UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
PRACOWNIA GENETYKI MOLEKULARNEJ I WIRUSOLOGII
KIEROWNIK
PROF. DR HAB. HANNA ROKITA

12 marca 2012 r.

Recenzja
pracy doktorskiej p. mgr Rafała Kamińskiego
pt „The analysis of the interactions between HIV-1 protein Rev, viral RRE RNA and a host cell factor Purα"

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy analizy oddziaływań białka Rev wirusa niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) z cząsteczkami wirusowego RNA, zawierającymi sekwencje odpowiedzialne za wiązanie białka Rev, oraz z białkiem komórkowym Purα.

Pomimo prawie 30-tu lat badań, wirus niedoboru odporności HIV-1 stanowi spore wyzwanie dla badaczy i lekarzy. Niewątpliwym postępom w leczeniu zakażeń wirusem HIV-1 towarzyszy nieustanne poszukiwanie nowych sposobów zwalczania skutków infekcji tym stale mutującym lentiwirusem powodującym powstawanie oporności na kolejne leki przeciwwirusowe.

Praca doktorska p. mgr Kamińskiego jest kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych w zespole ko-promotora rozprawy, prof. K. Khalili z Uniwersytetu Temple w Filadelfii w USA. W badaniach tych udowodniono, że białko komórkowe Purα wiąże się z ważnym białkiem regulatorowym wirusa, Tat (ang. **t**rans**a**ctivator of **t**ranscription), zmieniając jego funkcję w zakażonej wirusem komórce. Wyniki opisane przez Autora w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej dotyczą innego białka wirusa HIV-1, Rev (ang. **r**egulator of **e**xpression of **v**irion proteins), ważnego regulatora cyklu życiowego wirusa. Białko Rev wiąże się specyficznie do sekwencji RRE (ang. Rev responsive element) znajdującej się w drugim intronie w genie env i umożliwia transport cząsteczek mRNA zawierających introny do cytoplazmy. W ten sposób możliwa jest translacja wirusowych białek i enkapsydacja pełnych (zawierających introny) transkryptów. Zdolność białka Purα do rozpoznawania i wiązania powtórzonych sekwencji typu GGN w

UL. GRONOSTAJOWA 7
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 (12) 664 6337
EMAIL:HANNA.ROKITA@UJ.EDU.PL

RRE, skłoniła Autora do próby wyjaśnienia roli tego białka w transporcie wirusowego mRNA zawierającego introny.

Chociaż jak sam Autor podkreśla, jego praca nie pokazuje wpływu badanego białka komórkowego na przebieg zakażenia wirusem HIV-1 czy zmiany ekspresji białek wirusowych w zakażonych komórkach, jest to niewątpliwie ważna praca, gdyż jej wyniki mogą stać się podstawą opracowania skutecznych inhibitorów cyklu życiowego wirusa HIV-1 w komórkach poprzez celowanie do komórkowych kofaktorów białek wirusowych, jakim jest np. białko Purα. Wyniki zawarte w rozprawie zostały już opublikowane w postaci dwóch prac oryginalnych w J Cell Biochem i Cancer Biol Ther o łącznym IF ok. 6,0 w 2008 r. i co ważne w obu p. Rafał Kamiński jest pierwszym autorem.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, napisana w języku angielskim z racji miejsca wykonania doświadczeń, jest niezbyt obszerna (liczy łącznie 71 stron), ale zawiera wszystkie wymagane części i jest zwięzła. W 15-stronicowym starannie opracowanym wstępie opisano samego wirusa HIV-1, jego cykl życiowy, ważne wirusowe białka oraz eksport cząsteczek wirusowego RNA z jądra do cytoplazmy. Autor opisuje także funkcje białka komórkowego Purα oraz komórkowy eksport jądrowo-cytoplazmatyczny. Moja uwaga krytyczna do tego rozdziału dotyczy danych zebranych w Tabeli 1 (str. 19-20), w której chyba tylko z powodu zbytniej skromności (bo wyniki zostały już opublikowane) Autor nie umieścił badanego przez siebie białka Purα jako czynnika komórkowego, dla którego wykazano oddziaływanie z białkiem wirusowym Rev. W rozdziale tym cytowana jest praca Levy 2007 (str. 11), której brak w spisie piśmiennictwa a także nie zamieszczono pełnego cytowania danych bibliograficznych (Stoltzfus, str. 14, wiersz 7 od dołu).

Rozdział „Materiały i Metody" jest napisany dość skrótowo na 8 stronach więc niekiedy można odnieść wrażenie, że Autor stosował powszechnie znane techniki. Tymczasem poza hodowlą komórkową, immunoblottingiem czy izolacją białek oraz RNA, są to dość skomplikowane metody, jak np. klonowanie szeregu konstruktów genetycznych dla uzyskania ekspresji pełnych i zmutowanych białek, transformacja bakterii plazmidowym DNA, mutageneza ukierunkowana, transfekcja ludzkich komórek plazmidowymi wektorami, wyciszanie ekspresji genów z wykorzystaniem siRNA, izolacja białek fuzyjnych z ekspresji w bakteriach, reakcja odwrotnej transkrypcji, reakcja łańcuchowa polimerazy DNA, metoda hybrydyzacji typu Northern, immunoprecypitacja RNA (RIP) i koimmunoprecypitacja białek oraz analiza białek oddziałujących z badanym RNA metodą EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). W rozdziale tym jest sporo błędów

literowych i językowych, ale przede wszystkim brak wyjaśnienia powodu wyboru linii komórkowej glejaka U87MG do badania interakcji białek wirusowych i RNA wirusowego z białkiem komórkowym Purα. Zastosowana linia komórek nowotworowych nie jest naturalnym miejscem rozwoju wirusa HIV-1, gdyż są nimi ludzkie limfocyty T pozytywne pod względem receptora CD4 i makrofagi.

Wyniki badań stanowią najobszerniejszy rozdział pracy, zostały przedstawione na 20 stronach w postaci 13 złożonych rycin. W pierwszej części badań opisanych w rozprawie zanalizowano wpływ białka Purα na funkcję wirusowego białka Rev transfekując komórki U87-MG plazmidem reporterowym oraz plazmidami ekspresyjnymi dla białek Rev i Purα. Stosując dwa układy oparte na aktywności genów reporterowych (acetylotransferazy chloramfenikolu i lucyferazy) zależnej od sekwencji RRE wiążącej białko Rev udowodniono, że nadekspresja białka Purα zwiększa stymulujący efekt białka Rev na ekspresję genów reporterowych. Co ciekawe, nadekspresja samego białka Purα także podnosiła w cytoplazmie zawartość RNA, które zawierało introny. Zastosowanie inhibitora eksportyny 1, antybiotyku leptomycyny B, pozwoliło zahamować wpływ białka Rev na aktywność lucyferazy i w ten sposób wykazać specyficzność efektu Purα na aktywność białka Rev. Zastosowanie zjawiska interferencji RNA do wyciszenia endogennej ekspresji białka Purα na poziomie jego transkryptu pozwoliło pokazać spadek ekspresji genu lucyferazy w przypadku sekwencji regulatorowej RRE. Dla tego wyniku brakuje próby interpretacji zaobserwowanego znacznego niemal 10-krotnego obniżenia zawartości białka Purα w komórkach skutkującego tylko ok. 20% spadkiem aktywności reporterowego genu (Fig. 3). Wydaje się, że taki wynik wyklucza wyłączną rolę Purα w aktywacji białka Rev. Użycie serii mutantów delecyjnych obu białek Rev i Purα pozwoliło pokazać ważny wynik, że tylko białka o pełnej długości zawierające wszystkie funkcjonalne domeny zwiększały aktywności stosowanych genów reporterowych. Z kolei próba koekspresji obu badanych białek wykazała, że białko Purα zwiększa zawartość transportowanych przez Rev cząsteczek mRNA z sekwencją RRE w cytoplazmie a więc niewątpliwie posiada bezpośredni wpływ na transport mRNA z udziałem białka Rev.

W drugiej części badań zgromadzono dane wskazujące na wzajemne wiązanie się białek Rev i Purα. Najpierw metodą mikroskopii fluorescencyjnej udowodniono wspólną lokalizację białek Rev i Purα w komórce. Uzyskane w wyniku ekspresji z odpowiednio skontruowanych plazmidów białka fuzyjne wykazujące zieloną (dla Purα) i czerwoną (dla Rev) fluorescencję wykryto w rejonie okołojądrowym choć samo białko Rev występuje też w jąderku a Purα także w cytoplazmie. Następnie w teście wiązania białek fuzyjnych z transferazą S glutationową (GST) GST-Rev i

GST-Purα oraz ich mutantów delecyjnych z białkami komórek transfekowanych plazmidami ekspresyjnymi dla białka Purα lub Rev pokazano, że Purα wiąże się z białkiem Rev o pełnej długości ale szczególnie ważny w białku Rev jest rejon obejmujący aminokwasy 18-50, w którym znajduje się sygnal lokalizacji jądrowej (NLS), domena wiążąca RNA (RBD) oraz domena odpowiedzialna za powstawanie multimerów Rev (MD). Z kolei dla białka Purα w podobnym teście wykazano istotną rolę aminokwasów 73-123 w wiązaniu z białkiem Rev. Ponadto metodą ko-immunoprecypitacji pokazano obecność i lokalizację głównie w cytoplazmie kompleksów Purα/Rev w komórkach stransfekowanych plazmidem reporterowym zawierającym sekwencję RRE oraz plazmidami ekspresyjnymi dla rekombinowanych białek Purα (z metką T7) i Rev (z metką c-myc i His).

W trzeciej (ostatniej) serii doświadczeń Autor zgromadził dowody na udział sekwencji RNA w oddziaływaniach obu badanych białek. Dzięki zastosowaniu testu opóźnienia wędrówki w żelu – EMSA z RNA zawierającym region RRE jako sondą i rekombinowanymi białkami Rev i Purα (w fuzji z GST), pokazał, że Purα wiąże się nie tylko z istniejącym kompleksem Rev/RRE i zwiększa ich zawartość, ale także samo może wiązać się z sekwencjami RNA niezwiązanymi z Rev. Do tej części wyników można mieć zastrzeżenia wynikające z użycia białek fuzyjnych a nie czystych, gdyż trudno ocenić wpływ „metki" w postaci GST na wiązanie z wyznakowanym RNA. Ponadto, jak wynika z Fig, 11 i 12, część próbek białek była inkubowana przy niedomiarze sondy (np. ścieżki 3-5 i 8-10 – Fig. 11A). Wreszcie test immunoprecypitacji RNA pozwolił pokazać, że wiązanie Purα z Rev i RNA z sekwencją RRE ma miejsce w cytoplazmie komórek w hodowli in vitro. Podsumowując opisane w rozprawie wyniki należy podkreślić, że we wszystkich doświadczeniach zadbano o włączenie właściwych kontroli, co wymagało np. przygotowania serii plazmidów kontrolnych. Nie wskazano natomiast liczby powtórzeń poszczególnych doświadczeń. W tym rozdziale brak numeracji ścieżek w Fig. 1B i 1C, Fig. 2B, 6C, 10 a Fig. 13 pomyłkowo oznaczono jako 14. W Fig. 6C (str. 43) pomylono położenie produktów hybrydyzacji z sondą CAT.

Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo ciekawy i poparta wieloma danymi z opublikowanego piśmiennictwa. Autor wiele miejsca poświęca roli białka Purα w komórce, jego zdolności do wiązania się do mRNA i rybosomowego RNA, co wyraźnie sugeruje jego rolę w kierowaniu transkryptów do miejsc translacji. Bardziej dogłębna analiza wiązania się Purα do specyficznych sekwencji w RNA i białku wirusowym Rev skłoniła Autora do wysnucia hipotezy, że białko Purα pomaga helikazom RNA tak przekształcić „ładunek" w postaci mRNA, że możliwa jest jego translokacja przez pory jądrowe do cytoplazmy. Nie pozostawiono także bez komentarza

zdolności białka Purα do wiązania się do DNA oraz współdziałania tego białka z innym białkiem regulatorowym wirusa, Tat. Interesująco omówiono również ogólny zarys potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genomu retrowirusów. Niewątpliwie ciekawa a niewyjaśniona dotychczas byłaby rola białka Purα w eksporcie transkryptów wirusowych posiadających introny niezależnie od białka Rev, w obecności inhibitora eksportu jądrowego, leptomycyny B. Niekoniecznie byłoby to przekierowanie mRNA na inne szlaki eksportu jądrowego a być może efekt nadekspresji białka Purα.

W streszczeniach angielsko- i polsko-języcznym, które są poprawnie zredagowane, znalazła się nieścisłość dotycząca transportu jądrowo-cytoplazmatycznego (strony odpowiednio 6 i 8), niesłusznie sugerująca, że eksport z jądra komórkowego dotyczy jedynie cząsteczek rRNA. W streszczeniu polsko-języcznym trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że „zwiększenie różnorodności cząsteczek mRNA (przez alternatywny splicing) powoduje zwiększenie pojemności genetycznej genomu wirusa". Chodzi tu na pewno o zwiększenie „pozornej" pojemności genomu, gdyż fizycznie genom nie powiększa się.

Poza dyskusją Autor załączył rozdział „Wnioski", w których w 4 punktach krótko podsumowuje uzyskane wyniki.

Praca jest napisana poprawnie, dobrze zredagowana i ilustrowana, choć niektóre schematy są zbyt pomniejszone (Fig. 4A, 5A i 7). Legendy rycin są napisane bardzo szczegółowo z podaniem wszystkich istotnych informacji. Poza błędami literowymi i interpunkcyjnymi znaleziono pomyłki, które omówiono przy poszczególnych rozdziałach pracy.

Niezależnie od wspomnianych powyżej drobnych uwag wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie **p. mgr Rafała Kamińskiego** do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Hanna Rokita