

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Ząbczyńskiej**„Glikozylacja białek surowicy w chorobie Hashimoto: analiza strukturalna i funkcjonalna”**

Choroba Hashimoto (HT) jest autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, a jej rozwój jest związany z utratą tolerancji immunologicznej. Uważa się, że przyczyną zniesienia tolerancji na własne antygeny i rozwoju choroby Hashimoto są czynniki genetyczne oraz środowiskowe. HT charakteryzuje się obecnością w surowicy przeciwciał skierowanych przeciw antygenom tarczycy peroksydazie tarczycowej (TPO) i tyreoglobulinie (Tg). Przeciwciała anti-TPO są obecne u 90-95% chorych z HT i występują częściej niż anti-Tg, które stwierdza się u 60-80% pacjentów. Podwyższony poziom tych autoprzeciwciał jest podstawowym markerem diagnostycznym w HT. Jednakże mechanizmy molekularne leżące u podłoża chorobowych zmian funkcjonalnych tarczycy nadal wymagają wyjaśnienia.

Jednym z niepoznanych jeszcze procesów są zmiany w glikozylacji, dotyczące komórek tarczycy oraz komórek i białek układu odpornościowego. Analiza glikozylacji białek surowicy jest istotna dla wyjaśnienia mechanizmu autoimmunizacji w chorobie Hashimoto. Ponadto, zmieniona glikozylacja białek surowicy jest też celem w poszukiwaniu markerów chorób autoimmunizacyjnych, w tym HT. Dlatego temat pracy doktorskiej mgr Marty Ząbczyńskiej uważam za bardzo interesujący i niezwykle aktualny.

Oceniana praca jest złożeniem trzech publikacji: jednej pracy przeglądowej i dwóch prac oryginalnych. Warto podkreślić, że ukazały się one w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu (*Biomolecules*, IF 4,7; *Biochem. Biophys. Acta*, IF 3,7; *Int. J. Mol. Sci.*, IF 4,7). We wszystkich publikacjach Marta Ząbczyńska jest pierwszą autorką, a z zamieszczonego rozdziału „Oświadczenia współautorów” wynika, że Jej udział w przygotowaniu wszystkich trzech publikacji był kluczowy. W obszernym Wstępie pracy doktorskiej (liczącym 10 stron) Autorka wprowadza w realizowany temat przedstawiając patogenezę choroby Hashimoto, proces N-glikozylacji białek, jak również wyczerpująco omawiając badania opisane w dwóch publikacjach oryginalnych. W Dyskusji (6 stron) zamykającej pracę Autorka podsumowuje i interpretuje otrzymane wyniki. Z dużą wiedzą, ale i też z dużą ostrożnością proponuje wyjaśnienie obserwowanych efektów.

Z uwagi na to, że wyniki będące podstawą pracy doktorskiej zostały już ocenione przez recenzentów wymienionych czasopism, pozwolę sobie przedstawić tylko krótkie omówienie najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Marty Ząbczyńskiej.

W pracy przeglądowej z roku 2018 pt. „*Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders*” Autorka podejmuje tematykę roli glikozylacji kluczowych glikoprotein tarczycy w funkcjonowaniu tego gruczołu. Artykuł gromadzi dane uzyskane w badaniach strukturalnych i funkcjonalnych glikozylacji białek stanowiących autoantygeny. Zawiera opis procesów zachodzących w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych w tarczycy, w tym w rozwoju nowotworów tego gruczołu i chorobach autoimmunizacyjnych, którym towarzyszą zmiany glikozylacji. Artykuł świadczy o obszernej znajomości tematu i stanowi szczegółowe wprowadzenie merytoryczne do realizacji założonych badań.

W pierwszej pracy badawczej z roku 2019 pt. „*Altered N-glycan profile of IgG-depleted serum proteins in Hashimoto's thyroiditis*” Autorka wykazała zmiany strukturalne N-glikanów białek surowicy po deplecji IgG zidentyfikowane w HT z użyciem metody HPLC, MS oraz analiz lektynowych. Zgodnie z analizą MS frakcja N-glikanów, której zawartość istotnie wzrasta w HT, zawiera dwie struktury: jednosjalowaną trzyantenową strukturę kompleksową oraz dwusjalowaną dwuantenową strukturę z fukożą antenową. Badania z użyciem lektyn specyficznych dla Fuc i SA wykazały istotny statystycznie spadek zawartości rdzeniowej Fuc w reakcji z lektyną LCA (*Lens culinaris* agglutinin) oraz wzrost α 2,3-sjalilacji białek w reakcji z lektyną MAL-II (*Maackia amurensis* lectin II) w próbkach surowicy dawców z HT, podobnie, jak dla N-glikanów IgG (Martin i wsp. 2020).

W drugiej pracy badawczej, z 2020 roku, pt. „*The Contribution of IgG Glycosylation to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) in Hashimoto's Thyroiditis: An in Vitro Model of Thyroid Autoimmunity*” Autorka dokonała oceny roli zmienionej w przebiegu choroby Hashimoto glikozylacji IgG w modelach *in vitro* procesów ADCC i CDC zachodzących w tarczycy chorych z HT. Wyniki badań potwierdziły zwiększoną liczbę komórek efektorowych w obecności IgG wyizolowanych od dawców HT w porównaniu z kontrolą w obu zastosowanych modelach. Autorce udało się pokazać odwrotny wpływ desjalilacji IgG na procesy ADCC oraz CDC. Zaobserwowała

zwiększenie intensywności ADCC oraz obniżenie intensywności CDC w HT w porównaniu do zdrowych dawców.

Nie mam merytorycznych uwag do pracy doktorskiej mgr Marty Ząbczyńskiej zwłaszcza, że recenzje wykonali już recenzenci czasopism. Pragnę podkreślić, że dysertacja została przygotowana z dużą wiedzą i starannością a jej ocena sprawiła mi dużą przyjemność. Lektura pracy nasunęła mi kilka ogólnych i szczegółowych uwag i pytań, o ustosunkowanie się do których chciałabym prosić Autorkę:

1. Sądzę, że praca Martin i wsp., 2020 powinna zostać włączona do rozprawy doktorskiej. Praca ta, według Autorki, była punktem wyjścia do podjęcia badań stanowiących podstawę rozprawy. Otrzymane następnie przez Autorkę wyniki badań znakomicie uzupełniają i w znacznym stopniu poszerzają analizę pełnego glikomu białek surowicy w chorobie Hashimoto. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Marta Ząbczyńska jest drugim autorem wspomnianej pracy. Rozumiem jednak, że w badaniach uczestniczyły trzy międzynarodowe ośrodki naukowe oraz wielu autorów, co na pewno utrudniało spełnienie wymaganych procedur, w tym uzyskanie oświadczeń wszystkich współautorów.
2. Zastanawiam się, czy użycie endoglikozydazy F (*Elisabethkingia miricola*), która łatwiej niż BKF trawi glikoproteiny natywne, pozostawiając na łańcuchu polipeptydowym jedną resztę N-Acetyloglukozaminy z dołączoną $\alpha(1,6)$ fukozą, nie umożliwiłoby porównania ilości rdzeniowej fukozy w białkach surowicy HT i kontrolnej? Stosując, analogicznie metodę lektynoblotingu.
3. Rozważając hipotezę, że ostry i przewlekły stan zapalny stanowi przyczynę rozwoju chorób autoimmunizacyjnych, w tym HT, prowadząc do wzrostu stężenia cytokin prozapalnych, a te z kolei do wzrostu ekspresji wielu galaktozylotransferaz, co skutkuje wzmożoną glikozylacją, jak można wytłumaczyć odwrotny efekt sialylacji i rdzeniowej fukozytacji N-glikanów IgG w HT? Czy jest wiadomo, jak wygląda ekspresja FuT8? Moje pytanie wynika z faktu, że w przypadku przeciwciał anti-Tg (Yuan i wsp., 2015) w HT zaobserwowano zarówno wzrost sialylacji i rdzeniowej fukozytacji IgG w porównaniu do zdrowych dawców.

4. Pytanie szczegółowe dotyczące pierwszej pracy badawczej:
 - na podstawie analizy N-glikanów białek surowicy przedstawionej na Fig. 2 wynika, że są dwie struktury GP9 i GP17 zawierające korową fukozę. Jak wytłumaczyć zatem wzrost intensywności GP9 po de-fukozytacji przy użyciu BKF? I dlaczego jednocześnie spada intensywność GP21, chociaż nie ma tam fukozy?

5. Wykazano, że terminalny kwas sialowy w N-glikanach utrudnia wiązanie fragmentu Fc IgG do receptora na komórkach efektorowych (Jones i wsp., 2016) oraz blokuje wiązanie czynnika C1q do terminalnej galaktozy (Quast i wsp., 2015). Natomiast obecność $\alpha(1, 6)$ Fuc obniża wiązanie Fc IgG do receptora Fc γ R (Luo i wsp. 2017). A zatem w wyniku jednoczesnego usunięcia kwasu sialowego oraz rdzeniowej fukozy z IgG należałoby się spodziewać wzrostu intensywności obu efektów cytotoksycznych ADCC oraz CDC. Tymczasem po desialilacji IgG Autorka zaobserwowała wzrost efektu ADCC, natomiast obniżenie efektu CDC. Autorka tłumaczy to jednoczesnym wpływem obniżonej zawartości rdzeniowej fukozy w IgG chorych na HT i jest to prawda, ale tylko w odniesieniu do efektu ADCC (Luo i wsp., 2017). Zatem, czy jest znany przypuszczalny mechanizm wyjaśniający, jak brak rdzeniowej fukozy może wpływać na wiązanie czynnika C1q do terminalnego fragmentu N-glikanu Fc (Gudey i wsp., 2018) a tym samym obniżać efekt CDC?

6. Uwagi szczegółowe dotyczące drugiej pracy badawczej opublikowanej w *Biomolecules*:
 - termin „TOPO-negative cells” użyty w tekście rozprawy dla kontroli negatywnej cytofluorometrii, czyli komórek nieznakowanych przeciwciałem, jest niewłaściwy (Fig. 2C)
 - w przypadku modelu CDC dla obu rodzajów komórek docelowych zwraca uwagę wysoka liza komórek w kontroli? Z czego to wynika?

Podsumowanie

Pracę doktorską mgr Marty Ząbczyńskiej oceniam bardzo wysoko. Autorka wykazała się dużą wiedzą i znajomością wielu technik laboratoryjnych, a przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Podsumowując uważam, że przedstawiona dysertacja spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Marty Ząbczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na opublikowanie rozprawy w renomowanych czasopismach, wnoszę o wyróżnienie stosowną nagrodą.



Dr hab. Ewa Jaśkiewicz

Laboratorium Glikobiologii
Instytutu Immunologii i Terapii Dośw. PAN
im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu