
Prof. dr hab. Katarzyna Nałęcz
Pracownia Procesów Transportu w Błonach Biologicznych
Tel. 22-5892-303, E-mail: k.nalecz@nencki.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Bożeny Szulc
pt. „Funkcjonalna analiza potencjalnych transporterów UDP-N-acetyloglukozoaminy”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa, wykonana w Zakładzie Biochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Olczaka, dotyczy wybranych transporterów kodowanych przez geny z rodziny *SLC35*. Należy podkreślić, że nadrodzina genów *SLC* (solute carriers) koduje białka, których funkcją jest transport przez błony biologiczne głównie jonów i hydrofilowych związków niskocząsteczkowych, z wyjątkiem rodziny *SLC3*, która koduje geny białek regulujących heterodimeryczne transportery z rodziny *SLC7*. Większość ponad 400 białek kodowanych przez geny *SLC* zgrupowanych w 66 rodzin, to transportery zlokalizowane i funkcjonujące w błonie plazmatycznej i dysponujemy szeroką wiedzą na temat ich specyficzności substratowej, mechanizmu transportu, czy ostatnio także struktury, mimo, że jako hydrofobowe białka błonowe nie są łatwym przedmiotem krystalizacji. O wiele mniej wiemy jednak, z wyjątkiem rodziny *SLC25* - transporterów wewnętrznej błony mitochondrialnej, o białkach funkcjonujących w wewnętrznych błonach w komórce, takich jak białka kodowane przez geny *SLC35*. Ponieważ badania na heterologicznych układach drożdżowych wykazywały rolę jednego z białek z tej rodziny (*SLC35A3*, *A3*) w dostarczaniu UDP-N-acetyloglukozoaminy do procesu glikozylacji białek, podjęcie badań nad funkcją tego białka w komórkach ssaczy było istotne nie tylko ze względów poznawczych, jeśli chodzi o transport tego nukleotydo-cukru, ale również ważne dla analizy procesów glikozylacji. Należy w tym miejscu dodać, że kowalencyjne wiązanie cukrów i ich pochodnych w procesie N- lub O-glikozylacji prowadzi w przypadku białek do ich prawidłowego zwijania, uzyskania właściwej konformacji prowadzącej do stabilności glikoprotein i jest istotne dla funkcjonowania wielu białek w błonie plazmatycznej (m.in. transporterów czy białek adhezyjnych), a także białek ulegających sekrecji. Ponieważ głównymi przedziałami komórkowymi, w których zachodzi proces glikozylacji białek są siateczka śródplazmatyczna (retikulum endoplazmatyczne, ER) i aparat Golgi'ego, podjęcie przez mgr inż. Bożenę Szulc badań nad mechanizmem transportu jednego z substratów glikozylacji, a mianowicie N-acetyloglukozoaminy jest istotne nie tylko ze względu na próbę wyjaśnienia molekularnych

podstaw tego zjawiska, ale także ze względu na fakt, iż zaburzenia transportu nukleotydocukrów powodują szereg stanów patologicznych.

Należy też dodać, że podjęta w dysertacji tematyka jest kontynuacją prowadzonych przez zespół promotora pracy - prof. Mariusza Olczaka badań nad glikoproteinami i molekularnymi podstawami stanów patologicznych wynikających z wrodzonych zaburzeń glikozylacji.

Ocena formalna pracy:

Rozprawa, zawarta na 136 stronach, ma kształt tradycyjnego manuskryptu, główne części to Wykaz skrótów, Streszczenie, Abstract w j. angielskim, Wstęp, Cel Pracy, Materiały i metody Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Literatura obejmująca 177 pozycji. Dodany jest też suplement z listą publikacji mgr inż. Bożeny Szulc i na podkreślenie zasługuje fakt, że ma ona w swoim dorobku 7 prac, w tym 2 pierwszoautorskie i trzecią z równorzędnym pierwszym autorstwem. Warto dodać, że część wyników przedstawionej dysertacji została opublikowana w 2020 r. w „Journal of Biological Chemistry” i mgr inż. Bożena Szulc jest w tej publikacji także pierwszym autorem.

