



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

dr hab. Mariola Paściak, prof. nadzw.
Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław, 20 lipca 2022r.

VIDE
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCIPLINY NAUKI MEDYCZNE
Przewodniczący
prof. dr hab. Agnieszka Halaś
Halaś

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Szczykutowicz

„Ocena O-glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia i jej potencjalnego związku z męskim potencjałem rozrodczym” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Ferens-Sieczkowskiej

Proste i złożone glikany występują powszechnie w przyrodzie i są podstawowymi składnikami komórek. W procesie glikozylacji tworzone są wiązania glikozydowe między resztami cukrowymi, a białkami lub lipidami, a w wyniku glikozylacji białek powstają *N*- lub *O*-glikany. Fascynujące jest że z 9 reszt cukrowych i różnej anomerii wiązań cukrowych powstaje tak wielka różnorodność strukturalna tych związków. Glikany uczestniczą w wielu kluczowych procesach biologicznych, m.in. adhezji, aktywacji receptorów, przenoszeniu sygnałów. Strukturalne elementy glikanów powodują, że mogą one oddziaływać z innymi cząsteczkami, a na szczególną uwagę zasługuje proces oddziaływania ligand-receptor, którego przykładem mogą być lektyny endogenne występujące w komórkach układu odpornościowego. Opisano wiele typów lektyn endogennych, w tym lektyny typu C (np. selektyny, MGL, DC-SIGN), lektyny typu I (Siglecs), galektyny i inne.

Procesy rozpoznawania glikanów mają podstawowe znaczenie w oddziaływaniu gamet rozrodczych w procesie zapłodnienia, a także implantacji zarodka i funkcji łożyska. Poznanie złożonych mechanizmów molekularnych prowadzących do zapłodnienia, jak również immunomodulacyjnej roli glikanów obecnych w płynach ustrojowych ma na celu poszukiwanie biomarkerów niepłodności.

Jest to niezmiernie ważne zarówno z poznawczego jak i medycznego punktu widzenia. Niepłodność uznawana jest przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) za chorobę cywilizacyjną i jest poważnym problemem społecznym. Szacuje się, że dotyczy on 15 % par na świecie, a w Polsce stanowi to około 1,2 - 1,5 mln par zmagających się z tym problemem. Podaje się, że 20-40 % przypadków niepłodności spowodowanych jest wyłącznie czynnikiem męskim, a wśród nich ok 15 % stanowią przypadki idiopatyczne.

Z tych względów przedłożona do oceny Rozprawa Doktorska dotyczy ważnych zagadnień powiązania *O*-glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia, ze szczególnym uwzględnieniem skróconych *O*-glikanów typu mucynowego, z męskim potencjałem reprodukcyjnym oraz poszukiwania immunomodulacyjnych glikoprotein wpływających na proces zapłodnienia.

Praca powstała pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Ferens-Sieczkowskiej, biochemika i glikobiologa, od lat zajmującej się zagadnieniami glikozylacji białek, glikobiologią nowotworów oraz niepłodnością męską, w tym wszechstronną analizą profilu glikozylacji białek plazmy nasienia.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Przedstawiona do recenzji praca stanowi zbiór trzech spójnych tematycznie artykułów: pracy przeglądowej oraz dwóch prac eksperymentalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu. Łączna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 10,039. Prace te stanowią zbiorowe opracowania, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Załączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do wiodącej roli Doktorantki w powstaniu tych prac.

Rozprawę rozpoczyna omówienie uzyskanych wyników, składające się ze wstępu będącego wprowadzeniem do tematyki badań, w którym Doktorantka przedstawia molekularne podstawy zapłodnienia, hipotezę obrony fetoembrionalnej oraz udział składników plazmy nasienia w tym procesie. Ponadto opisuje antygeny T i Tn, które są podstawą skróconego rdzenia O-glikanów i ich udział w procesach nowotworowych oraz immunomodulacyjnych.

