prof. dr hab. Anna Lityńska

Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48) 12 664 64 65
E-mail: anna.litynska@uj.edu.pl

PAN - Instytut Immunologii
Wpl. dnia 18-04-2016
L. dz. 172/16

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01

Ocena

rozprawy doktorskiej Pana mgra **RADOSŁAWA KACZMARKA**

pt.

„Changes in the specificity of human α1,4–galactosyltransferase (Gb3/CD77 syntase): studies on the molecular background (Badanie przyczyn zmian swoistości ludzkiej α1,4-galaktozylotransferazy (syntazy Gb3/CD77))"

Wyniki przedstawionej mi do oceny pracy zostały opublikowane w trzech międzynarodowych czasopismach z listy filadelfijskiej a zatem były one już poddane surowej ocenie recenzentów. Szkoda tylko, że publikacje nie zostały dołączone do tych materiałów. Praca jest kontynuacją badań grupy Pana Prof. Marcina Czerwińskiego i współpracowników nad wyjaśnieniem molekularnych podstaw powstania antygenu NOR, który to antygen jest glikosfingolipidem z unikalną terminalna strukturą Galα1,4GalNAc. Glikozylacja jest powszechną modyfikacją, której podlegają zarówno białka jak i lipidy. Glikany odgrywają istotna rolę w podstawowych procesach fizjologicznych jak również patologicznych. Wśród glikanów są również determinanty antygenowe układów grupowych krwi takich jak: AB0 czy P1PK. Glikany powstają w wyniku działania specyficznych enzymów – glikozylotransferaz. W tym procesie można wyróżnić swoistą triadę: donor, akceptor i transferaza. Donorami są zaktywowane reszty cukrowe, najczęściej jako nukleotydocukry, akceptorami mogą być oligosacharydy, określone reszty aminokwasowe lub lipidy. Natomiast glikozylotransferazy przenoszą reszty cukrowe na cząsteczki akceptora z wytworzeniem wiązania glikozydowego. Pomimo dużej różnorodności struktur glikanowych proces ten jest uporządkowany i najczęściej przebiega

sekwencyjnie za co odpowiada lokalizacja glikozylotransferaz w odpowiednich przedziałach aparatu Golgiego. Zatem rola glikozylotransferaz w syntezie glikanów jest niezwykle istotna, a wszelkie zmiany w sekwencji genów kodujących te enzymy mogą prowadzić do zmian zarówno ilościowych jak i jakościowych w tym procesie.

Pan mgr Radosław Kaczmarek zajął się bardzo ważnym ale równocześnie trudnym zagadnieniem jaki stanowi badanie jednej z glikozylotransferaz biorącej udział w glikozylacji lipidów. Ludzka α1,4-galaktozylotransferaza katalizuje tworzenie wiązania α1,4-glikozydowego pomiędzy resztą galaktozy pochodzącą z UDP-galaktozy a terminalną galaktozą laktozyloceramidu – antygen P^k (Gb3/CD77) lub paraglobozydu (antygen P1). Dodatkowo wykazano, że ten enzym może występować w dwu postaciach: konsensowej lub zawierającej podstawienie aminokwasu (podstawienie 211 Gln w Glu) w pozycji 211 łańcucha polipeptydowego polegające na zamianie reszty glutaminy na resztę kwasu glutaminowego. Ta zmiana spowodowana jest przez mutację punktową 631C>G w genie *A4GALT* co rozszerza swoistość akceptorową enzymu w ten sposób, że nabywa zdolność przyłączania galaktozy zarówno do terminalnej galaktozy jak i do terminalnej N-acetylogalaktozaminy globozydu w wyniku czego powstaje antygen NOR z nieznanym do tej pory terminalnym disacharydem Galα1,4GalNAc. Erytrocyty z powierzchniowym antygenem NOR są aglutynowane przez większość ludzkich surowic, gdyż w surowicy występują naturalne przeciwciała rozpoznające glikotop Galα1,4GalNAc. Tym nie mniej, były to tylko dowody pośrednie dotyczące funkcji ludzkiej α1,4-galaktozylotransferazy w tworzeniu antygenów P^k , P1 oraz NOR. Uzyskaniem dowodu biochemicznego zajął się Pan mgr Radosław Kaczmarek.

Praca ma typowy podział na rozdziały: wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusję zakończoną wnioskami oraz spis literatury. Pracę kończy appendix z 4 rozdziałami oraz spis rysunków, tabel oraz publikacji Doktoranta.

Wstęp stanowi najobszerniejszą część pracy i zawiera najnowsze informacje na temat glikozylotransferaz z podziałem na rodziny, ich specyfiką substratową oraz mechanizmem działania. Następnie, zostały opisane glikosfingolipidy z uwzględnieniem struktury i ich syntezy *de novo*. Znaczną część wstępu zajmuje omówienie układu grupowego $P1P^k$, GLOB i Forsssman. Omówione są enzymy zaangażowane w syntezę antygenów,

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01

struktury antygenów należące do serii globo i neolakto oraz serologiczne aspekty związane z obecnością antygenów grupowych krwi. Ostatnia część wstępu dotyczy antygenów jako receptorów dla bakterii takich jak uropatogenne szczepy *E. coli* czy dla toksyny Shiga. Ilość przedstawionych informacji oraz szczegółowy opis zagadnień świadczą o bardzo dobrej orientacji Pana mgr Radosława Kaczmarka w tej tematyce. Wstęp zakończony jest celem pracy, który został zawarty w trzech punktach.

Materiały i metody opisane zostały na 15 stronach. Rozpoczyna rozdział dotyczący wszelkich działań dotyczących DNA: izolacji, amplifikacji, trawienia, klonowania fragmentów DNA do odpowiedniego wektora, sekwencjonowania i na koniec wprowadzenia do elektrokompetentnych komórek *E. coli*. Następna część dotyczy analiz wykonywanych na poziomie białek. Trzecia część opisu metodyki to główny trzon prowadzonych badań, w których wykorzystano komórki linii 2102 E_1 ludzkiego potworniaka nietrasfekowane i stabilnie transferowane wektorem kodującym konsensową α1,4-galaktozylotransferazę, która produkuje antygeny P^k i P1 i komórki transfekowane wektorem kodującym enzym z podstawieniem 211Q>E syntezujące antygeny P^k , P1 i NOR. Komórki te posłużyły do otrzymania odpowiedniej do dalszych badań ilości glikosfingolipidów, które następnie zostały z nich wyizolowane. Obojętne glikosfingolipidy były frakcjonowane, a każda frakcja analizowana wysoko sprawną chromatografią cienkowarstwową (HPTLC) w układzie analitycznym i preparatywnym. Zidentyfikowany antygen NOR był poddany trawieniu α–galaktozydazą z nasion kawy. Analizą instrumentalną z użyciem MALDI-TOF przebadano całą pulę obojętnych glikosfingolipidów otrzymanych w komórkach linii 2102 E_1 oraz glikosfingolipid NOR1. Natomiast metodą MS/MS i MS^3 potwierdzono obecność struktury antygenu NOR1/SSEA analizując jon 1411,8 m/z oraz jony powstałe podczas jego fragmentacji. Aktywne formy α1,4-galaktozylotransferazy a właściwie jej katalityczną domenę otrzymano w owadziej linii komórek Sf9. Z cząsteczki enzymu usunięto fragment wprowadzający go do błony i zastąpiono sekwencją kierującą enzym do sekrecji. Enzymy wyizolowano z pożywki hodowlanej metoda chromatografii na kolumnie Ni-NTA. Następnie oznaczono aktywność obu form α1,4-galaktozylotransferazy stosując dwie metody. Metodę ELISA z wykorzystaniem syntetycznych akceptorowych substratów zkoniugowanych z PAA i metodę izotopową ze znakowaną donorową Gal [UDP-C^{14} Gal]. Jako substraty zostały użyte pochodzące z erytrocytów laktoceramid, paraglobozyd, globozyd i obojętne glikosfingolipidy. Opis metod jest

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01

szczegółowy pomimo faktu, że zostały one zawarte w opublikowanych pracach.

Kolejny rozdział czyli wyniki obejmują 10 stron. Wykonując analizę glikosfingolipidów powierzchniowych oraz używając specyficznych przeciwciał, a także stosując analizę instrumentalną Pan mgr Radosław Kaczmarek. wykazał, że komórki linii 2102 E_1 transfekowane wektorem kodującym konsensową α1,4-galaktozylotransferazę produkują antygeny P^k i P1, natomiast komórki transferowane wektorem kodującym enzym z podstawieniem 211Q>E syntezują antygeny P^k, P1 i NOR. Nie obserwowano reakcji z przeciwciałami dla komórek nietrasfekowanych. Ten wynik opisuje pierwszą glikozylotransferazę, która zmienia swoją swoistość akceptorową na skutek punktowej mutacji. Kolejnym ważnym wynikiem tej pracy było otrzymanie w owadziej linii komórkowej Sf9 aktywnych enzymów o sekwencji konsensowej oraz z podstawieniem, a następnie wykazanie ich aktywności wobec syntetycznych oligosacharydów i oczyszczonych glikosfingolipidów. W ten sposób zostało wykazane, że konsensowa forma enzymu syntezuje zarówno antygen P^k jak i P1, co jest bezpośrednim dowodem biochemicznym na to, że antygen P1 powstaje w wyniku działania α1,4-galaktozylotransferazy. Wreszcie, bardzo ważną obserwacją jest to, że enzym zawierający podstawienie 211Q>E syntezuje antygeny P^k, P1 i NOR. Najwyższą aktywność wykazuje on w stosunku do Lac-PAA, który jest prekursorem antygenu P^k.

Dyskusja jest najkrótszą częścią pracy, gdyż obejmuje 5 stron i koncentruje się na skomentowaniu najważniejszych osiągnięć tej pracy. Tym, że fenotyp NOR jest wynikiem mutacji 613C>G w genie *A4GALT* co zostało wykazane na podstawie widm masowych otrzymanych dla glikosfingolipidów izolowanych z transferowanych komórek 2101 E_p. Wyniki te zostały potwierdzone w reakcji ze specyficznymi przeciwciałami. Kolejny ważny krok dotyczył wyjaśnienia genetycznych podstaw polimorfizmu fenotypu P_1/P_2. Pytanie, na które nie była znana odpowiedź dotyczyło tego czy tylko jeden enzym Gb3/CD77 kodowany przez gen *A4GALT* jest odpowiedzialny za syntezę dwóch antygenów P1 i P^k lub czy są dwa różne enzymy, z których jeden nie został jeszcze poznany. Trudność w znalezieniu odpowiedzi polegała na tym, że nie było danych na temat aktywności dla izolowanego rekombinowanego produktu genu *A4GALT.* Innym aspektem tego zagadnienia była możliwość tworzenia heterodimerów z syntazą Gb4Cer. Zgodnie z tą hipotezą punktowa mutacja Q211E mogła by wpływać na ten proces. W celu weryfikacji tej hipotezy zastosowano metodę BiFC

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01

(Bimolecular Fluorescence Complementation), która jednak nie wykazała heterodimeryzacji natomiast pokazała homodimeryzację obu form enzymu. Jednak wg Pan mgra Radsława Kaczmarka analiza pozycji mutacji w odniesieniu do motywu DXD w cząsteczce enzymu sugeruje raczej bezpośredni udział reszty aminokwasowej 211 w procesie transferu substratu. Następna część dyskusji dotyczy wyboru wektora bakulowirusowego jako właściwego systemu dla uzyskania rekombinowanego enzymu. Zaletą tej metody jest stosunkowo duża wydajność dla białek izolowanych z pożywki hodowlanej komórek owadzich. Wprowadzenie sekwencji sekrecji (gp67) pozwoliło na uzyskanie odpowiedniej do badań ilości rekombinowanego enzymu. Wykorzystując go, uzyskano po raz pierwszy biochemiczny dowód, że ludzka syntaza Gb3/CD77 jest syntazą P1 co potwierdziło wcześniejsze pośrednie przypuszczenia i dało odpowiedź co do molekularnego podłoża systemu P1PK. Wariant enzymu z podstawieniem pQ112>E syntezuje antygen NOR. Co również istotne, te wyniki obalają tezę „jeden enzym jedno wiązanie", która obowiązywała w odniesieniu do syntezy glikanów. Jest to również pierwsza opisana glikozylotransferaza, która w wyniku punktowej mutacji zmienia specyfikę substratową i w konsekwencji prowadzi do powstania niespotykanej u ssaków reszty cukrowej. Dyskusję kończą wnioski przedstawione w trzech punktach, które pokazują, że założone we wstępie cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Sposób realizacji i zastosowane metody są na najwyższym poziomie a wyniki niezwykle cenne nie mam więc uwag krytycznych a raczej pytania otwierające dyskusję.

Pytania:

1. Do metody ELISA stosowane były płytki pokryte substratem. Czy sprawdzano ilość związanego do płytek substratu (w trakcie pokrywania) do testu ELISA?

2. Czy α1,4-galaktozylotransferaza podlega potranslacyjnym modyfikacjom (fosforylacja/glikozylacja) i czy jest taka pewność, że forma błonowa i forma rozpuszczalna (na której przeprowadzano badania) wykazują taką samą aktywność?

3. W jakim kierunku pójdą dalsze badania mające na celu określenie roli glutaminianu w funkcji tego enzymu?

4. Czym było spowodowany tak długi czas (62 i 72 godz) inkubacji z galaktozydazami?

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przeprowadzonej oceny mogę z pełną odpowiedzialnością stwierdzić, że rozprawa doktorska Pana mgra Radosława

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01

Kaczmarka Pt. **„Changes in the specificity of human α1,4–galactosyltransferase (Gb3/CD77 syntase): studies on the molecular background (Badanie przyczyn zmian swoistości ludzkiej α1,4-galaktozylotransferazy (syntazy Gb3/CD77))"** spełnia wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595) oraz w Rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 roku zatem zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii I Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgra Radosława Kaczmarka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wagę otrzymanych wyników oraz wysoki poziom zastosowanych metod wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Kraków, dnia 11 kwietnia 2016 roku.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierzą

Zakład Biochemii Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 64 68
12 664 64 65
fax 12 664 51 01