



Prof. dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 7 luty 2022 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Ossowskiej pt. „*Określenie struktury chemicznej O-antygenów fitopatogennych bakterii rodzajów Dickeya i Pectobacterium*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje kompleksowe badania strukturalne polisacharydów O-swoistych (antygenów O) lipopolisacharydów (LPS) patogenów roślinnych rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*. Bakterie te wywołują choroby szerokiej gamy roślin użytkowych, m.in. ziemniaka, marchwi, czy pomidorów. W przypadku bakterii z rodzaju *Dickeya* badaniami objęto siedem szczepów reprezentujących 4 gatunki: *D. dadanti* IFB0016, *D. dianthicola* IFB0485, *D. solani* (IFB0099, IFB0123, IFB0158 i IFB0223) oraz *D. zea* IFB0031. W drugim przypadku było to pięć szczepów *Pectobacterium parmentieri* (IFB5308, IFB5408, IFB5427, IFB5432 oraz IFB5441). Według danych wyjściowych, szczepy różniły się poziomem wirulencji względem infekowanego gospodarza, co stanowiło przesłankę dla ich wyboru. Badania obejmowały hodowle bakteryjne, preparacje i degradacje LPS oraz wykonanie kompletu analiz klasycznymi metodami, takimi jak analiza cukrowa, metylacyjna, analiza konfiguracji cukrowych i niecukrowych składników oraz interpretacje widm NMR. Część z otrzymanych wyników została opublikowana w 2016 i 2017 r. w postaci dwóch prac oryginalnych w specjalistycznym czasopiśmie *Carbohydrate Research* z pierwszym autorstwem Pani mgr Karoliny Ossowskiej (pozycje 125 i 148 spisu literatury).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska to bogato ilustrowane opracowanie (w szczególności w części *Wyniki i Wnioski*), obejmujące 148 stron. Rozprawa charakteryzuje się prawidłowym układem, w którym wyróżniono *Wykaz Skrótów*, *Wstęp*, *Cel Pracy*, *Część Eksperymentalną*, *Wyniki i Wnioski*, *Podsumowanie*, *Streszczenie* oraz spis *Literatury*.



W odniesieniu do wybranego układu rozprawy, z punktu widzenia czytelnika umieszczenie streszczeń na początku rozprawy byłoby bardziej praktyczne. Rozprawa jest przygotowana bardzo starannie i niemal nie zawiera błędów edytorskich. Zachowuje prawidłowy ciąg logiczny, przez co czyta się ją bardzo dobrze. Jedyne obco brzmią anglicyzmy takie jak *O-antygen*, *część korowa* i odmiana stosowana dla skrótów LPS i OPS (LPSów, LPSu, OPSu itp.).

Na wyróżnienie zasługuje część eksperymentalna, w której omówione są i bogato zilustrowane niemal wszystkie szczegóły przeprowadzonych doświadczeń i interpretacji wyników. Wysoka jakość tej części opracowania pokazuje ekspertyzę Pani mgr Karoliny Ossowskiej w zakresie preparatyki i analizy cukrów. Ponieważ wybór szczepów do analizy struktur LPS wynikał z ich fitopatogenności i wskazywanej roli LPS jako elementu biofilmu w patogenezie chorób wywoływanych przez wybrane gatunki bakterii, we *Wstępie* brakuje rozwinięcia tego aspektu z punktu widzenia znaczenia LPS/OPS. Opis ogranicza się do jednego zdania na str. 19 i dwóch krótkich i ogólnych akapitów na str. 31 i 37. Brak bardziej szczegółowego opisu stanu wiedzy w tym temacie przełożyło się prawdopodobnie na brak dyskusji nad wynikami preparacji i badań strukturalnych LPS z punktu widzenia wirulencji wybranych szczepów. Jest to o tyle ciekawe i powinno być ujęte we *Wstępie* i *Podsumowaniu*, gdyż na str. 23 w rozdziale 1.1.4 Doktorantka pisze, cyt.: „Wyboru szczepów dokonano pod kątem różnic w poziomie wirulencji tych drobnoustrojów”. Także podrozdział o lipidzie A powinien być napisany pod kątem zmienności tego regionu LPS z punktu widzenia patogenów roślin. Do rozdziału *Wstęp* nasuwają mi się następujące pytania i uwagi techniczne: (i) czy Tabele 4 i 5 (str. 24-25) nie powinny zawierać kolumny zatytułowanej „inna nazwa szczepu”, skoro część szczepów pierwotnie pochodzi z badań zagranicznych ośrodków? (ii) Proszę o rozwinięcie twierdzenia dotyczącego występowania OPS w roli adhezyny; czy zdaniem Doktorantki to prawidłowe określenie w stosunku do polisacharydu? (iii) Brakuje wyjaśnienia dla oznaczenia „0-2” dla  $\alpha$ -L-6dTalpAc<sub>0-2</sub> w legendzie Tabeli 6 (str. 38).

Kilka niedociągnięć zauważono w rozdziale *Część Eksperymentalna*. Stosowanie liczby pierwszej nie jest prawidłowe w tego typu opracowaniach. Nie podano finalnego stężenia fenolu dla ekstrakcji fenolowo-wodnej. W opinii recenzenta, szczegółowy opis przygotowania złoza



BioGel P-100, pakowania kolumny i nakładania próbki na żel jest zbędny, gdyż znajduje się w instrukcji producenta. Nie podano natomiast rozmiaru cząstek dla wybranego produktu BioGel P-100. Brakuje także referencji dla opisu analizy cukrowej. W opisie dla doświadczeń wykonywanych techniką spektroskopii NMR nie podano typu stosowanej sondy.

Rozdział *Wyniki i Wnioski* wyczerpująco przedstawia omawiane dane w postaci wielu rysunków i czytelnych tabel. Sposób w jaki jest napisany wychodzi naprzeciw nie tylko ekspertom, ale i czytelnikowi, który jest mniej zorientowany w tematyce badań strukturalnych polisacharydów, co odczytuje jako zaletę rozprawy. Przedstawione wyniki i ich interpretacja w pełni potwierdzają otrzymane struktury OPS. W mojej opinii jakość rozdziałów chromatograficznych (ich rozdzielczość) może wskazywać na brak optymalizacji doboru złoża i eluentu. Pracę niewątpliwie wzbogaciłyby obrazy rozdziałów elektroforetycznych dla badanych LPS barwionych metodą srebrową, co pozwoliłoby Doktorantce na ocenę profilów LPS pod kątem ich gładkiego charakteru, obecności lipidu A i udziału frakcji wysokocząsteczkowych OPS, a w konsekwencji podjęcie dyskusji nad ewentualną rolą OPS/LPS lub jej brakiem w wirulencji wybranych szczepów. Profile elektroforetyczne stanowią również jeden z elementów potwierdzenia, że badane polisacharydy posiadają kotwicę lipidową i stanowią LPS. Jestem ciekawa argumentacji Doktorantki w zakresie wykluczenia obecności w preparatach antygenów kapsularnych i egzopolisacharydów. Powyższe pytanie ma na celu ocenę zrozumienia przez Doktorantkę etapów preparacji, które stosowała i nie stanowi podważenia wniosku związanego z preparacją LPS. Interesuje mnie również na jaki charakter pochodnych wskazywały widma masowe nieopisanych pochodnych o cyt. „charakterze niecukrowym” (Rys. 39). Przedyskutowania wymaga również strategia przyjęta dla analizy tych dwóch dużych grup OPS. Finalnie Doktorantka opisała takie same struktury OPS dla wszystkich siedmiu szczepów *Dickeya* i 3 struktury OPS dla pięciu szczepów *Pectobacterium parmentierii*. Za tymi wynikami stoi duża liczba wykonanych hodowli, preparacji i analiz, które mimo identyfikacji tych samych struktur przeprowadzono dla wszystkich szczepów. Jestem ciekawa, czy z punktu widzenia otrzymanych wyników można było zaproponować dla tych 2 grup szczepów uproszczony schemat postępowania, który ograniczyłby liczbę preparacji i analiz do niezbędnego minimum. Pytanie



ma charakter dyskusyjny i recenzent oczekuje oparcia odpowiedzi na stosowanych metodach oraz tych, które są znane doktorantce, ale nie były dostępne w laboratorium. Poniżej kilka drobnych uwag edytorskich do rozdziału *Wyniki i Wnioski*. Opisy Rys. 14, 15, 56 (i innych im podobnych) powinny zawierać wyjaśnienie dla stosowanych strzałek. W legendzie do Rys. 31 powinno być wyjaśnienie dla oznaczeń 1, 2, 3. Uzupełnienia wymaga opis sygnałów anomerycznych (o numer atomu) na Rys. 44. Widmo NMR na Rys. 65 powinno zawierać opisane wszystkie sygnały, niezależnie od celu, dla którego zostało przywołane w tekście.

Niezależnie od uwag powyżej, jakość zaprezentowanych wyników podpartą bogatym opracowaniem danych pomiarowych, ich kompleksowość, komplementarność i poddanie krytycznej dyskusji oceniam bardzo wysoko. Pani mgr Karolina Ossowska zidentyfikowała 4 oryginalne podjednostki polisacharydów O-swoistych LPS wybranych gatunków fitopatogenów. Pewien niedosyt budzi brak podjęcia próby oceny tych struktur/preparacji LPS z punktu widzenia ich potencjalnego wpływu na różnice w wirulencji szczepów w *Podsumowaniu*. Nie było to celem pracy, jednak pod tym kątem wybrano szczepy do badań i próba takiej analizy w dyskusji z punktu widzenia doniesień literaturowych powinna być podjęta. W odniesieniu do dwóch ostatnich rozdziałów rozprawy (Streszczenie i Wykaz Literatury) nie mam żadnych zastrzeżeń.

W podsumowaniu, wysoko oceniam jakość i oryginalność uzyskanych wyników. Potwierdzam, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty i wnosi ona oryginalny i istotny wkład w wiedzę o strukturach LPS wybranych fitopatogenów. Warto przypomnieć, że część wyników oryginalnych została opublikowana w postaci dwóch artykułów, gdzie Pani mgr Karolina Ossowska jest pierwszym autorem: (1) *Ossowska K, Czerwicka M, Sledz W, Zoledowska S, Motyka A, Golanowska M, Condemine G, Lojkowska E, Kaczyński Z. The uniform structure of O-polysaccharides isolated from Dickeya solani strains of different origin. Carbohydr Res. 2017, 445:40-43* i (2) *Ossowska K, Czerwicka M, Sledz W, Zoledowska S, Motyka A, Szulta S, Lojkowska E, Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharides isolated from plant pathogenic bacteria Pectobacterium wasabiae IFB5408 and IFB5427. Carbohydr Res. 2016;426:46-9.*



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

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska odpowiada ustawowo określonym warunkom określonym dla stopni naukowych. Wnoszę o przyjęcie ocenianej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Karoliny Ossowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz

KIEROWNIK  
Laboratorium Immunochemii  
i Techniki Produkcji Szczepionek  
*J. Łukasiewicz*  
Prof. dr hab. Jolanta Łukasiewicz