

Poznań, 14.03.2022 r.

dr hab. Miłosz Ruskowski
Zakład Biologii Strukturalnej Eukariontów
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
e-mail: mruszkowski@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Katarzyny Kuśki

zatytułowanej:

„Analiza struktury i funkcji białka MyD88 zaangażowanego w odpowiedź immunologiczną”

Niniejsza recenzja dotyczy pracy doktorskiej pani mgr Katarzyny Kuśki pt. „Analiza struktury i funkcji białka MyD88 zaangażowanego w odpowiedź immunologiczną”. Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Grupie Badawczej Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Grzegorz Dubin, a promotorem pomocniczym dr Katarzyna Pustelny. Recenzowana praca doktorska powstała dzięki finansowaniu w ramach grantu Symfonia Narodowego Centrum Nauki (2014/12/W/NZ1/00457), którego kierownikiem był prof. dr hab. Tadeusz Holak oraz grantu Projekty Badawcze Młodych Naukowców oraz Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego (MNS 7/2020).

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę dotyczą ludzkiego białka MyD88 (*ang. Myeloid differentiation primary response 88*). Jest to jedno z kluczowych białek adaptorowych zaangażowanych w przekazywanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. MyD88 bierze udział w tworzeniu tzw. myddosomu, czyli wielobiałkowego kompleksu typu SMOC (*ang. supramolecular organizing center*). MyD88 jest białkiem wielodomenowym, składającym się z tzw. *death domain* (DD), *intermediate domain* (ID) oraz *Toll/interleukin-1 receptor domain* (TIR). Istnieje również alternatywny wariant splicingowy MyD88 oznaczany jako MyD88 *short* (MyD88S). Należy podkreślić, że wybrana tematyka jest ciekawa, ambitna oraz wpisuje się w aktualne trendy badawcze. Co więcej, oprócz wysokiej wartości poznawczej, posiada również potencjał aplikacyjny możliwy do rozwijania w kolejnych projektach.

Doktorantka jest współautorką pięciu opublikowanych artykułów naukowych, a kolejna publikacja jest w przygotowaniu. Jedna z publikacji, zatytułowana „Mechanism of MyD88S mediated signal termination” jest bezpośrednio związana z niniejszą rozprawą. Doktorantka jest drugą autorką tej publikacji, która została wydana w *Cell Communication and Signaling* (IF=5.7). Inny artykuł, w przypadku którego Doktorantka dzieli pierwsze autorstwo, jest również związany z badaniami elementów układu immunologicznego. Zaznaczam jednak, że w liście publikacji na stronie 2 rozprawy podano zły tytuł, a poprawny to: „Macrocyclic Peptide Inhibitor of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint”.

Układ rozprawy jest klasyczny, Wyniki oraz Dyskusja stanowią oddzielne rozdziały. Całość pracy ma 106 stron, z których 83 obejmują rozdziały od Wstępu do Dyskusji. W pracy Doktorantka zawarła 30 rysunków, natomiast bibliografia obejmuje 129 pozycji.

Zakres zagadnień poruszonych we wstępie jest dobrze przemyślany, a sam ich opis jest logiczny. Czytelnik zaznajamia się dzięki temu z właściwościami receptorów Toll-podobnych (TLR) i przebiegiem kaskad sygnałowych wywołanych aktywnością TLR. Dalsza część wstępu poświęcona jest białku MyD88, omawiane są m.in. jego rola w myddosomie, warianty splicingowe, a także rola w procesach chorobotwórczych.

Rozdział „Cele pracy” jasno nakreśla braki w wiedzy dotyczącej MyD88. W rozdziale zawarto również listę przeprowadzonych badań, dzięki której łatwiej jest się odnaleźć w Materiałach i Metodach, Wynikach oraz Dyskusji. Niestety Doktorantce nie udało się otrzymać struktury kompleksu TIR-TIR białek MyD88 i Mal. Należy tutaj podkreślić, że badania strukturalne takie jak w omawianym projekcie są wysokiego ryzyka, a brak wymiernego rezultatu absolutnie nie świadczy o błędach eksperymentatora ani o braku determinacji. W ramach pracy Doktorantka opracowała metodę produkcji domen TIR białek MyD88 oraz Mal, nie udało się natomiast otrzymać kryształów w żadnym układzie. Oprócz strukturalnej charakterystyki oddziaływania TIR-TIR, praca zakładała poszukiwanie małowymiarowych związków na nie wpływających. Doktorantka prezentuje badanie przesiewowe wykorzystujące bibliotekę 1500 cząsteczek-fragmentów, których wiązanie do białka znakowanego ¹⁵N mierzono przy pomocy NMR. W ten sposób, wyselekcjonowano dziesięć cząsteczek-fragmentów oddziałujących z TIR_{MyD88}, nie udało się jednak otrzymać kryształów kompleksu TIR_{MyD88} z tymi ligandami. Kolejnym celem pracy było zbadanie roli ID w tworzeniu się myddosomu oraz w propagacji sygnału odpowiedzi immunologicznej. W celu otrzymania informacji strukturalnej, Doktorantka wykorzystywała przewidywania *in silico*, pomiary wymiany H-D przy pomocy NMR, sączenie molekularne w warunkach natywnych i denaturujących oraz dichroizm kołowy. Doktorantka zbadła następnie szereg mutantów MyD88 w testach *in cellulo* mających na celu wyłonienie kluczowych fragmentów białka dla propagacji sygnału. Identyfikacja fragmentu „Ala2”, a w szczególności Tyr116 w MyD88 jako kluczowych elementów w ramach ID jest cennym wynikiem omawianych badań. Ciekawe są również badania, dzięki którym Doktorantka wykazała, że choć forma splicingowa MyD88S może tworzyć dimery z MyD88FL to uniemożliwia przyłączanie się kolejnych podjednostek, a tym samym stworzenie myddosomu. Doktorantka słusznie stwierdza, że jest to najważniejszy wynik pracy.

Znalezione przeze mnie błędy i nieścisłości mają charakter lokalny, nie pomniejszając wartości naukowej pracy. W wykazie skrótów brakuje kilku, które pojawiają się w rozprawie, np. DD, ID, TIR, TLR, MHC. Wyjaśnienie nazwy pożywki LB to lysogeny broth, a nie Luria-Bertani. Uwagi, komentarze i pytania do głównych części pracy zawarte są poniżej.

W rozdziale „Wstęp”:

- Brak konsekwencji w używaniu skrótów, np. stosowanie „receptory TLR”, gdzie skrót zawiera już słowo „receptor”.
- Przycięto numerację sekwencji po prawej stronie rys. 1 (s.21).
- Odwołanie do Rysunku 2C jest wcześniej niż do 2A (s. 22).
- Na stronie 29 zamiast „składa się z 296 aminokwasów” powinno być „składa się z 296 reszt aminokwasowych”.
- Strony 39/40, brak odnośnika literaturowego dot. odkrycia i właściwości MyD88S.

W rozdziale „Materiały i Metody”:

- Nazewnictwo np. Ala2 jest niefortunne, ponieważ sugeruje mutację drugiej alaniny w sekwencji.
- Na stronie 46 zamiast „proteinaza PreScission” powinno być „proteaza PreScission”.

- Pojawiają się przykłady żargonu np. „Sprzęty” oraz „wytrząsarka bakteryjna” (s. 47).
- Na stronach 47-48 dla buforów A-D Doktorantka nie podaje informacji o pH, ani co było titrantem TRISu, co jest istotnym przeoczeniem.
- Na stronie 49 nie napisano jakie było stężenie dodawanego DNA, a jedynie objętość. Zamiast „Transformacja plazmidowego DNA do kompetentnych komórek E. coli” proponowałbym „Transformacja kompetentnych komórek E. coli plazmidowym DNA”, przy czym nazwa gatunkowa powinna być kursywą.
- Strona 50, „indukowano produkcję białka przez dodatek 0,5 mM IPTG”; domyślam się, że Doktorantka ma na myśli stężenie końcowe.
- Na stronie 52 nie podano stężenia białka poddanego próbom krystalizacji. Jak wiele prób krystalizacji w różnych stężeniach było poczynionych? Brak również informacji nt. źródła peptydu syntetycznego odpowiadającego ID.
- Czy rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA (s. 54) można było przeprowadzić generując mniej toksycznych odpadów?
- Co Doktorantka miała na myśli pisząc „prowadzono transfer na i detekcję chemiluminescencji” na stronie 57?

W rozdziale „Wyniki”:

- Na stronie 59 brakuje specyfikacji buforu, w którym były mieszane roztwory domen TIR białek MyD88 i Mal. Czy był to bufor D? Jeśli tak, to wysokie stężenie soli (300 mM NaCl) mogło przeciwdziałać tworzeniu się heterodimeru.
- Na Rysunku 10 Doktorantka nie opisała osi x.
- Na rysunku 13A nazwy gatunkowe powinny być napisane kursywą.
- Brak konsekwencji oznaczeń reszt aminokwasowych np. na stronie 66 „Glu110” i „Leu 155”. W innych sekcjach reszty oznaczane są pełną nazwą aminokwasu; np. na stronie 72 ciąg pięciu reszt jest opisany pełnymi nazwami.
- Doktorantka wprowadza nowy skrót „peplD”, który powinien być wprowadzony w Metodach na stronie 52.
- Na stronie 52 podano, że sączenie molekularne ID w warunkach denaturujących prowadzone było w 9 M moczniku, a na stronie 68 czytamy, że roztwór był 8 M.
- Na stronie 70 odwołanie do Rysunku 18 powinno pojawić się zdecydowanie wcześniej, najlepiej przy pierwszym nawiązaniu do omawianych wyników.
- Na Rysunku 19B nie wskazano, co było kontrolą.
- Na stronie 62, przy informacji, że zidentyfikowano 10 małowzrostkowych kandydatów oddziałujących z TIR_{MyD88} brakuje informacji o zastosowanych kryteriach selekcji.
- Na stronie 63 zamiast „nie posiadają wartości jako modulatory/inhibitory docelowych białek” zaproponowałbym „nie posiadają wartości jako modulatory/inhibitory aktywności docelowych białek”.
- Rysunki 21 i 22 powinny mieć zamienioną numerację i lokalizację w tekście (dot. stron 73-75).
- Zdanie „Reszty te które oddziałują z resztami R32 i E104 należącymi odpowiednio do modeli A i B (Rysunek 21).” jest niezrozumiałe.

- Na Rysunku 21 (prawa strona) heteroatomy powinny zostać pokolorowane zgodnie z konwencją. Czy źródłem jest tutaj również PDB ID 3MOP? Jeśli tak, to zauważam brak konsekwencji, ponieważ na Rysunku 6 zaznaczono, że jedynie DD są pokazane, choć wydaje się, że struktura wygląda identycznie. Fragment na stronie 90: „Wynik ten znajduje potwierdzenie w aktualnie dostępnych strukturach przestrzennych myddosomu (identyfikator PDB: 3MOP i 6I3N), w których oprócz domeny DD białka MyD88 został również ujęty fragment domeny ID.” rozwiewa tę wątpliwość. Zaznaczam, że w modelu 3MOP ostatnią resztą ID jest Ile117, która jest na początku ID.
- Rysunek 23, czy faktycznie identyczne ilości kontrolnego plazmidu (25 ng) skutkują tak drastyczną różnicą poziomu ekspresji, czy jest to błąd na rysunku? Pokazany wynik nie jest zgodny ze zdaniem na stronie 75 „Poziom aktywacji po stymulacji IL-1 β obserwowany w komórkach transfekowanych pustym plazmidem odpowiada przekazowi sygnału przez endogennie występujące białko MyD88”. Dotyczy to jedynie „prawej wersji” kontroli.
- Odwołanie do Rysunku 25 powinno pojawić się znacznie wcześniej na stronie 79.
- Rysunek 26 powinien zawierać również wyniki dla wariantów z metką GFP, o których mowa na stronie 80.
- Schematyczne przedstawienie testu ekspansji myddosomu (Rysunek 28) mogłoby być bardziej szczegółowe. Czy możliwa była detekcja FLAG-mCherryMyD88FL przez fluorescencję?

