



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 10.10.2022

Recenzja pracy doktorskiej mgra Macieja Prusinowskiego zatytułowanej „Konstrukcja bioaktywnych rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin oraz ich wariantów fuzyjnych i delecyjnych dedykowanych do badań nad funkcjonalnością kompleksów telomerowych”

Praca doktorska mgra Macieja Prusinowskiego została wykonana w Pracowni Inżynierii Genetycznej, Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Piotr Skowron, a promotorem pomocniczym dr Daria Kreft. Grupa badawcza prof. Piotra Skowrona jest jedną z najlepszych grup w Polsce zajmujących się nadekspresją i oczyszczaniem białek w układach prokariotycznych. Praca doktorska obejmuje właśnie, jak to ujęto w celu pracy, nadekspresję ludzkich białek kompleksu Shelterin – hTRF1, hTRF2 i ich domen wiążących telomerowy DNA Myb1 i Myb2, a także badania nad tym czy uzyskane białkowe preparaty oddziałują ze sobą, co prowadziłyby do rekonstrukcji kompleksu, a także z telomerowym DNA. W mojej opinii, po zapoznaniu się z wynikami pracy doktorskiej stwierdzam, że cele postawione w pracy doktorskiej zostały osiągnięte.

Kompleks Shelterin pełni funkcje ochronne w stosunku do sekwencji telomerów znajdujących się na końcach chromosomów i pełniących funkcje ochronne w stosunku do poprawności przekazu informacji genetycznej w następnych pokoleniach. Kompleks ten zbudowany jest u człowieka z następujących białek: hTRF1, hTRF2, TIN2, POT1, TPP1 i Rap1. Do wytworzenia pełnego kompleksu nie jest wymagana interakcja z telomerowym DNA. Shelterin wiąże się zarówno z dwuniciowym jak i jednoniciowym telomerowym DNA, a wiązanie to nie wykazuje kooperatywności. Kompleks Shelterin oddziałuje ponadto z innymi kompleksami/białkami, pełniącymi funkcje pomocnicze lub poszerzające funkcjonalny zakres działania multikompleksu. Takimi białkami są tankyryza I czy nukleaza Apollo/SMNIB. Wiadomym jest powszechnie, że telomerowy DNA oraz rybonukleoproteina telomeraza stoją na straży prawidłowych podziałów komórkowych lecz gdy ta ostatnia ulega ekspresji w niepożądanych komórkach, staje się przyczyną procesów nowotworzenia. Zauważono również, że zaburzenia w ekspresji komponentów kompleksu Shelterin, a także ich mutacje, są widoczne w przypadku różnych chorób nowotworowych. Stąd coraz częściej sięga się w walce z chorobami nowotworowymi po białka kompleksu Shelterin jako potencjalnych celów terapii przeciwnowotworowych.

Zatem opracowanie metod nadekspresji genów kompleksu Shelterin i badanie *in vitro* ich oddziaływań, a także wiązania z telomerowym DNA uważam za ważne i zasadne z punktu widzenia badań podstawowych jak i prowadzenia prac nad nowymi terapiami nowotworowymi, szczególnie celowanych na poszukiwanie ligandów wiążących komponenty kompleksu.



Praca rozpoczyna się obszernym wstępem omawiającym budowę i funkcje kompleksu Shelterin i sukcesy/porażki terapii przeciwnowotworowych wykorzystujących jako cel działania telomerazę i kompleks Shelterin. Ponadto wstęp zawiera wprowadzenie w techniki nadekspresji białek z wykorzystaniem różnych etykiet pozwalających na dokładniejsze oczyszczenie nadeksprymowanego białka takich jak His-tag, Ub (ubikwityna) i etykieta Fh8, które Kandydat w swojej pracy stosował. Po wstępie znajduje się obszerny rozdział dotyczący materiałów i metod, ciekawy jest zwłaszcza fragment poświęcony technice badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym – technologia BLITZ wykorzystująca interferometrię warstw biologicznych. Można nią badać oddziaływanie białko-białko jak i białko – DNA, a także wyznaczać stała wiązania (K_d) wiązań między cząsteczkami biologicznymi.

