



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, 24 listopada 2020r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Kałuży

„Analiza sjalilacji N-glikomu plazmy męskiego nasienia ze szczególnym uwzględnieniem swoistego antygeny sterczowego” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Ferens-Sieczkowskiej

Praca dotyczy profilu glikozylacji swoistego antygeny sterczowego oraz profilu sjalilacji N-glikanów plazmy nasienia mężczyźni o różnym statusie płodności. Glikoproteiny i glikany zawarte w nasieniu umożliwiają funkcjonowanie plemników, odpowiadają za interakcje z żeńskim układem odpornościowym i wpływają na sam proces zapłodnienia. Nieprawidłowa glikozylacja może powodować zaburzenia w funkcjonowaniu nasienia, a nawet bezpłodność. Podjęte badania glikomiczne wpisują się w niezwykle aktualny temat poszukiwania biomarkerów odpowiedzialnych za zaburzenia płodności oraz schorzeń układu rozrodczego. Szacuje się, że na świecie niepłodność dotyczy 8-12% par w wieku reprodukcyjnym, natomiast w Polsce problemy z płodnością są diagnozowane u ok 19% par, w tym bezpłodność dotyczy 4%, a obniżona płodność 15% par.

Glikoproteiny znajdujące się w plazmie męskiego nasienia wydają się dobrymi kandydatami do badań glikoproteomicznych, mających na celu ocenę męskiej płodności. Potranslacyjne modyfikacje białek, przede wszystkim glikozylacja, jak również monosacharydy zajmujące końcową pozycję w łańcuchu oligosachrydowym, np. kwas sjalowy, uczestniczą w wielu ważnych procesach biologicznych. Sjalilacja glikanów jest niezbędna we wczesnym rozwoju embrionalnym i w rozwoju neurologicznym, ponadto poziom i wzór sjalilacji może się zmieniać na skutek rozwoju procesu nowotworowego. W pionierskiej pracy Pang i współpracownicy wykazali, że kwas sjalowy determinuje proces wiązania plemników do osłonki przejrzystej oocytów. Glikoepitopy zawarte w plazmie nasienia rozpoznawane przez specyficzne lektyny, mogą brać udział w procesach immunomodulacyjnych towarzyszących zapłodnieniu. Powyższe przesłanki uzasadniają ważność podjętego przez Doktorantkę tematu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór trzech spójnych tematycznie prac eksperymentalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu. Łączna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 9,153. Prace te stanowią zbiorowe opracowania, w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem, w trzeciej pracy jest wymieniona jako autor drugi, ale o takim samym udziale co pierwszy autor. Do rozprawy dołączono omówienie uzyskanych wyników, streszczenie w języku polskim i angielskim, życiorys naukowy, oświadczenie o wkładzie własnym oraz oświadczenia współautorów. Doktorantka opisuje swój udział w powstanie poszczególnych





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

publikacji, w tym rolę w planowaniu i przeprowadzaniu doświadczeń, w analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Oświadczenia współautorów szczegółowo opisują zakres wykonanych doświadczeń i udział w powstaniu prac i nie budzą wątpliwości co do znaczącego wkładu Doktorantki w powstanie artykułów. Z tych względów ocena rozprawy obejmuje głównie analizę wkładu Autorki w poszczególnych publikacjach w oparciu na oświadczeniach współautorów i osiągniętych wynikach badań.

Rozprawę rozpoczyna obszernie omówienie uzyskanych wyników, składające się ze wstępu, będącego wprowadzeniem do tematyki badań, w którym Doktorantka przedstawia charakterystykę swoistego antygeny sterczowego, profil glikozylacji oraz funkcje proteolityczne tego białka. Ponadto opisuje techniki analizy glikanów wykorzystywane w badaniach - tandemową spektrometrię mas i lektynobloting.

Tu należy zauważyć, że pewnym uproszczeniem jest stwierdzenie, że „w źródle typu MALDI obserwuje się sygnały pochodzące od jonów $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$ ” ponieważ mogą się tworzyć również inne typy jonów dodatnich. Doktorantka zamiennie stosuje termin „spektrometria mas” i „spektrometria masowa”, a należałoby konsekwentnie stosować jeden termin.

