

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Maciej Prusinowski

Konstrukcja bioaktywnych rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin oraz ich wariantów fuzyjnych i delecyjnych dedykowanych do badań nad funkcjonalnością kompleksów telomerowych

Promotor:

prof. dr hab. Piotr Skowron

Promotor pomocniczy:

dr Daria Krefft

Praca doktorska wykonana w Pracowni Inżynierii Genetycznej, Katedrze Biotechnologii Molekularnej

Gdańsk 2022

SPIS TREŚCI

1. Cel Pracy	6
2. Streszczenie.....	7
3. Wstęp Teoretyczny	10
3. 1. Budowa, właściwości, funkcje i rola telomerów w organizmach	10
3. 2. Jak telomeraza wydłuża końce chromosomów	14
3. 3. Kompleks białek Shelterin ochraniający końce chromosomów.....	16
3.3.1. Czynniki pomocnicze kompleksu Shelterin	20
3. 4. Znaczenie telomerazy w chorobach nowotworowych	23
3. 5. Znaczenie kompleksu Shelterin w chorobach nowotworowych	24
3. 6. Strategie zwalczające nowotwory poprzez celowanie w komponenty telomerowe	26
3.6.1. Inhibitory telomerazy	26
3.6.2. Inhibitory białek kompleksu Shelterin	28
3. 7. Kooperyjne właściwości białek i procesy ich oczyszczania.....	29
3.7.1. Etykieta polihistydynowa (His).....	38
3.7.2. Etykiety oparte na homologach ubikwityny.....	39
3.7.3. Etykieta Fh8	40
4. Materiały i Metody.....	44
4.1. Materiały podstawowe i sprzęt.....	44
4.2. DNA	46
4.3. Pożywki i podłoża bakteryjne	47
4.4. Hodowle bakteryjne	48
4.4.1. Szczypty bakterii	48
4.4.2. Antybiotyki	49
4.4.3. Hodowle na podłożu stałym.....	49
4.4.4. Hodowle w pożywce płynnej	49
4.5. Transformowanie komórek bakterii plazmidowym DNA.....	50
4.5.1. Przygotowanie elektrokompetentnych komórek <i>Escherichia coli</i>	50
4.5.2. Przygotowanie komórek chemikompententnych DMSO/PEG <i>Escherichia coli</i> ..	50
4.5.3. Transformacja komórek bakteryjnych przy pomocy metody elektroporacji	51
4.5.4. Transformacja komórek chemikompententnych PEG/DMSO	51
4.6. Izolowanie DNA plazmidowego.....	52
4.7. Trawienie endonukleazami restrykcyjnymi	52
4.8. Reakcja Łańcuchowa Polimerazy – PCR (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	53
4.9. Mutageneza ukierunkowana.....	55
4.10. Reakcja ligacji DNA	57
4.11. Sekwencjonowanie DNA	58

4.12.	Oczyszczanie DNA plazmidowego po reakcjach enzymatycznych.....	58
4.12.1.	Oczyszczanie DNA metodą ekstrakcji fenol/chloroform.....	58
4.12.2.	Oczyszczanie DNA przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów.....	58
4.13.	Precypitacja DNA	59
4.14.	Izolowanie DNA z żeli agarozowych.....	59
4.14.1.	Izolowanie DNA metodą elektroelucji.....	59
4.14.2.	Izolowanie DNA przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów.....	59
4.15.	Oznaczenia stężenia i czystości DNA metodą spektrometryczną.....	60
4.16.	Elektroforeza agarozowa DNA/ DNA-białko	60
4.17.	Elektroforeza kompleksów białko-DNA w żelu poliakryloamidowym.....	61
4.18.	Elektroforeza poliakryloamidowa białek w warunkach denaturujących.....	63
4.18.1.	Elektroforeza SDS-PAGE.....	63
4.18.2.	Elektroforeza TRIS-TRICINE-SDS.....	65
4.19.	Liza komórek bakteryjnych.....	67
4.20.	Dializa	68
4.21.	Zagęszczanie preparatów białkowych za pomocą siły osrodkowej	68
4.22.	Ultrafiltracja	69
4.23.	Immunodetekcja białek metodą Western Blotting	69
4.24.	Fracjonowane strącanie białek siarczanem amonu	71
4.25.	Oznaczanie stężenia białek metodą densytometryczną.....	72
4.26.	Trawienie białek proteazami	72
4.27.	Chromatograficzne oczyszczanie białek	73
4.27.1.	Złoża chromatograficzne.....	75
4.27.2.	Bufory chromatograficzne	76
4.27.3.	Oczyszczanie rekombinantowych białek Fh8_hTRF1_His, Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii powinowactwa	77
4.27.4.	Oczyszczanie rekombinantowego białka Fh8_hTRF1_His za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych	77
4.27.5.	Oczyszczanie rekombinantowego białka Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych	77
4.27.6.	Oczyszczanie rekombinantowych białek hTRF1, hTRF2 za pomocą chromatografii wykluczania.....	78
4.27.7.	Oczyszczanie rekombinantowych białek His_Ub_Myb1, His_Ub_Myb2 za pomocą chromatografii powinowactwa	78
4.27.8.	Oczyszczanie rekombinantowych białek His_Myb1, His_Myb2 za pomocą chromatografii powinowactwa.....	78
4.27.9.	Oczyszczanie rekombinantowych białek His_hTRF1, His_hTRF2 za pomocą chromatografii powinowactwa.....	79
4.27.10.	Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii powinowactwa	79

4.27.11. Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii wykluczania	79
4.28. Badania potwierdzające właściwości natywne wiązania telomerowego DNA przez rekombinantowe białka kompleksu Shelterin	79
4.28.1. Metoda pomiaru przesunięcia mobilności w elektroforezie żelowej - EMSA (ang. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	79
4.28.2. Technologia BLItz wykorzystująca interferometrię biowarstw	80
4.29. Chemiczna synteza peptydów	84
5. Wyniki i Dyskusja.....	85
5.1. Preparatyka wybranych białek telomerowych z ludzkiego kompleksu Shelterin chroniącego końce chromosomów, wykazujących oddziaływanie z telomerowym dsDNA..	85
5.1.1. Uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 hTRF2 w fuzji z domeną Fh8 na N- końcu oraz etykietą His na C- końcu	87
5.1.2. Uzyskanie wariantów delecyjnych białek hTRF1 i hTRF2 – Myb1 i Myb2 w fuzji z domeną Ub na N- końcu.....	110
5.1.3. Uzyskanie wariantów delecyjnych hTRF1 i hTRF2 – Myb1 i Myb2 w fuzji z nieusuwalną etykietą His na N- końcu.....	118
5.1.4. Uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 w fuzji z nieusuwalną etykietą His na N- końcu.....	121
5.2. Preparatyka bioaktywnej rekombinantowej proteazy TEV.....	123
5.3. Analiza <i>in vitro</i> interakcji między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a telomerowym DNA.....	127
5.3.1. Pomiar oddziaływań pomiędzy białkami z ludzkiego kompleksu Shelterin i telomerowym dsDNA wykonany przy użyciu testu EMSA	129
5.3.2. Pomiar oddziaływań pomiędzy białkami z ludzkiego kompleksu Shelterin i telomerowym dsDNA wykonany przy użyciu technologii BLItz.....	145
5.4. Analiza <i>in vitro</i> interakcji między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a peptydami TIN i Apollo.....	152
6. Podsumowanie	157
7. Literatura.....	163
8. Wykaz stosowanych skrótów	168

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi prof. dr hab. Piotrowi Skowronowi za możliwość rozwijania swoich umiejętności w szeroko pojętej biotechnologii oraz inżynierii genetycznej. Dziękuję za przekazaną wiedzę, poświęcony mi czas, nakreślenie strategii w pracy laboratoryjnej oraz wnikliwe sprawdzenie niniejszej pracy.

Dziękuję dr Darii Krefft, dr Joannie Żebrowskiej za wszelką przekazaną wiedzę, wskazówki merytoryczne, każde dobre słowo i wsparcie. Dziękuję również za pomoc w wnikliwym sprawdzeniu niniejszej pracy

Dziękuję również wszystkim pozostałym Koleżankom i Kolegom z Katedry Biotechnologii Molekularnej za niejednokrotną pomoc i miłą atmosferę podczas realizacji moich badań naukowych.

W szczególności dziękuję moim najbliższym, za wiarę, nieocenione wsparcie i bycie ze mną w chwilach zwątpienia.

1. CEL PRACY

Nadrzędnym celem przedstawionej pracy było opracowanie działającego modelu *in vitro* przeznaczonego do badań oddziaływań białko-białko oraz białko-DNA przez poszczególne podjednostki kompleksu Shelterin i telomerowego dwuniciowego DNA. Uproszczony model kompleksu Shelterin z telomerowym DNA może posłużyć do testowania szeregu związków chemicznych, które mogą być potencjalnymi kandydatami w terapiach przeciwnowotworowych.

Cele szczegółowe składają się na: bioprodukcję rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 z ludzkiego kompleksu Shelterin oraz ich wariantów delecyjnych Myb1 i Myb2 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym oraz opracowaniu metod potwierdzających interakcje rekombinantowych białek z telomerowym dsDNA oraz peptydami TIN i Apollo.

2. STRESZCZENIE

Kompleks białek ochronnych Shelterin ściśle połączony jest z pojęciem telomerów. Początkowa część pracy skupia się więc na ich dogłębnej charakterystyce, budowie i roli w organizmach żywych, w tym człowieka. Następnie przedstawia odpowiedzi na fundamentalne pytania na temat molekularnych aspektów funkcji telomerów, mających wpływ na homeostazę ich długości. Jak telomery rozwiązały problem końcowej replikacji oraz w jaki sposób przeciwdziałają niezliczonym ścieżkom komórkowym, mogącym wpływać i działać na końce DNA? Przeanalizowano działanie enzymu telomerazy, należącego do grupy odwrotnych transkryptaz, oraz kompleksu Shelterin, składającego się z sześciu odrębnych białek (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 i Rap1), które stanowią odpowiedzi na postawione pytania. Wykazano znaczenie wymienionych komponentów telomerowych w chorobach nowotworowych i wskazano celowane strategie w terapiach przeciwko nim. Zebrane informacje podkreśliły wagę osiągnięcia głównego celu niniejszej pracy.

Druga część rozważań teoretycznych opisuje wybrane właściwości białek, podkreślając te, które obecnie są wykorzystywane w procesach ich oczyszczania. Przedstawia zalety nowoczesnych podejść w preparatyce fuzyjnych preparatów białkowych z różnymi etykietami. Podkreśla przewagę bioprodukcji tych białek w bakteryjnych systemach ekspresyjnych oraz łatwość ich oczyszczania za pomocą dedykowanych technik chromatograficznych. Przedstawione informacje ułatwiają zrozumienie wybranych strategii uzyskania docelowych białek z kompleksu Shelterin.

Część eksperymentalna przedstawia wyniki potwierdzające uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 (ang. *human TRF1/2*) oraz ich domen wiążących Myb1 i Myb2 w bakteryjnym systemie *Escherichia coli* (*E. coli*). Otrzymane rezultaty z poszczególnych etapów ich preparatyki poparły opisane wcześniej zalety biosyntezy i oczyszczania rekombinantowych białek fuzyjnych z wybranymi etykietami. Przeprowadzone doświadczenia na specyficzność oddziaływań otrzymanych białek, przy wykorzystaniu metody EMSA oraz technologii BLItz, potwierdziły ich natywne właściwości. Wykazano interakcje rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 oraz ich domen wiążących z telomerowym dsDNA oraz oddziaływanie hTRF1 i hTRF2 z peptydami TIN i Apollo. Spełniono w ten sposób cele szczegółowe, które umożliwiły

wypełnienie celu głównego, potwierdzając użyteczność otrzymanych białek kompleksu Shelterin w modelach oddziaływań *in vitro*.

ABSTRACT

The Shelterin protein complex and telomere notion are closely intertwined. The initial part of this thesis focuses on their comprehensive characteristics, structure, and role in living organisms, including humans. Next, it provides answers to fundamental questions about the molecular aspects of telomere function that have effect on telomere length homeostasis. Furthermore, how telomeres solve the problem of terminal replication, and how they counteract the myriad of cellular pathways that can sense and act on the ends of DNA? The answer to posed questions is presented by analysis of the activity of the telomerase enzyme, belonging to the group of reverse transcriptase, and the Shelterin complex, consisting of six distinct proteins (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 and Rap1). The importance of these telomeric components in tumor diseases is demonstrated, and targeted strategies for therapies against them are indicated. The collected information accents the importance of achieving the main aim of this thesis.

The second part of the theoretical considerations describes selected properties of proteins that are currently used in their purification processes. It presents the advantages of modern approaches in the preparation of fusion protein with different labels. It accents the advantage of bioproduction fusion proteins in bacterial expression systems and the simplicity of their purification using dedicated chromatographic techniques. The presented information helps understand the selected strategies for obtaining target proteins from the Shelterin complex.

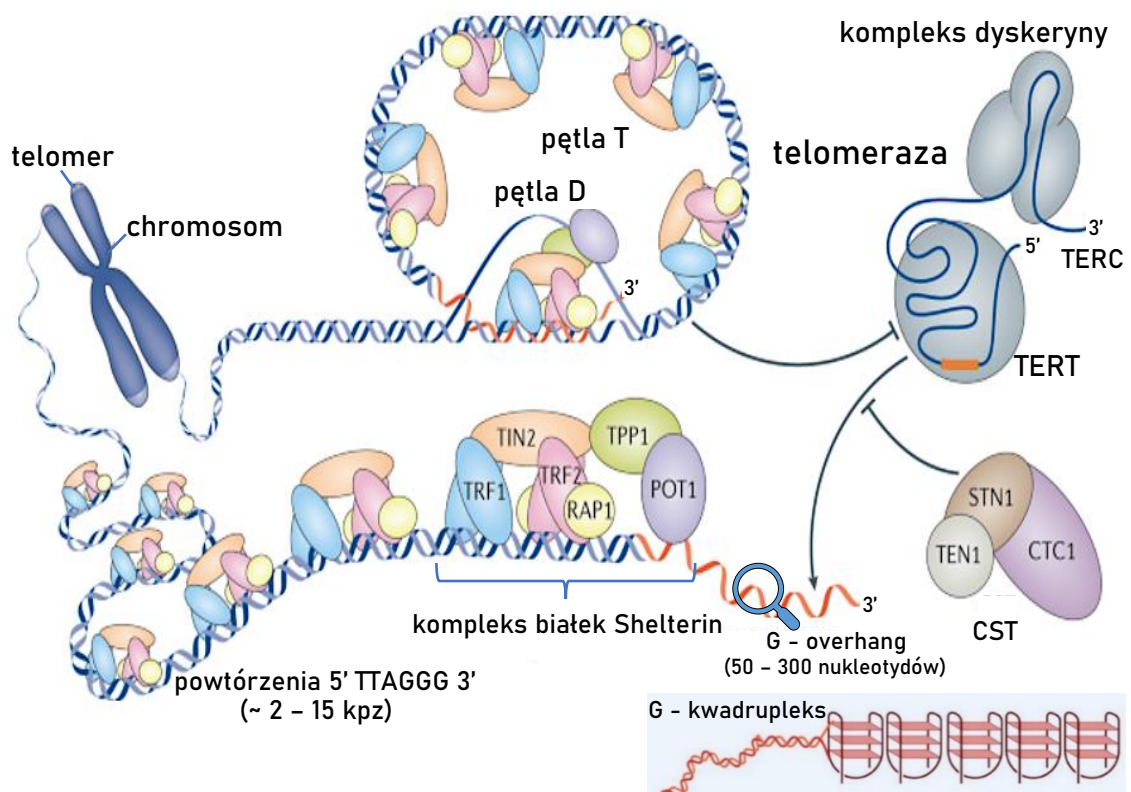
The experimental part shows the results that confirm obtaining the full variants of hTRF1 and hTRF2 (human TRF1/2) and their Myb1 and Myb2 binding domains in the *Escherichia coli* bacterial expression system. The results from individual stages of their preparation processes support the previously described advantages of biosynthesis and purification of recombinant fusion proteins with selected labels. The performed studies on the specificity of interactions the Shelterin proteins, using the EMSA method and BLItz technology, confirm their native properties. The interaction of hTRF1 and hTRF2 recombinant proteins and their binding domains with telomeric dsDNA is demonstrated, as well as the interaction of hTRF1 and hTRF2 with TIN and Apollo peptides. To sum up, the detailed aims were met, which consequently allowed achieving the main aim. The usefulness of the obtained proteins of the Shelterin complex in *in vitro* interaction models is confirmed.

3. WSTĘP TEORETYCZNY

3.1. Budowa, właściwości, funkcje i rola telomerów w organizmach

Każda forma życia definiowana jest przez swój unikatowy genom, który jest nośnikiem informacji biologicznej niezbędnej do powstania tego organizmu oraz utrzymania jego funkcji życiowych. Większość genomów, w tym nasz ludzki, zbudowana jest z cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), lub w przypadku niektórych wirusów kwasu rybonukleinowego (RNA). Genom organizmów wielokomórkowych dzieli się na dwie odrębne części – jądrową: zbudowaną z liniowych cząsteczek DNA tworzących uporządkowane struktury - chromosomy oraz mitochondrialną, występującą tylko w organellach wytwarzających energię - mitochondriach. Organizacja genomów jądrowych w chromosomy nie posiada wyjątków, każdy dotąd poznany organizm posiada przynajmniej dwa chromosomy i składa się z liniowych cząsteczek DNA (Brown 2009; Turner i in. 2011; Stencel i Crespi 2013; Alberts i in. 2016). Chromosomy powstają w wyniku upakowania długich liniowych cząsteczek DNA w wysoce zorganizowane struktury poprzez wiązanie się z innymi biopolimerami - białkami. Organizacja ta ma wpływ na procesy ekspresji poszczególnych genów znajdujących się w danym chromosomie (Brown 2009; Stencel i Crespi 2013). Zagwarantowanie stabilności chromosomów jest więc niezbędne dla zachowania integralności całych genomów, architektury jądrowej i ich parowania podczas procesu mejozy. Strukturalnym elementem chromosomów odpowiadającymi za ich stabilność są kompleksy nukleoproteinowe zwane telomerami (Hug i Lingner 2006; de Lange 2009; 2009; Brown 2009; de Lange 2018; Fathi i in. 2019; Fernandes i in. 2020; Izumi i Funa 2019; Lim i Cech 2021). Telomery są wyspecjalizowanymi strukturami DNA stanowiącymi fizyczne końce chromosomów. Od oryginalnych prac Hansa Muller (Muller 1938) i Barbary McClintock (McClintock 1941) uznaje się, że telomery chronią końce chromosomów przed degradacją nukleolityczną, szlakami naprawczymi DNA oraz nieprawidłową fuzją z innymi końcami (Greider 1996; Kazanowska i in. 2003; Iwano i in. 2004; Cech 2004; Gilson i Géli 2007; de Lange 2018; Fernandes i in. 2020). Odpowiadają również za regulację ekspresji niektórych genów, procesy nowotworzenia, starzenia komórek oraz homologicznej rekombinacji (Gilson i Géli 2007; Fernandes i in. 2020). Telomerowe DNA oraz G-kwadrupleks (G4) komórek ludzkich zbudowane są z wielu tysięcy par zasad (pz) heksanukleotydowych, tandemowych dwuniciowych (ds) powtórzeń **TTAGGG**, zakończonych przez jednoniciowe (ss) wolne końce 3' bogate w G,

składające się z 50 – 400 nukleotydów. Połączone są z wieloma oddziałującymi ze sobą białkami telomerowymi, które zbiorczo określane są jako kompleks białek ochronnych **Shelterin**. Każda odrębna podjednostka białkowa wchodząca w skład kompleksu odgrywa wyjątkową rolę w regulacji długości i ochronie telomerów. Shelterin wchodzi w interakcję zarówno z telomerycznym dwuniciowym jak i jednoniciowym DNA i jest wystarczająco obfity, aby związać je w całości (de Lange 2018). Kompleks ten sprawia że telomerowe DNA przyjmuje strukturę pętli T, w której koniec telomeru zwija się z powrotem, a wolny koniec 3' G wnika w dwuniciowy DNA (tzw. pętla D) (Iwano i in. 2004; Gilson i Géli 2007; de Lange 2009; O'Sullivan i Karlseder 2010; Moyer i in. 2015; Teasley i Stewart 2016; de Lange 2018; Izumi i Funa 2019; Fernandes i in. 2020; Lim i Cech 2021; Fathi i in. 2019). G4 powstaje w wyniku parowania się zasad wodorowych między czterema guaninami. Może również powstawać podczas replikacji, gdy dupleksowa nić telomerowego DNA otwiera się, umożliwiając ruch widełek replikacyjnych. Sugeruje się, że struktury G4 oraz dwie pętle T i D wzajemnie się wykluczają (Fernandes i in. 2020). Za regulację długości telomerów odpowiada enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy nazwany telomerazą, którego funkcją jest dobudowanie brakującego 3' końcowego odcinka nici DNA (Greider 1996; Weinrich i in. 1997; Kazanowska i in. 2003; Gilson i Géli 2007; Zvereva, Shcherbakova, i Dontsova 2010; Bryś i in. 2012; Schmidt i Cech 2015; Teasley i Stewart 2016; Kim i in. 2016; Fathi i in. 2019). Ostatnim komponentem przyczyniającym się do utrzymania integralności telomerów jest kompleks białek CST. W ścisłej koordynacji z kompleksem Shelterin reguluje dostęp telomerazy i polimerazy DNA (alfa-primazy) do telomerów (Rice i Skordalakes 2016; Lim i Cech 2021). Znaczenie omawianych struktur dla ludzkiego zdrowia dodatkowo podkreśla przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny dla Elizabeth Blackburn, Jack Szostak i Carol Greider w 2009 r. za ich pracę opisującą jak zakończenia chromosomów są chronione przez struktury zwane telomerami oraz enzym telomerazę (Blackburn, Greider, i Szostak 2006). Przedstawienie pełnej struktury telomerów zostało pokazane na rycinie 1.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie komponentów telomerów z ukazaniem struktur drugorzędowych: pętli T, pętli D i G-kwadrupleksu DNA. 1) Kompleks Shelterin składający się z sześciu odrębnych białek telomerowych, który wiąże się bezpośrednio z jednoniciowym i dwuniciowym telomerowym DNA i ma kluczowe znaczenie dla ochrony telomerów, a także kontrolowania aktywności telomerazy podczas wydłużania się telomerów. 2) Telomeraza jest kompleksem reprezentowanym przez trzy główne składniki: odwrotną transkryptazę telomerazy (TERT), składnik RNA (TERC) i kompleks dyskeriny zawierający białka NHP2, NOP10, TCB1 i GAR, wykazujący właściwość wydłużania telomerów. 3) Kompleks białek CST, zwany potocznie „czapeczką telomerową”. Przyjmuje się, że jest odpowiedzialny za hamowanie aktywności telomerazy, a także promowanie syntezy opóźnionej nici i interakcję z primazą polimerazy. Rycina stworzona na podstawie: (Lim i Cech 2021; Fernandes i in. 2020).

Dalsze rozważania dotyczące molekularnych aspektów funkcji telomerów, mających wpływ na stabilność całych genomów, skupią się na dwóch problemach, które napotkali naukowcy już przy początkowych etapach prac nad telomerami (Gilson i Géli 2007; de Lange 2009; 2018). Pierwsza z nich to problem końcowej replikacji, który wynika z niezdolności polimerazy DNA do replikacji końców podczas syntezy opóźnionej nici (Watson 1972). Drugi, który okazał się bardziej skomplikowany, to ochrona końców, wynikająca z niezliczonych ścieżek komórkowych, które mogą wpływać i działać na końce DNA (de Lange 2018; Fernandes i in. 2020). Wczesne prace wyjaśniły, że podobnie jak większość organizmów eukariotycznych, ssaki (w tym ludzie) rozwiązały problem końcowej replikacji za pomocą enzymu telomerazy, wydłużającego

końce 3' chromosomów o telomerowe DNA (Blackburn, Greider, i Szostak 2006; Zvereva, Shcherbakova, i Dontsova 2010; Bryś i in. 2012; Moye i in. 2015; Kim i in. 2016; de Lange 2018; Fernandes i in. 2020). Dopiero około dekadę temu udowodniono, że za rozwiązanie drugiego problemu odpowiedzialne są białka kompleksu Shelterin. Poczynione zostały znaczne postępy w poznaniu mechanizmów, dzięki którym białka te zapobiegają przypadkowej aktywacji szlaków sygnalizacji uszkodzenia DNA (DDR ang. *DNA damage response*), naprawy pęknięć dwuniciowych (DSB ang. *double-strand break*) oraz łączeniu się niehomologicznych końców (NHEJ ang. *nonhomologous end joining*). Wczesna literatura na temat wspomnianych szlaków sygnałowych i punktów kontrolnych wykrywających uszkodzenia DNA w komórkach eukariotycznych nie uwzględniała oczywistego dylematu, że komórki muszą odróżnić przypadkowe pęknięcia DNA od końców chromosomów. Najnowsze dane sugerują, że telomery są zagrożone przez co najmniej siedem różnych ścieżek DDR (de Lange 2018; Luo i in. 2021). Zagrożenia i sposób walczenia z nimi przez poszczególne białka Shelterin przedstawiono w tabeli 1.

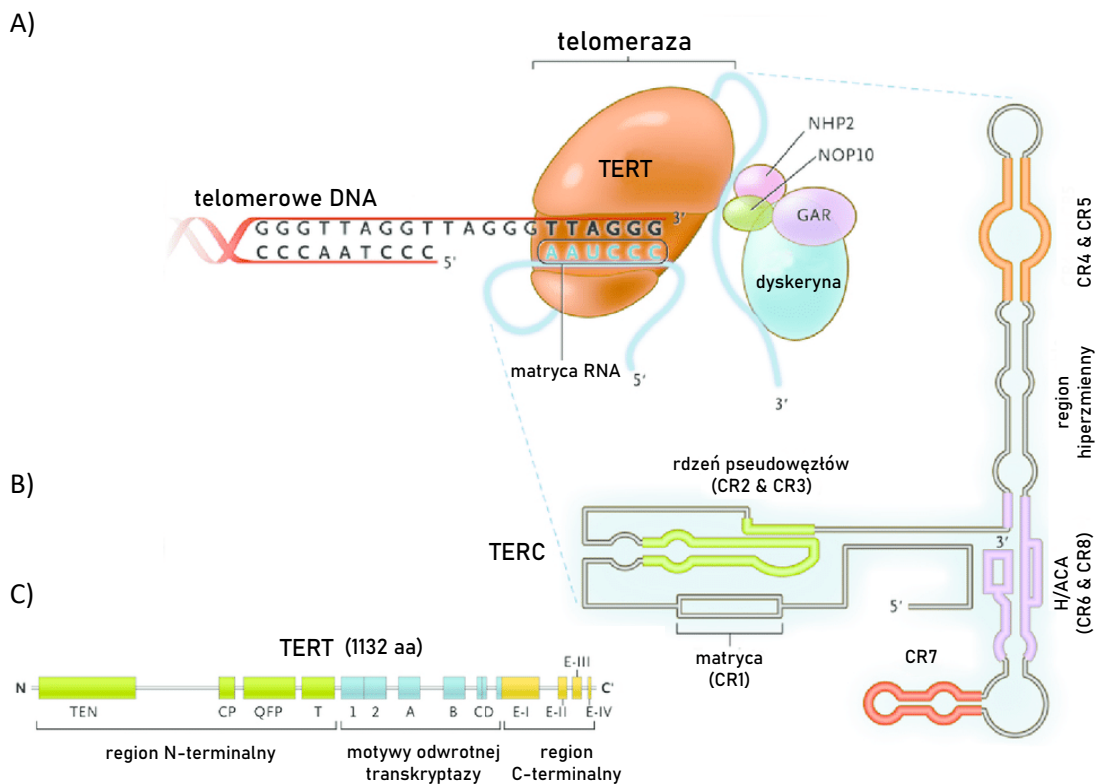
Tab. 1. Podsumowanie szlaków sygnalizacji uszkodzenia DNA (DDR), tłumionych przez białka Shelterin. Przedstawiono podjednostki dedykowane do każdego szlaku i ich proponowany mechanizm ochronny. Na podstawie: (de Lange 2018).

Szlaki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR)	Podjednostki Shelterin	Mechanizm	Generalny represor
kinaza ATM	TRF2 (TIN2)	pętla T	brak
kinaza ATR	POT1	wykluczenie RPA	brak
polimeraza 1 (PARP1)	TRF2, TIN2	wiązanie rozgałęzionego DNA	Ku70/80
c-NHEJ (klasyczne niehomologiczne łączenie końców)	hTRF2	pętla T (iDDR, Rap1)	CYREN (S/G2)
Alt-NHEJ (alternatywne niehomologiczne łączenie końców)	TRF2 (TIN2, POT1)	pętla T, represja PARP1, ?	Ku70/80
naprawa ukierunkowana na homologię HDR (ang. <i>homology-directed repair</i>)	POT1 albo POT1 + Rap1	nie poznano	Ku70/80
Hiper-resekcja w telomerach	POT1, TRF2	represjonowanie ATM/ATR	53BP1/Rif1/Rev7

Dla kilku ścieżek wymieniono ogólne represory. Przy represji c-NHEJ spekuluje się, że Rap1 i domena iDDR w TRF2 przyczyniają się do zapobiegania akcji c-NHEJ, gdy telomery są w stanie liniowym.

3. 2. Jak telomeraza wydłuża końce chromosomów

W podrozdziale 3.1 podkreślono, że telomery w komórkach eukariotycznych wydłużane są przez enzym telomerazę. Telomeraza jest zaliczana do enzymów z grupy odwrotnych transkryptaz (polimeraz DNA, zależnych od RNA). Zbudowana jest z dwóch głównych komponentów: TERC (składnik RNA), który jest matrycą do syntezy DNA oraz podjednostki katalitycznej TERT (białka odwrotnej transkryptazy) (Greider 1996; Weinrich i in. 1997; Blackburn, Greider, i Szostak 2006; Gilson i Géli 2007; Zvereva, Shcherbakova, i Dontsova 2010; Kim i in. 2016; Fernandes i in. 2020). Uzyskanie przez nią pełnej aktywności wymaga obecności szeregu różnych białek pomocniczych, takich jak: dyskeryna, NHP2, NOP10, GAR1, TCAB1, reptyna i pontyna (Gilson i Géli 2007; Zvereva, Shcherbakova, i Dontsova 2010; Schmidt i Cech 2015; Fernandes i in. 2020). Dokładną budowę enzymu przedstawia rycina 2.



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie kompleksu telomerazy. A) Całokompleks enzymu składający się z odwrotnej transkryptazy (TERT), składnika RNA (TERC) oraz białek pomocniczych (dyskeryna, NHP2, NOP10 i GAR1). B) Komponent TERC zbudowany z 451 nukleotydów składających się na siedem konserwatywnych regionów od CR1 do CR7. Wykazuje strukturę spinki do włosów charakterystyczną dla klasy małych jąderkowych RNA. C) Komponent TERT zawierający trzy główne domeny: region N-końcowy, motywy odwrotnej transkryptazy i region C-końcowy. Rycina stworzona na podstawie: (Calado i Young 2009)

Telomeraza wydłuża końce 3' chromosomów, poprzez katalityczne przyłączenie heksamerowych powtórzeń telomerowych, podczas gdy nie komplementarna syntezowana jest przez konwencjonalne polimerazy DNA. Wykazuje ona aktywność w komórkach macierzystych, zarodkowych i niektórych komórkach odpornościowych. Nie jest wykrywalna w ludzkich komórkach somatycznych, ze względu na wyciszenie transkrypcji TERT podczas procesu rozwoju, podczas gdy inne składniki, w tym TERC są dalej powszechne. Egzogenne przywrócenie ekspresji TERT w niektórych typach komórek ludzkich jest wystarczające do przywrócenia pełnej aktywności telomerazy. Aczkolwiek wykazano, że w części typów komórek ludzkich TERC jest również inhibitorem telomerazy (Chiba i in. 2015; Schmidt i Cech 2015; Fernandes i in. 2020). Brak opisanej aktywności w komórkach somatycznych powoduje skracanie się telomerów wraz z każdym podziałem komórki. Szybkość skracania telomerów różni się w zależności od typu komórek i waha się od 15 do 200 pz na każde podwojenie. Skracanie telomerów koreluje z indukcją procesu starzenia komórek, określanym również jako starzenie replikacyjne (stadium M1). Krytycznie krótkie telomery powodują aktywację szlaków DDR. Prawidłowe ustalenie długości telomerów ma więc kluczowe znaczenie dla długoterminowego przeżycia komórki. Rezerwa długości telomerów powinna być wystarczająca, aby uniknąć przedwczesnego starzenia się komórek i w konsekwencji przyspieszenia chorób związanych z wiekiem. Z drugiej strony powinna być na tyle krótka, aby hamować powstawanie nowotworów, poprzez ograniczanie potencjału replikacyjnego komórek (Bryś i in. 2012; Chiba i in. 2015; Fernandes i in. 2020; Lim i Cech 2021). Obecność powyżej pięciu telomerów, które aktywowały DDR zwiększa prawdopodobieństwo starzenia sterowanego przez p53 - czynnika transkrypcyjnego o właściwościach supresora nowotworowego. Inaktywacja supresorów nowotworowych p53 i Rb powoduje ominięcie procesu starzenia. Doprowadza to do kontynuowania podziałów komórek wraz z dalszym zużywaniem się telomerów, aż do osiągnięcia ostatecznego kryzysu (stadium M2), które charakteryzuje się poważną niestabilnością genomową i w konsekwencji prowadzi do apoptozy. Szlak skracania telomerów reprezentuje więc bardzo silny mechanizm supresorowy nowotworów wraz z sygnalizacją p53 i Rb. Niestety około 85% do 90% nowotworów (obejmujący szeroki zakres) pokonuje barierę supresji nowotworowej poprzez ekspresję genu kodującego podjednostkę telomerazy hTERT i/ lub reaktywację enzymu telomerazy, podczas gdy pozostałe wykorzystują inne mechanizmy, w tym alternatywne wydłużanie telomerów

(ALT) (Greider 1996; Takubo i in. 2002; Hug i Lingner 2006; Chiba i in. 2015; Fernandes i in. 2020; Schmidt i Cech 2015; Bejarano i in. 2019; Bhari i in. 2021; Luo i in. 2021).

3. 3. Kompleks białek Shelterin ochraniający końce chromosomów

Poruszony w podrozdziale 3.1. aspekt ochrony końców chromosomów przez białka kompleksu Shelterin przeciw przypadkowej aktywacji szlaków sygnalizacji uszkodzeń DNA (DDR) nie wyjaśnił dokładnych mechanizmów obrony. Dokładne ich zrozumienie związane jest z poznaniem właściwości i funkcji poszczególnych podjednostek kompleksu Shelterin. Ludzki kompleks białek ochronnych Shelterin zbudowany jest z sześciu odrębnych białek: TRF1 (czynnik powtórzeń telomerowych 1, ang. *telomere repeat factor 1*), TRF2 (czynnik powtórzeń telomerowych, ang. *telomere repeat factor 2*), Rap1 (białko represorowo aktywatorowe 1, ang. *repressor/activator protein 1*), TIN2 (białko jądrowe oddziałujące z TRF, ang. *interacting nuclear protein 2*), TPP1 (trójpeptydylopeptydaza 1, ang. *tripeptidyl peptidase 1*) oraz POT1 (białko chroniące telomery 1, ang. *protection of telomere 1*). Kompleks ten wiąże się bezpośrednio zarówno z dwuniciowym jak i jednoniciowym telomerowym DNA. Jak zdążono kilkakrotnie podkreślić ma kluczowe znaczenie dla ochrony telomerów, a także kontrolowania aktywności telomerazy podczas procesu wydłużania się telomerów (Iwano i in. 2004, 1; Schmidt i Cech 2015; Erdel i in. 2017; de Lange 2018; Bejarano i in. 2019; Bhari i in. 2021; Luo i in. 2021; Lim i Cech 2021). Poniżej przedstawiona została budowa całego ludzkiego kompleksu Shelterin wraz z schematycznym przedstawieniem składowych elementów wszystkich białek kompleksu (rycina 3).

Główne regiony interakcji pomiędzy poszczególnymi podjednostkami kompleksu Shelterin ustalono w oparciu o wyniki z doświadczenia koimmunoprecypitacji, analizy dwuhybrydowej drożdży oraz z badań nad ich strukturami przy pomocy mikroskopu elektronowego (de Lange 2018). Wykazano, że białka hTRF1 i hTRF2 wiążą się z białkiem TIN przy użyciu innych regionów interakcji. TIN2 wiąże się również z białkiem TPP1, które połączone jest z białkiem POT1. Białko Rap1 łączy się z hTRF2, uzupełniając pełny kompleks sześciu podjednostek. Obszary oddziaływania między podjednostkami kompleksu Shelterin charakteryzują się różną strukturą i prawdopodobnie nie obejmują modyfikacji potranslacyjnych (de Lange 2018). Okazuje się, że do wytworzenia pełnego kompleksu białek telomerowych nie jest wymagana interakcja z telomerowym DNA. Natomiast domeny wykazujące wysokie powinowactwo do telomerowego DNA w obrębie kompleksu Shelterin są dobrze scharakteryzowane. Za wiązanie dwuniciowego telomerowego DNA odpowiedzialne są domeny Myb białek hTRF1 i hTRF2, wykazując nanomolowe powinowactwo (Erdel i in. 2017; de Lange 2018). Wiązanie z wysokim powinowactwem przez białka hTRF1 i hTRF2 zależne jest od tworzenia homodimerów, w którym pośredniczy domena TRFH, dlatego w takiej postaci są przedstawiane na schematach (Ryc. 1. i Ryc. 2.). Homodimery białek hTRF1 i hTRF2 wykazują łącznie cztery moduły rozpoznawania telomerowego dwuniciowego DNA (dsDNA, ang. *double stranded DNA*) 5'TTAGGG3' w jednej pojedynczej cząsteczce kompleksu Shelterin (Court i in. 2005; Erdel i in. 2017; de Lange 2018). Kompleks Shelterin zawiera dodatkową domenę wykazującą znaczne podobieństwa do Myb, która zlokalizowana jest w centralnym obszarze białka Rap1. Przez nieodpowiedni do wiązania DNA ładunek powierzchniowy, wykazuje do niego niskie powinowactwo, sugerując, że może bardziej oddziaływać z białkami. Białko POT1 wiąże się natomiast z jednoniciowym telomerowym DNA poprzez dwie N-terminalne fałdy oligonukleotydu/oligosacharydu (OB ang. *oligonucleotide/oligosaccharide binding*). *In vitro* POT1 wiąże się z subnanomolarnym powinowactwem do miejsc jednoniciowego DNA (ssDNA, ang. *single stranded DNA*) 5'TAGGGTTAG3' na końcu nici 3' lub z nieco niższym powinowactwem w pozycji wewnętrznej. TPP1 pomimo posiadania tego samego ugrupowania OB nie wykazuje powinowactwa do telomerowego ssDNA (de Lange 2018). Natomiast w połączeniu z domeną podobną do resolwazy złącza Holliday (HJRL) bierze udział w wiązaniu się do białka POT1. Powstały heterodimer POT1/TPP1 zwiększa stabilizację całego kompleksu Shelterin, dodatkowo utrzymując ogólny poziom POT1 w komórkach (Gong, Stock, i Liu 2020; Aramburu i in. 2022).

Białka wiążące się do telomerowego DNA nie wykazują współdziałania podczas analiz indywidualnych *in vitro*. Uformowanemu w pełni kompleksowi Shelterin również wydaje się brakować silnych interakcji kooperacyjnych w badaniach *in vitro*. Kompleksy Shelterin wiążą się zatem z telomerowym DNA jako niezależne jednostki. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazują również, że białka kompleksu Shelterin mogą wiązać się zarówno z telomerowym jak i nietelomerowym DNA. Obserwowane oddziaływania wiążące białek Shelterin z telomerowym DNA są silne, odzwierciedlające szybkie tempo asocjacji oraz wolne tempo dysocjacji. Wykazują też znaczną odporność na siłę hydrodynamiczną i wysoką siłę jonową, w przeciwieństwie do oddziaływań z nietelomerowym DNA. Eksperymenty *in vitro* wskazują również, że kompleksy Shelterin poprzez dyfuzyjne przeszukiwanie 3-D, a także 2-D wzdłuż DNA znajdują docelowe telomerowe miejsca wiązania. Kompleks Shelterin może więc przejściowo wiązać się i dyfundować wzdłuż nietelomerowego dsDNA. Wykazano również, że poszczególne, pojedyncze białka z kompleksu Shelterin, charakteryzujące się wysokim powinowactwem do telomerowego DNA, mogą wiązać się niezależnie z nietelomerowym DNA. Dyfundują wzdłuż genomu, aż do momentu znalezienia telomerowego miejsca docelowego, a po wzajemnym spotkaniu się tworzą w pełni uformowany kompleks (Erdel i in. 2017; de Lange 2018). Shelterin zawiera jeszcze dwie dodatkowe interakcje z telomerowym DNA, obie z udziałem białka hTRF2, które związane są z tworzeniem się pętli T. Poprzez krótki region N-terminalny, wykazujący głównie charakter zasadowy (określany jako domena podstawowa), hTRF2 wiąże się w sposób niezależny od sekwencji z rozgałęzionymi dsDNA, w tym do struktury u podstawy pętli T. Powinowactwo tej domeny do strukturalnego DNA jest niskie (submikromolarne), a jej oddziaływanie z rozgałęzionymi strukturami prawdopodobnie wymaga zakotwiczenia do dsDNA przez domenę Myb. Druga interakcja obejmuje domenę TRFH, która przez wiele odsłoniętych reszt lizyny wiąże się z niespecyficznym dsDNA z niskim powinowactwem. Umożliwia ona owinięcie około 90 pz DNA wokół siebie, co sprzyja tworzeniu pętli T (de Lange 2018; Lim i Cech 2021). Białko Rap1 wykazuje ponadto subtelny wpływ na oddziaływanie domeny zasadowej białka hTRF2 z DNA. Rap1 zmniejsza oddziaływanie danej domeny z rozgałęzionym DNA, jednocześnie zwiększając specyficzność wiązania białka hTRF2 do powtórzeń telomerowych, poprzez zapobieganie angażowaniu się w niezależne od sekwencji interakcje z DNA (Iwano i in. 2004, 1; Ye i in. 2004; Court i in. 2005; de Lange 2018). Nie poznano jeszcze dokładnej stechiometrii poszczególnych jednostek w utworzonych

kompleksach Shelterin *in vivo*. W komórkach ludzkich białek TRF1, TRF2, TIN2 i Rap1 jest 10 razy więcej od białek TPP1 oraz POT1. Rdzeniem kompleksu Shelterin określamy zatem zespół czterech najliczniejszych podjednostek, występujący zarówno osobno jak i z frakcją zawierającą dwa pozostałe białka (Ryc. 2. B i C) (Takai i in. 2010; de Lange 2018). Pomimo stabilizowania białek hTRF1 i hTRF2, poprzez ‘mostek’ z wiązania TIN2 na telomerach, nie wyklucza się istnienia oddzielnych podkompleksów opartych wyłącznie na pojedynczych białkach hTRF1 i hTRF2. Ilość cząsteczek rdzenia Shelterin jest wystarczająca, aby związać wszystkie dwuniciowe powtórzenia telomerowe. Ponadto stechiometryczny nadmiar białek TPP1/POT1 nad miejscami wiązania jednoniciowych powtórzeń telomerowych jest dziesięciokrotnie większy, co sugeruje, że *in vivo* większość telomerowego DNA jest związana z białkami kompleksu Shelterin (de Lange 2018). Pomimo przewagi obecności kompleksów Shelterin nad telomerowym DNA, nukleosomalna struktura telomerów wydaje się nie mieć wpływu na same kompleksy. Wiązanie się hTRF1 i hTRF2 *in vitro* z chromatyną nukleosomalną ma jednak dostrzegalne efekty, a wzajemne oddziaływanie między kompleksem Shelterin a nukleosomami *in vivo* zasługuje na dalszą analizę (Court i in. 2005; Galati i in. 2012, 2; 2015, 1; de Lange 2018).

3.3.1. Czynniki pomocnicze kompleksu Shelterin

Kompleks Shelterin oddziałuje z kilkoma odrębnymi białkami i kompleksami białkowymi, przyczyniającymi się do jego funkcjonowania. Część interakcji kontroluje obfitość podjednostek kompleksu Shelterin w komórkach, nie przyczyniając się do funkcjonalności samych kompleksów (np. RNF6, Fbx4). Wiele czynników pomocniczych kompleksu Shelterin ma dobrze określone funkcje w szlakach naprawy DNA. Prawdopodobnie kompleks Shelterin przyłączył dodatkowe funkcjonalności, takie jak: degradacja nukleolityczna, aktywność helikazy, udział w replikacji DNA, aby ułatwić enzymatyczną obróbkę telomerowego DNA. Pierwszym zidentyfikowanym czynnikiem pomocniczym kompleksów Shelterin jest tankyraza 1, wiążąca się z hTRF1. Reguluje spójność telomerów i wpływa na homeostazę ich długości (de Lange 2018). Kolejnym przykładem czynnika pomocniczego jest nukleaza Apollo/SMN1B, która pomaga przy generowaniu poprawnych wolnych końców w telomerach. Apollo wchodzi w interakcję z regionem białka hTRF2 w obrębie domeny TRFH. Spowodowane jest to możliwością wiązania białek posiadających motyw H/YxLxP w omawianym regionie interakcji. Oprócz Apollo, podobny motyw posiada białko naprawcze DNA SLX4, które

również przyłącza się do białka hTRF2. Podobny region interakcji obserwowany jest w domenie TRFH białka hTRF1, mogący oddziaływać z motywem FxLxP. Białka Shelterin oddziałują ze znacznie większą ilością czynników pomocniczych niż wyżej wspomniane. Część z nich wraz z opisem ich ogólnych funkcji i wpływu na ochronę telomerów została przedstawiona w tabeli 2.

Tab. 2. Wpływ wybranych czynników pomocniczych kompleksu Shelterin na ochronę telomerów. Na podstawie (de Lange 2018).

Czynnik pomocniczy Shelterin	Podjednostka oddziałująca	Ogólna funkcja czynnika pomocniczego	Wpływ na ochronę telomerów
Tankyraza 1	hTRF1	PARsylacja (ang. <i>PARsylation</i>) modyfikacja substratowych białek poprzez poli-ADP-rybozylację	utrzymywanie homeostazy telomerów, odróżnianie siostrzanych telomerów
Apollo/SMN1	hTRF2	naprawa sieciowania pomiędzy nićmi	generowanie poprawnych wolnych końców w telomerach
RNF8	TPP1	odpowiedź na uszkodzenie DNA ligaza ubikwityny	obrót TPP1
Fbx4	hTRF1	adapter do ligazy ubikwityny E3	obrót hTRF1
BML Helikasa syndromu Blooma	hTRF1 + hTRF2	helikaza RecQ,	replikacja telomerów
RTEL1	hTRF2	helikaza	replikacja telomerów; rozdział pętli w fazie S
SLX4	hTRF2	kompleks nukleaz: XPF/ERCC1, Mus81, SLX1	replikacja telomerów; trawienie pętli T
Ku70/80	hTRF2	inhibitor (c-NHEJm, alt-NHEJ, PARP1 i HDR)	inhibicja c-NHEJm, alt-NHEJ, PARP1 i HDR
TRIP6	POT1	białko LIM	tłumienie sygnalizacji ATR
HP1 γ	TIN2	wiązanie/utrzymanie heterochromatyny	nie określono (może mieć wpływ na łączenie się siostrzanych telomerów)
Heregulin/HR G β 2	Rap1 + hTRF2	czynnik wzrostu	nie określono

Najbardziej znaczące funkcje poszczególnych białek z kompleksu Shelterin w ochronie telomerów wynikające z ich budowy, wzajemnego oddziaływania, prezentowanych samodzielnych funkcjonalności jak i tych po związaniu z czynnikami pomocniczymi zostały zbiorczo przedstawione w tabeli 3.

Tab. 3. Funkcje poszczególnych podjednostek kompleksu Shelterin. Na podstawie (Jafri i in. 2016; de Lange 2018; Fathi i in. 2019; Fernandes i in. 2020; Bhari i in. 2021; Aramburu i in. 2022).

Białko/białka	Funkcje
hTRF1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Poprzez domenę homologii (TRFH) ulega homodimeryzacji. ○ Poprzez domenę Myb wiąże się z telomerowym dsDNA. ○ Uważa się, że negatywnie reguluje długość telomerów poprzez białko POT1, bądź bezpośrednio, blokując wiązanie telomerazy poprzez stabilizację struktury pętli T, uniemożliwiając telomerazie dostęp do końca 3' (nie oddziałuje bezpośrednio z telomerazą). ○ Pośrednio reguluje długość telomerów poprzez działanie enzymu Tankyrazy - enzym z nadrodziny polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP). Generuje polimery ADP-rybozy na resztach kwasu glutaminowego akceptora białka, którym w tym przypadku jest hTRF1, co skutkuje zahamowaniem jego wiązania z telomerem.
hTRF2	<ul style="list-style-type: none"> ○ Poprzez domenę homologii (TRFH) ulega homodimeryzacji. ○ Poprzez domenę Myb wiąże się z telomerowym dsDNA. ○ Pełni istotną rolę w tworzeniu struktury drugorzędowej znanej jako pętla T, w której wolny koniec 3' ssDNA wnika do dwuniciowej sekwencji DNA. ○ Pomaga usunąć zagrożenia związane z łączeniem niehomologicznych końców (NHEJ) i sygnalizacji zmutowanej kinazy ataksji-teleangiektazji (ATM) poprzez pętlę T. ○ Podobnie jak hTRF1 negatywnie reguluje długość telomerów, zniechęcając telomerazę do wiązania z końcem 3' poprzez pętlę T.
TIN2	<ul style="list-style-type: none"> ○ Stabilizuje cały kompleks Shelterin, działając jako 'pomost' między telomerycznym dsDNA a ssDNA, łącząc hTRF1 i hTRF2 z heterodimerem TPP1/POT1. ○ Negatywnie reguluje długość telomerów zapobiegając działaniu tankyrazy 1 na hTRF1 (hamującej wiązanie hTRF1 do telomeru). ○ Reguluje aktywność telomerazy (nie poznano mechanizmu).
POT i TPP1	<ul style="list-style-type: none"> ○ TPP1 oddziałuje z białkiem POT1 tworząc heterodimer. ○ POT1 i TPP1 jako stabilny heterodimer wiążą się z wolnym końcem 3' telomerowego ssDNA poprzez fałdy OB białka POT1. ○ Heterodimer poprzez białko TPP1 oddziałuje z TIN2 w celu połączenia białek wiążących dsDNA (hTRF1 i hTRF2) z POT1. ○ Jako dimer zwiększają stabilność kompleksu Shelterin poprzez zapobieganie działaniu szlaku DDR związanego z ataksją-teleangiektazją i związanym z Rad3 (ATR). ○ Regulują długość telomerów poprzez interakcję N-końcowej domeny OB TPP1 (TEL) z N-końcową domeną telomerazy (TEN), oraz działając jako czynnik procesywności dla telomerazy podczas wydłużania telomerazy, poprawiając translokację matrycy i zmniejszając dysocjację startera.
Rap1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Poprzez rekrutację przez białko hTRF2 tworzą razem heterodimer. ○ Heterodimer pełni niezbędną funkcję w ochronie telomerów przed szlakami naprawy ukierunkowanymi na homologie (HDR) (SLX4 i PARP1).

3. 4. Znaczenie telomerazy w chorobach nowotworowych

Sposób, w jaki telomery są utrzymywane w celu nieustannej proliferacji komórek nowotworowych prowadząc do ich nieśmiertelności jest nadal przedmiotem szeroko prowadzonych badań (Bhari i in. 2021). Indukcja enzymu telomerazy jest jednym z najważniejszych zjawisk występujących w 85 – 90% wszystkich nowotworów złośliwych, czyniąc ją jednym z najczęstszych markerów rakowych (Jafri i in. 2016; Slusher, Kim, i Ludlow 2020; Bhari i in. 2021). W komórkach nowotworowych ogrywa istotną rolę właśnie poprzez utrzymywanie długości telomerów, która jest niezbędna do ich ciągłej proliferacji (Kelland 2007; Biroccio i in. 2011; Bryś i in. 2012; Chiba i in. 2015; Jafri i in. 2016; Fernandes i in. 2020; Bhari i in. 2021). Wyciszenie enzymu telomerazy działa jako pierwotna bariera przed procesami nowotworzenia i jest osiągnięta przez wyciszenie transkrypcji TERT lub alternatywnie łączone jest z jej wariantami niekodującymi (Kelland 2007; Kim i in. 2016; Fernandes i in. 2020; Slusher, Kim, i Ludlow 2020). Ostatnie obserwacje ujawniają liczne działania onkogenne związane z podjednostką TERT wykraczające poza jej funkcję kanoniczną w przywracaniu aktywności telomerazy wydłużającej telomery (Gonzalez i in. 2014; Fernandes i in. 2020). Obejmują one szlaki sygnałowe, które wpływają na rozwój i progresję nowotworów, takich jak: regulacja ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), aktywacja transkrypcji regulujących szlak Wnt lub bezpośrednia regulacja transkrypcji zależnej od NF- κ B (Slusher, Kim, i Ludlow 2020; Gonzalez i in. 2014; Bhari i in. 2021). Wykazano, że TERT promuje limfogenezę zależną od MYC (rodziny genów regulatorowych i protoonkogenów, kodujących czynniki transkrypcyjne), niezależnie od jej aktywności katalitycznej. Zaobserwowano również, że TERT oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym SP1, przyczyniając się do angiogenezy. Tak więc telomeraza / TERT przyczynia się do powstania kilku cech charakterystycznych dla chorób nowotworowych, które mogą być zależne lub niezależne od jej aktywności katalitycznej (Slusher, Kim, i Ludlow 2020). Obecnie prowadzone są badania nad wpływem zmian genetycznych, mających wpływ na regulację ludzkiego genu TERT w chorobach nowotworowych. Trwają prace nad zrozumieniem funkcji promotora TERT (TMP), amplifikacji genu TERT, reorganizacji Locus TERT, insercji onkowirusowego DNA w Locus TERT oraz alternatywnego składania TERT w tworzeniu i utrzymywaniu chorób nowotworowych (Fernandes i in. 2020; Slusher, Kim, i Ludlow 2020).

3. 5. Znaczenie kompleksu Shelterin w chorobach nowotworowych

Shelterin jako kompleks białek chroniących telomery również odgrywa istotną rolę w procesach nowotworzenia. Oprócz utrzymywania integralności telomerów, przeciwdziała również różnym szlakom odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Zmiana jego funkcji wiąże się z odbezpieczaniem telomerów, powodując niestabilność całych genomów. Ta niestabilność jest jedną z charakterystycznych cech komórek rakowych, a więc badanie roli poszczególnych komponentów kompleksu Shelterin staje się bardzo istotnie (Fernandes i in. 2020; Luo i in. 2021). Szczegółowe mechanizmy regulacji kompleksu w chorobach nowotworowych cały czas pozostają nieuchwytnie (Luo i in. 2021). Zmienioną ekspresję poszczególnych podjednostek kompleksu Shelterin oraz mutacji w obrębie ich genów zauważono i opisano w kilkunastu różnych chorobach nowotworowych (tabela 4.) (Fernandes i in. 2020; Bejarano i in. 2019; Luo i in. 2021).

Tab. 4. Wpływ zróżnicowanego poziomu ekspresji genów kodujących białka z kompleksu Shelterin w występowaniu różnych rodzajów nowotworów. Na podstawie (Fernandes i in. 2020).

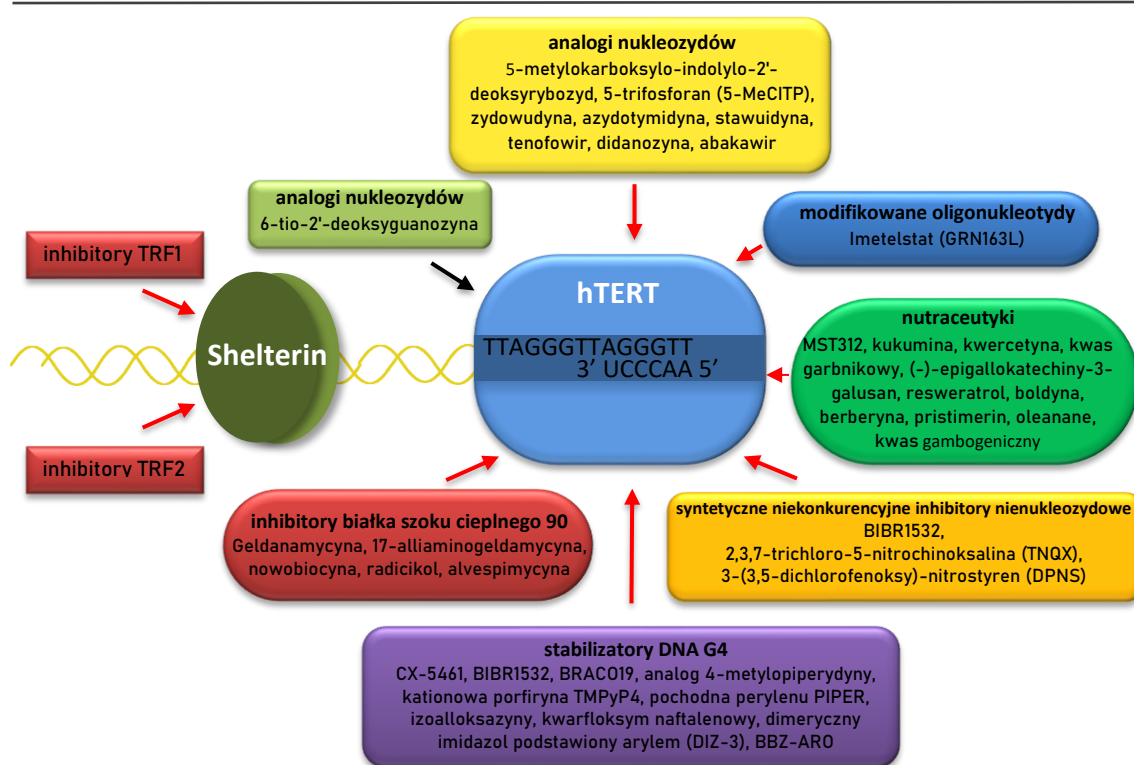
Podjednostka kompleksu Shelterin	Choroba zgłoszona przy nad ekspresji	Choroba zgłoszona przy zmniejszonej ekspresji	Choroba zgłoszona przy wadzie genetycznej
TRF1	rak wątrobowo komórkowy rak płuc rak żołądka ostra białaczka limfoblastyczna białaczka T-komórkowa rak nerkowo komórkowy rak prostaty glejak	rak żołądka ostra białaczka szpikowa przewlekła białaczka limfocytowa rak piersi mięsaaki mezenchymalne	
TRF2	rak wątrobowo komórkowy rak płuc rak żołądka białaczka T-komórkowa rak nerkowo komórkowy rak prostaty rak skóry	ostra białaczka szpikowa rak piersi rak żołądka	przewlekła białaczka limfocytowa
Rap1	rak żołądka szpiczak mnogi rak nerkowo komórkowy	B-przewlekła białaczka limfocytowa	czerniak
TIN2	rak wątrobowo komórkowy białaczka T-komórkowa szpiczak mnogi	ostra białaczka szpikowa rak żołądka	
POT1	szpiczak mnogi rak żołądka rak krtani	B-przewlekła białaczka limfocytowa mięsaaki mezenchymalne	naczyniakomięsak glejak chłoniak z komórek płaszczki przewlekła białaczka limfocytowa czerniak
TPP1 (ACD)	szpiczak mnogi rak krtani B-przewlekła białaczka limfocytowa		przewlekła białaczka limfocytowa czerniak

Niezależne grupy badawcze wykazały, że geny kodujące białka TRF1, TRF2, RAP1, POT1 i TIN2 ulegają silnej nadekspresji w raku wątrobowo-komórkowym, gruczolaku płuc, raku żołądka, białaczce, raku nerkowo komórkowym, raku prostaty i sugerowały ich rolę w promowaniu nowotworzenia (Fernandes i in. 2020). Zwiększoną biosyntezę białka TRF2 połączono z promowaniem mechanizmów onkogeny takich jak inicjacja, progresja, migracja, przerzuty, angiogenza i nadzór immunologiczny (Fernandes i in. 2020). Wykazano, że nadprodukcja białka TRF1 sprzyja tworzeniu pnia nowotworu i utrzymywaniu telomerów. Udowodniono, że nie tylko zbyt wysoki poziom ekspresji genów kodujących białka kompleksu Shelterin połączony jest z występowaniem chorób nowotworowych. W niektórych typach nowotworów odnotowano zmniejszoną ekspresję genów kodujących białka z kompleksu Shelterin. Zaburzone wzorce ekspresji genów białek telomerowych w porównaniu do zdrowych komórek powiązано z patogenezą przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL), w której biosynteza dwóch białek TRF1 i POT1 była ponad dwukrotnie zmniejszona, podczas gdy geny białka Rap1 i TPP1 wykazywały zwiększoną ekspresję. Analiza poziomów ekspresji pokazała, że kompleks Shelterin jest dodatnio skorelowany z celami E2F (czynniki transkrypcyjne biorące udział w kontroli przejścia G1/S u zwierząt i roślin poprzez pośredniczenie w aktywacji transkrypcyjnej wielu genów wymaganych do progresji cyklu komórkowego i replikacji DNA), podczas gdy jest ujemnie skorelowana ze szlakiem p53. Co ważne, Shelterin wiąże się z odpornością nowotworu i przewiduje odpowiedź na terapię immunologiczną z blokadą PD-1 (Luo i in. 2021). Z różnymi typami nowotworów związane są również białka kompleksu Shelterin, w których genach zaszły mutacje zarodkowe i somatyczne. Wśród wszystkich genów kodujących poszczególne białka kompleksu Shelterin, doniesiono że najczęściej ulegającym mutacjom jest gen kodujący białko POT1 (Fernandes i in. 2020). Mutacje występujące w obrębie genu POT1 podzielono na trzy grupy w oparciu o wpływ na strukturę i funkcjonowanie biosyntezywanego białka. Wyodrębnia się mutacje zmiany sensu w domenie wiążącej ssDNA, mutacje zmiany sensu w domenie oddziałującej z TPP1 oraz pozostałe destrukcyjne mutacje (Gong, Stock, i Liu 2020; Fernandes i in. 2020; Grill i in. 2021). Większość wariantów mutacji przyczynia się do zwiększania długości telomerów o podwyższonym poziomie kruchości. Uważa się, że zwiększona długość telomerów wywołana mutacjami POT1 może zapewnić selektywną przewagę komórkom nowotworowym. Ponadto, nadmiernie długie telomery mogą umożliwiać ominięcie

replikacyjnego punktu kontrolnego starzenia, sprzyjając powstawaniu chorób nowotworowych (Gong, Stock, i Liu 2020).