W dalszej części omówienia Doktorantka określa cel badań, którym była analiza O-glikomu glikoprotein plazmy nasienia a także ocena potencjalnych zmian profilu O-glikozylacji w nasieniu u mężczyzn o obniżonym statusie reprodukcyjnym. Przedstawia również cele szczegółowe poszczególnych prac składających się na rozprawę doktorską. W mojej opinii jasne sformułowanie celów jest kluczowe i świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Następnie opisuje materiał biologiczny i metody wykorzystywane w części doświadczalnej wykorzystywane w badaniach m.in. macierze lektynowe, lektynobloting i chromatografię powinowactwa oraz bardzo skrótowo analizę bioinformatyczną, dochodząc do omówienia i dyskusji osiągniętych wyników, przedstawionych w publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Omówienie stanowi dobre podsumowanie realizowanych badań i zakończone jest ośmioma trafnie sformułowanymi wnioskami. Do rozprawy dołączono także streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenie o wkładzie własnym i oświadczenia współautorów oraz prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej.

Doktorantka opisuje swój udział w powstanie poszczególnych publikacji, w tym rolę w przygotowaniu koncepcji, przeprowadzaniu doświadczeń i analizie wyników, przygotowaniu rycin do prac eksperymentalnych oraz w redakcji manuskryptów. Oświadczenia współautorów szczegółowo opisują zakres wykonanych doświadczeń i udział w powstaniu prac i nie budzą wątpliwości co do znaczącego wkładu Doktorantki w powstanie prac. Przedstawienie rozprawy w postaci zbioru publikacji oznacza, że prezentowane wyniki zostały już poddane wnikliwej krytyce recenzentów. Na uwagę zasługuje, że prace te były już kilkakrotnie cytowane pomimo krótkiego czasu od ich opublikowania.

W pierwszej pracy (**Biomed Res Int. 2019; 2019: 5397804**), która jest pracą przeglądową Doktorantka wprowadza w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy i przedstawia liczne argumenty świadczące o roli składników plazmy nasienia nie tylko jako biernej ochronie gamet, ale mających wpływ na proces zapłodnienia. Opisała regulacyjną rolę glikoprotein w procesie kapacytacji oraz w modulacji układu odpornościowego. Przedstawiła hipotezę zaproponowaną przez Clarka i współpracowników (1996), dotyczącą oddziaływań między resztami cukrowymi, a białkami obecnymi w męskim i żeńskim układzie rozrodczym, które mogą być odpowiedzialne za wytworzenie tolerancji immunologicznej podczas zapłodnienia, a następnie implantacji zarodka i utrzymania ciąży.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Praca ta świadczy o dobrej znajomości tematu, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną, obejmuje najświeższe cytowania prac i wprowadza czytelników do złożonego zagadnienia mechanizmów molekularnych prowadzących do zapłodnienia, które są ciągle jeszcze niedostatecznie poznane, a wiedza o tych procesach pomogłaby wielu pacjentom borykającym się z problemem bezpłodności.

Opisując składniki plazmy nasienia pisała Pani przede wszystkim o glikoproteinach, ale wspomniała Pani też o prostaglandynach. Czy nie można wykluczyć, że inne lipidowe składniki np. glikosfingolipidy poprzez reszty cukrowe mogłyby oddziaływać z lektynami obecnymi na komórkach układu odpornościowego? Czy są dostępne informacje dotyczące występowania glikolipidów w plazmie nasienia?

