



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Bożeny Szulc
pod tytułem
“Funkcjonalna analiza potencjalnych transporterów
UDP-N-acetyloglukozoaminy”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Bożeny Szulc odnosi się do niezwykle interesującego i intensywnie eksplorowanego w ostatnich latach zagadnienia dotyczącego funkcjonalnego znaczenia kompleksów tworzonych między białkami biorącymi udział w procesie glikozylacji. Zagadnienie to wpisuje się w szeroki nurt badań skupiających się na wyjaśnianiu molekularnych mechanizmów wpływających na przebieg procesu glikozylacji.

O ile sam proces biosyntezy glikanów został dosyć dobrze poznany, to kwestia jego regulacji pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że glikozylacja jest procesem uporządkowanym, ale brak matrycy na bazie której są syntezowane glikany powoduje, że jest ona gatunkowo-, tkankowo- i komórkowo-specyficzna, a dodatkowo na jej ostateczny wzór ma również wpływ aktualny stan komórki. Nie ma zatem nic zaskakującego w tym, że w stanach patologicznych obserwowane są zmiany we wzorze glikozylacji glikokoniugatów. Konsekwencją zaburzonej biosyntezy glikokoniugatów są nie tylko zmiany właściwości fizyko-chemicznych tych makrocząsteczek, ale również, niekorzystne zazwyczaj dla organizmu, aberracje dotyczące pełnionych przez nie rozlicznych ról modulujących, przebiegu reakcji rozpoznawania typu komórka-komórka czy komórka-macierz pozakomórkowa, oraz molekularnej mimikry glikanów gospodarza.

Ostateczna struktura syntezowanych glikanów jest wypadkową obecności i dostępności potencjalnych miejsc glikozylacji, poziomu ekspresji genów kodujących glikozylotransferazy i glikozydazy, aktywności, lokalizacji w błonach oraz sekwencyjności działania wspomnianych enzymów, dostępności nukleotydowych donorów monosacharydów, za których

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dostarczenie do wnętrza odpowiednich organelli komórkowych odpowiedzialne są właśnie transmembranowe białka, określane mianem transporterów nukleotydo-cukrów, a na to nakłada się dodatkowo działanie czynników środowiskowych. Z uwagi na przedstawione powyżej przesłanki, kierunek prowadzonych przez Panią mgr inż. Bożenę Szulc badań dotyczących transportu UDP-*N*-acetyloglukozoaminy w komórkach ssaczy i identyfikacji białek z rodziny SLC35A mogących pełnić rolę transporterów tego nukleotydo-cukru, który to jest niezbędny do syntezy *N*- i *O*-glikanów oraz proteoglikanów, uważam za trafny i w pełni uzasadniony.

Opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej badania zostały wykonane pod opieką naukową Pana prof. dra hab. Mariusza Olczaka w Zakładzie Biochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zostały one sfinansowane z trzech źródeł: realizowanego w latach 2018-2021 projektu PRELUDIUM przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (27/N/NZ3/00369), którego kierownikiem była Doktorantka, co zasługuje na szczególne podkreślenie; projektu OPUS przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (2014/15/B/NZ3/00372), którego kierownikiem był Profesor Mariusz Olczak, oraz ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii na lata 2014-2018.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Bożeny Szulc została napisana klasycznie i ma układ typowy dla tego typu prac dyplomowych. Struktura pracy jest przejrzysta i przemyślana. Rozdział *Wstęp* zajmuje 18 stron, rozdział *Materiały i metody* - 28 stron, rozdział *Wyniki* - 48 stron, a rozdział *Dyskusja* - 11 stron. Poza tymi kluczowymi rozdziałami, w rozprawie doktorskiej umieszczono dodatkowo *Wykaz najważniejszych skrótów* zajmujący dwie strony oraz zajmujące po jednej stronie: *Streszczenia* w języku polskim i języku angielskim, *Cel pracy*, *Wnioski*, *Suplement* zawierający spis publikacji współautorstwa Doktorantki. Spis publikacji (rozdział *Literatura*) zajmuje 15 stron. Rozprawa doktorska ilustrowana jest 49-cioma rycinami i zawiera 15 tabel. Całość liczy 136 stron maszynopisu.

