

## Autoreferat

1. Imię i nazwisko:

Yusuke Azuma

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

26.03.2012r. **Doktor nauk farmaceutycznych w dziedzinie Nauki Przyrodnicze**

Studia doktoranckie w Szkole Podyplomowej Nauk Farmaceutycznych, Kyoto University, Kioto, Japonia

Tytuł dysertacji: Wprowadzenie funkcji przełączania metali do białek przy użyciu ligandów trójkleszczowych

(oryginalny tytuł w języku japońskim: 3座配位子を用いた金属スイッチ能のタンパク質への導入)

Promotor : Prof. Dr. Shiroh Futaki

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

10.2018 - obecnie     Adiunkt w Małopolskim Centrum Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

10.2012 – 09.2018     Staż podoktorski w Laboratorium Chemii Organicznej,  
ETH Zurich, Zurych, Szwajcaria (grupa Donalda Hilverta)

04.2012 – 09.2012     Staż podoktorski w Instytucie Badań Chemicznych,  
Kyoto University, Uji, Japonia (grupa Shiroh Futaki)

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Tytuł osiągnięcia:

**"Przekształcanie kompartmentów syntazy lumazyny do zastosowań bionanotechnologicznych".**

#### 4.1. Publikacje

Osiągnięcia zostały opublikowane jako artykuły naukowe jak poniżej;

1. **Azuma Y**, Zschoche R, Tinzl M, Hilvert D

Quantitative packaging of active enzymes in a protein cage

*Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1531-1534.

DOI: 10.1002/anie.20150841

IF = 16.600, MEiN = 200

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na:

Wymyśleniu kluczowego pomysłu badawczego; wykonaniu większości eksperymentów; analizie danych; częściowym pozyskaniu finansowania; przygotowaniu manuskryptów i rycin do publikacji. Biorąc wszystko razem pod uwagę, mój procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi co najmniej 60%.

2. **Azuma Y**, Bader DLV, Hilvert D

Substrate sorting by a supercharged nanoreactor

*J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 860–863

DOI: 10.1021/jacs.7b11210

IF = 15.000, MEiN = 200

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na:

Wymyśleniu projektu; wykonaniu większości eksperymentów; analizie danych; częściowym pozyskaniu finansowania; przygotowaniu manuskryptów i rycin do publikacji. Biorąc wszystko razem pod uwagę, mój procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi co najmniej 70%.

3. **Azuma Y**, Herger M, Hilvert D

Diversification of protein cage structure using circularly permuted subunits

*J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 558–561.

DOI: 10.1021/jacs.7b1051

IF = 15.000, MEiN = 200

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na:

Wymyśleniu projektu; wykonaniu większości eksperymentów; analizie danych; częściowym pozyskaniu finansowania; przygotowaniu manuskryptów i rycin do

publikacji. Biorąc wszystko razem pod uwagę, mój procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi co najmniej 70%.

4. **Azuma Y**, Zschoche R, and Hilvert D

The C-terminal peptide of *Aquifex aeolicus* riboflavin synthase directs encapsulation of native and foreign guests by a cage-forming lumazine synthase

*J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 10321–10327.

DOI: 10.1074/jbc.C117.79031

IF = 4.800, MEiN = 140

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na:

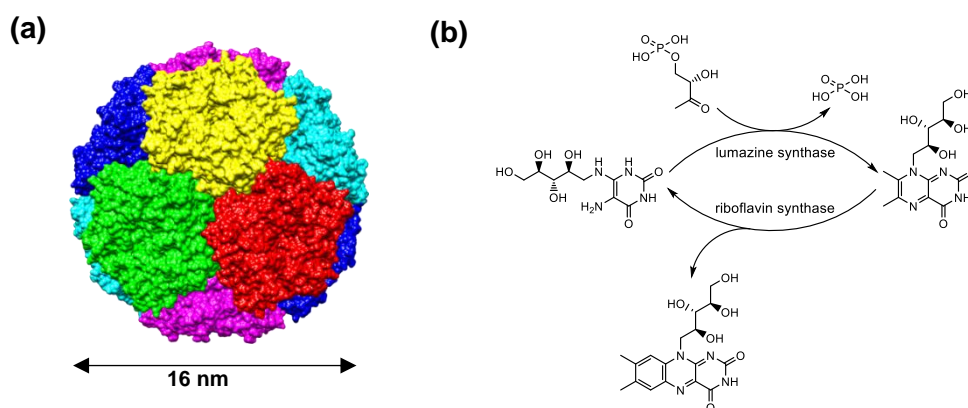
Wykonaniu większości eksperymentów; analizie danych; częściowym pozyskaniu finansowania; przygotowaniu manuskryptów i rycin do publikacji. Biorąc wszystko razem pod uwagę, mój procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi co najmniej 60%.

#### **4.2. Ogólny zarys badań**

Klatki białkowe to puste w środku, nanometrowe cząsteczki zbudowane z samoorganizujących się podjednostek białkowych<sup>1,2</sup> Struktury te występują licznie w przyrodzie i odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych. Wśród tych znajdziemy: ochronę i transport materiału genetycznego (kapsydy wirusów),<sup>3,4</sup> mineralizację żelaza (ferrytyna),<sup>5</sup> proteostazę (chaperony i proteasomy)<sup>6,7</sup>, a także tworzenie wydzielonych przedziałów dla krótkich szlaków metabolicznych (mikrokompartymenty bakteryjne).<sup>8</sup> Naturalnie występujące klatki białkowe, z perspektywy bioinżynierii, są bardzo atrakcyjnymi strukturami ze względu na ich homogeniczny charakter, możliwość wydajnej produkcji w postaci białek rekombinowanych, a także łatwość ich modyfikacji za pomocą metod chemicznych i genetycznych. Z uwagi na te cechy, adaptacja naturalnych klatek białkowych w celu dostosowania ich struktur i funkcji do danych potrzeb jest obecnie popularnym obszarem badawczym, a dziedzina ta jest dynamicznie rozwijana dzięki potencjalnym zastosowaniom w biomedycynie, katalizie oraz biologii syntetycznej.<sup>1,2</sup>