W pracy oryginalnej (*Andrologia* 2018, e 13018) Doktorantka zastosowała nowoczesną metodę macierzy lektynowych do analizy wzorca glikozylacji białek obecnych w plazmie nasienia. Praca ta powstała we współpracy z profesorem Blixtem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Kopenhaskiego. Zastosowanie szeregu specyficznych lektyn o różnej swoistości immobilizowanych na powierzchni stałej umożliwiło szybkie profilowanie całkowitego glikomu. Metoda ta znakomicie nadaje się do porównywania względem siebie profili glikanów obecnych w różnych próbkach biologicznych i dzięki miniaturyzacji nie wymaga dużych ilości odczynników. Materiałem badawczym była znakowana barwnikiem fluorescencyjnym plazma nasienia 61 pacjentów o obniżonym statusie płodności, zgodnie z klasyfikacją WHO podzielonych na grupy: oligozoospermiczną, astenozoospermiczną, oligoastenozoospermiczną i pacjentów z prawidłowymi parametrami nasienia, którzy należeli albo do grupy kontrolnej (posiadającej potomstwo) lub nieposiadającej – normozoospermicznej. Grupa kontrolna liczyła siedmiu płodnych mężczyzn.

Osiemnaście lektyn różniących się specyficznością względem monosacharydu i rozpoznawanego epitopu, immobilizowano na fazie stałej w czterech stężeniach i trzech powtórzeniach, a następnie nanoszono na nie znakowane fluorescencyjnie próby plazmy nasienia i mierzono intensywność sygnału. Etap optymalizacji mikromacierzy, polegający na sprawdzeniu reaktywności rekombinowanych glikoprotein i glikanów skoniugowanych z BSA oraz testowaniu różnych stężeń plazmy nasienia, został przedstawiony w Omówieniu prac.

Dla wszystkich analizowanych lektyn (oprócz ConA) średnia reaktywność prób pochodzących od mężczyzn o obniżonej płodności była niższa niż w grupie kontrolnej. Najbardziej było to widoczne dla lektyn specyficznych względem O-glikanów i wiążących terminalną fukozę lub kwas sialowy.

Czy mogłaby Pani przedstawić możliwe wyjaśnienie dlaczego w reakcji z konkanawaliną A obserwowano odmienny wzorec reaktywności niż z pozostałymi lektynami tzn. wyższą reaktywność próbek plazmy nasienia w porównaniu do kontroli?

W trzeciej pracy (*Int J Mol Sci.* 2021, 22: 7331) Doktorantka podjęła się oszacowania częstości występowania glikoepitopów galaktozowych i/lub N-acetylogalaktozaminowych, rozpoznawanych przez lektyny VVL (*Vicia Villosa*) i MPL (*Maclura pomifera*), reprezentujących odpowiednio antygen Tn oraz antygen T. Te antygeny cukrowe występują na



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

skróconych *O*-glikanach, a ich obecność może być związana zarówno z procesem nowotworowym, jak również sugeruje się ich zaangażowanie w procesy immunologiczne, w tym prowadzące do zapłodnienia. Co ważne, antygeny te nigdy wcześniej nie były badane w kontekście immunomodulacji podczas zapłodnienia oraz wpływu na status płodności męskiej. Analizie poddano 103 próby plazmy nasienia: 16 prób kontrolnych oraz 87 prób pochodzących od pacjentów z obniżonym statusem płodności, podzielonych na 4 grupy diagnostyczne.

Po rozdziale elektroforetycznym białek zawartych w plazmie nasienia w badanych grupach mężczyzn Doktorantka otrzymała profile reaktywności glikoprotein z lektynami VVL i MPL, oznaczyła zarówno ich całkowitą reaktywność jak i gęstość glikoepitopów na poszczególnych białkach. Obie lektyny reagowały z tymi samymi frakcjami glikoprotein, w przypadku lektyny MPL widoczne były dodatkowe pasma. Cenną obserwacją było wykazanie, że gęstość epitopów, nie miała takiego znaczenia jak reaktywność poszczególnych białek. Białka po wycięciu z żelu poddano analizie proteomicznej stosując metodę LC-MS. Żeby potwierdzić uzyskane wyniki i jednoznacznie wykazać, które białka są nośnikami glikoepitopów T i Tn, przeprowadzono chromatografię powinowactwa z lektynami MPL i VVL immobilizowanymi na żelu agarozowym połączonych prób plazmy nasienia 10 mężczyzn normozoospermicznych. W analizie elektroforetycznej uzyskanych frakcji uzyskano 4 prążki zawierające glikoproteiny o masach cząsteczkowych 83 kDa, 70 kDa, 53 kDa i 15 kDa, które następnie zidentyfikowano stosując analizę LC-MS. Obecność semenogeliny 1 i 2, fibronektyny, białka indukowanego prolaktyną i laktotransferyny potwierdzono dodatkowo w teście immunoblotingu ze specyficznymi przeciwciałami.

