

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 11.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kuśki

pt.: „Analiza struktury i funkcji białka MyD88 zaangażowanego w odpowiedź immunologiczną”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Dubina oraz promotora pomocniczego dr Katarzyny Pustelny

Tematem przewodnim recenzowanej rozprawy doktorskiej jest analiza struktury białka w kontekście jego funkcji biologicznej. Pojęcie „struktura” oznacza sposób rozłożenia elementów składowych danego układu i wzajemnych powiązań między tymi elementami, i jest charakterystyczny dla tego układu. Struktura nadaje całości zorganizowaną jedność. W zasadzie wszystko we wszechświecie ma swoją strukturę, a ta determinuje dalsze procesy i zachowania układu. Przykładowo w odpowiednią strukturę są zorganizowane atomy, białka, wirusy, bakterie, komórki czy całe organizmy. Swoją strukturę mają też gleby, skały czy lasy. Są również struktury ekonomiczne, gospodarcze czy społeczne. Swoją strukturę posiada pisany tekst czy kod programowania. Także państwa posiadają swoje struktury, a te dalej organizują się w struktury geopolityczne. Zaburzenie jakiegokolwiek ww. struktury może, choć nie musi, prowadzić do szeregu niekorzystnych zmian. Dobrym przykładem zaburzenia struktury wpływające na życie ludzkości jest zamiana reszt aminokwasowych w strukturze białka kolca wirusa SARS-CoV2, odpowiedzialnego za wywołanie pandemii COVID-19. Okazuje się, że pojedyncze mutacje L452R i E484Q w taki sposób wpływają na strukturę białka, że wiąże się ono bardziej wydajnie z ludzkim receptorem ACE2, prowadząc do zwiększonego wnikania do komórek gospodarza. Mutacja P681R w miejscu cięcia furyną S1/S2 ułatwia silniejszą aktywację proteolityczną białka kolca, co skutkuje zwiększoną zakaźnością wirusa. Nowe kombinacje mutacji prowadzą do unikania odporności, poprzez m.in. zmniejszone wiązanie przez przeciwciała monoklonalne (mAb). Innym, bardzo aktualnym, przykładem wpływu zaburzenia struktury na życie ludzkości jest zmiana (lub próba zmiany) struktury układu geopolitycznego państw. Efekty tego zaburzenia widzimy dzisiaj na ulicach ukraińskich i europejskich miast. Przykłady te pokazują jak ważna jest struktura dla prawidłowego (lub wadliwego) funkcjonowania całego układu. W recenzowanej pracy badany jest wpływ struktury białka MyD88 na funkcjonowanie układu odpornościowego człowieka. Zaburzenie struktury tego białka przyczynia się do zahamowania lub zmiany przekazywania sygnału komórkowego, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia odpowiedzi immunologicznej organizmu lub do zwiększonego ryzyka zachorowania na niektóre nowotwory czy zwiększonej zapadalności na choroby neurodegeneracyjne. Analiza struktury domen białka MyD88 oraz jego naturalnych czy otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej mutein w kontekście ich zdolności do formowania kompleksów (myddosomów) oraz zdolności przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego stało się tematem rozprawy doktorskiej pani Katarzyny Kuśki.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Dubina z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz dr Katarzyny Pustelny, jako promotora pomocniczego, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dysertacja doktorska mgr Kuśki posiada układ typowy dla prac z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 106 stron maszynopisu i

podzielona jest na sześć głównych rozdziałów (tj. wstęp, czyli część literaturowa, cel pracy, materiały i metody (choć opis zawiera głównie opis materiałów), metody, wyniki, dyskusję i bibliografię). Rozdziały te poprzedzone są streszczeniem w języku angielskim i polskim, podziękowaniami i informacjami na temat finansowania badań zawartych w pracy doktorskiej. Spis piśmiennictwa obejmuje 129 pozycji literaturowych. Pod względem edycyjnym praca została dobrze przygotowana a zamieszczone rysunki, schematy, tabele i zdjęcia bardzo pomagają w zrozumieniu uzyskanych przez Doktorantkę wyników. W pracy znalazłam kilka błędów edycyjnych i językowych. (np. w kilku słowach brakuje ostatnich liter; bardzo często w tekście pojawia się słowo „nadekspresja” w zaszyfrowanej kombinacji liter zaczynających się od cyfry 18 lub 70, lub 71, lub 78 – co najprawdopodobniej wynika z błędu oprogramowania drukarki; na niektórych rysunkach jest za mała czcionka; brak opisu skali oraz jednostek - widmo CD). Uwagi te w żaden sposób nie umniejszają mojej wysokiej oceny formalnej pracy doktorskiej p. Katarzyny Kuśki.

Pierwszy rozdział pracy doktorskiej to „Wstęp”, w którym Doktorantka krótko wprowadziła czytelnika w tematykę funkcjonowania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej człowieka. Szczegółowo opisała działanie i strukturę receptorów Toll-podobnych (TLR), które są jednymi z najważniejszych receptorów biorących udział w natychmiastowej odpowiedzi immunologicznej. Receptory TLR w części zewnątrzkomórkowej posiadają domeny rozpoznające i wiążące ligandy (patogeny). Po ich związaniu receptory TLR ulegają dimeryzacji, co w dalszej kolejności umożliwia przyłączenie się do ich części wewnątrzkomórkowej białek adaptorowych takich jak MyD88 czy Mal. Białka adaptorowe zbudowane są domen TIR-IR-DD i mogą tworzyć hetero- (z receptorami TLR) lub homodimery poprzez oddziaływanie domenami TIR. Powstały kompleks TLR - białko adaptorowe, umożliwia dalsze przyłączanie się kolejnych białek IRAK (oddziaływanie domenami DD), co w efekcie prowadzi do powstania myddosomu oraz amplifikacji i propagacji sygnału komórkowego NF- κ B. Aktywacja ścieżki NF- κ B prowadzi w konsekwencji do produkcji cytokin. We Wstępie, Doktorantka bardzo szczegółowo opisała budowę domen TIR białek adaptorowych, biorąc pod uwagę dostępne struktury przestrzenne. Pokazała, że domeny TIR są kluczowe dla formowania dimerów i całych myddosomów a ich struktura, choć podobna, determinuje różne powierzchnie oddziaływać w dimerach. Struktura monomeru domeny TIR w białku MyD88 jest znana, natomiast nie wiadomo, w jaki sposób układa się ona w homodimerze MyD88-MyD88 czy w heterodimerze MyD88-TLR/Mal. W kolejnych podrozdziałach „Wstępu” mgr Kuśka opisała w jaki sposób zachodzi kaskada sygnałowa NF- κ B niezależna lub zależna od białka MyD88. Co ciekawe alternatywne składanie transkryptów prowadzi do powstania białka MyD88S (alternatywny wariant białka MyD88 bez domeny ID), które działa hamująco (jest inhibitorem) na szlak sygnałowy receptorów TLR, dzięki utworzeniu heterodimeru MyD88-MyD88S. Dalej, Doktorantka opisała szczegółowo strukturę myddosomu, czyli olbrzymiego kompleksu białkowego umożliwiającego amplifikację i transdukcję sygnału komórkowego NF- κ B. W mojej opinii opis literaturowy dysertacji został dokonany prawidłowo, i w sposób pełny wprowadza czytelnika w tematykę badań, pokazując jednocześnie „luki” w stanie wiedzy, które mgr Kuśka postanowiła uzupełnić.

W kolejnej części dysertacji („Cel pracy”) mgr Kuśka przedstawiła dwa główne cele swojej pracy doktorskiej, którymi były: **(i) charakterystyka strukturalna oddziaływań domen TIR-TIR w białkach MyD88 i Mal oraz (ii) wyjaśnienie funkcji domeny ID w białku MyD88 w procesie tworzenia się myddosomu oraz propagacji sygnału komórkowego podczas odpowiedzi immunologicznej.** Do osiągnięcia zamierzonych celów Doktorantka wyznaczyła sobie zadania cząstkowe, do których należało:

- (1) Otrzymanie domen TIR białek MyD88 i Mal, oraz ustalenie struktury krystalicznej homo- i heterodimerów domen TIR,

- (2) Poszukiwanie niskocząsteczkowych modulatorów aktywności domen TIR białka MyD88,
- (3) Charakterystyka strukturalna domeny IR białka MyD88,
- (4) Zbadanie roli domeny ID w propagacji sygnału komórkowego NF- κ B,
- (5) Określenie roli domeny ID w tworzeniu myddosomu.

