

Doktorant: Filip Bartnicki

Tytuł pracy:

„Zastosowanie aptamerów DNA w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych opartej na metkach fuzyjnych H₃, R₆, R₈ oraz Tat₄₉₋₅₇”

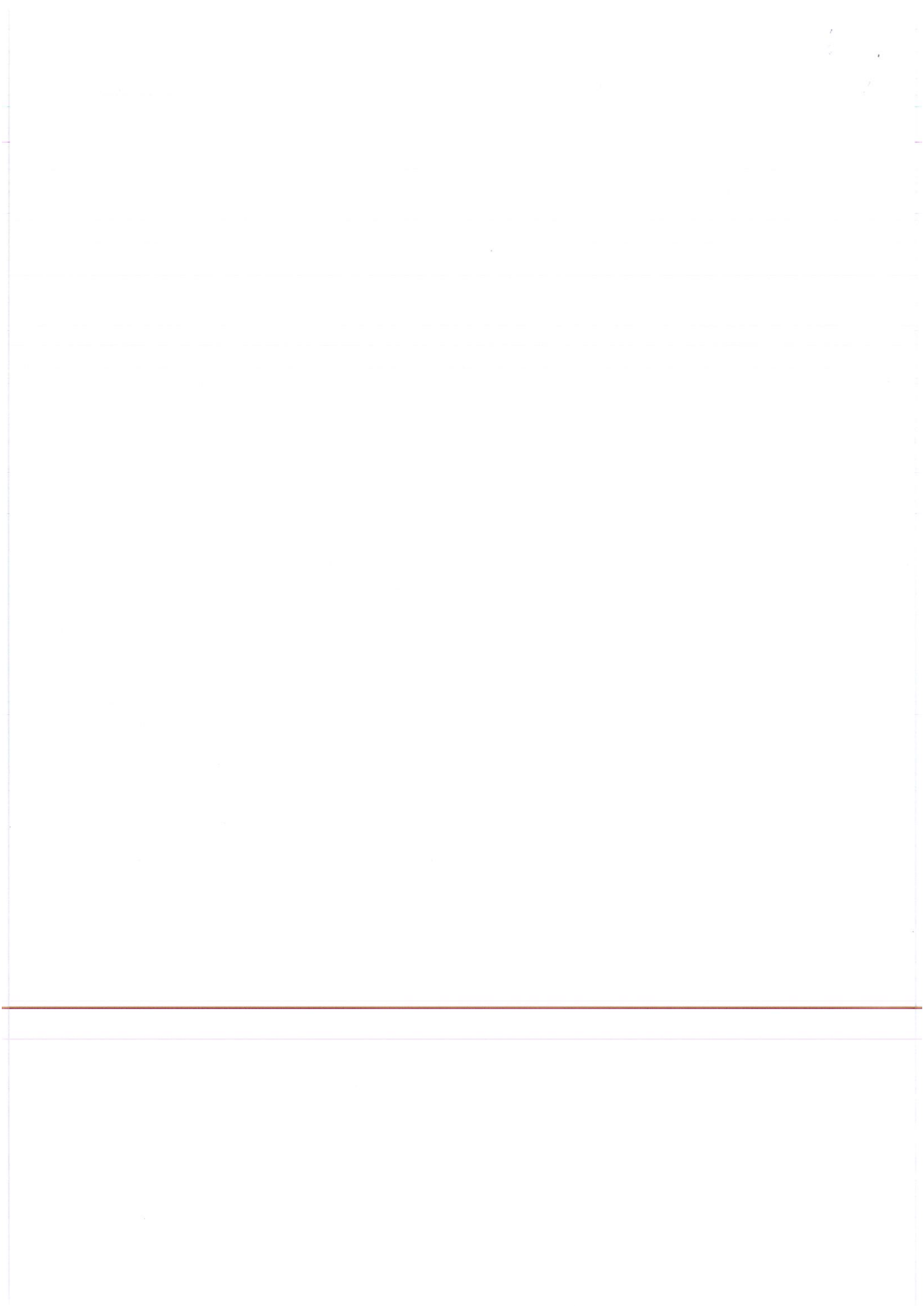
Promotor: dr hab. Wojciech Strzałka

STRESZCZENIE

Istotnym czynnikiem warunkującym rozwój nauk biologicznych, a także szeroko rozumianego przemysłu biotechnologiczno-farmaceutycznego jest dostęp do preparatów białkowych o bardzo wysokim stopniu czystości. Wszystkie z obecnie stosowanych systemów chromatografii powinowactwa służące do oczyszczania białek obarczone są pewnymi ograniczeniami mogącymi w określonych przypadkach wykluczyć bądź znacznie utrudnić ich zastosowanie. Z tego powodu niezwykle istotne są badania nad układami o nowych właściwościach, które w przyszłości będzie można zaadaptować na potrzeby chromatografii powinowactwa białek, rozszerzając w ten sposób spektrum dostępnych narzędzi badawczych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, korzystając z metody SELEX, opracowano dwa układy chromatografii powinowactwa przeznaczone do oczyszczania białek rekombinowanych. Pierwszy z nich oparty jest na specyficznym oddziaływaniu aptameru DNA (krótkiej cząsteczki ssDNA) z metką składającą się z trzech reszt histydyny (H₃). Drugi z układów wykorzystuje aptamer DNA wykazujący wysokie powinowactwo i specyficzność względem peptydu o sekwencji aminokwasowej RKKRRQRRR (Tat₄₉₋₅₇) oraz metek składających się z sześciu (R₆) albo ośmiu (R₈) reszt argininy.

Analiza właściwości biochemicznych aptameru B1 wiążącego metkę H₃ oraz 24-10 wiążącego metkę R₈ wykazała, że obie cząsteczki wydajnie wiązały jedynie te białka rekombinowane, które posiadały dołączone odpowiednie metki fuzyjne. Co więcej, wykazano, że aptamer 24-10 poza wiązaniem metki R₈ z powodzeniem wiązał również inne metki cechujące się wysoką zawartością reszt argininy: R₆ oraz Tat₄₉₋₅₇. W kolejnym etapie badań zidentyfikowano minimalną sekwencję nukleotydową badanych aptamerów, konieczną do efektywnego wiązania testowanych metek. Doprowadziło to do uzyskania skróconych cząsteczek zwanych dalej aptamerami H₃T i AR (będących pochodnymi odpowiednio aptamerów B1 i 24-10) o udoskonalonych parametrach wiązania metek fuzyjnych. W



kolejnym etapie badań opracowano metody elucji białek rekombinowanych, połączonych z odpowiednimi metkami ze złożeń chromatograficznych zawierających analizowane, zimmobilizowane cząsteczki ssDNA. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że dla aptameru H₃T i metki H₃ należało zastosować bufor elucyjny pozbawiony jonów soli, natomiast w przypadku metek bogatych w argininę i aptameru AR z powodzeniem wykorzystano bufor elucyjny zawierający stosunkowo niskie stężenia chlorowodoru guanidyny.

Ostatecznie udowodniono, że złoża chromatograficzne zawierające zimmobilizowany aptamer H₃T lub AR można wykorzystać do wielokrotnego oczyszczania białek rekombinowanych (zawierających dołączoną odpowiednią metkę fuzyjną) z ekstraktów białkowych przygotowanych z komórek *Escherichia coli*. Co więcej, w przypadku złoża chromatograficznego z unieruchomionym aptamerem H₃T wykazano, że w porównaniu z powszechnie stosowanym złożem Ni-NTA pozwala ono na uzyskiwanie preparatów białkowych cechujących się wyższym poziomem czystości.

Podsumowując, w efekcie przeprowadzonych badań dowiedziono, że opracowane aptamery DNA cechują się właściwościami umożliwiającymi stosowanie ich jako ligandów w układach chromatografii powinowactwa przeznaczonych do oczyszczania białek rekombinowanych zawierających metkę fuzyjną H₃, R₆, R₈ lub Tat₄₉₋₅₇.

Filij Bestuichi

