

Wrocław, 24.10.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Mikołajczyka
pt. „Rola N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77”**

wykonanej w Laboratorium Glikobiologii

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we
Wrocławiu

Praca doktorska pana Krzysztofa Mikołajczyka pt., Rola N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77” została wykonana w Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod opieką naukową pana prof. dr hab. Marcina Czerwińskiego. Rozprawa doktorska dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia naukowego-posttranslacyjnej modyfikacji poprzez N-glikozylację ludzkiej glikozylotransferazy Gb3/CD77, enzymu, który jest sam zaangażowany w komórkowy proces N-glikozylacji. Niniejsza praca świetnie wpisuje się w tematykę badawczą Laboratorium Glikobiologii i bazuje na wieloletnim bogatym doświadczeniu naukowym Promotora niniejszej pracy.

Rozprawa doktorska przygotowana została w formie cyklu trzech spójnych tematycznie prac opublikowanych w uznanych czasopismach naukowych (dwóch eksperymentalnych oraz jednej przeglądowej) o sumarycznym współczynniku oddziaływania 12,201, we wszystkich przedstawionych pracach doktorant jest pierwszym autorem (co jednoznacznie świadczy o wiodącej roli doktoranta w powstanie niniejszych publikacji). Warto podkreślić, że wszystkie te prace przeszły już dokładną recenzję wykonaną przez międzynarodowych ekspertów. Niniejsza rozprawa zawiera również rozdział „Wprowadzenie”, które jasno zaznaja z podejmowaną tematyką badawczą, dokładnie sprecyzowany „Cel badań”, „Omówienie wyników badań”, gdzie doktorant przedstawia najważniejsze rezultaty przeprowadzonych badań, opisane w detalach w poszczególnych publikacjach oraz „Wnioski”, w których podsumowuje uzyskane wyniki w kontekście zastanego stanu wiedzy. Rozprawa doktorska napisana jest bardzo starannie, w odpowiednich proporcjach, jasno nakreślono cel pracy, który został zrealizowany poprzez serię bardzo dobrze zaplanowanych eksperymentów angażujących różnorodne techniki badawcze (techniki biologii molekularnej (m.in.

ukierunkowana mutageneza, klonowanie molekularne), biochemii (m.in. produkcja białek rekombinowanych, testy enzymatyczne, western blotting), biologii komórki (m.in. hodowle komórkowe, modyfikacje komórek ssaczych, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna).

Pomimo przejścia procesu recenzji w uznanych czasopismach naukowych, każdy z rozdziałów niniejszej pracy doktorskiej zawierał nurtujące mnie kwestie naukowe (wymienione w detalach poniżej) i w związku z tym bardzo prosiłbym pana mgr Krzysztofa Mikołajczyka o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej.

Publikacja 1. W pierwszej pracy o charakterze przeglądowym, opublikowanej w czasopiśmie *Glycobiology*, doktorant w detalach przedstawia stan wiedzy dotyczący N-glikozylacji glikozylotransferaz różnego typu. Publikacja jest naukowo bardzo solidna, oparta na wielu źródłach, napisana bardzo ciekawie i starannie. Publikacja zawiera bardzo szczegółową tabelę, która ułatwia szybki dostęp do najważniejszych informacji dotyczących glikozylacji poszczególnych glikozylotransferaz. Publikacja zawiera też wnioski dotyczące podjętej tematyki oraz zaznacza przyszłe kierunki badań w niniejszym polu badawczym. Odnosnie tej pracy mam kilka nurtujących mnie pytań do doktoranta dotyczących glikozylotransferaz, na które nie znalazłem odpowiedzi w niniejszej publikacji:

1. Czy dana glikozylotransferaza może być substratem dla siebie samej? Np. czy Gb3/CD77 może glikozylować inne cząsteczki Gb3/CD77?
2. Jaka jest rola cytoplazmatycznej części glikozylotransferaz?
3. Czy znane są przykłady, gdzie dołączenie reszt cukrowych do glikozylotransferaz bezpośrednio wpływa na powinowactwo enzymu względem aktywowanych cukrów i/lub substratów (np. glikozylowanych białek)?
4. W publikacji przy większości typów glikozylotransferaz pojawia się informacja o wpływie N-glikozylacji na ich aktywność enzymatyczną. W wielu przypadkach zmiany N-glikozylacji negatywnie wpływają na komórkowy poziom/stabilność enzymów, obniżając jednocześnie całkowitą aktywność enzymów. Jednocześnie nieliczne są przykłady analizy enzymatycznych parametrów (V_{max} , K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) dla poszczególnych glikozylotransferaz po ich deglikozylacji/mutacji miejsc glikozylacji. Czy doktorant uważa wyciąganie wniosków o wpływie N-glikozylacji glikozylotransferaz



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

na ich aktywność enzymatyczną za optymalne naukowo przy braku analiz parametrów enzymatycznych?