W rozdziale „Dyskusja”:

- Na stronie 88 pojawia się skrót HTS, który nie został wytłumaczony; domyślam się, że chodzi o high-throughput screening.
- Dalej czytamy: „Również prowadzenie analiz SAR (ang. *structure activity relationship*) jest szybsze i tańsze w przypadku związków wytypowanych przy pomocy FBDD, jako że związki te są stosunkowo łatwe do zsyntezowania.”, co wprowadza w błąd. To raczej pochodne związków z biblioteki zastosowanej w danej kampanii FBDD są łatwiejsze do zsyntetyzowania na etapach hit-to-lead.
- Zdanie “Zaletą związków niskocząsteczkowych jest zdolność do penetracji większej powierzchni badanego białka ze względu na mniejszą szansę wystąpienia zawady sterycznej, a także ich lepsza rozpuszczalność w porównaniu z większymi, bardziej rozbudowanymi cząsteczkami” zawiera szereg źle dobranych sformułowań. Po pierwsze, trudno tutaj mówić o penetracji większej powierzchni, a raczej o możliwości związania w mniejszych lub płytszych niszach na powierzchni. Po drugie, zalecałbym ostrożność w korelowaniu wprost wielkości cząsteczki z jej rozpuszczalnością.
- Na stronie 93 czytamy: „Reszty Q114-L118 znajdują się w początkowym fragmencie domeny ID, który zgodnie z modelowaniem *in silico* przyjmuje strukturę alfa-helisy. Badania strukturalne potwierdzają tę predykcję. Wzmiankowane reszty tworzą wraz z resztami domeny DD helisę H6 i są widoczne w strukturze przestrzennej myddosomu (identyfikator PDB 3MOP).” Nie widzę potrzeby modelowania fragmentu Gln114-Ile117 w przypadku, gdy dostępna jest trójwymiarowa struktura eksperymentalna.

Doktorantka nie ustrzegła się niedociągnięć edytorskich i błędów interpunkcyjnych. Na uwagę zwracają frazy ##adekspr, gdzie # oznacza cyfrę. Jest takich 8, np. na stronie 18, 46, 47, 70, 71. Inne przykładowe błędy edytorskie przedstawia poniższa tabela.

Strona	Jest:	Powinno być:
7/24	NAD+	NAD ⁺
15	za powstawania odpowiedzi immunologicznej	za powstawanie odpowiedzi immunologicznej
22	z uwagi na dużą ruchliwość	z uwagi na dużą ruchliwość
23	Opis Rys. 2: oligomery Mal	oligomeru Mal
23	zwiększoną ekspresję	zwiększoną ekspresję
29	Domena ID jest kodowa	Domena ID jest kodowana
32	myddosomem. myddosomem.	myddosomem.
34	struktur, która powstają	struktur, które powstają
53	MyD88 FL	MyD88FL
50	elektroforezy SDS-PAGE	SDS-PAGE
50/51	kolumny S75	kolumny Superdex75
56	po kontrolą	pod kontrolą
57	komórki transferowano	komórki transfekowano
57	określony	określony
57	w zebranych nadsączach	, a w zebranych nadsączach
59	Następnie obie domeny zmieszano	Następnie roztwory obu domen zmieszano
68	denaturacyjnych	denaturujących
69	domanę	domenę
71	na kolejny etapie	na kolejnym etapie
71	aktywności lucyfeazy osiągała	aktywność lucyfeazy osiągała
73	rys. 20: kontrola	kontrola
81	utworzeni funkcjonalnego myddosomu	utworzenie funkcjonalnego myddosomu
87	Ta ważna obserwacja nie tłumaczy jednak dominująco negatywnego efektu białka MyD88 w obecności MyD88 pełnej długości.	Ta ważna obserwacja nie tłumaczy jednak dominująco negatywnego efektu MyD88S w obecności MyD88FL.
94	prowadziła do fosforylację wszystkich badanych białek	prowadziła do fosforylacji wszystkich badanych białek

Podsumowując, rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Kuśki zawiera interesujące i wartościowe wyniki eksperymentalne, które powstały dzięki wykorzystaniu szeregu metod z pogranicza biologii molekularnej, strukturalnej oraz biofizyki, włączając również badania *in cellulo*. Doktorantka zmierzyła się z bardzo ambitną tematyką badawczą. Choć nie wszystkie postawione cele udało się zrealizować, praca stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat funkcji elementów MyD88. Dlatego też stwierdzam, że rozprawa spełnia kryteria 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.). Wnoszę więc o dopuszczenie mgr Katarzyny Kuśki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Miłosz Ruszkowski
dr hab. Miłosz Ruszkowski