

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 27.08.2021
L.dz. 10809



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr hab. Dorota Hoja-Łukowicz, prof. UJ

Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48) 12 664 64 66
E-mail: dorota.hoja-lukowicz@uj.edu.pl

Kraków, 25.08.2021

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr **KATARZYNY SZYMCAK-KULUS**

pt.

„**HUMAN ALPHA-1,4-GALACTOSYLTRANSFERASE AS AN ENZYME REGULATING SHIGA TOXIN
BINDING**”

(„Ludzka α -1,4-galaktozylotransferaza jako enzym regulujący wiązanie toksyn Shiga”)

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Marcina Czerwińskiego w Laboratorium Glikobiologii, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Badania prowadzono w ramach realizacji projektu badawczego pt. „Antygeny układów grupowych P1PK i GLOB jako receptory dla toksyn Shiga” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 7; nr projektu 2014/13/B/NZ6/00227). Wyniki badań opublikowano w dwóch artykułach eksperymentalnych, które ukazały się w roku 2018 i 2021 w prestiżowych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports*, tj. **PLoS One** (doi: 10.1371/journal.pone.0196627) oraz **J. Biol. Chem.** (doi: 10.1016/j.jbc.2021.100299), o współczynnikach oddziaływania IF, odpowiednio **2.776** (2018) oraz **5.157** (2020). Według Google Scholar artykuły te było cytowane odpowiednio 9 i 2 razy (dane na dzień 25.08.2021).

Rozprawa doktorska jest 127 stronicowym manuskrytem w wersji angielskojęzycznej i ma standardowy układ z podziałem na rozdziały: STRESZCZENIA - w języku polski i angielskim, SKRÓTY, WPROWADZENIE, CELE BADAŃ, MATERIAŁY I METODY, WYNIKI, DYSKUSJA, PODSUMOWANIE, BIBLIOGRAFIA, APPEDIX, SPIS RYSUNKÓW oraz SPIS TABEL.

WPROWADZENIE stanowi wyczerpujące opracowanie aktualnego stanu wiedzy nt. (i) budowy strukturalnej, klasyfikacji i mechanizmu działania enzymów należących do nadrodziny glikozylotransferaz, odstępstw od ich regio- i stereospecyficzności

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/institut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

substratowej poparte wieloma przykładami, (ii) budowy strukturalnej, klasyfikacji i biosyntezy glikosfingolipidów z szerszym omówieniem biosyntezy antygenów cukrowych układu grupowego krwi P1PK warunkowanej aktywności konsensowej lub wariantowej syntazy Gb3/CD77 (α 1,4-galaktozylotransferazy), (iii) podłoża genetycznego zróżnicowania fenotypowego w obrębie układu grupowego P1PK oraz (iv) roli antygeny P^K/Gb3 jako receptora determinującego chorobotwórczość, w tym jego udział w molekularnym mechanizmie wiązania i internalizacji toksyn Shiga.

CELE BADAŃ przedstawione są zadaniowo, zwięźle i poprzedzone są uzasadnieniem co do konieczności rozstrzygnięcia kontrowersyjnych doniesień naukowych nt. (1) zależności obserwowanego zróżnicowania fenotypowego P₁/P₂ a występowaniem określonego/określonych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genie *A4GALT*, (2) zdolnością α 1,4-galaktozylotransferazy do glikozylowania glikoprotein oraz (3) czy inne glikotopy układu grupowego krwi P1PK niż antygen P^K biorą udział w wiązania i internalizacji toksyn Shiga.

Podjęte cele badawcze są konsekwentną kontynuacją badań prowadzonych od lat przez zespół profesora Marcina Czerwińskiego, a rozpoczętych przez profesor Elwirę Lisowską, nad zrozumieniem molekularnych przyczyn syntezy antygenów układu grupowego krwi P1PK. Prowadzone badania mają kluczowe znaczenie w medycynie transfuzyjnej, transplantacji oraz zapobieganiu poronieniom i chorobom hemolitycznym płodu i noworodka. Mają one również znaczenie w patologii molekularnej i podatności na niektóre choroby, jak zespół hemolityczno-mocznicowy wywołany wiązaniem toksyn Shiga wytwarzanych przez enterokrwotoczne szczepy *E. coli*. Pożądane są zatem pogłębione badania nad zrozumieniem budowy strukturalnej części cukrowych oraz struktur rdzeniowych, będących nośnikami glikotopów. Niewątpliwie założone cele badawcze są ambitnym wyzwaniem dla badacza, a ich zrealizowanie jest ważne nie tylko z poznawczego, ale przede wszystkim medycznego punktu widzenia.

Na szczególne podkreślenie zasługuje bogactwo zastosowanych metod i najnowocześniejszych technik badawczych z zakresu inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, biochemii, hodowli komórkowej czy technik spektroskopowych. Metody zostały pogrupowane i opisane zgodnie z chronologią realizowanych zadań, co jest dużym ułatwieniem dla czytającego. Ten złożony warsztat metodyczny wskazuje, że Pani mgr Katarzyna Szymczak-Kulus posiada kompetencje w zakresie planowania i prowadzenia badań oraz umiejętności analizowania różnorodnych danych pomiarowych.

DYSKUSJA została napisana wyczerpująco i zakończona wytyczeniem kolejnych kierunków badań, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. WNIOSKI sformułowane prawidłowo. BIBLIOGRAFIA zawiera 151 pozycji literaturowych, a ich dobór jest właściwy i świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

OCENA UZYSKANYCH WYNIKÓW

Pierwotnie uważano, że występowanie erytrocytów o fenotypie P₁ związane jest ze zwiększonym poziomem transkryptu dla genu *A4GALT*, gdyż nie stwierdzono, aby polimorfizmy w regionie kodującym korelowały z obecnością lub brakiem erytrocytów o tym fenotypie. W 2014 roku zidentyfikowano jedenaście polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) poza regionem kodującym enzym z czego dwa tj. rs2143918 i rs5751348 wykazywały spójność genotypowo-fenotypową w całej puli próbek badanych – 338 próbek. Zasugerowano również, że SNP rs5751348 może prowadzić do wariantów allelicznych genu *A4GALT*, a w konsekwencji mieć wpływ na tworzenie fenotypów P₁/P₂.

W swoich badaniach mgr Katarzyna Szymczak-Kulus, na 109 próbkach krwi zdrowych ochotników, przeanalizowała cztery SNP w regionie niekodującym (rs8138197, rs2143918, rs2143919 i rs5751348) oraz bardzo rzadki SNP rs397514502 w regionie kodującym pod względem korelacji z fenotypami P₁/P₂ oraz poziomem ekspresji genu *A4GALT*. Doktorantka potwierdziła, że SNP rs5751348 najlepiej koreluje ze zwiększonym poziomem ekspresji genu *A4GALT* oraz kodowanej przez ten gen syntazy Gb3/CD77. Wysoki poziom enzymu sprawia, że oprócz antygenu Gb3/P^k produkowany jest również antygen P1. Z kolei **obecność SNP rs397514502 (p.Q211E) w regionie kodującym prowadzi do obniżonej syntezy antygenu P1, ale w zamian enzym produkuje antygen NOR**. Ostatnio inni badacze odkryli, że region rs5751348G preferencyjnie wiąże czynniki transkrypcyjne EGR1 i RUNX1, potwierdzając tym samym doniosłość ustaleń Doktorantki.

Do tej pory ludzka syntaza Gb3/CD77 była uważana za enzym ściśle specyficzny dla glikosfingolipidów, w przeciwieństwie do kilku innych glikozylotransferaz ssaków, które mogą wykorzystywać zarówno glikolipidy jak i glikoproteiny jako akceptory. Uważano również, że produkt reakcji katalizowanej przez syntazę Gb3/CD77 – antygen Gb3/P^k na glikosfingolipidach – jest jedynym ludzkim receptorem dla toksyn Shiga (Stx).

Pani mgr Katarzyna Szymczak-Kulus, uzyskała rozpuszczalną, rekombinowaną ludzką syntazę Gb3/CD77 w wersji konsensowej oraz zmutowanej z p.Q211E, i udowodniła, że oba enzymy mogą syntetyzować glikotop P1 (końcowy trisacharyd Galα1→4Galβ1→4GlcNAc-) na dianthenowym N-glikanie typu kompleksowego i syntetycznej N-glikoproteinie – saporynie D. Ponadto w badaniach *in vivo*, poprzez transfekcję komórek CHO-Lec2 wektorami kodującymi konsensową i zmutowaną ludzką syntazę Gb3/CD77, wykazała, że oba enzymy wytwarzają glikotopy P1 nie tylko na glikosfingolipidach, ale także na N-glikoproteinach, przy czym enzym z kwasem glutaminowym w pozycji 211 (p.Q211E) wykazuje podwyższoną aktywność zarówno względem glikoprotein jak i glikosfingolipidów. Doktorantka wykazała, że N-glikoproteiny zakończone glikotopem P1 są rozpoznawane przez podjednostki B toksyny Stx1, ale nie toksyny Stx2. Obecność polimorfizmu rs397514502,



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

warunkującego syntezę syntazy Gb3/CD77 z podstawieniem p.Q211E, powoduje podwyższenie poziomu wiązania podjednostki B toksyny Stx1. Doktorantka pokazała, że N-glikoproteiny z glikotopem P1, wytwarzane w transfekowanych komórkach CHO-Lec2, mogą być funkcjonalnymi receptorami dla toksyny Stx1. **Zatem, toksyna Stx1 może rozpoznawać i wykorzystywać N-glikoproteiny z końcowym glikotopem antygeny P1 oprócz swoich kanonicznych glikosfingolipidowych receptorów do wchodzenia i zabijania komórek, podczas gdy Stx2 może używać tylko antygen Gb3/Pk glikosfingolipidów.** Jak wykazała Doktorantka, w przypadku komórek CHO-Lec2 transfekowanych wektorem kodującym syntazę Gb3/CD77 z podstawieniem 211Q>E, główna droga wejścia toksyny Stx1 prowadzi przez antygen P^k na glikolipidach (ok. 60%), natomiast w ok. 40% przypadków drogę wejścia stanowią glikoproteiny z ugrupowaniem końcowym Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-. Doktorantka wykazała, że glikolipid Gb4 (antygen P) nie jest receptorem dla toksyn Stx1 i Stx2.

