



Wrocław 1.06.2022

Ocena pracy doktorskiej magister Anny Bereźnickiej

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

Glikozylotransferazy, są olbrzymią rodziną enzymów, która u ssaków liczy ponad 200 białek. Enzymy te wykazują wysoką swoistość donorowo-akceptorową. Zamiany reszt aminokwasowych w tych białkach mogą prowadzić nie tylko do zmniejszenia czy nawet utraty aktywności enzymatycznej, ale również do modyfikacji swoistości względem donorów i/lub akceptorów. Ludzka syntaza Gb3/CD77 jest transmembranowym enzymem odpowiedzialnym za przeniesienie reszty galaktozy na laktozyloceramid i paraglobozyd – prekursorzy antygenów grupowych krwi P<sup>k</sup> i P1. Enzym z podstawieniem Q211E wykazuje rozszerzoną swoistość akceptorową i przyłącza resztę galaktozy również do akceptorów glikosfingolipidowych. Badania nad tą muteiną były elementem rozprawy doktorskiej promotora pomocniczego rozprawy, dr. Radosława Kaczmarka.

Glikany znajdujące się na powierzchni komórek biorą udział w wielu procesach biologicznych np. adhezji komórkowej, oddziaływaniu z makrocząsteczkami lub patogenami. Tworzenie kompleksu pomiędzy patogenem a oligosacharydowym receptorem na komórce gospodarza to często pierwszy etap infekcji. Bakterie *Shigella dysenteriae* czy enterotoksyczne szczepy *E. coli* (ETEC) produkują toksyny Shiga, których receptorami u ludzi są glikosfingolipidy, należące do ludzkiego układu grupowego krwi P1PK.

Bakterie wytwarzające toksyny Shiga stanowią poważny problem zdrowotny we współczesnym świecie. Rocznie powodują one ponad milion zgonów. Podstawowym rezerwuarem patogennych bakterii *E coli* jest bydło, ale również ptaki uważane są za możliwy element przenoszący patogeny. Posiadają one odporność na zakażenia ETEC mimo obecności specyficznych receptorów.

Przedmiotem rozprawy doktorska Pani mgr Anny Bereźnickiej była syntaza Gb3/CD77. Autorka przeprowadziła molekularną charakterystykę dwóch ptasich enzymów Gb3/CD77, a także podjęła próbę wyjaśnienia ich roli w zakażeniach ETEC oraz podstaw mechanizmów molekularnych stojących za opornością ptaków na toksyny Shiga. Temat pracy uważam za ciekawy zarówno ze względów

naukowych jak i praktycznych. Badania zostały przeprowadzone w laboratorium profesora Marcina Czewińskiego, renomowanego immunochemika zajmującego się glikobiologią. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr. Radosław Kaczmarek.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anny Bereźnickiej liczy 175 stron. Rozprawa została podzielona w tradycyjny sposób na rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Pracę rozpoczyna streszczenie oraz wykaz skrótów, po rozdziale dyskusja znajduje się bibliografia oraz załączniki.

Wstęp zajmuje 38 stron i został bardzo dobrze napisany. Autorka wyczerpująco, ale bez nadmiernej szczegółowości, opisała prawie wszystkie zagadnienia teoretyczne związane ze swoją rozprawą. Ten materiał dobrze wprowadza czytelnika w obszar glikanów (ich struktury, syntezy) oraz antygenów grupowych krwi. Ponadto autorka rozprawy zamieściła informacje o antygenach cukrowych biorących udział w oddziaływaniu z patogenami oraz toksyną Shiga.

Rozdział materiały oraz metody obejmuje 19 stron. Mgr Bereźnickia w sposób należyty opisała sposoby prowadzenia doświadczeń. Wachlarz metod jest szeroki, co dobrze świadczy o warsztacie badawczym doktorantki.

Wyniki pracy zostały przedstawione na 37 stronach i są bogato ilustrowane rycinami. Do najważniejszych osiągnięć doktorantki zaliczam:

1. Określenie poziomu antygenów układu P1PK na erytrocyty należących do 12 gatunków ptaków oraz efektywności wiązania podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do wybranych ptasich erytrocytów; przeprowadzenie charakterystyki glikosfingolipidów i glikoprotein z erytrocytów ptaków oraz analizy obecności przeciwciał rozpoznających antygeny grupowego krwi P1PK u ptaków.

2. Detekcję obecności glikotopów Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal oraz charakterystykę glikosfingolipidów i glikoprotein w komórkach śródbłonkowych gołębia i kury oraz przeprowadzenie testów wiązania i toksyczności podjednostki 1B toksyny Shiga wobec tych komórek; przeprowadzenie analizy immunohistochemicznej glikotopów P1 na tkankach gołębia i kury, jak również wiązania podjednostki 1B toksyny Shiga do wybranych tkanek.

3. Charakterystykę produktów dwóch genów kodujących syntazy Gb3/CD77 u gołębia (określonych jako P i M) oraz wykazanie, że enzym M posiada aktywność wobec akceptorów glikoproteinowych i glikosfingolipidowych, podczas gdy enzym P jest aktywny jedynie wobec glikoprotein.

4. Wykazanie, że syntazy Gb3/CD77 M i P wykazują zdolność do produkcji w pełni funkcjonalnych receptorów dla toksyn Shiga oraz przeprowadzenie analizy wrażliwości komórek transfekowanych wektorami kodującymi syntazy Gb3/CD77 M i P na toksyny.

Wyniki otrzymane przez mgr Annę Bereźnickią poszerzają wiedzę na temat antygenów występujących u ptaków oraz aktywności syntaz Gb3/CD77. Doktorantka zaobserwowała, że komórki ludzkie transferowane wektorami kodującymi syntazy wykazywały podwyższenie wrażliwości na toksynę Stx1, a z drugiej strony, komórki śródbłonna gołębia, które prezentują antygeny P1 i P<sup>k</sup> są niewrażliwe na tą toksynę. Może to sugerować, że glikotopy P1, są dla toksyn receptorami pułapkowymi.

Podsumowaniem pracy jest bardzo dobrze napisana dyskusja. Autorka rozprawy w sposób rozsądny komentuje swoje wyniki, odnosząc je do danych literaturowych. Dyskusję kończy komentarz do niejednoznacznych wyników otrzymanych w pracy oraz propozycja dalszych badań celem ich rozwiązania.

Autorka rozprawy nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć. W pracy jest kilka błędów edytorskich; na ryc. 20, 33, 35 nie ma lub źle podawane są oznaczenia istotności statystycznych; na stronie 75 enzymy PNGaza F i O-GlcNAc-aza są nazwane proteazami; w podpisie do ryc. 10 zabrakło informacji co oznaczają symbole umieszczone na rysunku. Do określenia procentu podobieństwa pomiędzy sekwencjami w rozprawie jest używane słowo homologia (60–68% homologii, str. 45), która oznacza pochodzenie od wspólnego przodka (powinien być % podobieństwa lub identyczności). Czy na pewno poprawne jest określenie „białaczkowe komórki macierzyste raka okrężnicy” na str. 32? Autorka używa w pracy określenia parvklasa, nie spotkałem się z nim wcześniej, czy jest to obecnie stosowana terminologia w systematyce? Opisując schemat struktury glikozylotransferaz, doktorantka napisała, że posiadają one nieuporządkowanym region rdzenia (str. 20). Zazwyczaj część centralna białka, określana jako rdzeń hydrofobowy, charakteryzuje się zwartą regularną strukturą trzyczłonową. Czy to oznacza, że rdzeń białka (jego centralna część) jest rozwinięta w stanie natywnym?

Do doktorantki mam również kilka pytań. We Wstępie do rozprawy, nie znalazłem opisu w jaki sposób toksyny Shiga ze światła jelita trafiają do krwioobiegu. Proszę o krótką informację na ten temat. Testy cytotoksyczności były przeprowadzane z użyciem MTS, czy były one potwierdzane inną metodą? Do unieśmiertelniania komórek wykorzystano lentiwirusa zawierającego w sobie sekwencję dla gołębiego genu *TERT*. Jakimi innymi metodami można unieśmiertelić komórki? Na ryc. 24. przedstawiono zmiany żywotności pierwotnych ptasich komórek endotelialnych pod wpływem toksyny Shiga. Jakiego efektu można oczekiwać dla komórek ludzkich przy analogicznych stężeniach toksyny? Do otrzymania gołębiego syntazy Gb3/CD77 użyto ludzkich komórek 2102Ep. Komórki te endogennie produkują syntazy Gb3/CD77. Czy można użyć innych linii komórkowych (bez tego enzymu) do badań?

Podsumowując, pragnę podkreślić wysoki poziom przedstawionej do oceny pracy. Mgr Anna Bereźnicka w swoich badaniach wykorzystwała szereg metod badawczych, dzięki którym otrzymała interesujące wyniki dla antygenów układu grupowego krwi P1PK u ptaków. Rezultaty swojej pracy przestawiła w publikacji zamieszczonej w *Int J Mol Sci* 2021, w której jest pierwszym autorem.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej "Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków: rola syntazy Gb3/CD77" jest bardzo wysoka, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie magister Anna Bereźnickiej przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze poziom przedstawionej pracy oraz fakt opublikowania jej wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Daniel Krowarsch