Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii
Zakład Biotechnologii Białek

ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 89
fax +48 71 375 26 08

PAN Wrocław Instytut Immunologii
Wpł. dnia 18-04-2016
L. dz. 171/16

Wrocław 15.04.2016

Ocena pracy doktorskiej magistra Radosława Kaczmarka

"Badanie przyczyn zmian swoistości ludzkiej α1,4-galaktozylotransferazy (syntazy Gb3/CD77)"

Podstawowe antygeny grup krwi zostały odkryte ponad 115 lat temu przez Karla Landsteinera, natomiast 10 lat później Ludwik Hirszfeld wraz z Emilem von Dungernem wykazali, że są one dziedziczone. Ich pionierska praca stała się podstawą nauki o grupach krwi. To właśnie ci badacze wprowadzili oznaczenie symbolami A, B, AB i 0. Wraz z rozwojem badań odkryto 341 antygenów grupowych krwi sklasyfikowanych w 36 układach grupowych. Co ciekawe, większość tych antygenów występuje również na komórkach innych tkanek organizmu. Z tego powodu właściwa wydaje się nazwa antygeny grupowe krwi i tkanek. Antygen grupowy może być definiowany przez fragment białka, glikoproteiny lub glikolipidu. Rożna jest rola cząsteczek odpowiadających za antygeny grupowe. Mogą one być enzymami, kanałami, cząsteczkami adhezyjnymi lub receptorami dla endogennych lub egzogennych białek. Mnogość antygenów grupowych krwi wynika z jednonukleotydowego polimorfizmu, inwersji, insercji lub delecji genów lub ich fragmentów. Wiedza na temat roli antygenów grupowych krwi w prawidłowej pracy organizmu oraz stanach patologicznych cały czas się powiększa. Poza powszechnie znanymi, negatywnymi konsekwencjami związanymi z przetoczeniem niezgodnej pod względem antygenów krwi lub choroby hemolitycznej płodu i noworodka istnieją również doniesienia naukowe dotyczące korelacji pomiędzy grupami krwi a zachorowalnością na niektóre choroby nowotworowe, zakrzepicę lub chorobę wieńcową. Ciekawym aspektem naukowym związanym z grupami krwi jest również ich rola w interakcji z patogenami.

Skomplikowana natura antygenów grupowych krwi związana z ich syntezą oraz szeroko pojętą aktywnością biologiczną jest bardzo ciekawym oraz aktualnym zagadnieniem naukowym. Od wielu lat grupa dr. hab. Marcina Czerwińskiego zajmuje się badaniem różnorakich aspektów związanych z molekularnymi własnościami antygenów, czego owocem są liczne prace w renomowanych czasopismach naukowych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Radosława Kaczmarka liczy 125 stron. Rozprawa została podzielona na tradycyjnie 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 42 strony. Autor rozpoczyna wstęp od omówienia aktywności biologicznej glikozylotransferaz. Omówione są zagadnienia związanych z ich budową, podziałem na rodziny, specyficznością substratową oraz mechanizmem katalizy. Następnie autor pracy przechodzi do omówienia zagadnień związanych z strukturą oraz syntezą glikosfingolipidów. Kolejne rozdziały wstępu poświęcone są układom grupowym krwi. Szczegółowo przedstawiono układy P1PK, GLOB, FORS oraz kolekcję GLOB. Autor pracy omówił sposób kodowania glikozylotransferaz odpowiedzialnych za syntezę pochodnych cukrowych wymienionych antygenów, następnie opisał ich strukturę oraz molekularne podstawy ich powstawania. Więcej uwagi mgr Kaczmarek poświęca zagadnieniom związanym, z ciągle nie do końca poznanym, mechanizmem leżącym u podstaw systemu P1K1. Wstęp kończą informacje o roli wymienionych antygenów jako receptorów dla bakterii, toksyn, wirusa HIV oraz w zakażeniach pasożytniczych.

System P1K1 jest najbardziej tajemniczy spośród 36 skatalogowanych układów grupowych. Szczególną rolę w syntezie antygenów tego układu bierze enzym Gb3/CD77. Celem pracy doktoranta było otrzymanie rekombinowanej formy tego białka, porównanie aktywności biologicznej wariantu konsensusowego z muteiną syntetazy oraz analiza antygenu NOR produkowanego przez komórki 2102Ep transfekowane syntetazą.

Rozdział materiały oraz metody obejmuje 15 stron. Autor pracy operuje szerokim wachlarzem metod badawczych. Opisane zostały techniki z zakresu: klonowania DNA, analizy białek, w tym *western blottingu*, nadprodukcji białek w systemie bakulowirusowym oraz ich oczyszczania, cytometrii przepływowej, oczyszczania i analizy glikolipidów (w tym metody HPTLC), spektrometrii mas (zarówno MLDI-TOF jak i ESI MS^n) oraz pomiarów aktywności rekombinowanych enzymów z wykorzystaniem syntetycznych oraz naturalnych substratów.

Wyniki pracy przedstawione zostały na 10 stronach. Do najważniejszych osiągnięć mgr Radosława Kaczmarka zaliczam:

1. Otrzymanie homogennych, aktywnych biologicznie preparatów konsensusowej syntetazy Gb3/CD77 oraz jej wariantu mutacyjnego Q211E w systemie bakulowirusowym.
2. Udowodnienie, że struktura glikosfingolipidu NOR1 otrzymanego w linii komórkowej 2102Ep transferowanej wektorem kodującym muteinę Q211E enzymu Gb3/CD77 jest podobna do antygenu NOR1 izolowanego z krwinek ludzkich (za wyjątkiem części ceramidowej).
3. Wykazanie, że enzym Gb3/CD77 jest syntetazą antygenu P1.
4. Przedstawienie danych eksperymentalnych pokazujących, że białko Gb3/CD77 może syntetyzować zarówno antygen P^k jak i P1.
5. Zbadanie aktywności enzymatycznej wariantu Q211E syntazy Gb3/CD77 i wykazanie, że odpowiada ona za syntezę antygenów P^k, P1 oraz NOR.

6. Wykazanie wpływu mutacji Q211E syntazy Gb3/CD77 na formowanie oligomerów.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Radosława Kaczmarka wnosi bardzo wiele do zrozumienia molekularnych podstaw układu P1PK. Wykazanie, że ludzka α1,4-galaktozylotransferaza odpowiada za syntezę antygenów P^k i P1, a jej wariant mutacyjny dodatkowo za syntezę antygenu NOR, jest dużym osiągnięciem. Jest to pierwszy opisany w literaturze przykład syntazy, w której mutacja powoduje zmianę swoistości akceptorowej.

Autor pracy podsumowuje otrzymane przez siebie wyniki w formie 5-stronicowej dyskusji, krytycznie, w sposób logiczny przedstawiając tok prowadzonych eksperymentów. Zakończenie dyskusji opisuje dalsze możliwe ścieżki prowadzenia badań, celem porównania specyficzności synatazy konsensusowej oraz posiadającej postawienie Q211E.

Autor nie ustrzegł się jednak w pracy pewnych niedociągnięć. Wyniki pracy zostały opublikowane i może stąd opis prowadzonych eksperymentów, otrzymanych wyników oraz dyskusja są przedstawione bardzo skrótowo. Na tym tle wstęp jest bardzo rozbudowany, wydaje się być artykułem przeglądowym. Niektóre zdania są nadmiernie rozbudowane, przez co trudno zrozumieć przekazywaną myśl (np. rozdział 1.1.1, akapit 1, zdanie 4). Odnosząc się do Emila von Dungerna oraz Ludwika Hirszfelda można by zacytować oryginalny artykuł. Przy niektórych nazwach odczynników nie ma przedstawionego pochodzenia, albo pojawia się ono w dalszej części pracy. „Wstawki" na rysunkach można by przedstawić jako kolejne częsci rysunku (B, C, ...).

Ponadto mam kilka pytań dotyczących wykonanych eksperymentów. Czy zamiast chromatografii cienkowarstwowej nie można było zastosować rozdziałów z użyciem HPLC, czy nie pozwoliło by to na analizy ilościowe oraz określenie parametrów kinetycznych badanych enzymów ? Dlaczego wymiana buforu przed oczyszczaniem na kolumnie ze złożem niklowym zajmowała aż 120 godzin. W jakiej objętości prowadzono nadprodukcję białek w systemie bakulowirusowym ? Czy można oszacować w jakim procencie otrzymane rekombinowane białko było aktywne (lub poprawnie zwinięte). Proszę o informację, czy wektor kodujący syntezę był przygotowanie osobiści przez autora pracy, podobnie, czy eksperymenty MS były wykonywane samodzielnie.

Podsumowując, pragnę podkreślić bardzo wysoki poziom przedstawionej do oceny pracy. Mgr Radosław Kaczmarek w swoich badaniach wykorzystał szereg metod badawczych dzięki którym wykazał unikalne własności syntazy Gb3/CD77 oraz jej wariantu Q211E. Wyniki swojej pracy przestawił w czasopismach takich jak: *Journal of Biological Chemistry, Biochemical and Biophysical Research Communications* oraz w artykule przeglądowym w *Transfusion Medicine Reviews*. Warto podkreślić również, że poza wymienionymi artykułami doktorant jest autorem siedmiu innych

publikacji zarówno krajowych jak i międzynarodowych. Ponadto, wyniki swojej pracy zaprezentował w postaci dziesięciu doniesień konferencyjnych.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej "Badanie przyczyn zmian swoistości ludzkiej α1,4-galaktozylotransferazy (syntazy Gb3/CD77)" jest bardzo wysoka, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie magistra Radosława Kaczmarka 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 czasopismach o wysokim współczynniku wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Z poważaniem

Daniel Krowarsch