

dr hab. Ewa Pocheć  
Zakład Biochemii Glikokoniugatów  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Jagielloński  
tel. 012 664 64 67  
e-mail: [ewa.pochec@uj.edu.pl](mailto:ewa.pochec@uj.edu.pl)

Kraków, 24.05.2018



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej  
**mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka**  
z tytułu

„Fukozyłacja białek mleka ludzkiego w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod opieką Pani prof. dr hab. Marii Iwony Kątnik-Prastowskiej jako promotora oraz Pani dr hab. Magdaleny Orczyk-Pawłowicz jako promotora pomocniczego. Zespół ten od wielu lat specjalizuje się w analizie glikozylacji białek w materiale biologicznym pozyskanym od dawców w różnych stanach fizjologicznych oraz jednostkach chorobowych. Praca doktorska mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka jest częścią prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii badań, mających na celu ocenę glikozylacji białek mleka ludzkiego.

Znaczenie oligosacharydów zawartych w mleku matek w rozwoju odporności niemowląt znane było od dawna. Ludzkie mleko jest bogate w glikany, które występują zarówno w postaci wolnej (HMO), jak również związanej z białkami i lipidami, tworząc odpowiednio glikoproteiny i glikolipidy. Glikany mleka blokując bakteryjne receptory adhezyjne o charakterze lektynowym hamują adhezję bakterii do komórek gospodarza i w efekcie zapobiegają infekcjom bakteryjnym u noworodków. Nabyciu odporności przez noworodki sprzyja również obecność w mleku matek przeciwciał klasy G (IgG), które należą do najważniejszych glikoprotein układu odpornościowego. Wiele badań poświęcono identyfikacji i charakterystyce białek obecnych w ludzkim mleku, natomiast glikozylacja tych białek pozostaje ciągle tematem słabo poznanym. Wynika to z dużej różnorodności łańcuchów cukrowych dołączonych do białek oraz stopnia skomplikowania ich budowy. Uzyskanie pełnej informacji o strukturze glikanów wymaga zastosowania z reguły kilku różnych technik badawczych, co sprawia, że analizy glikozylacji są czasochłonne i pracochłonne. Dlatego ilość danych o budowie glikanów jest często znacząco mniejsza niż wyników analiz białek, do których są związane.

Wśród glikanów mleka na szczególną uwagę zasługuje ich frakcja fukozylowana, której analizy w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka podjęła się Pani mgr inż. Jolanta Lis-Kuberka. Fukoza obecna w pozycjach terminalnych glikanów odgrywa ważną rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych. Obecność fukozy w glikanie fragmentu Fc IgG modyfikuje funkcje efektorowe przeciwciał i wpływa istotnie na przebieg odpowiedzi immunologicznej. Dlatego podjęcie badań mających na celu ocenę zawartości

Wydział Biologii

Instytut Zoologii  
i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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

fukozylowanych oligosacharydów w białkach mleka ludzkiego, w tym IgG na poszczególnych etapach dojrzewania mleka oraz analizę poziomu fukozytacji IgG zależną od infekcji matki, jest w pełni uzasadnione zarówno na poziomie badań podstawowych, jak również budzi nadzieje na wykorzystanie uzyskanych wyników w produkcji mieszanek mlecznych oraz uwzględnieniu poziomu fukozytacji HMO i glikokoniugatów mleka jako dodatkowego kryterium w kontroli jakości mleka deponowanego w Bankach Mleka.

Tytuł precyzyjnie oddaje zawartość pracy doktorskiej. Rozprawa składa się z rozdziałów: Omówienie (str. 4-13), Piśmiennictwo (str. 14-15), Wnioski (str. 16), Streszczenie w języku polskim (str. 17-19), Streszczenie w języku angielskim (str. 20-21), kopii 3 prac naukowych stanowiących monotematyczny cykl (str. 22-60), Curriculum Vitae (str. 61) oraz Oświadczeń Współautorów (str. 62-73). Spójny tematycznie cykl publikacji, stanowiący zasadniczą część rozprawy doktorskiej, obejmuje dwie prace eksperymentalne opublikowane w 2015 i 2018 roku oraz jeden artykuł przeglądowy z 2015 roku. We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Jolanta Lis-Kuberka jest pierwszym autorem i wniosła największy wkład w ich przygotowanie, biorąc udział w planowaniu doświadczeń, wykonaniu eksperymentów, analizie i opracowaniu wyników badań, przygotowaniu manuskryptu, rycin i tabel oraz korekcie manuskryptu.

Badania zostały wykonane na próbkach mleka pozyskanego od matek na różnych etapach laktacji oraz próbach ich osocza. W odróżnieniu od badań na materiale pochodzącym z hodowli *in vitro*, gromadzenie materiału od dawców wymaga pełnej dyspozycyjności oraz z reguły długiego czasu na skompletowanie wystarczającej liczby próbek, która pozwoli na uzyskanie wyników istotnych statystycznie. Dlatego należy docenić, że Doktorantka przeprowadziła badania fukozytacji immunoglobulin G wykorzystując łącznie prawie 300 próbek mleka i 40 próbek osocza krwi. Glikozylacja białek jest procesem wrażliwym na szereg czynników, w tym wiek i płeć dawców, składniki diety, stosowane leki, a nawet nadużywanie alkoholu czy palenie tytoniu. Wobec tego w badaniach glikozylacji konieczne jest precyzyjne dobranie grupy badanej i kontrolnej pod względem tych kryteriów. Ten wymóg został spełniony w przypadku badań wykonanych przez Panią mgr Jolantę Lis-Kuberka.

Analiza zawartości fukozy w oligosacharydach mleka została przeprowadzona w oparciu o metody lektynowe. Lektyny, najczęściej pochodzenia roślinnego, są uznanym narzędziem do analizy składu cukrowego glikokoniugatów, pozwalającym na identyfikację danej reszty cukrowej oraz typu wiązania glikozydowego. Do badań wykorzystywano dwie techniki bazujące na cukrowej specyficzności lektyn: lektynobloting po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS-PAGE) oraz zmodyfikowany test immunoenzymatyczny ELISA do identyfikacji reszt cukrowych w cząsteczkach IgG. Detekcję fukozy przeprowadzono stosując trzy lektyny różniące się specyficznością względem typu wiązania glikozydowego, którym dołączony jest ten monosacharyd: UEA izolowanej z *Ulex europaeus*, która preferencyjnie rozpoznaje fukozę  $\alpha$ 1,2-wiązaną, LTA z *Tetragonolobus purpureus* specyficzną dla Fuc  $\alpha$ 1,3 oraz LCA z *Lens culinaris* wiążącą rdzeniową Fuc  $\alpha$ 1,6. Wykonanie analiz glikozylacji, szczególnie metodą lektynoblotingu, dla tak dużej liczby próbek w dwóch powtórzeniach zasługuje na uznanie. Uzyskanie powtarzalnych wyników metodami lektynowymi wymaga dużej precyzyjności, ponieważ wpływ na wiązanie lektyn ma szereg czynników, m.in. pH i skład

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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

buforów, właściwy dobór rozcieńczenia lektyn, czas reakcji kolorymetrycznej katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę a nawet temperatura reakcji. Liczba wykonanych analiz oraz uzyskane wyniki świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

W rozdziale pt. Omówienie zostały zebrane najważniejsze dane dotyczące metodyki badań oraz uzyskanych wyników. Dwa schematy w przejrzysty sposób obrazują etapy procedury metod lektynowych użytych do doświadczeń oraz zasadę detekcji fukozy w białkach mleka wykorzystaną w tych metodach, trzeci przedstawia specyfikę wiązania lektyn wybranych do analizy fukozytacji białek mleka w oparciu o dane literaturowe. Na dwóch kolejnych rycinach tego rozdziału przedstawiono najważniejsze wyniki otrzymane dla fukozylowanych białek mleka. Wyniki własne przedstawiono na tle danych literaturowych zebranych w rozdziale Piśmiennictwo. Klarowny opis oraz starannie przygotowane ryciny ułatwiają zrozumienie danych opublikowanych w dwóch anglojęzycznych artykułach oryginalnych będących częścią monotematycznego cyklu. Nieliczne błędy literowe, interpunkcyjne i błąd pisowni w słowach „lektyno-bloting” oraz „fukozo-swoistych” (przymiotniki i rzeczowniki złożone z członów nierównorzędnych znaczeniowo piszemy łącznie) nie wpływają na czytelność tego opisu.

Pierwsza publikacja będąca częścią monotematycznego cyklu (Lis-Kuberka et al., 2018) dotyczy fukozytacji przeciwciał klasy G (IgG) stanowiących główną frakcję glikoproteinową osocza krwi oraz najważniejszą immunologicznie glikoproteinę ludzkiego mleka. Badania przeprowadzono na 186 próbkach mleka kobiet, które urodziły w terminie, 106 próbkach mleka pobranego od kobiet, które urodziły przedwcześnie oraz 40 próbkach osocza krwi kobiet karmiących. Stwierdzono, że zawartość fukozy wiązanej  $\alpha$ 1,2 oraz  $\alpha$ 1,3 do glikanów IgG w przeciwieństwie do stężenia IgG koreluje z etapami laktacji oraz zależy od infekcji matki i tego, czy poród miał miejsce w terminie czy kobiety urodziły przedwcześnie. Porównanie fukozytacji IgG osocza i mleka matek uwzględniające stężenie IgG wskazuje na znacząco większą zawartość fukozy w IgG obecnym w mleku matek w porównaniu do IgG w osoczu krwi. To bardzo ciekawy wynik, który w mojej opinii stanowi punkt wyjścia do kolejnych badań strukturalnych oraz funkcjonalnych. Ważne do interpretacji funkcjonalnej uzyskanych wyników byłoby określenie w kolejnych badaniach, czy intensywniejsza fukozytacja dotyczy tylko glikanów fragmentów Fc, czy również fragmentów Fab.

Celem drugiej pracy (Lis-Kuberka et al., 2015) stanowiącej część rozprawy doktorskiej była ocena zawartości fukozy w glikoproteinach mleka zdrowych kobiet karmiących pobranego między 2 a 47 dniem laktacji. Stosując lektyny UEA i LCA wykazano istotny statystycznie spadek ekspresji fukozy wiązanej  $\alpha$ 1,2 i  $\alpha$ 1,6 do glikanów białek mleka w procesie dojrzewania mleka oraz brak korelacji w zawartości fukozy wiązanej  $\alpha$ 1,3 do oligosacharydów białek mleka (reakcja z lektyną LTA) z jego dojrzewaniem. Autorzy interpretują ten wynik jako zabezpieczenie przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi dziecka, które rodzi się z niedojrzałym układem odpornościowym. Wysoki poziom fukozytacji białek mleka może jednocześnie sprzyjać kolonizacji przewodu pokarmowego przez prawidłową florę bakteryjną. Stwierdzenie różnic w  $\alpha$ 1,2- i  $\alpha$ 1,6-fukozytacji białek mleka matki w przebiegu laktacji nasuwa pytanie, których białek dotyczą zmiany fukozytacji oraz rodzi potrzebę weryfikacji hipotezy znaczenia funkcjonalnego tych zmian glikozytacji, m.in.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniuatów

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-glikokoniuatow>



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

dla prawidłowego rozwoju dziecka, co zapewne zostanie uwzględnione w kolejnych projektach badawczych Zespołu.

Wnioski w obydwu pracach badawczych zostały sformułowane poprawnie i są adekwatne do uzyskanych wyników. Zastosowane metody analizy glikozylacji oraz narzędzia statystyczne wybrane do analizy danych pozwoliły na realizację celu badań i uzyskanie wyników weryfikujących postawione hipotezy badawcze. W obydwu publikacjach eksperymentalnych wyniki własne poddano krytycznej analizie w kontekście dostępnych danych literaturowych.

Trzecia praca z monotematycznego cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka to artykuł przeglądowy opublikowany w 2015 w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. Praca powstała w oparciu o 125 pozycji literaturowych, jest bogatym źródłem informacji na temat fukozylowanych białek mleka. To bardzo ciekawe opracowanie, napisane w sposób przejrzysty, bogato ilustrowane 5 rycinami i 5 tabelami. Stanowi bardzo dobre wprowadzenie teoretyczne w tematykę badawczą dwóch pozostałych prac eksperymentalnych. Mam tylko uwagę związaną z zaliczeniem wolnych oligosacharydów mleka do glikokoniugatów. Do zdań "Oprócz glikoprotein w mleku ludzkim są obecne jeszcze inne glikokoniugaty: wolne oligosacharydy (HMOs - human milk oligosaccharides) [...]" oraz "Z nielicznych doniesień wynika jednak, że glikokoniugaty mleka ludzkiego, w tym HMOs, [...]" (odpowiednio str. 44 i 46 rozprawy doktorskiej) wkraść się błąd, ponieważ wolne oligosacharydy to nie glikokoniugaty.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka to wartościowe opracowanie naukowe, aktualne tematycznie i dostarczające nowych dla wiedzy wyników, które uzasadniają kontynuację badań w kierunku bardziej szczegółowych analiz strukturalnych, identyfikacji białek mleka o zmienionej fukozytacji oraz analiz funkcjonalnych. Ponadto, należy dodać, że rozprawa została przygotowana w sposób przejrzysty oraz wyjątkowo estetyczny.

Wątpliwości i sugestie:

1. Mam wątpliwości co do poprawności określenia celu badań (Omówienie, str. 5 rozprawy, Streszczenie w języku polskim, str. 17 oraz Streszczenie w języku angielskim, str. 20). W mojej opinii celem była ocena zawartości fukozy w glikoproteinach mleka i osocza a nie określenie reaktywności lektyn. Reaktywność lektyn, które specyficznie rozpoznają reszty cukrowe, umożliwiła ocenę zawartości tych monosacharydów.
2. Rycina 3 w rozdziale pt. Omówienie przedstawia preferencje trzech fukozospecyficznych lektyn wykorzystanych do badań względem wiązań glikozydowych, którymi dołączona jest fukoza. W opisie ryciny podano, że wybrane lektyny wiążą fukozę w *N*- i *O*-glikanach, natomiast rycina przedstawia tylko schemat *N*-glikanu. Myślę, że byłoby zasadne przedstawić graficznie również wiązanie lektyn do reszt fukozy w *O*-glikanach.
3. Wiadomo, że lektyny mogą wiązać się niespecyficznie do części białkowej a nie przez resztę cukrową. Czy nie byłoby zasadne wykonanie dodatkowej kontroli specyficzności wiązania lektyn poprzez blokowanie lektyny fukozą przed reakcją z glikoproteinami w obydwu zastosowanych technikach? Prace wchodzące w skład monotematycznego cyklu niniejszej rozprawy doktorskiej zostały poddane wnikliwym recenzjom przed przyjęciem do druku w czasopiśmie z listy A MNiSW i jakością badań oraz wiarygodność uzyskanych

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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>

wyników nie budzi wątpliwości. Proszę o potraktowanie tej uwagi jako sugestii przy planowaniu i realizacji kolejnych badań w trosce o jak najwyższą jakość badań.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka pt. „Fukozyłacja białek mleka ludzkiego w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka” **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.) oraz wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie uwzględniając wartość merytoryczną oraz potencjalną aplikacyjność uzyskanych wyników badań wnioskuję o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Ewa Pocheć



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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>