracy (Załącznik D3) wchodzącej w skład rozprawy, a zatytułowanej: “The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwinirose - higher branched monosaccharide”, obszernie opisanej również w części wstępnej rozprawy, Doktorantka szczegółowo opisuje drogę rozwikłania niełatwej zagadki, jaką okazała się być obecność

w preparacie OPS niezwykle rzadkiego składnika – rozgałęzionego, ośmiowęglowego cukru, erwiniozy (3,6,8-trideoksy-4-C-(R-1-hydroksyetylo)-D-gulo-oktozy). Ten rzadki składnik został już wcześniej opisany w OPS *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* GSPB 9205 oraz w egzopolisacharydzie wytwarzanym przez szczep *P. atrosepticum* SCRI1043. W powtarzającej się podjednostce tworzącej OPS *P. versatile* CFBP6051T są obecne aż dwie reszty erwiniozy, przyłączone jako boczne odgałęzienia mannoz w trisacharydzie:  $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 3\text{)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4\text{)-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$ .

## Komentarze i pytania

Proszę, aby Doktorantka ustosunkowała się do następujących kwestii:

1. Doktorantka w swej pracy analizowała polisacharydy LPS-ów bakterii fitopatogennych, należących do rodzajów *Dickeya* oraz *Pectobacterium*. Proszę o kilka słów wyjaśnienia, jakie potencjalne znaczenie w patogenezie tych bakterii mają struktury opisane przez Panią i w jaki sposób wyniki Pani badań mogą zostać wykorzystane do zwalczania bądź zapobiegania infekcjom u roślin.
2. Drugie pytanie odnosi się do treści oświadczeń współautorów prac wchodzących w skład rozprawy. Według oświadczeń trzech współautorów, wykonywali oni analizy/eksperymenty biologiczne (dotyczy publikacji nr 1 i 2), oraz brali udział w przygotowaniu opisów tych analiz. Jednak najwyraźniej finalnie wyniki te nie weszły w skład manuskryptów. Czy Doktorantka może przybliżyć, jakie analizy biologiczne zostały wykonane i jakie są ich wyniki?

Włączone do rozprawy prace zostały opublikowane. Podlegały więc wcześniej recenzji specjalistów i edytorów, zyskując ich pozytywne opinie. Nie mam więc zastrzeżeń merytorycznych dotyczących ich treści. Poniżej przedstawiam jedynie kilka uwag, które nasunęły mi się podczas czytania części wstępnej (opisowej) rozprawy:

1. Wykaz skrótów: TFB (powinno być: TSB) i TSA to odpowiednio: bulion sojowy i agar sojowy, podłoża stosowane standardowo do posiewu tzw. drobnoustrojów wymagających, a takimi zapewne są bakterie z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*. Doktorantka opisała te skróty odpowiednio jako „płynną i stałą pożywkę do hodowli bakterii”.
2. W części opisowej pracy Doktorantka opisując tabele i ryciny w podpisie umieszcza niefortunną frazę, Tabela/Rysunek przedstawiający (np.: „Tabela 1. Tabela przedstawiająca.”, „Rysunek 1. Rysunek przedstawiający..”). Wg mojej opinii jest oczywiste, że w tabeli zamieszczono pewne dane, a na rysunku przedstawiono. Wystarczy wpisać: Tabela 1. Klasyfikacja bakterii...., Rysunek 1. Schemat budowy LPS-u.” Ta uwaga dotyczy



wszystkich tabel, rysunków i schematów zamieszczonych w pracy. Niektóre rysunki (np. Rys.1 i 2) mimo, że ewidentnie pochodzą ze źródeł bibliograficznych (nie są to rysunki czy schematy w całości wymyślone przez Doktorantkę), jednak Doktorantka nie zamieściła w podpisie odpowiedniej cytacji pracy źródłowej.

3. Na Rysunku 3. Przedstawiono schematyczną budowę modelowego/enterobakteryjnego lipidu A (*E. coli*), a nie jak zamieszczono w podpisie rysunku: „strukturę chemiczną lipidu A”.
4. str. 16. Cel pracy: Doktorantka twierdzi, że jej zadaniem będzie określenie struktury chemicznej O-polisacharydów”. Jest to kalka z języka angielskiego. Powinno być: „polisacharydów O-swoistych” (synonimem tego określenia jest antygen O, a akronimem OPS).
5. W tym samym rozdziale, kilka linijek niżej: „Cele szczegółowe obejmowały: ▪ wyizolowanie LPS-ów ze ścian komórkowych bakterii, a następnie wyodrębnienie z nich OPS-ów”. Doktorantka przy pomocy opisanych w pracy metod nie izolowała ścian komórkowych z bakterii aby z kolei z nich wyizolować LPS, ale frakcję/preparat lipopolisacharydu otrzymała bezpośrednio z komórek, a następnie z tego preparatu wyodrębniała frakcję OPS.
6. str. 17. Część eksperymentalna, Doktorantka w sposób graficzny przedstawiła „Schemat analizy strukturalnej polisacharydów”. W punkcie ostatnim: „Analizy chemiczne” wymienia: „analiza cukrowa” ... „reakcja z optycznie czynnym butan-2-olem”. Wg mojej opinii prawidłowo powinno brzmieć: „analiza składu cukrowego” (analiza cukrowa to kalka z języka angielskiego: „sugar analysis”), oraz: „ustalenie absolutnej konfiguracji cukrów”, którą oczywiście wykonuje się stosując optycznie czynny butan-2-ol lub oktanol. Idąc tym tropem Doktorantka zamiast „analiza metylacyjna” (tu prawidłowe określenie) powinna była wpisać: „reakcja z jodkiem metylu w obecności zasady”.
7. Str. 20. Oczyszczanie LPS-u – trawienie enzymatyczne; Doktorantka powinna podać ilości używanych enzymów. Są dane bibliograficzne precyzujące ilości enzymów konieczne do zastosowania w przeliczeniu na gram suchej masy bakterii. Doktorantka pisze, że dodano „szczyptę DNazy i RNazy” oraz „szczyptę proteinazy K”. W powyższy sposób Doktorantka wprowadza do swojej rozprawy doktorskiej drobne elementy alchemii.
8. Str. 33 i 35. Rozdział „Analizy chemiczne”, Rysunki przedstawiające widma mas uzyskane techniką GC-MS sprawiają wrażenie, że do pracy zostały wklejone surowe pliki widm MS.

Są one mało czytelne (zbyt słaba rozdzielczość). Wydaje się, że pomocne byłyby schematy fragmentacji omawianych octanów alditoli i częściowo permetylowanych octanów alditoli.

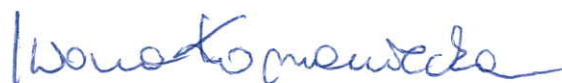
9. W skład rozprawy wchodzić dwie publikacje (D1 i D2), w których część uzyskanych wyników zamieszczono w tzw. dodatku (Supplementary), w formie rycin. Niestety do rozprawy nie włączono tych dokumentów. Według mojej opinii, oba pliki Supplementary powinny się w niej znaleźć, gdyż stanowią integralną część artykułów.

W podsumowaniu stwierdzam, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kowalczyk prezentują bardzo wysoki poziom naukowy i niewątpliwie wnoszą cenny wkład w poznanie struktur powierzchniowych fitopatogennych bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka opisała występowanie w tych strukturach dwóch rzadko spotykanych składników cukrowych, jakimi są abekoza i erwinioza. Ponadto, Doktorantka wykazała, że w obrębie rodzaju *Dickeya* wszystkie szczepy posiadają 6-deoksycukry w strukturach OPS-ów, oraz że naturalną cechą rodzaju *Pactobacterium* istnienie ogromnej różnorodności struktur OPS.

#### **Wnioski końcowe**

**Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Mając na uwadze wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, jej wkład w przeprowadzone badania oraz fakt opublikowania wyników badań zawartych w rozprawie w formie trzech oryginalnych prac badawczych, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr. Agnieszki Kowalczyk stosowną nagrodą.**



dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS

