



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 30-05-2022
L.dz. 141

**Wydział Lekarski**  
**Zakład Chemii i Immunochemii, Katedra Biochemii i Immunochemii**  
**Kierownik Zakładu: dr hab. M.Orczyk-Pawilowicz, prof. UMW**

Wrocław, 26.05.2022r

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Anny Bereźnickiej

„Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków: rola syntazy Gb3/CD77”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr. hab. Marcina Czerwińskiego oraz dr. Radosława Kaczmarka 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 układu grupowego krwi P1PK u ptaków: rola syntazy Gb3/CD77 w oporności na toksyny Shiga” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 16; nr projektu UMO-2018/31/B/NZ6/01828), a wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w artykule eksperymentalnym, który ukazał się w 2021r w renomowanym czasopiśmie z listy Journal Citation Reports, tj. Int. J. Mol. Sci. (doi: 10.3390/ijms22189761) o współczynniku oddziaływania IF= 6.132 (5-Year Impact Factor; 2020), w którym Pani mgr Anna Bereźnicka jest pierwszym autorem. W opinii recenzenta w w/w przypadku należy uwzględnić fakt przejścia ocenianej pracy przez rygorystyczny tryb *peer-review*. Wiedza dot. ptasiej syntazy Gb3/CD77 jest fragmentaryczna, a jej rola w zakażeniach STEC i podstawy mechanizmów molekularnych oporności ptaków na działanie toksyn Shiga są nieznane i nie były przedmiotem badań. Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest nowoczesna oraz adekwatna do potrzeb jakie wyznaczają współczesnej immunologii działania dedykowane ochronie zdrowia publicznego.

Rozprawa doktorska jest 175 stronicowym manuskrytem w wersji polskiej i ma standardowy układ z podziałem na rozdziały: Streszczenia – w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie. Wstęp jest precyzyjnie przemyślany i zawiera wszystkie niezbędne informacje układające się w logiczną, spójną całość i stanowi wyczerpujące opracowanie aktualnego stanu wiedzy. Doktorantka przedstawiła opis struktur, swoistości substratowej i mechanizm działania glikozylotransferaz z uwzględnieniem ludzkiej syntazy Gb3/CD77. Scharakteryzowała struktury i funkcje



## UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

glikosfingolipidów, biosyntezę N- i O-glikanów oraz glikanów O-GlcNAc glikoprotein, a następnie skupiła się na układach grupowych krwi P1PK i GLOB. W kolejnych podrozdziałach opisała antygeny cukrowe kręgowców i ich udział jako czynniki modulujące w oddziaływaniach z patogenami, uwzględniając antygen Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal, kwas N-glikoliloneuraminowy (Neu5Gc), antygeny GalNAc/Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal (ABH) i GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc (Forssman) oraz antygen Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal. W ostatniej części wstępu omówiła nazewnictwo, strukturę, klasyfikację, mechanizm działania oraz znaczenie epidemiologiczne toksyny Shiga z uwzględnieniem zwierząt jako rezerwuary enterokrwotocznych szczepów *E. coli* produkujących toksyny Shiga. Całość została wzbogacona starannie przygotowanymi 12 rycinami oraz 4 tabelami.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane w sposób precyzyjny. Doktorantka zdefiniowała cele swoich badań szczegółowych wskazując obszary wymagające pogłębionych analiz z uwagi na niepełną charakterystykę ptasiej syntazy Gb3/CD77 w porównaniu do ludzkiego enzymu oraz nieznaną jej rolę w zakażeniach STEC i w podstawach mechanizmów molekularnych oporności ptaków na działania toksyn Shiga. Jako główne cele wskazała: (1) Określenie poziomu homologów antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK u ptaków, (2) Molekularną charakterystykę syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu z gołębi oraz (3) Próbę odpowiedzi na pytanie: dlaczego ptaki są odporne na zakażenia STEC? Założone cele badawcze stanowią istotny element oraz naturalną kontynuację badań prowadzonych od wielu lat przez profesora Marcina Czerwińskiego oraz jego Zespół.

Na szczególne podkreślenie zasługuje bogactwo zastosowanych w pracy metod i najnowocześniejszych technik badawczych z zakresu biochemii, biologii molekularnej, hodowli komórkowych oraz technik spektroskopowych, w tym cytofluorometrii przepływowej, Western blottingu, HPTLC i spektrometrii masowej oraz precyzyjne wyjaśnienie podejmowanych procedur i strategii. Zastosowany przy realizacji badań bogaty warsztat metodyczny wskazuje na wysokie kompetencje Pani mgr Anny Bereźnickiej w zakresie zarówno planowania jak i prowadzenia badań. Zastosowanie dedykowanej aparatury do realizacji kolejnych zadań badawczych gwarantowało uzyskanie rzetelnych i wiarygodnych wyników.

Rozdział Wyniki zawiera zestawienie wraz z omówieniem uzyskanych rezultatów podczas prowadzenia badań. Biorąc pod uwagę różnorodność przeprowadzonych eksperymentów oraz ich złożoność jest napisany w przystępny sposób, a rezultaty badań są przedstawione w formie opisowej oraz graficznej, udokumentowane licznymi rycinami oraz wykresami, co ułatwia analizę.



## UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zwieńczeniem przedstawionej do oceny pracy doktorskiej jest dyskusja oraz podsumowanie. Dyskusja została przygotowana w sposób wyczerpujący i zakończona zwięzłym podsumowaniem. Doktorantka wskazała obszary, które w jej opinii wymagają rozszerzenia zakresu prowadzonych badań oraz wykonania dodatkowych szczegółowych analiz. W tych dwóch rozdziałach mgr Anna Bereźnicka wykazała się dużą dojrzałością naukową pod względem otrzymanych rezultatów. Krytycznie oceniła swoje osiągnięcie, powołując się na wyniki innych autorów prowadzących badania w podobnej tematyce. Dyskusja została podsumowana schematem badań nad rolą ptasich syntaz Gb3/CD77 w oddziaływaniu z toksyną Shiga opisanych w pracy. Na uznanie zasługuje bardzo obszerna bibliografia zastosowana do przygotowania rozprawy doktorskiej, która zawiera 333 pozycje literaturowe, w tym pozycje z lat 2019-2022 stanowią ponad 20%, co wskazuje na biegłość w obszarze zainteresowań naukowych Doktorantki.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki należy uznać wykazanie, że:

- Antygeny układu grupowego krwi P1PK występują jedynie u przedstawicieli parwklasy ptaków współczesnych i wykazują duże zróżnicowanie zarówno gatunkowe jak i osobnicze.
- Gatunki ptaków należące do parwklasy ptaków współczesnych analizowane w niniejszej pracy mają co najmniej dwa geny odpowiedzialne za produkcję syntazy Gb3/CD77.
- Syntaza Gb3/CD77 P jest swoista jedynie wobec akceptorów glikoproteinowych tworząc glikotopy P1, podczas gdy syntaza Gb3/CD77 M przenosi reszty galaktozy również na akceptory glikosfingolipidowe.
- Syntazy Gb3/CD77 M i P wykazują zdolność do produkcji w pełni funkcjonalnych, pułapkowych receptorów dla toksyn Shiga, a czynniki wpływające na wrażliwość ptasich komórek śródbłonna na holotoksynę Stx1 wykraczają poza proste oddziaływanie ligand – receptor.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana starannie, zarówno pod względem redakcyjnym jak i opracowania tabel i rycin, jednak z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych błędach/braku konsekwencji, tj. „podwójna” numeracja dla podrozdziału 4.5.3. Antygeny GalNAc/Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal (ABH) i GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc (Forssman)(brak w spisie treści) oraz 4.5.3. Antygen Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal, brak odniesienia do odpowiednich pozycji piśmiennictwa pod niektórymi tabelami i rycinami, nazewnictwo typów N-glikanów, niekonsekwencja w zapisie cytowań w tekście (wymienne i/and), niejednolite zasady zastosowane przy przygotowywaniu spisu literatury oraz niefortunnych określeniach tj. „terminalna struktura” (dot. całości) „Enzymatyczny łańcuch boczny” (str. 23), „jest białkiem o długości...” (str. 25), „trawienie przez dwie proteazy: PNGazę F oraz...”(str. 75), „glikoforyna A od osoby B” (str. 121), „zawierały szybko migrujące prążki” (str. 125). Wskazane



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

niedociągnięcia nie mają jednak wpływu na całościową ocenę rozprawy. W przedstawionym do oceny tekście dysertacji brakuje zbiorczego dorobku naukowego Doktorantki. Informacja taka pozwala na dokonanie całościowej oceny kandydatki, co jest również istotnym elementem przygotowywanej opinii.

Lektura recenzowanej dysertacji nasunęła mi kilka pytań dotyczących zaproponowanych strategii oraz rozszerzenia zakresu prowadzonych badań, o ustosunkowanie się do których, w formie krótkiego komentarza, chciałabym poprosić Doktorantkę:

- Wstępne określenie mechanizmu wiązania cząsteczek toksyn Shiga przez erytrocyty i komórki śródbłonka (pochodzących z gołębia i kury) z wykorzystaniem nowoczesnych metod mikroskopowych (*live-cell imaging*) – potencjalne mechanizmy tych oddziaływań.
- Strategie planowane przy analizie struktur N-glikanów obecnych na paralogach – potencjalne zastosowanie lektyn.

Podsumowując, rozprawę doktorską pani mgr Anny Bereźnickiej oceniam bardzo wysoko. Biorąc pod uwagę wkład pracy Doktorantki, oryginalność podjętej tematyki, wysoki poziom merytoryczny pracy, w tym zastosowanie złożonego warsztatu metodycznego oraz niewątpliwy wkład uzyskanych wyników w rozwój dyscypliny z całym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Anny Bereźnickiej odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami) dotyczącej nadawania stopni naukowych i tytułu naukowego oraz stopni i tytułu w zakresie sztuki. Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii doświadczałnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora pani mgr Annie Bereźnickiej.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

M. Orczyk-Pawitowicz