



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Lekarski
Zakład Chemii i Immunochemii, Katedra Biochemii i Immunochemii
dr hab. M. Orczyk-Pawiłowicz, prof. UMW

Wrocław, 02.11.2022r

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. Krzysztofa Mikołajczyka

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

N-glikozylacja jest jedną z najważniejszych modyfikacji potranslacyjnych białek, która w istotny sposób wpływa na ich fałdowanie, stabilność i rozpuszczalność, lokalizację wewnątrzkomórkową, wydzielanie oraz bioaktywność. Uważa się, że wszechobecność N-glikanów jest wynikiem ich dużej różnorodności, dzięki znacznej liczbie sposobów łączenia reszt cukrowych, względnej hydrofilowości i przestrzennej elastyczności łańcuchów oligosacharydowych. N-glikany są syntetyzowane przez zestaw enzymów w szlakach glikozylacji, w tym glikozylotransferazy, które również ulegają N-glikozylacji. W ostatnich latach wzrasta ilość doniesień wskazujących na istotny wpływ N-glikanów glikozylotransferaz na ich funkcje, w tym wydzielanie, stabilność i powinowactwo substratu/akceptora. Zmiany tych właściwości mogą mieć kluczowy wpływ na aktywność glikozylotransferaz. Ponadto, N-glikany i glikozylotransferazy są istotne w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworów. Mając na uwadze powyższe, badania nad glikozylotransferazami mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod terapii oraz otrzymania enzymów o zmodyfikowanym profilu glikozylacji przekładającym się na ich właściwości. Z uwagi na brak danych dot. struktury przestrzennej ludzkiej syntazy Gb3/CD77 oraz roli jaką pełnią przyłączone N-glikany podjęte przez Doktoranta badania są jak najbardziej aktualne i uzasadnione.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska 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. Badania opisane w niniejszej rozprawie zostały wykonane w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki - Diamentowy Grant pt. „Ludzka syntaza Gb3/CD77: czy N-glikany mogą wpływać na syntezę glikosfingolipidów?” kierowanego przez mgr. Krzysztofa Mikołajczyka (nr grantu 0097/DIA/2017/46).



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji, obejmujący jeden artykuł przeglądowy z 2020 roku oraz dwie prace eksperymentalne opublikowane w 2021 i 2022 roku. Prace stanowiące rozprawę doktorską charakteryzują się wysokim współczynnikiem wpływu IF, odpowiednio ***Glycobiology* IF=4,313** oraz ***Biochem Biophys Res Commun.* IF=3,322**, sumaryczna wartość **IF= 11,948**. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorant jest pierwszym autorem, a Jego wiodąca rola w zakresie sformułowania problemu badawczego, przygotowania założeń pracy oraz zgromadzenia literatury w zakresie roli N-glikozylacji w aktywności glikozylotransferaz (praca przeglądowa, udział 90%) oraz sformułowania tez badawczych, zaprojektowania metodologii badań, przeprowadzeniu eksperymentów oraz analiz statystycznych (prace eksperymentalne, udział 75% i 65%) nie budzi zastrzeżeń i została potwierdzona odpowiednimi oświadczeniami pozostałych współautorów. W pracy eksperymentalnej opublikowanej w ***Biochem Biophys Res Commun.* (2022)** Doktorant jest także tzw. autorem korespondencyjnym. Ponadto, na uwagę zasługuje fakt, że pomimo krótkiego czasu od opublikowania, prace wchodzące w skład rozprawy były już kilkakrotnie cytowane. Przedstawienie rozprawy doktorskiej w formie spójnego cyklu publikacji wskazuje, że uzyskane przez Doktoranta wyniki prac eksperymentalnych zostały już wnikliwie i krytycznie zweryfikowane przez recenzentów czasopism.

Przesłana do recenzji rozprawa doktorska liczy 118 stron, w tym stronę tytułową, spis treści, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, deklaracje współautorów, trzy publikacje wchodzące w skład rozprawy oraz wnioski. Tytuł rozprawy doktorskiej odzwierciedla jej zawartość. W streszczeniu Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę zagadnień będących przedmiotem Jego badań. W artykule przeglądowym „***How glycosylation affects glycosylation: the role of N-glycans in glycosyltransferase activity***” (***Glycobiology. 2020***) wchodzącym w skład rozprawy, na podstawie bardzo szczegółowego przeglądu danych literaturowych (274 pozycje) Doktorant podsumował aktualny stan wiedzy w zakresie wpływu N-glikanów glikozylotransferaz na ich aktywność, scharakteryzował molekularne mechanizmy leżące u podstaw zmian aktywności enzymów po deglikozylacji oraz metody stosowane w badaniach. Ponadto, przedstawił szczegółowe dane dot. glikozylotransferaz, dla których do tej pory wykazano ścisłą zależność między profilem N-glikozylacji i ich aktywnością.

Założenia i cele rozprawy doktorskiej zostały sformułowane prawidłowo i stanowią istotny obszar badań prowadzonych od wielu lat w Laboratorium Glikobiologii kierowanym przez profesora Marcina Czerwińskiego, promotora rozprawy. Głównym celem badań przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej było określenie roli N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77, z uwzględnieniem dwóch form, tj. enzymu o pełnej długości (zlokalizowanego w aparacie Golgiego) oraz formy rozpuszczalnej, pozbawionej



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

hydrofobowego fragmentu transbłonowego. Jako cele szczegółowe, Doktorant wskazał 1) Określenie, które miejsca N-glikozylacji ludzkiej syntetazy Gb3/CD77 mają przyłączone glikany, z uwzględnieniem typu przyłączonego glikanu; 2) Zbadanie wpływu miejsc N-glikozylacji ludzkiej syntazy Gb3/CD77 na aktywność, swoistość akceptorową oraz lokalizację wewnątrzkomórkową; 3) Analizę wrażliwości komórek CHO-Lec2 transfekowanych genami kodującymi warianty glikozylacyjne ludzkiej syntazy Gb3/CD77 na toksyny Shiga; oraz 4) Zbadanie wpływu (*in silico*) reszt cukrowych na konformację enzymu i określenie ich potencjalnego wpływu na jego aktywność katalityczną. Wyrazem nowatorskiego charakteru i naukowej wartości badań zrealizowanych w celu odpowiedzi na wyżej wymienione pytania jest opublikowanie wyników w dwóch pracach oryginalnych w renomowanych, wysoko punktowanych czasopismach.

W pierwszej publikacji eksperymentalnej ***“Missing the sweet spot: one of the two N-glycans on human Gb3/CD77 synthase is expendable” (Glycobiology. 2021)*** Doktorant zaprezentował wyniki badań ludzkiej syntazy Gb3/CD77 o „pełnej” długości i wykazał obecność reszt cukrowych przyłączonych w obu miejscach N-glikozylacji (N121 i N203) oraz wskazał N-glikan w pozycji N203 jako niezbędny dla aktywności i prawidłowej lokalizacji subkomórkowej enzymu, w przeciwieństwie do N-glikanu w pozycji N121. W pełni N-glikozylowana ludzka syntaza Gb3/CD77 i jej glikoforma pozbawiona N-glikanu N121 jest prawidłowo zlokalizowana w aparacie Golgiego, natomiast glikoforma pozbawiona N-glikanu N203 jest częściowo błędnie zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym. Enzym pozbawiony N-glikanów w obu pozycjach był nieaktywny i akumulował się w retikulum endoplazmatycznym. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wskazał, że dwa N-glikany ludzkiej syntazy Gb3/CD77 mają przeciwstawny wpływ na jej właściwości, ujawniając podwójną naturę N-glikozylacji i potencjalnie nowy mechanizm regulacyjny kontrolujący aktywność biologiczną białek.