Ocena merytoryczna pracy:

Wstęp obejmuje dwa podstawowe dla pracy zagadnienia, a mianowicie szczegółowy opis procesów N- i O-glikozylacji, a także omówienie białek zaangażowanych w dostarczanie substratów tych procesów. Śledzenie struktur i opisu procesu glikozylacji ułatwiają czytelne ryciny. Jednolita szata graficzna i konsekwentne stosowanie tych samych symboli dla poszczególnych cukrów i ich pochodnych (także w rozdziale Wyniki) bardzo ułatwiają analizę struktury glikanów i ich powstawania. Następnie omówione są nukleotydocukry i ich transportery. Nie wiem tylko, dlaczego UDP-N-acetyloglukoaminy w skrócie UDP-GlcANC zmienia w tekście rodzaj na męski (str. 19, str. 20). Po ogólnym omówieniu transporterów nukleotydocukrów Autorka przechodzi do charakterystyki transporterów z rodziny SLC35, skupiając się na tych, które stanowią przedmiot części eksperymentalnej doktoratu, a mianowicie SLC35A2, SLC35A3, SLC35B4 i SLC35D1. Charakterystyka ta obejmuje także opis stanów patologicznych związanych z mutacjami genów kodujących badane transportery. Wstęp zakończony jest opisem glikozylotransferaz, w szczególności glikozylotransferaz N-acetyloglukoaminy (Mgat).

Wstęp można uznać za kompletny i dobrze wprowadzający w tematykę rozprawy, widać, że Autorka posiada umiejętność klarownego przedstawiania złożonych procesów. Rozdział ten jest znakomitą monografią i być może warto byłoby ten tekst opublikować np. w „Postęпах

Biochemii”. Z poczucie belferskiego obowiązku muszę jednak wytknąć pewne błędy terminologiczne, czy moje sugestie:

- Str. 22 i 28: stwierdzenie, że transportery nukleotydo-cukrów wypompowują monofosfonukleotydy lub SLC35D1 wypompowuje UDP-GlcAc jest błędne, ponieważ termin „pompa” jest stosowany do ATPaz, które transportują jony kosztem hydrolizy ATP, a białka te, jak pisze Autorka, katalizują reakcję wymiany;
- Cytosol (Rys. 6) – zarówno po angielsku, jak i po polsku winno być cytosol przez „s” (vide „Słownik Biochemiczny angielsko-polski i polsko-angielski” Edwarda Bańkowskiego, który powstał przy wsparciu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego);
- ER –poprawnie „siateczka śródplazmatyczna”;
- „konserwatywna sekwencja” (w kilku miejscach), lepiej „sekwencja zachowana w ewolucji”;
- Na str. 25 pojawia się w opisie genu SLC35A2 słowo egzon. Mimo, że w j. polskim „x” przed samogłoską jest wymieniany na „eg” (egzocytoza, egzonukleaza), to jednak termin ekson pochodzi od słowa ekspresja i taka pisownia jest wprowadzona przez wspomniany powyżej „Słownik Biochemiczny”. Autorka zresztą jest niekonsekwentna, gdyż w rozdziale Wyniki” na rycinach pokazujących analizę fragmentów mRNA występuje termin Ekson” (Rys. 18, 36, 44), także w tekście na str. 36 jest ekson, a w tabeli 1 (poniżej) jest egzon.

Polemizowałabym także z przedstawionym na str. 20 stwierdzeniem „Nie wiadomo również dlaczego transport UDP-GlcNAc wymagałby aż tylu różnych białek”. Wiele substratów przenoszonych przez transportery SLC (np. aminokwasy) wykorzystuje kilka różnych białek, których ekspresja i lokalizacja mogą ulegać zmianie w rozwoju, czy różnych stanach patologicznych.