Nietypowo część opisująca wyniki została połączona z dyskusją. W tym przypadku jednak ma to swoje uzasadnienie, gdyż praca jest w dużej mierze metodyczna, opisująca krok po kroku optymalizację procedur uzyskania białek hTRF1, hTRF2 (z i bez etykiet) oraz domen Myb1 i Myb2 (również z i bez etykiet). W części tej nie dało się również uniknąć opisu zoptymalizowanych procedur, które pewnie bardziej pasują do części Materiały i Metody ale w pracy metodycznej jak najbardziej muszą znaleźć się w części wynikowej. Kandydatowi udało się z powodzeniem uzyskać pełne warianty hTRF1 i hTRF2 w wariantach wolnych od etykiet, a także z nieusuwalną etykietą His, a także domen Myb1 i Myb2 w tej samej konfiguracji. Warto nadmienić, że białka hTRF1 i hTRF2 zostały uzyskane z dwoma etykietami Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His. Po procesie bardzo skutecznego oczyszczania usuwano etykiety Fh8 i His metodami enzymatycznymi przy wykorzystaniu proteazy Tev i karboksypeptydazy A, a następnie uwolnione białko oczyszczano przy pomocy chromatografii powinowactwa i metodą sączenia molekularnego. Warto nadmienić, że do usuwania etykiety Fh8 zastosowano komercyjną proteazę TeV jak i rekombinowaną, uzyskaną w ramach niniejszej pracy. Własnoręcznie wyprodukowana proteza Tev okazała się wydajniejsza od komercyjnej. Szkoda, że tych wyników nie pokazano w pracy, bo to przecież musiał być duży wysiłek i nakład pracy Kandydata by uzyskać te dane. Podsumowując ten rozdział nadekspresji i oczyszczania wybranych białek kompleksu Shelterin Kandydatowi udało się uzyskać wysoce homogeny i wolny od proteaz preparat hTRF1 i hTRF2. Udało się uzyskać 1,74 mg hTRF1 i 2,28 mg hTRF2 z około 4,5g osadu bakteryjnego co jest bardzo dobrym wynikiem.

Następnie przystąpiono do nadekspresji wariantów delecyjnych białek hTRF1/2, czyli domen Myb1 i Myb w fuzji z etykietą His i domeną Ub (ubikwityny) na N-końcu, ułatwiająca zwijanie białka. Tę etykietę można odciąć stosując proteazę UBPD2C, co zostało opracowane w Katedrze Biotechnologii Molekularnej. Odcinanie etykiet było przeprowadzane poprzez zastosowanie proteazy UBPD2C, która usuwała His_Ub z nadeksprymowanych Myb1 i Myb2, co zostało potwierdzone z zastosowaniem przeciwciał anti His-HRP po oczyszczeniu preparatu i po zastosowaniu chromatografii powinowactwa. Tożsamość uzyskanych białek potwierdzono również stosując monoklonalne przeciwciała anti-TRF1 i anti-TRF2. Ostatecznie udało się uzyskać 6,56 mg białka Myb1 i 8,7 mg białka Myb2 z około 6g biomasy bakteryjnej co uważam za bardzo dobry wynik.



W kolejnym etapie uzyskano preparaty Myb1 i Myb2 z nieusuwalną etykieta His na N-końcu nadprodukowanych białek. Celem było sprawdzenie, czy uda się uzyskać duże ilości poprawnie zwiniętego białka bez konieczności dodawania domeny Ub, a także by sprawdzić, czy etykieta His wpływa na parametry wiązania domen Myb1/2 z DNA telomerowym czy nie. Nadprodukowane białka oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa i uzyskano 4,75 mg His_Myb1 i 4,52 mg His_Myb2 z około 1,5 g biomasy bakteryjnej co jest wynikiem znakomitym.

Analogiczne doświadczenia wykonano w celu uzyskania białek hTRF1/2 z nieusuwalną etykieta His na końcu N. W tym wypadku wydajność uzyskania oczyszczonego białka nie była już tak dobra i wyniosła 1,-7 mg dla His_hTRF1 i 0,63 mg dla His_hTRF2 z około 6,5 g biomasy bakteryjnej. Czym można uzasadnić niską wydajność uzyskania pełnych białek hTRF1/2?

W dalszej części pracy następuje najciekawszy rozdział dotyczący analizy interakcji prowadzonych *in vitro* między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a telomerowym DNA. Już wstępne badania wykazały, że Myb1/His_Myb1, Myb2/His_Myb2, hTRF1 i hTRF2 wiążą się z liniowym dsDNA plazmidowym pUC19_s2 zawierającym 2 powtórzenia telomerowe. Z doświadczeń EMSA wynika, że etykieta His nie ma raczej wpływu na oddziaływanie białek z telomerowym DNA. Najlepsze wyniki uzyskano dla delecyjnych form Myb1 i Myb2. Szkoda, że doświadczenia te nie zostały przeprowadzone przy wzrastających ilościach podawanego białka, a także w obecności kompetytora jakim jest DNA niezawierający telomerów. Rozumiem, że kompleks Shelterin wiąże się też słabo z nietelomerowym DNA i „ślizga” wzdłuż DNA poszukując telomerów ale wysoką specyficznosc wiązania można by obserwować właśnie dodając wzrastające stężenia takiego kompetytora. Jestem ciekawa zdania Pana Prusinowskiego na ten temat. Dalej wykonano doświadczenia typu EMSA w obecności peptydów TIN i Apollo. Wyniki wykazały, że wpływ peptydów TIN i Apollo na poprawę oddziaływań białek hTRF1/2 i Myb1/2 z ds. DNA jest znikomy, niezależnie od długości zastosowanego DNA, zawsze zawierającego 2 powtórzenia sekwencji telomerowej. Analiza oddziaływań badanych białek z dsDNA niezawierającym 2 powtórzeń telomerowych wykazała, że najsilniej wiąże się z nim Myb2, a gdy porównać wiązanie Myb2 z DNA zawierającym telomery – to to pierwsze jest nieco słabsze. Czy można stąd wysnuć konkluzje tego typu, że to białko hTRF2 odpowiada za przyłączenie się kompleksu Shelterin do DNA i ślizg wzdłuż cząsteczki w poszukiwaniu telomerów?