Oba streszczenia jasno i zwięźle oddają treść rozprawy doktorskiej. Zawierają one wszystkie niezbędne elementy, czyli precyzyjne uzasadnienie

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

wyboru tematu, zdefiniowany cel badań, skrótowy opis stosowanych metod badawczych oraz otrzymanych najważniejszych rezultatów, a także wnioski. Na szczególne podkreślenie zasługuje bogata bibliografia obejmująca 177 pozycji literaturowych, z czego 42% cytowanych prac było opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat, a 25% - w ciągu ostatnich 5 lat; najstarsza z cytowanych prac pochodzi z 1970 roku. Duży udział prac opublikowanych przed 2011 rokiem wynika z odwoływania się przez Doktorantkę do klasycznych prac z zakresu glikobiologii.

Z *Suplementu* można się dowiedzieć, że część z wyników opisanych w rozprawie doktorskiej została już opublikowana w 2020 roku w *The Journal of Biological Chemistry (JBC)*, czasopiśmie o IF wynoszącym 5,157, któremu zgodnie z komunikatem Ministra Edukacji i Nauki z 9 lutego 2021 roku, przyznano 100 pkt. Pani mgr inż. Bożena Szulc jest pierwszym autorem w tym artykule (Szulc B. i in., *J. Biol. Chem.*, 295:16445-16463, 2020). Już sama ta publikacja świadczy o wysokiej randze wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Ponadto Doktorantka jest współautorką siedmiu innych, wieloautorskich artykułów opublikowanych w latach 2017-2021, o łącznej liczbie punktów 790. W trzech z tych artykułów Pani mgr inż. Bożena Szulc jest pierwszym autorem lub równorzędnym pierwszym autorem, co świadczy o wiodącym w nich udziale, dużej aktywności naukowej Doktorantki oraz umiejętności pracy w zespole.

We *Wstępie* Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą poruszaną w rozprawie doktorskiej przypominając podstawowe informacje dotyczące glikozylacji oraz skrótowo przedstawiając budowę i biosyntezę N- i O-glikanów. O ile mogłabym się warunkowo zgodzić ze stwierdzeniem iż „(glikozylacja) Jest to jedna z najczęstszych posttranslacyjnych modyfikacji.... (str. 14)”, co jest pewnym uproszczeniem z uwagi na fakt, że jest prawdziwe w stosunku do innych typów glikozylacji niż N-glikozylacja, to sformułowanie, że „N-glikozylacja jest podstawową modyfikacją posttranslacyjną białek (str. 15) uważam już za niepoprawne. Proces N-glikozylacji przebiega zarówno ko-, jak i potranslacyjnie. Pierwszy etap N-glikozylacji prowadzi do syntezy prekursorowego N-oligosacharydu

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

(Glc₃Man₉GlcNAc₂) na lipidowym nośniku, który jest następnie przenoszony *en bloc* na nowopowstający łańcuch peptydowy, co katalizuje transferaza oligosacharydowa zależna od Dol-P, a więc zachodzi to kotranslacyjnie. Co więcej, czas zajścia *N*-glikozylacji jest ograniczony. Akceptorowa Asn zlokalizowana w tryplecie NXS/T, NXC, NQC lub NSG, jest częścią rosnącego peptydu, który ulega fałdowaniu w miarę jak wyłania się on z rybosomu. Kiedy białko ulegnie już zwinięciu, potencjalne miejsca *N*-glikozylacji mogą już nie być dostępne z powodu zawady przestrzennej. Kolejny etap *N*-glikozylacji, czyli obróbka glikanu, zachodzi faktycznie już potranslacyjnie. Ten fragment rozdziału *Wstęp* ilustrowany jest pięcioma poglądowymi, autorskimi rycinami. Moim zdaniem Rysunek 1 zyskałby na przejrzystości gdyby użyto większej czcionki. Poza tym przedstawia on schematycznie miejsca i etapy zachodzenia procesu glikozylacji w komórce, a nie jak napisano - w Aparacie Golgiego. Oprócz tego umieszczenie na Rysunku 1 zwrotu „synteza prekursorów *N*-glikanów” jest nieco mylące, gdyż może sugerować, że takich prekursorów jest więcej niż jeden, co oczywiście nie jest prawdą.