3.6. Strategie zwalczające nowotwory poprzez celowanie w komponenty telomerowe

Biorąc pod uwagę ważną i zasadniczą rolę telomerów w chorobach nowotworowych, opracowano różne strategie celowania w podjednostki telomerowe (Fernandes i in. 2020). Początkowo główny cel terapii przeciwnowotworowych stanowił enzym telomeraza, obecnie coraz większe zainteresowanie przejawiają białka kompleksu Shelterin (Bejarano i in. 2019; Bhari i in. 2021; Luo i in. 2021). Na rycinie 4 przedstawiono związki oraz grupy związków, które obecnie są najczęściej badane w potencjalnych terapiach skierowanych przeciwko chorobom nowotworowym.



Ryc. 4. Przedstawienie substancji celujących w enzym telomerazę i komponenty kompleksu Shelterin jako potencjalne podejście terapeutyczne przeciwko ludzkim nowotworom złośliwym. Wymieniono kilka klas inhibitorów telomerazy, w tym analogi nukleozydów, oligonukleotydy, nienukleozydy, nutraceutyki (pochodne izotiazolonu), stabilizatory G4-DNA. Rycinę stworzono na podstawie: (Fernandes i in. 2020).

3.6.1. Inhibitory telomerazy

Występowanie telomerazy prawie we wszystkich rozpoznawalnych nowotworach oraz brak jej aktywności lub minimalna aktywność w normalnych komórkach sprawia,

że enzym ten staje się wysoce specyficznym celem terapii nowotworowych. Większość badań dysfunkcji telomerów w chorobach nowotworowych skupiała się właśnie na hamowaniu kanonicznych i niekanonicznych działań telomerazy, dlatego jej inhibitory są atrakcyjnym narzędziem w terapiach przeciwnowotworowych (Bejarano i in. 2019; Fernandes i in. 2020; Bhari i in. 2021). Celowane w telomerazę inhibitory zostały podzielone na kilka grup, w tym: analogi nukleozydów, chemicznie modyfikowane oligonukleotydy, syntetyczne niekonkurencyjne inhibitory nienukleozydowe typu mieszanego, nutraceutyki, stabilizatory DNA G4 i inhibitory HSP90 (Ryc. 4., Tab. 5). Poprzez interakcje z telomerowym DNA, jego strukturami lub też z podjednostkami enzymu telomerazy prowadzą do obniżenia aktywności telomerazy i skracania końców telomerowych. Szczegółowe mechanizmy działania poszczególnych klas inhibitorów przedstawiono zbiorczo w tabeli 5 (Bejarano i in. 2019; Fernandes i in. 2020; Bhari i in. 2021; Luo i in. 2021).

Tab. 5. Przedstawienie wybranych klas inhibitorów telomerazy wraz z ich mechanizmem działania. Na podstawie: (Fernandes i in. 2020).

Różne klasy inhibitorów telomerazy	Mechanizm ich działania	Uzyskane wyniki i profil bezpieczeństwa
analogi nukleotydu	Poprzez włączanie się do telomerowego DNA, zapobiegają dodawaniu dNTP, hamują aktywność telomerazy, co prowadzi do uszkodzenia telomerów. Utrudniają rekrutację telomerazy do telomerowego DNA poprzez silne wiązanie się z ludzką matrycą RNA telomerazy (hTR), prowadząc do jej hamowania i skracania końców telomerowych.	Niska skuteczność w przedklinicznych modelach, związana z toksycznością i brakiem specyficzności.
modyfikowane oligonukleotydy	Utrudniają rekrutację telomerazy do telomerowego DNA poprzez silne wiązanie się z ludzką matrycą RNA telomerazy (hTR), prowadząc do jej hamowania i skracania końców telomerowych.	Tłumią wzrost komórek nowotworowych. Ograniczona toksyczność w badaniach klinicznych I/II fazy.
syntetyczne mieszanego typu niekonkurencyjne inhibitory nienukleozydowe	Powodują pomijanie wydłużania telomerów zależnego od telomerazy.	Tłumią wzrost komórek nowotworowych i indukują ich śmierć. Wysokie dawki powodują cytotoksyczność.
nutraceutyki	Tłumienie aktywności telomerazy i skracanie telomerów.	Zmniejszony wzrost guza w modelu przedklinicznym. Niska stabilność i biodostępność. Ograniczona stabilność i farmakokinetyka.
stabilizatory DNA G4	Wykazano, że G-kwadrupeks hamuje aktywność telomerazy i wydłużenie telomeru.	Wiązanie niespecyficzne z G-kwadrupeksem w promotorze i innych regionach genomu związanych z efektami poza docelowymi.
inhibitory białka szoku cieplnego 90 (HSP90)	Utrudniają przyłączenie telomerazy do telomerowego DNA.	Hamują wzrost komórek nowotworowych i indukują ich apoptozę.

Testy biochemiczne stosowane do pomiaru aktywności telomerazy *in vitro* zostały oparte na protokole amplifikacji telomerowej (TRAP). Aktywność telomerazy *in vivo* obserwowana jest poprzez miarę długości telomerów po traktowaniu wybranymi inhibitorami.

Niestety badania kliniczne prowadzone na kilku typach nowotworów wykazały, że strategia ta ma pewne ograniczenia. W mysich modelach raka efekt przeciwnowotworowy hamowania telomerazy jest osiągalny wyłącznie, gdy telomery osiągają krytycznie krótką długość. Efekt ten jest tracony przy braku genu supresorowego nowotworu p53, który w nowotworach często ulega mutacji (Bejarano i in. 2019). W pozostałych 10 – 15% nowotworów, wydłużanie telomerów osiąga się poprzez mechanizm alternatywnego wydłużania telomerów ALT (Bejarano i in. 2019; Bhari i in. 2021). Utrzymywanie mechanizmu długości telomerów i jego celowanie staje się więc bardziej złożone. Udowodniono, że oba mechanizmy mogą współistnieć w obrębie jednego guza (Gocha i in. 2013). Dynamiczna natura nowotworów w utrzymywaniu długości telomerów sugeruje, że terapie ukierunkowane na telomerazę mogą wymagać dokładnego scharakteryzowania mechanizmu wydłużania telomerów przed leczeniem, aby uzyskać maksymalne korzyści terapeutyczne (Bejarano i in. 2019; Bhari i in. 2021). Dąży się również do opracowania alternatywnych terapii celowania w telomery, zwiększających skuteczność terapii przeciwnowotworowych (Bejarano i in. 2019).

3.6.2. Inhibitory białek kompleksu Shelterin

Zmieniona ekspresja różnych podjednostek kompleksu Shelterin, a także mutacje w obrębie ich genów zauważalne w różnych typach nowotworów skierowały uwagę na kompleks Shelterin jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowych (Bejarano i in. 2019; Fernandes i in. 2020). Odślonięcie telomerów powoduje szybką śmierć komórki lub jej starzenie, nawet przy braku skracania telomerów, unikając w ten sposób niedociągnięcia przy hamowaniu telomerazy. Sytuację tę można wykorzystać jako strategię terapeutyczną przeciwko komórkom nowotworowym (García-Beccaria i in. 2015; Bejarano i in. 2017; 2019; Fernandes i in. 2020). Zależność tę oryginalnie zauważono poprzez hamowanie jednego z głównych składników Shelterin - TRF1 (García-Beccaria i in. 2015; Bejarano i in. 2017). Opisano, że indukcja otwierania telomerów przez genetyczne ubytki TRF1 lub jego chemiczne hamowanie może skutecznie blokować inicjację oraz progresję agresywnych guzów zarówno w mysim modelu raka płuc, jak i glejaka, w sposób niezależny od długości telomerów (García-Beccaria i in. 2015, 1; Bejarano i in. 2017; 2019). Wykazano również, że usunięcie TRF1 w tkankach normalnych nie powodowało poważnych defektów, ani nie skutkowało

zmniejszeniem przeżywalności myszy (usunięcie TRF1 nie wpływało na funkcje węchowce lub pamięć mózgu ani nie wpływało na tkanki o wysokiej proliferacji) (Bejarano i in. 2019). Pozytywnie przedstawiają się wyniki terapii celowanych w inne ważne podjednostki Shelterin. Gemcytabina powoduje ścieranie telomerów poprzez oddziaływanie na TRF2 i jest stosowana jako przeciwnowotworowy analog nukleozydu (Bhari i in. 2021). Przykłady te stanowią wystarczający dowód, że terapia ukierunkowana na podjednostki kompleksu Shelterin w przyszłości może okazać się obiecującym podejściem przeciwnowotworowym (Bejarano i in. 2019; Fernandes i in. 2020; Luo i in. 2021).

Opracowanie działającego modelu dedykowanego do badań oddziaływań między poszczególnymi podjednostkami kompleksu Shelterin oraz ich oddziaływań z telomerowym DNA, może usprawnić proces screeningu potencjalnych kandydatów celowanych w białka kompleksu Shelterin w terapiach nowotworowych. Uzyskane w ramach niniejszej pracy białko hTRF1 (Tab. 21.) [Wyn. i Dys. 5.1.] z sukcesem posłużyło jako model w badaniach zakłócania wiązania TIN2 z hTRF1 przez zaprojektowane *in silico*, zsyntetyzowane *de novo* peptydomimetyki z klasy małych cząsteczek, naśladujących rdzeń domeny wiążącej TIN2 (manuskrypt publikacji w przygotowaniu [Brankiewicz i in.]).

3. 7. Kooperacyjne właściwości białek i procesy ich oczyszczania

Białka w organizmach żywych pełnią bardzo ważne i różnorodne funkcje. Stanowią fundamentalne składniki we wszystkich aspektach funkcjonowania komórki. Odgrywają kluczowe role w większości procesów komórkowych w tym metabolizmie, przetwarzaniu informacji, odpowiedzi immunologicznej, adhezji komórek, podejmowaniu decyzji, transporcie i organizacji strukturalnej. Natomiast właściwości biologiczne samych białek w większości przypadków zależą od ich fizycznego oddziaływania z innymi białkami lub cząsteczkami, takimi jak metabolity, lipidy i kwasy nukleinowe (Berg 2003; Zhang 2009; Braun i Gingras 2012; Rao i in. 2014). Na przykład enzym heksokinaza wiąże glukozę i ATP, katalizując reakcję między nimi, przeciwciała przyczepiają się do wirusów lub bakterii, aby oznaczyć je do zniszczenia. Dokładnie opisane białka kompleksu Shelterin oddziałują ze sobą, a poprzez wiązanie do telomerowego DNA chronią końce chromosomów, zapewniając integralność i stabilność całych genomów. Ponadto interakcje białko-białko (PPI ang. *Protein-protein interaction*)

odgrywają kluczową rolę w funkcjach pośredniczących, takich jak wykrywanie środowiska, pośredniczenie w transdukcji sygnałów, dostosowywanie aktywności enzymów metabolicznych i sygnałowych, przekształcanie energii w ruch fizyczny oraz utrzymywanie organizacji komórkowej. Opracowanie dokładnych metod badania interakcji białek z innymi molekułami w komórkach jest więc niezwykle istotne i jest jednym z dodatkowych rezultatów niniejszej pracy (Pellegrini, Haynor, i Johnson 2004; Zhang 2009; Turner i in. 2011; Braun i Gingras 2012; Costa i in. 2014; Rao i in. 2014; Alberts i in. 2016). W rezultacie PPI stały się obecnie jednym z głównych celów biologii systemowej (Braun i Gingras 2012; Rao i in. 2014). Stanowią istotną rolę przy wnioskowaniu funkcji niezidentyfikowanych białek w komórce, poprzez przewidywanie oparte na podstawie dowodów ich interakcji z białkami, których funkcje zostały już ujawnione. Szczegółowe badania PPI przyspieszyły proces modelowania ścieżek funkcjonalnych pozwalając na zilustrowanie molekularnych mechanizmów procesów komórkowych. Scharakteryzowanie oddziaływań białek w danym proteomie jest fundamentalne dla poznania pełnej biochemii danej komórki (Pellegrini, Haynor, i Johnson 2004; Zhang 2009; Rao i in. 2014). Istotne właściwości PPI pierwotnie zostały wskazane przez Phizicky i Fields (Phizicky i Fields 1995) i brzmią następująco:

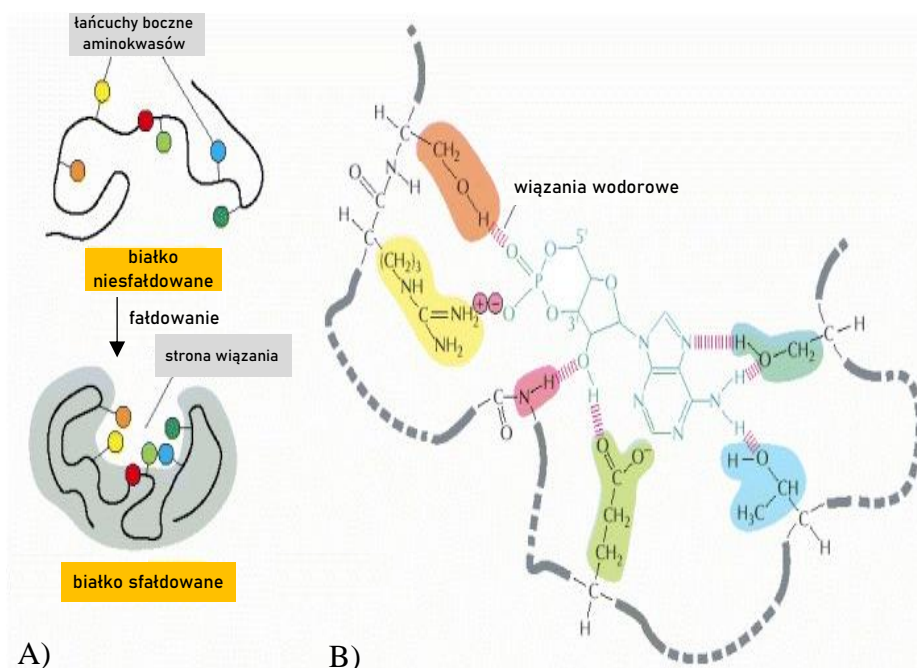
- mogą modyfikować właściwości kinetyczne enzymów;
- mogą działać jako ogólny mechanizm umożliwiający kanalizowanie substratów;
- mogą konstruować nowe miejsca wiązania dla małych cząsteczek efektorowych;
- mogą inaktywować lub tłumić białka;
- mogą zmienić specyficzność białek względem ich substratów poprzez interakcji z różnymi partnerami wiążącymi.

Wynik oddziaływań dwóch lub więcej białek z określonym celem funkcjonalnym można ustalić na kilka sposobów. Metody wykrywania PPI zostały podzielone na trzy kategorie: *in vitro*, *in vivo* oraz *in silico*. W technikach *in vitro* dany eksperyment przeprowadzany jest w kontrolowanym środowisku poza żywym organizmem. W technikach *in vivo* doświadczenie wykonywane jest na całym żywym organizmie lub w kulturach tkankowych komórek. Techniki *in silico* opierają się na symulacjach komputerowych (Rao i in. 2014). Schematyczna klasyfikacja metod wykrywania PPI została przedstawiona w tabeli 6.

Tab. 6. Podsumowanie wybranych metod wykrywania interakcji białko-białko oraz białko-biomolekuła (podkreślone na zielono). Na podstawie: (Concepcion i in. 2009; Hellman i Fried 2007; Rao i in. 2014; Rich i Myszka 2007; Barrows i Dyke 2022).

Podejście	Technika	Podsumowanie
<i>in vitro</i>	TAP-MS tandemowa chromatografia powinowactwa sprzężona ze spektroskopią mas	Opiera się na podwójnym znakowaniu białka będącego przedmiotem zainteresowania w jego <i>locus</i> chromosomalnym, a następnie dwuetapowym procesie oczyszczania i analizie spektroskopii masowej.
	chromatografia powinowactwa	Wykazuje wysoką czułość, wykrywa nawet najśłabsze interakcje pomiędzy białkami, umożliwia testowanie dużej ilości białek w próbce pod kątem interakcji w równym stopniu.
	koimmunoprecypitacja	Potwierdza interakcje przy użyciu ekstraktu z całych komórek, zawierającym białka w swojej natywnej formie w złożonej mieszaninie składników komórkowych.
	Mikromacierze białkowe	Umożliwia jednoczesną analizę tysięcy parametrów w ramach jednego eksperymentu.
	PCA (ang. <i>Protein-fragment complementation</i>)	Stosowana jest do wykrywania PPI między białkami o dowolnej masie cząsteczkowej i umożliwia wyrażanie na ich poziomach endogennych.
	Phage display	Opiera się na wynikach z włączenia białka i składników genetycznych w pojedynczą cząsteczkę bakteriofaga.
	krystalografia rentgenowska	Umożliwia wizualizację struktury danego białka na poziomie atomowym, zwiększając zrozumienie interakcji i funkcji.
	EMSA (ang. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	Podstawowa metoda, służąca do wykrywania kompleksów białkowych z kwasami nukleinowymi. Wynik interakcji uzyskuje się przez obserwację opóźnienia drogi migracji kompleksu białko-DNA w porównaniu do odpowiadającego mu wolnego DNA.
<i>in vivo</i>	BLI (ang. <i>Biolayer interferometry</i>)	Opiera się na optycznej technologii biocujników, która analizuje interakcje biomolekularne w czasie rzeczywistym bez konieczności znakowania fluorescencyjnego. Dostarcza informacji na temat siły wiązania, interakcji białek, właściwości kinetyki reakcji, takich jak stałe szybkości i szybkości reakcji.
	analiza dwuhybrydowa drożdży	Umożliwia zarówno przeprowadzanie badań ukierunkowanych na oddziaływanie między dwoma białkami, jak również poszukiwanie nowych, nieznanymi partnerów danego białka.
<i>in silico</i>	ang. <i>Synthetic lethality</i>	Opiera się na interakcjach funkcjonalnych, a nie na interakcji fizycznej. Definiowana jest jako rodzaj interakcji genetycznej, w której połączenie dwóch zdarzeń genetycznych powoduje śmierć komórki lub organizmu.
	fuzja genów	Fuzja genów, często nazywana metodą kamienia Rosetty. Opiera się na koncepcji, że niektóre białka zawierające pojedynczą domenę w jednym organizmie mogą się łączyć, tworząc białko wielodomenowe w innych organizmach.
	sekwencja oparta na ortologii	Opiera się na poszukiwaniu homologicznego charakteru białka docelowego z białkami umieszczonymi w bazach danych przy użyciu algorytmu parowania sekwencji lokalnych.
	sekwencja oparta na parach domen	Przewiduje interakcje białek na podstawie interakcji domena-domena.
	podejścia oparte na strukturze	Opiera się na przewidywaniu interakcji między dwoma białkami, pod kątem posiadania podobnej struktury (pierwotnej, drugorzędowej lub trzeciorzędowej).
	(I2H) <i>In silico</i> 2 hybrid	Opiera się na założeniu, że białka oddziałujące powinny podlegać koewolucji, aby funkcja białka była niezawodna.
	profil filogenetyczny	Profil filogenetyczny przewiduje interakcję między dwoma białkami, jeśli mają ten sam profil filogenetyczny.

W rzeczywistości wszystkie białka oddziałują lub wiążą się z różnymi cząsteczkami. Siła wiązania w zależności od przypadku może być różna, czasami wiązanie jest bardzo ciasne i silne, a innym razem może być słabe i krótkotrwałe. W przeciwieństwie do tego, wiązanie zawsze wykazuje wysoką specyficzność (każda cząsteczka białka może zwykle wiązać tylko jedną lub kilka cząsteczek z wielu różnych typów). Substancja, która jest wiązana przez białko – jest określana jako ligand dla tego białka (od łacińskiego słowa *ligare*, co oznacza „wiązać”) (Pellegrini, Haynor, i Johnson 2004; Schumann i Ferreira 2004; Braun i Gingras 2012; Costa i in. 2014; Rao i in. 2014). Zdolność białek do selektywnego wiązania się z ligandem o wysokim powinowactwie zależy od powstania zestawu słabych, niekowalencyjnych wiązań m. in. wiązań wodorowych, jonowych, oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływań hydrofobowych. Ponieważ każde pojedyncze wiązanie jest słabe, efektywna interakcja wiązania wymaga tworzenia wielu słabych wiązań jednocześnie. Jest to możliwe tylko wtedy, gdy kontury powierzchni cząsteczki ligandu są bardzo ściśle wyrównane z białkiem, dopasowując je na zasadzie klucza i dziurki od klucza co przedstawia rycina 5. (Turner i in. 2011; Braun i Gingras 2012; Rao i in. 2014; Alberts i in. 2016).



Ryc. 5. Schemat przedstawiający tworzenie się zestawu wiązań. A) Fałdowanie łańcucha polipeptydowego tworzącego szczelinę lub wgłębienie na powierzchni białka. Szczelina ta zawiera zestaw łańcuchów bocznych aminokwasów ułożonych w taki sposób, aby tworzyć wiązania niekowalencyjne tylko z pewnymi ligandami. B) Zbliżenie na rzeczywiste miejsce wiązania pokazujące wiązania wodorowe i oddziaływania jonowe utworzone między białkiem a jego ligandem (w tym przykładzie cykliczny AMP jest związanym ligandem). Rycinę stworzono na podstawie: (Alberts i in. 2016).

W obecnej pracy metody przeznaczone do wykrywania interakcji białko-biomolekuła posłużyły w celu potwierdzenia natywnych właściwości uzyskanych rekombinantowych białek z kompleksu Shelterin (Tab. 21.) w wiązaniu się do telomerowego dsDNA (Tab. 27.) i peptydów TIN i Apollo (Tab. 28.) [Wyn i Dys. 5.3., Wyn. i Dys. 5.4.]

Właściwość oddziaływania białek ze specyficznymi ligandami w ostatnich latach nabrała coraz większego znaczenia również w procesach ich oczyszczania. Zawdzięcza się to zauważalnemu w obecnych czasach rozwojowi metod umożliwiających uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji genów kodujących białka rekombinantowe w biotechnologii i inżynierii genetycznej, wymuszając konieczność opracowania wydajniejszych procesów ich oczyszczania (Magdeldin 2012). Proces oczyszczania białek w uogólnieniu można nazwać szeregiem różnych zachodzących po sobie etapów dążących do izolacji pojedynczego białka lub typów białek ze złożonych mieszanin. Metody oczyszczania opierają się na różnicy w ich właściwościach fizycznych bądź chemicznych. Jako najczęściej wykorzystywane możemy wyróżnić różnice w: wielkości (długości łańcucha polipeptydowego lub masy), wypadkowym ładunku elektrycznym, właściwościach hydrofobowych, czy wyżej opisanym powinowactwie do specyficznych ligandów (Magdeldin 2012; Turner i in. 2011). Technika najczęściej wykorzystującą ostatnio wspomnianą właściwość jest chromatografia powinowactwa. Szerokie zastosowanie tej metody oparte jest na fakcie, że każda biocząsteczka, którą chce się oczyścić, ma zwykle nieodłączne miejsce rozpoznawalne, przez które może zostać związane przez inną naturalną lub sztuczną cząsteczkę (Dong, Feng, i Sun 2010). Można zatem powiedzieć, że chromatografia powinowactwa opiera się głównie na rozpoznawaniu cząsteczki docelowej przez cząsteczkę związaną z kolumną (Liu i in. 2010; Magdeldin 2012). Na rozwój technik chromatografii powinowactwa bezpośredni wpływ miało opracowanie całego szeregu etykiet (His-tag, FLAG, GST, itd.), a także zmodyfikowanych białek fuzyjnych (Dong, Feng, i Sun 2010; Magdeldin 2012). Etykiety lub inaczej znaczniki białkowe to sekwencje peptydowe dołączane do końca N- lub C-rekombinantowego białka. Etykietą może być zarówno krótka sekwencja kilku lub kilkunastu aminokwasów, a także cała domena białkowa lub białko. Wybrany znacznik jest kodowany przez odpowiadającą mu sekwencję nukleotydową dołączoną tuż za kodonem start lub tuż przed kodonem stop docelowego białka, w wyniku czego przy ekspresji genu powstaje białko fuzyjne. Wśród najczęstszych funkcji jakie pełnią etykiety

wyróżnia się: ułatwienie detekcji i oczyszczania docelowych białek, zwiększanie ich rozpuszczalności, a także stosuje się je jako marker ekspresji genów. Etykiety powinny charakteryzować się łatwością do wykrycia oraz usunięcia, wykazywać wysokie powinowactwo do złoża przeznaczonego do jego oczyszczania, nie powinny wpływać na wyższe struktury białka rekombinowanego (Brizzard 2008; Dong, Feng, i Sun 2010; Magdeldin 2012). Zatem wymienione cechy znaczników białkowych wpłynęły nie tylko znacząco na rozwój technik chromatograficznych, lecz także na poprawę biosyntezy białek rekombinantowych w bakteryjnych systemach ekspresyjnych. Dominującym gospodarzem do produkcji białek rekombinowanych pozostaje dalej *E. coli*, dzięki korzystnej, szybkiej i niedrożej oraz wysokiej wydajności produkcji białek, wraz z dobrze scharakteryzowaną genetyką i różnorodnością dostępnych narzędzi molekularnych (Schumann i Ferreira 2004; Demain i Vaishnav 2009; Young, Britton, i Robinson 2012; Rosano i Ceccarelli 2014; Krefft i in. 2022). Jako system bakteryjny *E. coli* posiada jednak ograniczenia w ekspresji bardziej złożonych białek ze względu na brak wyrafinowanej maszynerii do wykonywania modyfikacji potranslacyjnych, co skutkuje słabą rozpuszczalnością części białek, szczególnie eukariotycznych, będących przedmiotem zainteresowania, które często wytwarzane są jako ciała inkluzyjne. Zastosowanie odpowiedniej etykiety może częściowo lub całkowicie rozwiązać ten problem (Schumann i Ferreira 2004; Demain i Vaishnav 2009; Kamionka 2011; Costa i in. 2014; Rosano i Ceccarelli 2014). Najczęściej używane etykiety wspomagające oczyszczanie, wykorzystujące właściwości powinowactwa do innych cząsteczek zostały przedstawione w tabeli 7, natomiast etykiety zwiększające rozpuszczalność białek rekombinowanych przedstawiono w tabeli 8.

Tab. 7. Etykiety stosowane przy oczyszczaniu chromatografii powinowactwa na podstawie: (LaVallie i McCoy 1995; Brizzard 2008; Malhotra 2009; Costa i in. 2014)

Etykieta	Białko/peptyd	Wielkość (aa)	Ligand	Elucja
(His ₆)	polihistydyna	6-10	jony Ni ²⁺	konkurencja z imidazolem
FH8	<i>Fasciola hepatica</i> 8-kDa antygen	69	hydrofobowy (interakcja zależna od wapnia)	czynniki chelatujące jony Ca ²⁺ , np. EDTA, manipulacja pH
Flag	peptyd Flag	8	przeciwciała Any-FLAG	konkurencja z FLAG
Strep-II	peptyd wiążący streptawidynę	8	streptawidyna	konkurencja z biotyną i jej pochodnymi
GST	transferaza-S-glutationowa	211	glutation	brak glutationu
MBP	białko wiążące maltozę	396	amyloza	konkurencja z maltozą
CBP	białko wiążące kalmodulinę	26	imobilizowana kalmodulina	czynniki chelatujące jony Ca ²⁺
HaloTag	zmutowana dehalogenaza	~300	chloroalkan	wiązanie kowalencyjne i uwalnianie proteolityczne białka docelowego
Protein A	białko gronkowcowe A	280	imobilizowane IgG	manipulacja pH (kwaśne)
CBM	moduł wiążący celulozę	*	celuloza	mocznik i guanidyna-HCl lub glikol etylenowy
IMPACT (CBD)	domena wiążąca chitynę	51	chityna	indukcja samorozszczepienia za pomocą ditiotretolu, β-merkaptotetanolu lub cysteiny
DOCK	domena dokerin z <i>Clostridium josui</i>	22	kohezyna-celuloza	czynniki chelatujące jony Ca ²⁺
Tamavidin	białko podobne do fungalawidyny	~140	biotyna	nadmiar wolnej biotyny podczas stosowania Tamavidin2-REV

*kilka rozmiarów (Od 4 do 20 (kDa)

Tab. 8. Etykiety zwiększające rozpuszczalność białek rekombinowanych na podstawie: (Esposito i Chatterjee 2006; Malhotra 2009; Costa i in. 2014).

Etykieta	Białko/peptyd	Wielkość (aa)	Organizm
FH8	<i>Fasciola hepatica</i> 8-kDa antygen	69	<i>Fasciola hepatica</i>
MBP	białko wiążące maltozę	396	<i>E. coli</i>
HaloTag	zmutowana dehalogenaza	~300	<i>Rhodococcus sp.</i>
Trx	tiodoksyna	109	<i>E. coli</i>
GST	transferaza-S-glutationowa	211	<i>Schistosoma japonicum</i>
UB	ubikwityna	76	wiele eukariotycznych
SUMO	mały modyfikator związany z ubikwityną	~100	<i>Homo sapiens</i>
SET	sekwencje peptydowe zwiększające rozpuszczalność	<20	syntetyczne
T7PK	kinaza białkowa faga T7	~240	<i>Bakteriofag T7</i>
CaBP	domena wiążąca jony wapnia	134	<i>Entamoeba histolytica</i>
Ecotin	inhibitor trypsyny <i>E. coli</i>	162	<i>E. coli</i>

Dzięki ogólnodostępności przeciwciał przeciwko znacznikom fuzyjnym można je stosować do „uniwersalnego” oczyszczania i wykrywania znakowanych białek (tj. bez konieczności uzyskiwania lub opracowywania sondy dla każdego specyficznego białka rekombinantowego). Pomimo wielu zalet jakie wiążą się ze stosowaniem etykiet mogą one potencjalnie zakłócać prawidłową strukturę i funkcjonowanie białka docelowego. Dlatego usunięcie znaczników fuzyjnych od docelowych białek jest często koniecznym i końcowym etapem ich oczyszczania (Costa i in. 2014; Malhotra 2009; Waugh 2011).

Etykiety fuzyjne najczęściej usuwane są od białek docelowych przy użyciu trawienia enzymatycznego, przy zastosowaniu specyficznych dla miejsca cięcia proteaz w łagodnych warunkach. Stosowane jest także trawienie chemiczne, przy użyciu np. kwasu mrówkowego, które jest mniej swoiste w porównaniu ze strategią enzymatyczną i wymaga trudnych warunków, które mogą wpływać na stabilność i rozpuszczalność białka docelowego. Trawienie enzymatyczne mimo przewagi nad chemicznym nie jest wolne od wad. Wydajność enzymatycznego usuwania etykiet może znacząco się różnić się w zależności od rodzaju białek i często wymaga optymalizacji warunków cięcia metodą prób i błędów (Malhotra 2009; Li 2011; Waugh 2011; Costa i in. 2014).

Do usuwania znaczników można użyć dwóch rodzajów endoproteaz serynowych, takich jak aktywowany czynnik krzepnięcia krwi X (czynnik Xa), enterokinaza i α -trombina, oraz proteazy wirusowe, m. in. wirus trawienia tytoniu (TEV) i proteaza 3C wirusa rinowirusa. Endoproteazy są użytecznymi narzędziami do usuwania N-końcowych znaczników fuzyjnych, ponieważ rozcinają one polipeptyd blisko końca C- ich miejsca rozpoznawania, pozostawiając w ten sposób docelowe białko z jego natywną sekwencją N-końcową (Costa i in. 2014; Li 2011; Malhotra 2009; Waugh 2011; Young, Britton, i Robinson 2012). Wymienione wyżej i inne często stosowane proteazy zostały przedstawione w tabeli 9.

Tab. 9. Powszechnie stosowane endoproteazy przeznaczone do usuwania znaczników białkowych. Na podstawie: (Malhotra 2009; Costa i in. 2014).

Proteaza	Pochodzenie	Miejsce cięcia
TEV	proteaza z wirusa wżerkowej plamistości tytoniu	ENLYFQ/G
EntK	enterokinaza	DDDDK/
Xa	czynnik Xa	IEGR/
Thr	trombina	LVPR/GS
PreScission	genetycznie zmodyfikowana pochodna proteazy 3C ludzkiego wirusa rinowirusa	LEVLFQ/GP
SUMO	rdzeń katalityczny Ulp1	Rdzeń katalityczny Ulp1 rozpoznaje strukturę trzeciorzędową SUMO i tnie na końcu C konserwowanego Gly-Gly.

Pomimo powszechnego stosowania etykiet fuzyjnych ich usuwanie nadal stwarza kilka trudności, takich jak: niespecyficzne cięcie z powodu rozpoznania liniowej sekwencji aminokwasowej, nieefektywne cięcie ze względu na przeszkodę steryczną lub obecność niekorzystnych pozostałości wokół miejsca cięcia, niska wydajność oczyszczania białka po usunięciu znacznika, czy wysokie koszty proteaz i żmudna optymalizacja warunków cięcia. Stąd usuwanie znacznika dodaje kolejne etapy złożoności do procesów oczyszczania rekombinowanych białek (Brizzard 2008; Malhotra 2009b; Li 2011; Waugh 2011; Young, Britton, i Robinson 2012; Costa i in. 2014).

3.7.1. Etykieta polihistydynowa (His)

Znacznik histydynowy stanowi jedną z najczęściej używanych etykiet fuzyjnych w procesach nadprodukcji i oczyszczania białek rekombinantowych. Zbudowany jest z sześciu lub więcej kolejnych reszt histydynowych (Dong, Feng, i Sun 2010; Magdeldin 2012; Spriestersbach i in. 2015). W większości przypadków nie wpływa negatywnie na poprawność fałdowania się białek w trakcie biosyntezy oraz nie zaburza struktury ani funkcji produkowanego białka. Wykazuje również bardzo niską immunogenność oraz kompatybilność z większością dalszych zastosowań otrzymanego białka (Carson i in. 2007; Spriestersbach i in. 2015; Booth i in. 2018). Zawdzięcza to małemu rozmiarowi (0,84 kDa w przypadku znacznika heksahistydynowego) oraz nie posiadaniu ładunku w fizjologicznym pH. Rekombinantowe białka ze znacznikiem His mogą ulegać nadprodukcji i oczyszczaniu w różnych systemach ekspresyjnych (Spriestersbach i in. 2015).

Do oczyszczania rekombinantowych białek fuzyjnych posiadających tę etykietę wykorzystywana jest chromatografia z unieruchomionym jonem metalu – IMAC (ang. *immobilized metal affinity chromatography*). Oparta jest na powinowactwie reszt histydyny do unieruchomionych jonów metali (np. Ni^{2+} , Cu^{2+} lub Co^{2+}). Jony metali są unieruchamiane na matrycach chromatograficznych przez ligand chelatujący, najczęściej kwas nitrylotriooctowy (NTA) lub kwas iminodioctowy (IDA). NTA przewyższa pod względem miejsc chelatujących IDA, co skutkuje stabilniejszym wiązaniem jonów metali, powodując zmniejszone wymywanie imobilizowanych jonów (Block i in. 2009; Magdeldin 2012; Spriestersbach i in. 2015; Booth i in. 2018). Zaletę stanowi również proces elucji białek posiadających etykietę His ze względu na łagodne i elastyczne warunki (100 – 500 mM imidazol, pH 5,9 – 4,5 lub EDTA) (Block i in. 2009; Magdeldin 2012; Spriestersbach i in. 2015). Białka fuzyjne ze znacznikiem His można oczyszczać zarówno w warunkach natywnych jak i w warunkach denaturujących, ze względu na zależność powinowactwa His wyłącznie od jego struktury pierwszorzędowej. Wykorzystując tę właściwość można pominąć omówione wyżej ograniczenie w nadprodukcji białek w systemie *E. coli*, skutkujące słabą rozpuszczalnością białka będącego przedmiotem zainteresowania i jego agregacją do nierozpuszczalnych ciał inkluzyjnych. Oczyszczanie białek z etykietą His na złożach IMAC w warunkach denaturujących wykonuje się przy użyciu silnych związków denaturujących, takich jak 8 M mocznik lub 6 M chlorowodorek guanidyny. Nie wpływają one negatywnie na złożę,

dotatkowo wywołane przez nie warunki denaturujące powodują zwiększenie wiązania się białek ze znacznikiem His do matrycy Ni-NTA. Dzieje się tak ze względu na całkowite odsłonięcie znacznika His, przy jednoczesnym zmniejszeniu potencjału nieoznakowanych białek do współocyszczania (Magdeldin 2012; Spriestersbach i in. 2015). W wielu przypadkach współocyszczające się zanieczyszczenia można usunąć stosując bardziej rygorystyczne warunki wiązania oraz elucji, zwiększając stężenie imidazolu, stężenie NaCl do 2 M lub dodając niskie stężenia detergentów. Parametrem mającym bardzo duży wpływ na czystość preparatu białkowego stanowi również stosunek żywicy Ni-NTA do białka znakowanego His. Stosunkowo wysokie powinowactwo i specyficzność etykiety His w większości przypadków skutkuje wydajnym oczyszczaniem, z wysokim stopniem czystości docelowego preparatu, przy zastosowaniu pojedynczego etapu oczyszczania wykorzystującego IMAC. Otrzymany w jednoetapowym procesie oczyszczania preparat jest wystarczająco czysty dla wielu dalszych zastosowań (Spriestersbach i in. 2015).

3.7.2. Etykiety oparte na homologach ubikwityny

Ubikwityna (Ub ang. *ubiquitin*) zbudowana jest z 76 reszt aminokwasowych o całkowitej masie cząsteczkowej 8,6 kDa. Białko to jest elementem uniwersalnej modyfikacji białek występującym u wszystkich organizmów eukariotycznych, zwanej ubikwitynacją. Pomimo, że zjawisko to nie występuje w organizmach bakteryjnych, wykazano, że białka sprzężone z Ub ulegają zwiększonej nadprodukcji w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Ponadto są łatwiejsze do oczyszczenia i renaturacji niż niehybrydowe białka obce (Wojtowicz i in. 2005; Butt i in. 2005; Marblestone i in. 2006). Wykazano, że Ub oraz jej homologi Ulp (ang. *ubiquitin-like protein*) promują prawidłowe fałdowanie się białek docelowych oraz zwiększają ich rozpuszczalność prawdopodobnie przez wywieranie efektów opiekuńczych, działając podobnie do chaperonów (Khorasanizadeh, Peters, i Roder 1996; Costa i in. 2014). Postawiono również hipotezę, że omawiane znaczniki fuzyjne zwiększają rozpuszczalność pożądanego białek, działając jako jądro fałdowania („hipoteza stopionej kulki”) (Englander 2000). Innymi słowy, przedstawiona teoria sugeruje, że znacznik fuzyjny działa jako miejsce zarodkowe, w którym rozpoczyna się proces prawidłowego fałdowania pożądanego białka (Englander 2000; Butt i in. 2005). Przedstawione zachowanie etykiet Ulp tłumaczone jest przez fakt, że Ub jest najszybciej fałdującym się białkiem w przyrodzie. Ponadto białka Ub i Ulp mają wysoce hydrofobowy rdzeń

w połączeniu z hydrofilową powierzchnią (Khorasanizadeh, Peters, i Roder 1996; Englander 2000; Butt i in. 2005; Marblestone i in. 2006; Wang i in. 2012; Costa i in. 2014). Ze wszystkich Ulp za najbardziej rozwijaną oraz dającą najlepsze rezultaty uważa się etykietę SUMO (ang. *Small ubiquitin related modifier*) (Gill 2004; Butt i in. 2005; Marblestone i in. 2006; Wang i in. 2012; Costa i in. 2014). Docelowe białka fuzyjne związane z Ub/ SUMO są zwykle oczyszczane za pomocą chromatografii powinowactwa w połączeniu ze znacznikiem His (His-Ub, His-SUMO) (Costa i in. 2014). Etykieta SUMO umożliwia bioprodukcję rekombinantowych białek w innych od komórek bakteryjnych gospodarzach, a mianowicie komórkach owadzych i innych organizmów eukariotycznych (Costa i in. 2014). Usuwanie Ub i Ulp w porównaniu do innych etykiet sprawia mniej problemów, omijając kilka wcześniej wymienionych trudności takich jak: niespecyficzne cięcia z powodu rozpoznania liniowej sekwencji aminokwasowej, czy obecność niekorzystnych pozostałości wokół miejsca cięcia. Zawdzięcza się to wykorzystaniu enzymu występującego w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* - proteazy UBP1. UBP1 jest proteazą cysteinową o długości 809 aminokwasów, która odcina ubikwitynę od białek przyłączonych do jej C-końca, wiążąc się z Ub poprzez wiązanie estrowe podczas trwania reakcji (Wojtowicz i in. 2005; Wojtowicz-Krawiec i in. 2014). Aktywność proteazy zależy od jej zdolności do odcinania peptydu Ub połączonego przez jego C-koniec z białkiem docelowym, niezależnie od sekwencji aminokwasowej połączonego ugrupowania (Wojtowicz i in. 2005; Wojtowicz-Krawiec i in. 2014).

Właściwości Ub poprawiające bioprodukcję białek rekombinantowych w ekspresyjnym systemie *E. coli* z sukcesem zostały wykorzystane do efektywnej nadprodukcji i oczyszczania domen wiążących Myb1 i Myb2 fuzji z Ub. Zastosowanie homologicznego enzymu UBP1 (UBPD2C), opracowanego przez zespół Wojtowicz-Krawiec (Wojtowicz-Krawiec i in. 2014), umożliwiło bezproblemowe usunięcie domeny Ub z fuzji.

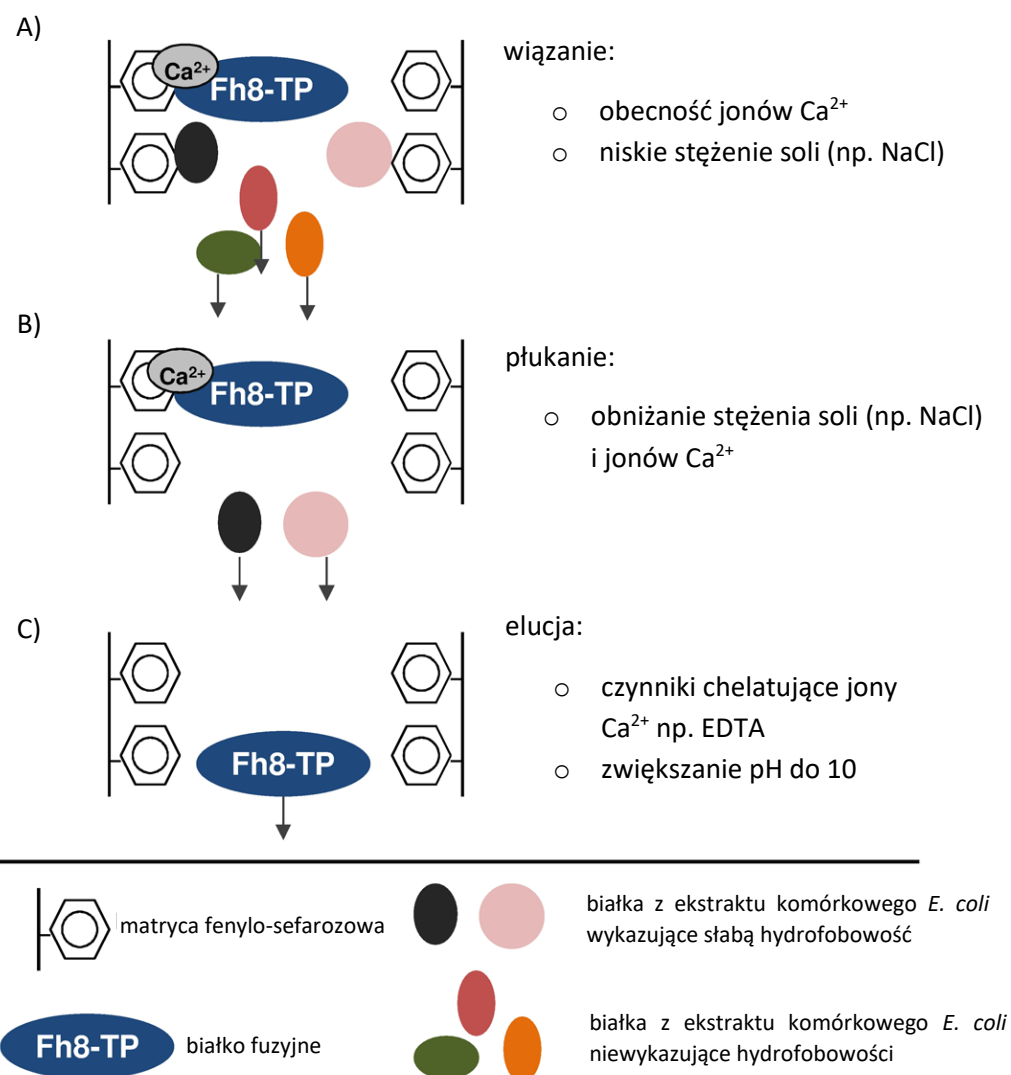
3.7.3. Etykieta Fh8

Etykieta Fh8 oznaczona w GenBanku pod numerem ID: AF213970.1 to jedna z obiecujących nowych technologii w produkcji rekombinowanych białek fuzyjnych, rozwijająca już istniejące znaczniki. Jest jedynym z nielicznych znaczników wymienionych w obu wyżej przedstawionych tabelach, wykazując jednocześnie właściwości wzmacniające rozpuszczalność i ułatwiające oczyszczanie.

W rzeczywistości Fh8 jest jednym z niewielu istniejących znaczników fuzyjnych, które oferują połączenie tych cech. Ponadto ze względu na niską masę cząsteczkową (8 kDa) przeważa nad innymi dużymi znacznikami fuzyjnymi w produkcji rekombinowanych białek w *E. coli* (Costa i in. 2014).

W naturze Fh8 jest małym antygenem wydzielanym przez pasożyta *F. hepatica* we wczesnych stadiach infekcji. Białko to znaleziono na powierzchni pasożyta i sugerowano, że mogło być użytecznym narzędziem do diagnozy, wytworzenia szczepionki i opracowania leków przeciwko infekcjom *F. hepatica*. Natomiast wytworzenie rekombinowanego Fh8 w *E. coli* doprowadziło do opracowania nowej, szybkiej i prostej immunodetekcji infekcji *F. hepatica*. Co więcej, produkowana rekombinacyjnie w *E. coli*, etykieta Fh8 okazała się być wysoce rozpuszczalną i niezwykle termostabilną domeną białkową, utrzymującą integralność struktury drugorzędowej do 74°C (Silva i in. 2004; Fraga i in. 2010; Costa i in. 2014).

Udowodniono, że Fh8 wykazuje wysoką homologię z białkami wiążącymi wapń i należy do kalmodulinopodobnej rodziny CaBP EF-hand. Białka tej rodziny są strukturalnie zorganizowane przez motywy EF-hand, stanowią strukturę helisa-pętla-helisa, która uczestniczy w koordynacji jonów Ca^{2+} . W białkach sensorowych Ca^{2+} takich jak kalmodulina i toponina C fizjologiczne zmiany poziomu wapnia po związaniu jonów Ca^{2+} tłumaczone jest poprzez przechodzenie zmian konformacyjnych. W białkach tego typu otwarcie struktury EF-handu odsłania hydrofobową powierzchnię, umożliwiając wiązanie cząsteczki docelowej. Opisywana domena Fh8 przedstawia dwa motywy EF-hand i została scharakteryzowana jako białko sensorowe Ca^{2+} . Podczas wiązania jonów wapnia, Fh8 przełącza się z konformacji zamkniętej (stan apo) do konformacji otwartej (stan obciążony wapniem). Z powodu reorientacji cztery helisy odsłaniają duży hydrofobowy region, który działa jako powierzchnia wiążąca cel. Oczyszczanie białek połączonych z tą etykietą opiera się na wyżej opisanych właściwościach białek z rodziny EF-hand z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC, ang. *hydrophobic interaction chromatography*) (Bhattacharya, Bunick i Chazin 2004; Silva i in. 2004; Zhou i in. 2006; Fraga i in. 2010; Schwaller 2010; Chazin 2011; Costa i in. 2014). Dokładny schemat oczyszczania rekombinowanych białek fuzyjnych zawierających etykietę Fh8 został przedstawiony i opisany na rycinie 6.



Ryc. 6. Schemat przedstawiający strategię oczyszczania białka z wykorzystaniem metodologii Fh8-HIC. (A) Etap wiązania: białko fuzyjne z Fh8 oddziałuje z matrycą hydrofobową w obecności wapnia i niskiego stężenia soli. Ten wstępny warunek wiązania zmniejsza niespecyficzne wiązanie innych białek z ekstraktów *E. coli*. (B) Etap płukania: poprzez obniżenie stężenia jonów soli (np. NaCl) i wapnia wypłukiwane są słabo oddziałujące białka, gdy białko fuzyjne z Fh8 dalej pozostaje związane z matrycą hydrofobową. (C) Etap elucji: czynnik chelatujący wapń np. EDTA, zakłóca zależne od wapnia wiązanie z Fh8, co powoduje elucję białka fuzyjnego z hydrofobowej matrycy. Rycinę stworzono na podstawie: (Costa i in. 2014).

Biorąc pod uwagę wysoką rozpuszczalność i stabilność Fh8 podczas nadprodukcji w systemie *E. coli* wraz z jego właściwościami odsłaniania regionów hydrofobowych zależnych od obecności Ca^{2+} , ułatwiających oczyszczanie rekombinowanych białek, wybrano ten znacznik do poprawy bioprodukcji i oczyszczania ludzkich białek z kompleksu Shelterin: hTRF1, hTRF2. W dalszej części pracy zalety etykiety Fh8 zostaną udowodnione poprzez uzyskanie pełnych wariantów tych białek, które nie są

powszechnie biosyntezywane w bakteryjnych systemach ekspresyjnych [Wyn. i Dys. 5.1.1.].

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Materiały podstawowe i sprzęt

- aparat do elektrotransferu Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, CA, USA)
- aparat do pomiarów oddziaływań BLItz (Sartorius, Niemcy)
- bloki grzewcze: IncuBlock (Denville Scientific Inc, MA, USA), TB2 Thermoblock (Biometra, Niemcy)
- cyfrowy aparat fotograficzny EOS 450D (Canon, Japonia)
- dezintegratory ultradźwiękowe: Sonic Ruptor 400, Sonic Ruptor 4000 (Omni International Inc. GA, USA) Soniprep 150 (MSE, UK)
- elektroporator GenePulser Xcell™ (BioRad, CA, USA)
- filtry strzykawkowe 0,22 μm, 0,45 μm (Biosens, Polska)
- inkubatory BF 53 (Binder, Niemcy)
- inkubatory-wytrząsarki powietrzne: Excella E25, Innova 43 (Eppendorf, Niemcy), ES-20/60 (BioSan, Polska)
- kolektor frakcji: BioFrac™ (BioRad, CA, USA)
- komora laminarna (Alpina, Polska)
- koncentratory odśrodkowe: Amicon Ultra -15 Centrifugal Filters Devices [3, 10K] (MERCK, Niemcy), Vivaspin® Turbo 15 10,000 MWCO (Sartorius, Niemcy)
- kuchenka mikrofalowa (Samsung, Korea Południowa)
- kuwety do elektroporacji o szczelinie 2 mm (Merck, Niemcy)
- lodówka chromatograficzna TSX Series High-Performance (Thermo Scientific, MA, USA)
- lodówki 4-8°C (Frost, Bochnia, Polar; Polska)
- łaźnia wodna Precision GP 150 (Thermo Scientific, MA, USA)
- membrana do elektrotransferu Amersham Hybond P 0,2 μm PVDF (Cytiva, UK)
- membrana filtracyjna Millipore Express® Plus (Merck, Niemcy)
- membrany ultrafiltracyjne Ultracel® 3, 10 kDa (Merck, Niemcy)
- mieszadła magnetyczne: Magnetic Stirrer RT Basic – 22, Cimarec Multipoint (Thermo Scientific, MA, USA), MR Hei-Mix S (Heidolph, Niemcy)

- mikrowirówka Sigma 1-14K (Sigma, Niemcy)
- mikrowirówka z chłodzeniem Sigma 1-14K (Sigma, Niemcy)
- negatoskop NGP10 do analizowania żeli poliakrylamidowych (UltraViol, Polska)
- bioreaktor RTS – 1C (BioSan, Polska)
- palnik gazowy Phoenix II^{eco} (Schuett-biotec, Niemcy)
- pH metr (Hanna Instruments, RI, USA)
- pionowy sterylizator parowy ASVE (SMS, Polska)
- płyta grzewcza (Denville Scientific Inc., USA)
- pompa perystaltyczna MasterFlex L/S (Cole Palmer, IL, USA)
- pompa próżniowa VCP 80 (VVR, PA, USA)
- programy komputerowe: ChromLab wersja 6.1.27.0 edycja standardowa (BioRad, CA, USA), BLItz Pro wersja 1.3.1.3 (Molecular Devices LLC., CA, USA), Azure Biosystems wersja 1.7.6.1202 (Azure Biosystems, Inc, CA, USA), UNSCAM IT Gel™ wersja 6.1. (Silk Scientific Corporation, UT, USA), Picasa³ wersja 3.9.141. (Google Inc, CA, USA), Gnu Image Manipulation Program (GIMP) wersja 2.10.22 (Spencer Kimball, Peter Mattis & GIMP Development Team), AmS Calculator (EnCor Biotechnology Inc., FL, USA), Weight to Molar Quantity (for proteins), Weight to Molar Quantity (for nucleid acids) (Meridian Bioscience, OH, USA) Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator 1997-2015 (Northwestern University, USA), SnapGene Viewer wersja 6.0.2 (GSL Biotech LLC, CA, USA), Microsoft office (Microsoft Corporation, WA, USA)
- spektrofotometr do pomiaru mikro ilości DNA/białek Colibri (Titertek Berthold, Niemcy)
- spektrofotometr UV/VIS 7205 (Cole Palmer, IL, USA)
- sterylizator parowy Classic (Prestige Mediacal, USA)
- system dokumentacji żeli Azure 600 (Azure Biosystems, Inc, CA, USA)
- szkło laboratoryjne (Chemland, Polska; Vitalb, Niemcy)
- średniociśnieniowy system chromatografii cieczowej NGC (BioRad, CA, USA)
- termocyklery do reakcji PCR: Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, MA, USA), T100 Thermal Cycler (BioRad, CA, USA)
- transilumiator Bio View blue light (Biostep, Niemcy)

- transiluminator UV (Labnet International Inc., NY, USA)
- wagi laboratoryjne: WTB 200, WTB 2000, AS 220/C/2 (Radwag, Polska)
- wirówki z chłodzeniem 3-18K oraz 6-16KS (Sigma, Niemcy)
- worki dializacyjne 3K, 10-12K (Merck, Niemcy)
- wortex Rea top (Heidolph, Niemcy)
- wyciąg laboratoryjny (Flores Valles, Hiszpania)
- wytrząsarka 100 Rocking Platform Rocker (VWR, PA, USA)
- zamrażarka -20°C (Liebherr, Niemcy)
- zamrażarka -80°C U410S (Eppendorf, Niemcy)
- zasilacze do elektroforezy: EV 231 (Consort, Belgia), Novex PowerEase 500 (Invitrogen, MA, USA), PowerPac™ Basic power supply, PowerPac™ Universal (BioRad, CA, USA)
- zestaw do elektroforezy poliakryloamidowej (BioRad, CA, USA)
- zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Niemcy)
- zestawy do elektroforezy agarozowej: Sub-Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT, MiniSub-Cell GT (BioRad, CA, USA)

4.2. DNA

- pET28a(+): *ori* f1, Kan^R, P_{T7}, 5369 pz (Merck, Niemcy)
- pET28a_FH8_TRF1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne Fh8_TEV_hTRF1_His, 6775 pz (GenScript, NJ, USA)
- pET28a_hTRF1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający uzyskany na drodze mutagenyzy ukierunkowanej gen kodujący białko fuzyjne Fh8_TEV_hTRF1_KA_His, 6778 pz,
- pET28a_His_Ubiq_hTRF1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne His_Ub_hTRF1, 6848 pz (GenScript, NJ, USA)
- pET28a_His_hTRF1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający uzyskany na drodze mutagenyzy ukierunkowanej gen kodujący białko fuzyjne His_hTRF1, 6611 pz
- pET28a_FH8_hTRF2_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne Fh8_TEV_hTRF2_KA_His, 6955 pz (GenScript, NJ, USA)

- pET28a_His_Ubiq_hTRF2_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne His_Ub_hTRF2, 7031 pz (GenScript, NJ, USA)
- pET28a_His_hTRF2_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający uzyskany na drodze mutagenyzy ukierunkowanej gen kodujący białko fuzyjne His_hTRF2, 6794 pz
- pET28a_His_Ubiq_Myb1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne His_Ub_Myb1, 5717 pz (GenScript, NJ, USA)
- pET28a_His_Myb1_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający uzyskany na drodze mutagenyzy ukierunkowanej gen kodujący białko fuzyjne His_Myb1, 5480 pz
- pET28a_His_Ubiq_Myb2_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający gen kodujący białko fuzyjne His_Ub_Myb2, 5702 pz (GenScript, NJ, USA)
- pET28a_His_Myb2_E.coli: plazmid pET28a(+) zawierający uzyskany na drodze mutagenyzy ukierunkowanej gen kodujący białko fuzyjne His_Myb2, 5069 pz
- pRK793: *ori* M13, Amp^R, P_{lacIq}, P_{tac}, gen kodujący białko fuzyjne MBP_TEV, 7405 pz (Addgene)
- pUC19 *ori* pMB1, Amp^R, LacZ α , 2686 pz (New England Biolabs, MA, USA)
- pUC19_s2 modyfikowany plazmid pUC19 zawierający 2 powtórzenia telomerowe 5' TTAGGGTTAGGG 3'
- pENTR TERRA: *ori* pMB1, Kan^R, P_{T7}, 3646 pz (Addgene)

4.3. Pożywki i podłoża bakteryjne

Sposób przygotowania używanych w niniejszej pracy pożywek i podłoży mikrobiologicznych przedstawiono w tabeli 10.

