



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

Prof. dr hab. inż. Paweł Sachadyn  
Laboratorium Biotechnologii Regeneracyjnej  
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
email: psach@pg.edu.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 14 września 2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. 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”**

Rozprawa doktorska mgr. Macieja Prusinowskiego zatytułowana „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, w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Piotra Skowrona oraz promotora pomocniczego dr Darii Krefft. Dysertacja p. Macieja Prusinowskiego opisuje otrzymywanie rekombinowanych ludzkich białek wiążących telomery TRF1 i TRF2 w układzie ekspresyjnym *E. coli* oraz ocenę ich aktywności *in vitro*. Celem Doktoranta było opracowanie modelu molekularnego do testowania *in vitro* potencjalnych leków przeciwnowotworowych zaburzających funkcjonowanie kompleksu Shelterin, a przez to działanie telomerazy. Doktorant i promotorzy podjęli się niezmiernie wymagającego i pracochłonnego zadania. Skonstruowanie modelu molekularnego kompleksu Shelterin z DNA może przyczynić się do uzyskania cennych wyników naukowych, a przede wszystkim do opracowania nowych leków. Praca p. Prusinowskiego odpowiada na wielkie wyzwanie badań biomedycznych, jakim jest walka z nowotworami. Znaczenie tej walki mogą uzmysłowić dane statystyczne - ryzyko zachorowania na nowotwór w ciągu życia sięga 40%, śmierci z powodu nowotworu niemal 20% ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Manuskrypt dysertacji p. Macieja Prusinowskiego obejmuje 170 stron. Praca ma typowy układ rozpraw doktorskich, składa się z rozdziałów: wstęp (31 stron), materiały i metody (41 stron), wyniki i dyskusja (68 stron); ponadto zawiera spis treści, wykaz skrótów, cel pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, podsumowanie i bibliografię liczącą 124 pozycje. Autor umieścił w manuskrypcie 33 tabele oraz 43 rysunki, w tym 37 oryginalnych, przedstawiających wyniki eksperymentów.

W rozdziale „Wstęp” Doktorant opisał budowę, funkcję i znaczenie telomerów, telomerazy i białek kompleksu Shelterin chroniących końce chromosomów. Autor zarysował strategię przeciwnowotworowe ukierunkowane na składniki kompleksu telomerazy oraz zaprezentował główne typy inhibitorów telomerazy oraz Shelterin. Ponadto przedstawił istotne aspekty metodyki oczyszczania białek, szczególnie białek z etykietami fuzyjnymi ułatwiającymi ich izolację i poprawiającymi ich rozpuszczalność, a także proteaz stosowanych do usuwania etykiet fuzyjnych po izolacji. Szczególną uwagę Doktorant poświęcił etykietom, które wykorzystywał w swojej pracy, czyli oligohistydynowej, ubikwitynowej oraz FH8, antygeny powierzchniowego pochodzącego z przywry *Fasciola hepatica*.

Rozdział „Materiały i metody” zawiera wyczerpujące zestawienie wykorzystywanych odczynników, materiałów, technik laboratoryjnych i aparatury. Warto tu zwrócić uwagę na bardzo drobiazgowy opis technologii BLitz do pomiaru oddziaływań między białkami i innymi molekułami, która jest oparta na interferometrii optycznej i nie wymaga stosowania barwników lub znaczników. Niestety, przy szerokim zakresie badań łatwo pominąć ważne szczegóły. W zestawieniu użytych plazmidów Autor podaje źródło, czyli firmę Genescript, ale nie określa, czy te plazmidy pochodziły z kolekcji, czy zostały zsyntetyzowane na zamówienie; przydatne byłoby zwłaszcza podanie odnośników do sekwencji nukleotydowych tych plazmidów. Opis mutagenyzy ukierunkowanej warto byłoby zilustrować schematem.

Opis wyników jest przejrzysty i staranny, wnioski poprawne, dyskusja oszczędna, co odpowiada charakterowi pracy, której celem było uzyskanie białek kompleksu Shelterin i potwierdzenie ich aktywności. Warto docenić pomysł zaprezentowania wszystkich badanych białek i peptydów na jednym żelu elektroforetycznym (Rys. 10). Godne uznania jest potwierdzenie aktywności białek kompleksu Shelterin za pomocą dwóch niezależnych podejść, czyli tradycyjnej techniki EMSA i nowoczesnej technologii BLitz, tym bardziej, że Autor otrzymał łącznie 8 białek TRF1 i TRF2, w tym warianty fuzyjne, delecyjne, po usunięciu domeny fuzyjnej, a ponadto samodzielnie przygotował proteazę TEV do odcinania etykiet fuzyjnych. Zadaniem Doktoranta było także przygotowanie kilku rodzajów DNA do testów. Niezwykle ciekawa jest z sukcesem wdrożona koncepcja jednoczesnego wprowadzenia etykiety oligohistydynowej w celu oczyszczania białka fuzyjnego i domeny FH8 w celu poprawy jego rozpuszczalności i proteolitycznego usunięcia tych etykiet po izolacji białka. Mam niewiele uwag krytycznych dotyczących opisu i dyskusji wyników. Dane w Tabeli 32 niekoniecznie pokazują, jak pisze Doktorant, „najmniejszy stosunek molowy, w którym białka kompleksu Shelterin wykazują zdolność do tworzenia kompleksów białko-DNA z

telomerowym dsDNA". Np. na Rys. 32 oddziaływanie Myb2 z DNA jest ewidentne dla wszystkich pokazanych stosunków molowych. Rozróżnienie „wyników widocznych” i „wyników widocznych wyraźnie” nie wydaje się trafne. Jeśli przy mniejszym stężeniu białka widać opóźnienie migracji części DNA, a przy większym, całości, to w obydwu wypadkach efekt będzie wyraźny. Większe opóźnienie prążka DNA nie musi oznaczać silniejszego wiązania przez białko, ale inną konformację kompleksu lub przyłączenie większej liczby podjednostek białka do DNA. Korzystne byłoby formułowanie wniosków w sposób bardziej powściągliwy. Np. Autor pisze: „rezultaty testów EMSA kompleksów białko-DNA wykazały, że obecność etykiety His nie wpływa na oddziaływanie rekombinantowych białek kompleksu Shelterin z telomerowym DNA” (s. 160). Bardziej precyzyjny byłby zapis: eksperyment nie wykazał wpływu etykiety His na oddziaływanie białek z telomerowym DNA.

Poprawność językowa i terminologiczna oraz poziom edytorski manuskryptu są zadowalające. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na kilka drobnych potknięć. W tytule Autor użył „terminu białka rekombinowane”, dalej konsekwentnie posługuje się terminem „białka rekombinantowe”, jak wydaje się, kalką wyrażenia „recombinant protein” z języka angielskiego, zastosowanego w miejsce znacznie częstszej w literaturze naukowej w języku polskim formy „białko rekombinowane”. Sugerowałbym tu wybór formy ogólnie przyjętej. Podczas lektury natknąłem się też na kilka tzw. błędów anakolutycznych, z których jeden zacytuję, żeby ułatwić w przyszłości zwalczanie tych, jak myślę, trudnych do wykrycia usterek. „Odstąpienie telomerów powoduje szybką śmierć komórki lub jej starzenie, nawet przy braku skracania telomerów, unikając w ten sposób niedociągnięcia przy hamowaniu telomerazy”(s. 28). Taka konstrukcja sugeruje, że odstąpienie telomerów unika niedociągnięcia, ale lepiej brzmi „pozwala uniknąć”. Poza tym, słowo „bezproblemowe” w wyrażeniu „bezproblemowe usunięcie domeny Ub z fuzji” (s. 40) warto zastąpić przez „skuteczne” lub „łatwe”, a zamiast „połowę reakcji rozdzielano” (s. 132) powinno być „połowę mieszaniwy reakcyjnej rozdzielano”. Podkreślam jednak, że takie drobne potknięcia wobec skali całej pracy nie mają istotnego znaczenia.

Dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 10 referatów, 7 posterów i dwie publikacje z listy filadelfijskiej w bardzo dobrych czasopismach biotechnologicznych. P. Prusinowski nie jest w tych artykułach pierwszym autorem, jednak uwzględnić, że celem pracy Doktoranta było ogromnie wymagające i pracochłonne przygotowanie platformy do badań molekularnych *in vitro*. Zapewne użycie tego modelu pozwoli na uzyskanie kolejnych rezultatów. Można więc oczekiwać, że ten trudny etap przygotowawczy przyczyni się do powstania cennych publikacji z wiodącym udziałem p. Macieja Prusinowskiego.

Poniżej przedstawiam kluczowe pytania, które nasunęły mi się podczas lektury tej pracy, a których dyskusję uważałbym za cenną podczas obrony rozprawy.

1. Czy Doktorant rozważał użycie w testach EMSA buforów do elektroforezy bez dodatku wersenianu sodowego chelatującego jony magnezowe, które wchodzą w skład buforu reakcyjnego?
2. Czy Doktorant może przedstawić inne modele kompleksu Shelterin opisane w literaturze naukowej i ich użycie do testowania związków przeciwnowotworowych?
3. Czy na podstawie uzyskanych wyników Doktorant może zaproponować kompozycję modelu molekularnego do testowania inhibitorów białek kompleksu Shelterin?

Podsumowując, chciałbym podkreślić imponujący zakres wykonanych przez Doktoranta prac eksperymentalnych i ich potencjalnie wielką przydatność do testowania związków chemicznych jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Sformułowanie uwag krytycznych w recenzji zwykle wymaga więcej miejsca niż wyrazów uznania. Podniesione wyżej pytania i drobne zastrzeżenia nie pomniejszają mojej szczególnie wysokiej oceny pracy Doktoranta i jego dokonań.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr. 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 wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki zawarte w art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Macieja Prusinowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na zakres, jakość i znaczenie wykonanych prac eksperymentalnych wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Macieja Prusinowskiego.

