

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 59, tel +48-58- 5236056 e-mail: joanna.skorko-glonek@ug.edu.pl

Prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
NIP: 584-020-32-39

Gdańsk, 18.03.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr Katarzyny Kuśki
zatytułowanej: „ANALIZA STRUKTURY I FUNKCJI BIAŁKA MYD88
ZAANGAŻOWANEGO W ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ”

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 22. 02. 2022 r.

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Dubina
oraz dr Katarzyny Pustelny.

Rozprawę doktorską stanowi przygotowana w języku polskim praca pisemna o klasycznym układzie, z wyodrębnionymi głównymi częściami: Wstęp (26 str.), Cele pracy (2 str.), Materiały i metody (16 str.), Wyniki (27 str.), Dyskusja (12 str.). Na początku pracy zostały umieszczone: lista publikacji Doktorantki, spis treści, lista stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy znajduje się spis odnośników literaturowych.

Oceniana rozprawa dotyczy analizy strukturalno-funkcjonalnej ludzkiego białka MyD88. Białko to jest kluczowym elementem przekazywania sygnału z receptorów TLR, prowadzącym do aktywacji czynnika NF- κ B, a w konsekwencji indukcję odpowiedzi prozapalnej. W związku z tym podjęcie badań zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat regulacji wrodzonej odpowiedzi układu immunologicznego uważam za zasadne, a uzyskane wyniki mogą potencjalnie znaleźć praktyczne zastosowanie.



Badania Doktorantki skupiły się na dwóch aspektach dotyczących funkcjonowania białka MyD88 jako przekaźnika sygnału: oddziaływaniom między domenami TIR i możliwością modulowania tych domem poprzez wiązanie niskocząsteczkowych związków oraz określeniu struktury i dotąd niepoznanej funkcji domeny ID łączącej domeny DD i TIR.

Streszczenie oraz treściowo tożsamy „Abstract” w sposób syntetyczny przedstawiają tematykę rozprawy i jej cele oraz opisane w rozprawie wyniki.

Rozdział „**Wstęp**” stanowi dobre wprowadzenie w zagadnienia związane z tematyką rozprawy. Pierwsza część wstępu zawiera ogólną charakterystykę układu odpornościowego. Szczególny nacisk został położony na opis receptorów Toll-podobnych, charakterystykę domen TIR i białek adaptorowych. Następnie Autorka skupiła się na przedstawieniu informacji na temat budowy i funkcji białka MyD88, głównego przedmiotu rozprawy.

Wstęp został napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały. Treści zawarte w tekście zostały bardzo dobrze uzupełnione klarownymi modelami strukturalnymi i schematami (Rys. 1-6). Podsumowując, rozdział ten porusza zakres tematyczny dobrze odzwierciedlający przedmiot badań Doktorantki i zagadnienia poruszane w dyskusji. Należy więc uznać wybór omawianych tematów za zasadny i niezbędny do właściwego wprowadzenia czytelnika do dalszych rozdziałów rozprawy.

Cel pracy został jasno określony, zarówno w tytule rozprawy, jak i dedykowanym rozdziale dysertacji. Zostały wyodrębnione dwa główne cele: (1) zbadanie wzajemnych oddziaływań domen TIR i identyfikacja niskocząsteczkowych modulatorów tych oddziaływań oraz (2) zbadanie roli domeny ID białka MyD88 podczas odpowiedzi immunologicznej. Warto w tym miejscu zauważyć, iż funkcja domeny ID nie była dotychczas badana. W związku z tym zaplanowane badania miały charakter nowatorski. Równocześnie, ze względu na istotność procesów, w które jest zaangażowane białko MyD88, podjęcie badań było jak najbardziej zasadne.

Mimo że nie wszystkie cele szczegółowe zostały pomyślnie zrealizowane, w dużej mierze udało się osiągnąć cele główne, co zostało wyczerpująco przedstawione w części opisującej wyniki.