Tab. 10. Skład poszczególnych pożywek i podłoży mikrobiologicznych.

Nazwa / pH	Skład na 1000 ml		Uwagi
pożywka LB pH 7,0 ± 0,2	trypton / pepton sojowy	10 g	brak
	ekstrakt drożdżowy	5 g	
	NaCl	10 g	
pożywka TB pH 7,0 ± 0,2	trypton	12 g	brak
	ekstrakt drożdżowy	24 g	
	glicerol	4 ml	
	*wodny roztwór fosforanów	100 ml	
pożywka SOC pH 7,0 ± 0,2	trypton	20 g	Roztwory glukozy i MgCl ₂ jałowiono przez filtrację i dodawano do pożywki po jej wcześniejszej sterylizacji.
	ekstrakt drożdżowy	5 g	
	NaCl	0,5 g	
	KCl (250 mM)	10 ml	
	MgCl ₂ (2M)	5 ml	
pożywka SOB pH 7,0 ± 0,2	trypton	20 g	Jałowy roztwór MgCl ₂ dodawano do pożywki po jej wcześniejszej sterylizacji.
	ekstrakt drożdżowy	5 g	
	NaCl	0,5 g	
	KCl (250 mM)	10 ml	
	MgCl ₂ (2 M)	5 ml	
podłoże LA pH 7,0 ± 0,2	trypton / pepton sojowy	10 g	brak
	ekstrakt drożdżowy	5 g	
	NaCl	10 g	
	agar	15 g	
*wodny roztwór fosforanów	KH ₂ PO ₄	23,1 g	brak
	K ₂ HPO ₄	125,4 g	

Komponenty podłoży i pożywek pochodziły z firmy BTL (Polska), sole z firmy POCh S. A. (Polska), z wyjątkiem chlorku magnezu (Merck, Niemcy). Przygotowane podłoża i pożywki mikrobiologiczne sterylizowano w autoklawie przez 20 minut w 120°C. W przypadkach, gdy było to niezbędne do mediów dodawano docelowe antybiotyki. Płytki przechowywano w lodówce (4°C).

4.4. Hodowle bakteryjne

4.4.1. Szczepy bakterii

- *E. coli* TOP10 (F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ⁻) (Thermo Scientific, MA, USA)
- *E. coli* E. cloni® 10G [F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *endA1* *recA1* Φ80*dlacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *araD139* Δ(*ara,leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ- *tonA* (Str^R)] (Lucigen, WI, USA)

- *E. coli* DH5 α [F'/*endA1 hsdR17 (rK⁻ mK⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ (*lacIZYA-argF*)U169 deoR (ϕ 80*dlaC* Δ (*lacZ*)M15)] (New England Biolabs, MA, USA)*
- *E. coli* ArcticExpress (DE3) [B F⁻ *ompT hsdS(rB - mB -) dcm+ Tet^R gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^R]* (Agilent Technologies CA, USA)
- *E. coli* BL21 (DE3) Star [F-*ompT hsdS_B (rB⁻, mB⁻) gal dcmrne131 (DE3)*] (Thermo Scientific, MA, USA)
- *E. coli* BL21-Gold (DE3) [Gold B F-*ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte*] (Merck, Niemcy)
- *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL [B F- *ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]]* (Agilent Technologies, CA, USA)

4.4.2. Antybiotyki

- kanamycyna – roztwór wodny, 30 mg/ml (Merck, Niemcy)
- karbenicylina – roztwór wodny, 100 mg/ml (A&A Biotechnology, Polska)
- chloramfenikol – roztwór w 99% etanolu, 35 mg/ml (Merck, Niemcy)
- tetracyklina – roztwór w 99% etanolu, 10 mg/ml (Merck, Niemcy)

4.4.3. Hodowle na podłożu stałym

Hodowle bakteryjne *E. coli* prowadzono na jałowym podłożu stałym LA [Mat. i Met. 4.3.] na szalkach Petriego z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (gdy było to wskazane). Hodowle prowadzono w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 30 lub 37°C.

4.4.4. Hodowle w pożywce płynnej

Hodowle bakteryjne *E. coli* prowadzono w jałowej pożywce płynnej LB, TB, SOB oraz SOC po transformacji komórek bakteryjnych plazmidowym DNA [Mat. i Met. 4.3.], z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (gdy było to wskazane). Hodowle prowadzono w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 10, 30 lub 37°C przez noc (12 - 24 h) albo do momentu osiągnięcia pożądanej gęstości optycznej (OD, ang. *optical density*). Pomiarów OD dokonywano w jednorazowych plastikowych kuwetach przy użyciu spektrofotometru UV-VIS przy długości fali 600 nm, stosując jałową pożywkę jako pomiar zerowy.

4.5. Transformowanie komórek bakterii plazmidowym DNA

Transformacją nazywa się proces aktywnego pobierania DNA przez organizmy jednokomórkowe, najczęściej bakterie i drożdże. Zdolność organizmów do transformacji nosi miano kompetencji. Najczęściej stosowanymi metodami transformacji bakterii wykorzystywanymi w inżynierii genetycznej są elektroporacja i transformacja chemiczna.

4.5.1. Przygotowanie elektrokompetentnych komórek *Escherichia coli*

Odczynniki:

- hodowla nocna *E. coli*
- pożywka SOB [Mat. i Met. 4.3.]
- 10% roztwór glicerolu (POCh S. A., Polska)

Wykonanie:

Zaszczepiano 200 ml pożywki SOB [Mat. i Met. 4.3.] w 500 ml kolbie szklanej przy użyciu 1 ml hodowli nocnej docelowego szczepu bakterii. Komórki bakteryjne hodowano w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 37°C do uzyskania pożądanej gęstości optycznej hodowli $OD_{600} = 0,6$. Komórki chłodzono przez 20 minut w łaźni lodowej i odwirowywano przez 5 minut w temperaturze 4°C przy względnej sile odśrodkowej (RCF, ang. *relative centrifugal force*) $3\ 000 \times g$. Biomasę komórek bakterii zawieszano w 250 ml wody, wirowano i ponownie zawieszano w 100 ml wody i odwirowywano. Przepłukaną w ten sposób biomasę komórek bakterii zawieszano w 4 ml 10% roztworu glicerolu i wirowano. Komórki elektrokompetentne ostatecznie zawieszano w 600 μ l 10% roztworu glicerolu. Komórki bakterii rozporcjowywano po 50 μ l do schłodzonych probówek typu Eppendorf, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Używane roztwory były jałowe i schłodzone do temperatury 4°C.

4.5.2. Przygotowanie komórek chemikompetentnych DMSO/PEG *Escherichia coli*

Odczynniki:

- hodowla nocna *E. coli*

- pożywka LB [Mat. i Met. 4.3.]
- Bufor TSB [LB pH 6,1, 10% PEG-3350 (Merck, Niemcy), 5% DMSO (Merck, Niemcy), 10 mM MgCl₂ (Merck, Niemcy), 10 mM MgSO₄ (POCh S. A., Polska)]

Wykonanie:

Zaszczepiano 100 ml pożywki LB [Mat. i Met. 4.3.] w 250 ml kolbie szklanej przy użyciu 1 ml hodowli nocnej docelowego szczepu bakterii. Komórki bakteryjne hodowano w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 37°C do uzyskania pożądanej gęstości optycznej hodowli OD₆₀₀ = 0,6. Komórki odwirowywano przez 5 minut w temperaturze 4°C przy RCF 4 000 × g. Biomasa komórek bakterii zawieszano w 1/10 objętości początkowej w buforze TSB i inkubowano w lodzie przez 10 min. Komórki chemikompetentne rozporcjowywano po 300 µl do schłodzonych probówek typu Eppendorf, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Używane roztwory były jałowe i schłodzone do temperatury 4°C.

4.5.3. Transformacja komórek bakteryjnych przy pomocy metody elektroporacji

Komórki elektrokompetentne docelowego szczepu *E. coli* [Mat. i Met. 4.4.1.] odmrażano w lodzie, dodawano plazmidowy DNA w ilości 10 - 100 ng i całość przenoszono do kuwety elektroporacyjnej o szczelinie 1 mm. Mieszaninę poddawano działaniu pulsu prądu o wartości napięcia 2,5 kV w elektroporatorze [Mat. i Met. 4.1.]. Natychmiastowo dodawano 1 ml pożywki SOC [Mat. i Met. 4.3.] i inkubowano przez godzinę w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 30°C, umożliwiając ekspresję genu warunkującego oporność uzyskanych rekombinantów na antybiotyku. Bakterie wysiewano (50 - 200 µl hodowli) na płytce z podłożem LA [Mat. i Met. 4.3.] z dodatkiem selektywnego antybiotyku [Mat. i Met. 4.4.2.] i inkubowano przez 18 h w odpowiedniej temperaturze.

4.5.4. Transformacja komórek chemikompetentnych PEG/DMSO

Odczynniki:

- jałowy roztwór KCM (5 × stężony): [500 mM KCl (POCh S. A., Polska), 150 mM CaCl₂ (POCh S. A., Polska), 250 mM MgCl₂ (Merck, Niemcy)]

Wykonanie:

Komórki chemikompetentne docelowego szczepu *E. coli* [Mat. i Met. 4.4.1.] odmrażano w lodzie i dodawano plazmidowy DNA w ilości 100 ng oraz KCM do końcowego stężenia 1 ×. Mieszaninę inkubowano kolejno przez 10 min w 4 i 25°C. Dodawano 1 ml pożywki SOC [Mat. i Met. 4.3.] i inkubowano przez godzinę w inkubatorze mikrobiologicznym w temperaturze 30°C, umożliwiając ekspresję genu warunkującego oporność uzyskanych rekombinantów na antybiotyk. Bakterie wysiewano (całość hodowli, po uprzednim zwirowaniu i zawieszeniu w mniejszej ilości pożywki) na płytki z podłożem LA [Mat. i Met. 4.3.] z dodatkiem selektywnego antybiotyku [Mat. i Met. 4.4.2.] i inkubowano 18 h w odpowiedniej temperaturze.

4.6. Izolowanie DNA plazmidowego

Odczynniki:

- Zestawy Plasmid Mini/ Plasmid Mini AX (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw GeneMARTIX series (EURx, Polska)
- Zestaw GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific, MA, USA)

Wykonanie:

Izolacje plazmidowych DNA przeprowadzano zgodnie z protokołami dołączonymi do komercyjnie dostępnych zestawów, wykorzystując w tym celu osad biomasy bakterii z 1,5 - 3 oraz 200 - 250 ml hodowli nocnej danego szczepu odpowiednio dla zestawów mini (A&A, EURx) oraz midi/ maxi (A&A, Thermo Scientific)

4.7. Trawienie endonukleazami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia DNA wybranymi endonukleazami restrykcyjnymi (REazy) prowadzono stosując ilość jednostek enzymu (U) od 1 - 10 przypadających na 1 µg DNA. Objętość używanej w mieszaniny reakcyjnej ustalano tak, by zawartość glicerolu nie przekraczała 5% jej końcowej objętości (20 - 100 µl). Trawienia prowadzono w odpowiednich warunkach buforowych i cieplnych przez 1 – 16 h. W celu zatrzymania reakcji prowadzona była inaktywacja temperaturowa (czas oraz temperatura jest charakterystyczna dla każdego enzymu). Dokładną charakterystykę użytych endonukleaz restrykcyjnych przedstawiono w tabeli 11.

Tab. 11. Przedstawienie parametrów wykorzystywanych endonukleaz restrykcyjnych.

Endonukleaza restrykcyjna	Bufor reakcyjny (1 × stężony)	Sekwencja rozpoznawalna	Temperatura i czas reakcji	Zastosowanie
SapI (New England Biolabs, MA, USA)	1 × CutSmart [50 mM octan potasu, 20 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 100 µg/ml BSA, pH 7,9 przy 25°C]	5' ...GCTCTTC(N) ₁ ▼...3' 3' ...CGAGAAG(N) ₄ ▼...5'	37°C 1 – 16 h	konwersja do liniowej formy plazmidów pUC19_s2, pNETR TERRA
SmaI (New England Biolabs, MA, USA)	1 × CutSmart [50 mM octan potasu, 20 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 100 µg/ml BSA, pH 7,9 przy 25°C]	5' ... CCC▼GGG ...3' 3' ... GGG▼CCC ...5'	37°C 1 -16 h	konwersja do liniowej formy plazmidu pUC19
BspHI (New England Biolabs, MA, USA)	1 × CutSmart [50 mM octan potasu, 20 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 100 µg/ml BSA, pH 7,9 przy 25°C]	5' ... T▼CATGA ...3' 3' ... AGTAC▼T ...5'	37°C 1 -16 h	analiza restrykcyjna klonów uzyskanych w procesie mutagenyzy ukierunkowanej
DpnI (Thermo Scientific, Ma, USA)	1 × Buffer Tango [33 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 66 mM octan potasu, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9 przy 37°C]	5' ... GA ^{m6} ▼TC ... 3' 3' ... CT▼A ^{m6} G ... 5'	37°C 1 h	wyeliminowanie matrycowego DNA pozostałego po reakcji PCR w procesie mutagenyzy ukierunkowanej

4.8. Reakcja Łańcuchowa Polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR to technika umożliwiająca syntezę *in vitro* fragmentów DNA o pożądanej długości oraz sekwencji, na matrycy śladowych ilości DNA. W niniejszej pracy została wykorzystana w metodzie mutagenyzy ukierunkowanej [Mat. i Met. 4.9.]. W celu uzyskania krótkiego fragmentu dsDNA zawierającego powtórzenia telomerowe oraz w sprawdzeniu poprawności uzyskania pozytywnych klonów po transformacji komórek bakteryjnych przy pomocy mieszaniny ligacyjnej.

Odczynniki:

- matrycowe DNA (1 – 100 ng)
- polimeraza Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U/µl (New England Biolabs, MA, USA)
- bufor do polimerazy Q5 (10 × stężony): pełny skład jest własnością firmy, w stężeniu 1 × zawiera 2 mM Mg²⁺, zapewniając optymalną aktywność dla wysokiej wierności polimerazy (New England Biolabs, MA, USA)
- 5 mM roztwór 5' – trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dNTP) (A&A Biotechnology, Polska)

- polimeraza Phusion Hot Start II DNA Polymerase, 2 U/ μ l (Thermo Scientific, MA, USA)
- bufor Phusion (5 \times stężony): pełny skład jest własnością firmy, w stężeniu 1 \times zawiera 1,5 mM Mg²⁺, zapewniając optymalną aktywność dla wysokiej wierności polimerazy (Thermo Scientific, MA, USA)
- gotowa mieszanina reakcyjna CloneID 1X Colony PCR Master Mix (Lucigen, WI, USA)
- 50 μ M roztwory starterów
- jałowa woda dejonizowana (Polpharma, Polska)

Startery:

- pET up: 5'-GAGCGTCCGGCGTAGA-3' (Eurofins Genomics, Austria)
- pET ter: 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (Eurofins Genomics, Austria)
- M13 pUC forward: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAACG-3' (Eurofins Genomics, Austria)
- M13 pUC reverse: 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3' (Eurofins Genomics, Austria)

Wykonanie:

W przypadku uzyskiwania krótkich fragmentów plazmidowego DNA pUC19 oraz pUC19_s2, odpowiednio niezawierającego i zawierającego powtórzenia telomerowe przygotowano mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodziły (na 50 μ l): matrycowy DNA plazmidowy (100 ng), startery (0,5 μ M), mieszanina dNTP (200 μ M), bufor zawierający 2 mM jonów magnezu, termostabilna polimeraza DNA Q5 (1 U).

W przypadku analizy uzyskanych potencjalnie pozytywnych klonów bakteryjnych przygotowano mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodziły (na 10 μ l): kolonia bakteryjna, startery (0,5 μ M), gotowa mieszanina reakcyjna CloneID™ (1 \times stężona). Reakcje prowadzono w termocyklerze [Mat. i Met. 4.1.] przy ustalonych profilach temperaturowo-czasowych przedstawionych w tabelach 12 i 13.

Tab. 12. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla uzyskiwania krótkich fragmentów DNA na matrycy pUC19 i pUC19_s2.

	Cykl	Temperatura	Czas
1	denaturacja wstępna	98°C	30 s
2	denaturacja	98°C	10 s
3	hybrydyzacja	53°C	10 s
4	wydłużanie łańcucha	72°C	20 s
5	wydłużanie końcowe	72°C	2 min
6	przechowywanie	10°C	∞

Tab. 13. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla analizy klonów bakteryjnych.

	Cykl	Temperatura	Czas
1	denaturacja wstępna	98°C	2 min
2	denaturacja	98°C	30 s
3	hybrydyzacja	55°C	30 s
4	wydłużanie łańcucha	72°C	2 min
5	wydłużanie końcowe	72°C	3 min
6	przechowywanie	10°C	∞

4.9. Mutageneza ukierunkowana

W inżynierii genetycznej metoda ukierunkowanej mutagenezy służy dokonywaniu precyzyjnych zmian w obrębie sekwencji genów. W niniejszej pracy została użyta w celu dodania aminokwasu lizyny w sekwencji aminokwasowej jako miejsce rozpoznawalne dla karboksypeptydazy A, poprzez zmianę sekwencji nukleotydowej genu kodującego białko Fh8_TEV_hTRF1_His oraz usunięcie sekwencji kodującej domenę ubikwityny z genu kodującego białko fuzyjne His_Ub_hTRF2. Precyzyjnych zmian dokonano przeprowadzając reakcje PCR [Mat. i Met. 4.8.] z użyciem zaprojektowanych starterów.

Odczynniki:

- matrycowe DNA (25, 50 ng) – plazmidowe DNA zawierające wklonowanie geny, do których wprowadzane są mutacje [Mat. i Met. 4.2.]
- polimeraza Q5 [Mat. i Met. 4.8.]
- bufor polimerazy Q5 (10 × stężony) [Mat. i Met. 4.8.]
- polimeraza Phusion Hot Start II [Mat. i Met. 4.8.]

Tab. 14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla mutagenezy genu Fh8_hTRF1_His.

	Cykl	Temperatura	Czas
1	denaturacja wstępna	98°C	30 s
2	denaturacja	98°C	10 s
3	hybrydyzacja	71°C	10 s
4	wydłużanie łańcucha	72°C	3 min 30 s
5	wydłużanie końcowe	72°C	2 min
6	przechowywanie	10°C	∞

} × 25

Tab. 15. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla mutagenezy genu His_Ub_hTRF2.

	Cykl	Temperatura	Czas
1	denaturacja wstępna	98°C	30 s
2	denaturacja	98°C	20 s
3	hybrydyzacja	69°C	20 s
4	wydłużanie łańcucha	72°C	2 min
5	wydłużanie końcowe	72°C	4 min
6	przechowywanie	10°C	∞

} × 30

4.10. Reakcja ligacji DNA

Odczynniki:

- T4 DNA ligaza, 400 U/μl (New England Biolabs, MA, USA)
- bufor ligazy T4 DNA (10 × stężony): [500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 100 mM DTT, pH 7,5] (New England Biolabs, MA, USA)
- jałowa woda dejonizowana (Polpharma, Polska)

Wykonanie:

Do reakcji ligacji cząsteczek DNA uzyskanych w procesie mutagenezy ukierunkowanej [Mat. i Met. 4.9.], w celu ponownego zamknięcia plazmidowego DNA, używano 80 ng DNA. Reakcję ligacji o objętości 20 μl przeprowadzano w dedykowanym buforze zawierającym ATP z wykorzystaniem ligazy DNA bakteriofaga T4, w temperaturze 4°C przez 16 h. Inaktywacji cieplnej dokonywano przez 10 minut w 65°C.

4.11. Sekwencjonowanie DNA

Potencjalnie pozytywne klonety uzyskane w wyniku przeprowadzonej mutagenety ukierunkowanej (wyselekcjonowane w analize restrykcyjnej) analizowano poprzez sekwencjonowanie wyizolowanych z nich plazmidowych DNA metodą Sangera (Sanger, Nicklen, i Coulson 1977; Brown 2009). Sekwencjonowanie zlecono firmie Eurofins Genomics (Austria). Otrzymane sekwencyjne elektrogramy kapilarne poddawano analize przy pomocy programu komputerowego: SnapGene Viewer [Mat. i Met. 4.1.].

4.12. Oczyszczanie DNA plazmidowego po reakcjach enzymatycznych

4.12.1. Oczyszczanie DNA metodą ekstrakcji fenol/chloroform

Odczynniki:

- buforowany fenol (Merck, Niemcy)
- chloroform (POCh S. A., Polska)

Wykonanie:

Do preparatów DNA dodawano fenolu o objętości równej 1/2 objętości preparatu i mieszano, następnie dodawano taką samą objętość (1/2 V) chloroformu i ponownie mieszano. Mieszaninę ekstrakcyjną zawierającą DNA wirowano przez 5 minut przy RCF 12 000 × g. Fazę wodną zawierającą DNA przenoszono do nowej probówki, dodawano chloroformu o objętości równej 1 V preparatu, mieszano i wirowano przez 5 minut przy RCF 12 000 × g. Czynność powtarzano. Fazę wodną przenoszono do czystej probówki i przeznaczano do etapu precypitacji DNA [Mat. i Met. 4.13.].

4.12.2. Oczyszczanie DNA przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów

Odczynniki:

- Zestaw Clean Up (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw GeneMARTIX series (EURx, Polska)
- Zestaw Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) (New England Biolabs, MA, USA)

Oczyszczanie DNA uzyskanego w wyniku reakcji PCR i trawienia REazami przeprowadzano zgodnie z protokołami dołączonymi do komercyjnie dostępnych zestawów.

4.13. Precypitacja DNA

Odczynniki:

- roztwór 3 M octan sodu, pH 5,4 (POCh S. A., Polska)
- chloroform (POCh S. A., Polska)
- koprecypitant Vivid Violet (EURx, Polska)

Wykonanie:

Do preparatów DNA dodawano octanu sodu o objętości równej $\frac{1}{10}$ V objętości, 96% etanolu o objętości równej 2 V, 4 - 1,5 μ l koprecypitanta w zależności od rodzaju izolowanego DNA. Całość mieszano i inkubowano w ciekłym azocie przez 10 min. Wirowano przez 30 minut przy RCF 14 000 \times g. Supernatant usuwano, a osad DNA przepłukiwano 70% etanolem i wirowano przez 15 minut przy RCF 12 000 \times g. Ponownie zlewano supernatant, osad DNA suszono przez 15 minut w temperaturze pokojowej i zawieszano w odpowiedniej ilości jałowej wody dejonizowanej.

4.14. Izolowanie DNA z żeli agarozowych

4.14.1. Izolowanie DNA metodą elektroelucji

Mieszaninę zawierającą fragmenty DNA rozdzielano przy pomocy elektroforezy agarozowej [Mat. i Met. 4.16.]. Po wystarczającym rozdziale, wycinano z żelu prążek zawierający docelowy fragment DNA za pomocą jałowego skalpela i umieszczano go w worku dializacyjnym, wypełnionym buforem 1 \times TBE. Worek dializacyjny wraz z zawartością umieszczano w aparacie do elektroforezy i prowadzono rozdział przy napięciu 5 - 10 V/cm do momentu całkowitej elucji DNA z żelu. Wycięty fragment żelu usuwano, a bufor zawierający DNA przenoszono do jałowych probówek i poddawano procesowi precypitacji [Mat. i Met. 4.13.].

4.14.2. Izolowanie DNA przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów

Odczynniki:

- Zestawy Gel-Out/ Gel-Out AX (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw E. Z. N. A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, GA, USA)
- Zestaw Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, MA, USA)

Oczyszczanie DNA z żeli agarozowych przeprowadzano zgodnie z protokołami dołączonymi do komercyjnie dostępnych zestawów.

4.15. Oznaczenia stężenia i czystości DNA metodą spektrometryczną

Stężenie i czystość DNA oznaczano wykonując pomiar 1 - 2 μ l próbki przy długości fali 260 nm wobec próby zerowej (roztworu, w którym zawieszano DNA) za pomocą spektrofotometru Colibri [Mat. i Met. 4.1.]. do pomiaru mikro ilości DNA, RNA, białek oraz innych substancji. Do określenia poziomu czystości wyizolowanych plazmidów DNA wykorzystywano współczynniki A_{260}/A_{280} oraz A_{260}/A_{230} .

4.16. Elektroforeza agarozowa DNA/ DNA-białko

Elektroforeza w żelu agarozowym jest techniką służącą do rozdzielania fragmentów DNA różniących się ich wielkością. Rozdział cząsteczek DNA warunkowany jest przez ilość nukleotydów (nt), krótsze fragmenty przemieszczają się szybciej w porównaniu z fragmentami dłuższymi. Migracja DNA jest wymuszana przez działanie pola elektrycznego na żel, w obecności buforu przewodzącego prąd elektryczny. Rozdział DNA-białko prowadzono wykonując test EMSA [Mat. i Met. 4.28.1].

Odczynniki:

- agarosa dedykowana analizom biotechnologicznym (BioShop, Kanada)
- bufor elektroforetyczny TBE (10 \times stężony): skład na 1000 ml: [108 g Tris (BioShop, Kanada), 55 g kwas borowy (POCh S.A., Polska), 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Merck, Niemcy)]
- wodny roztwór bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml
- barwnik wizualizujący GelRed Nucleic Acid Stain (10 \times stężony w DMSO) (Merck, Niemcy)
- bufor do nanoszenia Gel Loading Dye, Purple (6 \times stężony) (New England Biolabs, MA, USA)
- Bufor do nanoszenia kompleksów białko-DNA Native PAGE (NP) (2 \times stężony): [62 nM Tris-HCl pH 6,8 (BioShop, Kanada), 40% glicerol (POCh S. A., Polska), 0,01% błękit bromofenolowy (Vivantis, Malezja)]

wzorce wielkości DNA:

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) o wielkości fragmentów DNA (pz): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2 500, 1500, **1000**, 750, 500, 250
- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) o wielkości fragmentów DNA (pz): 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100
- O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) o wielkości fragmentów DNA (pz): **300**, 280, 260, 240, 220, **200**, 180, 160, 140, 120, **100**, 80, 60, 40, 20

Przygotowanie żeli i rozdział elektroforetyczny

Przygotowywano 0,7 – 2,5% żel agarozowy poprzez rozpuszczanie odpowiedniej ilości agarozy w buforze 0,5 - 1 × TBE podgrzewając całość, poprzez działanie mikrofal. W przypadku rozdzielania DNA do lekko wystudzonego roztworu agarozy dodawano roztworu bromku etydyny do końcowego stężenia 0,5 µg/ml lub GelRed do końcowego stężenia 1 ×, nie dodawano żadnego barwnika wizualizacyjnego w przypadku rozdzielania DNA-białko. Płynny żel wylewano na tackę poziomą tak, aby grzebień został zanurzony w żelu. Zastygnięty żel wstawiano do aparatu, który napełniano buforem 0,5 - 1 × TBE do wysokości około 5 mm nad powierzchnię żelu i usuwano z niego grzebień. Próbkę DNA mieszano z buforem Gel Loading Dye, Purple (tak, aby bufor stanowił 0,2 V próbki) i tak przygotowane próbki nanoszono do studzienek żelu. Próbkę DNA-białko mieszano z buforem 2 × NP (tak, aby bufor stanowił 0,5 V próbki). Elektroforezę prowadzono stosując napięcie około 1-10 V/cm odległości pomiędzy elektrodami. Żel z rozdzielania DNA-białko inkubowano w roztworze wybranego barwnika wizualizującego. Wybarwiony żel oglądano na transiluminatorze UV ($\lambda = 320$ nm) i fotografowano.

4.17. Elektroforeza kompleksów białko-DNA w żelu poliakrylamidowym

Elektroforeza DNA w żelu poliakrylamidowym jest techniką służącą do rozdzielania małych fragmentów DNA, w zakresie 5 – 1000 pz. Rozdział cząsteczek DNA warunkowany jest przez takie same czynniki co w elektroforezie agarozowej [Mat. i Met. 4.16.]. Większe usieciwienie żelu w porównaniu do żeli agarozowych pozwala

na uzyskanie lepszej rozdzielczości małych fragmentów. Rozdział DNA-białko w niniejszej pracy ponownie prowadzono wykonując test EMSA [Mat. i Met. 4.28.1].

Odczynniki:

- 30% roztwór akryloamidów: 29,2% akryloamid; 0,8% N, N'-metyleno-bisakryloamid (Merck, Niemcy)
- bufor elektroforetyczny TBE (10 × stężony) [Mat. i Met. 4.16.]
- 10% roztwór nadsiarczuanu amonu (APS) (Merck, Niemcy)
- N, N, N', N' -tetrametyloetylenodiamna (TEMED) (AppliChem, Niemcy)
- woda dejonizowana
- wodny roztwór bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml
- barwnik wizualizujący GelRed Nucleic Acid Stain (10 × stężony w DMSO) (Merck, Niemcy)
- Bufor do nanoszenia kompleksów białko-DNA Native PAGE (NP) (2 × stężony) [Mat. i Met. 4.16.]

wzorce wielkości DNA:

- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) o wielkości fragmentów DNA (pz): 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100
- O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) o wielkości fragmentów DNA (pz): **300**, 280, 260, 240, 220, **200**, 180, 160, 140, 120, **100**, 80, 60, 40, 20

Przygotowanie żeli i rozdział elektroforetyczny:

Umyte i odtłuszczone szyby (10 × 8,2 × 0,1 cm) montowano w ramkach i układano w statywie odlewniczym. W utworzoną pomiędzy płytkami szczelinę wlewano roztwór żelu, umieszczano grzebienie i pozostawiano go do polimeryzacji. Żele przygotowywano stosując odpowiednie proporcje odczynników, które zostały przedstawione w tabeli 16. Po zakończeniu reakcji polimeryzacji żel układano w kasecie żelowej, którą umieszczano w zbiorniku, usuwano grzebienie i całość zalewano buforem elektrodowym (0,5 - 1 × stężony bufor TBE). Gotowy aparat elektroforetyczny umieszczano w łaźni lodowej. Przeprowadzano pre-elektroforezę przykładając napięcie 100 V przez 20 min. Do studzienek w żelu nanoszono kolejno wzorzec wielkości

i przygotowane próbki zawierające barwnik NP. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 1,5 - 2 h stosując napięcie 50 - 80 V. Po zakończeniu rozdziału, żel inkubowano w buforze TBE z bromkiem etydyliny lub GelRed przez 20 - 30 minut. Po wybarwieniu DNA, żel oglądano na transiluminatorze UV ($\lambda = 320 \text{ nm}$) i fotografowano.

Tab. 16. Składniki niezbędne do przygotowania żeli poliakryloamidowych do natywnej elektroforezy kompleksów DNA-białko [V_{cat} : 15 ml] (Green i Sambrook 2012).

Składniki [ml]	6%	8%	10%
30% roztwór akryloamidów	3	4	5
bufor TBE (10 × stężony)	1,5	1,5	1,5
woda	10,4	9,4	8,4
10% APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,035	0,035	0,035

4.18. Elektroforeza poliakryloamidowa białek w warunkach denaturujących

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym przebiegająca w warunkach denaturujących, umożliwia rozdział białek wyłącznie ze względu na podstawie ich masy cząsteczkowej. Kształt cząsteczki oraz jej ładunek jest niwelowany poprzez użycie denaturujących odczynników. β -merkaptoetanol redukuje mostki disulfidowe, SDS (dodecylosiarczan sodu), powoduje zrywanie wiązań niekowalencyjnych w białku, prowadząc do rozfałdowania się łańcucha polipeptydowego. SDS nadaje wszystkim cząsteczkom białka równy, wysoki ładunek ujemny. Szybkość migracji białka w żelu zależy więc od następujących parametrów: rozmiaru cząsteczki, natężenia pola elektrycznego, udziału procentowego akryloamidu w żelu, a także stopnia jego usieciowania.

4.18.1. Elektroforeza SDS-PAGE

Odczynniki:

- 30% roztwór akryloamidów: 29,2% akryloamid; 0,8% N, N'-metyleno-bisakrylamid (Merck, Niemcy)
- Bufor 1: [1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (BioShop, Kanada)]
- Bufor 2: [1 M Tris-HCl pH 6,8 (BioShop, Kanada)]
- 10% roztwór dodecylosiarczanu sodu (SDS) (POCh S. A., Polska)

- 10% roztwór nadsiarczanu amonu (APS) (Merck, Niemcy)
- N, N, N', N' -tetrametyloetylenodiamna (TEMED) (AppliChem, Niemcy)
- woda dejonizowana
- bufor elektrodowy, tris-glicynowy (1 × stężony): [25 mM Tris-HCl (BioShop, Kanada), 192 mM glicyna (BioShop, Kanada), 0,1% SDS (POCh S. A., Polska)]
- bufor denaturujący (5 × stężony): [50 mM Tris-HCl pH 6,8 (BioShop, Kanada), 50% sacharoza (POCh S. A., Polska), 10% SDS (POCh S. A., Polska), 25% β-merkaptioetanol (Merck, Niemcy), 0,05% błękit bromofenolowy (Vivantis, Malezja)]
- barwnik do żeli poliakryloamidowych: 0,1% roztwór Coomassie Brilliant Blue R-250 w odbarwiaczu do żeli (Merck, Niemcy)
- odbarwiacz do żeli poliakryloamidowych: [40% metanol (POCh S.A., Polska), 7% kwas octowy (POCh S. A., Polska)]

Wzorce wielkości białek:

- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140, 260
- ExcelBand™ 3-color High Range Protein Marker PM2600 (9-245 kDa) (Smobio, Tajwan) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 10, 15, 20, 25, 35, 45, 60, 75, 100, 140, 180, 245
- Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116
- PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 3,4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 100

Przygotowanie żelu i rozdział elektroforetyczny:

Umyte i odfuszczone szyby (10 × 8,2 × 0,1 cm) montowano w ramkach i układano w statywie odlewniczym. W utworzoną pomiędzy płytkami szczelinę

wlewano 4,8 ml roztworu żelu rozdzielającego, dodawano cienką warstwę wody dejonizowanej, odcinając dostęp powietrza do żelu i pozostawiano go do polimeryzacji. Po zakończonej reakcji polimeryzacji usuwano warstwę wody i wlewano roztwór żelu zagęszczającego (około 2 ml), umieszczano grzebień i ponownie pozostawiano go do polimeryzacji. Żele przygotowywano stosując odpowiednie proporcje odczynników, które zostały przedstawione w tabeli 17. Po zakończeniu reakcji polimeryzacji żel układano w kasecie żelowej, którą umieszczano w zbiorniku, usuwano grzebień i całość zalewano buforem elektrodowym. Do studzienek w żelu nanoszono kolejno wzorzec wielkości i przygotowane próbki zawierające bufor denaturujący. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 1,5 - 2 h stosując natężenie 35 mA na żel. Po zakończeniu rozdziału, żel barwiono, odbarwiano i fotografowano.

Tab.17. Składniki niezbędne do przygotowania żeli poliakryloamidowych do elektroforezy SDS-PAGE [V_{cat}: 10 ml].

Składniki [ml]	Żel zagęszczający		Żel rozdzielający	
	5%	10%	10%	12%
roztwór 30% akryloamidów	1,7	3,3	3,3	4,0
bufor 1	-	2,5	2,5	2,5
bufor 2	1,25	-	-	-
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1
woda	6,8	4,0	4,0	3,3
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,004	0,004	0,004

Przygotowanie próbek:

Próbki poddawane elektroforezie mieszano z 5 × stężonym buforem denaturującym w stosunku 4:1. Próbki ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 98°C. Po inkubacji próbki wirowano i nanoszono do studzienek w żelu.

4.18.2. Elektroforeza TRIS-TRICINE-SDS

Odczynniki:

- 30% roztwór akryloamidów: 29,2% akryloamid; 0,8% N, N'-metyleno-bisakryloamid (Merck, Niemcy)

- Bufor 1': [3 M Tris-HCl pH 8,45 (BioShop, Kanada), 0,3% SDS (POCh S. A., Polska)]
- 10% roztwór dodecylosiarczanu sodu (SDS) (POCh S. A., Polska)
- 10% roztwór nadsiarczanu amonu (APS) (Merck, Niemcy)
- N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamna (TEMED) (AppliChem, Niemcy)
- woda dejonizowana
- bufor anodowy (1 × stężony): [0,2 M Tris, pH 8,9, (BioShop, Kanada)]
- bufor katodowy (1 × stężony): [0,1 M Tris (BioShop, Kanada), 0,05 M Tricine (BioShop, Kanada), 0,1% SDS (POCh S. A., Polska)]
- bufor denaturujący (4 × stężony): [0,2 mM Tris-HCl, pH 6,8 (BioShop, Kanada), 40% glicerol (POCh S. A., Polska), 16% SDS (POCh S. A., Polska), 6,2% ditiotretitol (DTT) (Merck, Niemcy), 0,04% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Niemcy)]
- barwnik do żeli poliakryloamidowych: 0,1% roztwór Coomassie Brilliant Blue R-250 w odbarwiaczu do żeli (Merck, Niemcy)
- odbarwiacz do żeli poliakryloamidowych: [40% metanol (POCh S.A., Polska), 7% kwas octowy (POCh S. A., Polska)]

Wzorce wielkości białek:

- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, MA, USA) zawierający białka o masie cząsteczkowej (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140, 260

Przygotowanie żelu i rozdział elektroforetyczny:

Umyte i odłuszczone szyby (10 × 8,2 × 0,1 cm) montowano w ramach i układano w statywie odlewniczym. W utworzoną pomiędzy płytkami szczelinę wlewano 4,8 ml roztworu żelu rozdzielającego, dodawano cienką warstwę wody dejonizowanej, odcinając dostęp powietrza do żelu i pozostawiano go do polimeryzacji. Po zakończonej reakcji polimeryzacji usuwano warstwę wody i wlewano roztwór żelu zagęszczającego (około 2 ml), umieszczano grzebień i ponownie pozostawiano go do

polimeryzacji. Żele przygotowano stosując odpowiednie proporcje odczynników, które zostały przedstawione w tabeli 18. Po zakończeniu reakcji polimeryzacji żel układano w kasecie żelowej, którą umieszczano w zbiorniku, usuwano grzebienie, kasetę zalewano buforem katodowym, a zbiornik napełniano buforem anodowym. Do studzienek w żelu nanoszono kolejno wzorzec wielkości i przygotowane próbki zawierające bufor denaturujący. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 3 - 4 h stosując natężenie 35 mA. Po zakończeniu rozdzielania, żel barwiono, odbarwiano i fotografowano.

Tab.18. Składniki niezbędne do przygotowania żeli poliakryloamidowych do elektroforezy Tris-Tricine-SDS [V_{cat} : 10 ml].

Składniki [ml]	Żel zagęszczający		Żel rozdzielający	
	5%	16,5%	17,3%	
roztwór 30% akryloamidów	1,62	5,36	5,61	
bufor 1'	2,50	3,33	3,33	
glicerol	-	1,06	1,06	
woda	5,82	0,25	-	
10% APS	0,05	0,05	0,05	
TEMED	0,01	0,01	0,01	

Przygotowanie próbek:

Próbki poddawane elektroforezie mieszano z 4 × stężonym buforem denaturującym w stosunku 3:1. Próbki ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 98°C. Po inkubacji próbki wirowano i nanoszono do studzienek w żelu.

4.19. Liza komórek bakteryjnych

Odczynniki:

- lizozym (Merck, Niemcy)
- roztwór 100 mM PMSF w 99% etanolu (BioShop, Kanada)
- koktajl inhibitorów proteaz w postaci tabletek SIGMAFAST Protease Inhibitor cocktailtablets, EDTA-free (Merck, Niemcy)

Wykonanie:

Biomasę komórek bakterii otrzymaną przez zwirowanie hodowli zawieszano w schłodzonym do 4°C buforze podstawowym dla dalszego oczyszczania w stosunkach

1:5 lub 1:10. Zawiesiny komórek suplementowano lizozymem (do końcowego stężenia 0,5 mg/ml), roztworem PMSF (do końcowego stężenia 1 mM) oraz w razie konieczności tabletką z koktajlem inhibitorów proteaz i całość inkubowano 20 - 30 minut w łaźni lodowej. Po inkubacji zawiesinę bakterii poddawano działaniu ultradźwięków w celu rozbicia komórek bakterii. Sonikację prowadzono w 20 - 50 cyklach, z których każdy pojedynczy składał się z 3 minutowych pulsów przerywanych o 50% maksymalnej częstotliwości urządzenia i 3 minut przerwy, utrzymując stałą temperaturę w okolicach 4°C. Stosowano trzpienie o różnej średnicy (4, 10 i 26 mm) w zależności od objętości uzyskanej zawiesiny komórkowej. Uzyskany ekstrakt komórkowy wirowano i przeznaczano do dalszych etapów preparatyki.

4.20. Dializa

Dializa jest procesem membranowym, w którym następuje usuwanie substancji niskocząsteczkowych z roztworu dializowanego do roztworu ich niezawierającego. W niniejszej pracy procesy dializy przeprowadzono w celu wymiany buforów, w których zawieszano docelowe preparaty białkowe. Wymianę buforu uzyskiwano, wykorzystując właściwości dyfuzji – migracja cząsteczek ze środowiska o wyższym stężeniu do środowiska o niższym stężeniu (zgodnie z gradientem stężeń) przy użyciu porowatej membrany [Mat. i Met. 4.1.].

Wykonanie:

Docelowy preparat białkowy umieszczano w worku do dializy o molekularnej granicy oddzielania (MWCO, ang. *Molecular Weight Cut-off*) równej 3 - 10 kDa i przenoszono go do buforu dedykowanego do dalszego etapu preparatyki, o objętości 100 krotnie większej od objętości preparatu. Dializę prowadzono w 4°C przez noc, zachowując stałe, lekkie mieszanie. W razie konieczności proces powtarzano wymieniając bufor na świeży.

4.21. Zagęszczanie preparatów białkowych za pomocą siły ośrodkowej

Oczyszczany preparat białkowy zagęszczano przy użyciu koncentratorów odśrodkowych o molekularnej granicy oddzielania (MWCO) równej 3 - 10 kDa [Mat. i Met. 4.1.] i wykorzystaniu wirówki Sigma 3-18K [Mat. i Met. 4.1.]. Zagęszczaniu w razie konieczności towarzyszyła wymiana buforu na dedykowany dla dalszego etapu preparatyki.

Wykonanie:

Komorę filtracyjną wypełniano wodą i wirowano przez 10 min przy RCF $4\ 000 \times g$ w 10°C w celu usunięcia resztek glicerolu i aktywacji membrany w przypadku jej celulozowej budowy. Komorę płukano buforem docelowym. Docelowy preparat białkowy umieszczano w komorze i proces zagęszczania uzyskiwano poprzez kilkukrotne wirowanie przez 2 – 10 min przy RCF $4\ 000 \times g$ do uzyskania docelowego stopnia zagęszczenia. Towarzystwającą zmianę buforu uzyskiwano przez dolewanie świeżych porcji buforu pomiędzy kolejnymi wirowaniami.

4.22. Ultrafiltracja

Docelowy preparat białkowy zagęszczano w komorze ultrafiltracyjnej pod ciśnieniem gazowego azotu z wykorzystaniem membrany o MWCO równej 3 - 10 kDa [Mat. i Met. 4.1.]. Zagęszczaniu w razie konieczności towarzyszyła wymiana buforu na dedykowany dla dalszego etapu preparatyki.

Wykonanie:

Membranę aktywowano w wodzie przez 30 min i umieszczano w komorze ultrafiltracyjnej. Komorę wraz z membraną płukano buforem docelowym. Pożądany preparat białkowy umieszczano w komorze i prowadzono proces zagęszczania ze stałym mieszanem. Towarzystwającą zmianę buforu uzyskiwano przez dolewanie świeżych porcji buforu po uzyskaniu pewnego stopnia zagęszczenia.

4.23. Immunodetekcja białek metodą Western Blotting

Technika Western blotting (WB), znana również jako protein blotting lub immunoblotting, wyewoluowała z metody transferu DNA (Southern blotting) i RNA (Northern blotting). Termin Western blotting nadano, aby opisać procedurę, która została nieznacznie zmodyfikowana w stosunku do pierwotnie przedstawionej przez zespół Towbina (Towbin, Staehelin, i Gordon 1979), aby zachować „geograficzną” tradycję nazewnictwa zapoczątkowaną przez Southern (Southern 1975; Kurien i Scofield 2006). WB jest ważną i rutynowo stosowaną metodą analizy białek, która zależy od specyficzności oddziaływania przeciwciało-antygen i jest użyteczna do jakościowej lub półilościowej identyfikacji specyficznych białek oraz oznaczania ich masy cząsteczkowej w złożonych mieszaninach (Kurien i Scofield 2006; Hnasko i Hnasko 2015). Metoda WB obejmuje rozdział białek za pomocą elektroforezy żelowej, ich transfer na membranę oraz

selektywną immunodetekcję unieruchomionego antygeny (Kurien i Scofield 2006; Hnasko i Hnasko 2015).

Odczynniki:

- 100% metanol (POCh S. A., Polska)
- bufor do transferu Towbina (1 × stężony): [48 mM Tris-HCl pH 8,6, (BioShop, Kanada), 38 mM glicyna (BioShop, Kanada), 20% metanol (POCh S.A., Polska), 0,04% SDS (POCh S. A., Polska)]
- bufor blokujący EveryBlot Blocking Buffer (BioRad, CA, USA)
- bufor TBS (10 × stężony), skład na 1000 ml: [24,228 g Tris (BioShop, Kanada), 87,66 g NaCl (POCh S. A., Polska)]
- bufor TBS - T (1 × stężony): [bufor TBS (1 × stężony) + 0,1% Tween 20 (Merck, Niemcy)]
- roztwór barwiący PonceauS (BioShop, Kanada)
- 5% kwas octowy (POCh S.A., Polska)
- hydrat tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) (Merck, Niemcy)
- fosfataza alkaliczna; BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate solution (BioShop, Kanada)
- jałowa woda dejonizowana

Przeciwciała:

- przeciwciała monoklonalne anti-His sprzężone z koniugatem peroksydazy (HRP) produkowane w myszach, 1:2000, roztwór w 1 × TBS-T, Anti-polyHistidine – Peroxidase antibody, Mouse monoclonal (Merck, Niemcy)
- przeciwciała monoklonalne anti-TRF1 (TRF1-78-sc-56807) IgG₁, produkowane w myszach, 1:500, roztwór w 1 × TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)
- przeciwciała monoklonalne anti-TRF2 (TRF2-4A-764) IgG₁, produkowane w myszach, 1:500, roztwór w 1 × TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)
- przeciwciała poliklonalne anti-mysie IgG, sprzężone z fosfatazą alkaliczną, produkowane w królikach, 1: 10000, roztwór w 1 × TBS-T, Rabbit Anti-Mouse IgG Antibody, Alkaline Phosphatase conjugate (Merck, Niemcy)

Wykonanie:

Transfer docelowych preparatów białkowych wykonywano przy użyciu aparatu do elektrotransferu - Trans-Blot Turbo Transfer System [Mat. i Met. 4.1.]. Przeprowadzono transfer metodą półsuchą na membranę PVDF [Mat. i Met. 4.1.]. Membranę zanurzano w 100% metanolu w celu jej aktywacji, po czym płukano ją wodą dejonizowaną. Membranę i filtry inkubowano z buforem do transferu Towbina. W kasecie do elektrotransferu składano tzw. „kanapkę” żel-membrana. Filtry umieszczano na dnie urządzenia, a na nich układano membranę. Bezpośrednio na membranę наносzono żel poliakryloamidowy po zakończonej elektroforezie SDS-PAGE / Tris-Tricine-SDS [Mat. i Met. 4.18.] i ponownie układano filtry. Pozbywano się pęcherzyków powietrza poprzez rolowanie „kanapki” wałkiem, zapobiegając niecałkowitemu przyleganiu poszczególnych jej warstw. Zamykano kasetę i umieszczano ją w aparacie do elektrotransferu. Elektrotransfer prowadzono przez 25 minut, przy napięciu 25 V i natężeniu 2,5 A. Membranę płukano w buforze TBS-T, a następnie barwiono przez 10 minut w roztworze PonceauS, po czym odbarwiano za pomocą 5% kwasu octowego i płukano jałową wodą. Membranę z transferowanymi białkami inkubowano w 5 ml buforu blokującego w temperaturze 25°C przez 5 min, następnie płukano ją 2-krotnie przez 5 minut w 1 × TBS-T. Detekcji białek na membranie dokonywano poprzez inkubację ze roztworami przeciwciał. W przypadku detekcji etykiety His membranę inkubowano z roztworem przeciwciał (I + II rzędowych) anti-His przez 1 h w temperaturze 37°C. Przed wywołaniem membrany płukano 2-krotnie przez 5 minut w 1 × TBS-T. Membranę wywołymano roztworem DAB, płukano wodą i fotografowano. Detekcji pełnych wariantów białek hTRF1 i hTRF2 oraz ich wariantów delecyjnych Myb1 i Myb2 dokonywano w dwóch etapach przy użyciu przeciwciał (I rzędowych) anti-TRF1/2 przez 1 h w temperaturze 37°C oraz przeciwciał (II rzędowych) anti-mysie IgG przez 1 h w temperaturze 37°C. Przed wywołaniem membrany płukano 2-krotnie przez 5 minut w 1 × TBS-T. Membranę wywołymano roztworem fosfatazy alkalicznej, płukano wodą i fotografowano.

4.24. Frakcjonowane strącanie białek siarczanem amonu

Odczynniki:

- siarczan amonu cz.d.a. (POCh S. A., Polska)

Wykonanie:

Odpowiednio przeliczoną ilość krystalicznego siarczanu amonu (AMS) (przy użyciu kalkulatora online: <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) dodawano do uzyskanego w procesie lizy komórkowej supernatantu, zawierającego białka His_Ub_Myb1 i His_UB_Myb2 i całość mieszano przez 1 h w 4°C. Wysalanie docelowych białek wykonywano dla sześciu poziomów nasycenia AMS (0-20%, 20-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%). Pierwszy poziom nasycenia, w warunkach 4°C uzyskano przez dodanie 3,3 g AMS do 30 ml surowego ekstraktu komórkowego, rozcieńczając całość do 31,75 ml. Po upływie godziny całość wirowano przy RCF 10 000 × g przez 20 min w 4°C, a uzyskany supernatant przenoszono do nowej probówki wirowniczej typu Falcon i dodawano kolejną porcję odważonego AMS. Procedurę powtarzano, aż do uzyskania ostatniego poziomu nasycenia AMS dodając odpowiednio 3,62, 1,93, 2,05, 2,19 i 2,33 g. Uzyskane osady zawieszano w buforze N i poddawano następnie oczyszczaniu na złożu Ni-NTA [Mat. i Met. 4.27.7.].

4.25. Oznaczanie stężenia białek metodą densytometryczną

Stężenie oczyszczonego preparatu białkowego oznaczano wykorzystując analizę densytometryczną cyfrowych zdjęć żeli przy użyciu programu UN-SCAN-IT Gel [Mat. i Met. 4.1.].

Wykonanie:

Prowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących [Mat. i Met. 4.18.] próbki białka wzorcowego surowicy albuminy wołowej (BSA) o wzrastającym stężeniu w obecności próbki docelowego preparatu białkowego o nieznanym stężeniu. Uzyskany żel fotografowano, a zdjęcie poddawano analizie komputerowej. Pomiaru nasycenia poszczególnych prążków odpowiadających białku BSA wykorzystywano do wyznaczenia krzywej wzorcowej (krzywa zależności zliczonych pikseli od ilości białka BSA) i wyznaczenia równania prostej. Stężenie białka docelowego obliczano podstawiając do równania prostej wartości zliczonych pikseli zmierzone dla pożądanego białka.

4.26. Trawienie białek proteazami

Reakcje trawienia preparatów białkowych wybranymi proteazami prowadzono stosując wyznaczoną doświadczalnie ilość enzymu przypadającą na 1 mg oczyszczanego

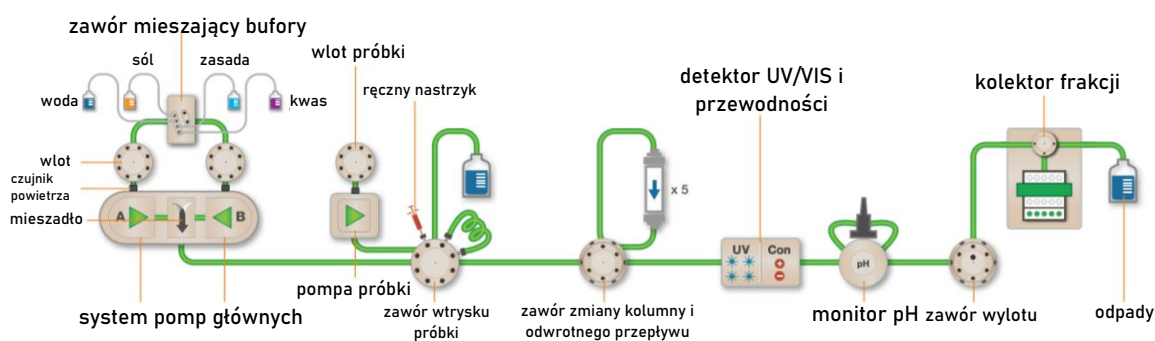
białka. Trawienia prowadzono w odpowiednich warunkach buforowych i cieplnych przez 1 – 14 h. Inaktywacji dokonywano przez zmianę warunków buforowych, temperatury, lub w przypadku karboksypeptydazy A dodaniem EDTA do końcowego stężenia 50 mM. Dokładną charakterystykę użytych proteaz przedstawiono w tabeli 19.

Tab. 19. Opis i charakterystyka używanych w poniższej pracy enzymów proteolitycznych.

Proteaza	Bufor reakcyjny (1 × stężony)	Sekwencja Rozpoznawalna	Temperatura i czas reakcji	Zastosowanie
TEV (New England Biolabs, MA, USA)	50 mM Tris- HCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 przy 25°C	ENLYFQ▼G	30°C 1-2 h	usunięcie domeny Fh8 z N-końca białka fuzyjnego
TEV rekombinantowa	0,5 mM EDTA, 1 mM DTT	ENLYFQ▼G	4°C 2-14 h	usunięcie domeny Fh8 z N-końca białka fuzyjnego
Karboksypeptydaza A (Merck, Niemcy)	50 mM Tris- HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0 przy 10°C	odcięcie C-końcowego aminokwasu w łańcuchu	37°C 1 h	usunięcie etykiety His z C-końca białka fuzyjnego
UBPD2C (Wojtowicz-Krawiec i in. 2014)	20 mM fosforanów, 2 mM DDT, 1 mM EDTA, pH 7,5	rdzeń katalityczny rozpoznaje sekwencje Ub i odcina przyłączone do jej C-końca białko, niezależnie od jej sekwencji aminokwasowej	37°C 2 h	usunięcie domeny Ub z N-końca białka fuzyjnego

4.27. Chromatograficzne oczyszczanie białek

Procesy oczyszczania białek rekombinantowych wykorzystujące techniki chromatograficzne, przeprowadzono głównie przy użyciu zautomatyzowanego systemu do oczyszczania białek NGC [Mat. i Met. 4.1.], sprzężonego z automatycznym kolektorem frakcji BioFrac™ Fraction Collector [Mat. i Met. 4.1.]. NGC to średniociśnieniowy aparat przeznaczony do chromatografii cieczowej wyspecjalizowany zarówno w analizach analitycznych jak i preparatywnych, umożliwiający znaczne zwiększenie skali oczyszczania białek. Modułowa budowa umożliwia skonstruowanie pożądanych opcji dla spełnienia szeregu wymagań dotyczących przepustowości i zastosowań w różnych analizach chromatograficznych. Przedstawiony na rycinie 7 schemat blokowy w pełni skonfigurowanego systemu NGC obrazuje możliwości jego zastosowania.



Ryc. 7. Schemat blokowy aparatu średniociśnieniowej chromatografii ciekłej NGC (BioRad). Rycinę stworzono na podstawie: [https://www.bio-rad.com/en-pl/category/ngc-medium-pressure-liquid-chromatography-systems?ID=MFCV7415], dostęp z dnia 08.05.2022 r.

Wykonanie:

Właściwy proces oczyszczania docelowego preparatu białkowego rozpoczynano od przygotowywania systemu NGC wraz z docelową kolumną. Początkowo cały aparat przepłukiwano jałową wodą, w tym pompy systemowe, pompę próbki oraz wszystkie przewody, wloty, wyloty oraz zawory w celu pozbycia się 20% etanolu. Następnie w systemie umieszczano kolumnę z pożądanym przez nas złożem chromatograficznym [Mat. i Met. 4.27.1.] i płukano je jałową wodą w ilości 10 objętości kolumny (CV, ang. *column volume*). Następnie wężyki od pomp systemowych umieszczano w dedykowanych dla danego złoża buforach i równowagowano złożę za pomocą 10 CV buforu równoważącego. W dołączonym oprogramowaniu ustalano poszczególne etapy i parametry oczyszczania, odpowiednie dla danej techniki chromatograficznej. Oznaczano pożądane parametry takie jak rodzaj kolumny, maksymalne ciśnienie, liczba pomiarów długości fal o różnych wartościach i wartość przepływu w ml/min (2 ml/min dla kolumn 5 ml oraz 1 ml/min dla kolumn 1 ml). Konfigurowano poszczególne etapy oczyszczania: równoważenie, płukanie i elucja, w których każdemu z osobna wyznaczano wartości przepływu, długość trwania wyrażoną w objętości kolumny (CV), procent buforu równoważącego do buforu elucyjnego, możliwość zbierania lub niezbiania frakcji, objętości zbieranych frakcji i kilka innych. Następnie rozpoczynano cały proces. Próbkę surowych ekstraktów komórkowych i białek наносono na złożę za pomocą pompy próbki. Płukania oraz elucji dokonywano za pomocą pomp systemowych. Odpowiednie stężenie czynnika elucyjnego uzyskiwano dzięki obecności wbudowanego mieszadła. Natomiast zamontowane moduły pH-metru oraz detektora UV-Vis umożliwiały w czasie rzeczywistym monitorowanie zmiany pH oraz obecności białek

w poszczególnych frakcjach, odczytując wskazania pH-metru oraz odpowiedzi detektora UV-VIS przy długości światła 280 i 214 nm. Frakcje (najczęściej o objętości 2 ml) z pożądaných etapów oczyszczania były automatycznie zbierane za pomocą sprzężonego kolektora frakcji. Umieszczenie całego aparatu wraz kolektorem frakcji w lodówce umożliwiło prowadzenie procesów w 4°C zmniejszając ryzyko degradacji oczyszczanych preparatów. Po zakończeniu całej procedury, system przepłukiwano wodą, a następnie 20% etanolem w celu zapobiegania wytrącania się soli i rozwojowi mikroorganizmów.

W przypadkach, gdy nie było możliwe użycie zautomatyzowanego systemu NGC rozdziały chromatograficzne przeprowadzano manualnie. Odpowiednią ilość złoża upakowywano w plastikowych kolumnach z filtrem. Przepływ cieczy wymuszany był wyłącznie przez działanie grawitacji. Szybkość przepływu cieczy regulowano poprzez dobieranie odpowiedniego przekroju kolumny. Zwiększając średnicę wybranej kolumny przyspieszano przepływ cieczy przez złożo. Proces oczyszczania docelowego preparatu białkowego rozpoczynano od przygotowania złoża. Pożądaną objętość danego złoża przenoszono do kolumny, czekali na jego poprawne ułożenie i wyciek pozostałości 20% etanolu. Następnie złożo płukano kolejno 10 CV jałowej wody i buforu równoważącego. Na tak przygotowane złożo nanoszono określoną ilość danego preparatu białkowego. Etapu płukania dokonywano przez przepuszczenie przez złożo w zależności od potrzeby od 5 do 10 CV buforu podstawowego. Elucję białek przeprowadzano skokowo, nanosząc na złożo porcje kolejnych buforów ze zwiększającym się stężeniem czynnika elucyjnego. Brak automatycznego mieszadła uniemożliwiał przeprowadzenie gradientu. Objętość zbieranych frakcji ustalano zgodnie z zapotrzebowaniem. Na końcu złożo regenerowano i zawieszano w 20% etanolu. Procedury oczyszczania w razie potrzeby przeprowadzano w 4°C, umieszczając kolumny w lodówce.

4.27.1. Złoża chromatograficzne

- HiTrap Imac Fast Flow 5 ml (Cytvia, UK)
- HiTrap Hic Selection Kit (Cytvia, UK)
 - HiTrap Butyl Fast Flow 1 ml (Cytvia, UK)
 - HiTrap Octyl Fast Flow 1 ml (Cytvia, UK)
- HiTrap Butyl Fast Flow 5 ml (Cytvia, UK)
- Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub (Cytvia, UK)
- HIS-Select Nickel Affinity Gel (Merck, Niemcy)

- HiLoad 26/600 Superdex™ 200 pg 320 ml (Cytvia, UK)
- HisTrap Hp 5 ml (Cytvia, UK)

4.27.2. Bufory chromatograficzne

- A [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl]
- B [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 500 mM imidazol]
- C [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1500 mM NaCl, 10 mM CaCl₂]
- D [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 5 mM CaCl₂]
- E [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 5 mM EDTA]
- F [50 mM Tris-HCl pH 10,0 w 10°C]
- G [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 5 mM CaCl₂]
- H [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 800 mM NaCl, 5 mM CaCl₂]
- I [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl₂]
- J [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂]
- K [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂]
- L [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA]
- M [50 mM Tris-HCl pH 8,0 w 10°C, 500 mM NaCl]
- N [50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl]
- O [50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 500 mM imidazol]
- P [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 10 mM imidazol]
- R [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 50 mM imidazol]
- S [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 100 mM imidazol]
- T [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 150 mM imidazol]
- U [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 200 mM imidazol]
- W [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 250 mM imidazol]
- Y [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 300 mM imidazol]
- Z [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 350 mM imidazol]
- AA [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 400 mM imidazol]
- AB [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 450 mM imidazol]
- AC [50 mM Tris-HCl pH 8,0 w 25°C, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 10% glicerol, 10 mM imidazol]

- AD [50 mM Tris-HCl pH 8,0 w 25°C, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 10% glicerol, 500 mM imidazol]
- AE [25 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5 w 25°C, 100 mM NaCl, 10% glicerol]

4.27.3. Oczyszczanie rekombinantowych białek Fh8_hTRF1_His, Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii powinowactwa

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HiTrap Imac Fast Flow przez 10 CV buforu A. Nanoszono surowe ekstrakty komórkowe zawierające pożądane białka fuzyjne Fh8_hTRF1_His / Fh8_hTRF2_His. Złoże płukano 15 CV buforu A (0 mM imidazolu), następnie 10 CV buforu A/ buforu B (10 mM imidazolu). Elucji pożądanych białek Fh8_hTRF1_His, Fh8_hTRF2_His dokonywano przy pomocy 10 CV buforu A/ buforu B, gradient imidazolu (10 – 500 mM).

4.27.4. Oczyszczanie rekombinantowego białka Fh8_hTRF1_His za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HiTrap Butyl Fast Flow przez 10 CV buforu C. Nanoszono pożądane białko fuzyjne Fh8_hTRF1_His, uzyskane po wstępnym oczyszczaniu na złożu IMAC. Złoże płukano 10 CV buforu C. Elucji pożadanego białka Fh8_hTRF1_His dokonywano w czterech etapach. Pierwszy etap - 10 CV bufor C/ bufor D, gradienty NaCl (1500 – 0 mM) i CaCl₂ (10 – 5 mM). Drugi - 10 CV bufor D/ bufor E, gradient EDTA (0 – 5 mM). Trzeci – płukanie 5 CV buforu E, czwarty – płukanie 10 CV buforu F (pH 10,0).

4.27.5. Oczyszczanie rekombinantowego białka Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Wykonano proces równowagowania 5 ml złoża Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) przez 10 CV buforu G. Nanoszono pożądane białko fuzyjne Fh8_hTRF2_His, uzyskane po wstępnym oczyszczaniu na złożu IMAC. Złoże płukano 10 CV buforu G – całość frakcji zbierano w pojedynczej probówce wirowniczej typu Falcon. Elucję pożadanego białka Fh8_hTRF2_His rozpoczynano od serii przemywań złoża kolejnymi buforami ze zmniejszającym się stężeniem soli (NaCl, CaCl₂). Używano kolejno 5 CV buforu H (800 mM NaCl, 5 mM CaCl₂), buforu I (500 mM NaCl, 5 mM CaCl₂), buforu J (300 mM NaCl, 5 mM CaCl₂), buforu K (150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂), całość frakcji zbierano w pojedynczych probówkach wirowniczych typu Falcon. Elucję kontynuowano nanosząc na złoże 5 CV buforu L (5 mM EDTA), a następnie buforu F (pH 10,0).

4.27.6. Oczyszczanie rekombinantowych białek hTRF1, hTRF2 za pomocą chromatografii wykluczania

Wykonano proces równowagowania 320 ml kolumny HiLoad 26/600 Superdex 200 pg przez 1 CV buforu M. Nanoszono preparaty hTRF1 i hTRF2 bezpośrednio po zakończeniu reakcji odcinania etykiety His przez karboksypeptydazę A. Rozdziału białek docelowych od usuniętych etykiet i użytych proteaz dokonano przez przepłukanie złoża 1 CV buforu M.

4.27.7. Oczyszczanie rekombinantowych białek His_Ub_Myb1, His_Ub_Myb2 za pomocą chromatografii powinowactwa

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HiTrap IMAC FF przez 10 CV buforu N. Na złożo nanoszono pożądane białka fuzyjne His_Ub_Myb1, His_Ub_Myb2 uzyskane po wstępnym etapie oczyszczania przy pomocy wytrącania siarczanem amonu. Zložo płukano 10 CV buforu N, a następnie 10 CV buforu N / buforu O (10 mM imidazolu). Elucji pożądanych białek His_Ub_Myb1, His_Ub_Myb2 dokonywano przy pomocy 10 CV buforu N / buforu O, gradient imidazolu (10 – 500 mM).

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HiTrap IMAC FF przez 10 CV buforu N. Nanoszono pożądane białka Myb1 i Myb2 uzyskane w wyniku reakcji z UBPD2C. Zložo płukano 10 CV buforu N (0 mM imidazolu). Elucji związanych pozostałości białek fuzyjnych His_Ub_Myb1, His_Ub_Myb2 oraz odciętej etykiety His_Ub dokonywano przy pomocy 2 CV buforu O (500 mM imidazolu).

4.27.8. Oczyszczanie rekombinantowych białek His_Myb1, His_Myb2 za pomocą chromatografii powinowactwa

Wykonano proces równowagowania 1 ml złoża HIS-Select Nickel Affinity Gel przez 10 CV buforu A. Nanoszono surowe ekstrakty komórkowe zawierające pożądane białka fuzyjne His_Myb1, His_Myb2. Zložo płukano 10 CV buforu P (10 mM imidazolu) – całość frakcji zbierano w pojedynczej probówce wirowniczej typu Falcon. Elucję pożądanych białek His_Myb1, His_Myb2 rozpoczynano od serii przemywań złoża kolejnymi buforami ze zwiększającym się stężeniem imidazolu. Używano kolejno 4 CV buforu R (50 mM imidazolu), buforu S (100 mM imidazolu), buforu T (150 mM imidazolu), buforu U (200 mM imidazolu), buforu W (250 mM imidazolu), buforu Y (300 mM imidazolu), buforu Z (350 mM imidazolu), buforu AA (400 mM imidazolu),

buforu AB (450 mM imidazolu), buforu B (500 mM imidazolu) - całość falkcji zbierano w pojedynczych probówkach wirowniczych typu Falcon.

4.27.9. Oczyszczanie rekombinantowych białek His_hTRF1, His_hTRF2 za pomocą chromatografii powinowactwa

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HisTrap HP 5 ml przez 10 CV buforu A. Nanoszono surowe ekstrakty komórkowe zawierające pożądaną białka fuzyjne His_hTRF1, His_hTRF2. Złoże płukano 15 CV buforu A, następnie 10 CV buforu A / buforu B (10 mM imidazolu). Elucji pożądanego białek His_hTRF1, His_hTRF2 dokonywano przy pomocy 10 CV buforu A/ buforu B, gradient imidazolu (10 – 500 mM).

4.27.10. Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii powinowactwa

Wykonano proces równowagowania 5 ml kolumny HiTrap Iac Fast Flow przez 10 CV buforu AC. Nanoszono surowy ekstrakt komórkowy zawierający pożądaną proteazę His_TEV. Złoże płukano 10 CV buforu AC (10 mM imidazolu). Elucji proteazy His_TEV dokonywano przy pomocy 10 CV buforu AC/ buforu AD, gradient imidazolu (10 – 500 mM).

4.27.11. Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii wykluczania

Wykonano proces równowagowania 320 ml kolumny HiLoad 26/600 Superdex 200 pg przez 1 CV buforu AE. Nanoszono całość preparatu proteazy His_TEV (12 ml) uzyskanego po pierwszym etapie oczyszczania za pomocą chromatografii powinowactwa. Rozdział białka docelowego od pozostałych zanieczyszczeń uzyskano przepłukując złoże 1 CV buforu AE.

4.28. Badania potwierdzające właściwości natywne wiązania telomerowego DNA przez rekombinantowe białka kompleksu Shelterin

4.28.1. Metoda pomiaru przesunięcia mobilności w elektroforezie żelowej - EMSA (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Test przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej (EMSA) to podstawowa technika wywodząca się z szerokiej gamy analiz jakościowych i ilościowych służących do charakteryzowania współpracujących systemów. Stosowana jest do badań oddziaływań kompleksów białkowych z kwasami nukleinowymi, inaczej mówiąc służy

do wykrywania białek wiążących DNA. W klasycznym teście roztwory białka i kwasu nukleinowego łączy się i powstałe mieszaniny poddaje się elektroforezie w natywnych warunkach w żelu poliakryloamidowym. Po zakończonej elektroforezie określa się rozmieszczenie DNA, przez autoradiografię kwasu nukleinowego znakowanego ³²P. Znane są przypadki stosowania elektroforezy agarozowej oraz barwników wizualizujących DNA pod wpływem światła UV. Założeniem testu EMSA jest zjawisko migracji DNA związanego z białkiem przez żel wolniej niż odpowiadające mu niezwiązane DNA (Smith i Delbary-Gossart 2001; Hellman i Fried 2007; Holden i Tacon 2011; Ream, Lewis, i Lewis 2016).

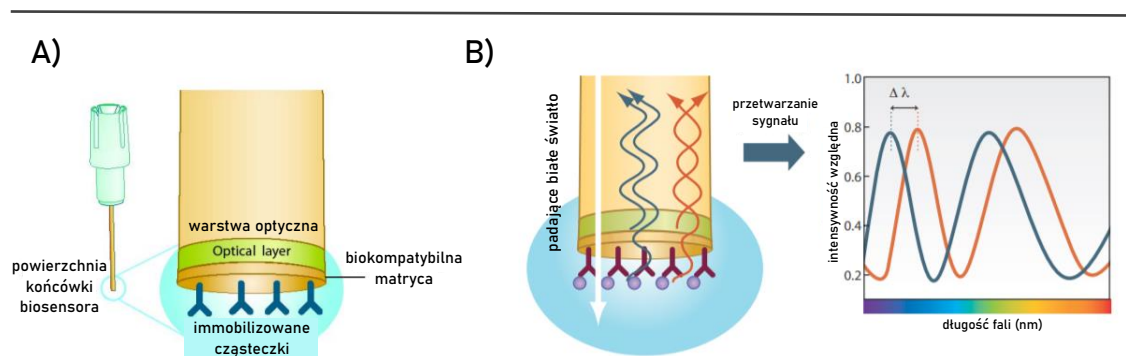
Wykonanie:

Kompleksy wybranych białek z kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z modyfikowanym DNA zawierającym powtórzenia telomerowe (Tab. 27.) rozdzielano przy pomocy elektroforezy agarozowej [Mat. i Met. 4.16.] w żelach o różnej procentowości (0,7 – 2,5%), w zależności od wielkości użytego DNA. Rozdziały prowadzono również w żelach poliakryloamidowych (6%) w procesie elektroforezy PAGE [Mat. i Met. 4.17.]. Wszystkie rozdziały przeprowadzono w warunkach natywnych, niedenaturujących. Wizualizacji prążków DNA w żelu dokonywano poprzez barwienie żelu w roztworach wizualizujących bromku etydyny lub GelRed [Mat. i Met. 4.16.].

4.28.2. Technologia BLItz wykorzystująca interferometrię biowarstw

Aparat BLItz wykorzystuje zastrzeżone testy bezetykietowe ForteBio Dip i Read™. Przeprowadzane są one przy użyciu jednorazowych biosensorów, z których każdy wykonany jest z biokompatybilnej matrycy, która jest jednorodna, niedenaturująca i minimalizuje wiązania niespecyficzne (Ryc. 8., A). Pozwala to na wykrywanie tylko cząsteczek bezpośrednio związanych z powierzchnią biosensora, zapewniając wyjątkową specyficzność dla poszczególnych zastosowań, nawet dla próbek pochodzących z surowych ekstraktów komórkowych. Szeroki wybór specjalistycznych biosensorów gwarantuje możliwość analizowania różnych oddziaływań, w tym białko-białko, białko-przeciwciało czy białko-DNA. Technologia interferometrii warstw biologicznych (BLI) dostarcza danych na temat interakcji białek w czasie rzeczywistym. System emituje białe światło w dół biosensora, zbierając następnie odbite światło. Długości fal światła odbitego zależą od grubości powłoki znajdującej się na warstwie optycznej. Długości fal

mogą wykazywać konstruktywną interferencję (niebieski), albo destrukcyjną (czerwony) (Ryc. 8., B). Zakłócenia są rejestrowane przez spektrometr jako unikalna sygnatura widmowa, następnie przedstawiane są w jednostkach intensywności względnej (nm). Każda zmiana liczby cząsteczek związanych z biosensorem powoduje zmianę wzorca interferencji, który jest mierzony w czasie rzeczywistym. To przesunięcie długości fali jest bezpośrednią miarą zmiany grubości optycznej (nm), związaną z przyłączoną warstwą biologiczną. Na podstawie tych danych oprogramowanie określa poziom wiązania się specyficznych ligandów dla danych biomolekuł.



Ryc. 8. Przedstawienie technologii interferometrii biowarstwowej (BLI) stosowanej przez system BLItz. A) Schemat budowy pojedynczego biosensora. B) Schematyczne przedstawienie zasady działania wykonywanych pomiarów. Rycinę stworzono na podstawie: [Blitz user guide (Sartorius, Niemcy)].

Technologia BLI jest powszechnie akceptowana jako odpowiedni test wiązania dla różnych makrocząsteczek. Większość eksperymentów BLI obejmuje interakcje białko-białko lub białko-małe cząsteczki. Interakcje DNA-białko są rzadziej sprawdzane i do tej pory opublikowano niewiele wyników dotyczących tych interakcji (Desai, Di, i Fan 2019; Barrows i Dyke 2022). Zrozumienie interakcji DNA-białko jest również podstawą dla kilku dziedzin nauki, w tym biochemii, biologii molekularnej i chemii medycznej. W związku z tym rozwój technik eksperymentalnych do walidacji tych oddziaływań ma dalej kluczowe znaczenie (Barrows i Dyke 2022).

BLI ma kilka zalet w porównaniu z tradycyjnymi testami wiązania DNA-białko. Zautomatyzowany charakter tej techniki ogranicza błąd ludzki. Ponadto wiele wcześniejszych testów, takich jak: DNase I footprinting, test ochrony endonukleazy restrykcyjnej (REPA, ang. *restriction endonuclease protection assay*) lub test przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej (EMSA), nie zapewniają pomiarów kinetyki wiązania. Kilka ustalonych testów wymaga substratów fluorescencyjnych lub

znakowanych radioaktywnie, podczas gdy BLI może być stosowany z nieznakowanymi cząsteczkami białka, czy biotynylowanym DNA. Ponadto BLI nie wymaga etapu wtórnego opartego na wychwytywaniu, co jest główną zaletą w przypadku badania białek pozbawionych dostępnych na rynku przeciwciał (Barrows i Dyke 2022).

Odczynniki:

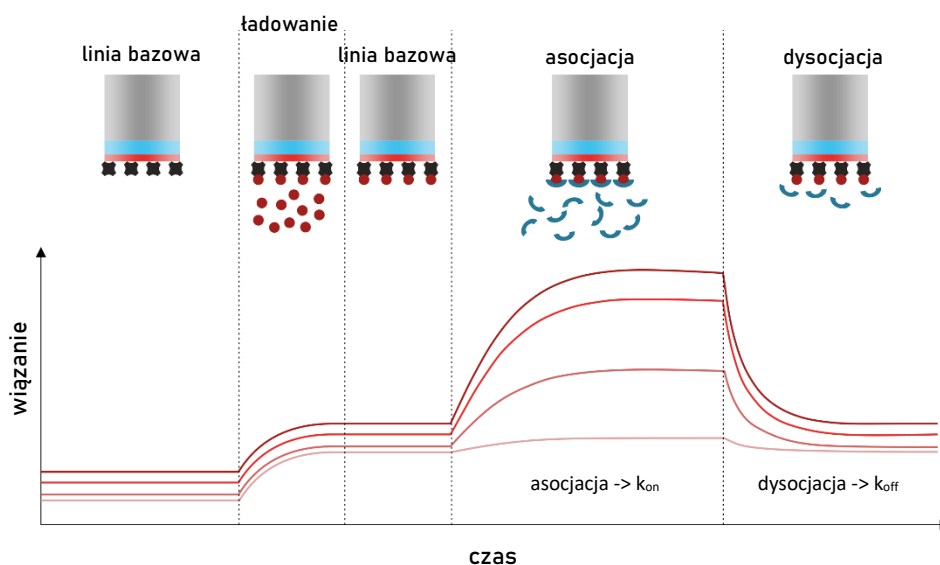
Tab. 20. Lista stosowanych biosensorów przeznaczonych do badań oddziaływań z wykorzystaniem technologii BLItz.

Biosensor	Opis	Przeznaczenie	Działanie
SA	streptawidyna	testy kinetyczne	unieruchamianie biotynylowanych cząsteczek do wszystkich analiz kinetycznych
HIS1K	anty-Penta-HIS	testy ilościowe testy kinetyczne	wychwytywanie białek ze znacznikiem His do analiz kinetycznych oznaczanie ilościowe białek z etykietą His znajdujących się w buforze, pożywce lub rozcieńczonym ekstrakcie komórkowym

Wykonanie:

Analizę kinetyczną rozpoczynano od procesu dehydratacji wybranych biosensorów (Tab. 20.), rozpuszczenia cienkiej pokrywy cukrowej, zabezpieczającej powierzchnię biosensora. Biosensory umieszczano w statywach umieszczonych pod płaskodenną 96-dółkową płytką zawierającą docelowy w całej analizie bufor [50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl]. Proces prowadzono przez 10 min. Testy kinetyczne przeprowadzono w programie zaawansowana kinetyka. Rozpoczynano pomiar. Otwierano pokrywę aparatu BLItz, umieszczano wybrany biosensor w miejscu jego mocowania, przesuwano suwak w pozycję pomiaru w probówkach (tube) i umieszczano w nim czarną (nieprzepuszczającą światła) probówkę z 200 µl buforu do analizy. Zamykano pokrywę i przeprowadzono odczyt linii bazowej (30 s). Otwierano pokrywę, usuwano probówkę, przesuwano suwak w pozycję pomiaru kropli (drop), наносzono 4 µl analitu (białka, które miało związać się do biosensora). Zamykano pokrywę i prowadzono odczyt ładowania (immobilizowania) docelowego białka na biosensor (90-120 s). Otwierano pokrywę, usuwano analit, przesuwano suwak w pozycję pomiaru w probówce i umieszczano 200 µl buforu do analizy. Zamykano pokrywę i rozpoczynano odczyt linii bazowej (30 s). Otwierano pokrywę, usuwano probówkę, przesuwano suwak w pozycję pomiaru kropli, наносzono 4 µl ligandu (cząsteczki oddziałującej z badanym białkiem). Zamykano pokrywę i prowadzono odczyt asocjacji

(60-120 s). Otwierano pokrywę, usuwano analit, przesuwano suwak w pozycję pomiaru w probówce i umieszczano 200 μl buforu do analizy. Zamykano pokrywę i rozpoczynano odczyt dysocjacji (90-120 s). Po zakończeniu całego pomiaru usuwano zużyty biosensor i zakładano nowy. Całą procedurę powtarzano dla każdego następnego pomiaru. Pomiar zerowy (blank) wykonywano nanosząc 4 μl buforu do analizy w etapie ładowania. Zamykając i otwierając pokrywę poruszano mocowaniem biosensora, umieszczając lub usuwając go w buforze lub analicie. Czynność tę należy wykonywać w sposób płynny, nie pozwalając na zbyt długi kontakt biosensora z powietrzem. Analit i ligand umieszczano w adapterze umożliwiającym pomiar w objętości kropli (dropholder), który po każdym pojedynczym pomiarze płukano 0,5 M HCl, następnie buforem do analizy. Probówki z buforem używano jednokrotnie. Typowy wykres rozdziału dla analitu oddziałującego ze swoistym ligandem przedstawia rycina 9.



Ryc. 9. Graficzne przedstawienie interakcji zachodzącej na powierzchni biosensora dla typowego pomiaru zaawansowanego testu kinetycznego dla oddziałującego układu. Rycinę stworzono na podstawie: [<https://2bind.com/bli>], dostęp z dnia 08.05.2022 r.

4.29. Chemiczna synteza peptydów

Chemiczna synteza zaprojektowanych peptydów: TIN (RHFNLAPLGRRRVQSQWASTR) i Apollo (EFRGLALKYLLTPV) w wariantach z i bez biotyny została zlecona firmie Lipopharm.pl (Polska). Peptydy zostały uzyskane wykorzystując strategię BOC na nośniku stałym (SPPS). Masa molekularna została potwierdzona przy użyciu LCMS. Czystość na poziomie 99,9% została uzyskana wykorzystując oczyszczanie przy użyciu HPLC.

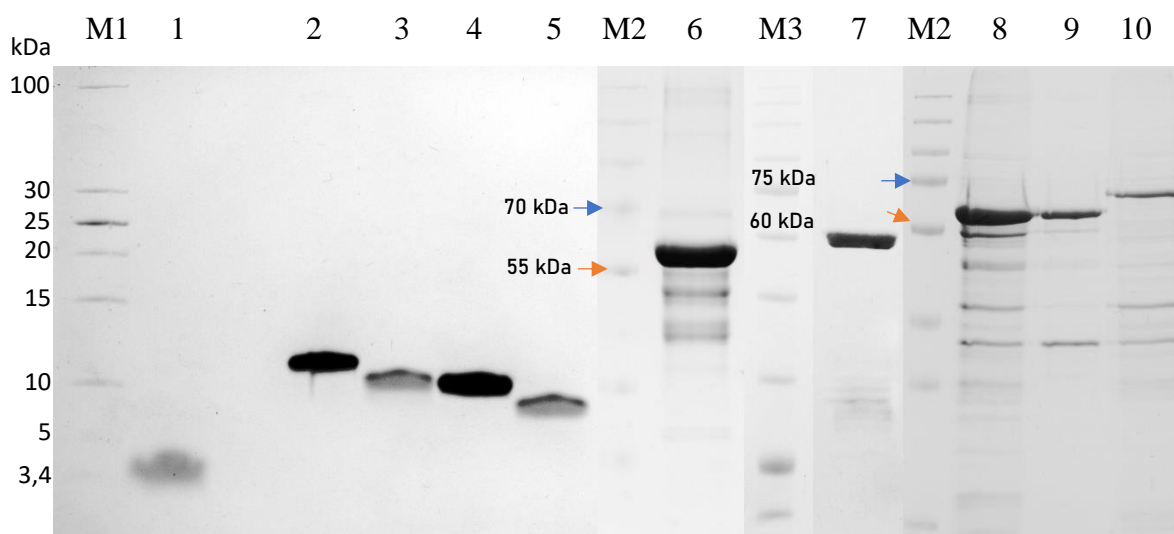
5. WYNIKI I DYSKUSJA

5.1. Preparatyka wybranych białek telomerowych z ludzkiego kompleksu Shelterin chroniącego końce chromosomów, wykazujących oddziaływanie z telomerowym dsDNA

Postawiony główny cel pracy wymagał opracowania w pełni funkcjonalnego modelu do badań oddziaływań *in vitro* pomiędzy rekombinantowymi białkami telomerowymi z kompleksu Shelterin a telomerowym dsDNA. Niniejszy rozdział przedstawia procesy preparatywne różnych wariantów białek hTRF1, hTRF2 oraz ich domen wiążących Myb1 i Myb2. Opisuje strategie, które doprowadziły do ich otrzymania w procesie biosyntezy i oczyszczania jako białka fuzyjne, przy zastosowaniu wybranych strategii dedykowanych dla użytych etykiet. Tabela 21 przedstawia wszystkie warianty omawianych białek kompleksu Shelterin, które zostały uzyskane w ramach niniejszej pracy, a także ich rozdział na żelach poliakryloamidowych (Ryc. 10.).

Tab. 21. Charakterystyka uzyskanych białek kompleksu Shelterin wykazujących powinowactwo do telomerowego dsDNA uzyskanych w ramach niniejszej pracy.

Białko	aa	kDa	pI	E%	System ekspresyjny	Szczep bakteryjny	Domena fuzyjna	Strategia oczyszczania
Myb1	61	7,5	10	3,34	pET28a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	His_Ub_X	Ni-NTA UBP2C Ni-NTA
Myb2	56	6,65	10,17	3,76	pET28a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	His_Ub_X	Ni-NTA UBP2C Ni-NTA
His_Myb1	67	8,3	10	3,34	pET28a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	His_X	Ni-NTA
His_Myb2	62	7,45	10,17	3,76	pET28a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	His_X	Ni-NTA
hTRF1	438	50,11	6	0,847	pET28a	<i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	Fh8_TEV_ X_K_His	Ni-NTA HIC TEV+Ca GF
hTRF2	499	55,42	9,22	0,858	pET28a	<i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	Fh8_TEV_ X_K_His	Ni-NTA HIC TEV+Ca GF
His_hTRF1	444	50,91	6	0,847	pET28a	<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	His_X	Ni-NTA
His_hTRF2	505	56,22	9,22	0,858	pET28a	<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	His_X	Ni-NTA



M1 – PageRuler™ Unstained Low Range Protein L.		M3 – ExcelBand™ 3-color High Range PM2600	
M2 – PageRuler™ Plus Prestained Protein L.		6 – białko hTRF1	[50,11 kDa]
1 – peptyd TIN	[2,6 kDa]	7 – białko hTRF2	[55,42 kDa]
2 – białko Myb1	[7,5 kDa]	8 – białko His_hTRF1 (I)	[50,91 kDa]
3 – białko His_Myb1	[8,3 kDa]	9 – białko His_hTRF1 (II)	[50,91 kDa]
4 – białko Myb2	[6,65 kDa]	10 – białko His_hTRF2	[56,22 kDa]
5 – białko His_Myb2	[7,45 kDa]		

Ryc. 10. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający uzyskane w ramach niniejszej pracy preparaty białkowe z kompleksu Shelterin. Białka domeny wiążącej Myb1 i Myb2 oraz peptyd TIN rozdzielono w 17,3% żelu poliakryloamidowym Tris-Tricine. Białka hTRF1 oraz hTRF2 rozdzielono w 12,5% żelach poliakryloamidowych SDS-PAGE. Strzałką niebieską oznaczono prążek wzorca wielkości równy 70 kDa, a strzałką pomarańczową oznaczono prążek wzorca wielkości równy 55 kDa.

Przedstawiony rozdział ukazuje produkty końcowe dla poszczególnych procesów preparatywnych białek kompleksu Shelterin. Wynik potwierdza uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 w wariantach wolnych od etykiet, a także z nieusuwalną etykietą His, oraz ich domen wiążących Myb1 oraz Myb2 w tej samej konfiguracji. Podkreśla to słuszność wyboru opracowanych strategii oczyszczania dedykowanych do zaprojektowanych białek fuzyjnych. Dokładna i szczegółowa preparatyka każdego wymienionego białka wraz z opisem dedykowanych strategii bioprodukcji i oczyszczania została opisana w kolejnych podpunktach.

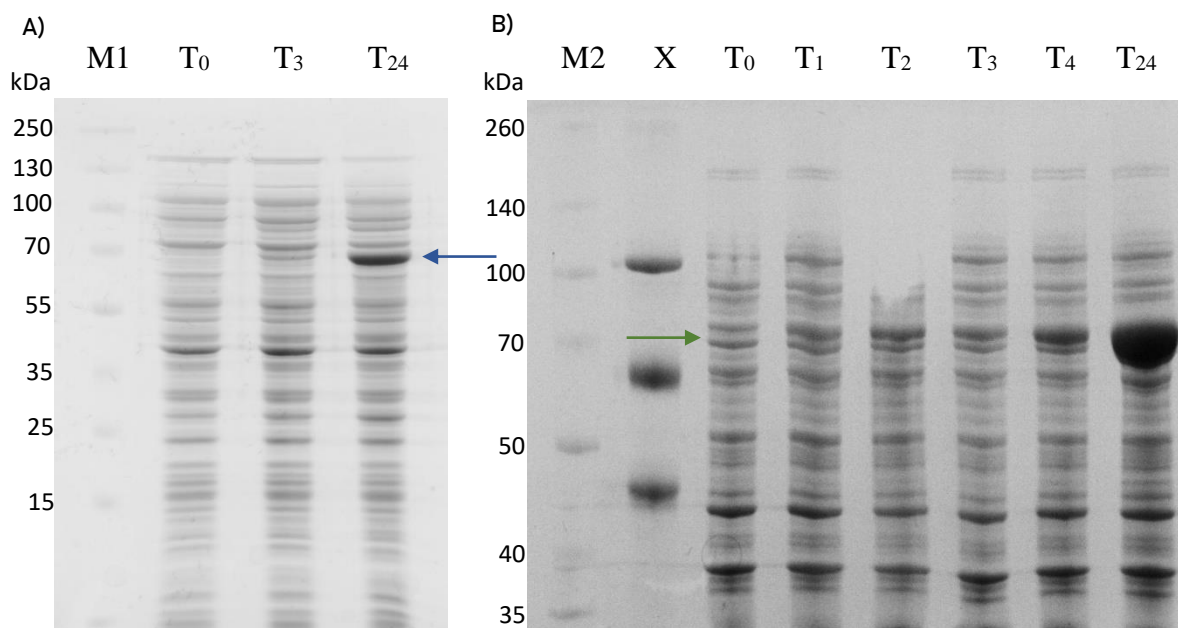
5.1.1. Uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 hTRF2 w fuzji z domeną Fh8 na N- końcu oraz etykietą His na C- końcu

Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne Fh8_hTRF1_His oraz Fh8_hTRF2_His

Wybór etykiety Fh8 do produkcji pełnych wariantów białek rekombinantowych hTRF1 i hTRF2 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym *E. coli* podyktowany był ograniczeniem tego systemu, posiadającego trudność w produkcji białek pochodzenia eukariotycznego [W. T. 3.7.]. Strategia ta nie została wybrana od razu i była konsekwencją analizy wyników wcześniejszych prób biosyntezy tych białek oraz przestudiowania kilkunastu pozycji (Khorasanizadeh, Peters i Roder 1996; Englander 2000; Bhattacharya, Bunick i Chazin 2004; Silva i in. 2004; Butt i in. 2005; Zhou i in. 2006; Marblestone i in. 2006; Fraga i in. 2010; Schwaller 2010; Chazinhtr 2011; Wang i in. 2012; Costa i in. 2014). Większość przejranej literatury w tym rozprawa doktorska dr Joanny Bidzińskiej (Bidzińska 2011) wskazywały na uzyskiwanie aktywnych białek hTRF1 i hTRF2 poprzez ich biosyntezę w komórkach owadzych Sf21 w układzie ekspresyjnym bakulowirusa (Kim, Kaminker, i Campisi 1999; Ye i de Lange 2004; Tahmaseb 2007; Tahmaseb i Turchi 2010; Lin i in. 2014; Jack i in. 2022; Zinder i in. 2022). Założenie opracowania szeroko dostępnego, szybkiego do uzyskania, modelowego kompleksu Shelterin z telomerowym DNA kierowało uwagę na biosyntezę tych białek w bakteryjnych systemach ekspresyjnych. Jedną z pierwszych prób uzyskania białek rekombinantowych hTRF1 i hTRF2 wykonanych przez zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej była ich bioprodukcja w fuzji z domeną ubikwityny UB_hTRF1/UB_hTRF2 w szczepie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) Star. Mimo uzyskania rozpuszczalnych docelowych białek strategia ta została odrzucona ze względu na wysoką degradację białek na etapie ich bioprodukcji. Druga próba optymalizacji ekspresji genów kodujących pożądaną białka polegała na zmianie bakteryjnego systemu ekspresyjnego na system grzybowy, który posiada jednak kilka cech wspólnych, t. j. niewysoki koszt prowadzenia hodowli oraz dostatecznie szybkie tempo wzrostu komórek. Próbę przeprowadzono w drożdżowym systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*, z której wyników powstała łączona praca magisterska (Głębocka i Skokowska 2019). Wybrany system ekspresyjny PichiaPink™ Expression Strain Set (Thermo Scientific, Ma, USA) okazał się mało wydajny do ekspresji genów kodujących docelowe białka hTRF1 i hTRF2 i dalej występował problem z ich degradacją (Głębocka i Skokowska 2019). Na etykietę Fh8 zdecydowano się po analizie literatury (Costa i in. 2014). Tak jak

opisano w podrozdziale W. T. 3.7.3. wykazuje ona zarówno cechy wspomagające rozpuszczanie jak i oczyszczanie, a w połączeniu ze szczepem ekspresyjnym, umożliwiającym biosyntezę białek w niskich temperaturach (10°C) zneutralizowano problem z ich degradacją *in vivo*.

Biosyntezę białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His rozpoczynano od zaszczepienia 50 ml hodowli nocnej w pożywce LB [Mat. i Met. 4. 3.] suplementowanej kanamycyną [Mat. i Met. 4.4.2.] za pomocą wyselekcjonowanych pozytywnych klonów bakteryjnych, zawierających DNA plazmidowy kodujący odpowiednie białka fuzyjne [Mat. i Met. 4.2.]. Transformowane bakterie szczepu ArcticExpress (DE3) [Mat. i Met. 4.4.1.] zaszczepiono, pobierając kolonie z podłoża mikrobiologicznego. Właściwe hodowle odmłodzono w 2 l pożywki LB suplementowanej dodatkiem kanamycyny [Mat. i Met. 4.4.2.] pobierając około 10 - 15 ml nocnych hodowli bakteryjnych uzyskując wartości OD₆₀₀ w okolicach pożądanego 0,1. Komórki bakteryjne wzrastały w 30°C aż do osiągnięcia OD₆₀₀ o wartości około 0,6. Indukcji ekspresji genu kodującego odpowiednie białko fuzyjne dokonywano przez dodanie do hodowli izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG) do końcowego stężenia 1 mM. Dalszą hodowlę kontynuowano w temperaturze 10°C przez 24 h. Hodowle zakończono poprzez zwirowanie całości przy RCF 5000 × g przez 10 min w 4°C, otrzymując około 4,5 g biomasy komórek bakteryjnych dla obu preparatów białkowych. Podczas wzrostu komórek bakteryjnych pobierano również próbki hodowli jako kontrole przyrostu białka docelowego po indukcji ekspresji genu. Pobierano po 1 ml hodowli dla czasu T₀ przed dodaniem IPTG oraz kolejnych od T₁ do T₂₄ po zaindukowaniu ekspresji genu. Wyniki kontroli przyrostu ilości białka od momentu indukcji ekspresji genów przedstawiono na rycinie 11.



M1 – PageRuler™ Plus Prestained Protein L

M2 – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein L

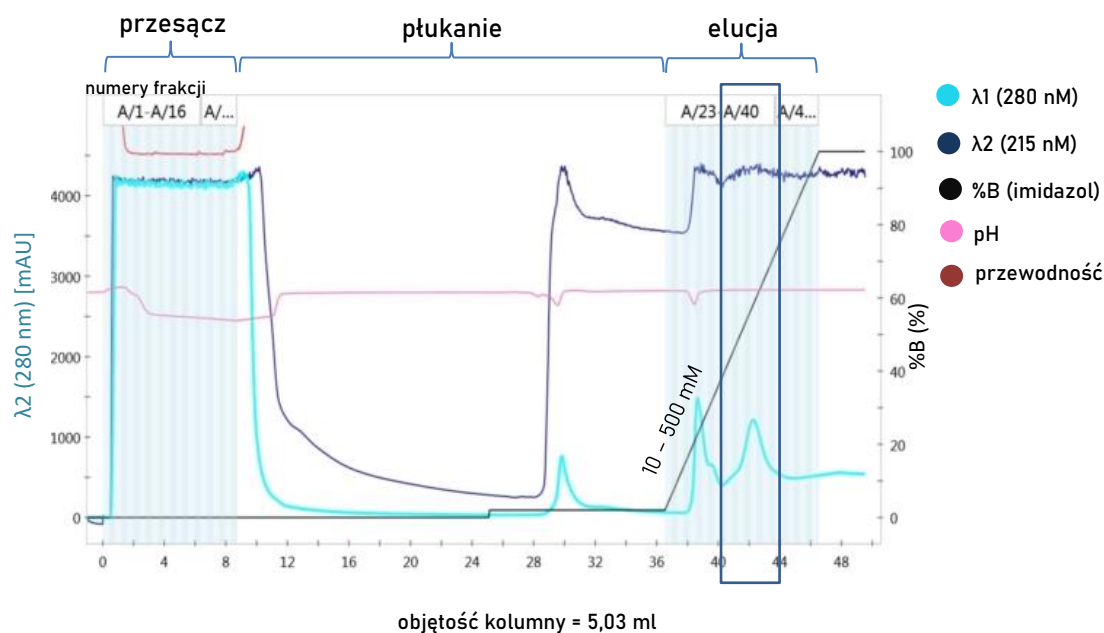
T₀ – T₂₄ - kolejne próbki pobierane od rozpoczęcia indukcji ekspresji genów kodujących białka Fh8_hTRF1_His/Fh8_hTRF2_His

Ryc. 11. Wynik rozdziálu elektroforetycznego w 12% żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE próbek pobranych po różnym czasie hodowli od momentu indukcji ekspresji genów kodujących białka Fh8_hTRF1_His/Fh8_hTRF2_His w szczepie ArcticExpress (DE3). A) Przyrost ilości białka Fh8_hTRF1_His w czasie jego nadprodukcji. B) Przyrost ilości białka Fh8_hTRF2_His w czasie jego nadprodukcji. Niebieska strzałka wskazuje przyrost białka Fh8_hTRF1_His, zielona strzałka wskazuje przyrost białka Fh8_hTRF2_His.

Próbki przyrostu ilości białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His w czasie ich nadprodukcji zostały naniesione proporcjonalnie do wartości OD₆₀₀ odpowiadającym im czasom pomiarów. Obserwowany przyrost docelowych białek po upływie określonego czasu od momentu rozpoczęcia indukcji ekspresji genów potwierdza poprawność biosyntezy białek Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His w wybranym szczepie ekspresyjnym. Białka fuzyjne Fh8_hTRF1_His (59 kDa) i Fh8_hTRF2_His (64 kDa) migrują w przybliżeniu zgodnie z ich teoretyczną wielkością. Większa wydajność biosyntezy obserwowana jest dla białka Fh8_hTRF2_His. Wyniki analizy western blot [Mat. i Met. 4.23.] z wykorzystaniem monoclonalnych przeciwciał anti-TRF1 i anti-TRF2, a także anti-His nie wykazały fragmentów degradacyjnych dla ekstraktów bakteryjnych pobranych podczas biosyntezy (nie pokazano). Wynik ten wskazuje, że dobrany system ekspresyjny jest odpowiedni do biosyntezy omawianych białek.

Oczyszczanie białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His oraz Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii powinowactwa

Otrzymane w wyniku przeprowadzonych hodowli z ekspresją genów kodujących docelowe białka Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His, biomasy komórek bakteryjnych zawieszano w buforze [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1000 mM NaCl, 0,5 mg/ml lizozym, 1 mM PMSF, suplementowanym ½ tabletki zawierającej koktajl inhibitorów proteaz] w stosunku osadu do buforu 1:10, uzyskując około 50 ml zawiesiny komórek bakteryjnych. Komórki bakteryjne inkubowano w łaźni lodowej przez 20 min, po czym komórki bakteryjne poddawano lizie, stosując metodę sonikacji [Mat. i Met. 4.19.]. Uzyskany ekstrakt komórkowy wirowano przy RCF 15000 × g przez 20 min w 4°C. Supernatant oddzielano od pozostałej biomasy, a następnie filtrowano go przy użyciu filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 μm w celu usunięcia ewentualnych resztek komórek i innych zanieczyszczeń. Przygotowany surowy ekstrakt komórkowy przeznaczono do właściwej procedury oczyszczania. Ze względu na obecność etykiety His i jej właściwości, które omówiono we wstępie teoretycznym [W. T. 3.7.1.] wykorzystano oczyszczanie przy użyciu chromatografii metalopowinowactwa (IMAC). Cały proces prowadzono przy pomocy zautomatyzowanego systemu do oczyszczania białek NGC [Mat. i Met. 4.27.3.]. Obecność docelowych białek Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His w poszczególnych frakcjach ustalano poprzez analizę otrzymanego chromatogramu głównie dla długości fali 280 nm oraz 215 nm. Chromatogram dla wskazań długości fali 215 i 280 nm przedstawiono na rycinie 12, na przykładzie procesu z oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His (dla Fh8_hTRF2_His chromatogram był analogiczny).

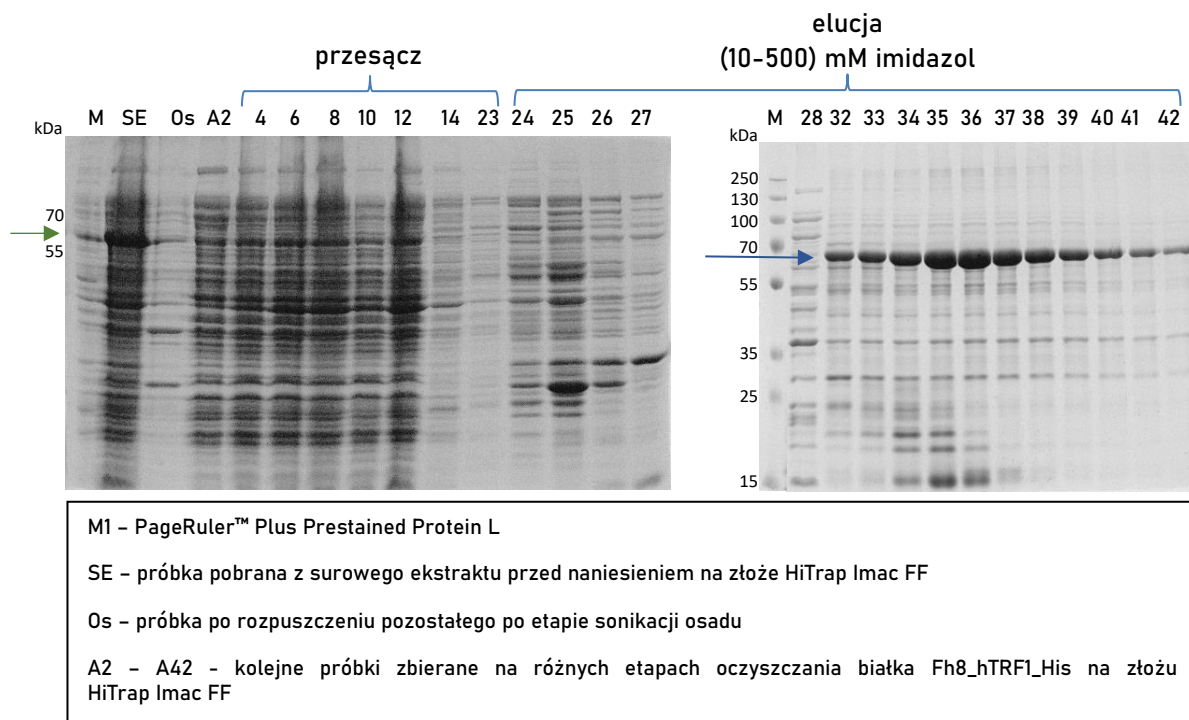


Ryc. 12. Chromatogram z przebiegu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap Imac Fast Flow. Granatowy prostokąt oznacza frakcje zawierające docelowy preparat. Na osiach y oznaczono wskazania detektora UV-VIS [mAU] oraz % użytego czynnika elucyjnego. Na osiach x oznaczono postęp procesu wyznaczony w objętości kolumny (CV) od 1 do 49 oraz numery zbieranych frakcji od A1-A42 do B1-B6.

Oprogramowanie dołączone do zautomatyzowanego systemu NGC umożliwia eksportowanie chromatogramów z parametrami, które były zbierane przez czujniki i detektory podczas całego procesu oczyszczania. W celu zachowania przejrzystości przedstawianych wyników wybierano tylko część z nich, które obrazują istotne zmiany zachodzące w poszczególnych etapach oczyszczania. Najważniejszymi parametrami z całej preparatyki białek są wskazania detektora UV-VIS przy długości fali $\lambda_1 = 280$ nm, oraz $\lambda_2 = 215$ nm, które umożliwiają szacunkową ocenę obecności białek w poszczególnych frakcjach zbieranych przez automatyczny kolektor frakcji. Kolejne parametry takie jak przewodność, pH, czy procent czynnika elucyjnego (%B) ułatwiają zrozumienie procesów zachodzących w poszczególnych etapach oczyszczania przy użyciu dedykowanych złoż i technik chromatograficznych.

Analiza przedstawionego chromatogramu, z przebiegu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap IMAC FF, została wykonana głównie w oparciu o wskazania detektora UV-VIS, głównie przy długościach fali $\lambda_1 = 280$ nm (Ryc. 12., turkusowa linia) oraz $\lambda_2 = 215$ nm (Ryc. 12., niebieska linia), wspomagając się odczytem zmiany ilości użytego czynnika elucyjnego (imidazolu) (Ryc. 12., czarna linia). Pominięto

parametry pH (Ryc. 12., różowa linia) oraz przewodności (Ryc. 12., bordowa linia), ze względu na brak ich wpływu na elucję białek posiadających znacznik His przy zastosowaniu chromatografii IMAC. Odczyty detektora UV-VIS wskazują, że największa ilość białek, zgodnie z przewidywaniami, znajduje się we frakcjach przesączu (FT z ang. *flow through*) (Ryc 12., frakcje nr A1-A22, CV nr 1-9). Bezpośrednie naniesienie surowego ekstraktu komórkowego na złożo typu Ni-NTA powoduje obecność we frakcjach przesączu białek bakteryjnych *E. coli* uwalnianych w procesie lizy komórkowej. Białka nieposiadające etykiety His nie wykazują powinowactwa do złoża niklowego, przez co przechodzą przez złożo i są eluowane we frakcjach przesączu. W początkowych etapach płukania (Ryc. 12., CV nr 10-25) obserwowano bardzo gwałtowny spadek ilości białek eluowanych, dopiero zwiększenie stężenia imidazolu do 10 mM (Ryc 12., CV nr 26-36) powoduje elucję reszty niezwiązanych, słabo związanych i niespecyficznie związanych białek. W przebiegu elucji gradientowej (10 - 500 mM imidazolu) obserwuje się dwa wyraźne piki chromatograficzne, pierwszy w zakresie 50 - 200 mM (Ryc. 12., frakcje nr A26-A30, CV nr 37-40) oraz drugi w zakresie 200 - 400 mM (Ryc 12., frakcje nr A32-A41, CV nr 41-44) stężenia imidazolu. Wysokie stężenie czynnika elucyjnego dla drugiego sygnału może wskazywać na elucję białka docelowego Fh8_hTRF1_His, które przez obecność etykiety His mocno związało się do złoża (Ryc. 12., granatowa ramka). Ocena przebiegu całego procesu oczyszczania z analizy samego chromatogramu jest niewystarczająca, uzyskane wyniki są ograniczone i wymagają potwierdzenia obecności docelowego białka poprzez analizę wielkości białka w żelu polikryloamidowym SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.]. W istocie użycie zautomatyzowanego systemu pozwala na precyzyjne wskazanie frakcji obejmujących docelowy preparat oraz szacunkową ocenę poprawności samego procesu, stanowiąc przewagę nad rozwiązaniami manualnymi. Określenie ilości oraz czystości otrzymywanych preparatów białkowych dopełniano przy wykorzystaniu analizy elektroforetycznej SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.]. Zdjęcia z rozdziału SDS-PAGE próbek z poszczególnych frakcji z oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap IMAC FF wyselekcjonowanych po analizie omawianego chromatogramu przedstawiono na rycinie 13.



Ryc. 13. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12,5% żelu SDS-PAGE frakcji uzyskanych na etapie oczyszczania białka fuzyjnego Fh8_hTRF1_His z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa i złoża HiTrap IMAC FF. Strzałki wskazują prążki pochodzące od migracji białka docelowego Fh8_hTRF1_His.

Wyniki rozdzielów elektroforetycznych w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE poszczególnych frakcji chromatograficznych z etapów procesu izolowania i oczyszczania białek Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His na złożu typu Ni-NTA potwierdziły korelację obecności białek ze wskazanymi pikami chromatograficznymi na chromatogramie (Ryc. 12.). Połączenie obu metod umożliwiło analizę jakościową oczyszczanego białka fuzyjnego Fh8_hTRF1_His. Rozdzielenie w żelu poliakryloamidowym frakcji surowych ekstraktów oraz rozpuszczonych pozostałych osadów z lizy komórkowej pozwoliło na oszacowanie wydajności procesu sonikacji, która wynosi w przybliżeniu 98%.

W ścieżce SE obserwowany jest wyraźny prążek pochodzący od białka Fh8_hTRF1_His (Ryc.13, zielona strzałka) wraz ze znaczną ilością prążków pochodzących od mieszaniny białek gospodarza *E. coli* uzyskanych podczas lizy komórek bakteryjnych. Obserwowany w ścieżce Os prążek pochodzący od białka docelowego Fh8_hTRF1_His jest znacznie mniej intensywny (Ryc.13, zielona strzałka), dodatkowo nie obserwuje się tak dużej ilości prążków pochodzących od innych białek. Największa ilość białek we frakcjach przesączu (Ryc 13., ścieżki A2 - A14) oraz na

wstępnym etapie elucji (Ryc.13., ścieżki A24 - A28) podkreśla skuteczność procesu oczyszczania białek rekombinantowych z zastosowaniem chromatografii IMAC. Większość białek zanieczyszczających docelowo preparat ze względu na brak etykiety His nie wiąże się do złoża i przechodzi przez nie, zmniejszając ilość zanieczyszczeń oczyszczanego białka docelowego. Obecność białka Fh8_hTRF1_His we frakcjach elucji A32 – A42 (Ryc. 13., niebieska strzałka) odpowiada wyraźnemu pikowi na chromatogramie w zakresie 200 – 400 mM stężenia imidazolu. Intensywność prążków pochodzących od pożądanego białka Fh8_hTRF1_His (Ryc. 13., niebieska strzałka) świadczy o uzyskaniu wysokiego poziomu jego bioprodukcji. Znacznie mniejsza ilość i intensywność prążków pochodzących od białek zanieczyszczających w porównaniu do próbki surowego ekstraktu świadczy o zwiększeniu poziomu czystości pożądanego białka Fh8_hTRF1_His. Przedstawione i omówione wyniki z procesu izolowania i oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap Imac FF, potwierdzają słuszność użycia wybranej metody do wstępnego procesu oczyszczania pożądaných białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His (analogiczne wyniki).

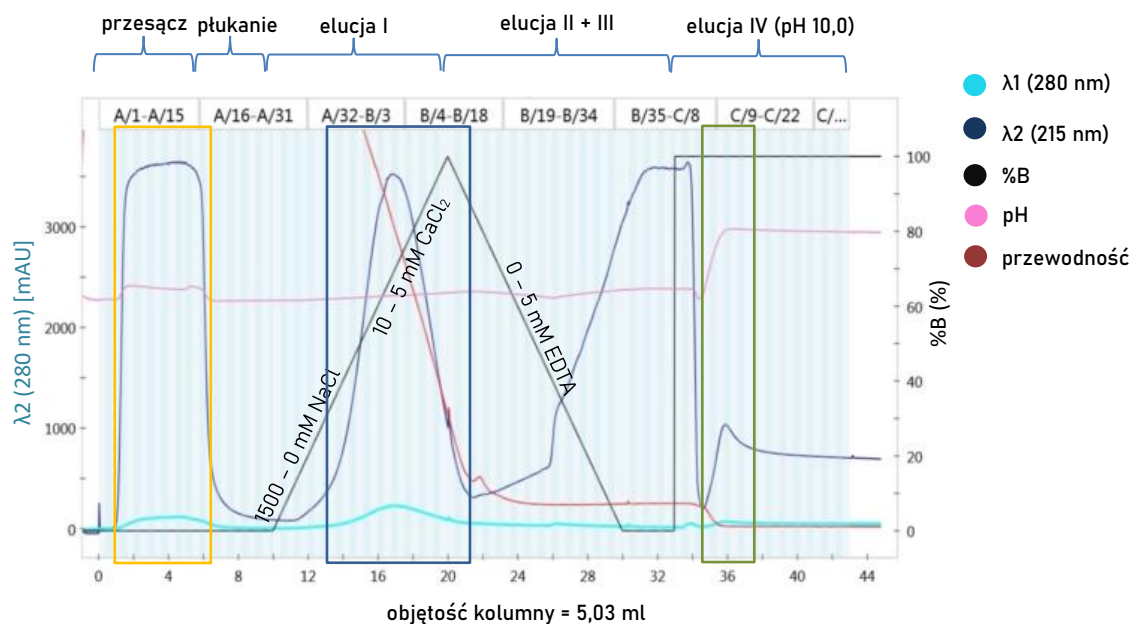
Fracje zawierające wstępnie oczyszczone białka Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His łączono w całość (ok. 20 ml) i umieszczano w workach dializacyjnych o wielkości porów membrany (MWCO z ang. *Molecular Weight Cut-off*) ok. 10 kDa. Powadzono proces dializy w buforze [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1500 mM NaCl, 10 mM CaCl₂] dla białka Fh8_hTRF1_His oraz [50 mM Tris-HCl pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 10 mM CaCl₂] dla białka Fh8_hTRF2_His. Preparaty białkowe przeznaczono do dalszego etapu oczyszczania za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC). Różnica w składzie buforów uwarunkowana była użyciem odrębnych złożeń w wymienionej metodzie chromatograficznej dla oczyszczania poszczególnych białek Fh8_hTRF1/2_His

Oczyszczanie białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His oraz Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Wyniki oczyszczania białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His oraz Fh8_hTRF2_His za pomocą chromatografii powinowactwa wykazały, że preparaty nie były homogenne. Postanowiono przeprowadzić wcześniej opracowany etap oczyszczania preparatów białkowych przy wykorzystaniu chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC). Wybór techniki podyktowany był obecnością domeny Fh8 w ich strukturze. Tak jak opisano we wstępie teoretycznym [W. T. 3.7.3.] domena ta charakteryzuje się wysoką

hydrofobowością w obecności jonów Ca^{2+} , zwiększając efektywność procesu oczyszczania białek rekombinantowych z użyciem tego rodzaju chromatografii. Oczekiwano otrzymania homogennych preparatów białkowych Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF1_His. Do uzyskania postawionego celu początkowo wybrano złożo Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) [Mat. i Met. 4.27.1.], zalecane w studiowanej literaturze (Costa i in. 2014). Przeprowadzane wcześniej na małą skalę optymalizacje wykazały bardzo dobrą efektywność i wydajność procesu oczyszczania białek Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His z jego zastosowaniem. W przejściu na większą skalę problematyczne okazało się oczyszczanie białka Fh8_hTRF1_His, które zbyt mocno oddziaływało z tym złożem, drastycznie zmniejszając wydajność i powodując duże straty preparatu. Wrócono zatem do analizy na małą skalę, sprawdzając inne złoża najczęściej wykorzystywane w chromatografii HIC. Wybrano zestaw selekcyjny HIC HiTrap Hic Selection Kit [Mat. i Met. 4.27.1.] przeznaczony do zautomatyzowanych systemów średniociśnieniowych, w którego skład wchodziły 1 ml złoża oparte na obecności grup fenylowych, butylowych i oktylowych. Do przetestowania efektywności oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His użyto dwóch złożo: HiTrap Butyl Fast Flow oraz HiTrap Octyl Fast Flow [Mat. i Met. 4.27.1.], z których lepsze dla preparatyki białka Fh8_hTRF1_His okazało się to pierwsze (wyników nie pokazano).

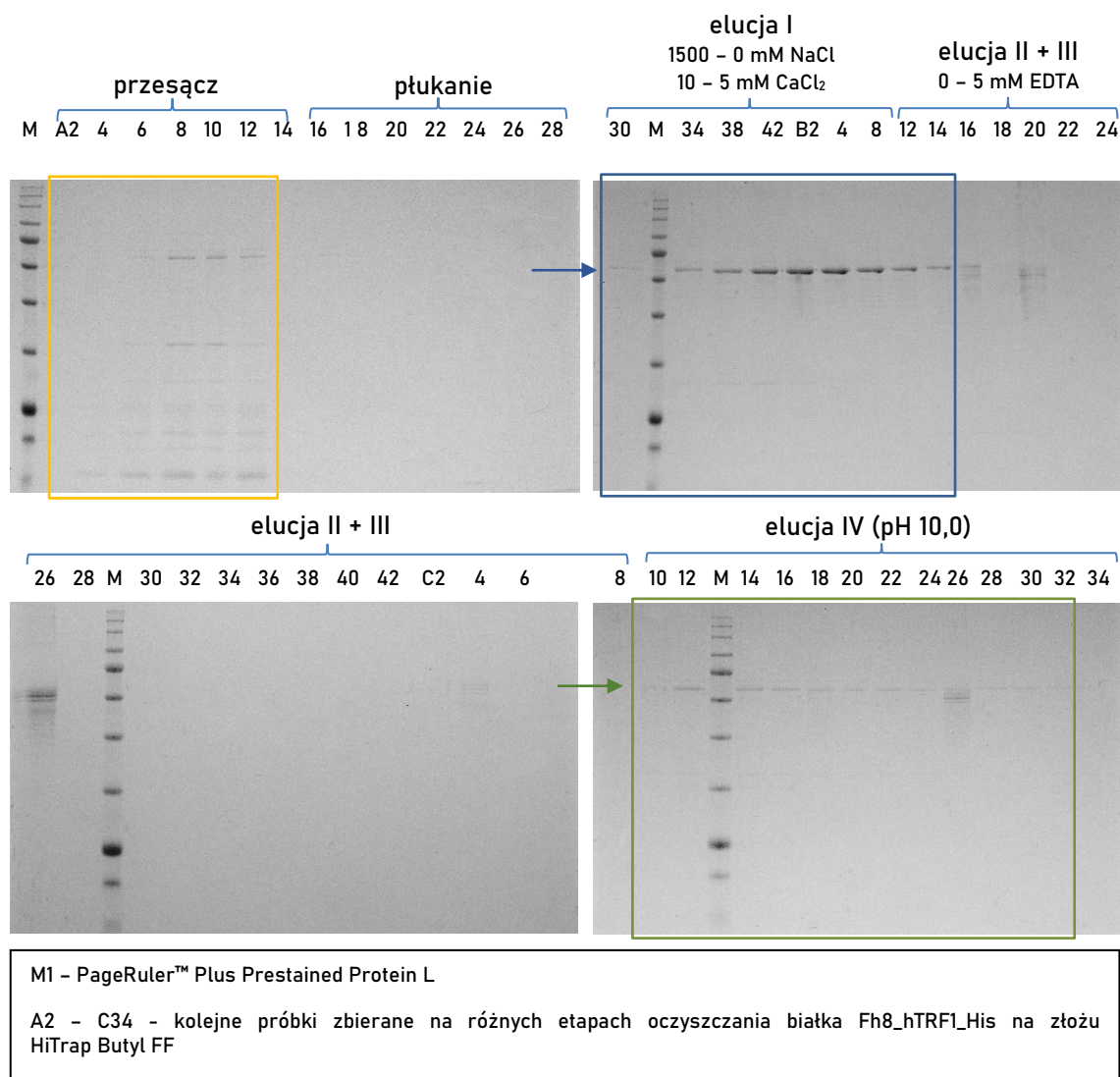
Właściwą procedurę oczyszczania preparatu Fh8_hTRF1_His przeprowadzono ponownie za pomocą systemu NGC [Mat. i Met. 4.27.4.]. Analogicznie jak w przypadku oczyszczania przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa poprawność całego procesu ustalono w oparciu o połączenie analizy wyników uzyskanych z elektroforezy SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] (Ryc. 15.) z analizą otrzymanego chromatogramu (Ryc. 14.).



Ryc. 14. Chromatogram z przebiegu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap Butyl Fast Flow. Pomarańczowy prostokąt oznacza pik odpowiadający białkom niezwiązanym do złoża, granatowy prostokąt oznacza pik odpowiadający elucji białek przy zmniejszającej się sile jonowej, zielony prostokąt oznacza pik odpowiadający elucji białek przy zastosowaniu wysokiego pH 10,0. Na osiach y oznaczono wskazania detektora UV-VIS [mAU] oraz % użytego czynnika elucyjnego. Na osiach x oznaczono postęp procesu wyznaczonego w objętości kolumny (CV) od 1 do 49 oraz numery zbieranych frakcji od A1-A42 przez B1-B42 do C1-C27.

Analiza przedstawionego chromatogramu (Ryc. 14.) z przebiegu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiTrap Butyl FF, ponownie została rozpatrywana przede wszystkim w oparciu o wskazania detektora UV-VIS przy długości fali 280 nm (Ryc. 14., turkusowa linia). W przypadku przebiegu procesu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His przy użyciu wyżej wymienionego złoża nie zostały pominięte parametry przewodności (Ryc. 14., bordowa linia) oraz pH (Ryc. 14., różowa linia). Spadek siły jonowej, determinowanej poprzez stężenie jonów Na^+ i Cl^- , czy zwiększenie pH buforu są jednymi z głównych czynników elucyjnych dla złożeń HIC. Wymienione wyżej parametry korelują zatem ze zmianą % użytych czynników elucyjnych takich jak: zmniejszające się stężenie NaCl i CaCl_2 , czy zwiększenie pH buforu do wartości 10,0. Wskazania detektora UV-VIS dla obu długości fali wyodrębniają trzy spłaszczone, lecz wyraźne piki świadczące o obecności białek w danych frakcjach. Pierwszy pik, drugi pod względem wielkości (Ryc. 14., frakcje nr A2-A17, CV nr 1-7, żółta ramka) obserwowany jest dla frakcji przesączu. Prawdopodobnie odpowiada on niezwiązanym białkom, które ze względu na brak etykiety Fh8 mają znacznie słabsze właściwości hydrofobowe.

Wspomiany drugi pik (Ryc. 14, frakcje nr A35-B14, CV nr 13-21, granatowa ramka) z wysokim prawdopodobieństwem odpowiada elucji naniesionego preparatu białkowego Fh8_hTRF1_His na złożu Hitrap butyl FF i obserwowany jest przy zmniejszającej się sile jonowej, wynikającej z gradientowego obniżania stężenia soli NaCl, potwierdzonej przez wskazania pomiarów przewodności. Elucja docelowego białka na tym etapie wspomagana jest dodatkowo obniżeniem stężenia jonów Ca^{2+} , które zwiększały powinowactwo domeny Fh8 do hydrofobowej matrycy. Płukanie złoża roztworem EDTA, usuwającym jony Ca^{2+} poprzez chelatowanie, nie zwiększyło poziomu elucji docelowego białka. Trzeci - ostatni i najmniejszy pik (Ryc. 14., frakcje nr C6-C14, CV nr 34-37, zielona ramka) prawdopodobnie odpowiada elucji pozostałych niewielkich ilości najmocniej związanego białka Fh8_hTRF1_His po zmianie wartości pH z 7,5 na 10,0 jednostek. Uzyskane wyniki zgodne są z założeniami procesu oczyszczania rekombinantowego białka zawierającego etykietę Fh8 z wykorzystaniem chromatografii HIC. Ostatecznego potwierdzenia jakości procesu oczyszczania preparatu białkowego FH8_hTRF1_His na złożu HiTrap Butyl FF dokonywano wykorzystując rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE w żelu poliakryloamidowym [Mat. i Met. 4.18.1.], którego wyniki przedstawiono na rycinie 15.



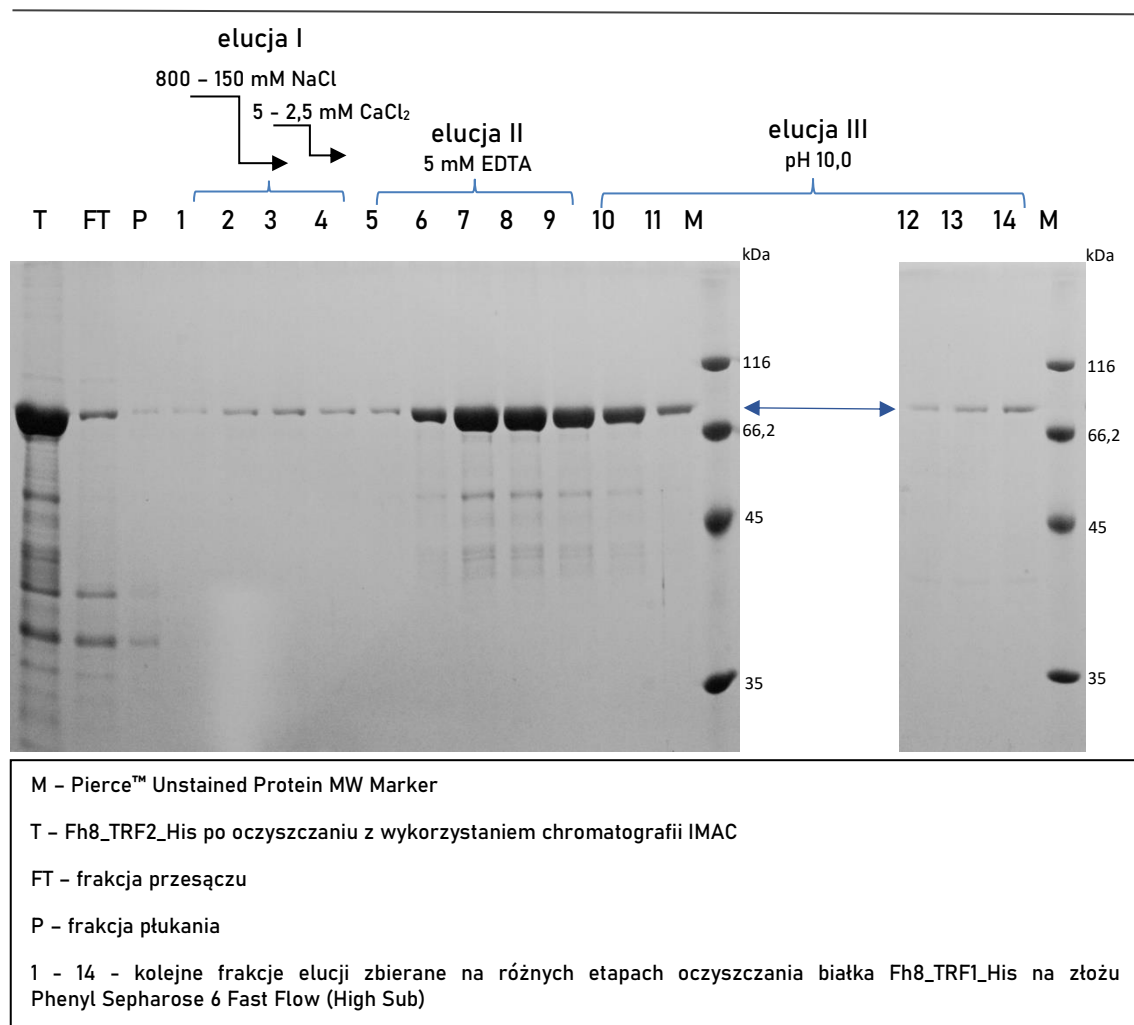
Ryc. 15. Wynik rozdzielania elektroforetycznego w 12,5% żelu SDS-PAGE frakcji uzyskanych na etapie oczyszczania białka fuzyjnego Fh8_hTRF1_His z wykorzystaniem chromatografii HIC i złoża HiTrap Butyl Fast Flow. Żółta ramka oznacza frakcje odpowiadające pikowi dla elucji białek niezwiązanych ze złożem (Ryc. 14.), granatowa ramka oznacza frakcje odpowiadające pikowi dla elucji białek przy zmniejszającej się sile jonowej (Ryc. 14.), zielona ramka oznacza frakcje odpowiadające pikowi dla elucji białek przy zastosowaniu wysokiego pH 10,0 (Ryc. 14.). Niebieska strzałka wskazuje prążki odpowiadające elucji białka Fh8_hTRF1_His przy zmniejszającej się sile jonowej, zielona strzałka wskazuje prążki odpowiadające elucji białka Fh8_hTRF1_His przy zwiększeniu wartości pH do 10,0.

Rozdział poszczególnych frakcji pobranych ze wszystkich etapów procesu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His z wykorzystaniem chromatografii HIC koreluje ze wskazaniami detektora UV-VIS dla długości fali $\lambda_1 = 280$ nm (Ryc. 14., turkusowa linia). Brak prążka pochodzącego od białka Fh8_hTRF1_His w ścieżkach odpowiadającym frakcjom przesączu (Ryc. 15., ścieżki nr A2-A14, żółta ramka) potwierdza jego związanie do zastosowanego złoża. W rozdzielaniu elektroforetycznym frakcji przesączu

(Ryc. 15., ścieżki nr A2-A14) zauważalne są prążki pochodzące od białek zanieczyszczających, które nie wykazały oddziaływania ze złożem butylowym. Analiza frakcji pobranych z etapu płukania nie wskazuje na obecność większej ilości zanieczyszczeń. Prążki pochodzące od białka docelowego Fh8_hTRF1_His obserwuje się w ścieżkach dla elucji I (Ryc. 15, ścieżki nr A30-B14, granatowa ramka) oraz elucji IV (Ryc. 15, ścieżki nr C10-C32, żółta ramka). Zgodnie z przewidywaniami prążki pochodzące od oczyszczanego białka odpowiadają opisanym pikom dla zmniejszającej się siły jonowej i podwyższenia pH do wartości 10,0. Elucja największej ilości białka Fh8_hTRF1_His (Rys 15, niebieska strzałka) obserwowana jest podczas zmniejszania siły jonowej, przy obniżaniu stężenia soli NaCl i CaCl₂ (Ryc. 15., ścieżki nr A30-B8). Tylko niewielka ilość białka eluuje podczas zwiększania stężenia EDTA (Ryc. 15., ścieżki nr B12-B24). Reszta najmocniej związanego białka Fh8_hTRF1_His (Ryc. 15., zielona strzałka) eluuje przy zwiększeniu pH do wartości 10,0 (Ryc. 15., ścieżki C10-C38). Białko Fh8_hTRF1_His eluowane w dwóch różnych etapach jest homogenne, w ścieżkach rozdzielonych frakcji nie zauważa się innych prążków pochodzących od białek zanieczyszczających. Opisane wyniki jednoznacznie potwierdzają słuszność wyboru złoża HiTrap Butyl Fast Flow w procesie oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His. Frakcje zawierające homogenne preparaty białkowe uzyskane w dwóch etapach elucji łączono ze sobą, uzyskując 2 × 40 ml preparatów białka Fh8_hTRF1_His. Ostatni etap oczyszczania, jakim jest usunięcie etykiet, wymaga małych objętości preparatu, dlatego zdecydowano się nanieść go na złożo HIS-Select™ Nickel Affinity Gel [Mat. i Met. 4.27.1.] w celu jednoetapowej elucji całego związanego preparatu przy użyciu mniejszej objętości buforu elucyjnego (15 ml). Następnie prowadzono proces dializy [Mat. i Met. 4.20.] w buforze podstawowym A [Mat. i Met. 4.27.2.].

Proces oczyszczania białka Fh8_hTRF2_His postanowiono przeprowadzić za pomocą złoża Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) wybranego na podstawie przeprowadzonych wcześniej optymalizacji. W przypadku oczyszczania białka Fh8_hTRF2_His przy przejściu na dużą skalę nie napotkano problemów ze zbyt mocnym oddziaływaniem białka ze złożem. Ponieważ nie posiadano dedykowanej do zautomatyzowanego systemu NGC kolumny zawierającej to złożo, cały proces przeprowadzono grawitacyjnie bez wymuszania ciśnienia pompą perystaltyczną [Mat. i Met. 4.25.5.]. Brak możliwości zbierania danych w czasie rzeczywistym na temat

zachodzących procesów podczas trwania poszczególnych etapów oczyszczania wymuszała przeprowadzenie analizy poprawności wyłącznie z wykorzystaniem metody SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.]. Wynik rozdziału próbek białka Fh8_hTRF2_His został przedstawiony na rycinie 16.



Ryc. 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12,5% żelu SDS-PAGE frakcji uzyskanych na etapie oczyszczania białka fuzyjnego Fh8_hTRF2_His z wykorzystaniem chromatografii HIC, używając złoża Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub). Czarne strzałki wskazują skokową zmianę stężenia soli NaCl i CaCl₂, Niebieska strzałka wskazuje prążki odpowiadające elucji białka Fh8_hTRF2_His.

Rozdział poszczególnych frakcji ze wszystkich etapów procesu oczyszczania białka Fh8_hTRF2_His na złożu Phenyl Sepharose® 6 Fast Flow wskazuje na delikatne różnice w oczyszczaniu z wykorzystaniem danego złoża w porównaniu do złoża HiTrap Butyl FF. Elucja największej ilości białka Fh8_hTRF2_His widoczna jest dopiero przy usuwaniu jonów Ca²⁺, poprzez ich chelatację przez EDTA (Ryc. 16., ścieżki 5 – 9).

Świadczy to o silniejszym oddziaływaniu domeny Fh8 z grupami fenolowymi niż butylowymi. Niewielka ilość białka docelowego Fh8_hTRF2_His we frakcjach przesączu i płukania (Ryc. 16., ścieżki FT i P, niebieska strzaka) może świadczyć o przekroczeniu pojemności kolumny, a w konsekwencji niezwiązaniu się całości naniesionego preparatu. W omawianych frakcjach widoczna jest również oczekiwana elucja białek zanieczyszczających. Bardzo mała intensywność prążków pochodzących od białka Fh8_hTRF2_His w ścieżkach przedstawiających elucję wywołaną zmniejszeniem siły jonowej (Ryc. 16., ścieżki nr 1-4) świadczy o minimalnej elucji docelowego białka na tym etapie oczyszczania. Nie obserwuje się też wymywania bardziej związanych białek zanieczyszczających. Reszta najmocniej związanego białka eluuje przy zwiększeniu pH do wartości 10,0 (Ryc. 16., ścieżki nr 10-14). Rzeczywisty przebieg procesu oczyszczania białka Fh8_hTRF2_His na złożu Phenyl Sepharose 6 Fast Flow jest zgodny z założeniami, przedstawionymi na rycinie 6 [W. T. 3.7.3] opisującej strategię oczyszczania białek rekombinantowych przy użyciu metodologii Fh8 - HIC. Uzyskane w tym etapie białko Fh8_hTRF2_His zostało w znacznym stopniu oczyszczone, choć obserwuje się nadal prążki od pozostałych białek zanieczyszczających. Zwiększoną homogenność białka potwierdza rozdział próbki preparatu białkowego Fh8_hTRF2_His pobranej przed naniesieniem na złożo HIC (Ryc. 16. ścieżka T). Przedstawiony rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym (Ryc. 16.) potwierdza słuszność wyboru złoża Phenyl Sepharose 6 Fast Flow do oczyszczania białka Fh8_hTRF2_His. Do dalszej preparatyki białka Fh8_hTRF2_His wybrano frakcje widoczne w ścieżkach 6 – 11 (Ryc. 16.), które połączono uzyskując około 25 ml preparatu białkowego. Preparat został poddany procesowi ultrafiltracji [Mat. i Met. 4.22.] przy użyciu membrany o MWCO równej 20 kDa. Ultrafiltracja pozwoliła na wymianę buforu z dodatkiem EDTA na bufor podstawowy A [Mat. i Met. 4.27.2.] oraz zmniejszenie objętości preparatu do 15 ml. Gotowy preparat Fh8_hTRF2_His został przeznaczony do ostatniego etapu oczyszczania – usunięcia etykiet.

Usuwanie etykiet Fh8 i His od białek Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His metodami enzymatycznymi przy pomocy proteazy TEV oraz karboksypeptydazy A

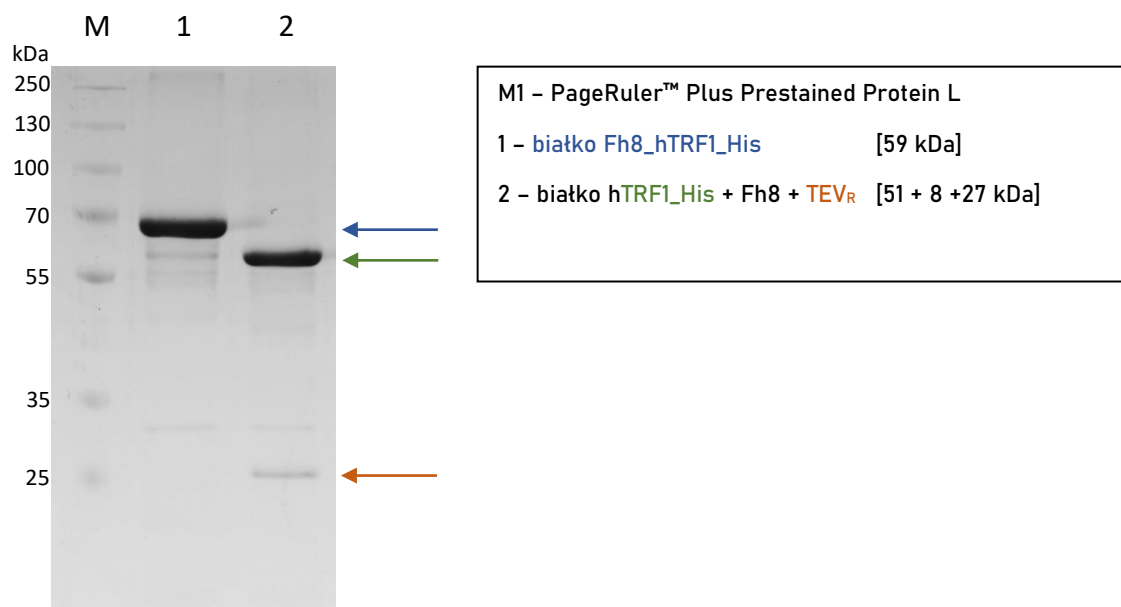
Usuwanie pojedynczego znacznika fuzyjnego jest zwykle procesem dwuetapowym. Pierwszym krokiem jest enzymatyczne odcięcie znacznika z oczyszczonego rekombinantowego białka fuzyjnego przy użyciu wybranej endoproteazy (posiadającej znacznik His). Następnie odcięte białko docelowe jest poddawane

oczyszczaniu przy użyciu chromatografii powinowactwa. Białko odzyskiwane jest z frakcji przesączu, ze względu na brak dalszego oddziaływania ze złożem, i rozdzielane od znacznika fuzyjnego i użytej proteazy, które wiążą się do złoża. W przypadku konstrukcji otrzymanych białek fuzyjnych, gdzie pełne struktury wyglądają następująco: Fh8_TEV_hTRF1_K_His oraz Fh8_TEV_hTRF2_K_His (na czerwono zaznaczono miejsce rozpoznawane przez docelowe proteazy), podejście dwuetapowe staje się niemożliwe. Użycie w pierwszej kolejności karboksypeptydazy A, służącej do odcięcia etykiety His na C-końcu, wyklucza użycie chromatografii metalopowinowactwa. Zatrzymanie aktywności powyższej proteazy wymaga użycia EDTA, które usunęłoby jony metalu ze złoża Ni-NTA, powodując elucję wszystkich związanych białek. Usunięcie obu znaczników postanowiono uzyskać w kolejno następujących po sobie reakcjach enzymatycznych, przy użyciu proteaz TEV i karboksypeptydazy A. Uzyskane w ten sposób białka wolne od etykiet; hTRF1 i hTRF2 postanowiono oczyścić stosując chromatografię wykluczania SEC (ang. *size exclusion chromatography*). Przeprowadzono optymalizację reakcji trawienia preparatów fuzyjnych Fh8_hTRF1_His i Fh8_hTRF2_His, w których sprawdzono efektywność wybranych proteaz (TEV i K_A) oraz ustalono kolejność ich użycia [Mat. i Met. 4.26.]. Podczas optymalizacji usunięcia etykiety Fh8 testowano dwie różne proteazy TEV, pierwszą komercyjnie dostępną (TEV_K) oraz rekombinantową (TEV_R), której bioprodukcję i oczyszczanie wykonano w ramach niniejszej pracy (Wyn. i dys. 5.2.). Rekombinantowa proteaza wykazała się większą efektywnością trawienia od komercyjnie dostępnej (wyników nie pokazano). Poprawność reakcji sprawdzano za pomocą technik elektroforetycznych SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] w połączeniu z western blotting [Mat. i Met. 4.24.] (wyników nie pokazano). Właściwe odcięcie etykiet Fh8 i His rozpoczynano od reakcji trawienia białka fuzyjnego protezą TEV_R (Tab. 26.), która jest bardzo specyficzna i nie trawi poza miejscem rozpoznawanym, a zahamowanie jej aktywności wymaga pozbycia się EDTA i DTT. Dodatkowo dalsza jej obecność nie wpływa na aktywność karboksypeptydazy A. Reakcje trawienia protezą TEV_R o stężeniu około 1 mg/ml prowadzono w stosunku wagowym do białka równym 2:5 w buforze wzbogaconym o 0,5 mM EDTA i 1 mM DTT, które są jej kofaktorami. Docelowe białko Fh8_hTRF1_His lub Fh8_hTRF2_His inkubowano z protezą TEV_R przez 14 h w 4°C delikatnie mieszając. Po zakończeniu reakcji preparaty białkowe dializowano do buforu [50 mM Tris-HCl pH 8,0 w 10°C, 500 mM NaCl], który jest optymalny dla aktywności karboksypeptydazy A. Dokładny skład pojedynczej reakcji trawienia został przedstawiony w tabeli 22 na przykładzie połowy

preparatu Fh8_hTRF1_His otrzymanego w poprzednim punkcie. Wynik reakcji enzymatycznej odcięcia etykiety Fh8 proteazą TEV_R z preparatu Fh8_hTRF1_His przedstawia wynik z rozdziału mieszaniny reakcyjnej w żelu poliakrylamidowym próbek pobranych przed i po przeprowadzonej reakcji (Ryc. 17.).

Tab. 22. Dokładny skład reakcji trawienia białka Fh8 hTRF1_His przy użyciu proteazy TEV_R [V_{cal}: 8 ml]

Składniki	Ilość [ml]
białko (ok. 0,6 mg/ml)	7,5
bufor 100 × (50 mM EDTA, 100 mM DTT)	0,1
TEV _R (ok. 1 mg/ml)	2
woda	0,4



Ryc. 17. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12,5% żelu SDS-PAGE preparatu białkowego Fh8_TEV_hTRF1_K_His przed i po reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem proteazy TEV_R. Strzałka niebieska wskazuje białko fuzyjne Fh8_hTRF1_His, strzałka zielona wskazuje białko hTRF1_His, strzałka pomarańczowa wskazuje proteazę TEV_R.

Poprawność odcięcia domeny Fh8 obserwowana jest poprzez różnicę w migracji prążków, pochodzących z mieszaniny reakcyjnej przed i po dodaniu proteazy TEV_R, w żelu poliakrylamidowym. Spowodowane jest to zmniejszeniem się masy białka fuzyjnego Fh8_hTRF1_His (59 kDa) (Ryc. 17., niebieska strzałka) o wielkość samej domeny Fh8 (8 kDa) (nie obserwuje się na otrzymanym żelu), która została usunięta od docelowego białka, otrzymując białko hTRF1_His (51 kDa) (Ryc. 17., zielona strzałka).

W rozdziale obserwuje się również prążek pochodzący od użytej proteazy TEV_R (27 kDa) (Ryc. 17., pomarańczowa strzałka).

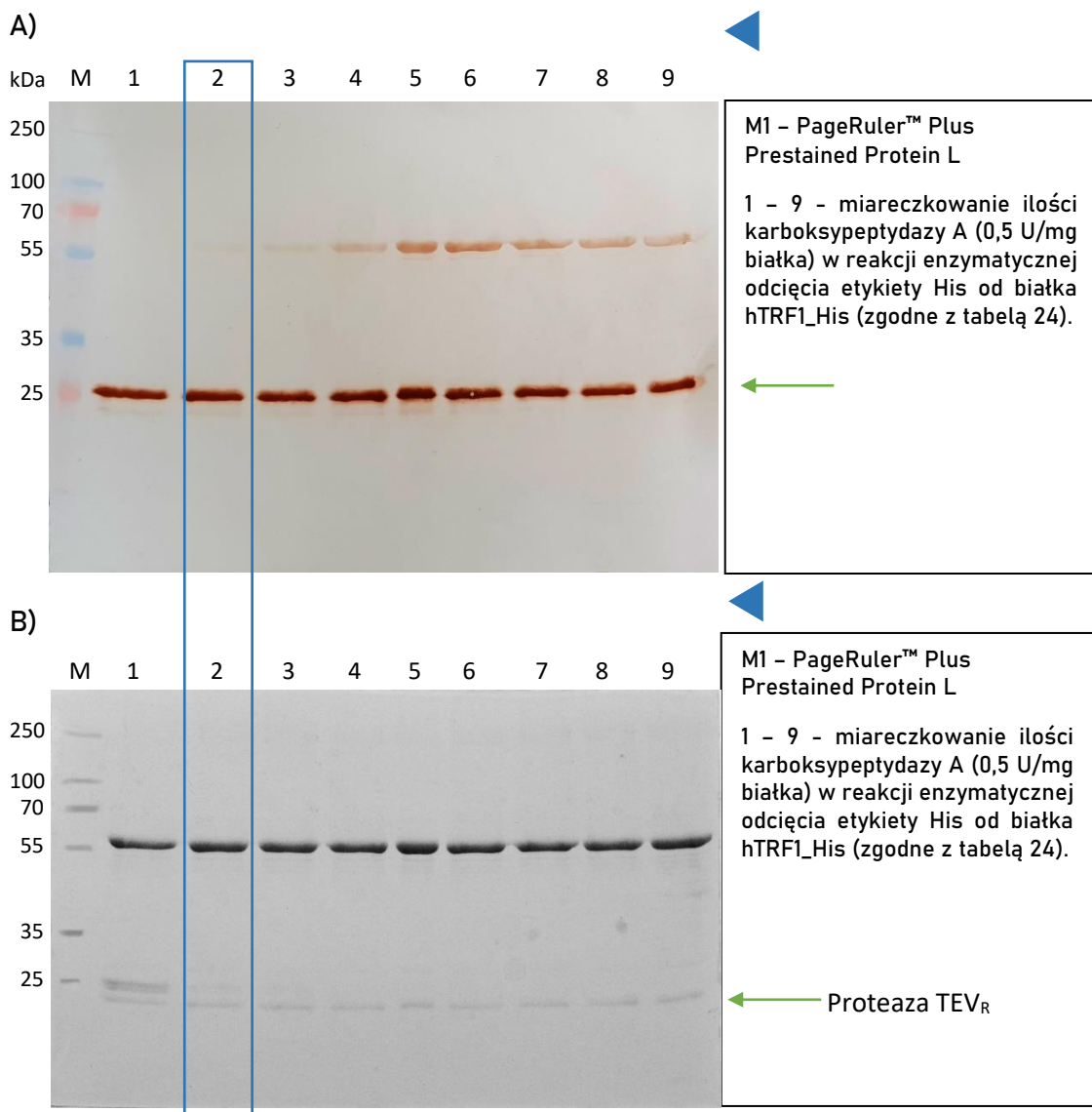
Usunięcie etykiety His z uzyskanych w poprzedniej reakcji enzymatycznej rekombinantowych białek: hTRF1_His oraz hTRF2_His przeprowadzono przy użyciu karboksypeptydazy A (rozcieńczenie karboksypeptydazy A (0,5 U/mg białka) [Mat. i Met. 4.26.]. Określenie stosunku użytej proteazy do białka za każdym razem wymagało przeprowadzenia serii reakcji miareczkowania ilości karboksypeptydazy A na mikro skalę. Stosunek użytej karboksypeptydazy A (0,5 U/mg białka) do białka wynosił 2:5 (przykładowe miareczkowanie przedstawiono na rycinie 18). Reakcję trawienia prowadzono w 37°C przez 1 h ze stałym mieszaniem. Proces trawienia zatrzymywano przez dodanie EDTA do końcowego stężenia 50 mM. Skład przykładowej reakcji trawienia karboksypeptydazą A przedstawia tabela 23. Wynik optymalizacji reakcji cięcia białka hTRF1_His karboksypeptydazą A analizowano za pomocą rozdzielu elektroforetycznego SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] wraz immunodetekcją z przeciwciałami anti-His sprzężonymi z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP) [Mat. i Met. 4.23.].

Tab. 23. Dokładny skład reakcji trawienia białka hTRF1_His przy użyciu karboksypeptydazy A [V_{cat}: 12 ml].

Składniki	Ilość [ml]
białko (ok. 0,6 mg/ml)	10
K _A (0,5 U/mg białka)	2

Tab. 24. Dokładny skład reakcji miareczkowania karboksypeptydazy A wobec białka hTRF1_His [V_{cat}: 15 µl]

Numer próbki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Składniki [µl]									
białko (µg)	6	6	6	6	6	6	6	6	6
bufor podstawowy	1	2	3	4,5	4,75	4,875	4,958	4,969	4,984
Enzym (0,5 U/mg)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008

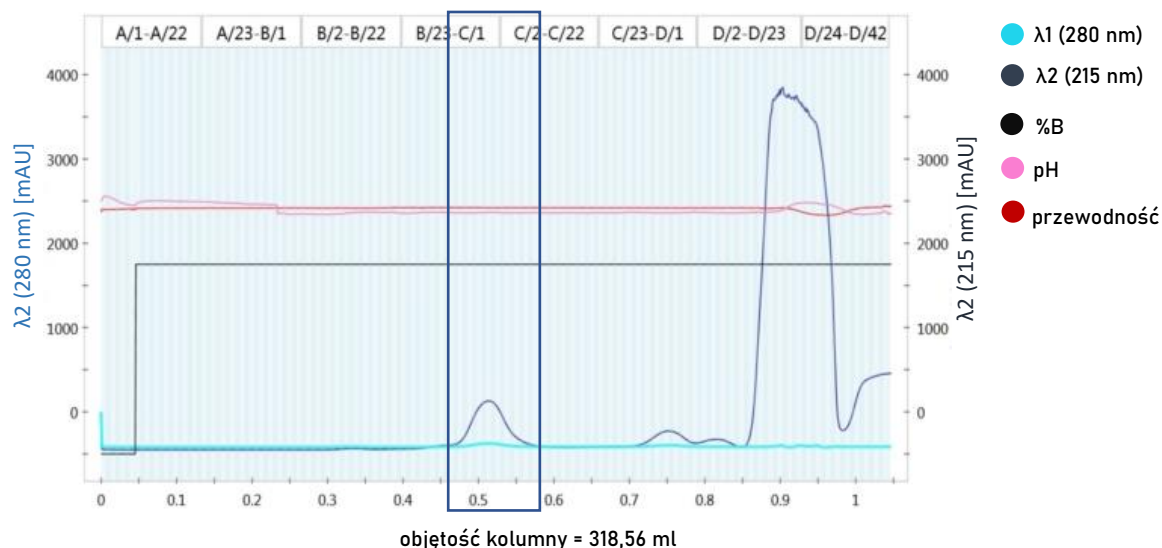


Ryc. 18. Wynik optymalizacji reakcji miareczkowania ilości karboksypeptydazy A z preparatem białkowym hTRF1_His **A)** uzyskany po analizie western blot z przeciwciałami anti-His_HRP, **B)** w 12% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Niebieski trójkąt oznacza wzrost ilości użytej karboksypeptydazy A. Zielona strzałka wskazuje proteazę TEV_R. Niebieska ramka oznacza najmniejszą ilość karboksypeptydazy A całkowicie odcinającą etykietę His.

Potwierdzenie całkowitego odcięcia etykiety His nie jest możliwe w tak prosty sposób jak w przypadku domeny Fh8 (poprzez różnice w migracji preparatów białkowych) ze względu na zbyt niską masę samej etykiety His (0,8 kDa). Poprawność reakcji usunięcia etykiety His przez enzym karboksypeptydazę A analizowano za pomocą immunodetekcji z monoklonalnymi przeciwciałami anti-His wykorzystując technikę western blotting [Mat. i Met. 4.23.]. Brak odpowiedzi kolorymetrycznej (Ryc. 18., A, ścieżka nr 2) dla prążka o wielkości odpowiadającej białku hTRF1_His po

wywołaniu membrany świadczyły o całkowitym odcięciu etykiety His. Do właściwej reakcji wybrano ilość enzymu w próbie, gdzie odpowiedź kolorymetryczna po wywołaniu membrany dla przeciwciał anti-His była praktycznie niezauważalna (Ryc. 18., ścieżka nr 2, niebieska ramka).

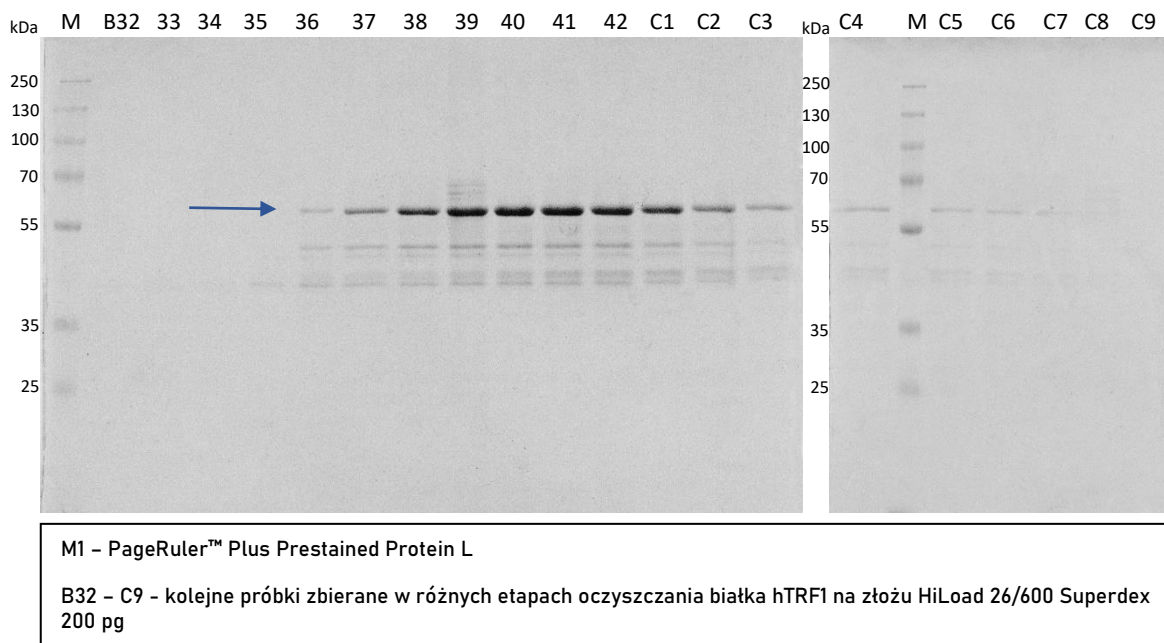
Po zatrzymaniu reakcji trawienia przez karboksypeptydazę A, docelowe rekombinantowe białka hTRF1 i hTRF2 bezpośrednio rozdzielano od usuniętych etykiet i użytych proteaz przy użyciu chromatografii SEC [Mat. i Met. 4.27.6.]. Preparaty białkowe nanoszono bezpośrednio po reakcji na zrównowagowane złożo. Chromatogram z przykładowego oczyszczania wybranego preparatu białkowego oraz analizę SDS-PAGE przedstawiono na rycinie 19 na przykładzie białka hTRF1 (dla hTRF2 rozdział jest analogiczny).



Ryc. 19. Chromatogram z przebiegu oczyszczania białka Fh8_hTRF1_His na złożu HiLoad 26/600 Superdex 200 pg. Niebieską ramką oznaczono pik odpowiadający elucji białka docelowego hTRF1. Na osiach y oznaczono wskazania detektora UV-VIS [mAU]. Na osiach x oznaczono postęp procesu wyznaczony w objętości kolumny (CV) od 0 do 1 oraz numery zbieranych frakcji od A1-A42 przez B1-B42, C1-C42 do D1-D42.

Chromatogram z przebiegu oczyszczania białka hTRF1 na złożu HiLoad 26/600 Superdex 200 pg analizowano rozpatrując wyłącznie wskazania detektora UV-VIS dla obu wybranych długości fali $\lambda_1 = 280$ nm oraz $\lambda_2 = 215$ nm. Pozostałe parametry pominięto, ponieważ w wykorzystanej technice chromatograficznej na rozdział białek wpływ ma jedynie wielkość danej molekuly. Wskazania detektora UV-VIS przedstawiają

cztery odrębne sygnały chromatograficzne pojawiające się kolejno przy 0,5, 0,75, 0,82 i 0,90 CV (Ryc. 19.). Znając zasadę rozdzielania biomolekuł z wykorzystaniem sączenia molekularnego, można wytypować pik odpowiadający elucji białka docelowego. Małe cząsteczki takie jak usunięte etykiety: Fh8 (8 kDa), His (0,8 kDa) łatwo wnikają w głąb porów w żelu, dłużej z nim oddziałując, powodując zwiększenie się czasu retencji. Cząsteczki większe, takie jak docelowe białka hTRF1 (50,11 kDa) i hTRF2 (56,5 kDa), którym do porów wniknąć jest trudno, szybciej przechodzą przez kolumnę. Z wysokim prawdopodobieństwem pierwszy obserwowany sygnał (Ryc. 19., frakcje nr B35-C11, niebieska ramka) obserwowany w 0,5 CV odpowiada białku hTRF1, ze względu na największą masę cząsteczkową w rozdzielanej mieszaninie. Kolejne sygnały widoczne przy 0,7 do 0,8 CV (Ryc. 19., frakcje nr C30-D10) prawdopodobnie odpowiadają użytym w reakcji proteazom: K_A (35 kDa), TEV_R (27 kDa), a następne piki przy 0,85 do 1 CV (Ryc. 19., frakcje nr D12-D39) odciętym etykietom Fh8 (8 kDa) i His (0,8 kDa). Do oceny jakości otrzymanych preparatów białkowych wybierano tylko frakcje potencjalnie pochodzące od docelowych białek wytypowane przez analizę chromatogramu (Ryc. 19., niebieska ramka). Poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny frakcji z oczyszczania białka hTRF1 (Ryc. 20., frakcje nr B32-C9) w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.].

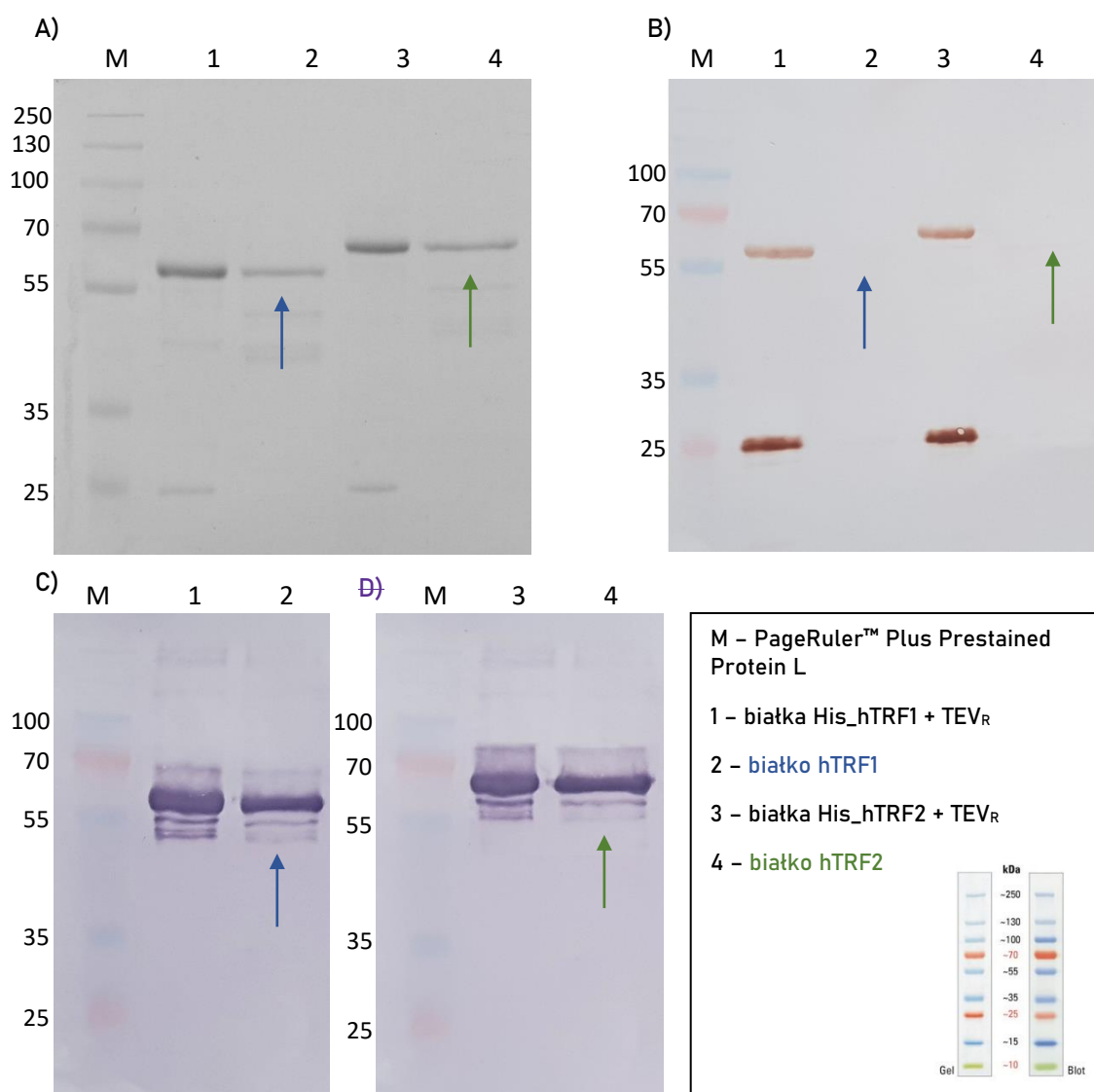


Ryc. 20. Wynik rozdziálu elektroforetycznego w 12,5% żelu SDS-PAGE frakcji uzyskanych na etapie oczyszczania białka hTRF1 z wykorzystaniem chromatografii wykluczania na złożu HiLoad 26/600 Superdex 200 pg. Niebieska strzałka wskazuje prążek odpowiadający białku hTRF1.

Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym wytypowanych frakcji z procesu oczyszczania białka hTRF1 na złożu HiLoad 26/600 Superdex 200 pg wskazuje na otrzymanie wysoko homogennego i wolnego od proteaz białka. Świadczą o tym wyraźne prążki pochodzące od pożądanego białka hTRF1 (Ryc. 20., ścieżki nr B36-C6, niebieska strzałka) w ścieżkach B36 – C5 oraz brak prążka pochodzącego od proteazy TEV_R w okolicach 25 kDa. Pomiedzy prążkami wzorca wielkości 55 - 35 kDa obserwowane są prążki pochodzące prawdopodobnie od zanieczyszczeń białkami bakteryjnymi, bądź będące fragmentami degradacyjnymi białka hTRF1 powstałe w wyniku niespecyficznego działania użytych proteaz. Użyte złoże miało za niską rozdzielczość, aby odczyścić zanieczyszczenie o zbliżonej do pożądanego białka masie cząsteczkowej.

Oczyszczone preparaty białek hTRF1 i hTRF2 uzyskane po etapie chromatografii SEC poddano analizie elektroforetycznej w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.], analizie western blot z przeciwciałami anty-His_HRP i anty-TRF1/2 [Mat. i Met. 4.23.].

Wyniki rozdziłów próbek po oczyszczaniu białek hTRF1 i hTRF2 oraz testu western blot z przeciwciałami anty-His przedstawia rycina 21.



Ryc. 21. Oczyszczone preparaty białek hTRF1 i hTRF2. A) Wynik rozdzielania elektroforetycznego w 12,5% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, B) wynik analizy western blot z przeciwciałami anti-His_HRP po wywołaniu membrany, C) wynik analizy western blot z przeciwciałami anti-TRF1 dla białka hTRF1 oraz z przeciwciałami anti-TRF2 dla białka hTRF2. Niebieska strzałka wskazuje białko hTRF1, zielona strzałka wskazuje białko hTRF2.

Oddziaływanie z monoklonalnymi przeciwciałami (anty-TRF1, anty-TRF2) przez otrzymane rekombinantowe białka hTRF1 i hTRF2 potwierdza ich tożsamość (Ryc. 21., A, C, ścieżki nr 2, 4, niebieska strzałka, zielona strzałka). Brak oddziaływania z przeciwciałami anti-His potwierdza uzyskanie białek wolnych od etykiety His (Ryc. 21., A, B, ścieżki nr 2, 4, niebieska strzałka, zielona strzałka). Przedstawione wyniki z rozdzielania SDS-PAGE białek hTRF1 i hTRF2 po oczyszczeniu przy użyciu SEC (Ryc. 21., A) oraz testu western blotting z przeciwciałami anti-His (Ryc. 21., A, B.)

potwierdziły skuteczność wybranej strategii oczyszczania białek hTRF1 i hTRF2 uzyskanych po odcięciu użytych etykiet Fh8 i His.

Preparaty oczyszczonych białek hTRF1/2 zagęszczono przy użyciu koncentratorów odśrodkowych [Mat. i Met. 4.21.] o MWCO 10 kDa [Mat. i Met. 4.21.]. Ostatecznie uzyskano 2 ml homogennego białka TRF1 o stężeniu 0,87 mg/ml [1,74 mg] oraz 3,8 ml homogennego białka TRF2 o stężeniu 0,6 mg/ml [2,28 mg] z około 4,5 g osadu bakteryjnego. Stężenia białek oznaczano metodą densytometryczną [Mat. i Met. 4.25.].

5.1.2. Uzyskanie wariantów delecyjnych białek hTRF1 i hTRF2 – Myb1 i Myb2 w fuzji z domeną Ub na N- końcu

Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne His_Ub_Myb1 oraz His_Ub_Myb2

Produkcję rekombinantowych domen wiążących Myb1 oraz Myb2 uzyskano w fuzji z etykietą poprawiającą fałdowanie się białka docelowego. Wykonano optymalizację kodonów dla genów kodujących białka Myb1/2 pod kątem ekspresji w komórkach bakteryjnych *E. coli* w celu umożliwienia bioprodukcji białek eukariotycznych z użyciem tego gospodarza. Jako domenę fuzyjną poprawiającą rozpuszczalność zastosowano etykietę Ub. Strategia wyboru opierała się na: (i) opisanych we wstępie teoretycznych właściwościach Ub w produkcji białek fuzyjnych zwiększających ekspresję i ułatwiających późniejsze ich oczyszczanie [W. T. 3.7.2.] oraz (ii) łatwości odcięcia samej etykiety przy użyciu rekombinantowej proteazy UBPD2C wykonanej przez zespół Wojtowicz-Krawiec (Wojtowicz-Krawiec i in. 2014). Poprawność strategii została potwierdzona podczas prób optymalizacyjnych bioprodukcji i oczyszczania białek His_Ub_Myb1 oraz His_Ub_Myb2, wykonanych przez zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej.

Ekspresję genów kodujących pożądane białka His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2 przeprowadzono w komórkach *E. coli* szczepu BL21(DE3) Star [Mat. i Met. 4.4.1.] w 2 l pożywki TB [Mat. i Met. 4.3.]. Analogicznie jak w przypadku pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 kontrolowano przyrost białka po rozpoczęciu indukcji ekspresji genów (wyników nie pokazano). Rozpoczynano od zaszczepienia 50 ml hodowli nocnych w pożywce LB [Mat. i Met. 4.3.] suplementowanej kanamycyną [Mat. i Met. 4.4.2.] poprzez pobranie bakterii zawierających DNA plazmidowy kodujące odpowiednio białka: His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2 [Mat. i Met. 4.2.] z płytek. Hodowle właściwe

zaszczepiano do wartości OD₆₀₀ wynoszącej około 0,1 poprzez odmładzanie hodowli nocnej, pobierając z niej około 12-18 ml. Wzrost komórek bakteryjnych następował w 37°C aż do osiągnięcia wartości OD₆₀₀ równej 0,6. Indukcji ekspresji genu kodującego dane białko dokonywano poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM i dalszą hodowlę kontynuowano w temperaturze 32°C przez 4 h. Hodowle zakańczano poprzez zwirowanie całości przy RCF 5000 × g, 10 min w 4°C otrzymując około 6 g biomasy komórek bakteryjnych dla obu preparatów białkowych.

Frakcjonowane strącanie białek fuzyjnych His_Ub_Myb1 oraz His_Ub_Myb2 za pomocą siarczanu amonu połączone z oczyszczaniem za pomocą chromatografii powinowactwa

Otrzymane we wcześniejszym etapie osady komórek bakteryjnych zawierające nadprodukowane docelowe białka His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2 zawieszono w buforze [50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5 w 10°C, 1000 mM NaCl, 0,5 mg/ml lizozym, 1 mM PMSF suplementowanego ½ tabletki zawierającej koktajl inhibitorów proteaz] w stosunku osadu do buforu 1:5, uzyskując około 30 ml zawiesin komórkowych. Komórki inkubowano w łaźni lodowej przez 20 min, po czym rozpoczęto etap lizy komórek stosując metodę sonikacji [Mat. i Met. 4.19.]. Uzyskany ekstrakt komórkowy wirowano przy RCF 15000 × g, 20 min, 4°C. Kolejny etap izolacji preparatów białkowych His_Ub_Myb1 oraz His_Ub_Myb2 postanowiono przeprowadzić, stosując etap wysalania AMS [Mat. i Met. 4.24.]. Wysalanie docelowych białek wykonywano w sześciu etapach, zwiększając stężenie AMS od 0-20%, 20-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%. Podczas przeprowadzania całego procesu zbierano 1 ml próbek kontrolnych z każdego etapu wysycania AMS. Osady białek uzyskane po ich zwirowaniu rozpuszczano w 1 × stężonym buforze Tris-Glicynowym [Mat. i Met. 4.18.1.] i analizowano przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE (wyników nie pokazano) [Mat. i Met. 4.18.1.]. Wszystkie analizowane frakcje zawierały mniejsze ilości zanieczyszczeń w porównaniu do próbki z surowego ekstraktu komórkowego. Frakcje z wysalania w przedziałach 0-20%, 20-40%, 40-50% zawierały ich znacznie większe ilości w porównaniu do frakcji wysalania w przedziałach 50-60%, 60-70% oraz 70-80%. W całość osobno łączono więc frakcje uzyskane odpowiednio przez wysalanie w przedziałach 0-50% oraz 50-80% poprzez ponowne rozpuszczanie osadów z obu przedziałów w 20 ml buforu [Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF]. Uzyskano w ten sposób około 20 + 20 ml preparatów białkowych His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2, które przeznaczono na docelowy proces ich

oczyszczania za pomocą chromatografii IMAC. Przed naniesieniem poszczególnych preparatów na kolumnę chromatograficzną, poddano je filtrowaniu przy użyciu filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,22 μm . Proces chromatograficzny ponownie prowadzono przy pomocy zautomatyzowanego systemu do oczyszczania białek NGC [Mat. i Met. 4.27.7.]. Obecność docelowych białek we frakcjach ustalano analogicznie jak w przypadku ich pełnych wariantów, poprzez analizę otrzymanych chromatogramów, połączoną z interpretacją rozdziałów elektroforetycznych frakcji w żelu poliakryloamidowym Tris-Tricine [Mat. i Met. 4.18.2.] (wyników nie pokazano). Uzyskano około 30 ml roztworu białka His_Ub_Myb1 i 40 ml roztworu białka His_Ub_Myb2. Przed przystąpieniem do odcięcia etykiety Ub, preparaty białkowe postanowiono zagęścić do około 10 ml. Proces ten przeprowadzono przy użyciu ultrafiltracji [Mat. i Met. 4.22.] z użyciem membrany o wielkości porów MWCO 10 kDa [Mat. i Met. 4.1.]. Podczas procesu białko zostało rozpuszczone w buforze reakcyjnym do trawienia proteazą UBPD2C [50 mM NaH_2PO_4 , 1000 mM NaCl, 150 mM imidazolu]. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE preparatów His_Ub_Myb1 (16,1 kDa) i His_Ub_Myb2 (15,25 kDa) uzyskanych po omawianych wyżej etapach izolowania i oczyszczania widoczny jest na rycinie 22 (ścieżki nr 1 i 3) przedstawiającej preparat przed i po reakcji cięcia przez ubikwitynazę.

Usuwanie etykiety His_Ub od docelowych białek Myb1 oraz Myb2 metodą enzymatyczną przy pomocy proteazy UBPD2C

Zastosowanie domeny Ub połączonej ze znacznikiem His umożliwiło przeprowadzenie standardowego dwuetapowego procesu jej usunięcia. Pierwszy etap odcięcia znacznika Ub od docelowych białek His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2 postanowiono uzyskać przez przeprowadzenie reakcji enzymatycznej z opisaną proteazą UBPD2C zgodnie z tabelą 25. Uzyskane białka wolne od etykiety zdecydowano rozdzielić od Ub oraz proteazy za pomocą chromatografii powinowactwa. Spodziewano się związania do złoża rekombinantowej proteazy, zawierającej znacznik His oraz odciętej domeny His_Ub. We frakcji przesączu spodziewano się białek Myb1/2, ze względu na brak etykiety His, a tym samym dalszego oddziaływania ze złożem IMAC.

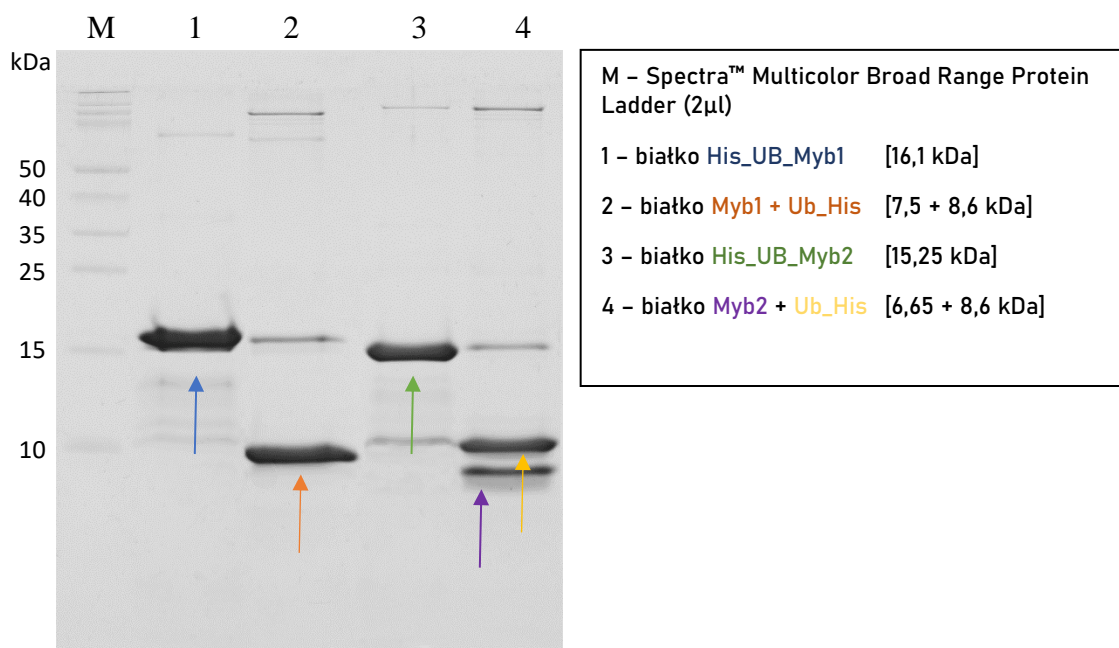
Wyniki optymalizacji wykazały, że na całkowite trawienie 15 μg białka potrzeba 0,35 μg proteazy UBPD2C (0,7 mg/ml). Przed właściwą reakcją trawienia oszacowano ilość otrzymanych preparatów poprzez analizę rozdziału elektroforetycznego preparatów fuzyjnych w żelu poliakryloamidowym obok znanej ilości białka BSA [Mat. i Met. 4.24.].

Dokładne ilości uzyskanych białek oraz użytej proteazy niezbędnej do całkowitego odcięcia Ub zostały przedstawione w tabeli 25.

Tab. 25. Dokładny skład reakcji trawienia białek His_Ub_Myb1 i His_Ub_Myb2 przy użyciu proteazy UBPD2C [V_{cat} : 20 ml].

Składniki	Ilość	
	His_Ub_Myb1 1,4 mg/ml, 13,7 mg	His_Ub_Myb2 1,6 mg/ml, 17,92 mg
białko		
bufor 10 × (UBPD2C)	2 ml	2 ml
proteaza [0,7 mg/ml]	0,32 mg	0,42 mg
woda	do 20 ml	do 20 ml

Reakcje prowadzono w 37°C przez 2 h delikatnie mieszając. Reakcje hamowano przenosząc preparaty do 4°C. Analizę aktywności proteazy sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny próbek pobranych przed i po zajściu reakcji, w żelu poliakryloamidowym Tris-Tricine [Mat. i Met. 4.18.2.].



Ryc. 22. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 16,5% żelu poliakryloamidowym Tris-Tricine reakcji trawienia preparatów białkowych His_Ub_Myb1/2 przed i po poddaniu reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem proteazy UBPD2C. Strzałka niebieska wskazuje białko fuzyjne His_UB_Myb1, strzałka zielona wskazuje białko fuzyjne His_UB_Myb2, strzałka pomarańczowa wskazuje białko Myb1, strzałka fioletowa wskazuje białko Myb2, strzałka żółta wskazuje domenę His_Ub.

Poprawność odcięcia domeny Ub obserwuje się poprzez różnice w migracji preparatów białkowych przed i po poddaniu reakcji enzymatycznej (Ryc. 22.). Wyraźne zmniejszenie się masy cząsteczkowej preparatów białkowych His_UB_Myb1 (16,1 kDa) (Ryc. 22., ścieżka nr 1, niebieska strzałka) i His_UB_Myb2 (15,25 kDa) (Ryc. 22., ścieżka nr 2, zielona strzałka) o ponad połowę wynika z odcięcia domeny Ub (8,6 kDa) (Ryc. 22., ścieżka nr 4, żółta strzałka) od białka fuzyjnego. Masy cząsteczkowe prążków pochodzących od białka Myb1 (7,5 kDa) (Ryc. 22., ścieżka nr 2, pomarańczowa strzałka) oraz Myb2 (6,65 kDa) (Ryc. 22., ścieżka nr 4, fioletowa strzałka) pokrywają się z teoretycznymi masami cząsteczkowymi wyliczonymi na podstawie sekwencji aa. Można zatem stwierdzić, że udało się uzyskać preparaty białkowe z odciętą domeną Ub. Zauważa się niewielkie pozostałości białek fuzyjnych His_Ub_Myb1 (Ryc. 22., ścieżka nr 2) i His_Ub_Myb2 (Ryc. 22., ścieżka nr 4), które zostaną oddzielone w kolejnym etapie oczyszczania. Uzyskane preparaty białkowe Myb1 i Myb2 (20 ml) umieszczano w komorze ultrafiltracyjnej z membraną o MWCO równej 3 kDa i prowadzono proces wymiany buforu na podstawowy N [Mat. i Met. 4.27.1.] z jednoczesnym ich zagęszczaniem do poprzedniej objętości (10 ml) [Mat. i Met. 4.22.].

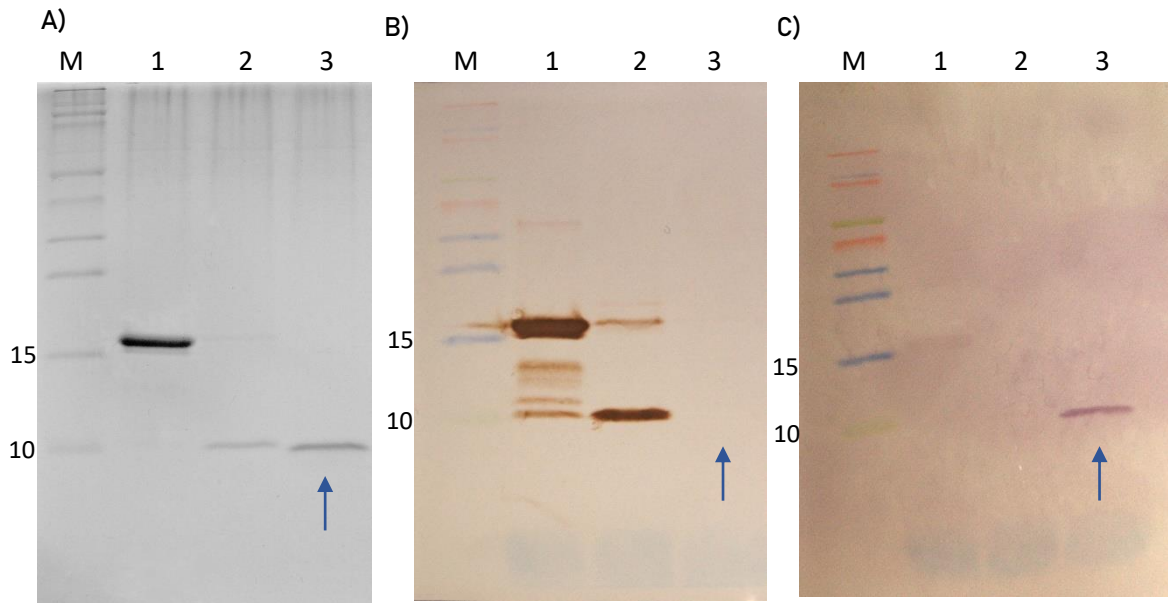
Przygotowane preparaty białkowe Myb1 i Myb2 oczyszczono przy użyciu chromatografii powinowactwa (IMAC), kolejny raz wykorzystując do tego zautomatyzowany system oczyszczania białek NGC [Mat. i Met. 4.27.7.]. W celu potwierdzenia poprawności uzyskania homogennych preparatów białkowych Myb1 i Myb2 przeprowadzono analizę western blotting z przeciwciałami anti-His_HRP [Mat. i Met. 4.23.] dla wszystkich frakcji chromatograficznych z przesączu, płukania oraz elucji. Poprawność oczyszczania na przykładzie preparatu Myb2 została przedstawiona na rycinie 23.

(15,25 kDa) (Ryc. 23., A, B, ścieżki nr 2, 13-14, niebieska strzałka) oraz odciętej domeny His_Ub (8,6 kDa) (Ryc. 23., A, B, ścieżki nr 2, 13-14, zielona strzałka). Zgodnie z przewidywaniami białko Myb2 (6,65 kDa) (Ryc. 23., A, B, ścieżka nr 3, czerwona strzałka) pozbawione etykiety His nie związało się do złoża Ni-NTA i wyeluowało we frakcji przesączu w przeciwieństwie do pozostałości białka fuzyjnego His_Ub_Myb2 (15,25 kDa) (Ryc. 23., A, B, ścieżki nr 2, 13-14, niebieska strzałka) oraz odciętej domeny His_Ub (8,6 kDa) (Ryc. 23., A, B, ścieżki nr 2, 13-14, zielona strzałka).

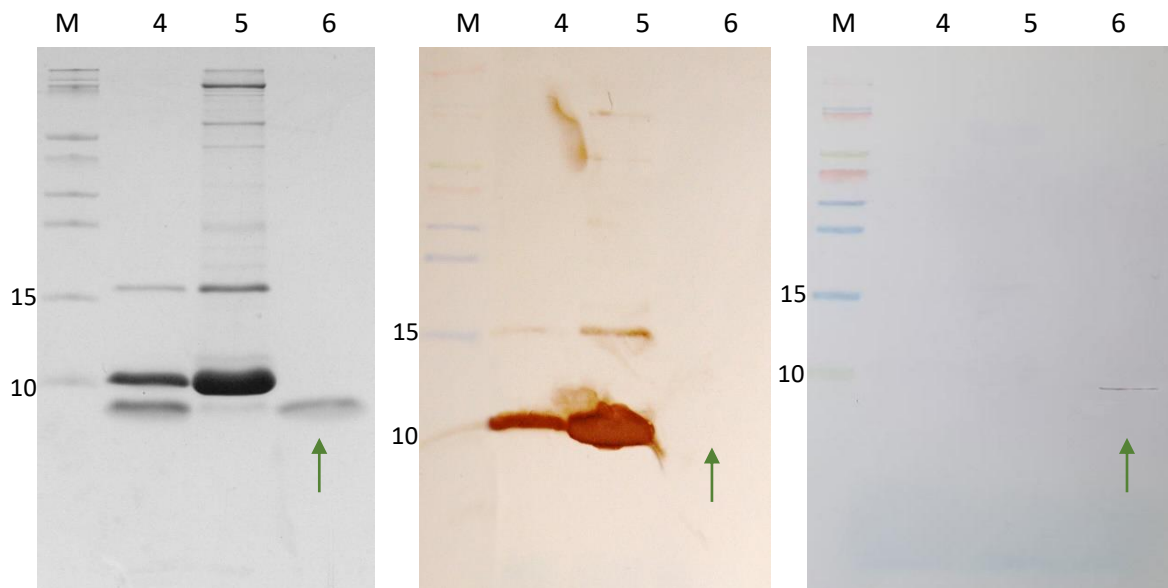
Przedstawione wyniki z rozdziału SDS-PAGE białka Myb2 po oczyszczaniu przy użyciu IMAC (Ryc. 23., A) oraz testu western blot z przeciwciałami anty-His (Ryc. 23., B.) potwierdziły skuteczność wybranej strategii oczyszczania białka Myb2 (analogicznie Myb1) uzyskanych po odcięciu użytej etykiety His_Ub.

Tożsamość uzyskanych białek Myb1 i Myb2 potwierdzono dodatkowo za pomocą techniki western blotting [Mat. i Met. 4.23.] z przeciwciałami monoklonalnymi anty-TRF1 i anty-TRF2 [Mat. i Met. 4.23.]. Wyniki immunodetekcji poszczególnych preparatów uzyskiwanych na etapach oczyszczania białek Myb1 i Myb2 przedstawiono na rycinie 24.

Myb1



Myb2



M - Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (2μl)

1 - białko His_UB_Myb1

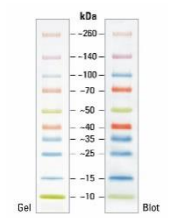
2 - białko His_UB_Myb1 + His_UB

3 - białko Myb1

4 - białko His_Ub_Myb2 + His_Ub + Myb2

5 - białko His_Ub_Myb + His_UB

6 - białko Myb2



Ryc. 24. Oczyszczone preparaty białek Myb1 i Myb2. A) wynik rozdziału elektroforetycznego w 16,5% żelu poliakrylamidowym Tris-Tricine. B) Wynik analizy western blot z przeciwciałami anti-His_HRP po wywołaniu membrany. C) Wynik analizy western blot z przeciwciałami anti-TRF1 dla białka Myb1 oraz z przeciwciałami anti-TRF2 dla białka Myb2. Niebieska strzałka wskazuje białko Myb1, zielona strzałka wskazuje białko Myb2.

Oddziaływanie z monoklonalnymi przeciwciałami (anty-TRF1/2) przez otrzymane rekombinantowe białka Myb1 (7,5 kDa) (Ryc. 24., A, C, ścieżka nr 3, niebieska strzałka) oraz Myb2 (6,65 kDa) (Ryc. 24., A, C, ścieżka nr 6, zielona strzałka) potwierdza ich tożsamość. Brak oddziaływania z przeciwciałami monoklonalnymi anty-His ponownie potwierdza uzyskanie homogennych białek Myb1 i Myb2, wolnych od etykiety His (Ryc. 24., A, B, ścieżki nr 3, 6).

Preparaty oczyszczonych białek Myb1/2 zagęszczono przy użyciu ultrafiltracji [Mat. i Met. 4.22.] przy użyciu membran o MWCO 10 kDa [Mat. i Met. 4.21.]. Ostatecznie uzyskano 6,5 ml białka Myb1 o stężeniu 1,01 mg/ml [6,56 mg] oraz 7,5 ml białka Myb2 o stężeniu 1,16 mg/ml [8,7 mg] z około 6 g biomasy bakteryjnej. Stężenia białek oznaczano metodą densytometryczną [Mat. i Met. 4.25.].

5.1.3. Uzyskanie wariantów delecyjnych hTRF1 i hTRF2 – Myb1 i Myb2 w fuzji z nieusuwalną etykietą His na N- końcu

Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne His_Myb1 oraz His_Myb2

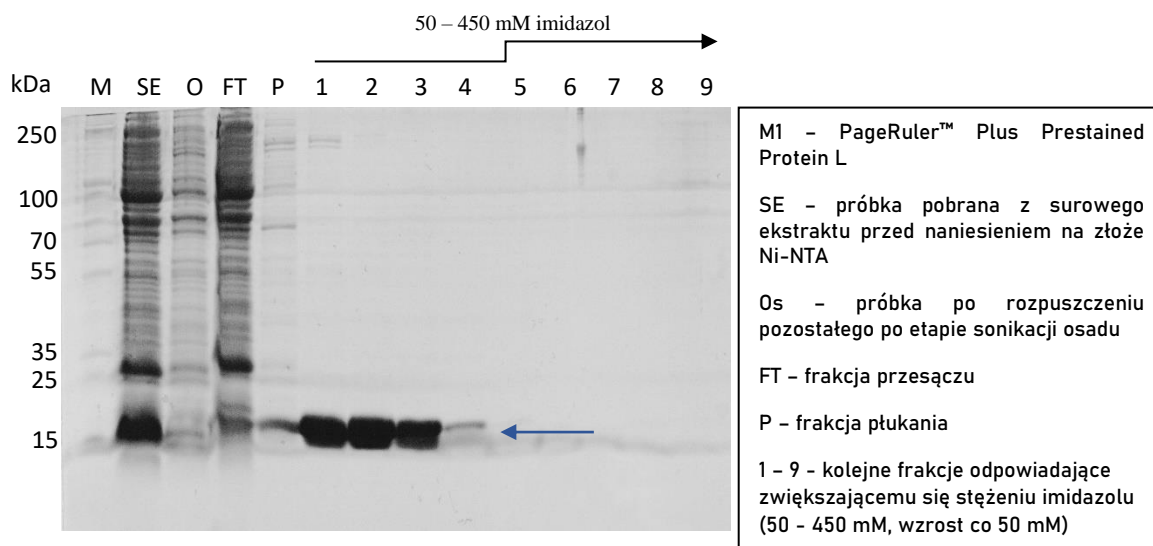
Bioprodukcję rekombinantowych domen wiążących Myb1 oraz Myb2 uzyskano również w fuzji z nieusuwalną etykietą His. Konstrukty genów kodujących warianty białek His_Myb1 i His_Myb2 zostały wykonane przez zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej na drodze mutagenyzy ukierunkowanej, usuwającej sekwencję kodującą ubikwitynę. W ramach uzyskanych wyników powstała praca magisterska (Maciszka 2019). Strategia ta miała na celu: (i) sprawdzenie poprawności biosyntezy i fałdowania się białek fuzyjnych His_Myb1 oraz His_Myb2 bez etykiety poprawiającej ich rozpuszczalność, (ii) znaczne skrócenie całego procesu ich oczyszczania, (iii) analizę wpływu etykiety His na oddziaływanie tych białek z telomerowym dsDNA. Poprawność strategii została potwierdzona podczas prób optymalizacyjnych bioprodukcji i oczyszczania białek His_Myb1/ His_Myb2, wykonanych przez zespół oraz studentów Katedry Biotechnologii Molekularnej (Maciszka 2019).

Ekspresję genów kodujących warianty rekombinantowych białek His_Myb1/2 prowadzono w komórkach *E. coli* szczepu BL21(DE3) Star [Mat. i Met. 4.4.1.] w 0,5 l pożywki LB [Mat. i Met. 4.3.]. Analogicznie do bioprodukcji pozostałych białek z kompleksu Shelterin kontrolowano przyrost ilości białek po indukcji ekspresji genów

(wyników nie pokazano). Biosyntezę białek His_Myb1 i His_Myb2 rozpoczynano od zaszczepienia 10 ml hodowli nocnych w pożywce LB [Mat. i Met. 4.3.] suplementowanego kanamycyną [Mat. i Met. 4.4.2.] poprzez pobranie bakterii zawierających plazmidowe DNA kodujące odpowiednio białka: His_Myb1 i His_Myb2 [Mat. i Met. 4.2.] z płytek. Hodowle właściwe (0,5 l) zaszczepiano do wartości OD₆₀₀ wynoszącej około 0,1 poprzez odmładzanie hodowli nocnej, pobierając z niej około 5 ml. Wzrost komórek bakteryjnych następował w 37°C aż momentu, gdy OD₆₀₀ osiągnęło wartość w okolicach 0,6. Indukcji genu kodującego dane białko dokonywano poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM i dalszą hodowlę kontynuowano w temperaturze 32°C przez 4 h. Hodowle zakończono poprzez zwirowanie całości przy RCF 5000 × g, 10 min w 4°C otrzymując około 1,5 g biomasy komórek bakteryjnych dla obu preparatów białkowych.

Oczyszczanie białek fuzyjnych His_Myb1 oraz His_Myb2 za pomocą chromatografii powinowactwa

Otrzymane biomasy komórek bakteryjnych (1,25 g dla His_Myb1 oraz 1,5 g dla His_Myb2) po ekspresji genów kodujących docelowe białka: His_Myb1 i His_Myb2 zawieszano w buforze [50 mM Tris-HCl, 1000 mM NaCl, pH 7,5 w 10°C, 0,5 mg/ml lizozym, 1 mM PMSF] w stosunku osadu do buforu 1:10, uzyskując odpowiednio 12,5 oraz 15 ml zawiesin komórkowych. Komórki inkubowano w łaźni lodowej przez 20 min, po czym rozpoczynano etap lizy, stosując metodę sonikacji [Mat. i Met. 4.19.]. Otrzymany surowy ekstrakt komórkowy wirowano przy RCF 15000 × g, 20 min, 4°C. W celu maksymalnego skrócenia procedury izolowania białka pominięto etap wysalania przez AMS, a otrzymane surowe ekstrakty naniesiono bezpośrednio na złożę typu Ni-NTA. Białko oczyszczano manualnie na 1 ml zrównowagowanego złoża HIS-Select Nickel Affinity Gel [Mat. i Met. 4.27.8.]. Obecność docelowych białek we frakcjach ustalano wykorzystując elektroforezę Tris-Tricine [Mat. i Met. 4.16.2.]. Rozdział frakcji uzyskanych podczas oczyszczania na złożu HIS-Select Nickel Affinity Gel przedstawiono na rycinie 25, na przykładzie białka His_Myb1.



Ryc. 25. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 16,5% żelu Tris-Tricine frakcji uzyskanych na etapie oczyszczania białka fuzyjnego His_Myb1 z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa i złoża HIS-Select Nickel Affinity Gel. Czarna strzałka wskazuje skokowy wzrost stężenia imidazolu, niebieska strzałka wskazuje elucję białka His_Myb1.

Wynik rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE poszczególnych frakcji chromatograficznych z etapu procesu izolowania i oczyszczania białka His_Myb1 na złożu typu Ni-NTA umożliwił analizę jakościową oczyszczanego białka fuzyjnego His_Myb1 (Ryc. 25.). Rozdzielenie w żelu poliakryloamidowym frakcji surowych ekstraktów oraz rozpuszczonych pozostałych osadów z lizy komórkowej pozwoliło na oszacowanie wydajności procesu sonikacji, która wynosi w przybliżeniu 98%.

W ścieżce SE obserwowany jest wyraźny prążek pochodzący od białka His_Myb1 (Ryc. 25, niebieska strzałka) wraz ze znaczną ilością prążków pochodzących od mieszaniny białek gospodarza *E. coli* otrzymanych podczas lizy komórek bakteryjnych. Obserwowany w ścieżce Os prążek pochodzący od białka docelowego His_Myb1 jest znacznie mniej intensywny, dodatkowo nie obserwuje się tak dużej ilości prążków pochodzących od innych białek. Największa ilość białek we frakcjach przesączu (Ryc 25., ścieżka FT) oraz płukania (Ryc. 25., ścieżka P) ponownie podkreśla skuteczność procesu oczyszczania białek rekombinantowych zawierających etykietę His przy zastosowaniu chromatografii IMAC. Białko His_Myb1 obserwowane jest we frakcjach elucji (Ryc. 25., ścieżki nr 1-4) o stężeniu imidazolu w zakresie 50 – 200 mM. Intensywność prążków pochodzących od pożądanego białka His_Myb1 (Ryc. 25., niebieska strzałka) świadczy o uzyskaniu wysokiego poziomu jego biosyntezy.

Brak prążków odpowiadających białkom zanieczyszczającym w porównaniu do próbki surowego ekstraktu świadczy o homogenności uzyskanego białka His_Myb1. Przedstawione i omówione wyniki z procesu izolowania i oczyszczania białka His_Myb1 na złożu HIS-Select Nickel Affinity Gel potwierdzają słuszność użycia wybranej metody do procesu oczyszczania pożądaných białek fuzyjnych His_Myb1 i His_Myb2 (analogiczne wyniki).

Preparaty homogennych białek rekombinantowych: His_Myb1 i His_Myb2 poddawano procesowi ultrafiltracji na membranie o MWCO równej 10 kDa [Mat. i Met. 4.22.]. Równoległe z procesem zagęszczania zmieniono bufor na zalecany przy pomiarach oddziaływań [50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl]. Ostatecznie uzyskano około 4,5 ml białka Myb1 o stężeniu 1,05 mg/ml [4,75 mg] oraz 1,53 ml białka Myb2 o stężeniu 3,02 mg/ml [4,62 mg] z około 1,5 g biomasy bakteryjnej. Stężenia białek oznaczano metodą densytometryczną [Mat. i Met. 4.25.].

5.1.4. Uzyskanie pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 w fuzji z nieusuwalną etykietą His na N-końcu

Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne His_hTRF1 oraz His_hTRF2

Bioprodukcję rekombinantowych hTRF1 oraz hTRF2 w fuzji z nieusuwalną etykietą His uzyskano analogicznie jak dla ich domen wiążących Myb1 i Myb2. Konstruktor genu kodującego wariant białka His_hTRF1 został wykonany przez studentów Katedry Biotechnologii Molekularnej na drodze mutagenyzy ukierunkowanej, usuwającej sekwencję kodującą ubikwitynę. W ramach uzyskanych wyników powstała praca magisterska (Jędryś i Górecka 2021). Konstruktor genu kodującego wariant białka His_hTRF2 został wykonany w sposób analogiczny [Mat. i Met. 4.9.]. Strategia ta została opracowana po uzyskaniu zadowalających rezultatów w bioprodukcji domen wiążących His_Myb1/2 oraz po wykazaniu braku wpływu etykiety His przy pomiarach oddziaływań z telomerowym dsDNA i miała na celu: (i) sprawdzenie poprawności biosyntezy i fałdowania się białek fuzyjnych His_hTRF1 oraz His_hTRF2 bez etykiety poprawiającej ich rozpuszczalność, (ii) znaczne skrócenie całego procesu ich oczyszczania, (iii) umożliwienie zastosowania technologii BLItz [Mat. i Met. 4.28.2] i biosensorów HIS1K (Tab. 20.) do badania oddziaływań. Poprawność strategii została potwierdzona podczas prób optymalizacyjnych bioprodukcji i oczyszczania białka

His_hTRF1, wykonanych przez studentów Katedry Biotechnologii Molekularnej (Jędryś i Górecka 2021).

Ekspresję genów kodujących warianty rekombinantowych białek His_hTRF1/2 prowadzono w komórkach *E. coli* szczepu BL21-Gold (DE3) [Mat. i Met. 4.4.1.], w 2 l pożywki LB [Mat. i Met. 4.3.]. Analogicznie do bioprodukcji innych białek z kompleksu Shelterin kontrolowano przyrost ilości białek po indukcji ekspresji genów (wyników nie pokazano). Biosyntezę białek His_hTRF1/2 rozpoczynano od zaszczepienia 50 ml hodowli nocnych w pożywce LB [Mat. i Met. 4.3.] suplementowanej kanamycyną [Mat. i Met. 4.4.2.] poprzez pobranie bakterii zawierających plazmidowe DNA kodujące odpowiednio białka: His_hTRF1 i His_hTRF2 [Mat. i Met. 4.2.] z płytek. Hodowle właściwe (2 l) zaszczepiano do wartości OD_{600} wynoszącej około 0,1 poprzez odmładzanie hodowli nocnej, pobierając z niej około 10 ml. Wzrost komórek bakteryjnych następował w 37°C aż do momentu, gdy OD_{600} osiągnęło wartość w okolicach 0,6. Indukcji ekspresji genu kodującego dane białko dokonywano poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM i dalszą hodowlę kontynuowano w temperaturze 32°C przez 4 h. Hodowle zakończono poprzez zwirowanie całości przy RCF 5000 × g, 10 min w 4°C, otrzymując około 6,5 g biomasy komórek bakteryjnych dla obu preparatów białkowych.

Oczyszczanie białek fuzyjnych His_hTRF1 oraz His_hTRF2 za pomocą chromatografii powinowactwa

Biomasy komórek bakteryjnych otrzymane w wyniku ekspresji genów kodujących docelowe białka His_hTRF1 i His_hTRF2 (6,4 g dla His_hTRF1 oraz 6,3 g dla His_hTRF2) zawieszano w buforze [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1000 mM NaCl, 0,5 mg/ml lizozym, 1 mM PMSF] w stosunku osadu do buforu 1:5, uzyskując około 32 ml zawiesiny komórek bakteryjnych. Zawiesinę komórek bakteryjnych inkubowano w łaźni lodowej przez 20 min, po czym komórki bakteryjne poddawano lizie stosując metodę sonikacji [Mat. i Met. 4.19.]. Uzyskany ekstrakt komórkowy wirowano przy RCF 15000 × g przez 20 min w 4°C. Supernatant oddzielano od pozostałej biomasy, a następnie filtrowano go przy użyciu filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 μm w celu usunięcia ewentualnych resztek komórek i innych zanieczyszczeń. Izolowanie oraz oczyszczanie białek His_hTRF1 i His_hTRF2 z otrzymanych surowych ekstraktów przeprowadzono przy użyciu chromatografii metalopowinowactwa (IMAC). Cały proces prowadzono przy pomocy zautomatyzowanego systemu do oczyszczania białek NGC

[Mat. i Met. 4.27.9.]. Obecność docelowych białek rekombinantowych His_hTRF1/2 w poszczególnych frakcjach ustalano analogicznie jak dla preparatów fuzyjnych z domeną Fh8 - poprzez analizę chromatogramów połączoną z interpretacją rozdziałów próbek przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] (wyników nie pokazano). Uzyskana czystość preparatów została przedstawiona w podrozdziale Wyn. i Dys. 5.1. na zdjęciu żelu poliakrylamidowego (Ryc. 10, ścieżki nr 8-9). Oddziaływanie z przeciwciałami monoklonalnymi (anty-TRF1, anty-TRF2) przez otrzymane rekombinantowe białka His_hTRF1 i His_hTRF2 potwierdziły ich tożsamość (wyników nie pokazano). Oddziaływanie z monoklonalnymi przeciwciałami (anty-His) potwierdziły obecność etykiety His w ich sekwencji aa (wyników nie pokazano). Użyteczność uzyskanych wariantów His_hTRF1 i His-hTRF2 została udowodniona przy badaniach oddziaływań za pomocą technologii BLItz [Wyn. i Dys. 5.3.].

Preparaty białek rekombinantowych His_hTRF1 i His_hTRF2 łączono i poddawano procesowi ultrafiltracji na membranie o MWCO równej 10 kDa [Mat. i Met. 4.22.]. Równoległe z procesem zagęszczania zmieniono bufor na zalecany przy pomiarach oddziaływań [50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl]. Ostatecznie uzyskano około 4 ml białka His_hTRF1 o stężeniu 0,268 mg/ml [1,07 mg] oraz 10 ml białka His_hTRF2 o stężeniu 0,063 mg/ml [0,63 mg] i 15 ml o stężeniu 0,042 mg/ml [0,63 mg] z około 6,5 g biomasy bakteryjnej. Stężenia białek oznaczano metodą densytometryczną [Mat. i Met. 4.25.].

5.2. Preparatyka bioaktywnej rekombinantowej proteazy TEV

W ramach niniejszej pracy oprócz białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) uzyskano również bioaktywną rekombinantową proteazę TEV, która z powodzeniem została użyta do odcięcia etykiety Fh8 od fuzyjnych białek Fh8_hTRF1_His, Fh8_hTRF2_His [Wyn. i Dys. 5.1.1.]. Wybrany mutant proteazy TEV - S219V charakteryzuje się wymianą Ser219 na Val219 w produkowanej rekombinantowej proteazie i wykazuje zmniejszoną około 100-krotnie szybkość autolizy. Wymiana jednego aminokwasu zapobiega samotrawieniu, przez zmianę sekwencji rozpoznawanej przez samą proteazę, obecną w sekwencji białka natywnego. Pozwala to na znaczne podniesienie wydajności katalitycznej rekombinantowej proteazy w porównaniu do natywnej. Charakterystyka rekombinantowego mutantu proteazy TEV została przedstawiona w tabeli 26.

Tab. 26. Charakterystyka bioaktywnej rekombinantowej proteazy TEV, uzyskanej w ramach niniejszej pracy.

Białko	aa	kDa	pI	E%	System ekspresyjny	Szczep bakteryjny	Domena fuzyjna	Strategia oczyszczania
TEV _R	243	27	8,91	1,160	pRK973	<i>E. coli</i> BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	His_X	Ni-NTA SEC

Strategia bioprodukcji rekombinantowej proteazy TEV została oparta na przestudiowanej literaturze (Kapust i in. 2001; Tropea, Cherry, i Waugh 2009). Polega na początkowej biosyntezie proteazy z fuzją z C- końcem białka wiążącego maltozę (MBP) w ekspresyjnym systemie *E. coli*. Prowadzi to do jej akumulacji w postaci rozpuszczalnej, z zachowaną aktywnością, a nie w ciałach inkluzyjnych, ponownie świadcząc o zaletach stosowania etykiet. Ustanowienie miejsca rozpoznawalnego dla proteazy TEV w konstrukcji produkowanego białka fuzyjnego powoduje odcięcie domeny MBP *in vivo*, dając w rezultacie rozpuszczalną domenę katalityczną proteazy TEV z N-końcowym znacznikiem His. Uzyskaną w ten sposób proteazę His_TEV oczyszcza się w dwóch etapach: stosując chromatografię powinowactwa na złożu IMAC, a następnie filtrację żelową (SEC). Samodzielne uzyskanie bioaktywnej proteazy TEV_R podyktowane było znacznym zmniejszeniem kosztów preparatyki białek z kompleksu Shelterin hTRF1/hTRF2 (Tab. 21.).

Ekspresja genu kodującego rekombinantową proteazę TEV

Ekspresję genów kodujących rekombinantową proteazę His_TEV przeprowadzono w komórkach *E. coli* szczepu BL21-Codon Plus (DE3)-RIL [Mat. i Met. 4.4.1.] w 2 l pożywki LB [Mat. i Met. 4.3.]. Analogicznie jak w przypadku białek kompleksu Shelterin [Wyn. i Dys. 5.1.] kontrolowano przyrost białka po rozpoczęciu indukcji ekspresji genów (wyników nie pokazano). Rozpoczynano od przygotowania 50 ml hodowli nocnej w pożywce LB [Mat. i Met. 4.3.] suplementowanej karbenicyliną i chloramfenikolem [Mat. i Met. 4.4.2.] poprzez pobranie bakterii zawierających DNA plazmidowy kodujący rekombinantowego mutantu proteazy His_TEV (S219V) z płytek [Mat. i Met. 4.2.]. Hodowle właściwe zaszczepiano do wartości OD₆₀₀ wynoszącej około

0,1 poprzez odmładzanie hodowli nocnej, pobierając z niej około 8 ml. Wzrost komórek bakteryjnych następował w 32°C aż do osiągnięcia wartości OD₆₀₀ równej 0,6. Indukcji ekspresji genu kodującego dane białko dokonywano poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM i dalszą hodowlę kontynuowano w temperaturze 30°C przez 4 h. Hodowlę zakończono poprzez zwirowanie całości przy RCF 5000 × g, 10 min w 4°C otrzymując około 5 g biomasy bakteryjnej.

Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii powinowactwa

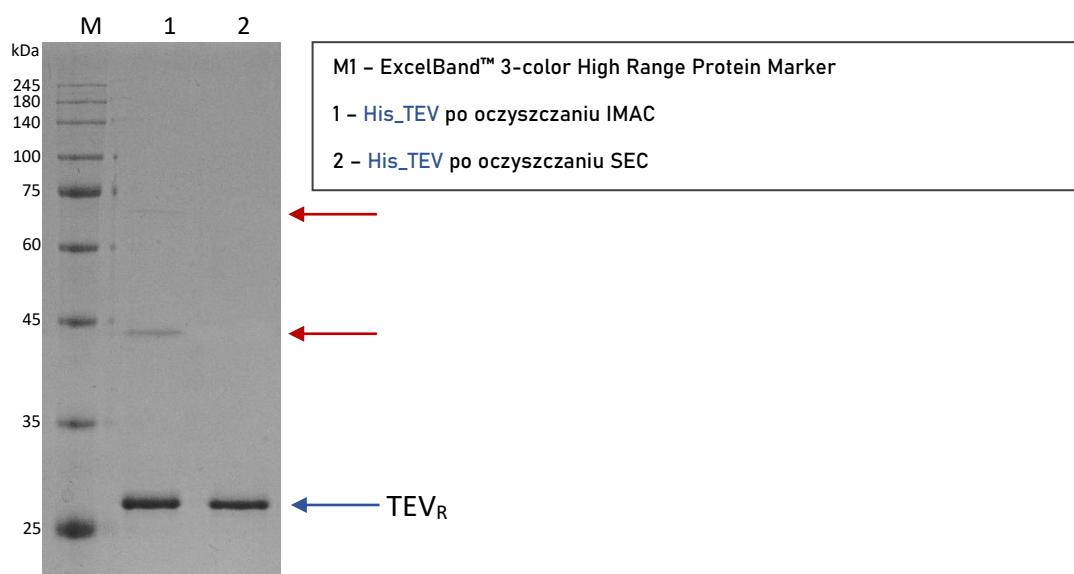
Część biomasy komórek bakteryjnych (2 g) po ekspresji genu kodującego rekombinantową proteazę His_TEV zawieszano w buforze [50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 w 25°C, 10% glicerol, 10 mM imidazol, 0,5 mg/ml lizozym, 1 mM PMSF] w stosunku osadu do buforu 1:10, uzyskując 20 ml zawiesiny komórkowej. Komórki inkubowano w łaźni lodowej przez 20 min, po czym rozpoczynano etap lizy komórek stosując metodę sonikacji [Mat. i Met. 4.19.]. Otrzymany surowy ekstrakt komórkowy wirowano przy RCF 15000 × g, 20 min, 4°C. Zgodnie z opracowaną na podstawie literatury (Kapust i in. 2001; Tropea, Cherry i Waugh 2009) procedurą surowy ekstrakt zawierający proteazę His_TEV naniesiono bezpośrednio na złożę HiTrap ImaC Fast Flow. Białko oczyszczano z wykorzystaniem systemu NGC [Mat. i Met. 4.27.10.]. Obecność docelowego białka His_TEV we frakcjach ustalano analogicznie jak w przypadku białek z kompleksu Shelterin, poprzez analizę otrzymanych chromatogramów, połączoną z interpretacją rozdziałów próbek przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] (wyników nie pokazano).

Fracje zawierające wstępnie oczyszczone białko His_TEV łączono w całość (ok. 24 ml) i umieszczano w workach dializacyjnych o wielkości porów membrany MWCO z ok. 10 kDa. Powadzono proces dializy w buforze [25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,5 w 25°C, 100 mM NaCl, 10% glicerol]. Preparaty białkowe przeznaczono do dalszego etapu oczyszczania za pomocą chromatografii SEC.

Oczyszczanie rekombinantowej proteazy His_TEV za pomocą chromatografii wykluczania

Pełną homogenność proteazy His_TEV uzyskiwano przy użyciu chromatografii wykluczania stosując złożę HiLoad 26/600 Superdex 200 pg. [Mat. i Met. 4.27.11.]. Analogicznie jak w przypadku białek z kompleksu Shelterin do oceny jakości

otrzymanych prepartów białkowych wybierano tylko frakcje potencjalnie pochodzące od docelowej proteazy, wytypowane poprzez analizę chromatogramu, połączoną z analizą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE [Mat. i Met. 4.18.1.] (wyników nie pokazano). Preparat His_TEV zagęszczano przy użyciu koncentratorów odśrodkowych [Mat. i Met. 4.21.] o MWCO 10 kDa [Mat. i Met. 4.21.] do zalecanego stężenia 1 mg/ml. Końcowe rezultaty oczyszczania białka His_TEV dla obu etapów chromatograficznych przedstawiono na rycinie 26.



Ryc. 26. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12,5% żelu poliakryloamidowym oczyszczonego preparatu His_TEV na różnych etapach jego preparatyki z wykorzystaniem kolejno chromatografii IMAC i SEC. Niebieska strzałka wskazuje proteazę His_TEV, czerwone strzałki wskazują białka zanieczyszczające.

Wyniki rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE poszczególnych frakcji z różnych etapów procesów oczyszczania białka His_TEV kolejno na złożu typu HiTrap Imac Fast Flow i HiLoad 26/600 Superdex 200 pg umożliwiły analizę jakościową oczyszczanej proteazy His_TEV.

W ścieżce nr 1 obserwowany jest wyraźny prążek pochodzący od białka His_TEV (Ryc. 26., niebieska strzałka) wraz z 2 prążkami pochodzącymi prawdopodobnie od białek gospodarza *E. coli* uzyskanych podczas lizy komórek bakteryjnych (Ryc. 26., czerwone strzałki), których nie udało się całkowicie usunąć w pierwszym etapie oczyszczania za pomocą chromatografii IMAC. Obserwowana w ścieżce 2

proteaza His_TEV (Ryc. 26., niebieska strzałka) jest w pełni homogenna, w ścieżce nie obserwuje się prążków białek zanieczyszczających (Ryc. 26., czerwone strzałki). Przedstawione i omówione wyniki z dwuetapowego procesu oczyszczania białka His_TEV potwierdziły słuszność wybranej strategii oraz uzyskanie homogennej proteazy TEV_R

Ostatecznie uzyskano około 10 ml proteazy His_TEV o stężeniu około 1,0 mg/ml [10 mg]. Stężenie białka oznaczano metodą densytometryczną [Mat. i Met. 4.25.]. Poprawne odcięcie domeny Fh8 od białka fuzyjnego Fh8_hTRF1_His przez uzyskaną proteazę TEV_R (Ryc. 17), potwierdza jej tożsamość [Wyn. i Dys. 5.1.1.].

5.3. Analiza *in vitro* interakcji między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a telomerowym DNA

Natywne właściwości wiązania telomerowego DNA przez uzyskane rekombinantowe białka z ludzkiego kompleksu Shelterin (Tab. 21.) [Wyn. i Dys. 5.1.] sprawdzano przy użyciu dwóch metod: pomiaru przesunięcia mobilności w elektroforezie żelowej (ang. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) [Mat. i Met. 4.28.1.] oraz interferometrii biowarstwowej (ang. *biolayer interferometry*, BLI) [Mat. i Met. 4.28.2.]. Jako specyficznych ligandów, stanowiących telomerowe dsDNA, używano zmodyfikowanych plazmidowych dsDNA. Używane w pomiarach oddziaływań z uzyskanymi białkami formy dsDNA przedstawiono w tabeli 27.

Tab. 27. Charakterystyka telomerowego dsDNA używanego w pomiarach oddziaływań z rekombinantowymi białkami kompleksu Shelterin, uzyskanymi w ramach niniejszej pracy.

dsDNA	pz	Powtórzenia telomerowe	Strategia uzyskania
liniowy plazmid pUC19_s2	2724	2	trawienie SapI [Mat. i Met. 4.7.] oczyszczanie po reakcji enzymatycznej [Mat. i Met. 4.12.]
fragment plazmidu pUC19_s2	175	2	reakcja PCR [Mat. i Met. 4.8.] izolowanie produktu z żelu [Mat. i Met. 4.14.] / oczyszczanie po reakcji enzymatycznej [Mat. i Met. 4.12.]
liniowy plazmid pENTR TERRA	3464	126	trawienie SapI [Mat. i Met. 4.7.] izolowanie produktu z żelu [Mat. i Met. 4.14.] / oczyszczanie po reakcji enzymatycznej [Mat. i Met. 4.12.]
Nietelomerowe DNA kontrolne			
liniowy plazmid pUC19_s2	2686	0	trawienie SapI [Mat. i Met. 4.7.] oczyszczanie po reakcji enzymatycznej [Mat. i Met. 4.12.]
fragment plazmidu pUC19_s2	137	0	reakcja PCR [Mat. i Met. 4.8.] izolowanie produktu z żelu [Mat. i Met. 4.14.] / oczyszczanie po reakcji enzymatycznej [Mat. i Met. 4.12.]

W pomiarach oddziaływań rekombinantowych białek z telomerowymi dsDNA wykorzystywano także peptydy, które potencjalnie mogły zwiększać omawiane oddziaływanie. W tabeli 28 przedstawiono podsumowanie wszystkich wariantów peptydowych, których używano w badaniach interakcji.

Tab. 28. Charakterystyka używanych peptydów wykazujących powinowactwo do wybranych białek kompleksu Shelterin: hTRF1, hTRF2.

peptyd	aa	KDa	Pi	E	Strategia uzyskania
TIN	21	2,6	12	2,17	synteza chemiczna na nośniku stałym (SPPS) z wykorzystaniem strategii Boc [Mat. i Met. 4.29.] oczyszczanie HPLC
Biot-TIN	21	2,6	12	2,17	synteza chemiczna na nośniku stałym (SPPS) z wykorzystaniem strategii Boc [Mat. i Met. 4.29.] oczyszczanie HPLC
Apollo	14	1,6	8,69	0,92	synteza chemiczna na nośniku stałym (SPPS) z wykorzystaniem strategii Boc [Mat. i Met. 4.29.] oczyszczanie HPLC
Biot-Apollo	14	1,6	8,69	0,92	synteza chemiczna na nośniku stałym (SPPS) z wykorzystaniem strategii Boc [Mat. i Met. 4.29.] oczyszczanie HPLC

Opracowanie działających metod, służących do pomiarów poziomów oddziaływań pomiędzy rekombinantowymi białkami kompleksu Shelterin (Tab. 21.),

uzyskiwanymi w ekspresyjnych systemach *E. coli*, z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) jest jednym z szczegółowych celów niniejszej pracy. Otrzymane pozytywne wyniki świadczą o uzyskaniu bioaktywnych rekombinantowych białek kompleksu Shelterin, wykazujących natywne właściwości wiązania telomerowego i nietelomerowego dsDNA [Wyn. i Dys. 5.3.1., Wyn. i Dys. 5.3.2.].

5.3.1. Pomiar oddziaływań pomiędzy białkami z ludzkiego kompleksu Shelterin i telomerowym dsDNA wykonany przy użyciu testu EMSA

Pomiar interakcji białko-DNA z wykorzystaniem testu EMSA opierał się na obserwacji opóźnienia migracji kompleksu białko-DNA w żelu w porównaniu do odpowiadającego mu niezwiązanego przez białko dsDNA. Optymalne warunki dla reakcji kompleksowania komponentów telomerowych ustalano na podstawie literatury (Galati i in. 2006; Bidzińska 2011). Dokładne ilości użytych komponentów (DNA i białek) przeliczano korzystając z gotowych wzorów i kalkulatorów online [Mat. i Met. 4.1.].

Stężenie molowe DNA przeliczano ze wzoru:

$$\frac{\text{stężenie w ng/}\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{średnia masa pary zasad}) * \text{liczba par zasad DNA}} * 10^6 = \text{stężenie nM}$$

Stężenie molowe białek obliczano z zależności: 1 kDa = 1 mol – 1000 g

Kontrola tworzenia kompleksów przez białka kompleksu Shelterin hTRF1, hTRF2 oraz ich domeny wiążące Myb1 i Myb2 z plazmidowym DNA pUC19_s2, zawierającym 2 powtórzenia telomerowe

Pierwsza przeprowadzona reakcja kontrolna tworzenia kompleksów białko-DNA miała na celu sprawdzenie, czy uzyskane białka kompleksu Shelterin (Tab. 21.) będą oddziaływać z dsDNA plazmidowym zawierającym 2 powtórzenia telomerowe (Tab. 27.) Do pierwszej przeprowadzonej reakcji kompleksowania rekombinantowych białek z kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA wykorzystano białka: Myb1 (0,1 mg/ml), His_Myb1 (0,1 mg/ml), Myb2 (0,16 mg/ml), hTRF1 (0,2 mg/ml), hTRF2 (0,2 mg/ml) oraz liniowe plazmidowe dsDNA pUC19_s2 zawierające 2 powtórzenia telomerowe (140 ng/ μ l). Dokładny skład poszczególnych reakcji kontrolnych przedstawiono w tabelach 29 i 30.

Tab. 29. Dokładny skład reakcji kompleksowania białek kompleksu Shelterin z dsDNA plazmidowym pUC19, zawierającym 2 powtórzenia telomerowe [V_{cat} : 25 μ l].

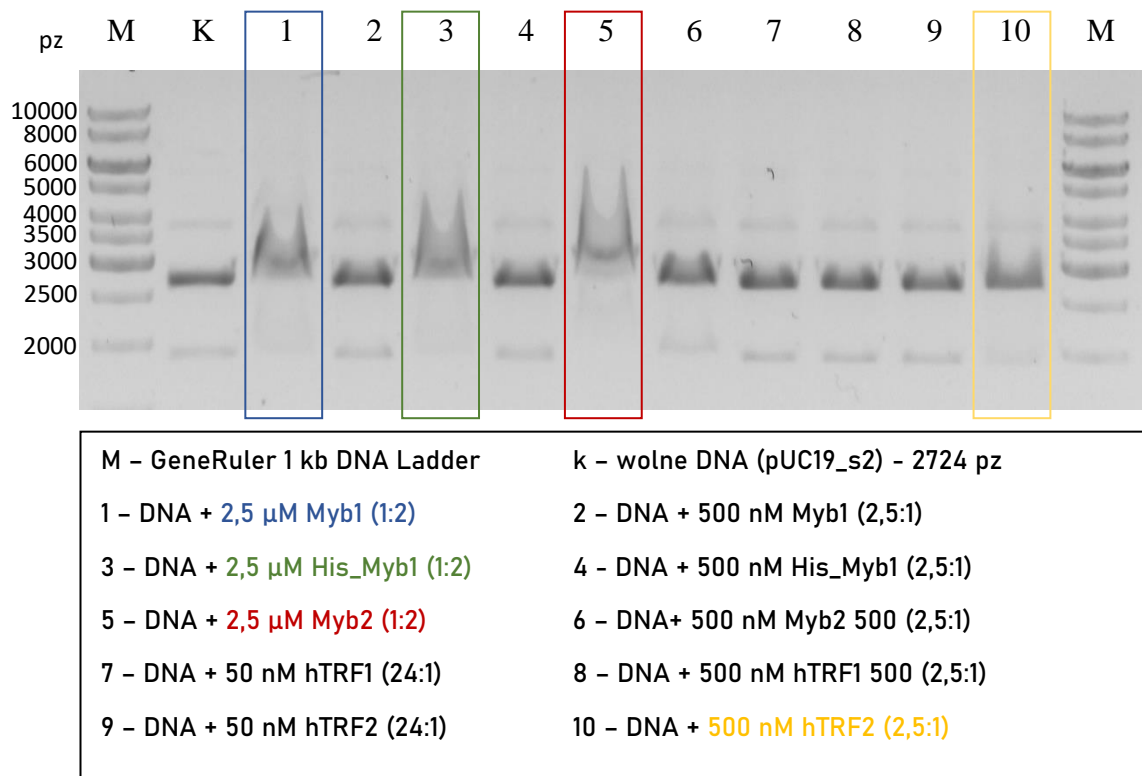
Składniki [μl]	Myb1	His_Myb1	Myb2	hTRF1	hTRF2
telomerowe DNA 5 nM*	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58
500 nM białka	0,90	0,90	0,52	3,13	3,45
bufor 8 \times (160 nM Tris-HCl pH 8,0, 800 nM NaCl, 400 nM KCl, 8 mM MgCl ₂ , 0,8 mM EDTA, 8 mM DTT, 40% Glicerol (v/v), BSA 0,8% (v/v), 0,8% Triton X-100 (v/v))	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
woda	19,39	19,39	19,77	17,16	16,84

Tab. 30. Dokładny skład reakcji kompleksowania białek kompleksu Shelterin z dsDNA plazmidowym pUC19, zawierającym 2 powtórzenia telomerowe [V_{cat} : 25 μ l].

Składniki [μl]	Myb1	His_Myb1	Myb2	hTRF1	hTRF2
telomerowe DNA 5 nM*	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58
50 nM dla hTRF1/2, 2,5 μ M dla Myb1/2	4,50	4,50	2,08	0,32	0,35
Bufor 8 \times (160 nM Tris-HCl pH 8,0, 800 nM NaCl, 400 nM KCl, 8 mM MgCl ₂ , 0,8 mM EDTA, 8 mM DTT, 40% Glicerol (v/v), BSA 0,8% (v/v), 0,8% Triton X-100 (v/v))	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
woda	15,79	15,79	18,21	19,97	19,94

*Stężenie samych powtórzeń telomerowych wynosiło 1,22 μ M.

Reakcje prowadzono przez 90 min w 4°C. Po zakończeniu inkubacji próbki rozdzielano za pomocą elektroforezy agarozowej [Mat. Met 4.14.]. Żel barwiono bromkiem etydydy i fotografowano na transiluminatorze UV. Rozdział próbek z przeprowadzonego testu EMSA przedstawiono na rycinie 27.

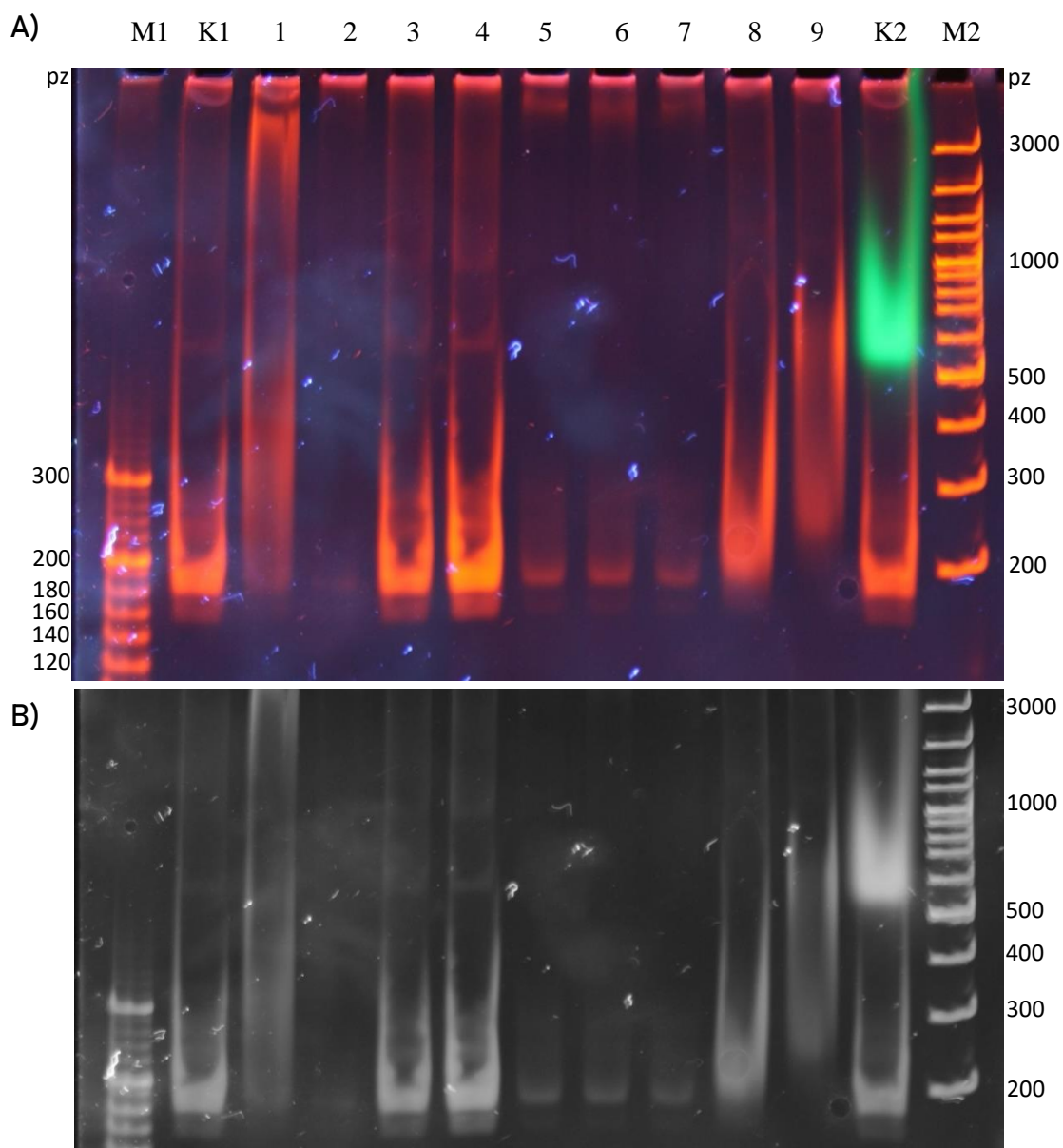


Ryc. 27. Wynik rozdziłu elektroforetycznego w 0,8% żelu agarozowym (0,5 × TBE) kompleksów białko-DNA (pUC19_s2, 2724 pz, 2 miejsca telomerowe). W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka. Niebieską ramką oznaczono kompleks Myb1-DNA, zieloną ramką oznaczono kompleks His_Myb1-DNA, czerwoną ramką oznaczono kompleks Myb2-DNA, żółtą ramką oznaczono kompleks hTRF2-DNA.

Przedstawiony rozdział liniowego dsDNA palzmidowego pUC19_s2, zawierającego 2 powtórzenia telomerowe (Tab. 27.) poddanego reakcji kompleksowania z różnymi białkami kompleksu Shelterin (Tab. 21.) wstępnie potwierdza ich interakcje. Wolne dsDNA, niepoddane reakcji kompleksowania migruje w sposób standardowy w postaci ostrego, prostego prążka (Ryc. 27., ścieżka K). Dla wszystkich naniesionych próbek dsDNA po interakcji z białkami telomerowymi obserwuje się w mniejszym lub większym zakresie opóźnienie w ich migracji lub ich rozciąganie. Największe oddziaływanie obserwuje się dla domen wiążących Myb1 (Ryc. 27., ścieżka nr 1, niebieska ramka), His_Myb1 (Ryc. 27., ścieżka nr 3, zielona ramka) oraz Myb2 (Ryc. 27., ścieżka nr 5, czerwona ramka) następnie dla białka hTRF2 (Ryc. 27., ścieżka nr 10, żółta ramka). Etykieta His wydaje się nie mieć wpływu na oddziaływanie białka His_Myb1 z telomerowym dsDNA (Ryc. 27., ścieżka nr 3, zielona ramka).

Tworzenie kompleksów przez rekombinantowe białka z kompleksu Shelterin hTRF1 i hTRF2 w połączeniu z peptydami TIN i Apollo z fragmentem plazmidu pUC19_s2, uzyskanym na drodze reakcji PCR, zawierającym 2 powtórzenia telomerowe

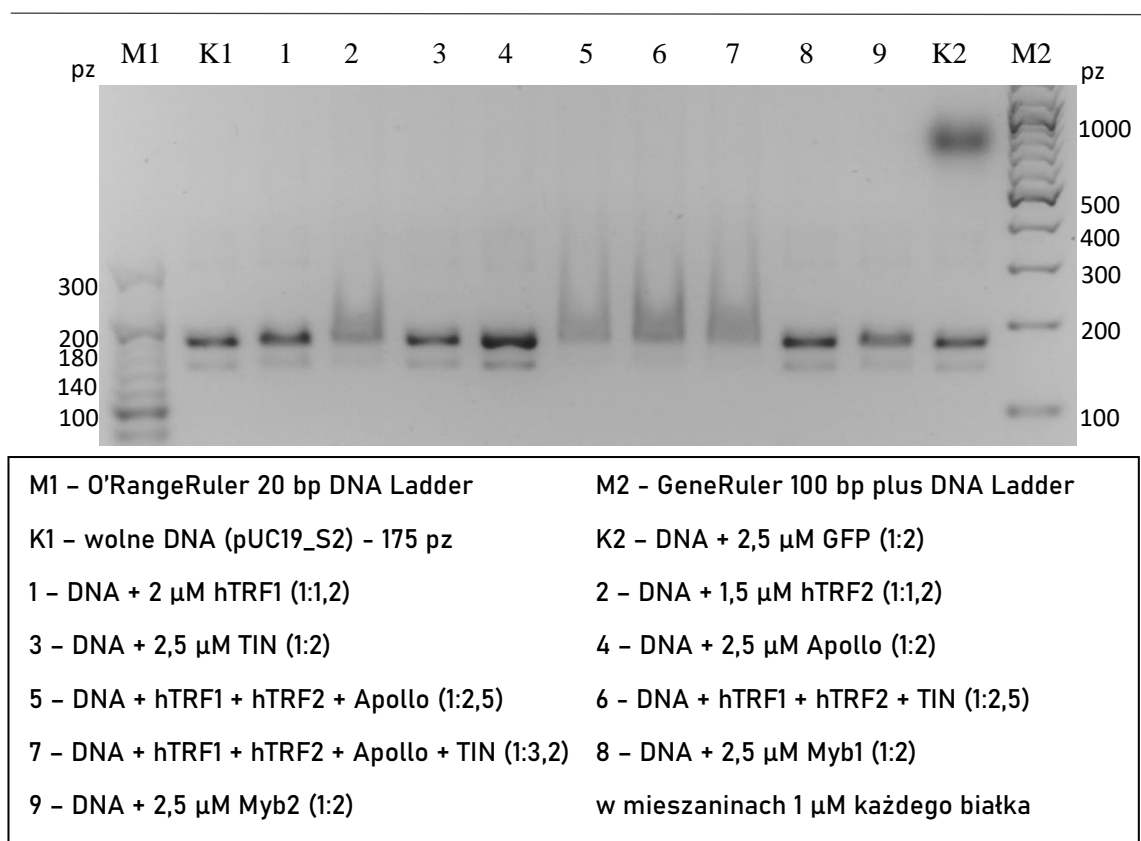
Kolejne reakcje postanowiono rozdzielić równoległe za pomocą elektroforezy natywnej DNA w żelu poliakryloamidowym [Mat. i Met. 4.17.], która jest częściej stosowana w tej technice. Użyto też mniejszego fragmentu DNA, uzyskanego na drodze reakcji PCR (Tab. 27.). Sprawdzone również, czy otrzymane peptydy TIN i Apollo (Tab. 28.) będą zwiększać powinowactwo rekombinantowych białek Shelterin (Tab. 21.) do telomerowego dsDNA (Tab. 27.). Ilość komponentów do złożenia reakcji obliczano w sposób analogiczny jak dla reakcji kontrolnej, używając tego samego buforu kompleksującego [20 nM Tris-HCl pH 8,0, 100 nM NaCl, 50 nM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% Glicerol (v/v), BSA 0,1% (v/v), 0,1% Triton X-100 (v/v)]. Próbkę białko-bufor, DNA-bufor inkubowano osobno w 4°C przez 30 min. Następnie próbki łączono w całość i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 60 min. Połowę reakcji rozdzielano w 6% żelu poliakryloamidowym [Mat. i Met. 4.17.], a pozostałą połowę w 2,5% żelu agarozowym [Mat. i Met. 4.16.]. Żele barwiono bromkiem etydyny i fotografowano na transiluminatorze UV. Wyniki rozdzielów przedstawiono na rycinach 28 i 29.



M1 - O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder	M2 - GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder
K1 - wolne DNA (pUC19_s2) - 175 pz	K2 - DNA + 2,5 μM GFP
1 - DNA + 2 μM hTRF1 (1:1,6)	2 - DNA + 1,5 μM hTRF2 (1:1,2)
3 - DNA + 2,5 μM TIN (1:2)	4 - DNA + 2,5 μM Apollo (1:2)
5 - DNA + hTRF1 + hTRF2 + Apollo (1:2,5)	6 - DNA + hTRF1 + hTRF2 + TIN (1:2,5)
7 - DNA + hTRF1 + hTRF2 + Apollo + TIN (1:3,2)	8 - DNA + 2,5 μM Myb1 (1:2)
9 - DNA + 2,5 μM Myb2 (1:2)	w mieszaninach 1 μM każdego białka

Ryc. 28. Wynik rozdziłu elektroforetycznego w 6% żelu poliakryloamidowym (PAGE) ($1 \times$ TBE) kompleksów białko-DNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 2 miejsca telomerowe). A) Żel fotografowany w kolorze. B) Żel fotografowany monochromatycznie. W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka/mieszanki białek.

Przedstawiony rozdział liniowego fragmentu plazmidowego dsDNA pUC19_s2, zawierającego 2 powtórzenia telomerowe (Tab. 27.) poddanego reakcji kompleksowania z różnymi białkami kompleksu Shelterin (Tab. 21.) ponownie świadczy o interakcji pomiędzy nimi (Ryc. 28.). W porównaniu do wolnego dsDNA (Ryc. 28, ścieżka K), opóźnienie migracji dsDNA po związaniu z białkiem obserwuje się dla białek: hTRF1 (Ryc. 28., ścieżka nr 1), Myb1 (Ryc. 28., ścieżka nr 8) i Myb2 (Ryc. 28., ścieżka nr 9). W przypadku próbek dsDNA inkubowanych z białkiem hTRF2 (Ryc. 28., ścieżka nr 2) oraz poszczególnymi mieszaninami (Ryc. 28., ścieżki nr 5-8) większość DNA obserwowana jest w studzienkach żelu. Możliwe, że duża liczba białek związanych z dsDNA uniemożliwiła mu wejście w głąb żelu, przez co nie da się jednoznacznie określić poziomu oddziaływania. Otrzymany wynik uniemożliwia również określenie wpływu peptydów TIN i Apollo na poprawę oddziaływań białek kompleksu Shelterin z dsDNA. Osobno peptydy TIN (Ryc. 28., ścieżka nr 3) i Apollo (Ryc. 28., ścieżka nr 4) oraz kontrolnie użyte białko GFP (Ryc. 28., ścieżka K2) nie wykazują oddziaływania z telomerowym dsDNA, co jest zgodne z literaturą. Właściwości fluorescencyjne GFP umożliwiły jego wizualizację, która dodatkowo świadczy o tym, że białko to migruje w żelu niezależnie od dsDNA (Ryc. 28., ścieżka K2), co stanowi dodatkową kontrolę negatywną przy pomiarach oddziaływań dla białek kompleksu Shelterin.

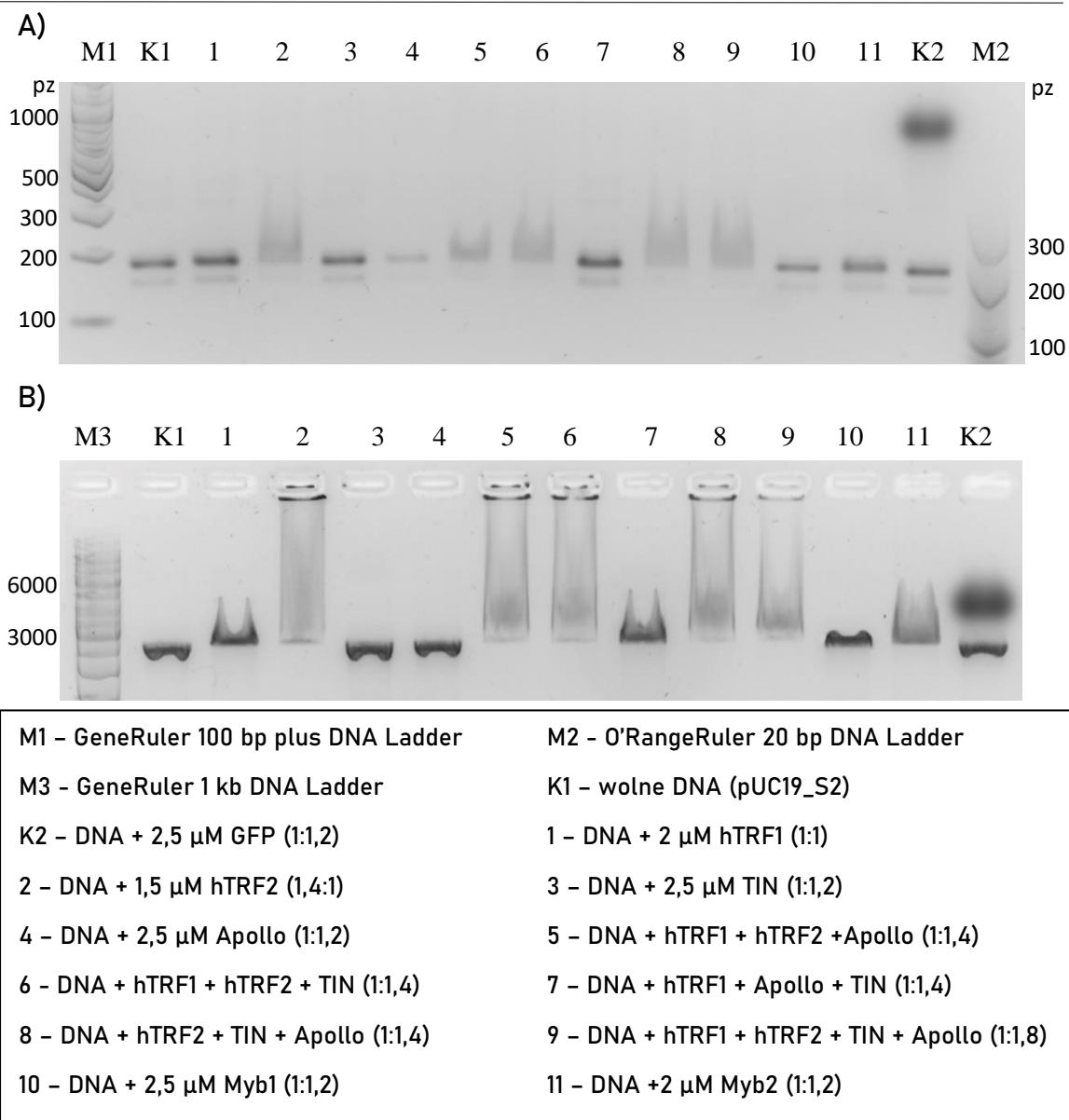


Ryc. 29. Wynik rozdziálu elektroforetycznego w 2,5% żelu agarozowym ($0,5 \times$ TBE) kompleksów białko-DNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 2 miejsca telomerowe). W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka/mieszaniny białek.

Rozdział drugiej połowy przeprowadzonych reakcji wykonany w żelu agarozowym [Mat. i Met. 4.16.] świadczy o różnicy w intensywności opóźnienia migracji dsDNA w zależności od rodzaju użytego żelu. W porównaniu do wolnego dsDNA (Ryc. 29., ścieżka K1), opóźnienie migracji dsDNA po związaniu z białkiem obserwuje się dla białka hTRF2 (Ryc. 29., ścieżka nr 2) oraz poszczególnych mieszanin, które w przypadku rozdziálu w żelu poliakryloamidowym pozostały w większości w studzienkach (Ryc. 29., ścieżki nr 5-8). Wpływ peptydów TIN (Ryc. 29., ścieżki nr 6, 7) i Apollo (Ryc. 29., ścieżki nr 5, 7) na poprawę oddziaływań białek telomerowych z dsDNA jest znikomy. Opóźnienie migracji i rozciągnięcie prążka dsDNA w tych ścieżkach jest porównywalne z próbką dla inkubacji dsDNA wyłącznie z białkiem hTRF2 (Ryc. 29., ścieżka nr 2). Oba wykonane rozdziály (Ryc. 28., 29.) świadczą o oddziaływaniu otrzymanych białek kompleksu Shelterin hTRF1 i hTRF2 (Tab. 21.) oraz ich domen wiążących Myb1 i Myb2 (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.).

Tworzenie kompleksów przez rekombinantowe białka z kompleksu Shelterin hTRF1 i hTRF2 w połączeniu z peptydami TIN i Apollo z użyciem różnej wielkości DNA zawierającego 2 powtórzenia telomerowe

W wyniku poprzednich analiz nie uzyskano jasnej odpowiedzi na temat możliwości zwiększania oddziaływania rekombinantowych białek Shelterin (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) po związaniu z wybranymi peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.). Kolejne reakcje kompleksowania mieszaniny białek Shelterin postanowiono rozdzielić za pomocą elektroforezy agarozowej [Mat. i Met. 4.16.], która dała lepsze rezultaty w poprzedniej próbie (Ryc. 27.). Ustawiono 2 analogiczne reakcje z taką samą ilością białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.), ale przy zastosowaniu różnych fragmentów dsDNA (Tab. 27.). Użyto mniejszego fragmentu DNA, uzyskanego na drodze reakcji PCR oraz liniowego plazmidu pUC19_s2, w obu przypadkach zawierających 2 powtórzenia telomerowe. Analogicznie do pozostałych przygotowanych reakcji użyto tego samego buforu kompleksującego. Próbkę białko-bufor, dsDNA-bufor inkubowano osobno w 4°C przez 30 min, po czym próbki łączono w całość i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 60 min. Reakcje w zależności od użytego dsDNA rozdzielano odpowiednio w 0,7 i 2,5% żelu agarozowym [Mat. i Met. 4.16.]. Żele barwiono bromkiem etydyny i fotografowano na transiluminatorze UV. Wyniki rozdziałów przedstawiono na rycinie 30.



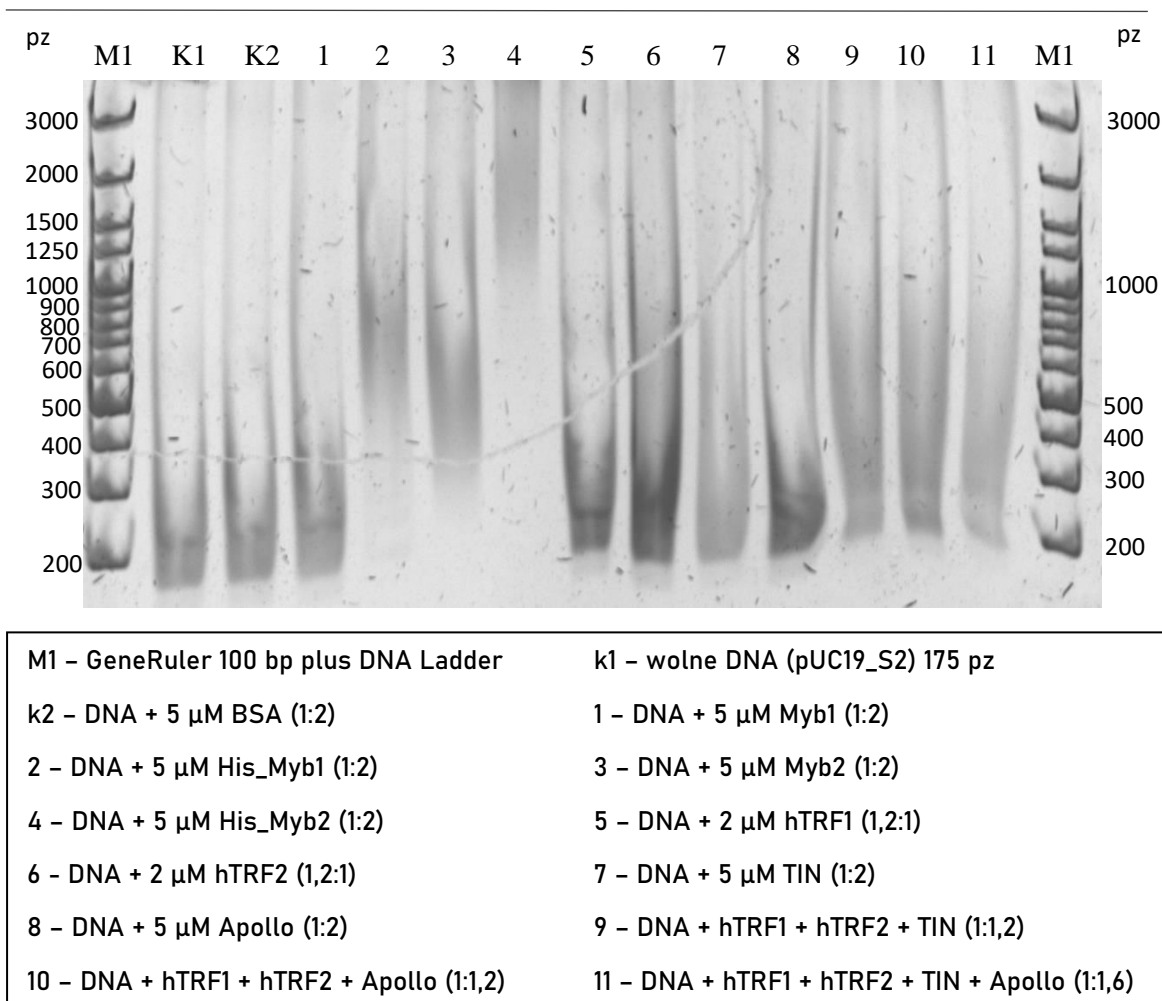
Ryc. 30. Wynik rozdzielania kompleksów białko-DNA z użyciem elektroforezy agarozowej ($0,5 \times$ TBE). A) Rozdział kompleksów białko-pUC19_s2 (175 pz, 2 powtórzenia telomerowe) w 2,5% żelu. B) Rozdział kompleksów białko-pUC19_s2 (2724 pz, 2 powtórzenia telomerowe) w 0,7% żelu. W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka/mieszanki białek.

Uzyskane wyniki z rozdzielania przeprowadzonych reakcji kompleksowania różnych wielkości dsDNA (Tab. 27.) przez rekombinantowe białka kompleksu Shelterin (Tab. 21.) zaprzeczają właściwościom zwiększającym omawiane oddziaływanie przez peptydy TIN i Apollo (Tab. 28.). W porównaniu do rozdzielania dsDNA związanego wyłącznie z pojedynczymi białkami hTRF1 (Ryc. 30, ścieżka nr 1) i hTRF2 (Ryc. 30, ścieżka nr 2), nie obserwuje się zwiększenia opóźnienia migracji dsDNA po związaniu z mieszaniną białek zawierających dane peptydy (Ryc. 30, ścieżki nr 5-9).

Największą interakcję z telomerowym dsDNA obserwuje się w kolejności malejącej dla białka: hTRF2 (Ryc. 30, ścieżka nr 2), Myb2 (Ryc. 30, ścieżka nr 11), hTRF1 (Ryc. 30, ścieżka nr 1) i Myb1 (Ryc. 30, ścieżka nr 10). Rozdział analogicznie przeprowadzonych reakcji w żelach agarozowych świadczy również o różnicy w intensywności opóźnienia migracji dsDNA w zależności od jego wielkości. Przyczyną tego może być opisana w podrozdziale W. T. 3.3. możliwość wiązania się białek kompleksu Shelterin do nietelomerowego DNA. Białka kompleksu Shelterin odnajdują docelowe telomerowe miejsca wiązania w wyniku przeszukiwania sekwencji wzdłuż nietelomerowego dsDNA. W krótkim fragmencie dsDNA (175 pz) prawdopodobieństwo znalezienia sekwencji składającej się z 2 powtórzeń telomerowych, jest dużo większe, niż w liniowym plazmidowym dsDNA (2724 pz). Zwiększone oddziaływania z dłuższym fragmentem dsDNA może wynikać z dodatkowych „niepożądanych” interakcji dsDNA po związaniu się białek Shelterin (Tab. 21.) z nietelomerowym fragmentem dsDNA.

Analiza tworzenia kompleksów przez rekombinantowe białka z kompleksu Shelterin hTRF1 i hTRF2 oraz ich domeny wiążące Myb1 i Myb2 z nietelomerowym DNA

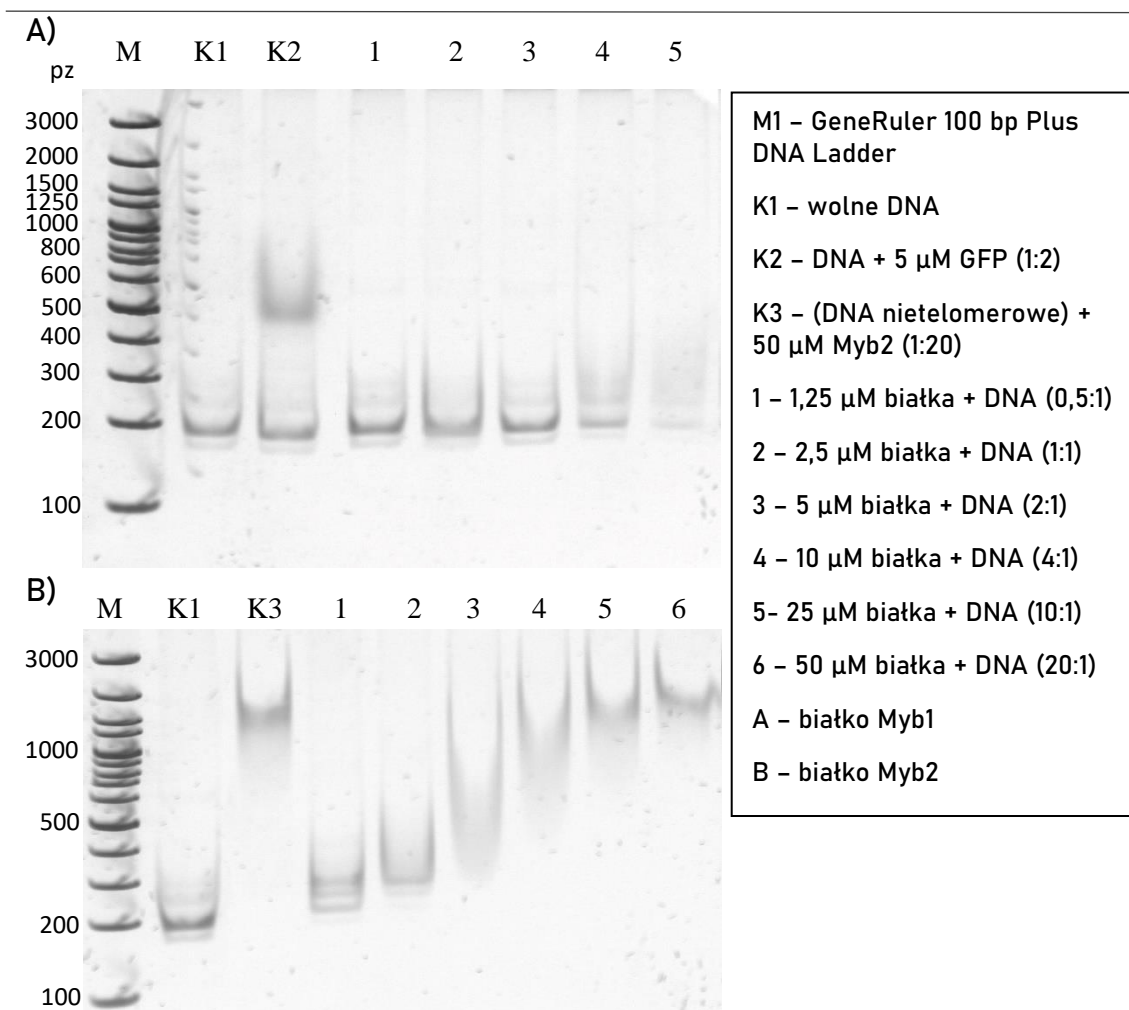
Analiza dotychczasowych wyników zwróciła uwagę na możliwość wiązania się białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z nietelomerowym dsDNA (Tab. 27.). Postanowiono przeprowadzić próby sprawdzające intensywność omawianych „niepożądanych” oddziaływań przez uzyskane białka z kompleksu Shelterin (Tab. 21.). Unikanie wysokiego oddziaływania niespecyficznego realizowano przez zmianę buforu kompleksującego na mniej wzbogacony [20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol]. Sprawdzano również czy zmiana buforu umożliwi lepszą analizę próbek po inkubacji z pełnymi wariantami hTRF1 i hTRF2 po połączeniu z peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.). Docelową analizę rozpoczęto od przeprowadzenia drugiej reakcji kontrolnej w ustalonych warunkach. Reakcje kompleksowania składano przy użyciu fragmentu dsDNA uzyskanego w reakcji PCR, pUC19_s2 (175 pz) (Tab 27.). Próbkę białko-bufor, DNA-bufor inkubowano osobno w 4°C przez 30 min, następnie łączono je w całość i inkubowano w tych samych warunkach przez 30 min. Końcową inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez kolejne 30 min. Reakcje ponownie rozdzielano klasycznie w żelu poliakrylamidowym [Mat. i Met. 4.17.]. Wynik rozdziałów przedstawiono na rycinie 31.



Ryc. 31. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 6% żelu poliakryloamidowym (PAGE) ($0,5 \times$ TBE) kompleksów białko-DNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 2 powtórzenia telomerowe). W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka/mieszanki białek.

Uzyskany wynik z rozdziału reakcji kompleksowania fragmentu dsDNA 175 pz (Tab. 27.) przez rekombinantowe białka Shelterin (Tab. 21.) świadczy o najlepszym oddziaływaniu domen wiążących Myb1 (Ryc. 31., ścieżka nr 1) i Myb2 (Ryc. 31., ścieżka nr 3) w zastosowanych warunkach reakcji. Ponownie potwierdzono, że etykieta His nie przeszkadza w oddziaływaniach białek His_Myb1 (Ryc. 31., ścieżka nr 2) i His_Myb2 (Ryc. 30., ścieżka nr 4) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.). Pełne warianty białek hTRF1 (Ryc. 30., ścieżka nr 5), hTRF2 (Ryc. 30., ścieżka nr 6) zarówno osobno jak i w połączeniu z peptydami TIN i Apollo (Ryc. 30., ścieżki nr 9-11) nie wykazały oddziaływania z telomerowym dsDNA w przedstawionych warunkach reakcji. Do oszacowania poziomu niespecyficznego oddziaływania rekombinantowych białek z kompleksu Shelterin (Tab.21.) z nietelomerowym dsDNA (Tab. 27.) wstępnie wybrano

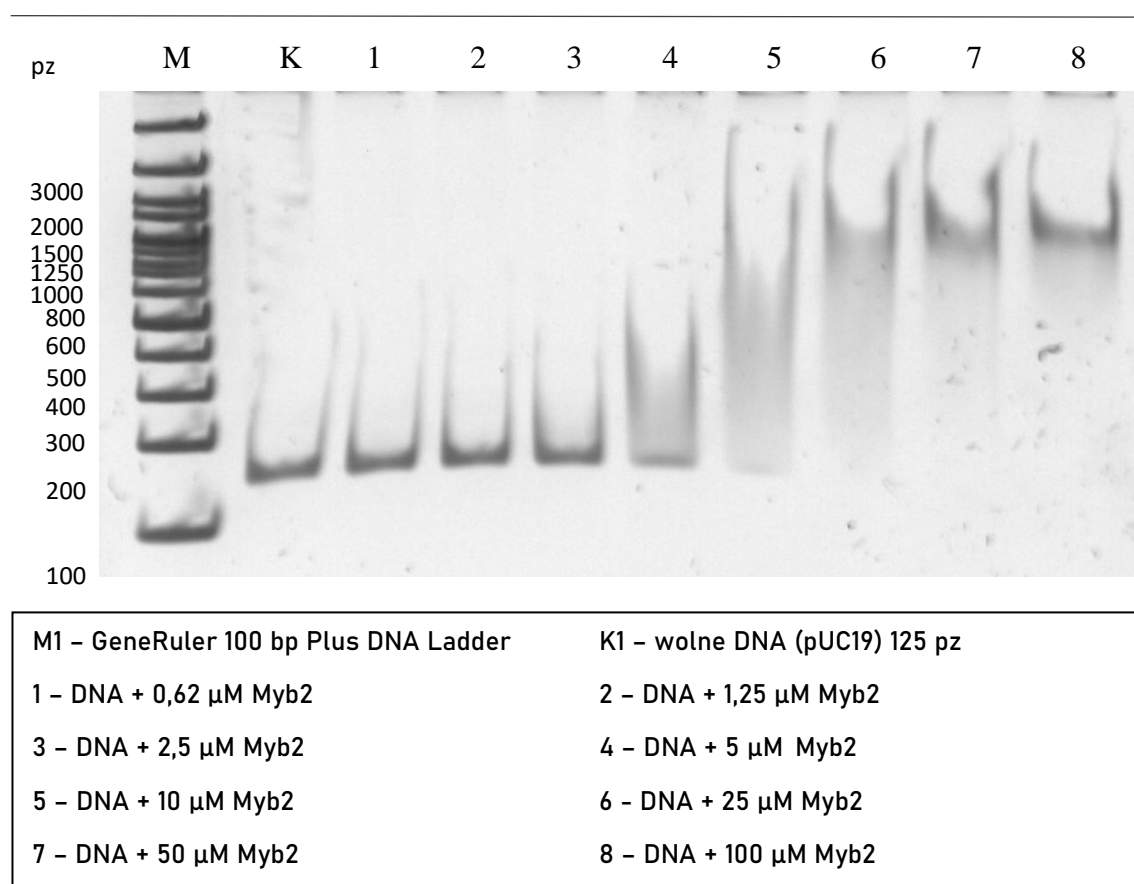
domeny wiążące Myb1 i Myb2 (Tab. 21.). Kolejne reakcje sprawdzające te niespecyficzne oddziaływania postanowiono sprawdzić za pomocą miareczkowania ilości wymienionych białek stosując dodatkową kontrolę – fragment DNA pUC19 (137 pz) nie posiadający powtórzeń telomerowych (Tab. 27.). W tym celu składano reakcje we wcześniej ustalonych warunkach. Reakcje kompleksowania z różną ilością rekombinantowych białek Myb1 i Myb2 ponownie składano przy użyciu fragmentu DNA uzyskanego w reakcji PCR, pUC19_s2 (175 pz), przy kontroli - fragmencie plazmidu pUC19 (137 pz) również uzyskanym w reakcji PCR. Próbkę białko-bufor, DNA-bufor inkubowano osobno w 4°C przez 30 min, następnie łączono je w całość i inkubowano w tych samych warunkach przez 30 min. Końcową inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez kolejne 30 min. Reakcje rozdzielano w 6% żelu poliakryloamidowym [Mat. i Met. 4.17.]. Wynik rozdziałów przedstawiono na rycinie 32.



Ryc. 32. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 6% żelu poliakrylamidowym (PAGE) (0,5 × TBE) kompleksów białko-DNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 2 powtórzenia telomerowe. A) Miareczkowanie ilości Myb1. B) Miareczkowanie ilości Myb2. W nawiasach () zaznaczono stosunek molowy powtórzeń telomerowych do danego białka/mieszanki białek.

Uzyskane wyniki z rozdzielów reakcji kompleksowania fragmentu dsDNA 175 pz, zawierającego 2 powtórzenia telomerowe (Tab. 27.) przez różne ilości domen wiążących Myb1 i Myb2 (Tab. 21.) świadczą o najsilniejszym oddziaływaniu z dsDNA przez białko Myb2 (Ryc. 32., B). Rozdział różnych ilości białka pozwolił na zobrazowanie zmiany intensywności opóźnienia migracji DNA w żelu w zależności od użytego stężenia białka. Użycie fragmentu DNA pUC19 (137 pz) niezawierającego powtórzeń telomerowych (Tab. 27.) jednoznacznie potwierdza właściwości wiązania rekombinowanych białek kompleksu Shelterin do nietelomerowego dsDNA. Rozdział dsDNA nietelomerowego po inkubacji z 50 μ M białkiem Myb2 (Ryc. 32., ścieżka K3), nie różni się od próbki dsDNA zawierającego 2 powtórzenia telomerowe po inkubacji

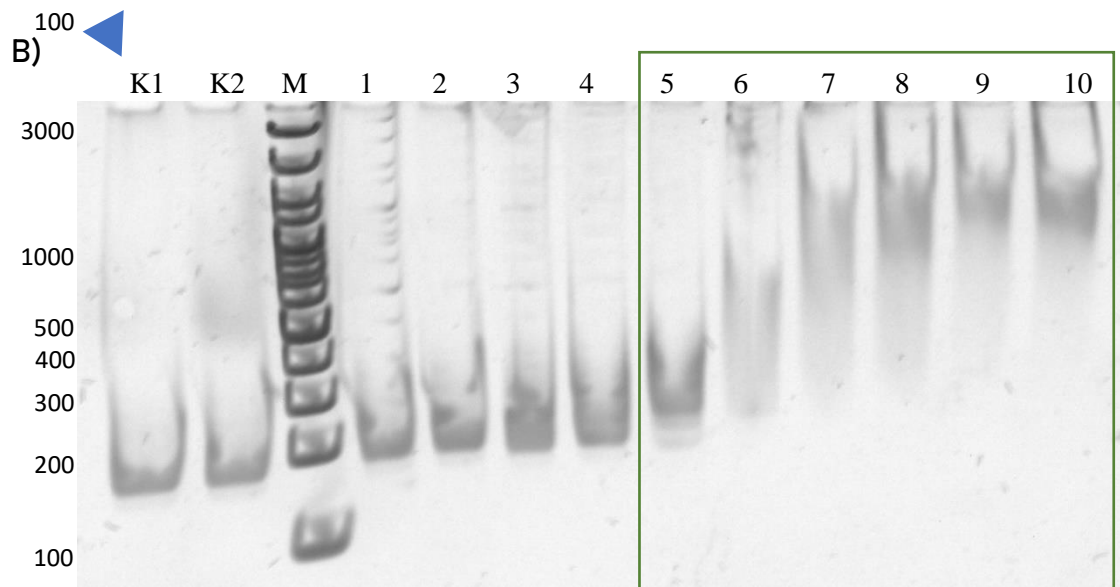
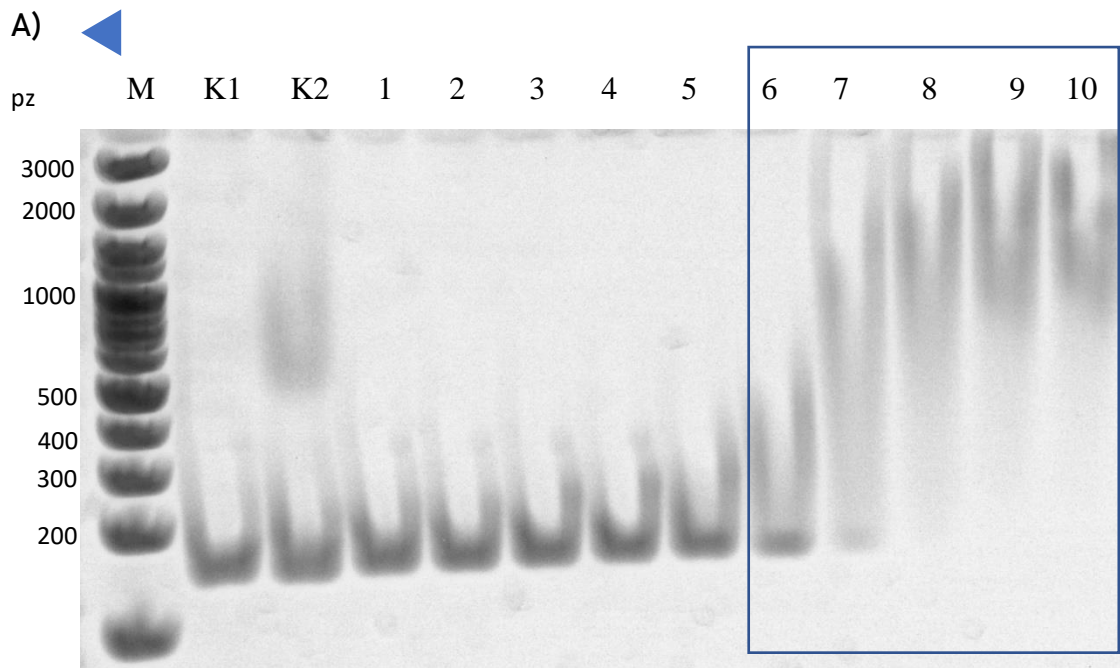
z białkiem Myb2 o takim samym stężeniu (Ryc. 32., ścieżka nr 6). Dalsze oszacowanie poziomu niepożądanego oddziaływania rekombinantowych białek telomerowych z nietelomerowym dsDNA postanowiono wykonać poprzez miareczkowanie ilości białka Myb2 (Tab. 21.) z nietelomerowym dsDNA (Tab. 27.). W tym celu składano reakcje z różną ilością białka Myb2 przy użyciu fragmentu plazmidu pUC19 z reakcji PCR (137 pz). Próbkę białko-bufor, DNA-bufor inkubowano osobno w 4°C przez 30 min, następnie łączono je w całość i inkubowano w tych samych warunkach przez 30 min. Końcową inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez kolejne 30 min. Reakcje rozdzielano w 6% żelu poliakryloamidowym [Mat. i Met. 4.17.]. Wynik rozdzielania przedstawiono na rycinie 33.



Ryc. 33. Wynik rozdzielania elektroforetycznego w 6% żelu poliakryloamidowym (PAGE) (0,5 × TBE) kompleksów Myb2-DNA (fragment pUC19_s2, 137 pz, 0 powtórzeń telomerowych).

Uzyskany wynik z rozdzielania reakcji kompleksowania fragmentu dsDNA 137 pz, niezawierającego powtórzeń telomerowych (Tab. 27.) przez różne ilości białka Myb2 (Tab. 21.) świadczą o nieco słabszym oddziaływaniu białka Myb2 z nietelomerowym

dsDNA. Opóźnienie migracji telomerowego dsDNA po inkubacji z białkiem Myb2 obserwowane jest już od stężenia 2,5 μM (Ryc. 32., ścieżka nr 2), przy czym wyraźnie widoczne jest przy 5 μM (Ryc. 32., ścieżka nr 2). Natomiast lekkie opóźnienie migracji nietelomerowego dsDNA po związaniu z białkiem Myb2 widoczne jest dopiero przy stężeniu 5 μM (Ryc. 33., ścieżka nr 4). Pełne potwierdzenie silniejszego oddziaływania białek z kompleksu Shelterin do telomerowego dsDNA postanowiono uzyskać za pomocą reakcji kompleksowania przy zwiększającej się sile jonowej. W tym celu przeprowadzono reakcje kompleksowania telomerowego i nietelomerowego dsDNA z 10 μM białka Myb2 w buforze kompleksującym ze zwiększającym się stężeniem soli (NaCl, 100 – 600 mM). Stężenie białka Myb2 wybrano uwzględniając równe opóźnienie migracji telomerowego i nietelomerowego dsDNA w żelu poliakryloamidowym (Ryc. 32., ścieżka nr 4, Ryc. 33., ścieżka nr 5). Wynik rozdziałów przedstawiono na rycinie 34.



M1 - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	K1 - wolne DNA pUC19/pUC19_S2
1 - 600 mM NaCl	2 - 500 mM NaCl
3 - 450 mM NaCl	4 - 400 mM NaCl
5 - 350 mM NaCl	6 - 300 mM NaCl
7 - 250 mM NaCl	8 - 200 mM NaCl
9 - 150 mM NaCl	10 - 100 mM NaCl

Ryc. 34. Wynik rozdzielania elektroforetycznego w 6% żelu poliakryloamidowym (PAGE) (0,5 × TBE) kompleksów Myb2-DNA. A) Kompleks Myb2-nietelomerowe dsDNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 0 powtórzeń telomerowych). B) Kompleks Myb2-telomerowe DNA dsDNA (fragment pUC19, 137 pz, 2 powtórzenia telomerowe). Niebieskie trójkąty oznaczają kierunek wzrostu stężenia soli NaCl. Niebieską ramką oznaczono zakres stężenia NaCl, na które kompleks Myb2-telomerowe dsDNA jest odporny, zieloną ramką oznaczono zakres stężenia NaCl, na które kompleks Myb2-nietelomerowe dsDNA jest odporny.

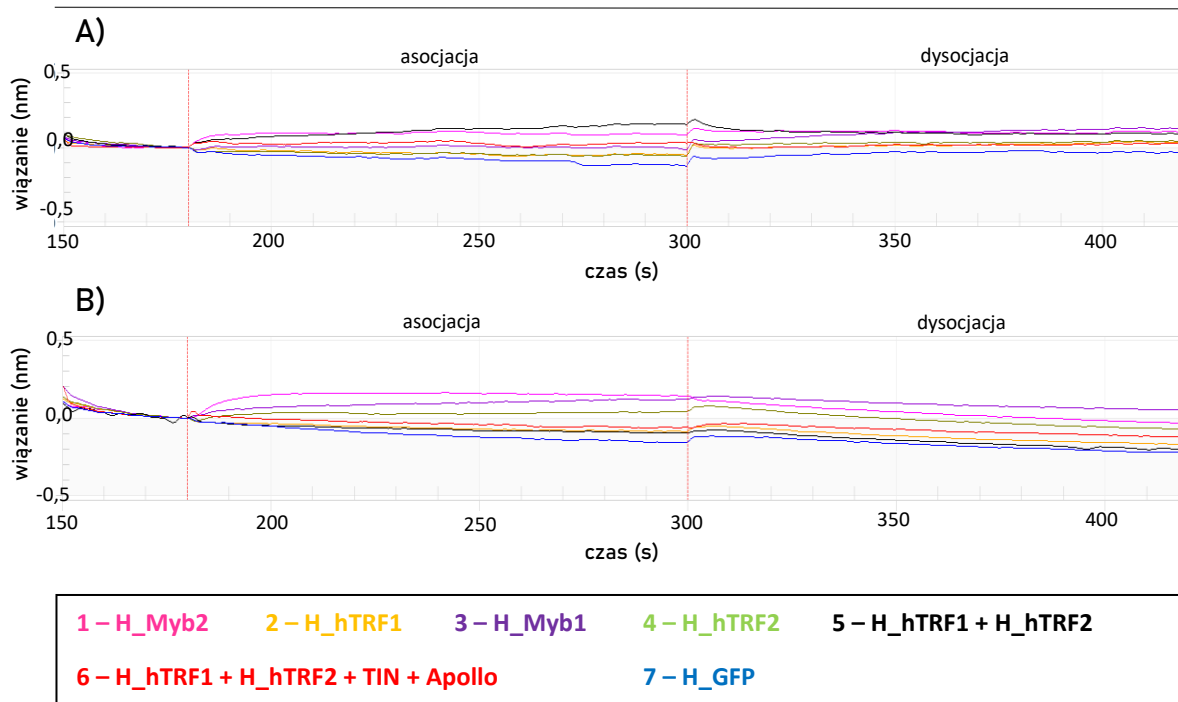
Uzyskane wyniki z rozdziałów reakcji kompleksowania 10 μ M Myb2 (Tab. 21.), zarówno z telomerowym i nietelomerowym dsDNA (Tab. 27.) w obecności różnego stężenia soli świadczą o silniejszym oddziaływaniu białka Myb2 (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.). Opóźnienie migracji telomerowego dsDNA po inkubacji z białkiem Myb2 obserwowane jest dla stężenia 350 mM NaCl (Ryc. 34., A, ścieżka nr 6, zielona ramka) przy czym bardzo wyraźne widoczne jest również przy 300 mM (Ryc. 34., A, ścieżka nr 7, zielona ramka) W przypadku oddziaływania z nietelomerowym DNA bardzo nieznaczne opóźnienie migracji DNA widoczne jest dla 300 mM NaCl (Ryc. 34., B, ścieżka nr 5, niebieska ramka), lecz wyraźnie obserwowane jest dopiero przy 250 mM NaCl (Ryc. 34., B, ścieżka nr 6, niebieska ramka). Jest to zgodne z przedstawioną we wstępie teoretycznym literaturą [W. T. 3.3.], która podkreśla większą odporność na wysoką siłę jonową dla oddziaływań białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA (Erdel i in. 2017; de Lange 2018).

5.3.2. Pomiar oddziaływań pomiędzy białkami z ludzkiego kompleksu Shelterin i telomerowym dsDNA wykonany przy użyciu technologii BLItz

Pomiar interakcji białko-DNA z wykorzystaniem technologii BLItz [Mat. i Met. 4.28.2] opierał się na immobilizowaniu białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) zawierających etykietę His do selektywnego biosensora HIS1K [Mat. i Met. 4.28.2.]. Pomiar polegał na obserwacji zmian wiązania w czasie rzeczywistym w etapach asocjacji i dysocjacji po przyłożeniu telomerowego dsDNA (Tab. 27.) w układzie pomiarowym bisensor_HIS1K_białko_Shelterin_telomerowe_dsDNA. Pierwsze próby polegały na optymalizacji ładowania biosensora przy pomocy białka znakowanego etykietą His. Rozpoczynano z zalecaniami producenta od 10 μ g/ml. Ustalono, że na optymalne wiązanie rekombinantowych białek Shelterin His_hTRF1, His_hTRF2 oraz ich domen wiążących His_Myb1 i His_Myb2 do biosensora HIS1K potrzeba odpowiednio 20 i 25 μ g/ml. Zakres wiązania wynosił około 0,6 – 1 nm (dla wybranego biosensora wiązanie na poziomie 1 nm to maksimum dla jego pojemności). Dla większej czytelności, otrzymane wyniki przedstawiano tylko dla etapów asocjacji i dysocjacji (ekstrapolując pojedyncze pomiary dla startu asocjacji w miejscu zerowym).

Pomiar interakcji rekombinantowych białek His_Myb1, His_Myb2, His_hTRF1 i His_hTRF2 z fragmentem DNA pUC19_s2 (175 pz), zawierającym 2 powtórzenia telomerowe

Pierwsze pomiary interakcji białko-DNA z wykorzystaniem technologii BLItz [Mat. i Met. 4.28.2] zostały wykonane dla wszystkich uzyskanych białek kompleksu Shelterin zawierających etykietę His (Tab.21.) oraz ich połączeń z peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.) (analogicznie ja dla testu EMSA [Wyn. i Dys. 5.3.1.]). Do pomiarów używano telomerowego dsDNA (Tab. 27.), fragmentu plazmidowego DNA pUC19 (175 pz), zawierającego 2 powtórzenia telomerowe, przy kontroli z fragmentem plazmidowego DNA pUC19 (137 pz), niezawierającego powtórzeń telomerowych. Pomiar niezaladowanego sensora (pomiar zerowy) nie wykazał niespecyficznego oddziaływania użytego dsDNA z warstwą biosensora, pozwalając na kontynuowanie pomiarów. Wynik oddziaływania białko-DNA przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 35.).



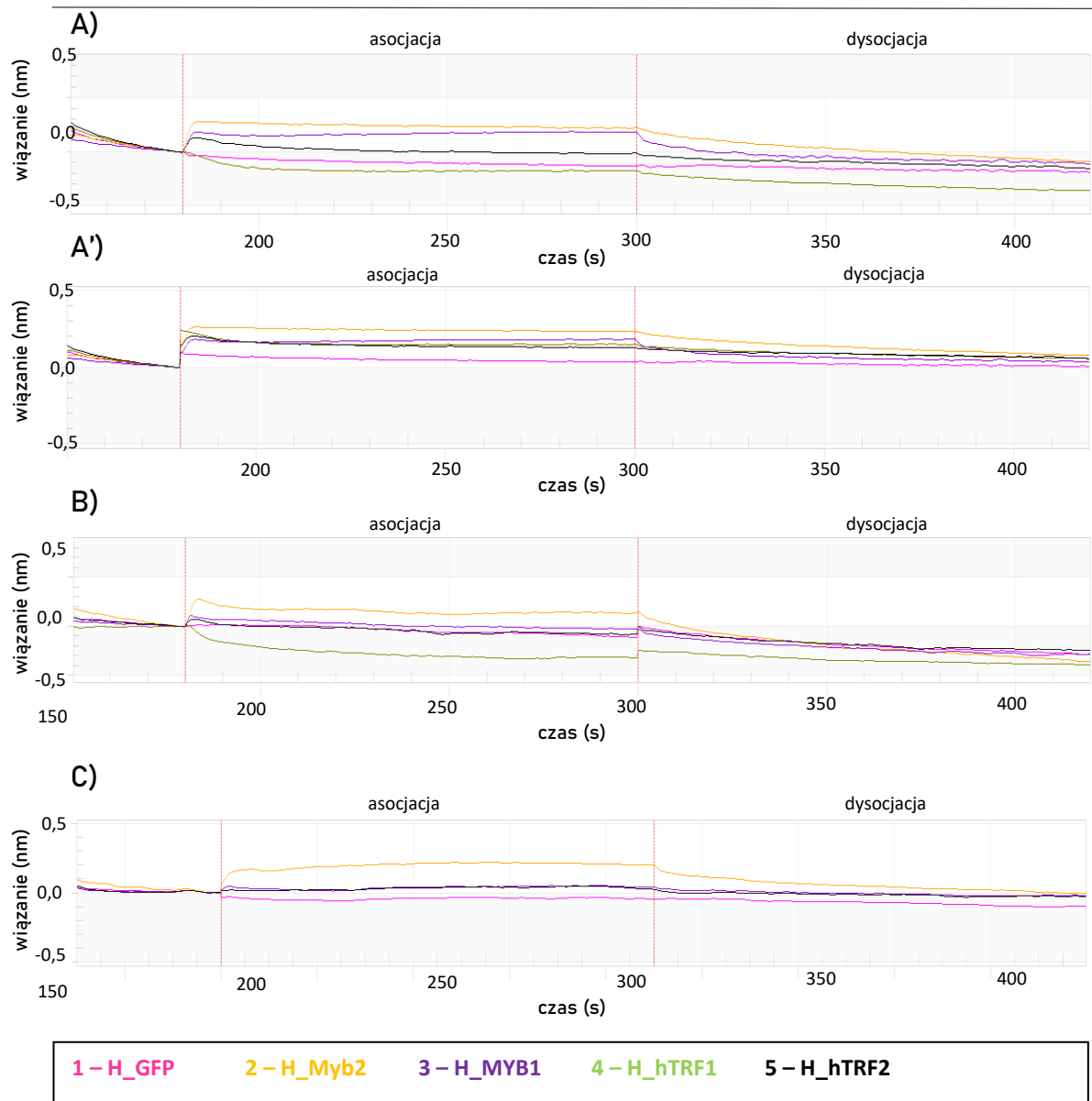
Ryc. 35. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów HIS1K-białko(1-7)_dsDNA wykonany za pomocą technologii BLItz. A) Pomiar oddziaływania białek kompleksu Shelterin z nietelomerowym dsDNA (fragment pUC19, 137 pz, 0 powtórzeń telomerowych). B) Pomiar oddziaływania białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA (fragment pUC19_s2, 175 pz, 2 powtórzenia telomerowe). Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom białek oznaczonych w legendzie.

Analizę wyników z pomiarów oddziaływań białko-DNA przy użyciu krótkich fragmentów dsDNA rozpatrywano całościowo (Ryc. 35.). Inaczej mówiąc, nie sugerowano się wynikami pojedynczych pomiarów. Spowodowane jest to minimalnie widocznym oddziaływaniem białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z wybranym telomerowym dsDNA (Tab. 27.). Może wynikać to z faktu, że w pomiarach oddziaływań za pomocą technologii BLItz [Mat. i Met. 4.28.1.] najlepsze rezultaty uzyskiwane są w przypadkach, kiedy ligand jest większy od immobilizowanej cząsteczki. Zgodnie z zasadami pomiaru, większe cząsteczki powodują znaczne różnice w warstwie biologicznej na powierzchni biosensora, ułatwiając detekcję w różnicy odbitych fal. W przedstawionej analizie większe wartości wiązania się dsDNA do poszczególnych białek kompleksu Shelterin załadowanych na biosensor obserwowane są dla telomerowego dsDNA. W etapie asocjacji wiązanie jest nieznacznie większe, natomiast w procesie dysocjacji obserwuje się powolniejszy i bardziej łagodny spadek wiązania, świadcząc o mocniejszym oddziaływaniu w porównaniu do pomiarów z nietelomerowym dsDNA. Zastosowana kontrola w postaci immobilizowania białka His_GFP (Ryc. 35., pomiar nr 7) potwierdza selektywność wiązania dsDNA przez uzyskane rekombinantowe białka z kompleksu Shelterin. Białko His_GFP (Ryc. 35., A, B, pomiar nr 7) w obu próbach nie wykazywało wiązania do dsDNA. Dalszy test postanowiono przeprowadzić przy pomocy liniowych form plazmidowych dsDNA (Tab. 27.) ze względu na ich większy rozmiar. Pominięto próby immobilizowania mieszaniny białek z wybranymi peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.) ze względu na ich znaczne ograniczenie w ładowaniu się do biosensora w porównaniu do pojedynczych białek.

Pomiar interakcji rekombinantowych białek His_Myb1, His_Myb2, His_hTRF1 i His_hTRF2 z liniowymi DNA plazmidowymi pUC19_s2 (2724 pz) oraz pENTR TERRA (3464 pz) zawierających odpowiednio 2 i 126 powtórzeń telomerowych

Pomiary interakcji białko-DNA z wykorzystaniem liniowych plazmidowych dsDNA (Tab. 27.) zostały wykonane dla wszystkich uzyskanych białek kompleksu Shelterin zawierających etykietę His (Tab. 21.). Do pomiarów użyto dwóch wariantów telomerowego dsDNA, plazmidowego DNA pUC19 (2724 pz) oraz pENTR TERRA (3464 pz), zawierających odpowiednio 2 i 126 powtórzeń telomerowych, przy kontroli z plazmidowym DNA pUC19 (2686 pz), niezawierającym powtórzeń telomerowych. Pomiar niezaladowanego sensora (pomiar zerowy) nie wykazał niespecyficznego oddziaływania użytego dsDNA z matrycą biosensora, pozwalając na kontynuowanie

pomiarów. Wynik oddziaływania białko-DNA przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 36.).



Ryc. 36. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów HIS1K-białko(1-5)_dsDNA wykonany za pomocą technologii BLItz. A) Pomiar oddziaływania białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA (pENTR TERRA, 3464 pz, 126 powtórzeń telomerowych). A') Pomiar bez ekstrapolowania równego startu asocjacji. B) Pomiar oddziaływania białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA (pUC19_s2, 2724 pz, 2 powtórzenia telomerowe). C) Pomiar oddziaływania białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA (pUC19, 2686 pz, 0 powtórzeń telomerowych). Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom białek oznaczonych w legendzie.

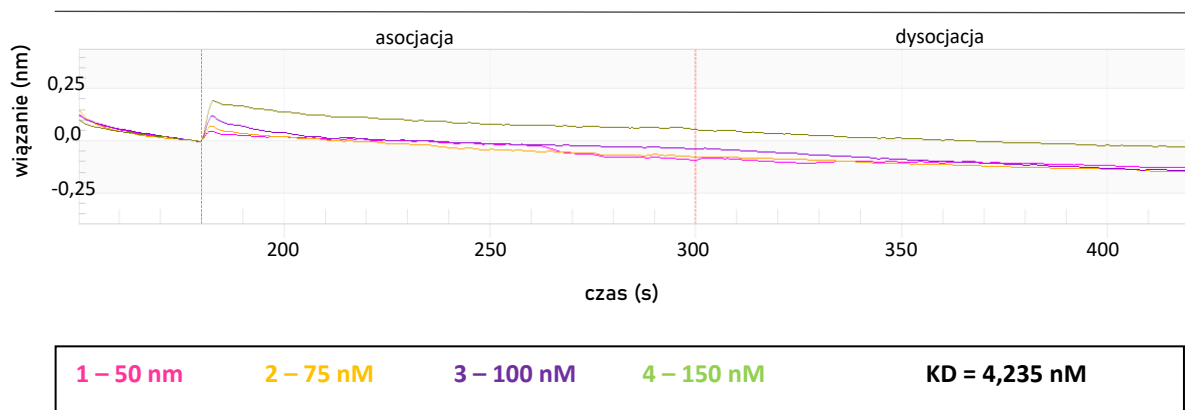
Analizę wyników z pomiarów oddziaływań białko-DNA przy użyciu plazmidowych dsDNA (Tab. 27.) rozpatrywano zarówno całościowo i jednostkowo, dla pojedynczego pomiaru. Obserwowane całościowo oddziaływanie rekombinantowych

białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Ryc. 36., A i B) jest silniejsze w porównaniu w nietelomerowym dsDNA (Ryc. 36., C). W wyniku oddziaływań dla telomerowego dsDNA (Ryc. 36. A i B) przebieg pomiaru asocjacji odzwierciedla szybkie tempo asocjacji użytego dsDNA (szybki przyrost wiązania na samym początku i wyrównanie lub nawet jego spadek w późniejszym etapie). Przebieg pomiaru dysocjacji odzwierciedla wolne tempo dysocjacji przyłożonego dsDNA (łagodny spadek wiązania). Wyniki te potwierdzają obserwacje oddziaływań *in vitro* białek telomerowych opisanych w literaturze (Erdel i in. 2017; de Lange 2018). Użyte kontrolnie białko His_GFP (Ryc. 36, pomiar nr 1)) ponownie nie wykazywało wiązania do dsDNA (brak widocznego wzrostu wiązania (nm)). Rozpatrując oddziaływania dla pojedynczych pomiarów białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA, największe oddziaływania wykazuje białko His_Myb2 (Ryc. 36, pomiar nr 2), następnie His_Myb1 (Ryc. 36., pomiar nr 3), His_hTRF2 (Ryc. 36., pomiar nr 4) a najmniejsze His_hTRF1 (Ryc. 36., pomiar nr 4). Ponownie należy wziąć pod uwagę możliwość występowania problemu z wielkością analizowanych cząsteczek. Przyłożenie dsDNA o wielkości około 2000 – 3000 pz do małych białek takich jak His_Myb1 (8,3 kDa) i His_Myb2 (7,45 kDa) stanowi lepsze warunki detekcji zmian wiązania niż przyłożenie tego samego dsDNA do dużo większych białek His_hTRF1 (51kDa) i His_hTRF2 (56 kDa). Przy zastosowaniu omawianego układu pomiarowego biosensor_HIS1K_białko_telomerowe_dsDNA postanowiono przeprowadzić testy na oznaczenie stałej wiązania (K_D) dla białek His_Myb1 i His_Myb2 (Tab. 21.) z dsDNA pENTR TERRA, zawierającego 126 powtórzeń telomerowych (Tab. 27.). Oznaczenie stałych K_D dla białek His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.) postanowiono uzyskać w bardziej złożonym układzie pomiarowym biosensor_SA_TIN_białko_telomerowe_dsDNA. Test ten zaprojektowano po pozytywnych wynikach na oddziaływanie białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z peptydem TIN (Tab. 28.) [Wyn. i Dys. 5.4.]. Zakładano zwiększenie ilości oddziałujących cząsteczek białek hTRF1 i hTRF2 po związaniu się białek przez peptyd TIN.

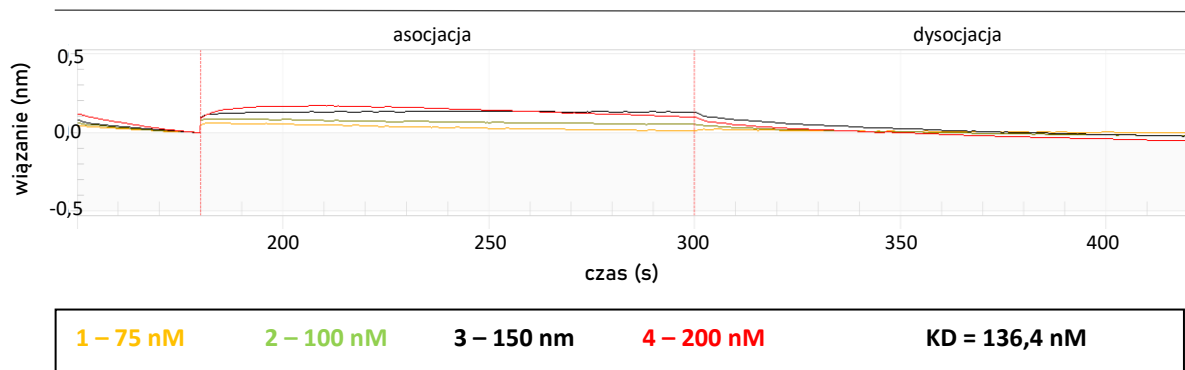
Wyznaczanie stałej wiązania (K_D) dla białek His_Myb1 i His_Myb2 z liniowym DNA pENTR TERRA (3464 pz) zawierającym 126 powtórzeń telomerowych

Wyznaczenie stałej wiązania (K_D) dla rekombinantowych białek His_Myb1 i His_Myb2 (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) zostało przeprowadzone przy

użyciu różnego stężenia DNA pENTR TERRA (3464 pz), zawierającego 126 powtórzeń telomerowych. Wynik oddziaływań dla analizy wyznaczającej stałe wiązania K_D dla układów: HIS1K_His_Myb1_dsDNA i HIS1K_His_Myb2_dsDNA przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 37., Ryc. 38.).



Ryc. 37. Wynik pomiarów oddziaływań dla układu HIS1K-Myb2_dsDNA(1-4) (pENTR TERRA, 3646pz, 126 powtórzeń telomerowych) wykonany za pomocą technologii BLITz. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiedniego stężenia dsDNA oznaczonych w legendzie.



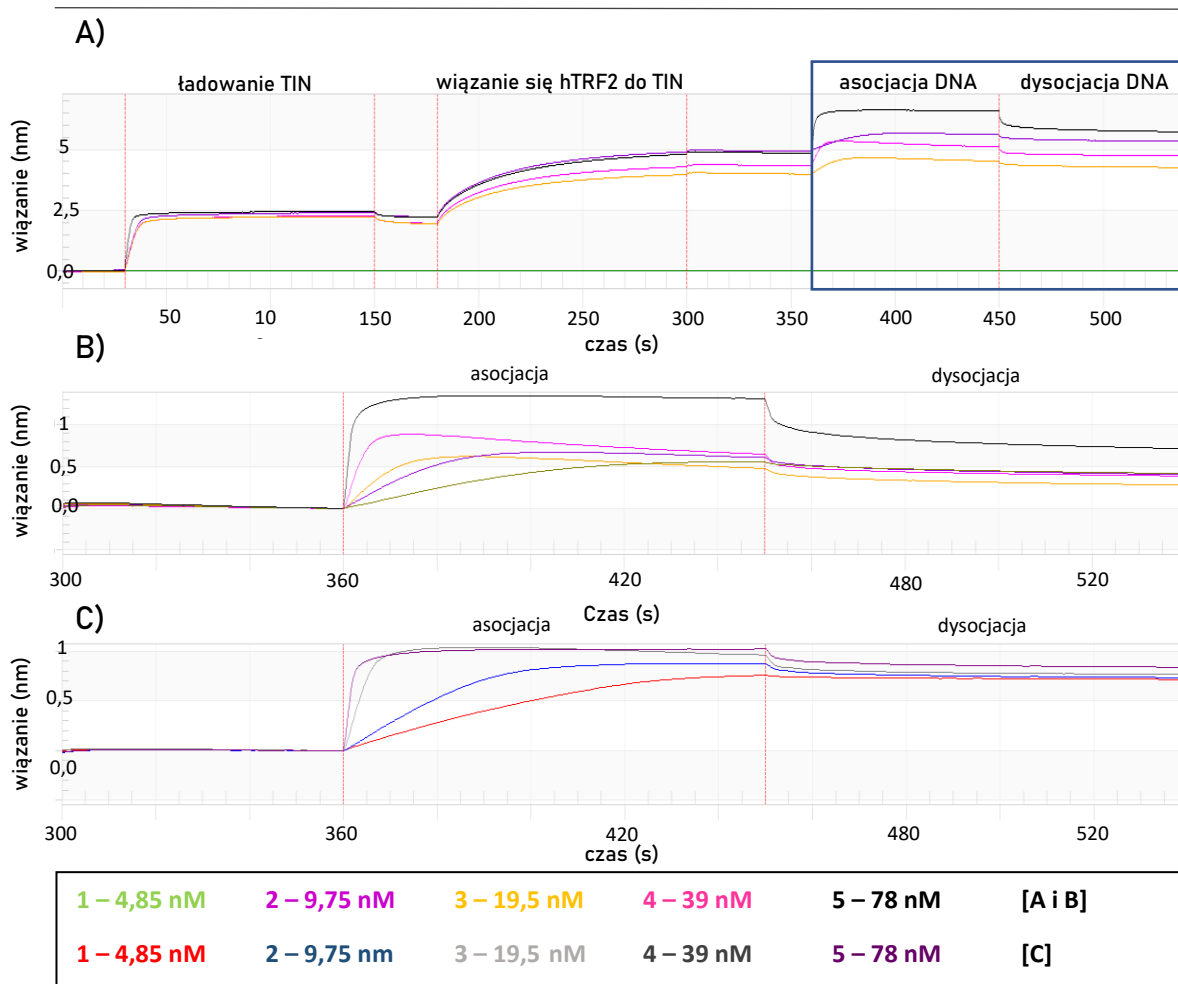
Ryc. 38. Wynik pomiarów oddziaływań dla układu HIS1K-Myb1_dsDNA(1-4) (pENTR TERRA, 3646pz, 126 powtórzeń telomerowych) wykonany za pomocą technologii BLITz. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiedniego stężenia dsDNA oznaczonych w legendzie.

Przedstawiony wynik interakcji białek His_Myb1 i His_Myb2 (Tab.21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) obrazuje zależność siły oddziaływania od użytego stężenia ligandu (Ryc. 38.). Większa liczba pomiarów oddziaływań białko-DNA ze zwiększającym się stężeniem ligandu (telomerowego dsDNA) pozwoliła przez dołączone do aparatu oprogramowanie [Mat. i Met. 4.1.] na wyliczenie stałej K_D oddziaływujących układów His_Myb1/2_pENTR_TERRA. Silniejsze oddziaływanie obserwowane jest przez wzrost wartości wiązania [nm]. Oznaczone stałe wiązania (K_D) na poziomie nanomolarnym zgadzają się z danymi literaturowymi (Erdel i in. 2017; de Lange 2018).

Świadczą również o dużej sile oddziaływania rekombinantowych białek His_Myb1 i His_Myb2 przy zastosowanych układach pomiarowych.

Wyznaczanie stałej wiązania (K_D) dla białek His_hTRF1 i His_hTRF2 z liniowym DNA pENTR TERRA (3464 pz) zawierającym 126 powtórzeń telomerowych

Wyznaczenie stałej wiązania (K_D) dla rekombinantowych białek His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) zostało przeprowadzone przy użyciu różnego stężenia DNA pENTR TERRA (3464 pz) zawierającym 126 powtórzeń telomerowych. Wynik oddziaływań dla analizy wyznaczającej stałe wiązania K_D dla układów SA_TIN_hTRF1/2_telomerowe_dsDNA, przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 37., Ryc. 38.).



Ryc. 39. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów SA_TIN_białko_dsDNA(1-5) wykonany za pomocą technologii BLITZ. A) Obraz całego pomiar., B) Pomiar dla oddziaływania hTRF2 z pENTR TERRA. C) Pomiar dla oddziaływania hTRF1 z pENTR TERRA. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiedniego stężenia dsDNA oznaczonych w legendzie.

Rzeczywisty obraz całej analizy pomiarowej (Ryc. 39., A) potwierdza słuszność zastosowanego układu. W etapie ładowania wyraźnie obserwuje się immobilizowanie peptydu biot-TIN (Tab. 28.) do wybranego biosensora. Pierwszy etap asocjacji wyraźnie wskazuje na mocne wiązanie się białka His_hTRF2 do peptydu biot-TIN (2,5 nm – $2,5 \times$ większe wiązanie niż maksymalna pojemność dla biosensora HIS1K) (analogicznie dla His_hTRF1). Drugi docelowy etap asocjacji wskazuje na wyraźne oddziaływanie telomerowego dsDNA (Tab. 27.) do białek His_hTRF1 (Ryc. 39., C, pomiary nr 1-5), His_hTRF2 (Ryc. 39., B pomiary nr 1-5). Wyznaczone K_D wiązania dla układów SA_TIN_hTRF2_dsDNA i SA_TIN_hTRF2_dsDNA (pENTR TERRA, 126 powtórzeń telomerowych) wynoszą odpowiednio 2,40 nM i 9,72 nM. Wyznaczone stałe wiązania (K_D) na poziomie nanomolarnym zgadzają się z danymi literaturowymi (Erdel i in. 2017; de Lange 2018) i świadczą o mocnym wiązaniu badanych rekombinantowych białek telomerowych (hTRF1, hTRF2) do telomerowego dsDNA.

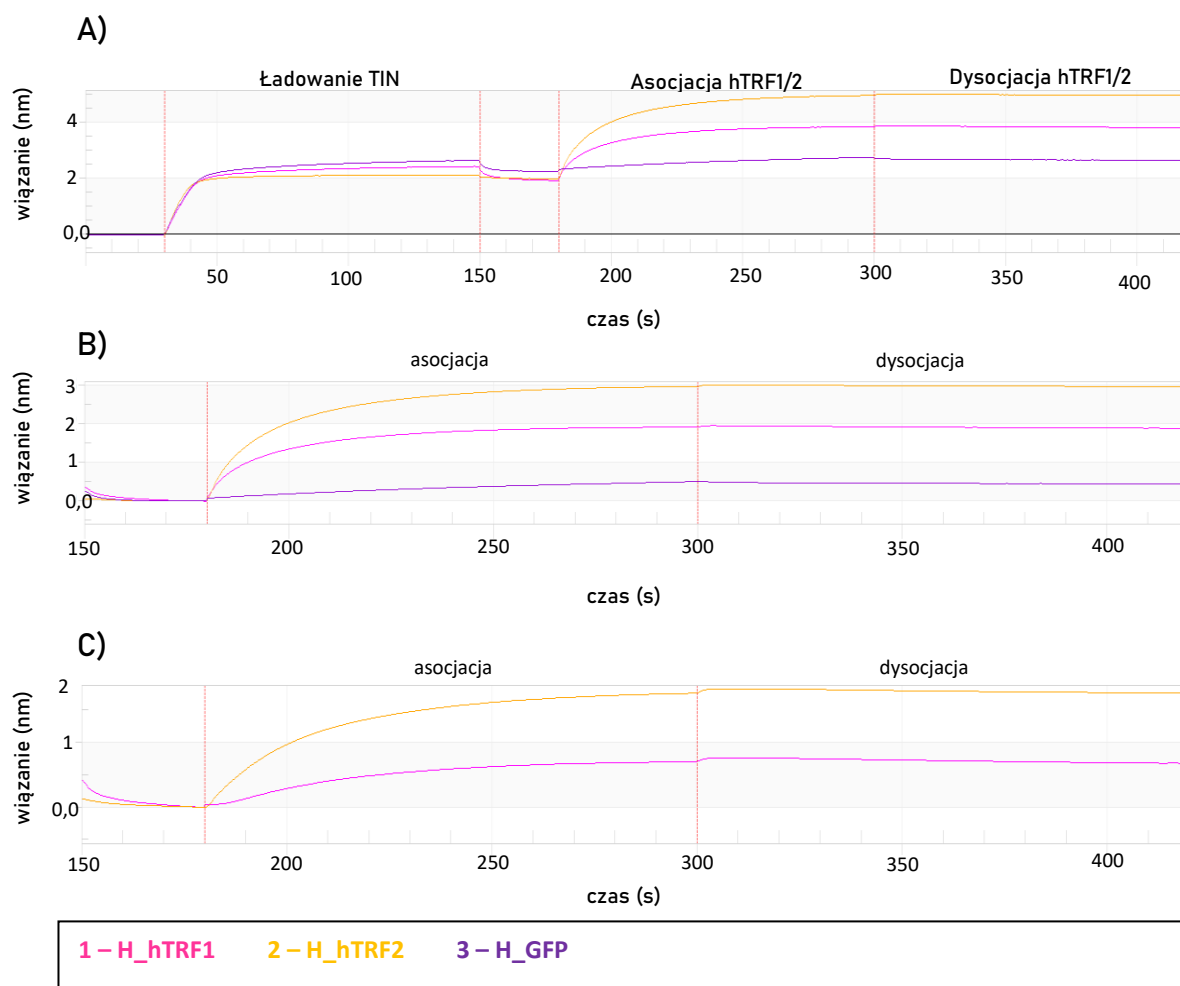
5.4. Analiza *in vitro* interakcji między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a peptydami TIN i Apollo

Pomiar interakcji peptyd-białko z wykorzystaniem technologii BLItz opierał się na immobilizowaniu biotynyloowanych peptydów biot-TIN i biot-Apollo (Tab. 28.) do selektywnego biosensora SA [Mat. i Met. 4.28.2.]. Pomiary analogicznie jak w przypadku interakcji białko-DNA polegały na obserwacji zmian wiązania w czasie rzeczywistym w etapach asocjacji i dysocjacji po przyłożeniu rekombinantowych białek kompleksu Shelterin His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.). Pierwsze próby polegały na optymalizacji wiązania peptydów do biosensorów SA. Rozpoczynano z ilością 10 $\mu\text{g/ml}$, zalecaną przez producenta. Ustalono, że na optymalne wiązanie peptydów biot-TIN i biot-Apollo do biosensora SA wystarczy ta minimalna wartość. Zakres wiązania wynosił około 2,5 nm (2,5-krotnie więcej, niż wynosi maksymalna pojemność dla biosensora HIS1K). Dla większej czytelności wyników, większość otrzymanych analiz ponownie przedstawiano tylko dla etapów asocjacji i dysocjacji.

Pomiar interakcji rekombinantowych białek His_hTRF1 i His_hTRF2 z peptydem TIN

Pomiary interakcji TIN-białko z wykorzystaniem technologii BLItz zostały wykonane dla pełnych wariantów uzyskanych białek telomerowych His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.). Do pomiarów kontrolnych użyto ponownie białka GFP. Pomiar niezaladowanego sensora (pomiar zerowy) nie wykazał niespecyficznego oddziaływania

użytych białek kompleksu Shelterin oraz białka GFP z warstwą biosensora, pozwalając na kontynuowanie pomiarów. Wynik oddziaływania TIN-białko przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 40.).

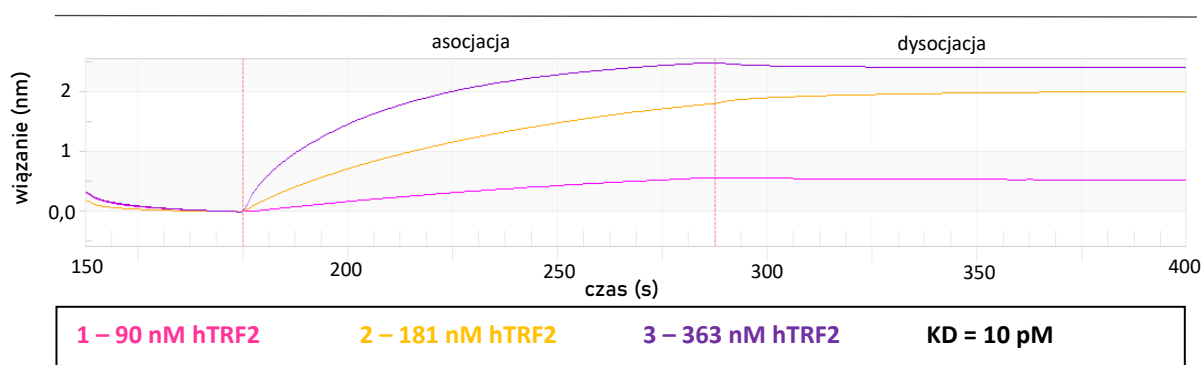


Ryc. 40. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów SA_TIN_białko(1-3) wykonany za pomocą technologii BLITz. A) Obraz całego pomiaru. B) Pomiar referencyjny wykonany dla białka GFP. C) Pomiar referencyjny wykonany dla białka His_hTRF2. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom białek oznaczonych w legendzie.

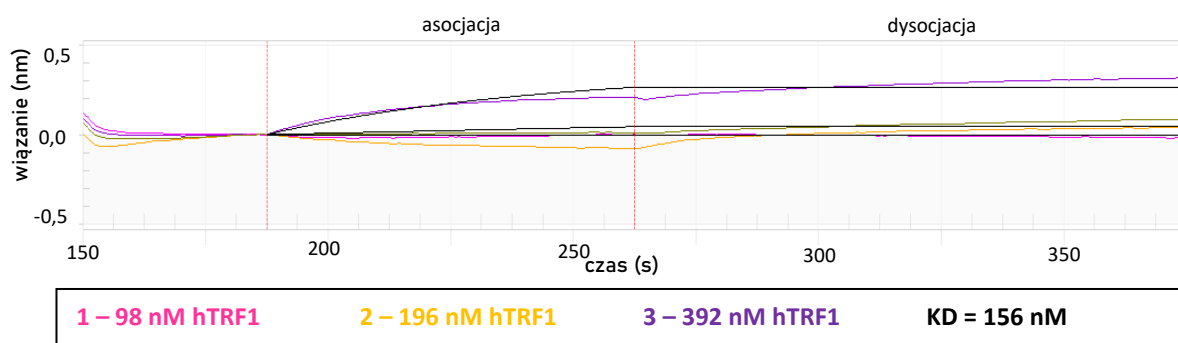
Pomiary interakcji TIN-białko z wykorzystaniem pełnych wariantów rekombinantowych His_hTRF1 i His_hTRF2 wyraźnie wskazują na ich mocne oddziaływanie z peptydem TIN (Ryc. 40., pomiary nr 1-2). Brak oddziaływania peptydu TIN z białkiem GFP (Ryc. 40., pomiar nr 3) potwierdza jego selektywne oddziaływanie z białkami His_hTRF1 i His_hTRF2, co jest zgodne z literaturą (de Lange 2018). Różnica w sile oddziaływania peptydu biot-TIN z poszczególnymi białkami hTRF1 i hTRF2 może wynikać z posiadania innych obszarów interakcji (de Lange 2018).

Wyznaczanie stałej wiązania dla białek hTRF1 i hTRF2 z peptydem TIN

Wyznaczenie stałej wiązania (K_D) dla peptydu biot-TIN (Tab. 28.) z rekombinantowymi białkami His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.) zostało przeprowadzone przy użyciu różnych stężeń rekombinantowych białek kompleksu Shelterin. Wynik oddziaływań dla analizy wyznaczającej stałe wiązania (K_D) dla układów SA_TIN_hTRF1/2 przedstawiono w postaci zależności wartości wiązania (nm) (Ryc. 41., Ryc. 42.).



Ryc. 41. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów SA_TIN_hTRF2(1-3) wykonany za pomocą technologii BLItz. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiedniego stężenia białka oznaczonych w legendzie.



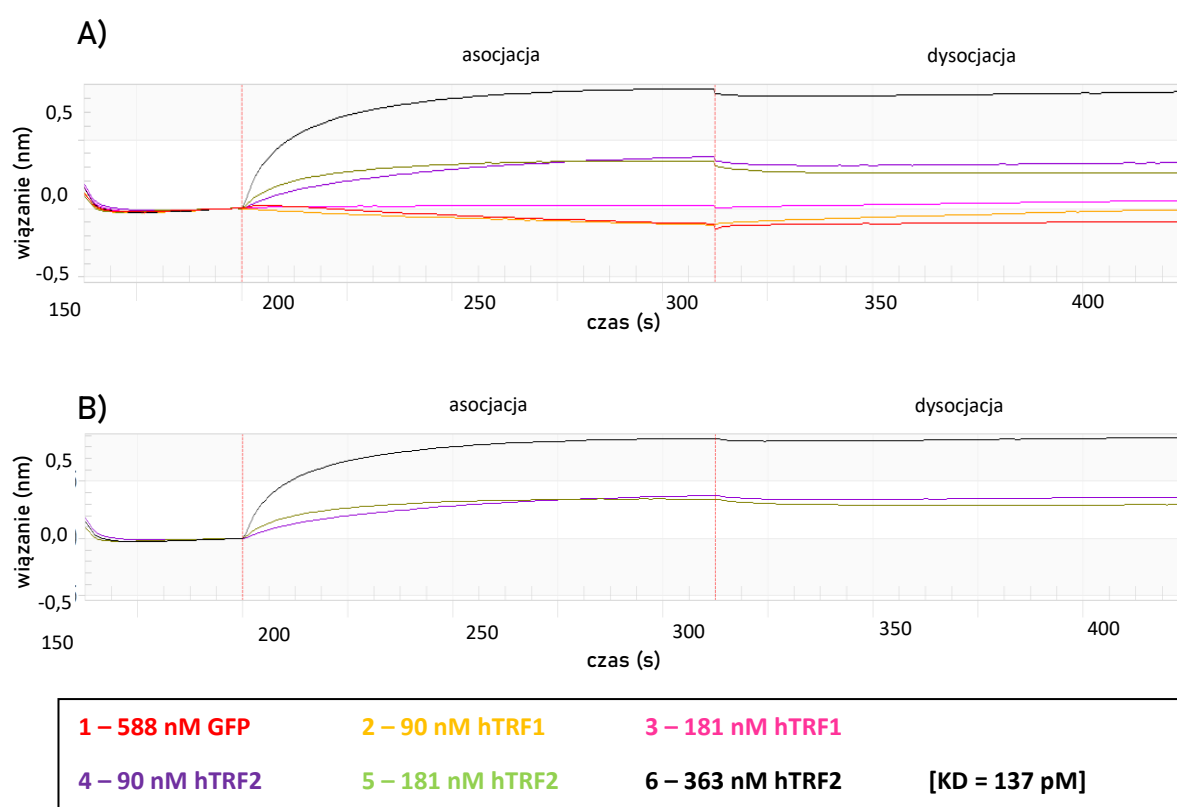
Ryc. 42. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów SA_TIN_hTRF1(1-3) wykonany za pomocą technologii BLItz. Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiedniego stężenia białka oznaczonych w legendzie.

Otrzymane wyniki oddziaływania peptyd-białko dla układów SA_TIN_hTRF1/2 (Ryc. 41., Ryc. 42.) potwierdzają słuszność ich zastosowania. Etap asocjacji rekombinantowych białek kompleksu Shelterin His_hTRF1 i His_hTRF2 wskazuje na ich wyraźne oddziaływanie z peptydem TIN (Ryc. 41, pomiary nr 1-3., Ryc. 42., pomiar nr 3). Wyznaczone K_D wiązania dla danych układów SA_TIN_hTRF1/2 wynoszą

odpowiednio 10 pM i 156 nM. Oznaczone stałe wiązania (K_D) na poziomie pikomolarnym i nanomolarnym świadczą o bardzo mocnym wiązaniu badanych rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 (Tab. 21.) do peptydu TIN (Tab. 28.).

Pomiar interakcji rekombinantowych białek His_hTRF1 i His_hTRF2 z peptydem Apollo połączony z wyznaczeniem stałej wiązania

Pomiary interakcji Apollo-białko z wykorzystaniem technologii BLItz zostały wykonane dla pełnych wariantów uzyskanych białek telomerowych His_hTRF1 i His_hTRF2 (Tab. 21.). Do pomiarów kontrolnych użyto ponownie białka GFP. Pomiar niezaladowanego sensora (pomiar zerowy) nie wykazał niespecyficznego oddziaływania użytych białek kompleksu Shelterin i GFP z warstwą biosensora, pozwalając na kontynuowanie pomiarów.



Ryc. 43. Wynik pomiarów oddziaływań dla układów SA_Apollo_białko(1-6) wykonany za pomocą technologii BLItz. A) Pomiar układów SA_Apollo_białko(1-3), B) Pomiar układów SA_Apollo_hTRF2(4-6). Kolory dla linii pomiarów odpowiadają kolorom odpowiednich białek i ich stężenia oznaczonych w legendzie.

Otrzymane wyniki oddziaływania peptyd-białko dla układów SA_Apollo_hTRF1/2 (Ryc. 43., A i B) potwierdza słuszność ich zastosowania. Etap

asocjacji rekombinantowego białka His_hTRF2 wskazuje na jego oddziaływanie z peptydem Apollo (Ryc. 43., pomiary nr 4-6). Brak oddziaływania peptydu Apollo z białkiem His_hTRF1 (Ryc. 43., pomiary nr 2-3.) oraz GFP (Ryc. 43., pomiar nr 1) wskazuje na jego selektywne oddziaływanie wyłącznie z białkiem hTRF2, co jest zgodne z literaturą (de Lange 2018). Wyznaczona K_D wiązania dla danego układu SA_Apollo_hTRF2 na poziomie pikomolarnym (137 pM) świadczy o bardzo silnym oddziaływaniu rekombinantowego białka hTRF2 (Tab. 21.) z otrzymanym Biot-Apollo (Tab. 28.).

6. PODSUMOWANIE

Głównym celem pracy było opracowanie działającego modelu *in vitro* przeznaczonego do badań oddziaływań białko-białko oraz białko-DNA przez poszczególne podjednostki kompleksu Shelterin i telomerowego dwuniciowego DNA. Postawione założenie zostało spełnione poprzez uzyskanie bioaktywnych rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 ludzkiego kompleksu Shelterin oraz ich domen wiążących Myb1 i Myb2 [Wyn. i Dys. 5.1.]. Bioaktywność rekombinantowych białek z ludzkiego kompleksu Shelterin została potwierdzona poprzez wykazanie ich natywnych właściwości wiązania się do telomerowego dsDNA [Wyn i Dys. 5.3.]. O bioaktywności uzyskanych białek kompleksu Shelterin świadczy również potwierdzona ich interakcja z peptydami TIN i Apollo [Wyn. i Dys. 5.4.].

Realizacja pierwszego postawionego celu szczegółowego, jakim jest bioprodukcja rekombinantowych białek kompleksu Shelterin, została przedstawiona w opisie preparatyki każdego pojedynczego białka tego kompleksu [Wyn. i Dys. 5.1.1-5.1.4.]. Obecność domeny Fh8 oraz etykiety His w fuzji z białkami hTRF1 i hTRF2 umożliwiły wysoki poziom ich biosyntezy w ekspresyjnym systemie *E. coli*. Przeanalizowane źródła literaturowe wskazują, że najpowszechniej stosowanym systemem służącym do otrzymywania białek kompleksu Shelterin jest system bakulowirusa (Kim, Kaminker i Campisi 1999; Ye i de Lange 2004; Tahmaseb 2007; Tahmaseb i Turchi 2010; Lin i in. 2014; Jack i in. 2022; Zinder i in. 2022), ale niektóre doniesienia świadczą o tym, że inne zespoły otrzymały białka kompleksu Shelterin w systemie *E. coli* (Huang i in. 2001; Jiang i in. 2004; Yang i in. 2011). Opracowana strategia izolowania i oczyszczania rekombinantowych białek fuzyjnych przy użyciu dedykowanych technik chromatograficznych oraz uzyskanej rekombinantowej proteazy TEV [Wyn. i Dys. 5.2.] pozwoliły na uzyskanie pełnych wariantów białek (hTRF1 oraz hTRF2) z kompleksu Shelterin [Wyn. i Dys. 5.1.1.]. Bioprodukcja fuzyjnych domen wiążących His_Ub_Myb1 oraz His_Ub_Myb2 w ekspresyjnym systemie *E. coli* połączona z dedykowaną strategią ich oczyszczania umożliwiła uzyskanie domen wiążących telomerowe DNA Myb1 i Myb2 (wariantów delecyjnych ludzkich białek TRF1 i TRF2) [Wyn. i Dys. 5.1.2.]. Uzyskanie wariantów białek z nieusuwalną etykietą His (His_hTRF1, His_hTRF2, His_Myb1 i His_Myb2) pozwoliło na znaczne skrócenie procesów ich preparatyki [Wyn. i Dys. 5.1.3.-5.1.4.] bez wyraźnych zmian w oddziaływaniu z telomerowym dsDNA. Uzyskanie łącznie 8 różnych wariantów białek

należących do kompleksu Shelterin (Tab. 21.) [Wyn. i Dys. 5.1.] spełniło założony cel pracy. Ilości otrzymywanych białek na poszczególnych etapach oczyszczania zostały podsumowane w tabeli 31.

Tab. 31. Przedstawienie wydajności poszczególnych procesów oczyszczania rekombinowanych białek kompleksu Shelterin uzyskanych w przeliczeniu na 1 g biomasy komórek bakterii. Pogrubioną czcionką oznaczono końcowe ilości dla zastosowanych strategii ich preparatyki.

Białko	Preparat	Etap	Ilość [mg]
hTRF1	Fh8_hTRF1_His	IMAC	5,79
	Fh8_hTRF1_His	HIC	4,04
	Fh8_hTRF1_His	IMAC	3,42
	hTRF1_His	TEV	2,62
	hTRF1	C _A + SEC	0,39
hTRF2	Fh8_hTRF2_His	IMAC	7,21
	Fh8_hTRF2_His	HIC	5,16
	hTRF2_His	TEV	4,20
	hTRF2	C _A + SEC	0,51
His_hTRF1	His_hTRF1	IMAC	0,27
His_hTRF2	His_hTRF2	IMAC	0,10
Myb1	His_UB_Myb1	IMAC	2,28
	Myb1	UBPD2C + IMAC	1,09
Myb2	His_UB_Myb2	IMAC	2,99
	Myb2	UBPD2C + IMAC	1,45
His_Myb1	His_Myb1	IMAC	3,17
His_Myb2	His_Myb2	IMAC	3,08

Największą ilość białek z 1 g osadu biomasy bakteryjnej uzyskano dla białek fuzyjnych Fh8_hTRF1_His oraz Fh8_hTRF2_His (odpowiednio 5,79 i 7,21 mg; Tab. 31.). Podkreślając zalety wybranego podejścia: (i) użycie etykiety Fh8 wspomagającej bioprodukcję i poprawne fałdowanie się białka, (ii) wykorzystanie szczepu *E. coli* ArcticExpress (DE3), pozwalającego na bioprodukcję białka w 10°C, umożliwiając wydłużenie czasu hodowli komórek bakteryjnych po rozpoczęciu indukcji ekspresji genu kodującego białko, wspomagając również jego poprawne fałdowanie. Porównując te wartości do ostatecznych ilości uzyskanych białek hTRF1 i hTRF2 (odpowiednio 0,39 i 0,51 mg; Tab. 31.) w tej strategii ich uzyskiwania obserwuje się

zależność zmniejszania się wydajności wraz z mnogością liczby etapów preparatywnych. Zależność tę obserwuje się również w strategiach uzyskania domen wiążących Myb1/2. Białek Myb1 i Myb2 w strategii bioprodukcji w fuzji z domeną Ub uzyskano 2-3-krotnie mniej (odpowiednio 1,09 i 1,45 mg; Tab. 31.) w porównaniu do białek His_Myb1 i His_Myb2 (odpowiednio 3,17 i 3,08 mg; Tab. 31.). Drugą zauważalną zależnością jest zmiana wydajności oczyszczania od długości i sekwencji aa białek. Świadczą o tym znacznie mniejsze ilości uzyskane w końcowym etapie preparatyki białek hTRF1 i hTRF2 (odpowiednio 0,39 i 0,51 mg; Tab. 31.) oraz His_hTRF1 i His_hTRF2 (odpowiednio 0,27, 0,10 mg; Tab. 31.). Podsumowując ostateczne ilości (Tab. 31., pogrubione wartości) otrzymywanych białek z kompleksu Shelterin, najlepsze rezultaty uzyskano przy produkcji białek His_Myb1 oraz His_Myb2 (odpowiednio 3,17 i 3,08 mg; Tab. 31.) z niesuwalną etykietą His, otrzymanych w jednoetapowym procesie ich oczyszczania. Najgorsze rezultaty uzyskano przy produkcji białek His_hTRF1 i His_hTRF2 (odpowiednio 0,27, 0,10 mg; Tab. 31.) dla produkcji wymagających dla systemu bakteryjnego białek bez etykiety wspomagającej jego poprawne fałdowanie. Jednak wszystkie warianty białek przebadano pod kątem aktywności białko-białko oraz białko-DNA. Biorąc pod uwagę wydajność oraz wkład pracy, najlepszą metodą otrzymywania domen wiążących Myb1 i Myb2 z białek kompleksu Shelterin hTRF1 i hTRF2 jest strategia ich bioprodukcji z niesuwalną etykietą His [Wyn. i Dys. 5.1.3.]. Jednoetapowy etap ich oczyszczania jest wystarczający do uzyskania w pełni homogennych preparatów. W przypadku pełnych wariantów hTRF1 i hTRF2 lepszą strategią jest ich bioprodukcja z etykietą wspomagającą ich poprawne fałdowanie (Fh8), pomimo bardziej czasochłonnego i złożonego procesu ich otrzymywania [Wyn. i Dys. 5.1.1.]. Przewagą jest ich otrzymywanie o dużo większym stopniu homogenności niż w przypadku strategii ich uzyskiwania z niesuwalną etykietą His połączoną z jednoetapowym procesem ich oczyszczania [Wyn. i Dys. 5.1.4.].

Test opóźnienia migracji elektroforetycznej (EMSA) wykazał oddziaływanie rekombinantowych białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) zarówno do telomerowego dsDNA i nietelomerowego dsDNA (Tab. 27.) [Wyn. i Dys. 5.3.1.]. Otrzymane rezultaty potwierdziły silniejsze oddziaływanie rekombinantowych białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA w porównaniu do ich oddziaływania z nietelomerowym dsDNA. Oddziaływania białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA wykazały także większą odporność na zwiększającą się siłę jonową roztworu, w którym badane były

oddziaływania. Nie stwierdzono zwiększenia efektywności oddziaływań białek kompleksu Shelterin do telomerowego dsDNA po związaniu z peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.). Wyniki te pokrywają się z danymi literaturowymi, świadczącymi o niewykazywaniu kooperatywnych działań *in vitro* przez białka kompleksu Shelterin wiążące DNA oraz możliwością ich oddziaływania z nietelomerowym dsDNA (Erdel i in. 2017; de Lange 2018). Rezultaty testów EMSA kompleksów białko-DNA wykazały, że obecność etykiety His nie wpływa na oddziaływanie rekombinantowych białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA. Określenie najmniejszego stosunku molowego, w którym białka kompleksu Shelterin wykazują zdolności do tworzenia kompleksów białko-DNA z telomerowym dsDNA przedstawiono w tabeli 32.

Tab. 32. Przedstawienie stosunku molowego, przy którym widać oddziaływanie rekombinantowych białek Shelterin z telomerowym dsDNA zawierającym 2 powtórzenia telomerowe, określonego przy wykorzystaniu testu EMSA.

Białko	Stosunek molowy DNA : białko, przy którym widać opóźnienie migracji DNA w żelu			Stosunek molowy DNA : białko, przy którym wyraźnie widać opóźnienie migracji DNA w żelu		
		:			:	
Myb1	1,2	:	1	1	:	2,5
Myb2	2	:	1	1	:	1
His_Myb1	1,2	:	1	1	:	2,5
His_Myb2	2	:	1	1	:	1
hTRF1	1	:	1	1	:	2
hTRF2	2,5	:	1	1	:	1

Na podstawie uzyskanych stosunków molowych użytego telomerowego dsDNA (Tab. 27.) z białkami kompleksu Shelterin (Tab. 21.), przy których obserwowano opóźnienia migracji telomerowego dsDNA w żelu, określano poziom ich wzajemnego oddziaływania. Największe oddziaływanie z telomerowym dsDNA wykazywało białko hTRF2, którego 2,5-krotnie mniejsza ilość w stosunku do telomerowego dsDNA powodowała opóźnienie jego migracji w żelach (2,5:1; Tab. 32.). Bardzo wyraźne spowolnienie migracji telomerowego dsDNA przez białko hTRF2 obserwowano przy ich równych ilościach w reakcji kompleksowania (1:1; Tab. 32.). Kolejno najmocniej oddziaływujące białka z telomerowym dsDNA to Myb2 i His_Myb2, gdzie ich 2-krotnie mniejsza ilość powodowała opóźnienie migracji dsDNA w żelu (2:1; Tab. 32.). Analogicznie do białka hTRF2 bardzo wyraźne spowolnienie migracji telomerowego

dsDNA przez białka Myb2 i His_Myb2 obserwowano przy ich równych ilościach (1:1; Tab. 32.). Najslabiej oddziaływały białko hTRF1 oraz jego domeny wiążące Myb1 i His_Myb1. Spowolnienie migracji telomerowego dsDNA w żelach po związaniu z nimi obserwowano dopiero przy równych ich ilościach odpowiednio dla białka hTRF1 (1:1; Tab. 32.) oraz białek Myb1, His_Myb1 (1,2:1; Tab.32.). Bardzo wyraźne oddziaływanie z telomerowym dsDNA przez białko hTRF1 oraz jego domeny wiążące Myb1 i His_Myb1 obserwowano przy ich 2-krotnie większych ilościach białek odpowiednio dla białka hTRF1 (1:2; Tab. 32.) oraz białek Myb1, His_Myb1 (1:2,5; Tab.32.).

Zastosowanie technologii BLItz [Mat. 4.28.2.] w połączeniu z biosensorami selektywnymi do etykiety His (HIS1K) pozwoliły na immobilizowanie rekombinantowych białek kompleksu Shelterin His_hTRF1, His_hTRF2, His_Myb1 oraz His_Myb2 (Tab. 21.) na powierzchni biosensorów, a w konsekwencji na pomiar ich oddziaływania z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) [Wyn. i Dys. 5.3.2.]. Przebieg oddziaływania białek rekombinantowych z telomerowym dsDNA w czasie rzeczywistym potwierdził szybkie tempo asocjacji oraz wolne tempo dysocjacji przyłożonego telomerowego dsDNA. Wyznaczone stałe wiązania (K_D) zarówno dla układów biosensor HIS1K – białko – telomerowe dsDNA dla białek His_Myb1/2 jak i dla układu biosensor SA – TIN – białko – telomerowe dsDNA dla białek His_hTRF1/2 z dsDNA telomerowym zawierającym 126 powtórzeń telomerowych wykazały wartości na poziomie nanomolarnym (Tab. 33.). Wyniki te pokrywają się z obecnymi doniesieniami literaturowymi (Erdel i in. 2017; de Lange 2018) i świadczą o silnym oddziaływaniu kompleksów. Wyniki uzyskane przy pomocy aparatu BLItz z biosensorami streptawidynowymi (SA) potwierdziły selektywne oddziaływanie rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 z uzyskanymi biotynylowanymi peptydami biot-TIN i biot-Apollo [Wyn. i Dys. 5.4.]. Wykazano natywne właściwości specyficznego oddziaływania rekombinantowych białek hTRF1 i hTRF2 do peptydu biot-TIN oraz białka hTRF2 do peptydu biot-Apollo. Wyznaczone stałe wiązania na poziomie piko/nanomolarnym ponownie świadczą o ich dużej sile wiązania. Dokładne wartości stałych wiązania dla poszczególnych układów przedstawiono w tabelach 33 i 34.

Tab. 33. Wyznaczone stałe wiązania K_D rekombinantowych białek kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA zawierającym 126 powtórzeń telomerowych, uzyskane dla różnych układów pomiarowych przy użyciu aparatu BLItz.

Białko	K_D dla układu HIS1K-białko-DNA	K_D dla układu SA-TIN-białko-DNA
His_Myb1	136,4 nM	-
His_Myb2	4,35 nM	-
His_hTRF1	-	9,2 nM
His_hTRF2	-	2,4 nM

Tab. 34. Wyznaczone stałe wiązania K_D rekombinantowych białek kompleksu Shelterin z peptydami biot-TIN i biot-Apollo, uzyskane przy użyciu aparatu BLItz.

Białko	K_D dla układu SA-TIN-białko	K_D dla układ SA-Apollo-białko
His_hTRF1	156 nM	-
His_hTRF2	10 pM	132 pM

Uzyskane stałe wiązania K_D określające siłę oddziaływania białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) korelują z wynikami uzyskanymi w metodzie EMSA (Tab. 32.). Najmocniejsze oddziaływanie wykazuje białko His_hTRF2 (K_D 2,4 nM), następnie białko His_Myb2 (K_D 3,35 nM), a najmniej białka His_hTRF1 (K_D 9,2 nM) oraz His_Myb1 (K_D 136,4 nM). Wynik ten był spodziewany ze względu na to, że domeny wiążące Myb odpowiadają dla określonego białka hTRF1/hTRF2 za wiązanie się do telomerowego dsDNA (Erdel i in. 2017; de Lange 2018; Luo i in. 2021; Lim i Cech 2021). Wyznaczone stałe wiązania K_D określające siłę oddziaływania białek kompleksu Shelterin z peptydami biot-TIN i biot-Apollo (Tab. 28.) wskazują na mocniejsze ich oddziaływanie z białkiem His_hTRF2.

Opisane wyniki z przeprowadzonych testów EMSA [Wyn. i Dys. 5.3.1.] oraz użytej technologii BLItz [Wyn. i Dys. 5.3.2.] świadczą nie tylko o opracowaniu metod potwierdzających interakcje rekombinantowych białek kompleksu Shelterin (Tab. 21.) z telomerowym dsDNA (Tab. 27.) i peptydami TIN i Apollo (Tab. 28.), ale także umożliwiającą określenie ich siły wiązania z wyznaczeniem wartości stałej dysocjacji K_D , co jest spełnieniem drugiego celu szczegółowego niniejszej pracy.

7. LITERATURA

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2016). *Molecular Biology of The Cell* 6th Edition New York, USA: Garland Science.
2. Aramburu, T., Kelich, J., Rice, C. & Skordalakes, E. (2022). *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 20, 675–684.
3. Barrows, J. K. & Dyke, M. W. V. (2022). *PLOS ONE*. 17, e0263322.
4. Bejarano, L., Bosso, G., Louzame, J., Serrano, R., Gómez-Casero, E., Martínez-Torrecuadrada, J., Martínez, S., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J. & Blasco, M. A. (2019). *EMBO Mol Med*. 11,.
5. Bejarano, L., Schuhmacher, A. J., Méndez, M., Megías, D., Blanco-Aparicio, C., Martínez, S., Pastor, J., Squatrito, M. & Blasco, M. A. (2017). *Cancer Cell*. 32, 590-607.e4.
6. Berg, T. (2003). *Angewandte Chemie International Edition*. 42, 2462–2481.
7. Bhari, V. K., Kumar, D., Kumar, S. & Mishra, R. (2021). *Biochemistry and Biophysics Reports*. 26, 100937.
8. Bhattacharya, S., Bunick, C. G. & Chazin, W. J. (2004). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1742, 69–79.
9. Bidzińska, J. (2011). *Molekularne kompleksy białek telomerowych TRF1 oraz TRF2 z telomerowym DNA, jako nowy cel molekularny dla małowcząsteczkowych związków chemicznych i ich znaczenie w terapii przeciwnowotworowej*. Rozprawa Doktorska. Politechnika Gdańska.
10. Biroccio, A., Porru, M., Rizzo, A., Salvati, E., D'Angelo, C., Orlandi, A., Passeri, D., Franceschin, M., Stevens, M. F. G., Gilson, E., Beretta, G., Zupi, G., Pisano, C., Zunino, F. & Leonetti, C. (2011). *Clinical Cancer Research*. 17, 2227–2236.
11. Blackburn, E. H., Greider, C. W. & Szostak, J. W. (2006). *Nat Med*. 12, 1133–1138.
12. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. & Schäfer, F. (2009). *Methods Enzymol*. 463, 439–473.
13. Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K. & Chruszcz, M. (2018). *ACS Omega*. 3, 760–768.
14. Braun, P. & Gingras, A. (2012). *REVIEW History of protein–protein interactions: From egg-white to complex networks*.
15. Brizzard, B. (2008). *BioTechniques*. 44, 693–695.
16. Brown, T. A. (2009). *Genomy* Wydawnictwo Naukowe PWN.
17. Bryś, M., Laskowska, M., Forma, E. & Krześlak, A. (2012). *Folia Medica Lodziensia*.
18. Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. & Mattern, M. R. (2005). *Protein Expression and Purification*. 43, 1–9.
19. Calado, R. & Young, N. (2009). *The New England Journal of Medicine*. 361, 2353–2365.
20. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C. & DeLucas, L. J. (2007). *Acta Cryst D*. 63, 295–301.
21. Cech, T. R. (2004). *Cell*. 116, 273–279.
22. Chazin, W. J. (2011). *Acc. Chem. Res*. 44, 171–179.
23. Chiba, K., Johnson, J. Z., Vogan, J. M., Wagner, T., Boyle, J. M. & Hockemeyer, D. (2015). *ELife*. 4, e07918.
24. Concepcion, J., Witte, K., Wartchow, C., Choo, S., Yao, D., Persson, H., Wei, J., Li, P., Heidecker, B., Ma, W., Varma, R., Zhao, L.-S., Perillat, D., Carricato, G., Recknor, M., Du, K., Ho, H., Ellis, T., Gamez, J., Howes, M., Phi-Wilson, J., Lockard, S., Zuk, R. & Tan, H. (2009). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 12, 791–800.
25. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. (2014). *Frontiers in Microbiology*.
26. Court, R., Chapman, L., Fairall, L. & Rhodes, D. (2005). *EMBO Rep*. 6, 39–45.

27. Demain, A. L. & Vaishnav, P. (2009). *Biotechnol Adv.* 27, 297–306.
28. Desai, M., Di, R. & Fan, H. (2019). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. e59687.
29. Dong, X.-Y., Feng, X.-D. & Sun, Y. (2010). *Biotechnology Progress*. 26, 1088–1094.
30. Englander, S. W. (2000). *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 29, 213–238.
31. Erdel, F., Kratz, K., Willcox, S., Griffith, J. D., Greene, E. C. & de Lange, T. (2017). *Cell Reports*. 18, 41–53.
32. Esposito, D. & Chatterjee, D. K. (2006). *Current Opinion in Biotechnology*. 17, 353–358.
33. Fathi, E., Nozad charoudeh, H., Sanaat, Z. & Farahzadi, R. (2019). *Stem Cell Investigation*. 6, 7–7.
34. Fernandes, S. G., Dsouza, R., Pandya, G., Kirtonia, A., Tergaonkar, V., Lee, S. Y., Garg, M. & Khattar, E. (2020). *Cancers*. 12, 1901.
35. Fraga, H., Faria, T. Q., Pinto, F., Almeida, A., Brito, R. M. M. & Damas, A. M. (2010). *FEBS Journal*. 277, 5072–5085.
36. Galati, A., Magdinier, F., Colasanti, V., Bauwens, S., Pinte, S., Ricordy, R., Giraud-Panis, M.-J., Pusch, M. C., Savino, M., Cacchione, S. & Gilson, E. (2012). *PLOS ONE*. 7, e34386.
37. Galati, A., Micheli, E., Alicata, C., Ingegnere, T., Cicconi, A., Pusch, M. C., Giraud-Panis, M.-J., Gilson, E. & Cacchione, S. (2015). *Nucleic Acids Res.* 43, 5824–5837.
38. Galati, A., Rossetti, L., Pisano, S., Chapman, L., Rhodes, D., Savino, M. & Cacchione, S. (2006). *Journal of Molecular Biology*. 360, 377–385.
39. García-Beccaria, M., Martínez, P., Méndez-Pertuz, M., Martínez, S., Blanco-Aparicio, C., Cañamero, M., Mulero, F., Ambrogio, C., Flores, J. M., Megias, D., Barbacid, M., Pastor, J. & Blasco, M. A. (2015). *EMBO Molecular Medicine*. 7, 930–949.
40. Gill, G. (2004). *Genes Dev.* 18, 2046–2059.
41. Gilson, E. & Géli, V. (2007). *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 825–838.
42. Głębocka, M. & Skokowska, A. (2019). Wpływ szczepów drożdży *Pichia pastoris* na produkcję białek kompleksu shelterynewego TRF1 i TRF2 oraz ich domen białkowych TRFH1 i TRFH2. Praca magisterska. Uniwersytet Gdański.
43. Gocha, A. R. S., Nuovo, G., Iwenofu, O. H. & Groden, J. (2013). *The American Journal of Pathology*. 182, 41–48.
44. Gong, Y., Stock, A. J. & Liu, Y. (2020). *Current Opinion in Genetics & Development*. 60, 48–55.
45. Gonzalez, O. G., Assfalg, R., Koch, S., Schelling, A., Meena, J. K., Kraus, J., Lechel, A., Katz, S.-F., Benes, V., Scharffetter-Kochanek, K., Kestler, H. A., Günes, C. & Iben, S. (2014). *Nat Commun.* 5, 4599.
46. Green, M., R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: Laboratory Manual, Fourth Edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
47. Greider, C. W. (1996). *Annual Review of Biochemistry*. 65, 337–365.
48. Grill, S., Padmanaban, S., Friedman, A., Perkey, E., Allen, F., Tesmer, V. M., Chase, J., Khoriaty, R., Keegan, C. E., Maillard, I. & Nandakumar, J. (2021). *JCI Insight*. 6, e138059.
49. Hellman, L. M. & Fried, M. G. (2007). *Nat Protoc.* 2, 1849–1861.
50. Hnasko, T. S. & Hnasko, R. M. (2015). *ELISA: Methods and Protocols*, Vol. edited by R. Hnasko, pp. 87–96. New York, NY: Springer.
51. Holden, N. S. & Tacon, C. E. (2011). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 63, 7–14.
52. Huang, H., R, P., U, K., Chen, Q. & Sun, J. (2001). *Chin J Cancer Res.* 13, 179–180.
53. Hug, N. & Lingner, J. (2006). *Chromosoma*. 115, 413–425.
54. Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M. & Shinkai, Y. (2004). *Journal of Biological Chemistry*. 279, 1442–1448.

55. Izumi, H. & Funa, K. (2019). *Cells*. 8, 390.
56. Jack, A., Kim, Y., Strom, A. R., Lee, D. S. W., Williams, B., Schaub, J. M., Kellogg, E. H., Finkelstein, I. J., Ferro, L. S., Yildiz, A. & Brangwynne, C. P. (2022). *Developmental Cell*. 57, 277-290.e9.
57. Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H. & Shay, J. W. (2016). *Genome Med.* 8, 69.
58. Jędryś, K. & Górecka, N. (2021). Mutageniza ukierunkowana i klonowanie genów kodujących białko kompleksu szelterynewego TRF1 do bakterii *Escherichia coli*. Praca magisterska. Uniwersytet Gdański.
59. Jiang, H., Zheng, X.-F., Luo, Y., Zhu, J., Fu, H.-J., Sun, Q.-L., Chen, C.-H. & Sun, Z.-X. (2004). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 20, 30–33.
60. Kamionka, M. (2011). *Curr Pharm Biotechnol*. 12, 268–274.
61. Kapust, R. B., Tózsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. (2001). *Protein Eng.* 14, 993–1000.
62. Kazanowska, B., Mikołajewska, A., Reich, A., Reich, M. & Chybicka, A. (2003). *Adv. Clin. Exp. Med.* 9.
63. Kelland, L. (2007). *Clinical Cancer Research*. 13, 4960–4963.
64. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. & Roder, H. (1996). *Nat Struct Biol*. 3, 193–205.
65. Kim, S., Kaminker, P. & Campisi, J. (1999). *Nat Genet*. 23, 405–412.
66. Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., Lai, T.-P., Zhang, N., Wright, W. E. & Shay, J. W. (2016). *PLOS Biology*. 14, e2000016.
67. Krefft, D., Prusinowski, M., Maciszka, P., Skokowska, A., Zebrowska, J. & Skowron, P. M. (2022). *Microb Cell Fact*. 21, 13.
68. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2006). *Methods*. 38, 283–293.
69. de Lange, T. (2009). *Science*. 326, 948–952.
70. de Lange, T. (2018). *Annual Review of Genetics*. 52, 223–247.
71. LaVallie, E. R. & McCoy, J. M. (1995). *Current Opinion in Biotechnology*. 6, 501–506.
72. Li, Y. (2011). *Biotechnology Letters*. 33, 869–881.
73. Lim, C. J. & Cech, T. R. (2021). *Nat Rev Mol Cell Biol*. 22, 283–298.
74. Lin, J., Countryman, P., Buncher, N., Kaur, P., E, L., Zhang, Y., Gibson, G., You, C., Watkins, S. C., Piehler, J., Opreko, P. L., Kad, N. M. & Wang, H. (2014). *Nucleic Acids Research*. 42, 2493–2504.
75. Liu, Y.-C. C., Rieben, N., Iversen, L., Sørensen, B. S., Park, J., Nygård, J. & Martinez, K. L. (2010). *Nanotechnology*. 21, 245105.
76. Luo, Z., Liu, W., Sun, P., Wang, F. & Feng, X. (2021). *Briefings in Bioinformatics*. 22, bbaa441.
77. Maciszka, P. (2019). Konstrukcja rekombinowanego genu kodującego domenę Myb białka TRF1. Praca magisterska. Uniwersytet Gdański.
78. Magdeldin, S. (2012). *Affinity Chromatography BoD – Books on Demand*.
79. Malhotra, A. (2009a). *Methods in Enzymology*, Vol. 463, pp. 239–258. Elsevier.
80. Malhotra, A. (2009b). *Methods in Enzymology*, Vol. 463, edited by R.R. Burgess & M.P. Deutscher, pp. 239–258. Academic Press.
81. Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. & Butt, T. R. (2006). *Protein Sci*. 15, 182–189.
82. McClintock, B. (1941). *Genetics*. 26, 234.
83. Moye, A. L., Porter, K. C., Cohen, S. B., Phan, T., Zyner, K. G., Sasaki, N., Lovrecz, G. O., Beck, J. L. & Bryan, T. M. (2015). *Nat Commun*. 6, 7643.
84. Muller, H. J. (1938). *Collecting Net*. 13, 181–198.
85. O’Sullivan, R. J. & Karlseder, J. (2010). *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 11, 171.
86. Pellegrini, M., Haynor, D. & Johnson, J. M. (2004). *Expert Review of Proteomics*. 1, 239–249.

87. Phizicky, E. M. & Fields, S. (1995). *Microbiol Rev.* 59, 94–123.
88. Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N. & Kumar, G. N. S. (2014). *International Journal of Proteomics.* 2014, 1–12.
89. Ream, J. A., Lewis, L. K. & Lewis, K. A. (2016). *Analytical Biochemistry.* 511, 36–41.
90. Rice, C. & Skordalakes, E. (2016). *Comput Struct Biotechnol J.* 14, 161–167.
91. Rich, R. L. & Myszka, D. G. (2007). *Analytical Biochemistry.* 361, 1–6.
92. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2014). *Front Microbiol.* 5, 172.
93. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 74, 5463–5467.
94. Schmidt, J. C. & Cech, T. R. (2015). *Genes Dev.* 29, 1095–1105.
95. Schumann, W. & Ferreira, L. C. S. (2004). *Genet. Mol. Biol.* 27, 442–453.
96. Schwaller, B. (2010). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, a004051.
97. Silva, E., Castro, A., Lopes, A., Rodrigues, A., Dias, C., Conceição, A., Alonso, J., Correia da Costa, J. M., Bastos, M., Parra, F., Moradas-Ferreira, P. & Silva, M. (2004). *Journal of Parasitology.* 90, 746–751.
98. Slusher, A. L., Kim, J. J. & Ludlow, A. T. (2020). *Cancers.* 12, 1514.
99. Smith, M. F. & Delbary-Gossart, S. (2001). *Colorectal Cancer: Methods and Protocols*, Vol. edited by S. M., pp. 249–257. Totowa, NJ: Humana Press.
100. Southern, E. M. (1975). *Journal of Molecular Biology.* 98, 503–517.
101. Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H. & Maertens, B. (2015). *Methods Enzymol.* 559, 1–15.
102. Stencel, A. & Crespi, B. (2013). *Molecular Ecology.* 22, 3437–3443.
103. Tahmaseb, K. (2007). *Browse All Theses and Dissertations.*
104. Tahmaseb, K. & Turchi, J. J. (2010). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 493, 207–212.
105. Takai, K. K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R. & de Lange, T. (2010). *J Biol Chem.* 285, 1457–1467.
106. Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M. & Nakamura, K.-I. (2002). *Experimental Gerontology.* 37, 523–531.
107. Teasley, D. C. & Stewart, S. A. (2016). *Encyclopedia of Cell Biology*, Vol. edited by R.A. Bradshaw & P.D. Stahl, pp. 426–434. Waltham: Academic Press.
108. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
109. Tropea, J. E., Cherry, S. & Waugh, D. S. (2009). *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols*, Vol. edited by S.A. Doyle, pp. 297–307. Totowa, NJ: Humana Press.
110. Turner, P., McLennan, A., Bates, A. & White, M. (2011). *Krótkie wykłady. Biologia molekularna Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.*
111. Wang, Z., Li, N., Wang, Y., Wu, Y., Mu, T., Zheng, Y., Huang, L. & Fang, X. (2012). *Protein Expression and Purification.* 82, 174–178.
112. Watson, J. D. (1972). *Nature New Biology.* 239, 197–201.
113. Waugh, D. S. (2011). *Protein Expr Purif.* 80, 283–293.
114. Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., Taylor, R. D., Carlos, R., Andrews, W. H., Wright, W. E., Shay, J. W., Harley, C. B. & Morin, G. B. (1997). *Nat Genet.* 17, 498–502.
115. Wojtowicz, A., Mazurkiewicz-Pisarek, A., Plucienniczak, G., Mikiewicz-Sygula, D., Chojnacka, L., Lukasiewicz, N. & Plucienniczak, A. (2005). *Microb Cell Fact.* 4, 17.
116. Wojtowicz-Krawiec, A., Sokolowska, I., Smorawska, M., Chojnacka-Puchta, L., Mikiewicz, D., Lukasiewicz, N., Marciniak-Rusek, A., Wolinowska, R., Bierczynska-

- Krzysik, A., Porebska, A. J., Kuthan-Styczen, J., Gurba, L., Borowicz, P., Mazurkiewicz, A., Plucienniczak, G. & Plucienniczak, A. (2014). *Microb Cell Fact.* 13, 113.
117. Yang, Q., Zhao, J., Zhou, N., Ye, Z. & Li, G. (2011). *Biosensors and Bioelectronics.* 26, 2228–2231.
118. Ye, J. Z.-S., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T. & de Lange, T. (2004). *Journal of Biological Chemistry.* 279, 47264–47271.
119. Ye, J. Z.-S. & de Lange, T. (2004). *Nat Genet.* 36, 618–623.
120. Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S. (2012). *Biotechnol J.* 7, 620–634.
121. Zhang, A. (2009). *Protein Interaction Networks: Computational Analysis* Cambridge University Press.
122. Zhou, Y., Yang, W., Kirberger, M., Lee, H.-W., Ayalasomayajula, G. & Yang, J. J. (2006). *Proteins.* 65, 643–655.
123. Zinder, J. C., Olinares, P. D. B., Svetlov, V., Bush, M. W., Nudler, E., Chait, B. T., Walz, T. & Lange, T. de (2022). 2022.01.24.477420.
124. Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M. & Dontsova, O. A. (2010). *Biochemistry (Mosc).* 75, 1563–1583.

8. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A	reszta adeozyny
aa	aminokwas (ang. <i>amio acid</i>)
ALT	mechanizm alterantynowego wydłużania telomerów (ang. <i>alternative lengthening of telomeres</i>)
altNHEJ	alternatywny NHEJ
APS	nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BLI	interferometria biowarstw (ang. <i>biolayer interferometry</i>)
BSA	albumina z surowicy bydłowej (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
C	reszta cytozyny
cNHEJ	klasyczny NHEJ
CV	objętość kolumny (ang. <i>column volume</i>)
DDR	szlak sygnalizacji uszkodzenia DNA (ang. <i>DNA damage response</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	mieszanina trójfosforanów czterech deoksyrybonukleotydów (N oznacza A, T, C lub G)
DSB	pęknięcia dwuniciowe (ang. <i>double-strand break</i>)
dsDNA	dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>double strand DNA</i>)
DTT ditiotreitól	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	test przesunięcia mobilności w elektroforezie żelowej (ang. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
Fh8	antygen pasożyta <i>Fasciola hepatica</i>
G	reszta guanozyny
GFP	białko zielonej fluoroscencji (ang. <i>green fluorescent protein</i>)
H	godzina (ang. <i>hour</i>)
h	ludzkiego (ang. <i>human</i>)
HDR	naprawa ukierunkowana na homologię (ang. <i>homology-directed repair</i>)

HIC	chromatografia oddziaływań hydrofobowych (ang. <i>hydrophobic interaction chromatography</i>)
IDA	kwask iminodiactowy (ang. <i>iminodiacetic acid</i>)
IMAC	chromatografia z unieruchomionym jonem metalu (ang. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
KA	karboksypeptydaza A (ang. <i>carboxypeptidase A</i>)
kDa	kDa kilodalton, 1 000 daltonów
LC-MS	chromatografia cieczowa z tandemową spektroskopią mas
Min	Minuta(y)
MWCO	molekularna granica oddzielania (ang. <i>molecular Weight Cut-off</i>)
NHEJ	łączenie się niehomologicznych końców (ang. <i>nonhomologous end joining</i>)
Ni-NTA	złozę z unieruchomionymi jonami niklu na matrycy kwasu nitrylotriactowego
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization sequences</i>)
nt	nukleotyd
NTA	kwask nitrylotriactowy (ang. <i>nitrilotracetic acid</i>)
OB	fałda oligonukleotydu/ oligosacharydu (ang. <i>oligonucleotide/ oligosaccharide binding</i>)
OD	gęstość optyczna
PAGE	elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	polietylenoimina (ang. <i>polyethylenimine</i>)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu (ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
POT1	trójpeptydylopeptydaza 1 (ang. <i>tripeptidyl peptidase 1</i>)
PPI	oddziaływanie białko-białko (ang. <i>Protein-protein interaction</i>)
pz	pary zasad

Rap1	białko represorowo aktywatorowe 1 (ang. <i>repressor/activator protein 1</i>)
RCF	względna siła odśrodkowa (ang. <i>relative centrifugal force</i>)
REaza	endonukleaza restrykcyjna
RNA	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
s	sekunda(y)
SDS	dodecylosiarczas sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza denaturująca białek w żelu poliakryloamidowym (w obecności SDS)
SEC	chromatografia wykluczania (ang. <i>size exclusion chromatography</i>)
ssDNA	jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>single strand DNA</i>)
SUMO	mały modyfikator związany z ubikwityny (ang. <i>small ubiquitin related modifier</i>)
T	reszta tymidyny
TEL	miejsce przyłączenia telomerazy
TERC	składnik RNA telomerazy (ang. <i>telomerase RNA component</i>)
TERT	odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. <i>telomerase reverse transcriptase</i>)
TEV	Proteaza pochodząca z wirusa TEV (ang. <i>Tobacco Etch Virus</i>)
TIN2	białko jądrowe oddziałujące z TRF (ang. <i>interacting nuclear protein 2</i>)
TPP1	białko chroniące telomery 1 (ang. <i>protection of telomere 1</i>)
TRF1	czynnik powtórzeń telomerowych 1 (ang. <i>telomere repeat factor 1</i>)
TRF2	czynnik powtórzeń telomerowych 2 (ang. <i>telomere repeat factor 2</i>)
Ub	Ubikwityna (ang. <i>ubiquitin</i>)
Ulp	analogi ubikwityny (ang. <i>ubiquitin like protein</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>Ultraviolet</i>)
WB	technika Western Blotting
VIS	spektrum światła widzialnego (ang. <i>visible spectrum</i>)