

dr hab. Ewa Pocheć, prof. UJ

Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków

tel. 012 664 64 67

e-mail: ewa.pochec@uj.edu.pl

Kraków, 3.11.2022



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej
magistra Krzysztofa Stefana Mikołajczyka

z tytułu

„Rola N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Krzysztofa Mikołajczyka została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Marcina Czerwińskiego w Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (dalej: IliTD PAN). Analizy wykonane w ramach pracy doktorskiej są częścią szerszej zdefiniowanego problemu badawczego realizowanego w Laboratorium Glikobiologii IliTD PAN ukierunkowanego na poznanie roli glikanów wchodzących w skład glikoprotein i glikosfingolipidów, w aktywności tych glikokoniugatów, oddziaływaniach międzykomórkowych oraz interakcjach komórek gospodarza z patogenami. Określenie znaczenia części cukrowej glikolipidów i białek jest kluczowe do pełnego zrozumienia ich właściwości i funkcji oraz poszukiwania przyczyn ich dysfunkcji w warunkach patologicznych.

Głównym celem badań mgra Krzysztofa Mikołajczyka było określenie na poziomie molekularnym znaczenia glikozylacji w aktywności jednej z glikozylotransferaz, ludzkiej syntazy Gb3/CD77 (EC 2.4.1.228), odpowiedzialnej za syntezę glikosfingolipidowych antygenów Gb3 (P^k) i P1 zawierających disacharyd Gal α 1 \rightarrow 4Gal oraz antygenu NOR (Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc), jak również terminalnego glikotopu P1 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-R) na akceptorach glikoproteinowych. Problem badawczy jest oryginalny i znaczący dla tego obszaru wiedzy.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów naukowych. Układ rozprawy jest zgodny z wymogami ustawowymi: zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 5-11), listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (str. 12), oświadczenia wszystkich współautorów publikacji uwzględniające zakres i wielkość udziału

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>



własnego w pracach (str. 13-49) oraz kopie trzech artykułów (str. 50-117). Dla pierwszej publikacji eksperymentalnej uwzględniono także materiały dodatkowe (Supplementary data). Rozprawę kończy krótki rozdział, w którym zebrano najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań (str. 118).

Dodatkowym dokumentem, nie wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej, ale ułatwiającym jej ocenę oraz pozwalającym na odniesienie się do osiągnięć naukowych Pana mgra Krzysztofa Mikołajczyka jest autoreferat zawierający (1) Wprowadzenie, (2) Cel badań, (3) Omówienie wyników badań z podziałem na poszczególne publikacje, (4) Wnioski, (5) Bibliografię, (6) Edukację oraz (7) Dorobek naukowy Doktoranta.

Praca doktorska jest starannie przygotowana pod względem merytorycznym i edycyjnym. Streszczenie w języku polskim i angielskim napisane jest w sposób jasny i w pełni oddaje zawartość rozprawy doktorskiej. Zawiera krótkie wprowadzenie podstawowych danych o ludzkiej syntazie Gb3/CD77, glikozylacji tego enzymu, glikosfingolipidowych i glikoproteinowych produktach jego aktywności oraz cel główny i cele szczegółowe badań. Druga część streszczenia to zwięzły opis uzyskanych wyników i wniosków w odniesieniu do każdej z publikacji.

Zbiór artykułów stanowią trzy anglojęzyczne prace z listy *Journal Citation Reports*, zamieszczone w Wykazie czasopism naukowych Ministra Edukacji i Nauki z dnia 12 grudnia 2021 roku - w każdej z nich mgr Krzysztof Mikołajczyk jest pierwszym autorem. W publikacji eksperymentalnej opublikowanej w bieżącym roku, jest również autorem korespondencyjnym. Wkład Doktoranta w powstanie każdej z publikacji jest znaczący: oceniony na 90% w publikacji przeglądowej, na 75% w pierwszej pracy eksperymentalnej i 65% w drugiej pracy eksperymentalnej.

Dwa pierwsze artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w roku 2020 i 2021 w *Glycobiology*, prestiżowym czasopiśmie o wysokiej wartości współczynnika wpływu (IF 2021: 5.954, 5-letni IF: 6.091; pkty MEiN: 100), dedykowanym do prezentowania badań z szeroko rozumianego zakresu glikobiologii. Druga praca eksperymentalna została wydana w uznanym czasopiśmie *Biochemical and Biophysical Research Communications* (IF 2021: 3.322, 5-letni IF: 3.498; pkty MEiN: 100).

