

Poznań 28.12.2020 r.

**Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak**

Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
w Poznaniu

## O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Zyzak, zatytułowanej  
***Wpływ białka adaptorowego Mal na odpowiedź antywirusową zależną od receptora Toll-podobnego 9,***  
wykonanej pod kierunkiem dra hab. inż. Jakuba Siednienko  
w Laboratorium Białek Sygnałowych Instytutu Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Rozpoznanie patogenu i jego szybka eliminacja z organizmu zależy od prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Proces ten rozpoczyna się od rozpoznania na powierzchni patogenów charakterystycznych wzorców molekularnych, związanych z patogenami PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) przez swoiste receptory PRR (ang. *patogen recognition receptors*), zlokalizowane na powierzchni lub wewnątrz komórek immunokompetentnych – makrofagów, komórek dendrytycznych, limfocytów, jak również komórek nabłonkowych układu oddechowego czy pokarmowego. Rozpoznanie PAMP uruchamia wewnątrz komórki mechanizmy transdukcji sygnału, prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych biorących udział w transkrypcji genów kodujących cytokiny oraz cząsteczki kostymulujące CD40 i CD86. Do grupy receptorów PRR należą receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*), będące elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Dotychczas scharakteryzowano 13 receptorów Toll (TLR1-13), które mogą być zlokalizowane na powierzchni komórek lub wewnątrz – w endosomach, lizosomach, siateczce endoplazmatycznej. Ligandami dla TLR występującymi na powierzchni komórki są cząsteczki eksponowane na powierzchni patogenu, natomiast dla TLR występujących w pęcherzykach endosomalnych kwasy nukleinowe, pochodzące od zdegradowanych w endosomach patogenów. Na przykład, endosomalny TLR 9 wiąże DNA bogate w niemetylowane sekwencje CpG. Receptor ten bierze udział w odpowiedzi przeciwwirusowej, skierowanej przeciw licznym wirusom.

Funkcjonowanie receptorów Toll zależy od ich struktury, translokacji i lokalizacji w błonie komórki, procesu ich dojrzewania oraz oddziaływania z licznymi białkami. Z receptorami Toll współdziałają białka adaptorowe, kinazy i białka pośredniczące.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 18-01-2021
L.dz. .... 869 .....

Szlaki sygnałowe zależne od TLR mogą przebiegać odmiennie w komórkach różnych typów. Ich poznanie i zrozumienie może mieć istotne znaczenie dla opracowania swoistej terapii przeciwwirusowej, przeciwnowotworowej i być może pozwoli na lepsze zrozumienie etiologii chorób autoimmunologicznych.

Z tego względu cel pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Zyzak nad rolą białka adaptorowego Mal/TIRAP (ang. *MyD88 Adaptor Like/TIR domain containing adaptor protein*) w szlaku sygnałowym receptora TLR-9 i odpowiedzi wirusowej uważam za słuszny i w pełni uzasadniony. Cel badań Doktorantki jest jasno określony we wstępie pracy. Podjęcie proponowanych przez mgr inż. Joannę Zyzak badań zostało uzasadnione także we wstępie rozprawy, w której opierając się na najnowszych danych literaturowych, Doktorantka przedstawia aktualny stan badań nad receptorami TLR i ich rolę w aktywności przeciwwirusowej.

W funkcjonowaniu receptora TLR9 ważną rolę pełni region TIR, zlokalizowany w jego C-końcowej części cytoplazmatycznej. Jest on odpowiedzialny za dimeryzację receptora, oddziaływania z białkiem adaptorowym MyD88 (ang. *myeloid differentiation primary response gene 88*), proces dojrzewania TLR 9 i transport do endosomu. Ligandem dla tego receptora są niemetylowane oligonukleotydy zawierające sekwencje CpG, jak również dsDNA wirusa neurotropowego opryszczki HSV 1.

Realizację celów badań mgr Joanna Zyzak rozpoczęła od określenia ekspresji na poziomie mRNA genu interferonu  $\beta$  i czynnika TNF  $\alpha$  w komórkach linii CHME-5 z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko Mal (*TIRAP*) za pomocą shRNA o sekwencji komplementarnej do *TIRAP*. Komórki takie zakażała wirusem HSV-1. Jako próbę kontrolną stosowała komórki linii CHME-5 z niewyciszoną ekspresją genu *TIRAP*. Obniżony poziom ekspresji genów interferonu  $\beta$  i TNF $\alpha$  w komórkach z wyciszonym genem *TIRAP*, zakażonych HSV, wskazywał na udział białka Mal w transdukcji sygnału od receptora TLR 9. Potwierdziła to Doktorantka w toku dalszych badań, w których wykorzystwała swoisty oligonukleotyd do zablokowania ekspresji tego receptora, jak również przeprowadzając badania na ludzkich komórkach jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej, w których do stymulacji TLR9 poza HSV-1 zastosowała syntetyczny oligonukleotyd bogaty w niemetylowane nukleotydy CpG. W komórkach takich dodatkowo zablokowała dostęp białka Mal do domeny TIR receptora TLR9 za pomocą swoistego peptydu.

W następnym etapie badań mgr Joanna Zyzak zanalizowała wpływ białka Mal na ekspresję innych białek biorących udział w transdukcji sygnału TLR9, w tym kinaz białkowych z rodziny MAP oraz na poziom czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i jego inhibitora I $\kappa$ B $\alpha$ . Wyniki tych badań wykazały, że Mal bierze udział w regulacji aktywowanej przez TLR 9 fosforylacji kinaz ERK1/2 po stymulacji receptora HSV-1 lub syntetycznym oligonukleotydem bogatym w niemetylowane CpG. Z kolei, aktywność kinaz ERK1/2 wymagana jest do zależnej od TLR 9 indukcji ekspresji genu interferonu  $\beta$ 1 i TNF $\alpha$ . Brak białka adaptorowego Mal w komórce hamuje zatem aktywację kinaz ERK1/2, co prowadzi do obniżonej ekspresji genów interferonu i TNF.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka postanowiła zbadać rolę kinazy BTK (kinaza treoninowa Brutona), biorącej udział w fosforylacji domeny TIR białka Mal w aktywacji kinaz ERK1/2. Stosując swoisty inhibitor BTK, wykazała, że fosforylacja kinaz ERK1/2 w transdukcji sygnału zależnego od TLR 9/Mal nie jest regulowana przez tę kinazę. Wykazała również, że inhibicja aktywności serynowo-treoninowej kinazy Tp12 z rodziny kinaz MAP (MAP3K) swoistym inhibitorem prowadzi do zahamowania transkrypcji genów interferonów, natomiast transkrypcja TNF jest zahamowana o 30% w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W procesie indukcji ekspresji genów cytokin

zależnych od TLR 9 bierze natomiast udział kinaza PI3. Wskazywało to na związek transdukcji sygnału TLR 9 z autofagią. Jednym z białek komórkowych zaangażowanym w tworzenie autofagosomów jest białko Atg16L1. Mgr Joanna Zyzak stosując koimmunoprecypitację, wskazała na potencjalną zdolność oddziaływania białka Mal z białkiem Atg16L1. Oddziaływanie obu białek, zdaniem Doktorantki, może odgrywać rolę podczas tworzenia fagoforu lub fuzji autofagosomu z endosomem. Sugestia ta wymagałaby jednak potwierdzenia w toku dalszych badań. Końcowym etapem transdukcji sygnału receptora TLR 9 jest aktywacja czynników transkrypcyjnych biorących udział w transkrypcji genów kodujących między innymi interferon. Mgr inż. Joanna Zyzak wykazała, że w komórkach zakażanych HSV dochodzi do aktywacji promotora genu dla interferonu beta, jak również jego domen regulatorowych, przede wszystkim wiążącej czynnik NF- $\kappa$ B, która wzrastała pod wpływem ekspresji genu białka Mal. Poza tym, Doktorantka wykazała, że białko Mal jest zaangażowane w translokację podjednostek tego czynnika do jądra komórkowego.

Reasumując wyniki badań otrzymane przez Doktorantkę, uważam, że cele badań wytyczone na wstępie pracy zostały w pełni zrealizowane. Mgr inż. Joanna Zyzak wykazała, że białko Mal jest ważnym regulatorem w transdukcji sygnału, zależnym od receptora TLR 9, prowadzącej do ekspresji genów IFN $\beta$  i TNF  $\alpha$ . Białko Mal ma także wpływ na translokację jądrowego czynnika NF $\kappa$ B w komórkach stymulowanych ligandem dla TLR 9. Z kolei, czynnik NF- $\kappa$ B kontroluje ekspresję promotorów genów cytokin. Białko adaptorowe Mal może być także zaangażowane w proces autofagii.

Przedstawiona do oceny praca dostarcza szeregu nowych i bardzo ważnych danych pozwalających na lepsze zrozumienie nie tylko roli białka Mal w transdukcji sygnału zależnego od receptora TLR9, ale również na poznanie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w ten proces. Przedstawione w pracy badania zostały starannie zaplanowane i konsekwentnie zrealizowane. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz technik badawczych, jakie Doktorantka wykorzystwała w pracy. Mgr inż. Joanna Zyzak wykazała się przy tym znajomością i umiejętnością zastosowania najnowszych technik z biologii molekularnej (tj. PCR, wyciszanie ekspresji genów, blokowanie aktywności białek, EMSA, hodowle komórkowe) oraz immunologii (Elisa, Western Blotting, koimmunoprecypitacja). Na uwagę zasługuje również sposób opracowania wyników badań przez Doktorantkę, jak też ich udokumentowanie na wykresach i fotografiach, co bardzo ułatwia czytelnikowi ich analizę. Wyniki badań Doktorantka przedyskutowała w danych z literatury przedmiotu w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Dyskusja wyników świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr inż. Joanny Zyzak do badań i Jej dojrzałości naukowej. Badania Doktorantki doskonale korespondują z nurtem podobnych badań na świecie.

Praca napisana jest w sposób jasny i poprawny. Drobne uchybienia czy niejasności nie mają wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną rozprawy mgr Joanny Zyzak. Przedstawiona do oceny praca stanowi bardzo cenne opracowanie naukowe, przedstawiające szereg nowych danych poznawczych, jak również ważnych dla opracowania nowych terapii przeciwwirusowych. O wysokiej wartości wyników prezentowanych w rozprawie mgr inż. Joanny Zyzak świadczy ich częściowe już opublikowanie w czasopiśmie „*J. Innate Immun*” w 2019 roku, którego współczynnik oddziaływania wynosi 4,089.

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską otrzymałam w formie 105 stronicowego wydruku komputerowego, a jej układ jest typowy dla tego typu rozpraw. Część doświadczalna pracy została poprzedzona streszczeniem w języku polskim i

wstępem przedstawiającym najnowszą wiedzę na temat transdukcji sygnału z udziałem receptorów Toll i białek z nim współdziałających. Metody stosowane w badaniach są dobrze opisane. Na uwagę zasługuje także część doświadczalna pracy, w której uzyskane wyniki zostały bardzo dobrze udokumentowane i opatrzone krótkim komentarzem. Dokumentacja badań jest przedstawiona na 35 rycinach i 7 fotografiach. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej. Bardzo podobała mi się również dyskusja wyników. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością literatury przedmiotu. Pracę kończą właściwie przedstawione wnioski badań, spis literatury obejmujący 219 pozycji literatury przedmiotu oraz streszczenie rozprawy w języku angielskim.

W mojej ocenie, praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Zyzak spełnia wszystkie kryteria określone w Ustawie MNiSW z 18.03.2011 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (DzU nr 204). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Zyzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, mając na uwadze wysoką wartość poznawczą, jak również jej znaczenie aplikacyjne, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.

*Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak*