Załadunek potencjalnych cząsteczek „gości” do wnętrza klatek białkowych jest niezbędnym krokiem do wykorzystania ich w zastosowaniach bionanotechnologicznych. By osiągnąć ten cel, grupa Donalda Hilverta, mojego doradcy na stażu doktorskim, opracowała wydajny system załadunku, oparty na

tworzącym klatki enzymie, syntazie lumazyny, pochodzącej z hipertermofilnych bakterii *Aquifex aeolicus*, AaLS.<sup>9</sup> Wiadomo, że białko to tworzy dwunastościenne struktury złożone z 60 identycznych monomerów (**Ryc. 1**)<sup>10</sup> i w naturze zawiera następującą po nim w szlaku enzymatycznym, syntazę ryboflawiny, co pozwala na zwiększenie wydajności reakcji biosyntezy ryboflawiny (witaminy B2) (**Ryc. 1b**).<sup>11</sup> By osiągnąć sztucznie wymuszony załadunek wybranych białek „gości” gruba Donalda Hilverta wprowadziła cztery ujemnie naładowane reszty glutaminianowe na wewnętrznej powierzchni klatki białka typu dzikiego (AaLS-wt), uzyskując w ten sposób AaLS-neg. Zabieg ten pozwolił na wydajny załadunek białek zawierających przeciwnie naładowany znacznik dekaargininy (R10).<sup>12</sup> Dalszy rozwój tej technologii poprzez zastosowanie technik kierowanej ewolucji (*ang. directed evolution*) zaowocował wariantem AaLS-13 o zwiększonym ładunku ujemnym i usprawnionej zdolności załadunku.<sup>13</sup> Dzięki temu poza białkami ze znacznikiem R10, do wnętrza klatki AaLS-13 możliwym stało się wprowadzenie dodatnio naładowanego wariantu białka zielonej fluorescencji, GFP(+36), zachodzące samoistnie po prostym zmieszaniu obu białek w roztworze.<sup>14</sup>



**Ryc. 1. Syntaza lumazyny z *Aquifex aeolicus* (AaLS).** (a) Struktura krystaliczna kompleksu AaLS (PDB: 1HQK). Poszczególne pentameryczne podjednostki przedstawione są z wykorzystaniem różnych kolorów. (b) Szlak biosyntezy ryboflawiny (witaminy B2).

W celu udoskonalenia wyżej opisanej metody załadunku, opracowałem: (1) **wydajne podejście do załadunku enzymów**, wykorzystujące GFP(+36) jako znacznik kierunkowy oraz (2) **system sortowania substratów** dla enzymów zamkniętych w klatkach. Dodatkowo, stworzyłem dwie strategie załadunku białek „gości” w żywych komórkach, wykorzystując (3) **permutację kołową oraz klatki o**

**strukturze mozaikowej**, a także (4) **naturalnie występujący znacznik sortowania**.

Oba podejścia przyczyniły się do znacznego rozszerzenia możliwości zastosowania klatek białkowych opartych na AaLS.

### **4.3. Zawartość poszczególnych publikacji**

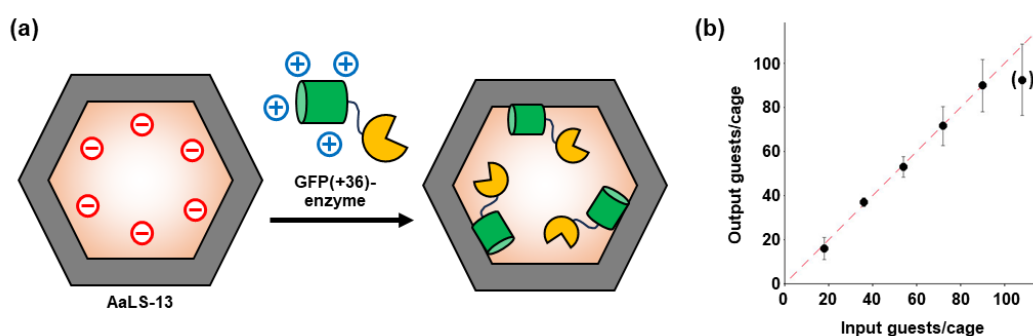
#### **4.3.1. Załadunek enzymów z wykorzystaniem GFP(+36) jako znacznika kierującego**

**Azuma Y**, Zschoche R, Tinzl M, and Hilvert D, Quantitative packaging of active enzymes in a protein cage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1531-1534.

Enkapsulacja enzymów jest naturalną i powszechnie występującą strategią w komórkach, umożliwiającą optymalizację reakcji metabolicznych lub biosyntetycznych w zatłoczonych środowiskach takich jak cytozol. W komórkach eukariotycznych enkapsulacja realizowana jest poprzez organelle wydzielone błonami lipidowymi, natomiast w bakteriach ma on miejsce dzięki obecności otoczek białkowych. Główne przykłady tego zjawiska to zamknięte w klatkach białkowych szeregi enzymów takie jak karboksosomy wiążące węgiel w cyjanobakteriach, lub przedziały utylizacji propanediolu (Pdu). Poprzez ograniczenie dyfuzji z i do zamkniętej przestrzeni, otoczki te umożliwiają lokalne zateżnienie lotnych substratów, wychwyty toksycznych półproduktów, a także zapobiegają zachodzeniu reakcji ubocznych.<sup>15</sup> Zastosowanie tych mechanizmów dla sztucznie enkapsulowanych enzymów jest znakomitym przykładem tego jak klatki białkowe mogą zostać wykorzystane jako doskonały system kontroli aktywności katalitycznej enzymów.

Wykorzystując elektrostatycznie sterowaną enkapsulację AaLS-13, opracowałem strategię, w której GFP(+36) pełni rolę znacznika załadunku enzymów do klatek białkowych. W tej pracy, modelowy enzym – retroaldolaza (RA)<sup>16</sup> – został połączony z GFP(+36) za pomocą inżynierii genetycznej by uzyskać białko fuzyjne GFP(+36)-RA. Po zmieszaniu GFP(+36)-RA z oczyszczonymi klatkami białkowymi AaLS-13 (**Ryc. 2a**) enzym fuzyjny został załadowany do klatek AaLS-13 z niemal 100% wydajnością – około 90 cząsteczek „gości” na klatkę (**Ryc. 2b**).<sup>17</sup> Dodatkowo, jako iż system ten pozwala na kontrolę ilości cząsteczek „gości” wprowadzanych do klatek w ramach tej pracy możliwe było zbadanie wpływu zatłoczenia molekularnego na aktywność katalityczną RA.

Kompatybilność systemu enkapsulacji oraz jego wpływ na aktywność katalityczną została zbadana dodatkowo dla 8 różnych enzymów, ujawniając zakres biokatalizatorów z nim kompatybilnych. Podczas gdy enkapsulacja przebiega wydajnie dla monomerycznych enzymów o umiarkowanym ładunku powierzchniowym, załadunek enzymów posiadających wysokie ładunki ujemne netto do klatek AaLS-13 zdaje się być niemożliwy, najprawdopodobniej ze względu na odpychanie elektrostatyczne. Enkapsulacja enzymów tetramerycznych również okazała się być problematyczna. Po zmieszaniu z AaLS-13, enzymy tego typu tworzyły agregaty i wytrącały się z roztworu, przypuszczalnie z powodu zbyt wysokiego dodatniego ładunku czterech znaczników GFP(+36). Możliwe, iż, w przypadku tych enzymów, dopasowanie ładunku powierzchniowego enzymu lub GFP jest wymagane do poprawnej enkapsulacji w klatkach AaLS-13. Pomimo wspomnianych tu ograniczeń związanych ze strukturą cząsteczek „gości”, przedstawiona strategia załadunku enzymów za pośrednictwem GFP(+36) znakomicie nadaje się jako wzorzec dla przyszłych „inteligentnych” nanoreaktorów.



**Rys. 2. Załadunek enzymu do klatek białkowych AaLS-13 za pośrednictwem GFP(+36).** (a) Schemat przedstawiający enkapsulację enzymu w klatce AaLS-13 przy użyciu GFP(+36) jako znacznika kierującego. (b) Wykres zależności liczby enkapsulowanych białek fuzyjnych GFP(+36)-RA na klatkę AaLS-13 od początkowego stosunku białek podczas ich zmieszania. Podano średnie  $\pm$  odchylenia standardowe obliczone dla trzech niezależnych eksperymentów. Dopasowanie liniowe (z wyłączeniem punktu w nawiasach) opisane jest współczynnikiem kierunkowym bliskim 1 (czerwona przerywana linia).

#### 4.3.2. Sortowanie substratów za pomocą oddziaływań elektrostatycznych

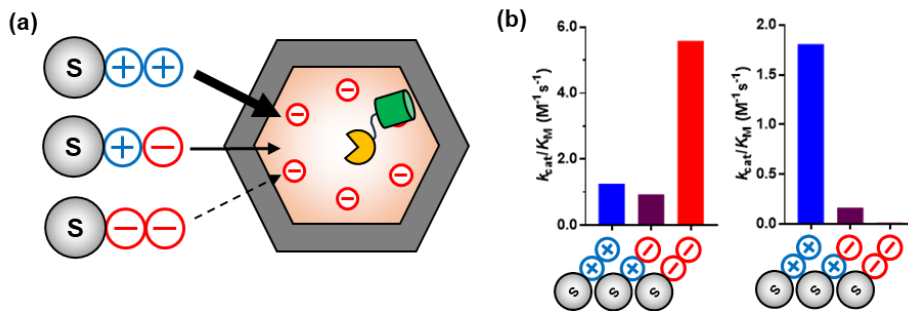
**Azuma Y, Bader DLV, and Hilvert D, Substrate sorting by a supercharged nanoreactor**

We wspomnianych powyżej naturalnych mikrokompartmentach (mikroprzedziałach) bakteryjnych, półprzepuszczalny charakter otoczki białkowej jest kluczowy do kontrolowania procesów enzymatycznych. Wcześniejsze badania tych struktur sugerują, że transport małych cząsteczek do i z tych przedziałów kontrolują pory obecne w podjednostkach je budujących. Podobnie, struktura porów musi mieć znaczenie w klatkach białkowych wykorzystywanych jako „komory” dla „nanoreaktorów” enzymatycznych. Dobrym przykładem tego mechanizmu są badania, w których wykazano, że wprowadzenie ujemnie naładowanych aminokwasów w pobliżu porów kapsydu bakteriofaga MS2 zmniejsza aktywność zamkniętej w nim fosfatazy poprzez ograniczenie wnikania ujemnie naładowanych substratów.<sup>18</sup>

W celu opracowania alternatywnej metody – metody kontroli reakcji enzymatycznych wewnątrz klatek białkowych nie bazującej na inżynierii porów – zapostulowałem, że do tego celu wykorzystane mogą zostać również interakcje pomiędzy danym substratem a powierzchnią wewnętrzną klatki białkowej. By zweryfikować tę hipotezę wykorzystałem proteazę pochodzącą z wirusa TEV, peptyd zawierający sekwencję rozpoznawaną przez tę proteazę (tev-K1) oraz jego zmodyfikowane znacznikami kierunkowymi analogi. Wśród tych przygotowałem peptyd zawierający heksalizynę (tev-K7E0), naprzemienne reszty lizyn oraz glutaminianów (tev-K4E3) lub heksaglutaminian (tev-K1E6). Proteaza TEV została załadowana do klatek AaLS-13 przy użyciu systemu wykorzystującego GFP(+36) opisanego powyżej. Według moich założeń powstały w ten sposób „nanoreaktor” powinien promować wychwyt i hydrolizę dodatnio naładowanych peptydów, jednocześnie hamując reakcje dla tych obdarzonych ładunkiem ujemnym (**Rys. 3a**).

Zgodnie z moimi przewidywaniami, proteaza TEV zamknięta w „nanoreaktorze” AaLS-13 trawi peptyd posiadający dodatnio naładowany znacznik wydajniej, niż te ze znacznikiem neutralnym lub ujemnie naładowanym. Enkapsulacja w AaLS-13 zatem „odwraca” naturalną specyficzność substratową proteazy GFP(+36)-TEV ( $k_{cat}/K_M$ ) około 480 razy (**Rys. 3b**), z dominującym wpływem zmiany  $K_M$ . Podobne wyniki dla sortowania substratów przez enkapsulowaną proteazę TEV otrzymano również dla przygotowanych substratów białkowych o różnych ładunkach powierzchniowych. Wyniki te potwierdzają, iż nanoreaktory posiadające

wysoko naładowane wewnątrz, stanowią prosty i uniwersalny sposób modulowania specyficzności substratowej enkapsulowanych enzymów.



