



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

dziekanat.wb@uwr.edu.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl

Instytut Immunologii
Wpł. dnia16.08.2021..
dz. 11855

Wrocław 12.08.2021

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz
Z-d Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski
dagmara.jakimowicz@uwr.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Szymczak-Kulus pod
tytułem „Human alpha-1,4-galactosylotransferase as an enzyme regulating
Shiga toxin binding” (“Ludzka alpha-1,4-galaktozylotransferaza jako
enzym regulujący wiązanie toksyn Shiga”)**

Recenzowana praca została wykonana w Laboratorium Glikobiologii, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod opieką prof. dr hab. Marcina Czerwińskiego. Temat pracy związany jest z wieloletnią tematyką badań zespołu i realizacją grantu badawczego NCN, kierowanego przez prof. hab. dr Marcina Czerwińskiego i dotyczącego antygenów P1 i P^K jako receptorów toksyny Shiga. Antygeny P1, P^K i NOR są łańcuchami cukrowymi glikosfingolipidów, których struktury i genetyczne podstawy zróżnicowania wciąż nie są w pełni poznane. Szczególnie intrygująca wydaje się być ich funkcja jako receptora toksyny Shiga. Toksyna ta dzięki rozpoznaniu antygeny na powierzchni nabłonka jelitowego wnika do komórek, gdzie powoduje zahamowanie syntezy białek oraz śmierć komórki. Z tego względu prowadzone w ramach pracy badania enzymu alpha-1,4-galactosylotransferazy (A4GALT) odpowiadającego za tworzenie wspomnianych struktur są w pełni uzasadnione.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki należy uznać:

- Znalezienie korelacji pomiędzy mutacjami w *locus A4GALT* a fenotypem krwinek czerwonych,



- Wykazanie, że enzym A4GALT dodaje galaktozę *in vitro* nie tylko do struktur glikosfingolipidów i syntetycznych oligosacharydów ale także do glikoprotein,
- Potwierdzenie, że A4GALT produkowana przez transdukowane komórki CHO jest aktywna względem glikosfingolipidów oraz glikoprotein,
- Wykazanie, że toksyna Shiga typu Stx1 wiąże glikoproteiny ze strukturą typu P1.

Wszystkie badania wykonane przez mgr Katarzynę Szymczak-Kulus i opisane w rozprawie doktorskiej zostały zawarte w dwóch artykułach: opublikowanym w *PLOS ONE*, 2018, gdzie Doktorantka pełni rolę drugiego autora oraz w *Journal of Biological Chemistry*, 2021, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem. Dowodzi to, że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały poddane krytycznej recenzji i docenione przez specjalistów z zakresu glikobiologii i antygenów grupowych krwi. Jednocześnie zwalnia mnie to ze szczegółowej oceny merytorycznej danych eksperymentalnych, pozwalając skupić się na samym opracowaniu wyników i przygotowaniu rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska jest napisana w języku angielskim i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Składa się z rozdziałów: Streszczenia, Wstępu, Celu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, krótkiego podsumowania w postaci Wniosków, oraz Załącznika, a także zestawień rysunków, tabel i skrótów.

Wstęp jest starannie napisany i stanowi rzetelne wprowadzenie do tematyki badań. Konstrukcja Wstępu jest skrupulatnie przemyślana, a kolejno przedstawiane zagadnienia tworzą logiczny ciąg informacji. Doktorantka rozpoczyna od opisu struktur i funkcji glikozylotransferaz, następnie przechodzi do przybliżenia enzymu A4GALT i jego roli w modyfikacji glikosfingolipidów, po czym omawia struktury tworzące antygeny P1 i P^K. W ostatniej części wstępu omówiono strukturę i mechanizm działania toksyny Shiga. Wstęp jest ilustrowany bardzo pomocnymi rysunkami, szczególnie schemat biosyntezy i struktur antygenów P1P^K jest wręcz nieodzowny dla zrozumienia tekstu.

Cel pracy jest obrazowo, precyzyjnie sformułowany i zgodny z tematem pracy. Przedstawienie celu pracy w postaci diagramu doskonale ilustruje wszechstronne podejście do rozwiązania problemu naukowego i poszukiwań odpowiedzi na zadanie pytania badawcze.

Rozdział Materiały i Metody w sposób bardzo opisowy i klarowny przedstawia kolejno przeprowadzone eksperymenty. Na uwagę zasługuje ogromny wachlarz stosowanych podejść eksperymentalnych. Obejmowały one, oprócz podstawowych biochemicznych oraz metod biologii molekularnej, tzn. przygotowania konstruktów genetycznych, oczyszczania oraz analiz

aktywności glikozylotransferaz, także rozmaite bardziej zaawansowane metody badawcze takie jak analizy poziomu transkryptu, oddziaływania toksyny z strukturami cukrowymi przy pomocy SPR, analizy fenotypu komórek przy zastosowaniu FACS, analizy struktur glikanów za pomocą spektrometrii mas i NMR. Doktorantka dołożyła wszelkich starań, aby dokładnie zaznaczyć, które materiały i procedury zostały uzyskane bądź przeprowadzone dzięki uprzejmości lub przy pomocy współpracowników. Jedyne drobne zastrzeżenie, co do niekompletności informacji w tym rozdziale dotyczy podrozdziału 6.3.13 zawierającego opis konstrukcji wektora bakulowirusowego oraz rozdziału 6.4, gdzie zabrakło informacji o weryfikacji poprawności konstruktów.

Jak wspomniano rozdział Wyniki zawiera dane eksperymentalne zawarte w dwóch już opublikowanych artykułach. Wyniki przedstawione są w sposób czytelny i klarowny, jednak pewne zastrzeżenia mogą budzić dość skrótowe opisy rysunków. Dotyczy to na przykład rysunków 28, 29, 43, 44, 48, 53, gdzie w legendzie przydatne byłoby dokładniejsze opisanie użytych komórek badanych i kontrolnych. Ponadto uważam, że korzystając z możliwości, jaką daje przygotowanie rozprawy doktorskiej, czyli braku rygору bardzo zwięzłego przedstawienia swoich wyników, Doktorantka mogła pokusić się o szersze wprowadzenia do kolejno opisywanych badań. Śledzenie przeprowadzonych badań ułatwiłyby odnośniki do Materiałów i Metod oraz nieco obszerniejsze skomentowanie uzyskanych wyników a także opatrzenie każdego z podrozdziałów krótkim podsumowaniem. I tak na przykład recenzent/czytelnik może odczuć brak szerszego komentarza wyniku przedstawionego na rys. 14 – nasuwa się tu pytanie, jak interpretowana jest znaczna zmienność poziomu transkryptu w badanych próbkach. Czy podjęto próbę skorelowania zidentyfikowanych SNP z poziomem transkryptu? Recenzentowi zabrakło również krótkiej choć interpretacji wyniku przedstawionego w Tabeli 14 – gdzie wskazano, że poziom transkryptu A4GALT Q211E jest znacznie niższy niż transkryptu genu natywnego. Nieco skrótowo są także opisane niektóre wyniki pokazujące oddziaływanie z toksyną Shiga. W tym rozdziale najbardziej zabrakło mi krótkiej interpretacji wyniku przedstawionego na rys. 53 wskazującego na zwiększoną wrażliwość na toksynę Stx1 komórek produkujących muteinę Q211E. Nawiązania do wspomnianych wyników oczywiście pojawia się w rozdziale Dyskusja, ale prosiłabym Doktorantkę o szersze komentarze w trakcie publicznej obrony pracy. Pomimo powyższych uwag uważam, że Doktorantka w poprawny i rzetelny sposób przedstawiła kolejno wykonane eksperymenty. Przeprowadzone badania dostarczyły niezwykle cennych informacji na temat antygenów P1,PK, swoistości glikozylotransferaz oraz roli glikanów jako receptorów.

Dyskusja Wyników jest ciekawa i dojrzała, a jednocześnie podobnie jak Wyniki i na wzór publikacji, bardzo precyzyjna i oszczędna. Rozdział ten jest podzielony na podrozdziały, które zawierają umiejętne odniesienie własnych wyników do danych literaturowych dotyczących poszczególnych zagadnień. Dyskusja zakończona jest zarysem zagadnień jeszcze niewyjaśnionych i przedstawieniem kolejno rodzących się pytań badawczych. Praca zakończona jest zgrabnym podsumowaniem w postaci wypunktowanych najważniejszych wniosków. Na zakończenie warto wspomnieć, że rozprawa została przygotowana w oparciu o ponad 150 pozycji literaturowych, co świadczy o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w tematyce badań.

Z obowiązku recenzenta powinnam wspomnieć o drobnych błędach redakcyjnych dostrzeżonych w rozprawie doktorskiej. Są to przede wszystkim braki odnośników w tekście do kilku tabel (tabeli 7, 9 i 10 w Materiałach i Metodach). W rozdziale 6.5.2. pojawia się skrót PAA, którego wyjaśnienia nie znalazłam. Na rysunek 28 ponadto wkradł się błąd w oznaczeniu dodania PNGazy. Na rysunku 42 użyte kolory nie w pełni zgadzają się z tymi pokazanymi w legendzie. Nie są to istotne uchybienia, ale zwrócenie na nie uwagi może być przydatne przy korektach przyszłych prac.

Na koniec chciałabym przedstawić do dyskusji dodatkowe pytania, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy doktorskiej:

1. Czy test glikozylacji SapD *in vitro* wskazujący na przeniesienie galaktozy na glikoproteiny może być zweryfikowany inną metodą eksperymentalną badającą swoistość A4GALT względem glikoprotein? Ponadto, czy pewne zanieczyszczenia preparatu białkowego A4GalT mogą wpływać na aktywność/swoistość białka?
2. Czy możliwa byłaby modulacja poziomu produkcji A4GalT w komórkach CHO celem sprawdzenia wpływu poziomu białka na efektywność/swoistość glikozylacji?
3. Czy obniżenie żywotności komórek produkujących białko A4GALT w obecności Stx1 do 80% można uznać za istotne?

Na zakończenie pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Katarzyny Szymczak-Kulus wnosi istotny wkład w badania genetyki i biochemii cukrowych antygenów grupowych krwi. Wspomniane powyżej pytania i uwagi nie wpływają na bardzo wysoką ocenę pracy. Wysoko oceniam wybór strategii badawczych prowadzących do odpowiedzi na pytania badawcze. Biorąc pod uwagę znaczącą rangę naukową wyników uzyskanych przez Doktorantkę wnoszącą o wyróżnienie pracy stosowaną nagrodą.

Podsumowując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że **praca doktorska mgr Katarzyny Szymczak-Kulus odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom doktorskim określonym w obowiązującej ustawie stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i w związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii Terapii Doświadczalnej im Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dziękuję

