

Streszczenie

Białko MyD88 (ang. *Myeloid differentiation primary response 88*) uważane jest za jedno z kluczowych białek adaptorowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, które łączy zaktywowane receptory Toll-podobne (TLR) i receptor Interleukiny-1 (IL-1R) z wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi. Szybka i efektywna odpowiedź wrodzonego układu odpornościowego jest niezbędna, aby uchronić gospodarza przed atakiem patogenu. Równocześnie wymagana jest odpowiednia kontrola i regulacja, gdyż nadmierna odpowiedź może prowadzić do chorób autoimmunologicznych lub nowotworów. Jeden z mechanizmów, który umożliwia precyzyjną regulację odpowiedzi polega na zaangażowaniu alternatywnych wariantów splicingowych o antagonistycznym działaniu. W przypadku białka MyD88 taką rolę pełni wariant MyD88S (ang. *MyD88 short*).

Po rozpoznaniu patogenu i związaniu ligandu następuje dimeryzacja receptorów TLR i IL-1R, które tworzą platformę umożliwiającą oddziaływanie z białkiem MyD88. Prowadzi to do lokalnego zagęszczenia białek efektorowych oraz utworzenia wielocząsteczkowego kompleksu zwanego myddosomem. Uważa się, że wielocząsteczkowe kompleksy będące centrami organizacyjnymi (ang. *SMOCs – supramolecular organizing centres*), do których zalicza się również myddosom pełnią rolę przekaźników drugiego rzędu we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, a ich tworzenie prowadzi do amplifikacji sygnału oraz jego propagacji. W strukturze myddosomu oprócz cząsteczek białka MyD88 znajdują się również cząsteczki kinaz z rodziny IRAK, które ulegają fosforylacji i aktywują kolejne białka szlaku, co w konsekwencji prowadzi m.in. do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *Nuclear Factor κ -light chain-enhancer of activated B cells*) i produkcji np. cytokin prozapalnych.

Białko MyD88 wyróżnia się unikalną budową domenową, z domeną DD (ang. *death domain*) na końcu aminowym, która odpowiada za oddziaływanie z kinazami IRAK, natomiast na końcu karboksylowym zlokalizowana jest domena TIR (ang. *Toll/interleukin-1 receptor domain*), która oddziałuje z zaktywowanymi receptorami. Domena TIR występuje również w budowie kilku innych białek adaptorowych zaangażowanych w ścieżkę sygnałową receptorów TLR, np. stanowi C-kończącą część białka Mal. Domeny TIR i DD białka MyD88 połączone są środkową domeną łącznikową ID. Domena ID jest nieobecna w alternatywnym wariantcie splicingowym MyD88S, gdzie domeny DD i TIR są ze sobą bezpośrednio połączone. Do ekspresji wariantu MyD88S

dochodzi po długotrwałej stymulacji receptorów Toll-podobnych. Ten alternatywny wariant splicingowy wykazuje dominująco negatywny efekt i prowadzi do zahamowania aktywacji czynnika NF- κ B. Szczegółowy mechanizm działania białka MyD88S nie został do tej pory poznany, postuluje się jedynie, że do zahamowania szlaku dochodzi już na etapie oddziaływania z kinazami IRAK.

Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu określenie struktury przestrzennej kompleksu domen TIR MyD88 i Mal, znalezienie niskocząsteczkowych inhibitorów tego oddziaływania, a także szczegółową charakterystykę domeny ID białka MyD88 oraz określenie jej roli w tworzeniu kompleksu myddosomu, a także poznanie mechanizmu inhibicji szlaku sygnałowego przez białko MyD88S.

Prace rozpoczęto od uzyskania homogennych białek TIR_{MyD88} i TIR_{Mal}. Następnie przeprowadzono próby uzyskania stabilnych kompleksów TIR_{MyD88}- TIR_{Mal} w celu krystalizacji i otrzymania struktury przestrzennej. Dane literaturowe sugerują oddziaływanie tych domen. W trakcie przeprowadzonych eksperymentów nie obserwowano tworzenia się stabilnych kompleksów. Równolegle przy pomocy FBDD-NMR (ang. *fragment-based drug discovery* – *projektowanie leków z małych fragmentów*) prowadzono poszukiwania niskocząsteczkowych związków wiążących się do domen TIR i modyfikujących ich funkcję. Zidentyfikowano aktywne związki. Przeprowadzono próby określenia oddziaływania tych związków z TIR_{MyD88} metodą krystalografii rentgenowskiej.

Równoległą część prac stanowiła charakterystyka domeny ID białka MyD88. Wstępne wyniki, które obejmowały badanie funkcji poszczególnych domen białka MyD88 pokazały, że domena ID jest niezbędna do propagacji sygnału, a alternatywny wariant splicingowy MyD88S nie jest w stanie aktywować NF- κ B. Porównanie sekwencji aminokwasowej domeny ID dla różnych gatunków ukazuje wysoką konserwację sekwencji aminokwasowej ID, co sugeruje zdefiniowaną funkcję i pośrednio występowanie zdefiniowanej struktury drugorzędowej. Obserwacja ta jednak nie została potwierdzona w przeprowadzonych badaniach. Zastosowanie szeregu metod biofizycznych pozwoliło określić, że domenę ID charakteryzuje co najwyżej przejściowa i niestabilna struktura drugorzędowa, a większość ID występuje w postaci kłęбка statystycznego.

W trakcie dalszych prac wykazano metodą skanowania alaninowego, że sekwencja jedynie 5 reszt aminokwasowych w obrębie ID jest kluczowa do propagacji sygnału. Odpowiednia muteina

MyD88 wykazywała aktywność porównywalną do MyD88S. Określono, iż kluczową resztą jest tyrozyna 116, która w myddosomie tworzy sieć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z resztami znajdującymi się w obrębie DD sąsiadujących cząsteczek MyD88.

Przy pomocy mikroskopii konfokalnej analizowano tworzenie się myddosomów w komórkach i wpływ wcześniej zidentyfikowanych reszt funkcjonalnych na ten proces. Potwierdzono zdolność do tworzenia myddosomu przez białko MyD88 pełnej długości (MyD88FL), co obserwowane było w postaci tworzących się wtrętów cytoplazmatycznych. Natomiast MyD88S oraz Ala2 wykazywały równomierne rozmieszczenie w komórkach. Badania te potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, iż MyD88S nie może formować myddosomów. MyD88S hamował również powstawanie wtrętów cytoplazmatycznych w przypadku koekspresji z MyD88FL.

Metodą immunoprecypitacji wykazano, że MyD88FL tworzy dimery z wszystkim testowanymi wariantami (w tym MyD88S i Ala2). Jednocześnie wykazano, iż kompleksy MyD88FL/MyD88FL ale nie MyD88FL/MyD88S są w stanie przyłączać kolejne cząsteczki MyD88, a tym samym wyjaśniono dominujący negatywny efekt MyD88S na transdukcję sygnału.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że domena ID białka MyD88 mimo wysokiej konserwacji sekwencji aminokwasowej jest w większości nieustrukturalniona i jedynie sekwencja 5 kolejnych reszt pełni znaczącą rolę w funkcjonalności białka, propagacji sygnału i aktywacji NF- κ B. Wykazano również, że alternatywny wariant splicingowy MyD88S po przyłączeniu do MyD88FL blokuje wiązanie kolejnych cząsteczek białka i tym samym powstawanie myddosomu. Uzyskane wyniki pozwoliły na zrozumienie mechanizmu dominującego negatywnego wpływu MyD88S na transdukcję sygnału w szlaku sygnałowym MyD88.