**Rys. 3. Sortowanie substratów z wykorzystaniem naładowanego nanoreaktora (a)** Schemat sortowania substratów poprzez proteazę TEV enkapsulowaną w klatce białkowej AaLS-13. (b) Wydajność katalityczna proteazy fuzyjnej GFP(+36)-TEV bez (po lewej) lub z zastosowaniem (po prawej) klatki białkowej AaLS-13 cięcia peptydu posiadającego znaczniki kierunkowe o różnym ładunku.

#### 4.3.3. Permutacja kołowa

**Azuma Y**, Herger M, and Hilvert D, Diversification of protein cage structure using circularly permuted subunits, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 558–561.

Opisywany tu system oparty na oddziaływaniach elektrostatycznych pozwala na łatwy i wszechstronny sposób samoistnego załadunku cząsteczek „gości” do klatek AaLS po zmieszaniu obu komponentów w roztworze. Brak w nim jednak selektywności, którą obserwowana jest w naturalnych środowiskach wewnątrzkomórkowych. Fakt ten potwierdza, to że wytwarzany w *Escherichia coli* AaLS-13 zanieczyszczony jest dodatnio naładowanymi białkami pochodzącymi z komórek gospodarza.<sup>13</sup> By rozwiązać ten problem, zaprojektowałem alternatywny system enkapsulacji oparty na tzw. „permutacji kołowej” (*ang. Circular Permutation*) AaLS, fuzji genetycznej oraz tworzeniu struktur mozaikowych białek polimerycznych w cytozolu komórek gospodarza (**Rys. 4**).

Permutacja kołowa jest szeroko stosowaną metodą, polegającą na zmianie pozycji C- oraz N- końca białka z jednoczesnym zachowaniem jego ogólnej struktury. Dzięki tej technice przygotowałem wariant cpAaLS, w którym N- i C-końce skierowane są wewnątrz klatki, tak by białka gości dołączone do monomerów cpAaLS na drodze fuzji genetycznej znalazły się wewnątrz klatki białkowej po jej

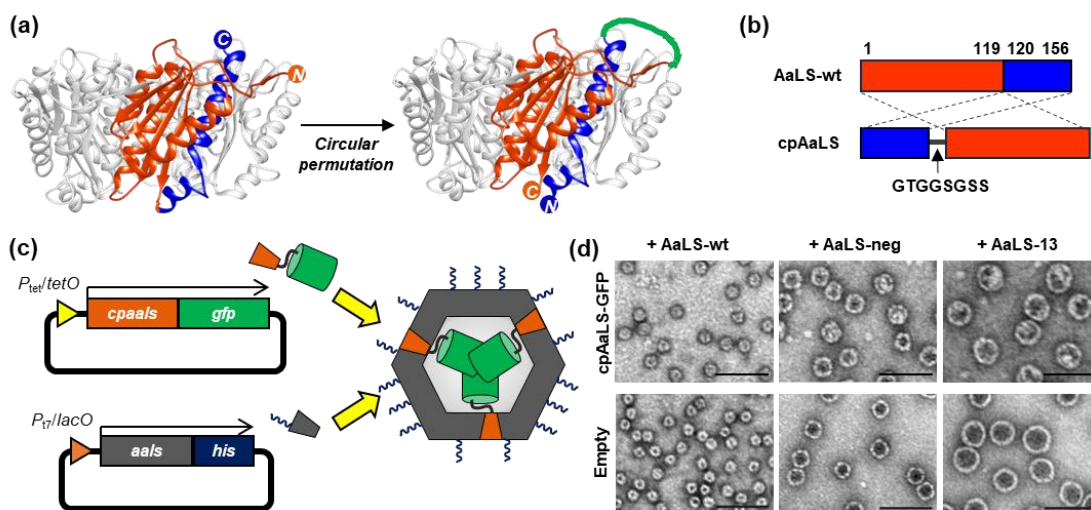


uformowaniu. Oryginalne natywne końce N i C AaLS, w cpAaLS zostały połączone za pomocą elastycznego łącznika o długości 8 aminokwasów (**ryc. 4ab**). Modyfikacja ta niespodziewanie zmieniła morfologię struktur tworzonych przez cpAaLS – wariant ten łączy się w struktury sferyczne o wielkości 24 nm lub 28 nm i rurki o szerokości 24 nm, w przeciwieństwie do macierzystego białka AaLS-wt, które tworzy wyłącznie sferyczne cząsteczki o wielkości 16 nm.

Forma w jakiej występuje cpAaLS może być dobrana poprzez modyfikację długości łącznika łączącego końce natywne. Po zmianie oryginalnego łącznika na peptydy o długości 8, 12 i 16 aminokwasów, zawierające znacznik polihistydynowy, jako dominującą populację można otrzymać odpowiednio rurki o szerokości 24 nm, struktury sferyczne o szerokości 28 nm i szerokości 24 nm.

Przygotowany wariant cpAaLS został następnie połączony za pomocą inżynierii genetycznej z modelowym białkiem GFP (cpAaLS-GFP), i poddany koekspresji wraz z AaLS-wt w celu utworzenia struktury mozaikowej klatek. W takiej strukturze podjednostki klatki zbudowane są z mieszaniny cpAaLS i AaLS-wt produkowanych równocześnie w komórce gospodarza *E. coli* (**Ryc. 4c**). Mimo opisanej powyżej różnorodnej morfologii zaobserwowanej dla samego cpAaLS, koekspresja z AaLS-wt poskutkowała otrzymaniem monodispersyjnych cząstek o średnicy 16 nm, wykazujących sygnał fluorescencyjny pochodzący od GFP. Oznacza to, iż kształt i rozmiar cząstek wyprodukowanych z użyciem tego systemu w komórkach żywych, jest determinowany przez główny składnik, tu AaLS-wt. Fakt ten potwierdza rozmiar klatek dla cpAaLS-GFP koekspresjowanego z ujemnie naładowanymi wariantami AaLS. Dla tych układów wyizolowane cząstki miały rozmiar podobny do klatek gospodarza AaLS-neg (~28 nm) i AaLS-13 (~40 nm), a ich wnętrza zawierały GFP.

Zaprezentowana tu innowacyjna metoda dzięki swojej kompatybilności z wcześniej zaprojektowanymi wariantami, znacznie poszerza zakres możliwości systemu enkapsulacji w AaLS. Dodatkowo, powyższe badania wskazują na to, iż permutacja kołowa jest potencjalnie uniwersalną strategią modulowania właściwości białek tworzących klatki oraz ich załadunku.



**Rys. 4. Permutacja kołowa AaLS.** (a,b) Schemat wytworzenia kołowo permutowanego wariantu AaLS zilustrowany dla struktury podjednostki pentamerycznej (a) oraz odpowiadający mu schemat drugorzędowej sekwencji białka (b). Monomer białka zaznaczony jest kolorem pomarańczowym dla reszt 1-119 i niebieskim dla reszt 120-156. (c) Schemat tworzenia mozaikowatej klatki w komórkach *E. coli*. P<sub>tet</sub>/tetO, promotor tetracykliny; tetO, operon tetracykliny; P<sub>T7</sub>, promotor T7; lacO, operon laktozowy. (d) Zdjęcia transmisyjnego mikroskopu elektronowego otrzymane dla struktur cpAaLS-GFP z AaLS-wt, AaLS-neg i AaLS-13 (góra) w porównaniu z odpowiadającymi im pustymi klatkami AaLS (dół). Pasek skali skalowany na 100 nm.

#### 4.3.4. Naturalny system sortowania

Azuma Y, Zschoche R, and Hilvert D, The C-terminal peptide of *Aquifex aeolicus* riboflavin synthase directs encapsulation of native and foreign guests by a cage-forming lumazine synthase, *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 10321–10327.

Mimo wielu metod sztucznego załadunku cząsteczek „gości” do AaLS, jego naturalny odpowiednik – mechanizm za pomocą którego syntazy lumazynowe (LS) są wypełniane w przyrodzie – długo nie był dobrze poznany. W 1980 r. odkryto, że syntaza lumazynowa *Bacillus subtilis* (BsLS) enkapsuluje homotrimeryczną syntazę ryboflawiny (RS) wewnątrz swojej dwunastościennej klatki.<sup>20</sup> Lata później, zasugerowano, iż kolokalizacja obu enzymów jest korzystna dla poprawy ogólnej szybkości reakcji tworzenia ryboflawiny przy niskich stężeniach dostępnego substratu.<sup>21</sup> Od tamtej pory tworzenie kompleksu RS/LS nie zostało wykryte w

żadnym innym organizmie, a mechanizm enkapsulacji gościa pozostawał niewyjaśniony.

W ramach opisywanej w tej sekcji pracy odkryłem, że tworzenie kompleksu RS/LS zachodzi dla enzymów z *Aquifex aeolicus*, AaRS i AaLS, nawet kiedy białka te są wyprodukowane jako białka rekombinowane w komórkach *E. coli*. Dodatkowo, zidentyfikowałem sekwencję o długości 12 aminokwasów obecną na C-końcu AaRS, która pełni rolę sekwencji kierującej cząsteczkę „gościa” (naturalnie AaRS) do klatek AaLS. Wykazałem również, iż wykorzystanie tego naturalnie występującego systemu jest możliwe dla arbitralnie wybranego białka „gościa”. Po wyposażeniu modelowego białka GFP w peptyd pochodzący z AaRS, białko to zostało z powodzeniem załadowane do klatek AaLS.

Przedstawiona w tej sekcji metodologia w połączeniu z opisanym wcześniej systemem mozaikowym cpAaLS, dostarcza narzędzi do przygotowywania "szytych na miarę" przedziałów subkomórkowych o pożądanym właściwościach.

#### **4.4. Dyskusja i perspektywy**

Stworzony przeze mnie system załadunku oparty na oddziaływaniach elektrostatycznych stanowi uniwersalną strategię mogącą służyć do enkapsulacji enzymów w klatce białkowej. Oprócz opisanych powyżej metod załadunku i sortowania substratów, system wykorzystujący GFP(+36), został dalej rozwinięty by przygotować układy naśladujące karboksosomy, a także mogące przeprowadzać ściśle kontrolowaną syntezy polimerów.<sup>22, 23</sup> Co istotne, przedstawiona tu metodologia nie ogranicza się wyłącznie do białka AaLS. Aby klatka białkowa była z nią kompatybilna wystarczy, iż klatka posiada ujemnie naładowane wnętrze, które umożliwi enkapsulację dowolnej cząsteczki wyznakowanej GFP(+36). Przykład takiej adaptacji dostępny jest w literaturze dla ferrytyny pochodzącej z *Archaeoglobus fulgidus*.<sup>24</sup> Dodatkowo, ze względu na to iż powierzchnie klatek AaLS-13 mogą być łatwo zmodyfikowane przy użyciu metod chemicznych,<sup>25</sup> genetycznych,<sup>26</sup> i enzymatycznych<sup>27, 28</sup>, system ładowania za pośrednictwem GFP(+36) sprawia, że klatki AaLS-13 mogą znaleźć zastosowanie biomedyczne jako nośniki leków czy też platformy prezentujące antygen .

Nie jest jasne, GFP(+36) i sprzężone z nim konstrukty fuzyjne wprowadzane są do złożonych uprzednio klatek białkowych AaLS-13. Struktura tych klatek, otrzymana za pomocą mikroskopii krioelektronowej, sugeruje iż może to być możliwe dzięki

dużym porom obecnym w 72 pentamerycznych podjednostkach białka<sup>17</sup>. Otwory te najprawdopodobniej umożliwiają białkom „gościom” dyfuzję do i z wnętrza otoczki białkowej. Taki mechanizm dobrze wyjaśnia dlaczego GFP(+36) i jego pochodne są szybko i wydajnie enkapsulowane w klatkach po zmieszaniu z AaLS-13 w roztworze.<sup>29</sup> Oznacza to również, iż klatki AaLS-13 prawdopodobnie nie są w stanie kontrolować transportu małych cząsteczek, w przeciwieństwie do opisanych uprzednio naturalnie występujących bakteryjnych mikrokompartmentów, które zapewniają ścisłą regulację dyfuzji z i do komór reakcyjnych. Z punktu widzenia inżynierii białek, a w szczególności i budowy precyzyjnych nanoreaktorów, nie jest to problematyczne, gdyż jak wykazano dla proteazy TEV, interakcja między substratem a wnętrzem klatki może zapewnić pożądany mechanizm sortowania molekularnego.

Przedstawiona tu permutacja kołowa jest wysoce wydajną metodą kontroli morfologii generowanych klatek białkowych. Oprócz opisanego powyżej szeregu dostępnych form zaobserwowanych dla cpAaLS dobrym przykładem zastosowania tej techniki jest permutowany kołowo wariant białka powłoki przedziału Pdu. Dla tego wariantu zmiana uległa czwartorzędowa struktura podstawowego bloku budulcowego tej klatki – z natywnego heksamery na pentamer. To z kolei poskutkowało zmianą struktury klatki na strukturę dwunastościenną, nie występującą dla tego białka w naturze.<sup>30</sup> Przykłady te podkreślają jak istotne są dalsze badania białka cpAaLS i jego morfologicznej plastyczności, jako iż zrozumienie jej podstaw pozwoliłoby na dalsze postępy w projektowaniu i montażu sztucznych klatek białkowych. Za względu na powyższe, w naszym laboratorium obecnie prowadzone są szeroko zakrojone badania strukturalne i biofizyczne białka cpAaLS.

Fuzja genetyczna i zastosowanie klatek mozaikowych z wykorzystaniem wariantów cpAaLS prezentowane na łamach tej pracy stanowią wysoce wydajną metodę enkapsulacji białek gości w klatkach białkowych AaLS w żywych komórkach. Mimo iż system oparty na oddziaływaniach elektrostatycznych pozwala na enkapsulację w żywych komórkach<sup>19</sup>, zastosowanie białek fuzyjnych zawierających cpAaLS zapewnia wydajność załadunku bliską 100%. Ze względu na swoją użyteczność cpAaLS znalazł zastosowanie jako platforma do projektowania i ewolucji cząsteczek imitujących wirusów, które są w stanie enkapsulować RNA w sposób specyficzny dla rozmiaru lub sekwencji.<sup>31-33</sup> Co ciekawe, jeden z niedawno opisanych wariantów cpAaLS, który został wygenerowany w celu ochrony materiałów genetycznych gości przed nukleazami, wykazywał budowę ścian kapsydu o liczbie

trójkątnej  $T = 3$ , utworzoną z mieszaniny pentamerycznych i heksamerycznych bloków budulcowych, nigdy wcześniej nie obserwowanych w przypadku syntaz lumazyny.<sup>33</sup> Podkreśla to dodatkowo użyteczność systemu cpAaLS, a także zawarty w nim potencjał plastyczności morfologicznej, która może zostać zastosowana do generowania nowych nanoprzędziałów o strukturze i funkcji występującej w naturze.

Kierowanie enzymów do mikroprzedziałów białkowych z wykorzystaniem specyficznych sekwencji kierunkowych jest strategią powszechnie występującą w przyrodzie. Peptydy pełniące tę funkcję zostały zidentyfikowane dla enkapsuliny oraz dla przedziałów Pdu i utylizacji etanoloaminy (Eut).<sup>34-36</sup> Co więcej, w ramach moich badań wykazano, że RS z innych mikroorganizmów posiadają segmenty C-końcowe o wzorach sekwencji (IXXXFL) podobnych lub identycznych z AaRS, co sugeruje wspólny mechanizm tworzenia kompleksów występujący u różnych gatunków. Odkrycie, że C-końcowa domena RS z *Bacillus subtilis*, BsRS, występuje jako znacznik sortujący białek, który kieruje do zapakowania w pokrewną LS potwierdza tą obserwację.<sup>37</sup> Wykorzystanie fuzji genetycznej tego typu peptydów kierujących z wybranymi cząsteczkami „gośćmi” pozwala na ich dostarczenie i załadunek do wybranych przedziałów białkowych.<sup>38,39</sup> Technologia ta, wraz z elektrostatycznie napędzanym załadunkiem i cpAaLS, zapewnia modularną i potężną platformę do budowy sztucznych przedziałów subkomórkowych o niestandardowych, pożądanym funkcjach.

#### 4.5. Bibliografia

1. Edwardson, T. G. W.; Lévassieur, M. D.; Tetter, S., *et al.*, *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 9145-9197.
2. Aumiller, W. M.; Uchida, M.; Douglas, T., *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 3433-3469.
3. Sun, S.; Rao, V. B.; Rossmann, M. G., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 114-120.
4. Roos, W. H.; Ivanovska, I. L.; Evilevitch, A., *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1484-1497.
5. Liu, X.; Theil, E. C., *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 167-175.
6. Hayer-Hartl, M.; Bracher, A.; Hartl, F. U., *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 62-76.
7. Kish-Trier, E.; Hill, C. P., *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 29-49.
8. Kerfeld, C. A.; Aussignargues, C.; Zarzycki, J., *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 277-290.
9. Azuma, Y.; Edwardson, T. G. W.; Hilvert, D., *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 3543-3557.
10. Zhang, X.; Meining, W.; Fischer, M., *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1099-1114.