5. Brak N-glikozylacji niektórych glikozylotransferaz prowadzić może do ich agregacji. Czy agregacja glikozylotransferaz pozbawionych N-glikanów wynika z rozwinięcia/nieprawidłowego zwinięcia części białkowej glikozylotransferaz, czy też N-glikany mogą ułatwiać „odpychanie” się cząstek glikozylotransferaz, a ich brak ułatwia agregację białkowych części glikozylotransferaz. Czy w komórce glikozylotransferazy (będące białkami błonowymi) po deglikozylacji tworzą agregaty przy błonie ER/Aparatu Golgiego? Jestem bardzo ciekawy opinii doktoranta na ten temat.
6. Dla rekombinowanego białka ST6Gal-I otrzymanego w kilku typach komórek (*P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *HEK293*) wykazano, że jedynie białko uzyskane z *S. cerevisiae* było nieaktywne i przypisano brak aktywności enzymatycznej ST6Gal-I z *S. cerevisiae* obecności różnego typu N-glikanów na ST6Gal-I niż w przypadku białka pozyskanego z innych źródeł. Czy w niniejszej pracy wykonano eksperymenty potwierdzające poprawne zwinięcie białkowej części enzymu pozyskanego ze wszystkich trzech źródeł?
7. Czy status N-glikozylacji glikozylotransferaz zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego komórki (np. warunki głodzenia, stres w ER)?

Publikacja 2. W drugiej pracy o charakterze eksperymentalnym opublikowanej w czasopiśmie *Glycobiology*, doktorant zbadał rolę poszczególnych N-glikozylacji w działaniu pełnej długości Gb3/CD77 w modelowych komórkach. W pracy zastosowano szeroki wachlarz technik badawczych prowadzących do przybliżenia znaczenia poszczególnych N-glikozylacji dla stabilności, aktywności i komórkowej lokalizacji Gb3/CD77. Dane przedstawione w pracy są bardzo dobrej jakości, a wyciągnięte wnioski są poprawne i poparte na dowodach eksperymentalnych. Odnośnie tej części bardzo prosiłbym doktoranta o odpowiedź na poniższe pytania:

1. Czy potwierdzono eksperymentalnie udział motywu DXD oraz jonów metalu w katalizie przeprowadzanej przez Gb3/CD77?
2. Czy znany jest epitop dla przeciwciała monoklonalnego Gb3/CD77 klon 5c7? Czy przeciwciała to rozpoznaje endogenne Gb3/CD77?



3. Czemu de-glikozylowane białko Gb3/CD77 wędruje na około 30 kDa (predykcja 40 kDa) (Fig. 2)? Dlaczego skrócony rozpuszczalny wariant Gb3/CD77 (pozbawiony pierwszych 43 aa, zawierający jednocześnie StrepTag/HisTag (około 14 aa), a więc wariant mniejszy o około 30 aa (Publikacja 3) wędruje w SDS-PAGE wolniej niż białko pełnej długości?
4. Czy Gb3/CD77 tworzy dimery/oligomery po pozbawieniu N-glikanów? Czy wariant E jest mniej wrażliwy na oligomeryzację po usunięciu glikanów? (Fig. 2A ścieżka nr 5, Fig. 2C, ścieżka 8 (prążek o masie ponad 55 kDa dla podwójnego mutantu Q), niewidoczny dla mutantu E (Fig. 2B, ścieżka 5, Fig. 2D, ścieżka 9).
5. Czy porównywano ilościowo poziom różnych mutantów Gb3/CD77 po transfekcji? Czy w komórkowych testach aktywności (np. FACs) czy też immuno-EM brano pod uwagę /korygowano o ewentualne różnice w poziomie całkowitym różnych wariantów Gb3/CD77?
6. Co przedstawia słupek błędu na wykresach cytometrii przepływowej? Jak było „n” w tych testach?
7. Czy w testach mikroskopowych wykonano kontrolę, w której nietransfekowane komórki traktowano przeciwciałem anty Gb3/CD77? Czy doktorant może odnieść się do tego, że obraz fluorescencji Q.T205A wygląda całkowicie inaczej przy ko-wybarwianiu na kalneksynę (ER) (praktycznie pełna kolokalizacja z ER) i syntaksynę-16 (praktycznie pełna kolokalizacja z markerem Aparatu Golgiego)?
8. W mojej opinii immuno-EM, m.in. ze względu na swoją wybiórczość (oraz potencjalne różnice w poziomie wariantów Gb3/CD77), nie jest optymalną techniką, żeby określać zmiany w lokalizacji białka w komórce. Czy próbowano zastosować inne podejście, lub jeśli nie to jakie eksperymenty mógłby Doktorant zaprojektować w celu pomiaru zmian w lokalizacji badanych białek?

Publikacja 3. Trzecia praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej jest logiczną kontynuacją poprzednich badań. Praca ta została opublikowana w *Biochemical and Biophysical Research Communications* i dotyczy produkcji i analizy rekombinowanej, katalitycznej części Gb3/CD77 oraz mutacyjnych wariantów tego białka. W niniejszej pracy wzbogacono warsztat badawczy o modelowanie molekularne, które ułatwiło zrozumienie efektu N-glikozylacji Gb3/CD77 na aktywność tego enzymu. Dane przedstawione w pracy są



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

również dobrej jakości, a wyciągnięte wnioski są poprawne i poparte na dowodach eksperymentalnych. Odnośnie tej części bardzo proszę doktora o odpowiedź na poniższe pytania:

1. We wstępie tej pracy doktorant pisze: „...a transmembrane domain (23-43 aa), which enables localization in the Golgi membrane...” – jaki jest wkład regionu transmembranowego (TM) glikozylotransferazy, w tym Gb3/CD77 w subkomórkową lokalizację tych białek? Czy TM kieruje glikozylotransferazy do Aparatu Golgiego i jeśli tak to jakie są specyficzne cechy TM w porównaniu z innymi regionami transmembranowymi, stanowiące sygnał kierujący do Aparatu Golgiego? Dlaczego Gb3/CD77 pozbawiona glikozylacji nie trafia do Aparatu Golgiego (posiadając przecież niezmienny region TM) (Publikacja 2)?
2. Czy doktorant analizował czystość uzyskanych białek rekombinowanych na SDS-PAGE przy barwieniu Coomassie Brilliant Blue (CBB) (lub stosując inne barwniki wykrywające „całkowite” białko w próbkach?) Jaka była wydajność produkcji rekombinowanych wariantów Gb3/CD77? Czy wykonywano testy enzymatycznej glikozylacji analizując wyniki poprzez SDS-PAGE i barwienie CBB?
3. W jaki sposób oczyszczono podwójne mutanty (Fig. 2C) do testu enzymatycznego (Fig. 3)? Czy warianty te były oczyszczane z lizatów komórkowych w odróżnieniu od mutantów pojedynczych oczyszczanych z medium (brak informacji w publikacji)? Jak czystość podwójnych wariantów wyglądała w SDS-PAGE? Czy podwójne warianty w wersji skróconej utknęły w ER tak jak ich pełnej długości odpowiedniki (publikacja 2)?
4. Czy próbki kontrolne w eksperymentach deglikozylacji enzymatycznej były traktowane tak samo jak próbki deglikozylowane (czas i temperatura)?
5. Co jest słupkiem błędu na Fig. 3? Jakie było „n”? Czy S.S123A jest znacząco bardziej aktywny niż WT względem Lac-PAA a mniej względem nLc4-PAA. Dlaczego w wariancie E jest na odwrót? Czy zmiany Q/E mogą determinować specyficzność enzymu?
6. Doktorant w pracy pisze: „The loss of activity could be caused by instability or misfolding and aggregation of the T205A glycovariants” Czy mierzono np. spektrofotometrycznie agregację rekombinowanych wariantów Gb3/CD77?
7. Termin „allosterically” z tytułu publikacji wydaje mi się niezbyt precyzyjny pod kątem enzymologii. Ponieważ mamy do czynienia z modyfikacją posttranslacyjną o

**ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA**

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

kowalencyjnym charakterze (stałe dołączenie glikanów do Asn) oraz nieznany jest wpływ tej modyfikacji na kinetyczne właściwości enzymu (czy pod wpływem tej modyfikacji enzym wykazuje charakterystyczny dla regulacji allosterycznej profil kinetyczny) w mojej opinii trafniejsze byłoby stwierdzenie, że ta posttranslacyjna modyfikacja zachodząca wpływa na aktywność enzymu.

8. Czy zidentyfikowano warunki/linie komórkowe, w których pozycja 203 nie jest glikozylowana? Czy glikozylacja ta mogłoby stanowić mechanizm regulacyjny (np. przy niekorzystnych warunkach środowiskowych, braku dostępności składników odżywczych itp.) żeby wyłączyć GT i przez to N-glikozylację innych komponentów komórki?

Oprócz zaprezentowanych publikacji mgr Krzysztof Mikołajczyk jest współautorem szeregu dodatkowych prac (razem 9 publikacji), kierował/kieruje grantami: PRELUDIUM oraz Diamentowy Grant, był wykonawcą w kilku projektach oraz aktywnie uczestniczył w konferencjach naukowych. Niewątpliwie jest to bardzo dobry dorobek naukowy, który świadczy jednoznacznie o produktywności naukowej i zaangażowaniu w prace badawcze.

Reasumując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Krzysztofa Mikołajczyka oceniam bardzo wysoko i chciałbym pogratulować zarówno Doktorantowi jak i Promotorowi. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Mikołajczyka spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Mikołajczyka oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo dobry poziom naukowy sugeruję wyróżnienie niniejszej Rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Łukasz Opaliński