W drugiej publikacji eksperymentalnej ***“One of the two N-glycans on the human Gb3/CD77 synthase is essential for its activity and allosterically regulates its function” (Biochem Biophys Res Commun. 2022)*** Doktorant analizował glikozylacyjne warianty syntazy Gb3/CD77 pozbawione fragmentów transbłonowych, produkowane w komórkach HEK293E. Warianty enzymu pozbawione jednego N-glikanu charakteryzowały się obniżoną masą cząsteczkową, natomiast warianty pozbawione obu N-glikanów nie były obecne w medium. Według Doktoranta brak N-glikanów odpowiadał za: 1) nieprawidłowe fałdowanie syntazy Gb3/CD77 oraz jej depozycję w siateczce śródplazmatycznej (ER) lub znaczący wpływ na obniżenie rozpuszczalności enzymu, co uniemożliwiało efektywne wydzielanie. Zastosowanie specyficznych glikozydaz pozwoliło na wskazanie typów N-glikanów przyłączonych do enzymu. W pełni N-glikozylowana rozpuszczalna forma ludzkiej syntazy zawiera dwa różne typy N-



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

glikanów tj. kompleksowe i wielomannozowe, natomiast warianty z podstawieniem w jednej pozycji zawierają tylko N-glikany typu kompleksowego. Ustosunkowania się, w formie krótkiego komentarza, wymaga niespójność w określeniu typu N-glikanów ludzkiej syntazy Gb3/CD77. W streszczeniu w języku polskim i angielskim podano „*W pełni N-glikozylowana rozpuszczalna forma ludzkiej syntazy zawiera dwa różne typy N-glikanów tj. kompleksowe i wielomannozowe*”, natomiast w abstrakcie publikacji w *Biochem Biophys Res Commun* (2022) „*The fully N-glycosylated enzyme contains one complex and one hybrid/oligomannose N-glycan*”.

W kolejnym etapie badań wykonano modelowanie *in silico* na modelu enzymu z N-glikanami i potwierdzono, że N-glikan w pozycji N203 zlokalizowany jest w pobliżu centrum aktywnego enzymu, w przeciwieństwie do N-glikanu w pozycji N121 oddalonego od centrum aktywnego, i może allosterycznie regulować aktywność enzymatyczną ludzkiej syntazy Gb3/CD77. Przedstawione wyniki badań podkreślają rolę N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77 (N-glikan w pozycji N203) i rozpuszczalności (N-glikany w pozycji N121 i N203), ze szczególnie znaczącą rolą N-glikanu w pozycji N203 w regulacji aktywności enzymu.

W podsumowaniu rozprawy doktorskiej Autor przedstawił sześć wniosków, odpowiednich do uzyskanych w pracach eksperymentalnych wyników. W opinii recenzenta, przeprowadzone badania pozwoliły na zrealizowanie w całości założonego celu pracy i w sposób wyczerpujący odpowiadają na pytania szczegółowe postawione w pracy. Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu eksperymentalnego oraz umiejętnością wykorzystania istniejących narzędzi badawczych do rozwiązywania wielowątkowych problemów naukowych. Analiza wszystkich uzyskanych wyników została wykonana w sposób wyczerpujący, a ilość oraz różnorodność przeprowadzonych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że mgr Krzysztof Mikołajczyk posiada duże doświadczenie naukowe zdobyte podczas planowania i prowadzenia poszczególnych etapów badań. Ponadto, zostały wskazane cele/kierunki dalszych badań w tym obszarze. Szczególnie interesujące są sugerowanego przez Doktoranta potencjalne zastosowania aplikacyjne badań nad rolą N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77 w poszukiwaniu nowych metod terapeutycznych, które mogą być wykorzystane w leczeniu pacjentów z chorobami nowotworowymi. Proszę Doktoranta o przybliżenie zagadnienia.

Po wnikliwym zapoznaniu się z dokumentacją, rozprawę doktorską mgr. Krzysztofa Mikołajczyka oceniam bardzo wysoko. Rozprawa została przygotowana w oparciu o trzy publikacje w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Biorąc pod uwagę wkład pracy Doktoranta, potwierdzony oświadczeniami współautorów oraz promotora, oryginalność tematyki badań, zastosowanie złożonego warsztatu do realizacji założonych celów oraz niewątpliwy wkład uzyskanych



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

wyników w rozwój dyscypliny z całym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Mikołajczyka odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora i spełnia warunki określone w art. 13 (ust.1) Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Mikołajczyka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, ze względu na wartość merytoryczną, nowatorski charakter badań oraz opublikowanie wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Magdalena
Orczyk-Pawłowicz