



Wrocław, 18.01.2021 r.

Prof. dr hab. Wojciech Nowacki

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Zyzak pt. „ Wpływ białka adaptorowego Mal na odpowiedź antywirusową zależną od receptora Toll-podobnego 9 ”, wykonanej pod kierunkiem promotora Pana dr hab. inż. Jakuba Siednienko oraz promotora pomocniczego Pani dr inż. Małgorzaty Mitkiewicz.

1. Charakterystyka techniczna rozprawy.

Rozprawa doktorska Pani Joanny Zyzak przedstawiona została na 105. stronach oprawionego wydruku komputerowego. Zawiera 5. rysunków i 26. rycin i 1. tabelę. Na początku dysertacji zamieszczono po stronie tytułowej podziękowania oraz informację o źródle finansowania. Praca była współfinansowana w ramach projektu OPUS4 Narodowego Centrum Nauki Nr UMO - 2012/07/B/NZ3/02550. Spis treści znajdujemy na str. 3-5., potem streszczenie w języku polskim str.6., wykaz stosowanych skrótów str. 7-8. Zasadnicze opracowanie składa się z 26. stron wstępu, 1. Strony na której przedstawiono cel pracy, materiał i metody zajmują 19. stron, wyniki badań to kolejne 23. strony, dyskusja wyników 11. stron, wnioski 1. strona, informacja o opublikowaniu części wyników znajdujących się w rozprawie oraz publikacje Doktorantki znajdujemy na str. 91. Strona 92 to streszczenie w języku angielskim. Na str. 93-105. Autorka podaje 219 pozycji dobrze dobranego, aktualnego, w zasadzie anglojęzycznego piśmiennictwa. Praca ma więc układ klasyczny i przygotowana jest bardzo starannie.



2. Charakterystyka merytoryczna opracowania, realizacji celu i uzyskanych wyników .

Układ immunologiczny, w ścisłej współpracy z układem nerwowym i hormonalnym, stanowi obronę gospodarza. Składają się na niego elementy odporności wrodzonej: komórkowe (monocyty, makrofagi, granulocyty i różne typy komórek dendrytycznych – DC) i humoralne (cytokiny, interferony, białka układu dopełniacz, białka ostrej fazy - bof etc.). Są one gotowe do natychmiastowego działania obronnego.

Druga grupa to wolno działające w odpowiedzi immunologicznej elementy odporności swoistej: zróżnicowane limfocyty T i B oraz przeciwciała. Elementy odporności nieswoistej pełnią obok funkcji bezpośredniej obrony, rolę łącznika z odpowiedzią swoistą prezentując na strukturach komórkowych MHC kl. I i II fragmenty antygenów.

Komórki odporności nieswoistej cechuje większa lub mniejsza zdolność fagocytozy spontanicznej, immunologicznej z udziałem opsonin (immunoglobuliny, składowe dopełniacza C1, C3, białka surfaktantu, niektóre bof) oraz wyrafinowane rozpoznanie wzorców molekularnych związanych z patogenami (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMP) przez odpowiednie receptory rozpoznające wzorce (Pattern Recognition Receptors – PRR). Wśród PRR są receptory Toll podobne, których dotychczas opisano 10 u człowieka i 13 u myszy. Część z nich występuje na powierzchni komórki a część we wnętrzu, w endosomach.

Doktorantka we wstępie rozprawy przedstawia aktualną wiedzę na temat tych powierzchniowych receptorów: TLR1-TLR2, TLR2, TLR2-TLR6, TLR4, TLR5 i TLR10 oraz receptorów endosomalnych: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11/12 oraz TLR13. Jej tematem badań jest TLR9, którego naturalnym ligandem jest DNA bakteryjne i wirusowe. Potwierdzona jest rola tego receptora w rozpoznawaniu oligonukleotydów bogatych w sekwencje dinukleotydów cytozyno-guaninowych – CpG. Budowa oligonukleotydu i obecny w nim motyw CpG określają typ i siłę indukowanej przez TLR9 odpowiedzi immunologicznej. Autorka przedstawia budowę i warianty tego receptora oraz proces jego transportu i dojrzewania w komórce. Przedstawia białka adaptorowe receptorów Toll-podobnych. W opisie Myddosomu znajdujemy informację o białku adaptorowym MyD88, które wykorzystywane jest przez prawie wszystkie receptory Toll-podobne. Wyjątkiem jest TLR3. Przekazywanie sygnału przez MyD88 warunkowane jest powstaniem kompleksu określanego jako Myddosom. Z piśmiennictwa wynika, że dokowanie białka MyD88 do domeny TIR receptorów Toll-podobnych nie zawsze zachodzi w sposób bezpośredni i wymaga uczestnictwa innego białka adaptorowego Mal (MyD88-adaptor like / TIRAP - TIR-domain-containing adaptor protein). Potencjalny udział tego białka w odpowiedzi antywirusowej, zależnej od receptora Toll-podobnego 9, jest głównym



wątkiem badawczym tej rozprawy. W wielu wcześniejszych opracowaniach wskazywano, że białko Mal oddziałuje tylko z TLR błony komórkowej.

W dalszej części wstępu znajdujemy omówienie szlaku sygnałowego TLR9, z podkreśleniem, że jest on różny w poszczególnych typach komórek, co Autorka przedstawia także na rys. 5. W cDC (conventional Dendritic Cells) i makrofagach głównym aktywowanym czynnikiem transkrypcyjnym jest NF- κ B, a w przypadku pDC (plazmocytoidalnych Dendritic Cells) mamy inny repertuar białek m.in. osteopontyny (OPN) oraz TRAF3 i umożliwiającą aktywację IRF7. Końcowym efektem uruchomienia szlaku sygnałowego TLR9 jest produkcja cytokin, chemokin i interferonów. Interferony typu I są kluczowe w nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej.

W swoich eksperymentach Doktorantka wykorzystuje wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (Herpes Simplex Virus , HSV-1 / Human Herpesvirus, HHV-1), dlatego słusznie zamieszczono we wstępie informację o roli receptorów Toll w rozpoznawaniu HSV-1. Ten powszechnie występujący wirus po wnikięciu do organizmu, zasadniczo przez błony śluzowe, po wstępnej replikacji migruje do zakończeń neuronów czuciowych. Lokalizuje się w zwoju nerwu trójdzielnego i wchodzi w stan latencji.

Pani mgr J. Zyzak bazując na dostępnym piśmiennictwie przedstawia etapy rozpoznania wirusa w przebiegu zakażeń przez grupę receptorów Toll. Rozpoznanie rozpoczyna się na etapie fuzji wirusa i komórki, w czym uczestniczy TLR2 w kompleksie z TLR1. W drugim etapie udział bierze endosomalny receptor TLR9 rozpoznający materiał genetyczny wirusa. Jako ostatni aktywowany przez HSV-1 jest TLR3, mogący wiązać dsRNA powstałe w trakcie replikacji wirusa. Udział różnych typów TLR w rozpoznaniu odmiennych składowych wirionów HSV-1 ma znaczenie w jego wykryciu przez różne populacje komórek, cechujących się zróżnicowanym ich występowaniem. Tak, jak podkreśla to Doktorantka, poznanie mechanizmów zaangażowanych do usuwania wirusa z komórki, może być bardzo istotne w rozwoju nowych terapii antywirusowych.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa funkcja białka adaptorowego Mal w szlaku sygnałowym receptora TLR9 nie została wyjaśniona. Stąd jako cel dysertacji Pani mgr inż. Joanna Zyzak przedstawia: „ustalenie funkcji , jaką Mal pełni w TLR9-zależnej odpowiedzi antywirusowej oraz poznanie nowych interakcji białka Mal z białkami szlaku sygnałowego receptora TLR9. Podejmuje także próbę identyfikacji czynników transkrypcyjnych regulowanych przez białko Mal i determinujących inicjację transkrypcji cytokin aktywowanych przez ten receptor”



Rozdział Materiał i Metody, to precyzyjnie przedstawiony wykaz odczynników chemicznych i reagentów, gotowych zestawów buforów i żeli, starterów do PCR i poliklonalnych przeciwciał diagnostycznych. Ponadto umieszczono tu opis plazmidów, izolowania jednojądrzastych ludzkich komórek krwi obwodowej (P BMC) pochodzących od zdrowych dawców oraz wykorzystanych w eksperymentach linii komórek ludzkich i mysich. Autorka podaje również wykaz aparatury i akcesoriów.

Metody opisane są jasno i wystarczająco precyzyjnie. Znajdujemy tu informacje dotyczące otrzymywania i hodowli komórek, przygotowania plazmidów, wyciszania ekspresji genu TIRAP, analizy ekspresji genów, techniki western blottingu, transfekcji, testu zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA), testu biologicznego oznaczania interferonów typu I, oznaczania TNF alfa oraz badania oddziaływania białka Mal z białkiem Atg16L. Ten szeroki zakres stosowanych metod do rozwiązania postawionego celu pracy, ujawnia duży zakres prac eksperymentalnych.

Wyniki przedstawione są precyzyjnie i pokazują konsekwentne dążenie Doktorantki do rozwiązania kolejnych zadań badawczych. Dokumentacja każdego etapu przedstawiona jest precyzyjnie i uzupełniona dobrym komentarzem.

Cel pracy został osiągnięty. Przedstawione 5 wniosków wynika z przeprowadzonych doświadczeń.

Dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej. Jest dynamicznie i bardzo logicznie poprowadzona, jako konfrontacja osiągniętych wyników z danymi literaturowymi.

3. Uwagi krytyczne i sugestie.

Na nieliczne literówki i techniczne błędy redakcyjne np. wskazanie, że sekwencje zastosowanych starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów podano w rozdziale *Materiał i metody* punkt 5.1.4, a nie jak wynika to ze wskazania na str.48 w punkcie 5.1.3., należy spojrzeć jak na drobne niedoskonałości tego bardzo dobrego opracowania.

4. Podsumowanie.

Stwierdzam, że praca doktorska pt. „Wpływ białka adaptorowego Mal na odpowiedź antywirusową zależną od receptora Toll-podobnego 9” opracowana przez Panią mgr Joannę Zyzak, spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, a określone w art. 13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki



UNIwersytet
PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU

KATEDRA IMMUNOLOGII, PATOFIZJOLOGII I PREWENCJI WETERYNARYJNEJ

(Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej, ze względu na aktualność podjętego tematu, dobrze i konsekwentnie wykorzystany warsztat badawczy, zrealizowanie celów badawczych, interesującą, logiczną, dynamiczną dyskusję. Słowem, bardzo dobre przygotowanie i przedstawienie dysertacji. Argumentem „za” jest również fakt opublikowania części wyników badań w recenzowanym czasopiśmie oraz publikacja prac oryginalnych i przeglądowych o łącznym IF = 13,174.

Prof. dr hab. Wojciech Nowacki