W dalszej części omówienia Doktorantka wyznacza cel badań, którym było scharakteryzowanie profilu glikozylacji swoistego antygeny sterczowego, ze szczególnym uwzględnieniem profilu sialylacji tej glikoproteiny w nasieniu mężczyzn o obniżonym statusie reprodukcyjnym. Następnie opisuje materiał biologiczny i metody wykorzystywane w części doświadczalnej ilustrowane przejrzystymi schematami, dochodząc do omówienia i dyskusji osiągniętych wyników, przedstawionych w publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Omówienie, dobrze podsumowujące realizowane badania, zakończone jest siedmioma trafnie sformułowanymi wnioskami.

W pierwszej z przedstawionych prac (**Carbohydr Res 2016, 435: 19-25**), autorzy przeprowadzili analizę porównawczą struktur oligosacharydowych N-glikoprotein plazmy męskiego nasienia. W badaniach wykorzystano materiał biologiczny pochodzący od płodnych i bezpłodnych mężczyzn, podzielonych na 5 grup w zależności od parametrów nasienia i statusu płodności. N-glikany uwalniano z glikoprotein poprzez trawienie endoglikozydazą, permetylowano i analizowano stosując tandemową spektrometrię mas MALDI-TOF/TOF. W badanych próbkach plazmy nasienia autorzy zidentyfikowali 86 struktur oligosacharydowych, o 15 więcej niż w pracy Pang i wspłpr. (2009). Wśród N-glikanów niewielką liczbę stanowiły struktury zawierające kwas sialowy i znaczący był udział struktur fukozylowanych tworzących antygeny Lewis X i Lewis Y. Cenną obserwacją było wykazanie różnic ilościowych we względnej zawartości poszczególnych grup glikanów w próbkach plazmy nasienia bezpłodnych mężczyzn w odniesieniu do kontroli. Dotyczyło to glikanów zawierających mannozę i typu hybrydowego, pozbawionych końcowej reszty kwasu sialowego i wysoko-fukozylowanych. W grupach: oligozoospermicznej i oligoastenoospermicznej zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu sialylacji, natomiast w grupie astenoospermicznej w ogóle nie znaleziono glikanów zawierających dwie reszty kwasu sialowego. Jednocześnie we wszystkich grupach z nieprawidłowymi parametrami nasienia obserwowano zwiększoną ekspresję glikanów zawierających ponad dwie reszty fukozy. W podsumowaniu pracy autorzy sugerują, że niektóre przypadki niewyjaśnionej bezpłodności mogą być związane z nieprawidłową glikozylacją.



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

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pochodziły ze zsumowanego materiału biologicznego; interesująca byłaby odpowiedź na pytanie, jakie praktyczne informacje dotyczące diagnostyki niepłodności można uzyskać prowadząc analizę próbek indywidualnych pacjentów w oparciu o te dane?

Druga ze zbioru prac (**Reprod Fertil Dev 2019, 31: 579-589**) dotyczy ekspresji sjalowanych glikoepitopów oraz antygenów Lewis X i Lewis Y glikoprotein plazmy nasienia płodnych i bezpłodnych mężczyzn. Autorzy ustalili wzorzec sjalilacji i fukozytacji glikoprotein na podstawie oddziaływania z czterema specyficznymi lektynami. Zaobserwowano jedynie sześć frakcji glikoproteinowych reagujących z lektyną specyficzną dla kwasu sjalowego przyłączonego wiązaniem glikozydowym $\alpha 2,6$ do końcowej reszty galaktozy. Na podstawie półilościowych analiz densytometrycznych autorzy wykazali statystycznie istotną obniżoną reaktywność większości analizowanych glikoprotein plazmy nasienia pacjentów z astenozoospermią z lektyną MAA, specyficzną dla $\alpha 2,3$ -związanych reszt kwasu sjalowego, w porównaniu do grupy kontrolnej. Obniżona ekspresja kwasu sjalowego przyłączonego z utworzeniem wiązania $\alpha 2,3$ w plazmie nasienia pacjentów z astenozoospermią była zgodna z wynikami uzyskanymi w poprzedniej pracy. Białka posiadające sjalowane glikoepitopy uzyskane w rozdziale elektroforetycznym, po wycięciu z żelu, poddano analizie LC-MS. Wśród zidentyfikowanych białek znalazły się m.in. fibronektyna, laktotransferyna, kwaśna fosfataza prostaty oraz swoisty antygen sterczowy. W dyskusji pracy autorzy zwracają uwagę, że w glikoproteinach plazmy nasienia występują immunomodulujące epitopy, a ich dostępność w plazmie nasienia może być zmieniona w grupach pacjentów o obniżonej płodności.

W trzeciej z przedstawionych prac (**Talanta 2021, 222: 121495**) autorzy przeprowadzili analizę profilu glikozylacji swoistego antygeny sterczowego (PSA) wyizolowanego z plazmy nasienia płodnych i bezpłodnych mężczyzn. Artykuł jest cennym opracowaniem metodycznym, zawiera m.in. protokół postępowania w analizie profilu glikozylacji PSA z plazmy nasienia z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI MS. Sekwencja postępowania to oczyszczenie PSA poprzez związanie tego antygeny do złoża opłaszczonego specyficznymi przeciwciałami, redukcję, alkilację i trawienie trypsyną. Otrzymane glikozylowane dipeptydy autorzy poddali dwuetapowej reakcji amidacji, która umożliwiła rozróżnienie glikoform kwasu sjalowego związanego wiązaniem $\alpha 2,6$ lub $\alpha 2,3$ do reszty galaktozy w łańcuchu oligosacharydowym. Powtarzalność i odtwarzalność tej wieloetapowej metody została zweryfikowana z wykorzystaniem puli plazmy nasienia przez trzy kolejne doby na 12 odrębnie przygotowanych próbkach. Na uwagę zasługuje bardzo staranne udokumentowanie każdego etapu optymalizacji zamieszczone w suplemencie pracy. Analiza glikopeptydów PSA z próbek plazmy nasienia za pomocą MALDI-FTICR-MS wykazała obecność 44 glikoform, natomiast w analizie MALDI-TOF znaleziono 22 glikoformy, były to głównie glikany jedno- i dwuantenowe o wysokim poziomie fukozytacji i sjalilacji. Autorzy wykazali, że w glikopeptydach PSA najpowszechniejszym wariantem związanego kwasu sjalowego była $\alpha 2,6$ sjaloglikoforma. Nadrzędnym celem pracy była analiza glikozylacji PSA pochodzącego z plazmy nasienia mężczyzn płodnych i z zaburzeniami płodności. Szczegółowe badania glikanów w grupach mężczyzn płodnych i bezpłodnych nie wykazały różnic statystycznych pomiędzy grupami, nie było też korelacji pomiędzy glikozylacją PSA a wiekiem pacjentów, czy poszczególnymi



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

parametrami nasienia. Ponadto profil glikozylacji PSA był odmienny od opisanego w pierwszej pracy profilu N-glikomu białek plazmy nasienia, mającym związek z płodnością. Na podkreślenie zasługuje aspekt praktyczny pracy, gdyż opracowana metoda może być zastosowana do oznaczania glikomu PSA pochodzącego z innych płynów ustrojowych, a także do detekcji epitopu N-acetylolaktozodiaminowego, stosowanego do rozróżniania łagodnych nowotworów prostaty.

Wielka różnorodność białek plazmy nasienia sugeruje pytanie o kryteria, według których należałoby typować glikoproteiny do badań N-glikomu w kontekście rozpoznawania niepłodności męskiej?

Podsumowując pragnę podkreślić, że rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem, w którym prawidłowo zaplanowane i zrealizowane badania stanowią ciąg logiczny, wnosząc oryginalną wiedzę o glikobiologii plazmy nasienia. Praca znacząco przyczynia się do poznania funkcji modyfikacji potranslacyjnych białek - zwłaszcza sjalilacji - w aspekcie badania męskiej niepłodności i poznania mechanizmów zapłodnienia, a także włącza się w nurt poszukiwania nowych biomarkerów niepłodności związanych z nieprawidłową glikozylacją. Autorka sukcesywnie doskonaliła warsztat badań glikomicznych posługując się nowoczesną, wysokorozdzielczą technologią spektrometrii mas. Oprócz waloru poznawczego otrzymane wyniki mają znaczenie praktyczne, gdyż opracowana metoda profilowania glikozylacji PSA ma potencjalnie zastosowanie także w diagnostycznym różnicowaniu nowotworów prostaty.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Anny Kałuży 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 Anny Kałuży do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mariola Paściak

dr hab. Mariola Paściak

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