Rozdział „**Materiały i metody**” w większości przypadków w sposób wyczerpujący i pozwalający na powtórzenie badań przedstawia zbiór materiałów wykorzystanych w pracy i protokołów wykonanych doświadczeń. Zwłaszcza opisy prowadzenia hodowli i analizy komórek, a także oczyszczania białek, są przedstawione bardzo szczegółowo. Natomiast bardzo skrótowo zostały potraktowane opisy uzyskiwania konstruktów genetycznych. Część plazmidów została zamówiona w firmie zewnętrznej, ale wiele konstruktów wykonała Doktorantka. Zabrakło m. in. informacji na temat polimeraz i warunków reakcji PCR stosowanych, jak można się domyślić, do konstrukcji plazmidów i przy mutagenizie miejscowo-specyficznej. Inne drobne niedociągnięcia obejmują: (1) brak szczegółowych danych na temat zestawu do analizy poziomu NF- κ B, (2) brak informacji na temat składu buforu i warunków sączenia molekularnego w doświadczeniu sprawdzającym dimeryzację domen TIR.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła rezultaty badań realizujących założone cele pracy. W pierwszej kolejności zostały opisane próby wizualizacji kompleksów domen TIR, pochodzących z białek MyD88 i Mal. Niestety, mimo literaturowych sugestii o tworzeniu takich kompleksów, Doktorantka nie zidentyfikowała ich obecności metodą sączenia molekularnego, ani nie uwidoczniała ich podczas próby kokrystalizacji. Czy Doktorantka rozważała próbę identyfikacji oddziaływań TIR-TIR inną metodą, np. ultrawirowania analitycznego? W wielu przypadkach tą metodą można zaobserwować obecność oligomerów oraz określić ich stabilność stosując różne stężenia białek.

Częściowym powodzeniem zakończyły się próby identyfikacji niskocząsteczkowych modulatorów domen TIR. Doktorantce udało się wytypować 10 niskocząsteczkowych związków, tzw. „fragmentów”, wiążących się do domen TIR, które mogą stać się punktem wyjścia do dalszych poszukiwań optymalnych struktur „fragmentów”.

Obszerną część badań stanowiły analizy strukturalne domeny ID białka MyD88. Zostały przeprowadzone zarówno analizy *in silico*, jak i badania biofizyczne, których wyniki wskazują na brak stabilnej struktury drugorzędowej izolowanej domeny ID.

Następnie Doktorantka skupiła się na określeniu roli domeny ID białka MyD88 w przekazywaniu sygnału. W tym celu został użyty zestaw zmutowanych wariantów MyD88, zawierających mutacje w różnych pozycjach domeny ID. Aktywność wariantów MyD88 w przekazywaniu sygnału była testowana na kilku etapach kaskady sygnałowej poprzez pomiar aktywności NF- κ B, określenie poziomu fosforylacji białek efektorowych (IRAK4 i IRAK1) i zbadanie wydajności tworzenia myddosomu. Doktorantka uzyskała wiele interesujących wyników, wśród których za najważniejsze uważam:

- (1) identyfikację pięcioaminokwasowego fragmentu domeny ID (reszty 114-118) jako elementu niezbędnego do funkcjonalności MyD88,
- (2) wskazanie reszty Tyr116 jako kluczowej reszty domeny ID, niezbędnej do zachowania stabilności międzycząsteczkowej sieci oddziaływań wodorowych w myddosomie,
- (3) wykazanie, iż w komórkach zawierających muteiny MyD88 pozbawione kluczowych elementów domeny ID, nie dochodzi do propagacji sygnału, co objawia się brakiem fosforylacji białek efektorowych,
- (4) wykazanie, iż obecność formy MyD88S w dimerze z MyD88 pełnej długości hamuje tworzenie myddosomu.

Oдноśnie oddziaływań, w które jest zaangażowana reszta Tyr116: z rysunku 21 wynika, że reszta Tyr116 tworzy kontakty z resztą Arg32. Czy jest możliwe takie wzajemne ułożenie tych reszt, aby powstały oddziaływania typu kation- π ? Tego typu oddziaływania mogłyby dodatkowo wzmocnić lokalną strukturę. Sugestię tę popiera fakt, iż mutacja Y116C także obniża funkcjonalność MyD88.

Podsumowując tę część pracy uważam, że Pani mgr Kuśka uzyskała bardzo wartościowe wyniki, które pozwoliły na zaproponowanie molekularnego mechanizmu działania formy splicingowej MyD88S. Uważam to za bardzo duże osiągnięcie Doktorantki, gdyż do tej pory podstawy dominująco negatywnego oddziaływania MyD88S nie były znane. O randze wyników świadczy m.in. fakt opublikowania ich w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym Cell Communication and Signaling.

W rozdziale „**Dyskusja**” Doktorantka ustosunkowała się do uzyskanych wyników i przeprowadziła ich wnikliwą analizę. W pierwszej kolejności Doktorantka odniosła się do aspektu dimeryzacji domen TIR i możliwości modulacji funkcjonowania tych elementów przez związki niskocząsteczkowe. Mimo niepowodzeń w identyfikacji dimerów domen TIR białek MyD88 i Mal oraz nieudanych prób krystalizacji domeny TIR ze związaną cząsteczką „fragmentu”, Autorka optymistycznie podeszła do uzyskanych wyników i widzi perspektywy przyszłych badań z wykorzystaniem zmodyfikowanych i rozbudowanych cząsteczek modulatorów.

W dalszej części Doktorantka dyskutuje wyniki związane z charakterystyką strukturalno-funkcjonalną domeny ID. Autorka zauważyła, że mimo dużego zachowania ewolucyjnego sekwencji całej domeny ID, tylko jego niewielki fragment, reszty 114-118 z kluczową rolą Tyr116, są niezbędne do zapewnienia funkcjonalności białka MyD88. W związku z tym mam pytanie: skoro N-końcowy fragment domeny ID (reszty 110-124) współtworzy z domeną DD helisę α H6, to czy brak domeny ID nie wpłynie na strukturę domeny DD? Helisa H6 będzie znacznie krótsza w wariancie MyD88S, a może w ogóle jej nie będzie? Czy jest możliwe, że brak domeny ID, oprócz wpływu na międzycząsteczkową sieć wiązań wodorowych, destabilizuje częściowo domenę DD, co uniemożliwia uzyskanie jej w formie izolowanej (wariant DD)?

Za bardzo ciekawe uważam rozważania Doktorantki na temat roli domeny ID w zapewnieniu funkcjonalności białka MyD88. Dotychczas panowało przekonanie, iż ten fragment białka pełni funkcję łącznika pomiędzy domenami DD i TIR. Autorka dowodzi, że domena ta odgrywa bezpośrednią rolę w procesie tworzenia myddosomu, co przekłada się na propagację sygnału zależnego od MyD88.

Podsumowując, sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na znajomość tematyki badawczej i umiejętność umieszczenia danych eksperymentalnych w szerszym kontekście. Znajdujące się na końcu rozdziału krótkie podsumowanie dobrze spina przedstawione w pracy wyniki i ich dyskusję.

Licząca 129 pozycji „**Bibliografia**” zawiera zestaw publikacji związanych z tematyką dysertacji i użytą metodyką. Są to prace datowane przede wszystkim po 2005 roku, aczkolwiek nie zostały pominięte prace pionierskie o znaczeniu historycznym.

Uwagi ogólne

Praca jest napisana w sposób klarowny i logiczny, zwięzłe, bez zbędnych dygresji, ale równocześnie z wystarczającą ilością szczegółów. Tekst dobrze uzupełniają ryciny (30) oraz tabele. Niektóre rysunki znacznie zyskałyby poprzez uzupełnienie opisów. W wielu przypadkach nie zostało określone, co stanowi kontrolę. W Rys. 23 nie jest widome, co oznaczają wartości podane na osi OX. Schemat przedstawiony na Rys. 28 także wymaga uzupełnienia. Oczywiście czytelnik znajdzie odpowiednie informacje w tekście pracy, niemniej dołączenie choćby krótkiego opisu znacznie ułatwiłoby zapoznanie się z treścią rycin. Dodatkowo przydałoby się uzupełnić Rys 14 o numerację reszt aminokwasowych w obrębie domeny ID. Pozwoliłoby to na łatwiejsze śledzenie pozycji analizowanych reszt. Sama Autorka nie uniknęła pomyłki i błędnie podała numery reszt tworzących struktury helikalne na Rys 14. Powinny to być reszty Glu111 do Glu124 oraz Glu143 i Leu144, a nie Gln112 do

Gln124 oraz Gln144 i Leu145. Ponadto zostały użyte błędne skróty trzyliterowe reszt glutaminianu (Gln zamiast Glu). Z obowiązku recenzenta muszę także wspomnieć o występujących w pracy błędach językowych (żargon laboratoryjny, niepotrzebne zapożyczenia z języka angielskiego) oraz licznych błędach edytorskich.

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko i wspomniane powyżej uchybienia nie umniejszają wartości pracy. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo eleganckie połączenie badań *in silico*, analiz strukturalnych metodami biofizycznymi i doświadczeń z wykorzystaniem technik biochemicznych, biologii molekularnej i cytologii. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny z zastosowaniem właściwie dobranej metodologii badawczej, a dobór metod badawczych wskazuje na interdyscyplinarność pracy. Przedstawione wyniki są opisane zasadniczo poprawnie i w wielu przypadkach stanowią podstawę do uściślenia hipotez i planowania dalszych badań. Przeprowadzona dyskusja świadczy o głębokiej wiedzy Doktorantki i jej umiejętności skonfrontowania rezultatów własnych badań z danymi literaturowymi. Wyciągnięte z wyników badań wnioski są wyważone i pozbawione nadinterpretacji. Nie mam w związku z tym wątpliwości, iż Pani mgr Katarzyna Kuśka dobrze opanowała warsztat naukowy w zakresie biochemii, biofizyki i biologii molekularnej. Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i są cennym uzupełnieniem wiedzy w zakresie modulacji odpowiedzi immunologicznej.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa całkowicie spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kuśki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy oraz opublikowanie części wyników w bardzo dobrym recenzowanym czasopiśmie naukowym, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Joanna Stęrkowska-Głonek