11. Ladenstein, R.; Fischer, M.; Bacher, A., *FEBS J.* **2013**, *280*, 2537-2563.
12. Seebeck, F. P.; Woycechowsky, K. J.; Zhuang, W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4516-4517.
13. Wörsdörfer, B.; Woycechowsky, K. J.; Hilvert, D., *Science* **2011**, *331*, 589-592.
14. Wörsdörfer, B.; Pianowski, Z.; Hilvert, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 909-911.
15. Chen, A. H.; Silver, P. A., *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 662-670.
16. Giger, L.; Caner, S.; Obexer, R., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 494-498.
17. Sasaki, E.; Böhringer, D.; van de Waterbeemd, M., *et al.*, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14663.
18. Glasgow, J. E.; Asensio, M. A.; Jakobson, C. M., *et al.*, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 1011-1019.
19. Zakaszewski, D.; Koziej, L.; Pankowski, J., *et al.*, *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11*, 6540-6546.
20. Bacher, A.; Baur, R.; Eggers, U., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 632-637.
21. Kis, K.; Bacher, A., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16788-16795.
22. Frey, R.; Mantri, S.; Rocca, M., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10072-10075.
23. Frey, R.; Hayashi, T.; Hilvert, D., *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10423-10426.
24. Tetter, S.; Hilvert, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 14933-14936.
25. Kaster, M. A.; Levasseur, M. D.; Edwardson, T. G. W., *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.* **2023**, *6*, 591-602.
26. Levasseur, M. D.; Mantri, S.; Hayashi, T., *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 838-843.
27. Tytgat, H. L. P.; Lin, C.-w.; Levasseur, M. D., *et al.*, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5403.
28. Levasseur, M. D.; Hofmann, R.; Edwardson, T. G. W., *et al.*, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200332.
29. Zschoche, R.; Hilvert, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 16121-16132.
30. Jorda, J.; Leibly, D. J.; Thompson, M. C., *et al.*, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5041-5044.
31. Azuma, Y.; Edwardson, T. G. W.; Terasaka, N., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 566-569.
32. Terasaka, N.; Azuma, Y.; Hilvert, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 5432-5437.
33. Tetter, S.; Terasaka, N.; Steinauer, A., *et al.*, *Science* **2021**, *372*, 1220-1224.
34. Fan, C.; Cheng, S.; Liu, Y., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 7509-7514.
35. Choudhary, S.; Quin, M. B.; Sanders, M. A., *et al.*, *PLoS One* **2012**, *7*, e33342.
36. Sutter, M.; Boehringer, D.; Gutmann, S., *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 939-947.
37. Han, X.; Woycechowsky, K. J., *Biochemistry* **2017**, *56*, 6211-6220.
38. Rurup, W. F.; Snijder, J.; Koay, M. S. T., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3828-3832.
39. Frank, S.; Lawrence, A. D.; Prentice, M. B., *et al.*, *J. Biotechnol.* **2013**, *163*, 273-279.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

### **5.1 Staż podoktorski w ETH Zürich, Zurych, Szwajcaria**

Okres: 10.2012 – 09.2018

Na stażu podoktorskim pracowałem nad projektami inżynierii klatek białkowych kierowanymi przez prof. Donalda Hilverta w ETH Zurich, Szwajcaria. To szkolenie w zakresie inteligentnego projektowania białek i bionanotechnologii było kluczowe dla osiągnięć naukowych wymienionych w niniejszym wniosku habilitacyjnym i stanowiło podstawę mojej obecnej działalności naukowej. Część prac była wspierana finansowo przez stypendium Uehara Memorial Foundation (10.2012 – 09.2013) oraz stypendium ETH (10.2013 – 09.2015).

### **5.2. Staż na Uniwersytecie w Poczdamie, Niemcy**

Okres: 06.2012 – 09.2012 Naukowiec wizytujący

10.2011 – 11.2011 Naukowiec wizytujący

Podczas studiów doktoranckich i tuż po nich, stosując podejście ewolucyjne prowadziłem badania nad inżynierią peptydów inhibitorowych, które specyficznie wiążą się z onkogennym białkiem HBZ. Projekt ten jest wynikiem współpracy między grupami kierowanymi przez prof. Shiroh Futaki (Uniwersytet w Kioto), prof. Masaki Matsuoka (Uniwersytet w Kioto) i prof. Katję Arndt (Uniwersytet w Poczdamie). Mój pobyt w Poczdamie był wspierany przez Uniwersytet Kioto w ramach programu Globalne Centra Doskonałości (G-COE) (finansowanego przez Japońskie Towarzystwo Promocji Nauki (JSPS)) (10.2011 – 11.2011) oraz Jednostkę Edukacyjną Uniwersytetu w Kioto / Program dla Globalnych Liderów (finansowany przez Japońską Agencję Nauki i Technologii) (06.2012 – 09.2012).

### **5.3. Doktorant na Uniwersytecie w Kioto, Japonia**

Okres: 04.2009 – 03.2012 Studia doktoranckie (Nauki Farmaceutyczne)

04.2007 – 03.2009 Studia magisterskie (Nauki Farmaceutyczne)

W ramach studiów magisterskich i doktoranckich prowadziłem badania nad rozwojem nowych metod wprowadzania trójkleszczowych cząsteczek ligandowych do peptydów/białek w celu kontrolowania struktury i funkcji poprzez dodanie jonów metali. Eksperymenty były wykonywane głównie w grupie prof. Shiroh Futaki w Instytucie Badań

Chemicznych na Uniwersytecie w Kioto, podczas gdy syntezę organiczną zaprojektowanych związków wykonywałem również w grupie prof. Takeo Kawabata w tym samym instytucie. Moje studia doktoranckie były wspierane przez Stypendium naukowe dla młodych naukowców (DC1) z Japońskiego Towarzystwa Promocji Nauki (JSPS) (04.2009 – 03.2012).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

#### **6.1.1. Nauczanie na kursach**

**Wykładowca** chorób zakaźnych w Kyoto Barber&Beauty College, Kioto, Japonia

- prowadzenie wykładów dla studentów szkoły fryzjerskiej na temat chorób zakaźnych, których znajomość jest wymagana do zdania egzaminu licencyjnego.
- przeprowadzanie i ocena egzaminów końcowych

**Asystent na kursie** Chemii biologicznej: Nukleotydy i węglowodany, ETH Zurich, Zurich, Szwajcaria

- prowadzenie wykładów w ramach sesji ćwiczeniowych, w czasie których studenci omawiali rozwiązania zadań domowych zadanych podczas głównych wykładów
- nadzorowanie grup studenckich prezentujących współczesne tematy z zakresu chemii biologicznej.