Wreszcie badanie oddziaływań przeprowadzono z wykorzystaniem ciekawej, całkowicie nowej dla mnie technologii BLItz, w której badane białka kompleksu Shelterin zawierające etykieta His były immobilizowane na selektywnym biosensorze HISIK. Obserwowano zmiany wiązania w czasie rzeczywistym w etapach asocjacji i dysocjacji po dodaniu telomerowego DNA. Do immobilizowanych wszystkich wariantów nadprodukowanych białek przyłączano dsDNA zawierający lub nie dwa powtórzenia telomerów. Uzyskano wynik wskazujący na wiązanie się białek z dsDNA zawierającym telomery. Zaobserwowano również szybkie tempo asocjacji użytego DNA i wolne tempo dysocjacji przyłożonego DNA. Na podstawie pomiarów wyznaczono również stałą wiązania. Oznaczone stałe wiązania dla His_Myb1 i His_Myb2 było na poziomie nanomolarnym co jest zgodne z literaturą i



świadczą one o dużej sile oddziaływania rekombinowanych białek z DNA zawierającym telomerowe powtórzenia, lecz w tym przypadku liniowy plazmid zawierał 126 powtórzeń telomerowego DNA. Bardzo podobnie wypadły pomiary stałej wiązania dla białek His_hTRF1 i His_hTRF2 - również w zakresie nanomolarnym co świadczy o dużej sile oddziaływania z telomerowym DNA.

Przeanalizowano również oddziaływania pomiędzy badanymi białkami kompleksu Shelterin a biotynylowanymi peptydami biot-TIN i biot-Apollo. Pełne warianty białek His_hTRF1/2 silnie wiązały się z peptydem biot-TIN, a wyznaczona dla tych oddziaływań stała wiązania była w zakresie odpowiednio piko- i nanomolarnym co świadczy o bardzo silnym wiązaniu tych białek do peptydu TIN. W przypadku peptydu Apollo wykazano brak wiązania się z His_hTRF1, natomiast bardzo silne wiązanie (stała wiązania w zakresie pikomolarnym) wykryto dla His_hTRF2.

Opisane powyżej badania świadczą o uzyskaniu przez mgra Prusinowskiego bioaktywnych, rekombinowanych komponentów kompleksu Shelterin, zdolnych do wiązania się z telomerowym DNA i z białkami pomocniczymi. Miałabym tutaj pytania do Doktoranta, mianowicie co wiadomo na temat potranslacyjnych modyfikacji białek hTRF1 i hTRF2? Czy sądzi Pan, że mogłyby one grać istotną rolę w funkcjonowaniu kompleksu Shelterin? Z kolei drugie pytanie dotyczy wiązania się kompleksu Shelterin z jednoniciowym DNA telomerowym. Czy planuje Pan tego typu badania i jak można by je przeprowadzić? Praca jest zasadniczo napisana dobrym językiem i zrozumiale choć Autor nie ustrzegł się pewnych żargonowych, niejasnych określeń i literówek. Z tych ostatnich wymienię te przy których się uśmiechnęłam, mianowicie „kukumina” zamiast „kurkumina” (Ryc.4) i „toponina C” zamiast „troponina C” (str.41).

Co do niezręczności przytoczę zdanie „G4 powstaje w wyniku parowania się zasad wodorowych” czy też „Szybkość skracania telomerów różni się w zależności od typu komórek i waha się od 15 do 200 pz na każde podwojenie.” Czy wreszcie „Gemcytabina powoduje ścieranie telomerów...”. Ponadto w tekście do opisu wirusa TEV zastosowano pełną nazwę „wirus trawienia tytoniu” podczas gdy jest to wirus wżerkowej plamistości tytoniu.

Przedstawiona rozprawa wymagała od Doktoranta bardzo dużego nakładu pracy, zoptymalizowanie procedur uzyskiwania pełnych i aktywnych białek eukariotycznych w układach bakteryjnych jest nie lada wyzwaniem i niezaprzeczalnie Pan mgr Prusinowski sprostał temu wyzwaniu i jest obecnie bardzo doświadczony gdy chodzi o nadprodukcję białek, ich oczyszczanie, a także badanie ich wiązania z różnymi ligandami. Potwierdzenie *in vitro* oddziaływań mających miejsce *in vivo* uważam za bardzo ważne dokonanie, pozwalające na przystąpienie do dalszych badań nad rekonstrukcją kompleksu Shelterin. W mojej opinii praca wnosi wiele nowości naukowych w obszary nauk chemicznych i wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgra Macieja Prusinowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia Szweykowska-Kulińska