



Prof. dr hab. Michał Pikuła

Gdańsk, 15.09.2022

*Profesor, Zastępca Dyrektora Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed  
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej  
Zakład Embriologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski  
Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)  
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, bud. CBM, pok. 162  
tel. 58 3491368 (bezp.); 58 3491495 (sekretariat)  
e-mail: pikula@gumed.edu.pl*

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Macieja Prusinowskiego pt. „Konstrukcja bioaktywnych rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin oraz ich wariantów fuzyjnych i delecyjnych dedykowanych do badań nad funkcjonalnością kompleksów telomerowych” przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgra Macieja Prusinowskiego pt. „Konstrukcja bioaktywnych rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin oraz ich wariantów fuzyjnych i delecyjnych dedykowanych do badań nad funkcjonalnością kompleksów telomerowych” została wykonana w Pracowni Inżynierii Genetycznej, Katedry Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dra hab. Piotra Skowrona oraz promotora pomocniczego dr Darii Kreft.

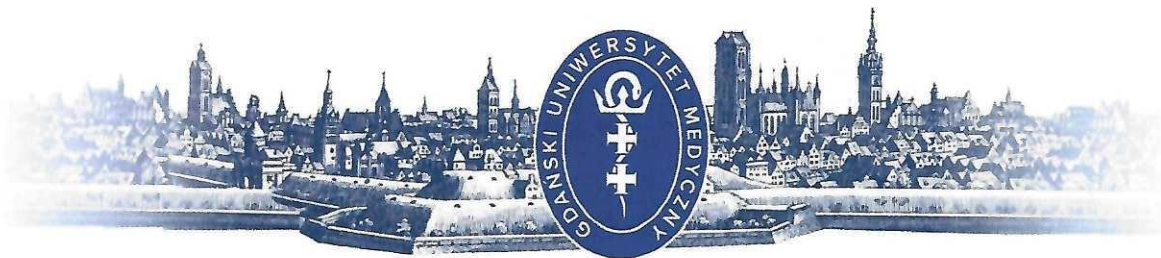
Recenzowaną pracę stanowi przygotowane w języku polskim klasyczne opracowanie liczące 170 stron. Praca podzielona została na następujące części: cel pracy (I), streszczenia w języku polskim oraz angielskim (II), wstęp teoretyczny (III), materiały i metody (IV), wyniki i dyskusja (V), podsumowanie (VI), literatura (VII) oraz wykaz stosowanych skrótów (VIII). Praca zawiera 33 tabele oraz 43 rysunki (37 oryginalnych i 6 rysunków przygotowanych na podstawie innych publikacji). Praca dotyczy bardzo ważnego zagadnienia biomedycznego i biotechnologicznego, jakim jest stworzenie rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin. Białka te odgrywają kluczową rolę w regulacji długości telomerów oraz ich ochronie. Praca dotyka zatem niezwykle ważnego aspektu medycznego związanego z leczeniem chorób nowotworowych, w tym przede wszystkim efektywniejszego poszukiwania leków przeciwnowotworowych. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że wciąż poszukiwane są wiarygodne i efektywne modele *in vitro* do testowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych.



Głównym celem pracy było opracowanie modelu *in vitro* przeznaczonego do badań oddziaływań białko-białko oraz białko-DNA przez podjednostki kompleksu Shelterin i telomerowego dwuniciowego DNA. Praca miała na celu w szczególności produkcję *in vitro* białek hTRF1 i hTRF2 z ludzkiego kompleksu Shelterin oraz ich wariantów delecyjnych Myb1 oraz Myb2 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Celem pracy było również opracowanie metod potwierdzających interakcje białek z telomerowym dsDNA oraz peptydami TIN oraz Apollo. Należy podkreślić, że cele pracy oraz zakres zaplanowanych badań były ambitne i z pewnością stanowiły duże wyzwanie naukowe i metodyczne.

Praca zawiera obszerny wstęp, w którym omówione są najważniejsze elementy pozwalające na zapoznanie się z tematyką pracy oraz dają wgląd w nowoczesne metody biotechnologiczne. Wstęp teoretyczny omawia przede wszystkim: budowę i właściwości telomerów, charakterystykę kompleksów białek Shelterin, znaczenie telomerazy oraz kompleksu Shelterin w chorobach nowotworowych, strategię zwalczania nowotworów poprzez celowanie w komponenty telomerowe. Autor opisuje również inhibitory białek kompleksów Shelterin, kooperacyjne właściwości białek i procesy ich oczyszczania, a także etykiety chemiczne (polihistydynowa, homologi ubikwityny, etykieta Fh8). Wstęp teoretyczny jest obszerny i co ważne wzbogacony został o tabele oraz schematy dobrze obrazujące działanie oraz strukturę wybranych białek. Szczególnie pomocna jest rycina 3, przedstawiająca struktury kompleksu Shelterin.

Rozdział materiały i metody napisany jest bardzo starannie; wybrane techniki badawcze zostały przedstawione w sposób precyzyjny i umożliwiający powtórzenie eksperymentów przez innych badaczy. W rozdziale tym opisano przede wszystkim: materiały podstawowe, sekwencji DNA *E. coli*, pożywki, podłoża bakteryjne, hodowle bakteryjne, transformowanie komórek bakterii plazmidowych DNA, izolowanie DNA plazmidowego, trawienie endonukleazami restrykcyjnymi, reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR), mutagenezę ukierunkowaną, reakcję ligacji DNA, sekwencjonowanie i oczyszczanie DNA plazmidowego, precypitację i izolowanie DNA, oznaczanie stężenia i czystości DNA metodą spektrofotometryczną, elektroforezy, dializy i zagęszczanie preparatów białkowych, ultrafiltrację i immunodetekcję, oznaczanie białek metodą densytometryczną, trawienie białek



protezami, chromatograficzne oczyszczania białek, badania potwierdzające właściwości natywne wiązania telomerowego DNA przez rekombinowane białka oraz nowoczesną technologię BLItz, która wykorzystuje interferometrię biowarstw. Warto dodać, że rozdział materiały i metody zawiera tabele oraz ryciny, które umożliwiają lepsze zapoznanie się z warunkami doświadczeń oraz zasadą działania danej techniki badawczej. Zakres prac doświadczalnych wykonanych przez doktoranta jest bardzo imponujący. Należy jednak zaznaczyć, że część doświadczeń została wykonana przez firmy zewnętrzne (sekwencjonowanie DNA lub synteza peptydów).

Rozdział „wyniki i dyskusja” przedstawia w sposób uporządkowany otrzymane wyniki a także dyskusję na temat wybranych doświadczeń i wyników eksperymentów. Autor opisuje tu przede wszystkim: preparatykę wybranych białek telomerowych z ludzkiego kompleksu Shelterin, preparatykę aktywnej rekombinowanej proteazy TEV, analizę interakcji między rekombinowanymi białkami z kompleksu Shelterin a telomerowym DNA oraz analizę interakcji między białkami z kompleksu Shelterin a peptydami TIN i Apollo. Wyniki stanowią główną część pracy i opisują również optymalizację warunków wybranych doświadczeń, na przykład oczyszczania białek fuzyjnych. Warto zwrócić uwagę, iż Doktorant posługiwał się nowoczesnymi metodami z zakresu inżynierii genetycznej; szczególnie warte podkreślenia są wyniki otrzymane dzięki technologii BLItz wykorzystującej interferometrię biowarstw. Doktorant podczas realizacji pracy otrzymał aktywne, rekombinowane białka TRF1 i TRF2, w tym warianty fuzyjne oraz delecyjne. Autor przedstawił pełną strategię otrzymywania białek TRF1 oraz TRF2, która może być wykorzystana w przyszłości przez inne Zespoły naukowe. Warto również dodać, że w ramach pracy doktorskiej uzyskano także rekombinowaną proteazę, która została następnie użyta do odcięcia etykiety Fh8 od białek fuzyjnych. Autor pracy wykazał, że oddziaływania białek z kompleksu Shelterin z telomerowym dsDNA są silniejsze od oddziaływań z nietelomerowym dsDNA. Wykorzystanie technologii BLItz oraz biosensorów selektywnych do etykiety His, umożliwiło immobilizowanie białek kompleksu Shelterin oraz pomiar ich oddziaływania z telomerowym dsDNA. Opisywany rozdział stanowi bardzo dokładny opis doświadczeń i otrzymywanych wyników, jednak w mojej opinii powinien być wzbogacony o szerszą dyskusję dotyczącą zbliżonych badań, w tym otrzymywania białek



telomerowych przez inne zespoły badawcze oraz znaczenia praktycznego wyników (testowanie potencjalnych leków przeciwnowotworowych).

Kolejny rozdział stanowi podsumowanie, które jest streszczeniem najważniejszych wyników z elementami dyskusji. W tym miejscu warto byłoby uzupełnić pracę o ostateczne wnioski płynące z wykonanych doświadczeń. Kolejną część pracy stanowi starannie przygotowany spis literatury obejmujący 124 pozycje bibliograficzne pochodzące głównie z ostatnich 10 lat. Ostatnią częścią pracy jest szczegółowo spisany wykaz stosowanych skrótów.

Cała praca przygotowana jest starannie, na wysokim poziomie edytorskim i nie budzi większych zastrzeżeń Recenzenta. Jedyne w kilku miejscach znalazły się drobne błędy językowe. Przede wszystkim chciałbym zwrócić uwagę, że w tytule pracy użyto terminu „rekombinowane białka”, natomiast w większości pracy Autor stosuje termin „rekombinantowe białka”, który nie jest szeroko przyjęty w terminologii biotechnologicznej. Całość pracy oceniam bardzo wysoko, zwracając uwagę, że wnosi ona znaczący wkład w rozwój inżynierii genetycznej oraz biotechnologii medycznej.

**Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Macieja Prusinowskiego pt. „Konstrukcja bioaktywnych rekombinowanych białek hTRF1 i hTRF2 z kompleksu Shelterin oraz ich wariantów fuzyjnych i delecyjnych dedykowanych do badań nad funkcjonalnością kompleksów telomerowych” spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jednocześnie ma duże znaczenie praktyczne. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgra Macieje Prusinowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy pracy oraz walory praktyczne otrzymanych wyników, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie pracy po spełnieniu odpowiednich wymogów formalnych stawianym pracom doktorskim.**

Zakład Embriologii  
Pracownia Inżynierii Tkankowej  
i Medycyny Regeneracyjnej

prof. dr hab. Michał Pikula  
Profesor