W trakcie lektury recenzowanej dysertacji nasunęło mi się kilka pytań

1. Dlaczego w badaniach genetycznego podłoża fenotypów P1/P2 brano pod uwagę NSP rs8138197 oraz NSP rs2143919, skoro już wcześniej Lai i wsp. (2014) wykazali brak korelacji pomiędzy tymi polimorfizmami a statusem P₁/P₂?
2. Na jakiej podstawie wybrano gen *ACTB* jako gen referencyjny w reakcji RT-qPCR? Czy testowano inne geny metabolizmu podstawowego? Jeśli tak, to który algorytm zastosowano do wyboru genu referencyjnego?
3. Czy w badaniach nad antygenami P1 i Gb4 jako ligandami i/lub receptorami dla toksyn Shiga z użyciem kotransfekowanych komórek Namalwa (*A4GALT/B3GNT5* oraz *A4GALT/B3GALNT1*) rozważano trawienia komórek α -galaktozydazą lub β -1,3-N-acetylogalaktazydazą w celu usunięcia epitopów, odpowiednio, P1 i Pk/Gb3 oraz Gb4 i uzyskania tym samym uproszczonego zestawu antygenów błonowych oraz uzyskania bardziej jednoznacznych wyników przy użyciu cytometru przepływowego?

Pomimo, że przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana z wielką starannością, tak pod względem redakcyjnym jak i opracowania rycin i tabel, to jednak z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych błędach edytorskich:

- zdanie nie powinno zaczynać się od wartości zapisanej cyframi, lecz słowem
- brak cytacji Tabel 4, 5, 7, 9, A1 i A2 w tekście rozprawy
- w celu zapewnienia możliwości powtórzenia eksperymentu, lepiej jest podawać stęż. końcowe poszczególnych odczynników niż ich objętości (np. rozdz. 6.2.3.2 i 6.2.6)

Ponadto:

- w tytule rozdz. 6.2.6 występuje błąd merytoryczny
- brak jest niektórych zestawów danych pomiarowych i ewentualnych komentarzy do nich, np. podrozdziały 6.2.3.3, 6.2.3.4, 6.2.4, 6.3.1.17, 6.3.1.18

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

- w opisie do ryciny 23A, napisano, że produkty reakcji enzymatycznej zostały przeanalizowane metodą UHPLC (str. 64), podczas gdy z opisu metody wynika, że użyto kolumny chromatograficznej o średnicy złoza 5µm (str. 43, linia 18), co raczej świadczy o zastosowaniu metody HPLC
 - na rycinie 25 (A i B), zamiast SapD4 i SapD5 powinno być odpowiednio SapD9 i SapD11 (str. 65)
 - w tekście pracy (str. 68, linia 8 od dołu strony) Doktorantka pisze, że został wykonany WB z użyciem przeciwciał anti-P1 (650), a wyniki pokazano na rycinie 28B – w rzeczywistości brak jest tych wyników
 - na rycinie 28B (str. 69) zamiast pierwszego znaku plus powinien być znak minus
 - opisy poszczególnych metod nie są równocenne pod względem szczegółów, np. przy opisie trawienia PNGazą F lizatu komórek CHO-Lec 2 nie wspomniano, że przed dodaniem enzymu, trzeba dodać Nonidet NP40 w celu zniesienia negatywnego wpływu SDS na aktywność PNGazy F. Tej informacji nie ma również w publikacji, na którą Doktorantka się powołuje (rozdz. 6.4.10). Z kolei w opisie internalizacji toksyn Shiga (rozdz. 6.6.3) brak informacji po jakim czasie od pierwszego pomiaru wykonano drugi pomiar – czyli jak długi czas przeznaczono na internalizację toksyn.
 - na str. 82 geny powinny być zapisane kursywą
- Wymienione powyżej niedociągnięcia nie mają jednak wpływu na całościową ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja zawiera oryginalne i nowatorskie wyniki, znacznie poszerzające nasze dotychczasowe rozumienie patologii toksyny Shiga; otwiera także możliwości na zaprojektowanie nowych leków uniemożliwiających wiązanie toksyn Shiga do komórek gospodarza. Z całym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona praca doktorska mgr Katarzyny Szymczak-Kulus odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom doktorskim określonym w obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki i w związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, zastosowanie złożonego warsztatu metodycznego oraz niewątpliwy wkład uzyskanych wyników w naukę, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniuatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

Paula Kojan - telowa

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniuatow>