



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Prof. dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 18.03.2021 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kocyły pt. „*Charakterystyka oddziaływania międzybiałkowego kompleksu koreceptora CD4 z kinazą tyrozynową Lck zależnego od jonów Zn²⁺*” (ang. *Zn²⁺-dependent CD4 coreceptor and Lck tyrosine kinase assembly*) wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężela na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje model badawczy heterodimeru dwóch białek z jonem cynku, będący przykładem tzw. „uścisku cynkowego”. Do badań wybrano układ związany z działaniem synapsy immunologicznej układu odpornościowego pomiędzy komórką prezentującą antygen (APC) a limfocytom T – dimeryczny kompleks koreceptora CD4 z kinazą tyrozynową Lck tworzony z udziałem Zn²⁺. Ten heterodimer Zn(CD4)(Lck) pełni istotną rolę w aktywacji oraz dojrzewaniu limfocytów T w odpowiedzi na antygeny prezentowane przez komórki APC. Badania prowadzono głównie dla uproszczonego modelu ww. kompleksu. Do swoich badań Pani mgr Anna Kocyła wybrała pierwszy zaproponowany w 2003 r. przez zespół Kim PW i wsp. model, otrzymany na podstawie analiz prowadzonych techniką spektroskopii NMR, opisujący tworzenie heterodimeru Zn(CD4)(Lck) przez 38-aminokwasowy fragment koreceptora CD4 oraz 29-aminokwasowy fragment N-końca kinazy tyrozynowej Lck. Dodatkowo był to pierwszy zidentyfikowany heterodimer, którego formowanie zależne jest od Zn²⁺, i który koordynowany jest przez cztery reszty cysteinyłowe, po dwie z każdej podjednostki białkowej. Pomimo wieloletnich lat badań nad wybranym kompleksem i jego funkcją biologiczną (co zostało wyczerpująco opisane w rozdziale *Wstęp*), opublikowane dotychczas prace bardzo pobieżnie traktowały aspekt udziału jonu Zn²⁺ w tworzeniu kompleksu, skupiając się raczej na metodyce typowej dla oddziaływań białko-białko i prostych doświadczeniach eliminacyjnych



wskazujących jedynie na znaczenie jonów tego metalu w oddziaływaniu. Dzięki wysoce specjalistycznemu i interdyscyplinarnemu warsztatowi zespołu, w którym realizowana była przedłożona rozprawa doktorska (Zakład Chemii Biologicznej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Artura Krężela), nacelowanemu na badania kompleksów białek z metalami, Pani mgr Anna Kocyla mogła zaplanować i wykonać imponujący wachlarz doświadczeń uzupełniających wiedzę na temat charakterystyki wybranego kompleksu i częściowo zweryfikować oraz poddać pod dyskusję wpływ zidentyfikowanych cech kompleksu i jego składników na funkcje biologiczne w kontekście roli synapsy immunologicznej APC-limfocyt T. Od strony warsztatu badacza, kompleksy białek z jonami metali wymagają szerokiej wiedzy i dbałości w tworzeniu protokołów doświadczeń, aby wyeliminować wszystkie czynniki mogące wypaczyć interpretację mierzonych parametrów, co w dużej mierze udało się w ocenianej pracy doktorskiej. Wybór technik i warunków eksperymentu brał pod uwagę wszystkie tego typu czynniki, m.in. konieczność rzetelnego pomiaru i utrzymania stężenia Zn^{2+} , potencjał redoks, zapewnienie warunków buforujących Zn^{2+} , wybranie technik analitycznych umożliwiających badanie powinowactwa rzędu nM, czy uwzględnienie w interpretacji danych możliwości tworzenia innych kompleksów, np. homodimerów.

W odniesieniu do opisanych trudności, na wyróżnienie zasługuje fakt, że w ocenianej pracy Pani mgr Anna Kocyla prowadziła swoje badania zaczynając od prostych doświadczeń miareczkowania składników kompleksu jonami Zn^{2+} po złożone układy modelowe typu LUV i GUV, aż po model *in vitro* oparty na komórkach Jurkat ekspresjonujących różne warianty badanych składników kompleksu. Pracę na tak szerokiej gamie modeli umożliwiła jej biegłość w tworzeniu narzędzi analitycznych niezbędnych do rejestracji i obserwacji zjawisk biologicznych przy użyciu metod spektrofotometrycznych, dichroizmu kołowego, kompetycyjnego miareczkowania, FRET, FLIM-FRET, czy kombinacji technik FACS i FRET. Dla realizacji założonych celów pracy doktorskiej, mgr Anna Kocyla przygotowała serię mutantów strukturalnych fragmentu CD4 (w zakresie długości fragmentu i mutacji w obrębie reszt C) i modyfikacji Lck, łącząc warianty otrzymanych białek ze znacznikami fluorescencyjnymi lub metkami funkcjonalnymi umożliwiającymi badanie ich w kilku różnych układach modelowych.



Razem w badaniach wykorzystano 19 różnych cząsteczek, co przedstawiono w Tabeli 3 rozdziału *Materiały i Metody*. Pomimo śledzenia w badaniach wcześniej opisanych w literaturze obserwacji dla kompleksu CD4 i Lck, takich jak, tworzenie kompleksu CD4(Lck)Zn²⁺ wraz z jego strukturą i identyfikacją elementów strukturalnych odpowiedzialnych za wiązanie jonu Zn²⁺, modulujące właściwości dimeru i monomeru CD4 na aktywację limfocytu T poprzez oddziaływanie APC-TCR, dimeryzacja Lck, czy zależna od Zn²⁺ palmitylacja Lck, te istotne biologicznie zjawiska zostały w ocenianej pracy po raz pierwszy gruntownie scharakteryzowane z wykorzystaniem precyzyjnych metod dedykowanych badaniom kompleksów białek z metalami.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska to bogato ilustrowane, obejmujące 153 str., anglojęzyczne opracowanie aktualnego stanu wiedzy w odniesieniu do uzyskanych wyników wraz z ich dyskusją. Praca doktorska charakteryzuje się prawidłowym układem, w którym wyróżniono *Streszczenie*, *Listę Skrótów*, *Wstęp*, *Cele Pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, i *Dyskusję*, *Załącznik* prezentujący dodatkowe wyniki oraz *Spis cytowanego piśmiennictwa*. Dodatkowo w opracowaniu znajdziemy spis publikacji pani mgr Anny Kocyły obejmujący na dzień. 05.01.2020 r. wyróżniający dorobek 7 anglojęzycznych publikacji, gdzie w 5 z nich Doktorantka jest pierwszym autorem oraz wskazanie na źródła finansowania wykonanych badań. Należy podkreślić, że z 3 grantów NCN wspierających realizację przedłożonej do oceny pracy doktorskiej, Pani mgr Anna Kocyła była kierownikiem dwóch grantów otrzymanych w ramach konkursów PRELUDIUM i ETIUDA, gdzie ostatni uwzględniał współpracę międzynarodową z ośrodkiem naukowym w Niemczech.

W odniesieniu do ww. rozdziałów w pracy, wszystkie z nich czyta się z ciekawością i niosą one duży ładunek informacji ze wskazaniem kluczowych źródeł literaturowych nie tylko z zakresu biochemii kompleksów białek z metalami, ale również immunologii (m.in. *Wstęp* i *Dyskusja*). W odniesieniu do *Wstępu*, zauważono drobne braki techniczne - niektóre skróty mają swoje rozwinięcie jedynie na liście skrótów (np. ZIP, ZnT). Kilka niedociągnięć zauważono w rozdziale *Materiały i Metody* – opisując linie komórkową Jurkat powinno się przytoczyć jej numer kolekcyjny, brakuje też charakterystyki przeciwciał użytych jako cząsteczki do stymulacji komórek Jurkat poprzez receptory CD3 i CD28. W tym zakresie użyto bardzo lakonicznego opisu



i skrótu typu CD28. Dodatkowo w rozdziale 3.2.25 pominięto wykorzystanie przeciwciał anti-CD3, które wynika jedynie z opisu do Ryc. 42 *Wyników*. W tym miejscu recenzji proszę Doktorantkę o przywołanie publikacji wskazującej na wpływ takiej stymulacji na zachowanie CD4 i Lck oraz poddanie pod dyskusję wad i zalet takiego modelu *in vitro*. Cele pracy zostały precyzyjnie wskazane, a następnie konsekwentnie realizowane. Rozdział *Wyniki* wyczerpująco przedstawia omawiane dane w postaci wielu rycin i czytelnych tabel. Ułatwieniem dla czytającego byłoby rozpoczęcie go od podsumowania różnych wariantów składników badanego kompleksu otrzymanych na potrzeby realizacji opisywanych dalej doświadczeń wraz z wprowadzeniem skrótów wyjaśnionych w Tabeli 3 *Materiałów i Metod*. W tej części praca dostarcza wielu oryginalnych wyników dotyczących: (i) potwierdzenia postulowanej przez twórców modelu stechiometrii składników Zn(CD4wt)(Lck) i powinowactwa jonów Zn²⁺; (ii) potwierdzenia możliwości tworzenia monomeru Zn(CD4wt), (iii) wykazania specyficzności badanych oddziaływań, (iv) wykazania zależności pZn^{0,5} od stężenia peptydowych składników i jonów Zn²⁺, (v) w rzetelnych badaniach z wykorzystaniem technik odpowiednich do obserwacji udziału Zn²⁺ w tworzeniu ZPPI, zidentyfikowano cechy strukturalne wpływające na stabilność i specyficzność oddziaływania peptydów CD4wt i Lck oraz jonów Zn²⁺ wykorzystując bogaty repertuar modyfikowanych peptydów CD4 w zakresie ich długości (eliminacja motywów RRR i α -helisy) oraz mutacje punktowe reszt cysteiny i histydyny spoza motywu wiążącego jony Zn²⁺; (vi) ustalono negatywny wpływ palmitylacji reszt C³⁹⁴ i C³⁹⁷ na stabilność i strukturę kompleksu; (vii) uzupełniono charakterystykę kompleksu transferazy palmitylowej DHHC21 (element szlaków sygnałowych aktywowanych w limfocytach T) w zakresie pomiaru jej oddziaływań z Zn²⁺; (viii) scharakteryzowano badany model uścisku cynkowego w warunkach kontrolowanych zmian w stężeniu jonów Zn²⁺; (ix) poszerzono zakres obserwacji oddziaływań o bardziej złożone układy modelujące struktury błon komórkowych, LUV i GUV, wykazując większą użyteczność GUV do badania opisywanych zjawisk i potwierdzając, że badany układ zachowuje swoje możliwości funkcjonalne również w bardziej złożonych systemach; (x) z sukcesem przeniesiono część obserwacji dla wybranego modelu na układ *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej Jurkat – popularny model do badań szlaków sygnałowych aktywowanych w limfocytach T; na



koniec (xi) proponując na przykładzie badań motywu uścisku cynkowego optymalne użyteczne biotechnologicznie narzędzia do badań zależnej od Zn^{2+} , odwracalnej i specyficznej, heterodimeryzacji białek. W konsekwencji wyznaczono stałe stabilności K^{12} , która dla heterokompleksu uścisku cynkowego wynosiła $1 \cdot 10^{19} M^{-2}$. Ponadto w badaniach wykazano, że parametrami wpływającymi na formowanie się dimerycznych kompleksów z udziałem Zn^{2+} są zarówno stężenia Zn^{2+} , jak i podjednostek białkowych, co odróżnia tego typu kompleksy od często badanych układów Zn^{2+} -białko. Kluczowe wyniki opisano w *Streszczeniu* oraz przedyskutowano w szerokim kontekście w rozdziale *Dyskusja*. Jakość zaprezentowanych wyników podpartą bogatym opracowaniem danych pomiarowych, ich kompleksowość, komplementarność i poddanie krytycznej dyskusji oceniam bardzo wysoko. Wyróżniające jest zaplanowanie tych badań w schemacie korzystania z modeli o wzrastającym poziomie trudności interpretacji wyników, co zostało bardzo dobrze omówione w *Dyskusji*. Rolą recenzenta poza wskazaniem oryginalnych osiągnięć pracy doktorskiej, jest również wskazanie niedociągnięć, których korekta powinna być uwzględniona przy redagowaniu kluczowego manuskryptu(ów) opartego o przedłożoną do oceny pracę doktorską. Sama redakcja *Wyników* ma drobne wady – kilka podrozdziałów rozpoczynają opisy teoretyczne modeli, czy też podstaw dla używanych technik lub szersza dyskusja wyników. Te fragmenty tekstu powinny znaleźć się w rozdziale *Wstęp* lub *Dyskusja*. Przykładem jest początek rozdziału 4.1, który w pewnym sensie ponownie opisuje wybrany model $CD4(Lck)Zn^{2+}$ powtarzając w dużej części Ryc. 7 i jej opis ze *Wstępu*. Podobne opisy dotyczą rozdziału 4.2, 4.5, 4.6, 4.7 i 4.8. Jak wcześniej wspomniano, zamiast elementów wstępu w rozdziale 4.1 *Wyników*, bardziej użyteczne byłoby przedstawianie wariantów peptydów otrzymanych na potrzeby pracy. Dla części wyników nie wykonano serii powtórzeń, co powinno się przełożyć na wartości rozrzutów (np. Ryc. 21, 22, 23, 25, 26 i inne). Autorka często używa w takich przypadkach wyrażenia „przykładowe” wyniki, co sugeruje, że wykonywała te doświadczenia w kilku powtórzeniach, a mierzone wartości nie wpływały na wyciągane wnioski dotyczące stechiometrii, czy powinowactwa. Natrafiono na pewne rozbieżności we wskazaniu długości fali użytej do pomiarów przedstawionych na Ryc. 21 – w tekście, legendzie do ryciny i wykresie pojawiają się trzy różne wartości: 618, 610 i 620 nm dla



kompleksu Zn(ZI) – proszę o wyjaśnienie rozbieżności. W legendzie do Ryc. 22 powinna pojawić się informacja, że peptydy CD4(FAM) i Lck(TAMRA) zostały użyte w stosunku 1:1. Ze względu na pokrywanie się krzywej miareczkowania dla peptydu CD4short na Ryc. 24A, proszę o informację jak przebiegała ta krzywa. Czy interpretacja wyników podana w zdaniu cyt.: „The Lck, CD4short and CD4helix forms Zn²⁺ complexes weaker than Zn(PAR)₂, and therefore inflection points are not evident (Fig. 24B)” (str. 73) nie jest błędna w odniesieniu do kompleksu Zn(Lck) skoro 220 nm nie jest optymalną długością fali do śledzenia tego typu kompleksów (Patrz Ryc. 21B)? Ryc. 23 wprowadza spore zamieszanie w interpretacji wyników, poprzez błędną numerację reszt aminokwasowych dla fragmentu CD4, odbiegającą od numeracji użytej na Ryc. 7 i numeracji przywoływanej we wstępie do rozdziału 4.1, jak również tej przy omawianiu strategii dla badań wpływu palimitylacji reszt C³⁹⁴ i C³⁹⁷ i ich dalszym omawianiu w *Dyskusji*. Czy nie byłoby zasadne uwzględnić w schemacie doświadczenia peptyd mutCD4 z jednoczesną modyfikacją C³⁹⁷, H³⁹⁹ i H⁴²⁶? Zastanawiają wyraźnie większe rozrzuty dla pomiarów żywotności komórek w 8 dniu hodowli komórek Jurkat w obecności antybiotyku (Ryc. 36C)? Wydaje się, że zdjęcia przedstawione na Ryc. 38 zostały wykonane z różnym powiększeniem (patrz panel Jurkat Lck+ vs Lck(12Ala), co powinno być zaznaczone na fotografii. Ponieważ stymulacja różnych wariantów komórek opisana na Ryc. 42 wymagała użycia przeciwciał anti-CD3 i CD28 jako cząsteczek stymulujących zmiany konformacyjne domen wewnątrzkomórkowych, dla pewności równego poziomu ekspresji tych receptorów, a tym samym porównywalnych warunków stymulacji, powinny być wykonane doświadczenia kontrolne FACS ze znakowaniem komórek anti-CD3 i -CD28. W rozdziale wyniki zidentyfikowano Ryciny, które zostały wcześniej w całości lub częściowo opublikowane w pracy *Kocyla i Krężel, Chemical Communications 2018: 96*, co wymagało odpowiedniego cytowania (Ryc. 45, 44, 43, 47, 48). Uwaga dotyczy również strony 111 *Dyskusji*.

W podsumowaniu wysoko oceniam jakość i oryginalność uzyskanych wyników, których znaczenia dla rozwoju dyscypliny nie umniejszają nieliczne uchybienia merytoryczne lub techniczne opisane powyżej. Potwierdzam, że cel pracy został osiągnięty, a praca wnosi oryginalny i istotny wkład w wiedzę o kompleksie CD4(Lck)Zn²⁺ i jego wariantach w kontekście



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

zastosowanych prostych i złożonych modeli doświadczalnych. Autorka uzyskała wysokiej jakości wyniki dzięki połączeniu nowoczesnych i miarodajnych metod oraz dużego wkładu pracy w przygotowanie narzędzi analitycznych, co czyni tę pracę przykładem wysokiej jakości badań na styku kilku dyscyplin: nauk chemicznych, biologicznych i po części medycznych, jeśli weźmie się pod uwagę kontekst funkcjonalny oddziaływania CD4 i Lck.

Podsumowując, rozprawa doktorska odpowiada ustawowo określonym warunkom określonym dla stopni naukowych. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej i dorobek naukowy Autorki ściśle związany z jej realizacją, wnoszę o przyjęcie ocenianej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Anny Kocyły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na względzie znaczenie, szeroki zakres, nowatorski charakter i jakość otrzymanych wyników, które gwarantują ich opublikowanie w wysokiej rangi czasopismach o zasięgu międzynarodowym, składam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

Prof. dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz