



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. 71- 3371172, fax 71- 33713 82

prof. dr hab. Hubert Krotkiewski
Laboratorium Immunochemii Glikokoniugatów

Wrocław, 09.09. 2015

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Beaty Olejnik pt. „**Ocena wybranych parametrów glikozylacji: ekspresji fukozy i oligosacharydów wysokomannozowych w plazmie nasienia mężczyzn o obniżonej płodności**”

Posiadanie dzieci należy do bardzo ważnych, emocjonalnie podstawowych aspektów życia osób dorosłych; niestety, w wielu przypadkach chęć posiadania dzieci staje się poważnym problemem życiowym par małżeńskich na skutek nasilającego się w ostatnich latach zjawiska niepłodności małżeńskiej. Problem ten dotyczy, wg WHO, ok. 15% par starających się o potomstwo; dane dotyczące Polski mówią nawet o ok. 20% par. W kontekście tych danych problem niepłodności małżeńskiej jest często nazywany chorobą społeczną. Przez długi czas sądzono, że na brak potomstwa podstawowy wpływ ma określony defekt fizjologiczny organizmu kobiety; obecnie równie poważnie, jako powód niepłodności małżeńskiej rozpatruje się czynnik męski. Wyniki prowadzonych w tym zakresie badań pokazały, że elementem podstawowym płodności męskiej jest jakość plemników, na którą ma negatywny wpływ wiele różnorodnych czynników, np. ekspozycja mężczyzny na określone związki chemiczne, promieniowanie elektromagnetyczne i jonizacyjne, spożywanie alkoholu, palenie tytoniu, stosowanie narkotyków, utrzymujący się stan zapalny, otyłość, długotrwały stres. Na jakość plemników mają również wpływ białkowe składniki plazmy nasienia, stanowiące dla plemników fizjologiczne środowisko. Wiedza ta stała się punktem wyjścia do wykonania niniejszej pracy doktorskiej, związanej z poszukiwaniem nowych, białkowych markerów niepłodności męskiej w plazmie nasienia. Z pewnością wykrycie takich biomarkerów byłoby znaczną pomocą w diagnozowaniu obniżonej płodności lub całkowitej niepłodności męskiej,

a następnie, w miarę możliwości, w jej leczeniu. Należy podkreślić, że badanie białek plazmy nasienia nie wiąże się wyłącznie z problemu niepłodności, ma ono dodatkowe znaczenie. Wykazano bowiem, że dokładna identyfikacja tych białek, a następnie ich analiza z użyciem określonej techniki spektrometrii masowej (opisano to w opublikowanym artykule *Genome Biology* 7, R40, 2006) jest źródłem informacji, które dotyczą również rozpoznawania nowotworu prostaty i nowotworu jąder. Wynika z tego, że badanie białkowych składników plazmy nasienia może być źródłem bardzo cennych informacji z zakresu diagnostyki medycznej, dotyczących organizmu mężczyzny. Próby znalezienia biomarkera tożsamego z niepłodnością męską, a związanego z komponentą cukrową białek plazmy nasienia jest postępowaniem celowym, ponieważ dostępne dane literaturowe informowały o zmniejszonej ilości kwasu sjałowego, o zwiększonej liczbie reszt fukozy oraz o obecności glikanów wysokomannozowych i glikanów hybrydowych w tych białkach.

Omawiana tu praca doktorska oparta jest na trzech opublikowanych artykułach: dwóch oryginalnych i jednym przeglądowym. Jest rzeczą zrozumiałą, że prace opublikowane w czasopiśmie naukowych były recenzowane i uzyskały pozytywne recenzje, niemniej każdy następny recenzent może mieć swoje uwagi, które mogą zawierać niezadane jeszcze pytania dotyczące tekstu. W pracy przeglądowej pt. „Seminal plasma glycoproteins in male infertility and prostate diseases: is there a chance for glyco-biomarkers?”, współautorstwa trzech osób, przedstawiono dane literaturowe na temat poszukiwań biomarkera/ów, przydatnych do wykrywania niepłodności męskiej oraz do wykrywania chorób prostaty. Metodologicznie biorąc badania takie zawierają w sobie następujące etapy pracy laboratoryjnej: identyfikacja i izolacja określonego białka z plazmy nasienia, wydzielenie z niego łańcuchów cukrowych (metodami enzymatycznymi lub chemicznymi) oraz analiza (najczęściej instrumentalna) struktury wydzielonych oligosacharydów. Postępowanie alternatywne polega na badaniu komponenty cukrowej wydzielonego białka w formie natywnej (niezdegradowanej) przy użyciu odpowiednio dobranych lektyn, stosując: lektynobloting, test ELISA lub nowoczesną metodę z użyciem biosensora BIAcore (z tzw. powierzchniowym rezonansem plazmonów (SPR) jako metodą detekcji oddziaływań). Wyniki uzyskane dla wolnych oligosacharydów, bądź dla natywnych białek, otrzymane dla materiału pochodzącego od mężczyzny zdrowego (z wykazanym ojcostwem) oraz dla mężczyzny z wykazaną patologią (płodnością obniżoną lub pełną niepłodnością) są następnie porównywane w celu wykazania różnic. Opisane w pracy przeglądowej badania skupione były na określeniu zmian w komponentie cukrowej następujących białek plazmy nasienia: antygenu prostaty (PSA), glikodeliny S (GdS), orozomukoidu (AGP) i fibronektyny (Fn); podkreślono również rolę wielu innych białek, dla

których został stwierdzony udział w kaskadzie interakcji prowadzących do fuzji dwóch gamet, męskiej i żeńskiej, co stanowi fizjologiczny moment zapłodnienia. Omawiany tu przegląd literatury został napisany w roku 2012, zawiera opis wyników uzyskanych na świecie w ciągu ostatnich lat, zacytowano w nim również 5 prac z Laboratorium, gdzie powstała niniejsza praca doktorska. Ten artykuł można ocenić jako literaturowe przygotowanie do wykonanej pracy doświadczalnej, która została przedstawiona w dwóch publikacjach oryginalnych oraz do przeprowadzenia dyskusji uzyskanych wyników. Pierwsza z tych prac (*Biomarkers* 18, 10-22, 2013) opisuje reakcję pasm białkowych, uzyskanych w elektroforezie SDS-PAGE plazmy nasienia, z lektyną *Aleuria aurantia* (AAL); lektyna ta rozpoznaje reszty fukozy związane do GlcNAc połączonej z resztą asparaginy polipeptydu. Dla 9 z 12 pasm białkowych wybranych do analiz reaktywność z lektyną AAL była podwyższona w przypadku próbek pochodzących od mężczyzn z niepłodnością. W pracy przedstawiono szacunek ilościowy fukozylowanych epitopów cukrowych (nazwano to *gęstością epitopów*), obliczając iloraz wielkości wiązania lektyny AAL do zawartości białka. Wg opisu stosowanych metod – białko oznaczano ilościowo dla poszczególnych pasm w żelu po elektroforezie, stosując zestaw Sypro Ruby, natomiast reakcję z biotynylowaną lektyną prowadzono na blocie nitrocelulozowym. W tym momencie mam pytanie: wg internetowego opisu zestawu barwiącego Sypro Ruby wizualizację pasm białkowych można uzyskać na jeden z trzech sposobów: stosując ultrafiolet, transluminator światła niebieskiego lub skaner laserowy. Chciałem zapytać, którą metodę wizualizacji zastosowano, bo takiej informacji nie znalazłem w tekście pracy. W omawianym artykule opisano również identyfikację białek plazmy nasienia, stosując reakcję z handlowymi, specyficznymi przeciwciałami na blocie; wykryto antytrombinę III, transferynę oraz orozomukoid, a także fragmenty fibronektyny i PSA. Pierwsze trzy białka są znane w literaturze jako nośniki zmian glikozylacyjnych, związanych z różnymi chorobami. Z przeprowadzonych badań wynika, że białka wykazujące zwiększoną fukozylację z dużym prawdopodobieństwem są kandydatami do zdefiniowania jako biomarkery (tutaj: glikomarkery) przy ocenie stanu nasienia.

W drugiej pracy doświadczalnej (*Int. J. Mol. Sci.* 16, 14933-50, 2015) Doktorantka zajęła się analizą białek plazmy nasienia, pobranego od dawców z obniżoną płodnością, pod kątem reakcji z lektyną *Galanthus nivalis* (GNL), która reaguje z terminalnymi resztami mannozy; w ten sposób można identyfikować N-glikany wielomannozowe oraz tzw. hybrydowe. Stwierdzono obecność czterech pasm białkowych w obrazie elektroforetycznym, wykazujących wyraźną reakcję z lektyną GNL. Wykonano również chromatografię powinowactwa plazmy nasienia na żelu z lektyną GNL, izolując nawet frakcje słabo reagujące

z lektyną. Wydzielone białka GNL-reaktywne trawiono peptydo-N-glikozydazą F, z produktów reakcji wyizolowano wolne N-glikany, które następnie permetylowano i analizowano metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF.

Omawiana tu praca doktorska jest ciekawym tematem badawczym, dotyczącym badania komponenty cukrowej białek plazmy nasienia mężczyzn o obniżonej płodności, w kierunku zdefiniowania glikomarkera(ów) charakteryzujących ten stan patologiczny. Do ciekawych i wartościowych wyników, uzyskanych w przedstawionych tu dwóch pracach oryginalnych, w odniesieniu do białek plazmy nasienia mężczyzn o obniżonej płodności, można zaliczyć między innymi:

- 1° wykazanie wyraźnego wzrostu ilości cukrowych epitopów fukozylowanych (na podstawie reakcji z lektyną *Aleuria aurantia*) oraz ilościowe wyliczenie gęstości tych epitopów w pasmach białkowych, uwidocznionych na elektroforegramach (SDS-PAGE),
- 2° wykazanie wyraźnej obecności struktur reagujących z lektyną *Galanthus nivalis* (N- glikany wielomannozowe i hybrydowe) w wyznaczonych pasmach białkowych, uzyskanych w elektroforezie SDS-PAGE,
- 3° zidentyfikowanie dziesięciu znanych glikoprotein, przy użyciu przeciwciał poliklonalnych, oraz wykazanie, że dwie z nich (antygen stercza oraz gonadotropina kosmówkowa) występują w formie kompleksów o wyraźnie wyższej, niż podawana w literaturze, masie cząsteczkowej,
- 4° zidentyfikowanie 27 struktur N-glikanów, obecnych w białkach plazmy nasienia, z podwyższoną reaktywnością wobec lektyny GNL, po ich enzymatycznym uwolnieniu. Były to łańcuchy dwu-, trój- i czteroantenne, większość z nich miała resztę fukozy związanej do GlcNAc połączonej z peptydem. Do wyznaczenia mas cząsteczkowych N-glikanów, co w tym przypadku daje bezpośrednią możliwość określenia ich struktury, zastosowano technikę spektrometrii masowej MALDI- TOF, po uprzedniej permetylacji oligosacharydów.

Badania komponenty cukrowej białek plazmy nasienia, u mężczyzn z obniżoną płodnością, wskazują na obecność w tych białkach N- glikanów o strukturze zróżnicowanej wobec oligosacharydów zawartych w białkach innych płynów ustrojowych. Wykazane odmienne elementy struktury to wyraźnie zwiększona fukozyllacja, brak reszt kwasu sialowego oraz obecność łańcuchów wielomannozowych i hybrydowych. Te cechy odmienne, rozpoznawane metodami immunochemicznymi w skali makroskopowej, a mające swoje przyczyny na poziomie molekularnym, mogą pomóc w zdefiniowaniu glikomarkerów omawianego tu stanu patologicznego u mężczyzn. Zbadanie przyczyn tych zmian na poziomie molekularnym niewątpliwie dopełniłoby obrazu biochemicznych uwarunkowań niepłodności

(bądź obniżonej płodności) męskiej i można sądzić, że będzie to kierunek dalszych badań w tej dziedzinie. Na koniec Recenzent pragnie uświadomić Doktorantce, że w tytule pracy doktorskiej jest pewien błąd rzeczowy: tytuł powinien jednak brzmieć „Ocena wybranych parametrów glikozylacji: ekspresji fukozy i oligosacharydów wysokomannozowych w białkach plazmy nasienia mężczyzn o obniżonej płodności”, a nie „...w plazmie nasienia”. Już wiele lat temu wykazywano obecność wolnych oligosacharydów w mleku i w moczu; na zasadzie analogii można sobie zatem wyobrazić potencjalną możliwość obecności wolnych oligosacharydów w plazmie nasienia ludzkiego; niemniej, opisane tutaj badania dotyczyły jednak oligosacharydów obecnych w białkach plazmy nasienia, a nie wolnych oligosacharydów w plazmie nasienia. Nie bardzo wiem, skąd wziął się ten błąd, ponieważ tytuły opublikowanych przez Doktorantkę artykułów oraz artykułów cytowanych w pracy doktorskiej są formułowane dobrze: zawierają określenie „seminal plasma glycoproteins”. Edytorski układ pracy jest prawidłowy i nie budzi zastrzeżeń.

Podsumowując recenzję pragnę stwierdzić, że wartość merytoryczna omawianej tu pracy doktorskiej oraz uzyskane wyniki są ciekawe i rzetelne. Należy podkreślić, że wyniki wykonanych doświadczeń zostały opublikowane w dwóch artykułach, oba w dobrych czasopismach, co znacznie zwiększa wartość i ocenę merytoryczną pracy doktorskiej. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przeprowadzonej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr Beaty Olejnik pt. „Ocena wybranych parametrów glikozylacji: ekspresji fukozy i oligosacharydów wysokomannozowych w plazmie nasienia mężczyzn o obniżonej płodności”** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy i nie zważając na zauważone błędy edytorskie, składam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Beaty Olejnik, gratulując przy tej okazji pani Promotor.

H. Krokiewicz