Interesujące wyniki uzyskano przeprowadzając analizę bioinformatyczną obecności potencjalnych miejsc *O*-glikozylacji na resztach seryny i treoniny w sześciu glikoproteinach wytypowanych na podstawie LC-MS. Analiza ta wykluczyła możliwość glikozylacji w białku indukowanym prolaktyną (PIP), w laktotransferynie znaleziono tylko kilka potencjalnych miejsc *O*-glikozylacji, natomiast nie wykluczono ich zarówno na fibronektynie jak i semenogelinie 1 i 2.

Przeszukiwanie bazy danych STRING umożliwiło uzyskanie informacji o znanych i przewidywanych oddziaływaniach między badanymi białkami, zidentyfikowanymi w pasmach SDS-PAGE oraz zawartych we frakcjach eluowanych w chromatografii powinowactwa. W obu przypadkach powiązania funkcjonalne występowały między semenogelinami, laktotransferyną, białkiem indukowanym prolaktyną i poprzez cynkową glikoproteinę (AZGP1) z białkami integrynowymi, protoonkogenną kinazą tyrozynową Src oraz fibronektyną. Na podstawie analizy wzbogacenia strukturalnego przewiduje się udział tych białek w odpowiedzi odpornościowej, w tym wrodzonej odporności.

Przeprowadzona analiza miejsc glikozylacji dla semenogeliny 1 wskazała znaczącą zawartość miejsc *O*-glikozylacji tego białka, co nie ma obecnie potwierdzenia w dostępnej literaturze. Jakie eksperymenty należałoby wykonać, żeby ostatecznie potwierdzić obecność *O*-glikanów w semenogelinie 1?

Czy sjalowane antygeny T i Tn mogą być rozpoznawane przez receptory Siglec i jakie miałyby to znaczenie w kontekście modulacji odpowiedzi odpornościowej podczas zapłodnienia?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Praca jest napisana poprawnie, bez błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Z obowiązku recenzenta wspomnę o drobnych błędach edytorskich, które znalazły się w omówieniu pracy: str 28, złe cytowanie tabel, powinno być odniesienie do Tab. 2 i Tab. 3, a nie do Tab. 1 i 2, w tabelach 2 i 3 powinno być napisane laktotransferyna zamiast lactotransferyna, wszystkie skróty nazw białek podanych na Ryc. 14 powinny być rozwinięte w wykazie skrótów na początku pracy. Te drobne uchybienia nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując pragnę podkreślić, że rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem, przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i stanowi logiczny ciąg kolejno przeprowadzonych eksperymentów. Metody stosowane w pracy są dobrze dobrane, na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowej techniki macierzy lektynowych jako wynik współpracy naukowej w ramach stażu doktorskiego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych badań oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska ma też elementy nowatorskie, gdyż po raz pierwszy zidentyfikowano glikoproteiny plazmy nasienia prezentujące końcowe reszty N-acetylogalaktozamy i galaktozy, jako potencjalne ligandy dla endogennych lektyn, które mogą uczestniczyć w modulacji matczynej odpowiedzi odpornościowej podczas zapłodnienia. Oprócz waloru poznawczego otrzymane wyniki mają znaczenie praktyczne, gdyż wpisują się w poszukiwanie biomarkerów związanych z płodnością.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Justyny Szczykutowicz uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne, bardzo wartościowe wyniki i spełnia warunki określone w art. 13 (ust. 1) Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Justyny Szczykutowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy ze względu na jej wartość merytoryczną.

Mariola Paściak

dr hab. Mariola Paściak

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirsztfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu