

Warszawa, 02.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdy Wąchalskiej

pt. „Udział białek komórkowych uczestniczących w hamowaniu prezentacji antygenów zależnym od białka UL49.5 bydlęcego herpeswirusa BHV-1”

(Participation of cellular proteins in the inhibition of antigen presentation dependent on UL49.5 protein of bovine herpesvirus BHV-1)

Powszechnie stosowaną strategią unikania reakcji immunologicznej jest kierowanie przez wirusy kluczowych molekuł obronnych i sygnałowych gospodarza do degradacji proteasomalnej przy użyciu ligaz ubikwityny (tzw. enzymy E3) wirusa lub gospodarza. Jednym z przykładów jest wirus opryszczki bydła 1 (BHV-1, BoHV-1), który może uniknąć odpowiedzi immunologicznej z udziałem limfocytów cytotoksycznych CD8+ poprzez indukcję degradacji transportera antygenowego TAP. Białka UL49.5 bydlęcego herpeswirusa 1 jest odpowiedzialne za ten proces, ale jego mechanizm pozostawał nieznany. Ponieważ UL49.5 nie posiada domeny charakterystycznej dla enzymów E3 przypuszcza się, że wykorzystuje ono maszynę systemu ubikwityna-proteasom gospodarza w celu usunięcia kompleksu TAP. Celem tej pracy była identyfikacja elementów komórkowych oraz mechanizmu działania UL49.5. Temat podjęty przez Autorkę jest ważny i aktualny, gdyż może pomóc w odkryciu czynników modulujących złożone relacje między gospodarzem a patogenem oraz nowych strategii interwencji ukierunkowanych na wczesne etapy infekcji wirusowej.

Część eksperymentalna doktoratu jest obszerna i bez wątplenia wymagała dużego nakładu pracy i umiejętności w zakresie biologii molekularnej i komórkowej. Doktorantka w wyczerpujący sposób zrealizowała cel pracy, jakim była identyfikacja czynników komórkowych, a w szczególności komponentów szlaku ubikwityna-proteasom zaangażowanych w degradację kompleksu TAP. Eksperymenty zostały zaplanowane bardzo starannie i błyskotliwie, wykorzystując aktualny stan wiedzy. Widoczna jest dbałość o stosowanie odpowiednich kontroli eksperymentów i wykorzystanie różnych metod oraz wnikliwą interpretację wyników. Doktorantka „swobodnie” porusza się w badanych zagadnieniach, czemu daje wyraz w rzetelnie poprowadzonej dyskusji.

Wyniki dysertacji stanowiły podstawę oryginalnego manuskryptu opublikowanego w czasopiśmie Cells, a Doktorantka jest jego pierwszą autorką. Dodatkowo, Autorka w czasie

pracy doktorskiej uczestniczyła w opracowaniu narzędzi oraz w badaniach nad rolą pęcherzyków pozakomórkowych w infekcji wirusowej. Rezultaty tej pracy również zostały opublikowane, a Doktorantka był odpowiednio pierwszą oraz współautorką.

Uwagi:

1. We wstępie teoretycznym zabrakło wprowadzenia i pogłębionej charakterystyki retikulum endoplazmatycznego, roli transportu peptydów antygenowych do tego organellum, opisu strategii DIVA, opisu degronów trzeciorzędowych oraz informacji nt miejsc oddziaływania UL49.5 z gM (przy okazji rys. 3.18).
2. Hipoteza postawiona w pracy doktorskiej opiera się na badaniach pokazujących proteasomalną degradację TAP. Zabrakło mi na początku części opisującej stworzony system eksperymentalny przedstawienia wyników (np. immunodetekcji), które walidowałyby to zjawisko. Mogłoby się wydarzyć, że Doktorantka nie potwierdziłaby tego zjawiska na etapie tworzenia własnego systemu i wtedy nasuwałoby się pytanie o zasadność przeprowadzenia wyciszenia panelu genów związanych z systemem ubikwityna-proteasom.
3. Nie znalazłem opisu bioinformatycznej analizy sekwencji za pomocą programu Geneious. Czy predykcje struktury drugorzędowej uzyskane za pomocą programu Geneious zostały również skonfrontowane z wynikami z innego programu/metody?
4. Czy była przeprowadzona normalizacja względem żywych komórek podczas analizy stabilności fluorescencyjnego modelu TAP w komórkach MJS podczas infekcji BoHV-1 (rys. 6.13)? Zmiany we fluorescencji mogłyby wynikać z faktu, że komórki umierają na skutek infekcji wirusem BoHV-1, i stąd widoczne są spadki fluorescencji EGFP, a nie dlatego, że wirus bezpośrednio oddziałuje z TAP.
5. Zabrakło przedstawienia potencjalnego mechanizmu tłumaczącego, dlaczego inhibitor VCP/p97 NMS-873 w obecności UL49.5 znacznie stabilizuje TAP (rys. 6.15A), a tylko nieznacznie MHC I (rys. 6.16A).
6. Wyciszenie ekspresji genów za pomocą siRNA i wysokoprzepustowego badania przesiewowego - w części wynikowej brakuje danych ilościowych otrzymanych z optymalizacji wyciszenia ekspresji genów oraz wybranych danych z badania

przesiewowego (poza zbiorczą analizą). Przydałaby się również statystyczna analiza jakości badania przesiewowego (m.in. obliczenie Z-factor). Zastanawiam się też, czy otrzymane wyniki „odbiegałyby” od potencjalnych wyników, gdyby zastosowano prostszą analizę w oparciu o oszacowanie całkowitej fluorescencji z dołka na czytniku płytek (znormalizowanej do ilości komórek) stosując jednorodną linię komórkową, a nie mieszaninę komórek MJS TAP2-GFP mCherryNLS oraz MJS TAP2-GFP UL49.5. Czy taka analiza była brana pod uwagę? Jakie byłyby potencjalne trudności związane z tak przeprowadzoną analizą? Zabrakło mi również opisu kryteriów selekcji do przesiewowego badania walidacyjnego w sekcji 6.2.4.

7. Podczas identyfikacji białek wchodzących w skład kompleksu z Rbx1 (rys. 6.24) oraz w badaniu oddziaływania UL49.5 z kuliną 2 (rys. 6.25) nie pokazano oddziaływania z TAP. Dlaczego nie sprawdzano interakcji z tym białkiem, skoro Doktorantka proponuje modelu kompleksu CRL2-UL49.5-TAP (rys. 6.29)? Czy w sytuacji, gdy Cul2 nie wiąże już UL49.5 (kompetycja ze strony gM), dochodzi do stabilizacji TAPów?

8. W przypadku analizy wpływu zahamowanej neddytacji i retrotranslokacji na stabilność podjednostki TAP1 i białka UL49.5 w warunkach zatrzymanej translacji białek (rys. 6.39) doktorantka napisała: „Zanotowano jedynie niewielki wzrost ilości UL49.5 pod wpływem inhibitora MLN4924 w porównaniu do znaczącego wzrostu ilości UL49.5 pod wpływem zahamowania retrotranslokacji, co może wskazywać na częściową degradację UL49.5 razem z kompleksem TAP oraz istnienie dodatkowo innej ligazy E3 zaangażowanej w degradację wolnego UL49.5 na drodze ERAD”. Zgadzam się z końcowym wnioskiem, jednakże w tym eksperymencie brakuje mi kwantyfikacji, która kinetyki degradacji UL49.5 w obecności inhibitora MLN4924 i NMS-873 przy zahamowanej translacji. W przypadku inhibitora MLN4924 mam wrażenie, że Doktorantka pisze o zmianie w kinetyce degradacji w porównaniu z kontrolą DMSO. Natomiast w przypadku inhibitora NMS-873 rzeczywiście następuje akumulacja UL49.5, ale degradacja wydaje się nadal zachodzić mimo zahamowanej retrotranslokacji. Zastanawia mnie również, czy Doktorantka porównywała kinetykę degradacji (przy zahamowanej translacji) UL49.5 i mutanta UL49.5^{AAAA}. Czy mutacja degonu mogłaby prowadzić do zwiększenia stabilności tego białka (na rys. 6.36 w lizacie widać, że UL49.5^{AAAA} ma większą stabilność)? W pracy zabrakło mi również poruszenia kwestii czy UL49.5 podlega ubikwitylacji oraz czy KLHDC3 degradowuje to białko?

9. Zabrakło informacji w całej części wynikowej rozprawy doktorskiej w jaki sposób przeprowadzone były analizy statystyczne, jaki był dobór testów, który determinował poziom istotności statystycznej, oraz co oznaczają słupki błędów na wykresach?

Pomimo tych uwag, wysoko oceniam jakość merytoryczną i estetykę (poza nieczytelnym rys. 6.38 oraz literówkami i błędami stylistycznymi) rozprawy doktorskiej mgr Magdy Wąchalskiej. Spełnia ona w pełni wymogi art. 187. ust. 1. i 2. Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.) w zakresie szerokiej wiedzy ogólnej doktoranta, umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, jak również przedmiotu rozprawy, którym jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przy zastosowaniu wyników własnych badań. Wnoszę o dopuszczenie mgr Magdę Wąchalską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Wojciech Pokrzywa
Laboratorium Metabolizmu Białek
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej
i Komórkowej w Warszawie
ul. Ks. Trojdena 4
02-109 Warszawa