Pierwsza publikacja o intrygującym tytule "*How glycosylation affects glycosylation: the role of N-glycans in glycosyltransferase activity*" jest rzetelnym opracowaniem przeglądowym na temat glikozylacji glikozylotransferaz, czyli enzymów katalizujących syntezę struktur oligosacharydowych glikokoniugatów. Powstała w oparciu o bogatą listę literatury obejmującą 274 artykuły naukowe z lat 1972-2020, wypełniając lukę w literaturze z zakresu znaczenia glikozylacji w aktywności glikozylotransferaz. Praca przeglądowa stanowi bardzo dobre wprowadzenie teoretyczne do badań własnych zaprezentowanych w dwóch kolejnych

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

artykułach oryginalnych. Opracowanie ilustrują dwa czytelne schematy przedstawiające funkcje N-glikanów związane z aktywnością enzymatyczną (Fig. 1) oraz metody stosowane do analizy glikozylacji i jej wpływu na aktywność białek (Fig. 2). Ważną częścią publikacji jest imponujących rozmiarów tabela zamieszczona na 13 stronach artykułu i zawierająca podstawowe dane o glikozylotransferazach, których aktywność regulowana jest przez N-glikany. Dane zebrane w publikacji dowodzą znaczenia obecności reszt cukrowych dla aktywności enzymów, a także licznych właściwości tych białek, takich jak stabilność, rozpuszczalność, uzyskanie prawidłowej struktury przestrzennej, kierowanie do właściwego kompartmentu w komórce lub ich sekrecji. Pracę kończy rozbudowany rozdział Conclusions, który w ciekawy i dojrzały sposób podsumowuje zebrane wcześniej dane literaturowe oraz przedstawia zalety i ograniczenia metod i podejść badawczych stosowanych do oceny roli N-glikanów w aktywności glikozylowanych glikozylotransferaz. Przedstawia również niezwykle ważny aspekt klinicznej aplikacyjności badań podstawowych z tego zakresu. Z przyjemnością i dużą ciekawością przeczytałam to opracowanie. Warto też dodać, że publikacja cieszy się dużym zainteresowaniem wśród specjalistów, o czym świadczy wysoka liczba cytowań (14 wg bazy Scopus i 10 wg Web of Science) uzyskana w ciągu niespełna dwóch lat od opublikowania.

Dwie kolejne publikacje prezentują wyniki badań uzyskane w ramach doktoratu. Badania wykonano na dwóch wersjach syntazy Gb3/CD77, zawierającej w pozycji 211 łańcucha białkowego resztę glutaminy (enzym Q) lub resztę kwasu glutaminowego (enzym E), co przekłada się na liczbę akceptorów rozpoznawanych przez enzym. Dla obydwu wersji syntazy Gb3/CD77 stworzono dwa warianty glikozylacyjne pozbawione N-glikanu w pozycji N₁₂₁ lub N₂₀₃ oraz warianty nieglikozylowane.

W pierwszej z prac eksperymentalnych pt. "Missing the sweet spot: one of the two N-glycans on human Gb3/CD77 synthase is expendable" badania przeprowadzono dla syntazy Gb3/CD77 o pełnej długości, zlokalizowanej wewnątrzkomórkowo w błonie aparatu Golgiego. Obecność N-glikanu(ów) w danym wariantcie enzymu weryfikowano stosując dwa podejścia badawcze, oceniając ubytek masy cząsteczkowej w rozdziale elektroforetycznym po de-N-glikozylacji z użyciem PNGazy F oraz wykorzystując komórki CHO-Lec2 traktowane tunikamycyną, która hamuje syntezę N-glikanów. Aktywność enzymatyczną wszystkich wariantów syntazy Gb3/CD77 określano metodą cytometryczną analizując zawartość produktów aktywności enzymu (antygeny Gb3, P1 i NOR) w transfekowanych komórkach CHO-Lec2 oraz metodą ELISA w lizatach tych komórek. Przyczyn utraty aktywności wariantów syntazy Gb3/CD77 o różnej N-glikozylacji szukano analizując lokalizację wewnątrzkomórkową tych enzymów, znów stosując dwie różne metody znakowania i obrazowania białek (konfokalna mikroskopia fluorescencyjna i transmisyjna mikroskopia elektronowa). W kolejnym etapie oceniono efekt aktywności wariantów

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>



syntazy Gb3/CD77 na poziomie ich produktów glikosfingolipidowych i glikoproteinowych stosując wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową HPTLC i spektrometrię mas MALDI-TOF oraz Western blotting. Cykl badań kończy ocena żywotności transfekowanych komórek CHO-Lec2 traktowanych dwoma typami holotoksyn Shiga (Stx1 i Stx2).

Druga publikacja doświadczalna zatytułowana "One of the two N-glycans on the human Gb3/CD77 synthase is essential for its activity and allosterically regulates its function" dotyczy opisanych wyżej wariantów enzymu w formie rozpuszczalnej bez fragmentu transbłonowego, wydzielanych do pożywki hodowlanej przez komórki linii HEK293E. Enzym izolowano z pożywki metodą chromatografii powinowactwa stosując złożo Ni²⁺-NTA-sepharose. Masę cząsteczkową wyizolowanych wariantów określano za pomocą Western blottingu. Zawartość całej puli N-glikanów wyznaczono de-N-glikozylując białko z użyciem PNGazy F a obecność struktur wielomannozowych oceniono stosując endoglikozydazę H (Endo H). Ze względu na różnice w aktywności wariantów glikozylacyjnych syntazy Gb3/CD77, wskazujące na różne znaczenie N-glikanów w regulacji aktywności tego enzymu, wykonano także modelowanie białka *in silico* na modelu enzymu zawierającego reszty oligosacharydowe.

Zwraca uwagę różnorodność podejść badawczych. Wszędzie tam, gdzie było to możliwe wyniki były weryfikowane różnymi metodami. W obydwu publikacjach eksperymentalnych metody zostały opisane w sposób szczegółowy, pozwalający na ich odtworzenie przez inne zespoły badawcze. Wyniki są dobrze udokumentowane i zobrazowane na licznych, dobrej jakości rycinach. Jedynie opisy rycin 4 i 5 w pierwszej publikacji eksperymentalnej są wykonane zbyt małą czcionką, co powoduje, że w wersji drukowanej są nieczytelne. Problem ten łatwo rozwiązać powiększając obraz w wersji cyfrowej.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie kilku istotnych wniosków zebranych w ostatnim rozdziale rozprawy. Najważniejszymi osiągnięciami przeprowadzonych badań są: (1) stwierdzenie obecności N-glikanów w obydwu miejscach N-glikozylacji syntazy Gb3/CD77, (2) wykazanie, że N-glikan dołączony do N₂₀₃ jest kluczowy do pełnej aktywności enzymu wewnątrzkomórkowego i jego lokalizacji w aparacie Golgiego, w przeciwieństwie do N-glikanu w pozycji N₁₂₁, który nie wpływa na aktywność enzymu, (3) wykazanie redukcji aktywności formy rozpuszczalnej enzymu nie zawierającego N-oligosacharydu w pozycji N₁₂₁ i całkowitą utratę aktywności tej formy enzymu bez N-glikanu w pozycji N₂₀₃, (4) wykazanie, że enzym pozbawiony N-glikanów traci aktywność enzymatyczną i nie jest wydzielany poza komórkę, (5) wykazanie, że nawet komórki CHO-Lec2 transfekowane genami kodującymi warianty glikozylacyjne enzymu pozbawione

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

N-glikanów posiadają receptory na glikokoniugatach odpowiedzialne za efekt cytotoksyczny wywołany przez toksyny Shiga.

Badania zostały zaplanowane i wykonane z dużą starannością, z użyciem dobrze dobranych, nowoczesnych technik badawczych, więc wiarygodność uzyskanych wyników, jak również ich wartość naukowa nie budzi wątpliwości. Proszę natomiast o komentarz do następujących pytań, które nasunęły mi się po przeczytaniu rozprawy:

1. Dlaczego charakterystykę struktur N-glikanów syntazy Gb3/CD77 wykonano tylko dla formy rozpuszczalnej uzyskanej w badaniach z użyciem komórek linii HEK293E a nie dla formy enzymu o pełnej długości analizowanej w komórkach linii CHO-Lec2?
2. W badaniach wykonanych dla enzymu o pełnej długości z użyciem komórek CHO-Lec2 masa cząsteczkowa dwóch wersji syntazy Gb3/CD77 w pełni N-glikozylowanych, określonych jako enzymy Q i E, wyznaczona w rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE w obecności standardów masowych była równa ok. 39 kDa, natomiast masa samego białka (warianty pozbawione N-glikanów) wynosiła ok. 32 kDa. Enzym pozbawiony jednego z miejsc N-glikozylacji, bez względu na to, które miejsce N-glikozylacji zostało wyeliminowane, miał masę ok. 37 kDa. Czyli brak jednego z dwóch N-glikanów powodował ubytek masy cząsteczkowej glikoproteiny o 2 kDa. Jak zatem wytłumaczyć różnicę w masie równą 5 kDa między enzymem zawierającym jeden N-glikan i białkiem nieglikozylowanym, niezależną od tego, do którego z miejsc N-glikozylacji dołączony był oligosacharyd?

Fragmety rozprawy w języku polskim (Streszczenie i Wnioski) oraz autoreferat napisane są w sposób jasny, poprawnie językowo. Mam tylko dwie drobne uwagi: (1) sugeruję w języku polskim używać określenia pożywka hodowlana w miejsce wyrażania "medium", które jest wieloznaczne, (2) w opisie wyników badań w pierwszej publikacji eksperymentalnej, zamieszczonym w autoreferacie, fragment zdania "enzymy Q i E, uprzednio traktowane tunikamycyną" to skrót myślowy, ponieważ tunikamycyną traktowane są komórki.

Zgodnie z wymogami Rady Naukowej IIITD (Szczegółowy tryb postępowania w sprawie nadania stopnia doktora) w rozprawie doktorskiej należy uwzględnić oprócz kopii artykułów również dodatkowe materiały opublikowane w internecie. Tych dodatkowych materiałów (Supplementary data) do drugiego artykułu eksperymentalnego nie znalazłam w rozprawie. Nie stanowiło to jednak problemu w ocenie pracy, ponieważ dotarłam do tego pliku w wersji cyfrowej na stronie internetowej czasopisma.

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

Badania do pracy doktorskiej mgr Krzysztof Mikołajczyk wykonał w ramach kierowanego przez siebie projektu badawczego pt. "Ludzka syntaza Gb3/CD77: czy N-glikany mogą wpływać na syntezę glikosfingolipidów?", finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki (program Diamentowy Grant). Oprócz badań do doktoratu angażował się w trzy inne granty badawcze. Pozyskanie środków na realizację kolejnego własnego tematu badawczego pt. "Rola dimeryzacji glikozylotransferaz w wiązaniu toksyn Shiga dla glikosfingolipidowych i glikoproteinowych receptorów" w konkursie Preludium Narodowego Centrum Nauki pozwoli Panu Krzysztofowi Mikołajczykowi na kontynuację badań i zapewne zwiążanie swojej przyszłości z pracą naukową.

Dorobek naukowy mgra Krzysztofa Mikołajczyka obejmuje łącznie 9 publikacji z listy JCR opublikowanych w latach 2016-2022 oraz 16 doniesień konferencyjnych (w tym trzech, w których jest pierwszym autorem) prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach w latach 2016-2020, co jak na ten etap pracy naukowej jest wysoką, wyróżniającą się wartością.

Rzetelnie przygotowana rozprawa doktorska z wykorzystaniem szeregu różnych metod molekularnych i komórkowych (ukierunkowana mutagenesa miejsc glikozylacji, transfekcje komórek, Western blotting, cytometria przepływowa, ocena aktywności enzymatycznej metodą ELISA, analiza glikozylacji z użyciem glikozydaz, wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa HPTLC, spektrometria mas MALDI-TOF, komórkowy test żywotności *in vitro*), obrazowania mikroskopowego (wewnątrzkomórkowa lokalizacja wariantów enzymu metodą immunofluorescencyjną i wizualizacja mikroskopie konfokalnym oraz techniką immunozłotową z obrazowaniem w transmisyjnym mikroskopie elektronowym) i analiz komputerowych (modelowanie struktury białka *in silico*) oraz bogaty dorobek naukowy dowodzą szerokiej wiedzy Doktoranta oraz umiejętności samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych, jak również skuteczności w pozyskaniu środków do ich realizacji.

Rozprawa doktorska Pana mgra Krzysztofa Mikołajczyka, oparta na już opublikowanych wynikach badań, stanowi bez wątpienia istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu glikobiologii. Dostarcza ważnych danych o regulacji aktywności enzymu przez N-glikany będące częścią tej glikoproteiny oraz co nie mniej ważne, stawia kolejne pytania badawcze i w konsekwencji wytycza nowe kierunki badań. Jak podaje Autor w autoreferacie, badania nad strukturą przestrzenną ludzkiej syntazy Gb3/CD77 są kontynuowane, więc odpowiedzi na pytania dotyczące m.in. allosterycznej regulacji aktywności tego enzymu przez N-glikan dołączony do asparaginy N₂₀₃, które zrodziły się w efekcie przeprowadzonych analiz, poznamy zapewne w niedalekiej przyszłości.

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

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgra Krzysztofa Mikołajczyka **spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim** zgodnie z wymaganiami Artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U.2022.574 ze zm.) oraz że dorobek naukowy Doktoranta uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych, dlatego **wniosuję** do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu **o dopuszczenie mgra Krzysztofa Mikołajczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie** stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, biorąc pod uwagę, że (1) wyniki badań uzyskane w ramach doktoratu zostały opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach a zebrane dane literaturowe opracowane i opublikowane w formie pracy przeglądowej, każdy z artykułów w czasopismach należących do renomowanych wydawnictw naukowych (Oxford University Press, Elsevier) oraz (2) doceniając wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Krzysztofa Mikołajczyka.**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński


dr hab. Ewa POCHEC, prof. UJ

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>