Przedstawiona we Wstępie rola białek SLC35A2 i SLC35A3 w komórkach drożdży oraz informacja dotycząca charakterystyki białek A2, B4 i D1 doprowadziły do sformułowania głównych **celów pracy**, a mianowicie wyjaśnienia, czy A3 jest głównym transporterem UDP-N-acetyloglukozoaminy w komórkach ssaczych, a także czy A2 i A3 wspólnie dostarczają nukleotydo-cukrów oraz czy białka B4 oraz D1 biorą udział w dostarczaniu UDP-N-acetyloglukozoaminy do syntezy N- oraz O-glikanów. Główne cele pracy są uzupełnione o etapy ich realizacji: Autorka zaplanowała wyjaśnienie roli badanych białek stosując inaktywację wybranych genów w komórkach ssaczych oraz określić rolę tych białek poprzez

analizę N- i O-glikanów produkowanych przez genetycznie zmodyfikowane linie komórkowe.

Opis **materiałów i metod** jest szczegółowy i z pewnością ułatwi w macierzystym Zakładzie powtórzenie i zastosowanie użytych metod. Jedyna moja krytyczna uwaga dotyczy tabel z przeciwciałami. Obecnie wiele czasopism wymaga podania (oprócz nazwy producenta) także numeru katalogowego użytego przeciwciała, bowiem wiele firm ma w swojej ofercie kilka przeciwciał na dany antygen, niektóre przeciwciała zostają wycofane, a więc podanie takiego numeru z pewnością ułatwiłyby kolejnym osobom przyszłe doświadczenia, chociaż podejrzewam, że taki spis z numerami funkcjonuje w macierzystym Zakładzie. Mimo tej uwagi, na podkreślenie zasługuje szerokie spektrum stosowanych metod, obejmujące hodowle różnych ssaczych linii komórkowych, metody biologii molekularnej prowadzące do inaktywacji genów, czy badanie ekspresji genów, a także nadekspresję białka SEAP (secreted alkaline phosphatase). Autorka przeprowadzała także żmudne procedury prowadzące do przygotowywania próbek do analizy N- i O-glikanów, co obejmowało w przypadku N-glikanów deglikozylację białek, oczyszczanie N-glikanów i ich fluorescencyjne znakowanie, oraz desialilację w przypadku próbek do analizy metodą spektrometrii mas. W przypadku O-glikanów hodowała komórki w obecności akceptora dla metody CORA (cellular o-Glycome reporter/Amplification), który, co warto podkreślić, samodzielnie syntezowała. Po oczyszczeniu i permetylacji O-glikanów przygotowywała próbki do analizy metodą spektrometrii mas. Chociaż rozdział N-glikanów metodą HPLC oraz analizę metodą spektrometrii mas MALDI-TOF wykonały inne osoby, Autorka samodzielnie analizowała uzyskane wyniki. Do analizy dojrzałych struktur glikanów wykorzystywała nadprodukcję wydzielanej przez komórki fosfatazy alkalicznej. W pracy stosowano także klasyczne metody rozdziału i analizy białek, a także barwienie immunofluorescencyjne, chociaż przy opisie tych ostatnich zabrakło informacji o stosowanych w mikroskopie konfokalnym długościach fal dla wzbudzenia i emisji. W opisie analizy statystycznej ostatnie zdanie „Na wszystkich wykresach przedstawionych w pracy stosowano następujące oznaczenia...” i podano wartość prawdopodobieństwa testowego zabrakło mi nazwy stosowanego testu statystycznego, chociaż domyślałam się, że był to niesparowany t-test z poprawką Welsha. Poza tym znalazłam tylko jeden wykres z tak zaznaczoną znamiennością (Rysunek 31). Należy jednak podsumować, że przedstawiony opis stosowanych metod, świadczy o dużej wszechstronności w pracy doświadczalnej, jak również o tym, że mgr inż. Bożena Szulc jest znakomitym eksperymentatorem.

W części eksperymentalnej pracy, opisanej w rozdziale **Wyniki** zastosowano inaktywację genów kodujących badane białka, a następnie analizowano produkty N- i O-glikozylacji w lizatach, a także glikozylację białek LAMP-1 i SEAP. Wykorzystano różne linie komórek ssaczych: ludzkie HEK293T, HepG2 oraz chomicze CHO i Lec8 (linia pozbawiona białka A2). Do inaktywacji genów wykorzystano klasyczny system CRISP-Cas9 do inaktywacji genu *SLC35A3* w liniach ludzkich, natomiast w inaktywacji genu *SLC35A3* w liniach chomiczych oraz genów *SLC35B4* i *SLC35D1* w liniach ludzkich wykorzystano nikazową wersję systemu CRISP-Cas9. Wykorzystano też wcześniej wyprowadzone w macierzystym Zakładzie ludzkie linie z inaktywowanym genem *SLC35A2*. Ze względu na toksyczność antybiotyku selekcyjnego (puromycyny) w przypadku linii chomiczych, selekcionowano klonów, a w wybranych klonach sekwencjonowano po jedностopniowej reakcji PCR krótkie sekwencje DNA, co pozwoliło, po stwierdzeniu zmiany ramki odczytu, na potwierdzenie braku produkcji funkcjonalnego białka A3. Podobną strategię selekcji klonów i sekwencjonowania krótkich odcinków DNA zastosowano w przypadku inaktywacji genu *SLC35A3* w ludzkich liniach pozbawionych białka A2, z tym, że jako czynnik selekcyjny wykorzystano białko fluorescencyjne RFP. Wpływ inaktywacji genów *SLC35A2* i *SLC35A3* na glikozylację badano poprzez analizę migracji w żelu białka LAMP1. Co prawda z wyjątkiem linii HEK293 A3KO we wszystkich zmodyfikowanych liniach komórkowych masa białka LAMP-1 była mniejsza, co mogłoby świadczyć o tym, że białka A2 i A3 są niezbędne dla glikozylacji, jednak autorka wyklucza taką rolę białka A3, ze względu na wyższą masę cząsteczkową w porównaniu z migracją białka LAMP-1 po inaktywacji *SLC35A2*. Jestem jednak ciekawa, jak Autorka interpretuje pojawienie się nowego prążka migrującego ok. 140 kDa we wszystkich modyfikowanych liniach komórek HepG2 (Rysunek 19). Analizowano N- i O-glikany we wszystkich badanych liniach komórkowych, porównując profile elucji i strukturę w lizatach uzyskanych z komórek typu dzikiego oraz komórek pozbawionych białka A2, białka A3 lub obu białek jednocześnie. Analiza za pomocą spektroskopii mas wykazała, że komórki pozbawione białka A3 nadal produkują złożone glikany, co wyklucza rolę tego białka w dostarczaniu UDP-N-acetyloglukozoaminy. Ciekawą jest też obserwacja, że komórki linii HepG2 pozbawione białka A2 produkowały jedną strukturę glikanu zawierającego galaktozę (Rysunek 21), podobnie, obecność galaktozy wykryto w N-glikanach linii chomiczych pozbawionych białka A2, co stawia znak zapytania nad rolą białka A2 w transporcie UDP-galaktozy. Aby uniknąć maskowania przez niedojrzałe glikany Autorka przeprowadziła analogiczną analizę dla białka sekrecyjnego SEAP po jego nadprodukcji. Jednak podobnie, jak w przypadku lizatów komórkowych nie zaobserwowano istotnych zmian N-glikozylacji w komórkach pozbawionych białka A3, chociaż

zaobserwowano brak struktur galaktyzowanych glikanów białka SEAP wydzielanego przez komórki A2KO. Zaskakującą obserwacją było stwierdzenie obecności struktur galaktyzowanych w linii HEK293T A2/A3KO, co może świadczyć, że A2 nie jest niezbędne dla transportu UDP-galaktozy. Pozbawienie białka A3 nie zmieniło także struktury O-glikanów, natomiast przy braku funkcjonalnego białka A2 (samego lub z A3) obserwowano wyłącznie antygen Tn. (rdzeń 1 O-glikozylacji).

Ponieważ te wszystkie wyniki wskazywały na możliwość transportu UDP-N-acetyloglukozoaminy i UDP-galaktozy przez inne białka, Autorka postanowiła sprawdzić efekt inaktywacji *SLC35A3* na ekspresję innych genów z rodziny *SLC35* i, z wyjątkiem *SLC35A5*, którego ekspresja rosła w komórkach HepG2 A3KO, nie zaobserwowała wzrostu ekspresji innych genów. W tym miejscu chciałabym przedyskutować ten problem w czasie obrony, ponieważ, jak wiemy, poziom transkrypcji nie odzwierciedla poziomu ostatecznej formy białka, jego aktywności i lokalizacji, jak choćby w przypadku białka D1, które głównie lokalizuje w siateczce śródplazmatycznej.

Autorka powtórzyła strategię analizy N- i O- glikanów w lizatach komórek i w białku SEAP po inaktywacji genów kodujących białka B4 i D1, jednak nie miało to wpływu na inkorporację N-acetyloglukozoaminy do N- i O-glikanów.

Ze względu na obserwowany wpływ pozbawienia białek A2 i A3 na rozgałęzianie N-glikanów, mgr inż. Bożena Szulc przeanalizowała też wybrane glikozylotransferazy Mgat. W komórkach ludzkich zaobserwowała pojawienie się dodatkowej formy Mgat1 o mniejszej masie cząsteczkowej oraz zmniejszenie poziomu wydzielania. Natomiast poziom Mgat2 rósł we wszystkich zmodyfikowanych liniach, a sekrecja tego enzymu rosła tylko w komórkach A2KO. Z kolei w przypadku badania Mgat5, ilość, masa i sekrecja tego enzymu w zmodyfikowanych liniach komórkowych były różne dla różnych linii komórkowych. Wyniki te wskazują na komórkowo specyficzny efekt pozbawienia białek A2 i A3 na glikozylotransferazy.

Wszystkie przedstawione w rozprawie obserwacje wskazują, jak zostało to podsumowane we wnioskach, że białko A3 nie jest głównym, czy raczej według mnie jedynym transporterem UDP-N-acetyloglukozoaminy w komórkach ssaczych. Ponieważ specyficzność substratowa wielu białek kodowanych przez geny z rodziny *SLC35* nie jest znana, identyfikacja transportera UDP-N-acetyloglukozoaminy stanowi niewątpliwie wyzwanie do przyszłych badań.

Przedstawiona na 11 stronach **Dyskusja** jest dobrze poprowadzona. Autorka podsumowuje swoje wyniki, wykazuje ich znaczenie i omawia w odniesieniu do literatury przedmiotu. Na podstawie uzyskanych przez siebie wyników z doświadczeń przeprowadzonych na 3 różnych

ssaczycy liniach komórkowych krytycznie odnosi się do postawionej na początku rozprawy hipotezy o roli białka A3 w transporcie UDP-N-acetyloglukozoaminy i białka A2 w transporcie UDP-galaktozy. Autorka omawia także mechanizmy kierujące białka B4 i D1 do odpowiednich przedziałów komórkowych, a zwłaszcza różnice wynikające z umiejscowienia metki po nadekspresji kodujących je genów. Za szczególnie ciekawą uważam część Dyskusji poświęconą możliwości tworzenia kompleksów wielobiałkowych (białka z rodziny SLC35 z glikozylotransferazami), jak i możliwość przenoszenia nukleotydo-cukru bezpośrednio z transportera na enzym, problemy ten mogą bowiem stanowić punkt wyjścia do dalszych badań.

Uwagi ogólne:

Praca przygotowana jest starannie pod względem edytorskim. Znalazłam niewiele literówek, kilka błędów typu „z nad”, zamiast „znad”, czy „komórką wymieniano pożywkę” zamiast „komórkom”. Nie udało się uniknąć anglicyzmów, jak np. „mikstura dNTP” w tabeli 6 (wolałabym „mieszanie”), żel akrylamidowy, zamiast akryloamidowy, gdzieśgdzie kropka zamiast przecinka (np. w wartościach pH buforów). Winno też być poli-L-lizyna (str. 58).

Uwagi końcowe:

Wymienione powyżej drobne uwagi krytyczne nie zmieniają mojej wysokiej oceny przedstawionej rozprawy. Przedstawione wyniki wskazują na znajomość wielu technik, umiejętność ich interpretacji, stanowią także oryginalne rozwiązanie badanego problemu dotyczącego zaangażowania białek SLC35 w dostarczaniu substratów do procesu glikozylacji. Rozprawa spełnia więc wymogi określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.).

Ze względu na szerokie spektrum stosowanych metod, wartość naukową przedstawionych wyników oraz ich dojrzałą interpretację wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy mgr inż. Bożeny Szulc stosowną nagrodą.