UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Chemii

dr hab. Błażej Gierczyk, prof. UAM Poznań, 02.05.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Urbaniak
„Zmienność sekwencji kodujących syntetazy nierybosomalnych peptydów oraz charakterystyka wytwarzanych metabolitów z grupy heksadepsipeptydów u *Hypocreales*"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Łukasza Stępnia
w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w aktualną i ważną tematykę biochemii ekologicznej oraz genetycznych podstaw zmienności metabolizmu wtórnego. Podjęte badania są zgodne z tematyką badawczą realizowaną w IGR PAN, dotyczącą relacji gospodarz-patogen, metabolitów mikromycetes i biologii Hypocreales. Jako przedmiot badań doktorantka wybrała depsypeptydy (bowerycyny, bowenniatyny i enniatyny) występujące u Hypocreales, skupiając się na zmienności strukturalnej tej grupy związków, zależności profilu ilościowego i jakościowego metabolitów heksadepsypeptydowych od trybu życia badanych grzybów, relacjach pomiędzy sekwencją genów kodujących syntetazy bowerycyny oraz enniatyny i metabolizmem badanych szczepów oraz zmiennością tych genów w kontekście pokrewieństwa badanych organizmów. Podjęta tematyka ma istotne znaczenie zarówno z czysto poznawczego punktu widzenia, jak i ze względu na potencjalne zastosowania badanych jonoforów. Związki te wykazują silne działanie biologiczne – w swojej natywnej formie oraz jako analogi są badane jako potencjalne leki o właściwościach przeciwpierwotniakowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych i przeciwnowotworowych. Z drugiej strony ich działanie toksyczne i zdolność do kumulowania się w żywności, wpływ na rozwój owadów oraz zaangażowanie w relacje roślina-patogen powoduje, że znajomość zmienności

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 1708
blazej.gierczyk@amu.edu.pl
www.chemia.amu.edu.pl

chemicznej w tej grupie związków, ich producentów, ekologicznych i genetycznych czynników decydujących o ich syntezie etc. jest niezbędna ze względu na zapewnienie bezpieczeństwa żywności oraz potencjalne zastosowanie przedstawicieli Hypocreales do kontroli biologicznej szkodników lub produkcji bioagrochemikaliów. Poszukiwania zależności zdolności do syntezy heksadepsypeptydów przez różne izolaty od sekwencji genetycznych kodujących syntetazy peptydów nierybosomalnych stanowi ważne wyzwanie ze względu na możliwość opracowania narzędzi do szybkiej diagnostyki patogeniczności lub toksygeniczności szczepów. Wybór Doktorantki dotyczący tematyki badawczej uważam za słuszny.

Praca składa się z trzech oryginalnych publikacji naukowych (1-3) oraz jednej pracy przeglądowej (4), opublikowanych w uznanych czasopismach (*Toxins*, *Pathogens*, *Journal of Fungi*) ujętych na liście JCR. Prace zostały opatrzone komentarzem Autorki, zawierającym podstawowe informacje o podjętej tematyce (wstęp, stan wiedzy, metodologia), zdefiniowanie hipotez badawczych, krótkie omówienie najważniejszych wyników oraz wnioski. Do pracy dołączono oświadczenia Doktorantki i współautorów o ich udziale w poszczególnych etapach powstania publikacji. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach mgr Urbaniak jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym (w pracy 4 autorem korespondencyjnym jest także Promotor). Zgodnie z oświadczeniami Autorka uczestniczyła we wszystkich etapach powstawania prac składających się na rozprawę doktorską: planowaniu eksperymentów, dyskusji wyników, przygotowaniu manuskryptu i odpowiedziach na recenzje; brała także aktywny udział w prowadzeniu większości prac eksperymentalnych. Prace finansowane były z dwóch projektów NCN, w tym jednego, którego kierownikiem była mgr Urbaniak (program PRELUDIUM 13). Część badań wykonano podczas stażu Doktorantki w The Norwegian Veterinary Institute.

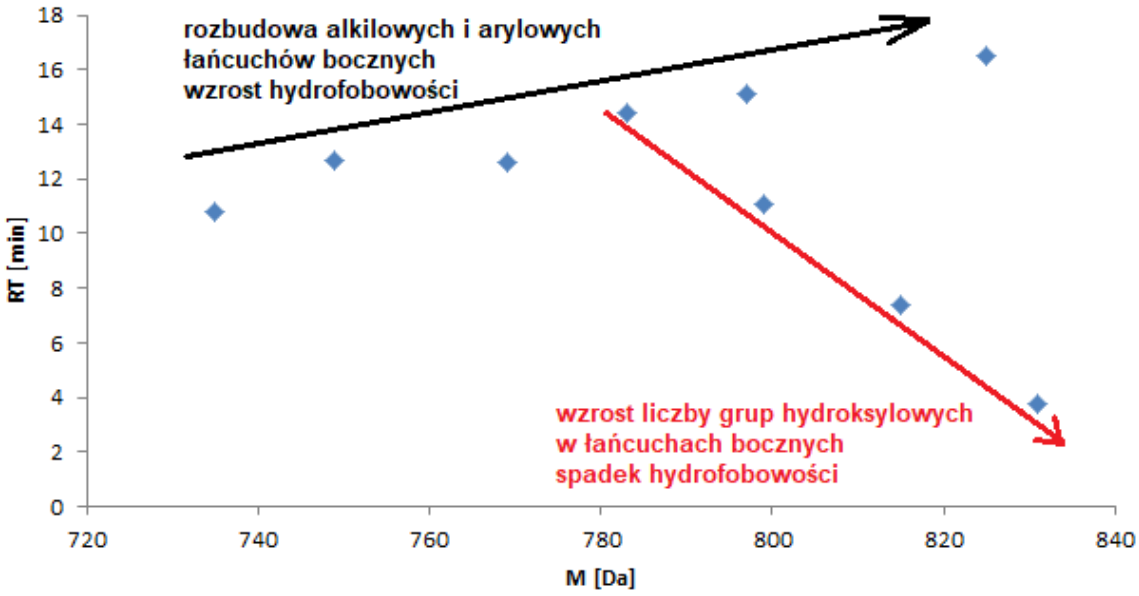
Od strony merytorycznej rozprawa prezentuje się bardzo dobrze. Autorka zrealizowała zaplanowane zadania naukowe. Na podkreślenie zasługuje biegłe posługiwanie się technikami z domeny biologii „klasycznej" (izolacja szczepów, zakładanie kultur) i molekularnej (izolacja DNA, sekwencjonowanie, analiza filogenetyczna) oraz chemii (bio)analitycznej (izolacja i oczyszczanie metabolitów, analizy HPLC i HILIC, zastosowanie ekstrakcji w układach ciecz/ciało stałe do frakcjonowania depsypeptydów, ilościowe i strukturalne wykorzystanie technik MS i HRMS). Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

- zidentyfikowanie nowych, naturalnie występujących analogów bowerycyny zawierających reszty tyrozynowe w cząsteczce;
- wykazanie związku pomiędzy sekwencją syntetazy bowerycyny, a grupą troficzną organizmu z którego wyizolowano DNA;

- wykazanie olbrzymiej zmienności wewnątrz- i międzygatunkowego potencjału syntezy depsypeptydów, niezależnego od warunków wzrostu, trofizmu i przynależności rodzajowej i gatunkowej;
- wykazanie posiadania genów odpowiednich syntetaz oraz zdolności do syntezy heksadepsypeptydów przez przedstawicieli saprobiontycznych *Trichoderma*;
- przygotowanie wartościowej pracy przeglądowej o cyklodepsypeptydach – związkach o istotnym znaczeniu biologicznym i farmaceutycznym.

Komentarz do publikacji napisany jest przejrzyście, choć brakuje w nim kilku rysunków i schematów, np.: struktur badanych związków i ich biosyntezy, gdyż ich wyłącznie słowne opisy są mało czytelne (wszak „jeden obraz wart jest tysiąca słów"). W części polskojęzycznej Autorce nie udało się ustrzec pewnych drobnych błędów w tłumaczeniu pojęć (np.: str. 25: „ciekła chromatografia" zamiast chromatografia cieczowa; str. 20: „pofragmentowany jon sodowy z bowerycyny" zamiast jony potomne powstałe z jonu sodowanej cząsteczki bowerycyny). Kilka istotniejszych błędów (choć nie rzutujących na merytoryczną wartość całej rozprawy) można natomiast odnaleźć w publikacjach stanowiących podstawę pracy:

- w pracy 4 (Rys. 2) na trzy struktury hydroksykwasów dwie są narysowane błędnie: w cząsteczce kwasu 2-hydroksy-3-metylopentanowego brakuje grupy –OH, natomiast zamiast kwasu 2-hydroksymasłowego narysowano cząsteczkę kwasu 2-hydroksy-2-metylopropionowego (2-hydroksyizomasłowego);
- użycie zapisu *sec*$CH_2CH(CH_3)_2$ lub *i*$CH_2CH(CH_3)_2$ jest błędne. Notację *n-*, *izo-*, *sec-*, *tert-* stosujemy wyłącznie w wypadku, jeśli następujący po symbolu podstawnik jest zapisany w postaci sumarycznej, np.: C_4H_9. Każdy podstawnik -$CH_2CH(CH_3)_2$ jest grupą izobutylową (2-metylopropylową). Nie istnieje ugrupowanie *sec*$CH_2CH(CH_3)_2$; grupa *sec*-butylowa (2-butylowa) ma strukturę -$CH(CH_3)CH_2CH_3$.
- w pracach 1 i 2 znajduje się informacja, że kolejność elucji bowerycyn rozdzielanych w układzie faz odwróconych silnie zależy od mas cząsteczkowych analizowanych związków. Jest to stwierdzenie nieprawdziwe – powinowactwo do fazy stacjonarnej C_{18} jest zależne od oddziaływań hydrofobowych, nie od masy cząsteczkowej. W przypadku depsypeptydów badanych w pracy 1 wzrost mas cząsteczkowych związany jest z rozbudową podstawników alkilowych lub ich zamianą na reszty benzylowe. Pociąga to za sobą spadek polarności. Tym samym obserwowany „trend" w zmianach czasów retencji nie ma charakteru przyczynowo-skutkowego. Wartości podawane w pracy 2 w ogóle nie korelują ze sobą, a obserwowane zmiany czasów retencji są wypadkowymi dwóch typów zmian strukturalnych (patrz wykres poniżej).



Podsumowując, wysoko oceniam wartość merytoryczną pracy, zawierającej wartościowy materiał doświadczalny. O wartości uzyskanych wyników świadczy fakt ich opublikowania w trzech pracach w wiodących czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Należy także podkreślić aktywność mgr Urbaniak w zakresie zdobywania środków na finansowanie nauki, zaangażowanie we współpracę międzynarodową oraz umiejętność wykorzystania staży naukowych do rozwoju własnej tematyki badawczej oraz zdobywania nowych umiejętności badawczych. Tym samym Doktorantka jawi się jako ambitna, wszechstronna i zaangażowana w pracę młoda badaczka. **W związku z powyższym wnioskuję do Rady Instytutu Genetyki Roślin PAN o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Moniki Urbaniak.**

Jednocześnie stwierdzam, że praca mgr Moniki Urbaniak **spełnia wymogi określone w ustawie** z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 z późniejszymi zmianami) oraz **wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Moniki Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Błażej Gierczyk