Kolejne rozdziały pracy, zatytułowane zostały „Materiały i metody” oraz „Metody”. W pierwszym z nich Doktorantka wymieniła skróty i nazwy białek, które otrzymała lub konstruktów które testowała (**29 różnych białek!**). W podrozdziale tym dokładnie wymieniła aparaturę badawczą oraz wszystkie materiały wykorzystywane w swoich pracach wraz ze źródłem ich pochodzenia. W podrozdziale „Metody” mgr Kuśka szczegółowo opisała techniki badawcze zastosowane podczas swoich badań. Zastosowała, w mojej opinii, właściwe metody i procedury, do których należały, w dużym uproszczeniu: (i) inżynieria genetyczna (modyfikacja genetyczna komórek bakteryjnych i ludzkich komórek eukariotycznych), (ii) biotechnologia (nadprodukcja i oczyszczanie białek), (iii) metody strukturalne (krystalografia i NMR), (iv) metody biologii molekularnej (elektroforeza, Western blot oraz testy na aktywację szlaku komórkowego NF- κ B) oraz (v) statystyczne. Wszystkie czynności zostały dokładnie opisane i na pewno będą służyły młodszym koleżankom i kolegom jako źródło „gotowych przepisów” w ich badaniach. Pewien niedosyt budzi jedynie brak szczegółowych informacji na temat pomiarów NMR (np. nie wiadomo jakiego rodzaju widma 2D NMR zostały zmierzone oraz w jakim pH) wykonywanych w pracach nad poszukiwaniem niskocząsteczkowych związków wiążących się do domeny TIR oraz na temat, choć zdaję sobie sprawę, że prace te wykonały inne osoby, o czym Doktorantka napisała w swojej dysertacji.

W następnym rozdziale zatytułowanym „Wyniki” pani Katarzyna Kuśka przedstawiła najważniejsze rezultaty swojej pracy wraz z ich interpretacją. Opis wyników podzieliła na osiem głównych podrozdziałów. W pierwszym z nich opisała nieudane próby uzyskania dimeru TIR-TIR. Pomimo wielu prób optymalizacji procesu dimeryzacji nie udało się uzyskać stabilnego dimeru ani w warunkach łagodnych, ani w warunkach krystalizacyjnych. Może, znając struktury 3D monomerycznych domen TIR, warto by wykorzystać techniki teoretyczne i zadokować obie domeny do siebie? W kolejnej części mgr Kuśka opisała eksperymenty mające na celu znalezienie niskocząsteczkowych modulatorów oddziaływań domen TIR białek Myd88 oraz Mal. Początkowo wykonane zostały (we współpracy) eksperymenty FBDD-NMR polegające na przetestowaniu całej biblioteki związków niskocząsteczkowych. Wyselekcjonowanych zostało dziesięć związków, które w eksperymentach NMR wiązały się do domeny TIR białka MyD88. Związki te zostały następnie wykorzystane przez Doktorantkę do uzyskania kompleksów białko-modulator. Niestety i tym razem próby uzyskania kryształów nie powiodły się. Pomimo nie uzyskania zaplanowanych wyników badań uważam, że warto było podjąć próby krystalizacji zarówno dimerów domen TIR jak i kompleksów z modulatorami, gdyż ewentualne uzyskanie pozytywnych wyników znacznie zwiększyłoby stan wiedzy na temat funkcjonowania białek adaptorowych receptorów TLR. Jakie, wg Doktorantki techniki eksperymentalne można by zastosować w przyszłości, chcąc zbadać możliwość formowania się dimerów oraz chcąc poznać miejsce oddziaływań obu domen TIR? W następnej części dysertacji mgr Kuśka podjęła się oznaczenia struktury przestrzennej domeny ID białka MyD88. Domena ID składa się z 46 reszt aminokwasowych, a sekwencja tej domeny jest silnie zakonserwowana u wyższych organizmów. Badania teoretycznego przewidywania struktury wykazały, że białko tworzy strukturę helikalną na N-końcu ale w pozostałej części jest nieustrukturyzowane. Wyniki tych badań zostały potwierdzone technikami eksperymentalnymi tj. dichorizmu kołowego (CD) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Widma CD wskazują na formowanie się struktury random-coil zarówno w PBS (nazwane przez Doktorantkę warunkami natywnymi), jak i w obecności mocznika. W mojej opinii warto byłoby sprawdzić jaki wpływ na widma CD ma temperatura czy pH roztworu, a także obecność trifluoroetanolu, który sprzyja formowaniu się

struktury helikalnej peptydu. Wykonane zostały również widma NMR w obecności różnego stężenia D₂O. Eksperyment ten pokazał, iż wszystkie protony amidowe ulegają wymianie chemicznej na deuter, co wskazuje na brak formowania się stabilnej struktury drugorzędowej przez domenę ID. Tego typu eksperyment rzadko stosuje się dla oznaczenia obecności wiązań wodorowych w peptydzie. Częściej wykonuje się pomiary w jednym stężeniu D₂O, ale w szerokim zakresie temperatur. W mojej ocenie dużo lepszym rozwiązaniem byłoby wykonanie serii widm 2D NMR w celu ustalenia struktury przestrzennej tego peptydu, choć duża ilość reszt aminokwasowych mogłaby utrudnić rozwiązanie widma. Czy takie próby zostały podjęte przez Doktorantkę lub współpracowników? W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przeprowadziła szereg doświadczeń, mających na celu określenie roli domeny ID w transdukcji sygnału komórkowego w ścieżce zależnej od MyD88. Testy te przeprowadziła poprzez badanie różnych konstruktów białka MyD88 w komórkowym teście nadekspresji opartym na pomiarze aktywności lucyferazy. Testowała konstrukty delecyjne, a także konstrukty z wymienionymi pojedynczymi lub kilkoma resztami na alaninę. Ostatecznie wykazała, że mutacja reszt 114-118 w obrębie domeny ID doprowadziła do znacznego spadku aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, wykazując efekt podobny do białka MyD88S (inhibitora). Doktorantka pokazała również, że największe znaczenie ma reszta Tyr116, która daje efekt propagacji sygnału komórkowego do tego jaki obserwowano dla białka MyD88S. W mojej opinii odkrycie to jest dużym osiągnięciem naukowym uzyskanym przez mgr Katarzynę Kuśkę. W ostatniej części rozdziału „Wyniki” mgr Kuska zbadała wpływ domeny ID białka MyD88 oraz białka MyD88S na formowanie myddosomu. W badaniach tych sprawnie posługiwała się nowoczesnymi metodami biologii molekularnej. Wyniki tej części pracy pokazały, że białko MyD88S wykazuje zdolność do tworzenia kompleksów z białkiem MyD88FL, ale nie pozwala na przyłączenie się kolejnych cząsteczek białka, przez co hamuje powstawanie myddosomu. Wyniki tych badań w sposób znaczący przyczyniają się do uzupełnienia stanu wiedzy na temat propagacji sygnału komórkowego odpowiedzialnego za aktywację odpowiedzi immunologicznej. Na szczególną pochwałę zasługuje fakt doskonałego zaplanowania wieloetapowych badań oraz ich przeprowadzenie z wykorzystaniem kolejnych wariantów mutein, a także dojrzałą analizę wyników z przeprowadzonych eksperymentów. Ta część pracy zawiera pokaźną ilość rysunków, schematów, wykresów i zdjęć, które doskonale dokumentują uzyskane wyniki.

Po lekturze tej części pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania.

- (1) Czy, używając programu I-TASSER, wygenerowana została teoretyczna struktura domeny ID? Może warto przetestować inne dostępne programy do przewidywania struktury drugorzędowej peptydu? Obecnie, jednym z lepiej działających tego typu programów jest program AlphaFold firmy Google.
- (2) Czy przed wykonaniem eksperymentów CD i NMR dla peptydu ID (domena ID) sprawdzona została forma oligomeryczna peptydu (np. HPLC, MS)? Badany peptyd posiada w swojej sekwencji jedną resztę cysteiny w pozycji 4, która może (choć nie musi) ulegać utlenieniu. W ten sposób mogą powstać dimery peptydu. Peptyd zawierający pojedynczą resztę Cys może również ulegać autohydrolizie. Jest to proces bardzo częsty nawet dla peptydów przechowywanych w formie liofilizatu. Jaka jest pewność, że w badaniach CD i NMR użyta została forma monomeryczna?
- (3) Str. 68. Jakie tzw. kity kalibracyjne zostały wykorzystane do wyznaczenia promienia Stokesa peptydu ID? Czy wyznaczona została masa cząsteczkowa peptydu ID na podstawie krzywej kalibracyjnej z sączenia molekularnego?
- (4) Str. 67. Czy widma ¹H NMR dla peptydu ID zostały skalibrowane względem intensywności protonów nieulegających wymianie chemicznej?

(5) Str. 79. Jaki należałoby zastosować test (technikę, metodologię), aby odróżnić dimery od oligomerów badanych białek?

(6) Rys. 26. Czy dla tych pomiarów wykonane zostały obliczenia statystyczne?

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski swojej pracy doktorskiej w odniesieniu do danych literaturowych. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam **ustalenie dużego znaczenia reszty Tyr116 w białku MyD88 w propagacji sygnału komórkowego, oraz że białko Myd88S wykazuje zdolność do tworzenia kompleksów z białkiem Myd88FL ale nie pozwala na przyłączenie się kolejnych cząsteczek białka, przez co hamuje powstawanie myddosomu.** Uważam, że cele pracy doktorskiej mgr Kuśki zostały w pełni zrealizowane.

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest interesująca i niezwykle potrzebna w świetle pełnego opisu działania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego. Recenzowana przeze mnie praca doktorska utwierdziła mnie jedynie w przeświadczeniu, że struktura układu jest bardzo ważna, a jej zaburzenie może prowadzić do dużych zmian w funkcjonowaniu układu. Rozprawa mgr Katarzyny Kuśki zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o dopuszczenie mgr Katarzyny Kuśki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.