**Asystent na kursie laboratoryjnym** Chemii analitycznej, Uniwersytet Medyczny i Farmaceutyczny Toyama, Toyama, Japonia

- prowadzenie wykładów i wsparcie techniczne w zakresie technik: miareczkowanie pH i chelatowe, RP-HPLC oraz chemoluminescencjna ELISA,
- ocenianie sprawozdań studentów

#### **6.1.2. Nadzorowanie pracy laboratoryjnej studentów**

na Uniwersytecie w Kioto, w grupie Futaki

- **nadzorowanie studentów studiów magisterskich przez 2 lata,**
- projektowanie eksperymentów zgodnie z kierunkiem projektu,



- nauczane eksperymentów, w tym synteza organiczna, synteza peptydów, przygotowanie liposomów, hodowla komórek ssaczy, cytometria przepływowa (FACS), mikroskopia konfokalna,
- ocena prac magisterskich

w ETH Zurich, w grupie Hilvert

- **nadzorowanie 2 studentów studiów licencjackich przez 4 / 6 miesięcy oraz 5 studentów studiów magisterskich przez 3 miesiące,**
- przedstawienie tematu badań i projektowanie eksperymentów zgodnie z kierunkiem projektu,
- prowadzenie eksperymentów obejmujących syntezę organiczną, syntezę peptydów, klonowanie molekularne, ekspresję i oczyszczanie białek, analizę spektroskopową (absorbancja, fluorescencja i dichroizm kołowy), kinetykę enzymów, cytometrię przepływową, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM), metodę ukierunkowanej ewolucji,
- ocena raportów i prac dyplomowych

na Uniwersytecie Jagiellońskim, w grupie Heddle

- **nadzorowanie pracy laboratoryjnej 4 doktorantów,**
- projektowanie eksperymentów zgodnie z kierunkiem projektu,
- nauczanie eksperymentów obejmujących klonowanie molekularne, ekspresję i oczyszczanie białek, spektroskopię absorpcyjną i fluorescencyjną, kinetykę enzymów.

na Uniwersytecie Jagiellońskim, w grupie Azuma

- **nadzorowanie 3 studentów studiów magisterskich jako ich promotor,**
- **obecnie nadzorowanie 2 postdoców, 1 doktoranta i 2 magistrantów,**
- zapewnienie projektów, doradztwa naukowego, infrastruktury badawczej i budżetu,
- nauczanie eksperymentów, w tym metod ukierunkowanej ewolucji i kriogenicznej mikroskopii elektronowej.

### **6.1.3. Edukacja pedagogiczna**

Jednostka edukacyjna Uniwersytetu Kioto / Program dla globalnych liderów

- Aby zostać liderem wziąłem udział w serii kursów edukacyjnych. Tematy kursów obejmowały umiejętności prezentacji, umiejętności komunikacyjne

w języku angielskim, prawo własności intelektualnej oraz staż w laboratorium przemysłowym/akademickim.

EMBO Programy szkoleniowe dla młodych badaczy.

- Odkąd zostałem wybrany jako laureat Grantu Instalacyjnego EMBO, zapewniono mi liczne szkolenia edukacyjne. Takie kursy obejmowały kierowanie pracą laboratorium, zarządzanie projektami, negocjacje oraz samorozwój.

## **6.2 Osiągnięcia organizacyjne**

### **6.2.1. Organizacja grupy**

Jako starszy naukowiec pracujący w grupie Heddle na Uniwersytecie Jagiellońskim jestem odpowiedzialny za zarządzanie laboratorium. Do moich zadań należy;

- ustanawianie ogólnych zasad laboratoryjnych zgodnie z przepisami uniwersyteckimi i naszymi praktykami,
- przydzielanie członkom grupy indywidualnych zadań, takich jak utrzymanie sprzętu laboratoryjnego,
- informowanie członków grupy o tematach omawianych na spotkaniu liderów grup instytutowych.

Równocześnie prowadzę własną podgrupę składającą się z 2 postdoców, 1 doktoranta, 3 studentów studiów magisterskich, 1 technika i 1 pracownika administracyjnego.

Moje zadania jako lidera grupy obejmują;

- ustanowienie szczegółowych zasad działania grupy zgodnie z przepisami uniwersyteckimi i dobrymi praktykami,
- kierowanie projektami badawczymi członków grupy i rozważanie strategii publikacji,
- nadzorowanie i ocena raportów i prac dyplomowych studentów,
- pozyskiwanie funduszy na badania,
- planowanie wykorzystania budżetu,
- rekrutacja nowych członków grupy,
- konfigurowanie narzędzi badawczych i innej infrastruktury,
- utrzymanie strony głównej grupy i stron serwisów społecznościowych.

### **6.2.2. Praca na rzecz Instytutu**

Jestem członkiem administracyjnego programu studiów doktoranckich w dziedzinie nauk biomedycznych na Uniwersytecie Jagiellońskim. Jestem odpowiedzialny za przygotowanie i wdrożenie kursu wprowadzającego, w ramach którego doktoranci mogą zdobywać punkty ECTS w oparciu o nowe umiejętności badawcze uzyskane w podczas doktoratu.

### **6.2.3. Koordynacja wewnętrznej i zewnętrznej współpracy**

Jako lider grupy nawiązałem konstruktywną współpracę naukową zarówno z wewnętrznymi, jak i zewnętrznymi badaczami, w tym;

- prof. dr Juha T. Huiskonen, Uniwersytet Helsiński, Finlandia
- prof. dr Reidun Twarock, Uniwersytet w Yorku, Wielka Brytania
- dr Farzad Fetahi, Uniwersytet w Yorku, Wielka Brytania
- prof. dr Neil Ranson, Uniwersytet w Leeds, Wielka Brytania
- dr Matt Byrne, Diamond Light Source, Wielka Brytania
- prof. dr Peter Kast, ETH Zurych, Szwajcaria
- dr Kathrin Würth-Roderer, Uniwersytet w Zurychu, Szwajcaria
- prof. dr hab. Elżbieta Pyza, Uniwersytet Jagielloński, Polska
- dr hab. Neli Kachamakova-Trojanowska, Uniwersytet Jagielloński, Polska
- dr hab. Sebastian Glatt, Uniwersytet Jagielloński, Polska
- prof. dr hab. Jonathan G. Heddle, Uniwersytet Jagielloński, Polska

### **6.2.4. Popularyzacja nauki**

**Małopolska Noc Naukowców (09.2023, Kraków)**

Koordynator wydarzenia naukowego dla ogółu społeczeństwa, w tym wykładów na palące tematy naukowe i prostych eksperymentów w laboratorium.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

.....  
(podpis wnioskodawcy)