W dalszej części *Wstępu* Doktorantka szczegółowo charakteryzuje jeden z nukleotydo-cukrów, czyli UDP-*N*-acetyloglucozaminę, której potencjalne transportery są przedmiotem funkcjonalnej analizy w ocenianej rozprawie doktorskiej. Następnie dokonuje gruntownego i wyczerpującego przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat budowy i mechanizmów działania transporterów nukleotydo-cukrów dla UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-Xyl, UDP-GlcA i UDP-GalNAc; u ludzi są to białka z podrodziny SLC35, co zilustrowane jest trzema informatywnymi rycinami. Lektura tej części *Wstępu* pokazuje, że Doktorantka jest doskonale zaznajomiona z literaturą przedmiotową i przygotowana do prowadzenia badań w tym zakresie.

Ostatni podrozdział *Wstępu* skupia się na czterech wybranych glikozylotransferazach *N*-acetyloglucozamininy (Mgat1, Mgat2, Mgat4, Mgat5), katalizujących dołączenie reszty GlcNAc do mannoz struktury rdzeniowej *N*-glikanów, co zapoczątkowuje budowę tzw. anten w *N*-glikanach typu kompleksowego (złożonego) i hybrydowego. Opisane w nim zostały reakcje katalizowane przez te enzymy, ich subkomórkowa lokalizacja oraz

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



wspomniano z jakimi białkami mogą one tworzyć wielobiałkowe kompleksy. Graficznym przedstawieniem działania wybranych glikozylotransferaz z rodziny Mgat miał być Rysunek 9, który Doktorantka stworzyła wzorując się na rycinie (Fig. 1) zamieszczonej w artykule autorstwa Lau K.S i Dennis J.W. opublikowanym w 2008 roku (pozycja 128 w spisie literatury). Niestety Doktorantka nie uniknęła błędu podczas opracowywania tej ryciny, ponieważ substratem dla Mgat 1 jest $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ a nie $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, co jest zresztą dobrze widoczne na wspomnianej rycinie (Fig. 1), czyli pierwsza od lewej struktura umieszczona na Rysunku 9 powinna mieć jeszcze dwie dodatkowe reszty mannozy. W mojej opinii, wzorowanie się na Fig. 1 z artykułu Lau K.S i Dennis J.W. nie jest najszcześniejszym wyborem. Nie uwzględniono tam faktu usuwania dwóch reszt mannozy z $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (reakcja katalizowana przez alfa-mannozydazę II Aparatu Golgiego), a to błędnie sugeruje, że substratem dla Mgat 2 jest właśnie $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, gdy tymczasem chodzi o $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Ponadto Mgat4 nie zawsze działa przed Mgat5. $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ jest równorzędnym substratem dla obu tych enzymów. Produkt powstały w efekcie działania jednego z tych enzymów, może być następnie wykorzystany jako substrat przez drugi enzym.

Informacje przedstawione we *Wstępie* dają przesłanki do sformułowania hipotezy badawczej i uzasadnienia celów podjętych badań. Niestety w rozprawie doktorskiej hipoteza badawcza nie została sformułowana. Cele natomiast zostały jasno określone. Miały one doprowadzić do udzielenie odpowiedzi na trzy kluczowe pytania (cytuję):

1. Czy białko A3 jest głównym transporterem UDP-N-acetyloglukozoaminy w komórkach ssaczy?
2. Czy białka A3 i A2 pełnią wspólną rolę w dostarczaniu nukleotydocukrów?
3. Czy białka B4 oraz D1 biorą udział w dostarczaniu UDP-N-acetyloglukozoaminy do tworzenia N- i O-glikanów?

Odpowiedzi na postawione pytania miała zagwarantować realizacja pięciu zaplanowanych zadań badawczych, wymienionych na str. 32 rozprawy doktorskiej.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wszystkie zadania badawcze zostały zaplanowane bardzo precyzyjnie, a metodyka badań opisana szczegółowo i obszernie. Dokładność opisu (procedury wykonania) pozwala na powtórzenie badań. Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i adekwatne do założonych celów. Realizacja tak skomplikowanego układu doświadczeń wymagała zastosowania szerokiego wachlarza nowoczesnych i różnorodnych metod z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki i biochemii, takich jak np.: inaktywacja genów z wykorzystaniem systemu CRISP-Cas9, stabilna i przejściowa transfekcja, analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR, immunofluorescencyjne barwienie komórek i Western blot, analiza O-glikanów z wykorzystaniem techniki CORA, strukturalna charakterystyka glikanów metodą spektrometrii mas (MALDI-TOF) i HPLC. Zdaję sobie sprawę, że kolejność podrozdziałów w rozdziale 3.2 *Metody* jest subiektywną decyzją Doktorantki i pewnie odzwierciedla ich istotność, ale moim zdaniem rozdział ten zyskałby na przejrzystości, gdyby kolejność podrozdziałów bardziej odpowiadała chronologii wykonywanych czynności. Ułatwiłoby to też recenzentowi analizę wyników; nie trzeba byłoby wówczas tak bardzo wertować stron rozprawy doktorskiej. Muszę jednak przyznać, że Doktorantka, starała się ułatwić to zadanie recenzentowi odsyłając do odpowiednich rozdziałów w części opisującej otrzymane wyniki. Za dobry pomysł uważam umieszczenie w rozdziale *Materiały i metody* szesnastu tabel, w których podano m.in. sekwencje i listy wykorzystywanych starterów, składy mieszanin reakcyjnych i warunki prowadzenia reakcji oraz wykaz używanych przeciwciał wraz ze stosowanymi rozcieńczeniami.

Lektura tej części rozprawy doktorskiej nasunęła mi się dwa pytania. Proszę o wyjaśnienie dlaczego linie komórkowe wykorzystywane podczas prowadzenia badań wymieniane są w dwóch miejscach w rozprawie doktorskiej: w podrozdziale 3.14 – linie HEK 293T, HepG2, CHO i Lec8, a w podrozdziale 4.1 – cztery kolejne (HEK 293T A2KO, HEK 293T A3KO, HepG2 A2KO, HepG2 A2KO). W spisie używanych odczynników znalazłam NBT/BCIP (str. 33). Do czego był używany ten roztwór, skoro przeciwciała

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii
Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



drugorzędowe są sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową lub Alexa Fluor 488/568? Ponadto, w podrozdziale 3.1.1 brakuje rozwinięć skrótów; pełne nazwy pojawiają się dopiero przy opisach metod. Zamiast używania określenia „bufor górny/dolny do żelu poliakryloamidowy” (str. 33) zgrabniej byłoby napisać: bufor do polimeryzacji zagęszczającego/rozdzielającego żelu poliakryloamidowego. Przy przeciwciałach monoklonalnych dobrze byłoby dać jeszcze nazwy klonów.

Rozdział *Wyniki* stanowi najbardziej obszerną część rozprawy doktorskiej i pozwala prześledzić tok rozumowania oraz rezultaty otrzymane podczas kolejnych etapów realizacji projektu. Otrzymane wyniki zostały udokumentowane na 31 rycinach, najczęściej złożonych z wielu części, przejrzystych i opatrzonych informatywnymi podpisami. Warto podkreślić, że na potrzeby realizacji zaplanowanych badań z sukcesem wygenerowano przy użyciu systemu CRISPR-Cas9 ponad 50 klonów czterech linii komórkowych z nieaktywnym genem *SLC35A3* (CHO A3KO, Lec A3KO, HepG2 A2KO/A3KO oraz HEK293 A2KO/A3KO), ponad 50 klonów jednej linii z inaktywowanym genem *SLC35B4* (HEK293T B4KO) oraz ponad 50 klonów jednej linii z inaktywowanym genem *SLC35D1* (HepG2 D1KO), w których brak produkcji funkcjonalnego białka był spowodowany delecją ustalonej liczby nukleotydów, jak wykazano po zsekwencjonowaniu genów. Świadczy to o ogromie wykonanej pracy. Linie te wraz ze wspomnianymi wcześniej, były później wykorzystywane do funkcjonalnej analizy roli białek transportowych A3, A2, B4 i D1.

Za właściwe uważam przeprowadzenie wstępnej oceny wpływu inaktywacji genów *SLC35A3* i *SLC35A2* na proces glikozylacji polegający na ocenie ubytku masy silnie glikozylowanego białka LAMP-1 (na podstawie obrazów z Western blot) zanim przeprowadzono szczegółową analizę puli N-glikanów białek produkowanych przez zmodyfikowane linie komórkowe dwoma metodami, to jest wysokosprawną chromatografią cieczową i spektrometrią mas MALDI-TOF, co było zadaniem dużo bardziej skomplikowanym pod względem metodycznym i analitycznym, też bardziej pracochłonnym i czasochłonnym. Chociaż wstępne wyniki były obiecujące

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii
Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

(spadek masy LAMP-1 w komórkach z inaktywowanym genem *SLC35A3* lub *SLC35A2*, chociaż różnie wyrażony), to szczegółowa analiza profili HPLC wykazała brak znaczących różnic pomiędzy komórkami dzikimi i tymi pozbawionymi funkcjonalnego białka A3, chociaż w liniach pozbawionych funkcjonalnego białka A2 zaobserwowano wzrost ilości struktur mniej złożonych, przy równoczesnym spadku struktur mocno rozbudowanych. Wyniki z MALDI-TOF potwierdziły, że funkcjonalne białko A3 nie jest konieczne do dostarczania UDP-GlcNAc, aby w badanych komórkach doszło do syntezy z *N*-glikanów typu kompleksowego i nie ma też wpływu na tworzenie *O*-glikanów. Analogicznie było w przypadku reporterowego białka, zmodyfikowanej alkalicznej fosfatazy. Na pochwałę zasługuje podjęcie w takiej sytuacji decyzji o konieczności oceny poziomu ekspresji genów czterech transporterów z rodziny SLC35 wytypowanych na podstawie skrupulatnego przeglądu literatury w liniach komórkowych z inaktywowanym genem *SLC35A3* oraz zbadania wpływu inaktywacji genów *SLC35A3* i *SLC35A2* na ilość, masę i sekrecję trzech glikozylotransferaz (Mgat1, Mgat 2 i Mgat 5). Ponieważ wyniki tych badań wykazały, że białko A3 nie jest głównym transporterem UDP-GlcNAc, przeprowadzono analogiczne badania dotyczące analizy syntezy *N*- i *O*-glikanów w komórkach z inaktywowanymi genami *SLC35B4* i *SLC35D1*. Doktorantce należą się słowa uznania za przeprowadzenie serii tak nowoczesnych, kompleksowych, wielowątkowych i dobrze udokumentowanych eksperymentów oraz dokonanie tak wieloaspektowej analizy wyników.

Rozdział *Dyskusja* stanowi wartościową część rozprawy doktorskiej. Przeprowadzona została w nim krytyczna, rozważna, rzeczowa i wyczerpująca analiza wszystkich własnych wyników na tle dostępnego piśmiennictwa przedmiotowego. Rozdział ten czyta się dobrze, z zainteresowaniem. Doktorantka po raz kolejny wykazuje się w nim dobrą znajomością tematyki dotyczącej zakresu prowadzonych badań i potwierdza swoją dojrzałość naukową. Należy tylko żałować, że tak obszernie prowadzone badania angażujące ogromny aparat eksperymentalny, nie pozwoliły jednoznacznie wskazać, które białko z rodziny SLC35 pełni rolę głównego transportera UDP-

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii
Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

N-acetyloglucozaminę w komórkach ludzkich, nukleotydocukru który jest niezbędny do syntezy *N*-glikanów typu kompleksowego i/lub hybrydowego, *O*-glikanów oraz proteoglikanów. Seria tak dobrze zaplanowanych doświadczeń dała podstawy aby wykluczyć, że ta kluczowa rola przypada białku A3, chociaż takie przesłanki pochodziły z badań na modelu mysim oraz z drożdżowych systemów heterologicznych. Niemniej jednak stwierdzone zmiany w wzorze *N*-glikanów wskazywały, że inaktywacja genu *SLC35A3* najsilniej upośledza działanie *Mgat5*. Wykazano ponad to, że białka A2 i A3 są funkcjonalnie powiązane podczas transportu tego nukleotydocukru, co sugeruje ich współpracę podczas tworzenia wielobiałkowych kompleksów. Niemniej jednak poznanie dokładnego mechanizmu tej współpracy wymaga poprowadzenia dalszych badań. Udowodniono również, że białka B4 i D1 nie odgrywają roli w transporcie UDP-GlcNAc podczas syntezy *N*- i *O*-glikanów.

Rozprawa doktorska jest starannie przygotowana od strony edycyjnej, z dużą dbałością o stronę językową. Nie mam większych zastrzeżeń co do poprawności formalnej manuskryptu (zgodności cytowań z listą literatury, opracowania bibliografii według przyjętej konwencji, zachowania marginesów, interlinii i wielkości czcionki), jakości tabel czy większości rycin. Ale jak to zwykle bywa przy tak obszernych objętościowo pracach, pojawiły się nieliczne literówki, błędy stylistyczne czy przyklejanie jednostek do wartości liczbowych. Chciałabym też zwrócić uwagę, że jeśli rozprawa jest pisana w języku polskim, to nie powinien się pojawiać skrót „h” jako oznaczenie godziny. Poza tym, zamiast „zawada strukturalna” (str.15.) powinien być użyty zwrot „zawada przestrzenna (steryczna)”, a jako rozwinięcie skrótu CDG (str. 8) powinno się pojawić określenie wrodzone, a nie złożone, schorzenia glikozylacji.

Powyżej przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają mojej wysokiej oceny dotyczącej wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej. Wyniki uzyskane przez Panią mgr inż. Bożenę Szulc w istotny sposób uzupełniają i poszerzają stan wiedzy na temat transporterów nukleotydocukrów w komórkach ssaczy, wnosząc zupełnie nowe elementy i podkreślając zasadność kontynuowania tego typu badań w przyszłości.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Co więcej, rozprawa doktorska jest oryginalna i ma nowatorski charakter. Pokazuje, że Doktorantka dobrze opanowała warsztat badawczy, umiejętnie analizuje, prezentuje i omawia otrzymane wyniki.

Uwzględniając wszystkie elementy przeprowadzonej oceny, z całą pewnością stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Bożeny Szulc pod tytułem „*Funkcjonalna analiza potencjalnych transporterów UDP-N-acetyloglukozoaminy*” spełnia w pełni wszystkie ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365 i Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr inż. Bożeny Szulc do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom merytoryczny ocenianej rozprawy doktorskiej, jej oryginalność, nowatorski, wielowątkowy i interdyscyplinarny charakter badań, aktualność podjętej tematyki badań, złożoność procedur i ich czasochłonność, skomplikowaną analizę wyników i fakt, że zostały one już częściowo opublikowane w renomowanym, wysoko punktowanym czasopiśmie, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Bożeny Szulc stosowną nagrodą.

dr hab. Małgorzata Przybyło, prof. UJ

Kraków, dnia 17 września 2021 r.

Wydział Biologii
Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych
Zakład Biochemii
Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: 12 664 64 62
fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>