

Prof. Ewa Śledziwska-Gójska
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa

Warszawa, 31. 10. 2019

Recenzja pracy doktorskiej

zatytułowanej „Identyfikacja i charakterystyka aptameru DNA wiążącego metkę lizylową – zastosowanie w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych” Pani mgr Klaudii Arciszewskiej

Chromatografia powinowactwa to jedna z najbardziej efektywnych metod oczyszczania białek z mieszanin, w tym z ekstraktów komórkowych. W ponad półwiecznej historii rozwoju tej metody dokonano ogromnego postępu pozwalającego na szerokie stosowanie chromatografii powinowactwa zarówno w nauce jak i w przemyśle. Jednym z istotnych etapów rozwoju tej metody było wprowadzenie aptamerów nukleinowych jako ligandów. Aptamery nukleinowe, zarówno DNA jak i RNA, mają zdolność wiązania cząsteczek z powinowactwem podobnym do przeciwciał. Przy tym, w porównaniu do przeciwciał posiadają szereg dodatkowych zalet, są mniejsze, tańsze w produkcji, stabilniejsze w trakcie przechowywania, a możliwości ich modyfikacji są niemal nieograniczone. Stąd ogromne zainteresowanie nowymi systemami wykorzystującymi ligandy tej grupy w chromatografii powinowactwa.

Celem przedstawionej do oceny pracy była identyfikacja aptamerów wiążących rekombinowane białka posiadające przyłączone na N- albo C-końcu metki lizylowe.

Zagadnienie podjęte przez mgr Arciszewską jest istotne nie tylko ze względu na rozszerzenie możliwości użycia aptamerów w czyszczeniu białek, ale także ze względu na specyficzne właściwości metki lizylowej, która pełni nie tylko funkcję znacznika rozpoznawanego przez ligand w chromatografii powinowactwa. Specyficzne właściwości peptydów lizylowych przyłączonych do celu molekularnego pozwalają na zwiększenie jego zdolności penetracji do wnętrza komórki, a także umożliwiają jego immobilizację na powierzchniach stałych.

Praca została przedstawiona w typowym dla prac doświadczalnych układzie obejmującym: *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Wstęp*, *Cel pracy*,

Materiały i odczynniki, Metody, Wyniki, Dyskusję i Podsumowanie wyników oraz Bibliografię.

We wstępie autorka przybliżyła zagadnienia związane z różnymi metodami chromatografii w ogóle po czym przechodzi do szczegółowego omówienia chromatografii powinowactwa: metodologii tego procesu, jego ewolucji i możliwych modyfikacji. Skrupulatnie omówione też zostało zastosowanie w chromatografii powinowactwa w czyszczeniu produkowanych na drodze inżynierii genetycznej białek fuzyjnych, zawierających metki rozpoznawane przez różne ligandy. Szczególna uwaga została poświęcona metkom lizyłowym. Omówiono właściwości samej lizyny, peptydów lizylowych i wreszcie właściwości i zastosowanie metek lizylowych w chromatografii powinowactwa, immobilizacji białek na nośnikach stałych i w ich penetracji do wnętrza komórek. W tej części wstępu zakradł się chochlik, wynikający najpewniej z przeoczenia, który przesuwaa prace wykorzystujące α -poli-L-lizynę w badaniach drugorzędowych struktur peptydów o sto lat, do lat 70 i 80 dziewiętnastego wieku. Sporo miejsca autorka poświęciła budowie, i właściwościom aptamerów oraz metodzie ich selekcji. Przedstawiła przy tym także liczne zastosowania aptamerów zarówno w technikach chromatograficznych jak i w diagnostyce i terapii. W mojej ocenie rozdział *Wstęp* kompetentnie wprowadza czytelnika do dalszych części rozprawy.

W rozdziale dotyczącym celu pracy autorka w sposób przejrzysty przedstawiła szereg zadań, które zamierza zrealizować aby wyselekcjonować i scharakteryzować aptamer wiążący metkę lizylową, ustalić optymalne warunki jego zastosowania w chromatografii powinowactwa, a także sprawdzić możliwość wykorzystania wyselekcjonowanego aptameru, w metodzie ELONA.

W klarowny i systematyczny sposób opisane też zostały materiały i zastosowane w trakcie realizacji projektu metody z zakresu biologii molekularnej, biochemii białek, biofizycznej analizy zachodzących reakcji i bioinformatyki.

Wyniki pracy zostały przedstawione w dziewięciu podrozdziałach, zawierających dwadzieścia sześć często złożonych ilustracji wyników doświadczeń. W pierwszym etapie doktorantka przygotowała białka, które miały posłużyć do identyfikacji aptamerów wiążących metkę lizylową i przeprowadziła ich analizę. W tytule podrozdziału opisującego ten etap pracy wymienione są białka: GST, GFP, PCNA, PorB-6H i Rad1 oraz ich fuzyjne formy niosących różnej długości metki lizylowe przyłączone na C- albo N-końcu. Należy zwrócić uwagę, że białka użyte w pracy jak GST i GFP są

powszechnie używane w biologii molekularnej, z kolei czynnik procesywności replikacji DNA - PCNA, reperacyjne i rekombinacyjne białko Rad1 i poryna PorB pełnią istotne funkcje w biologii komórki.

Geny kodujące badane białka zostały sklonowane pod heterologicznym promotorem laktozowym i eksprymowane w systemie *Escherichia coli*. Wyniki czyszczenia białek metodami klasycznymi przedstawiono na zdjęciach żeli poliakrylamidowych, na których rozdzielono elektroforetycznie, w warunkach denaturujących, 15 preparatów białkowych i potwierdzono tożsamość oczyszczonych białek metodą hybrydyzacji typu western z odpowiednimi przeciwciałami (Rys. 9). W rozdziale tym nie znalazłam wyników czyszczenia zapowiedzianej w tytule fuzyjnej formy białka Rad1.

Selekcję pożądaných aptamerów przeprowadzono za pomocą modyfikacji techniki SELEX na pojedynczym ziarnie agarozowym, która to technika od kilku lat jest z sukcesem stosowana w pracowni prowadzonej przez pan dr hab. Wojciecha Strzałkę. W złożonym procesie selekcji wykorzystano kolejno formy fuzyjne trzech różnych białek PCNA, GST i GFP w celu weryfikacji specyficzności oddziaływania z metką lizylową. Selekcję przeprowadzono dla dwóch różnych bibliotek jednoniciowych DNA. W pierwszym etapie wyselekcjonowano aptamery wiążące metkę 7K zwaną z N-końcem ludzkiego PCNA. Najwyższy poziom współczynnika wzbogacenia pól aptamerów, określanego przy pomocy reakcji ilościowego PCR, uzyskano po szóstym cyklu selekcji. Wyselekcjonowane aptamery zostały sklonowane i zsekwencjonowane, w wyniku czego uzyskano 15 różnych sekwencji wyselekcjonowanych z biblioteki M oraz 4 różne grupy sekwencji wyselekcjonowane z biblioteki B. Kolejna analiza współczynnika wzbogacenia została przeprowadzona dla przedstawicieli poszczególnych grup sekwencji względem fuzyjnego białka 7K-GST. Dla sekwencji charakteryzujących się najwyższym współczynnikiem wzbogacenia potwierdzono specyficzność oddziaływania poprzez porównanie współczynników wzbogacenia względem 7K-GST i niezmodyfikowanego GST.

Kolejna weryfikacja oddziaływań pomiędzy wyselekcjonowanymi aptamerami i metką lizylową związaną z trzecim z kolei białkiem, GFP, została przeprowadzona metodą pull down. W rezultacie wyselekcjonowano dwa aptamery M13 i B7, po jednym z każdej z bibliotek, najwydajniej wiążące metkę lizylową. Pokazano też różnicę pomiędzy wiązaniem przez aptamery fuzyjnego białka GFP-7K i natywnego GFP stanowiącego negatywną kontrolę. Według autorki wiązanie obydwu aptamerów do GFP pozbawionego metki

lizylowej było zaniedbywalne. Czy to uznaniowe określenie można by było zastąpić wynikiem ilościowym i czy prążek widoczny w ścieżce oznaczonej jako 1 na żelu pokazanym na rysunku 14B odpowiada natywnemu GFP wyizolowanemu przy pomocy aptameru M13?

Istotnym etapem pracy była z jednej strony optymalizacja długości metki lizylowej, a drugiej strony określenie, które regiony w wyselekcjonowanych aptamerach są niezbędne do wiązania badanych metek fuzyjnych.

Przeprowadzono analizę bioinformatyczną DNA szczepu *Esherichia coli* BL21-DE3 w celu ustalenia częstości występowania traktów lizynowych w białkach tej często używanej do ekspresji heterologicznych białek bakterii. Nie stwierdzono obecności w analizowanych białkach traktów lizylowych równych pięć i więcej lizyn. Równocześnie sprawdzono dla fuzyjnych form GST niosących metki lizylowe różnej długości, że metka zawierająca 5 lizyn wykazuje najwyższe powinowactwo do badanych aptamerów. Rodzi się pytanie, czy użycie innego białka w fuzji z metką lizylową dałoby podobny wynik optymalizacji?

Z kolei do wyznaczenia minimalnych regionów aptamerów zdolnych do wydajnej interakcji z metką lizylową wykorzystano serię wariantów aptamerów M13 oraz B7 skróconych odpowiednio od 5', 3' lub 5' i 3' końca jednocześnie i badano metodą pull down ich powinowactwo do metki złożonej z pięciu lizyn (5K) w fuzyjnej formie białka PCNA. Jako optymalny do dalszego zastosowania w chromatografii powinowactwa wybrano najkrótszy z badanych wariantów aptameru M13, skrócony o 10 nukleotydów zarówno na końcu 3' jak i 5', o ostatecznej długości 60 nukleotydów, który wiązał 5K-PCNA z wydajnością ponad 143% w stosunku do aptameru wyjściowego. W podobny sposób uznano za optymalny wariant aptameru B7, skrócony o 20 nukleotydów od 5' i 3' końca, o ostatecznej długości 46 nukleotydów.

Powstałe w ten sposób zoptymalizowane aptamery, nazwane odpowiednio: M5K i B5K poddano dalszej szczegółowej charakterystyce. Badano udział soli metali w procesie wiązania M5K i B5K z białkiem opatrzonym metką 5K. Ustalono, że obecność KCl nie wpływa na wiązanie M5K, natomiast stymuluje wiązanie B5K i pokazano że optymalne dla tego wiązania jest 15 mM stężenie tej soli. Ustalono ponadto, że MgCl₂ interferuje z wiązaniem metki 5K przez obydwa aptamery. Efekt interferujący wykazano także dla NaCl w stężeniu powyżej 100mM.

Analizując struktury badanych aptamerów pokazano przy pomocy spektrometrii dichroizmu kołowego wpływ obecności chlorku potasu na zmianę struktury aptameru M5K. Stwierdzono też wpływ obecności metki 5K na strukturę aptameru B5K. Analiza denaturacji termicznej obydwu aptamerów wykazała z kolei, że przyjmują one stabilną konformację w temperaturze poniżej 20°C. Interesuje mnie pogląd doktorantki, dlaczego w obecność chlorku potasu, który wpływa na zmianę struktury aptameru M5K nie wpływa na jego wiązanie z metką lizylową.

Ustalenie warunków oddziaływania badanych aptamerów z metką lizylową pozwoliło doktorantce na porównanie wydajności wiązania białka niosącego metkę 5K z aptamerami M5K i B5K w warunkach dla każdego z nich optymalnych. Porównanie to przeprowadzone metodą pull down wykazało ponad czterokrotnie większą wydajność wiązania białka 5K-PCNA przez B5K niż M5K. Dlatego zdecydowano, że w dalszych badaniach wykorzystany został już tylko aptamer B5K. Dla tego aptameru wyznaczono przy pomocy techniki izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC) parametry wiązania z metką 5K. Ustalono, że 1 cząsteczka aptameru B5K najprawdopodobniej wiąże jedną cząsteczkę peptydu 5K, a także, że interakcja aptamer - metka jest korzystna energetycznie. Stała dysocjacji kompleksu wyniosła 1,92 μM .

W wyniku kolejnych analiz zdefiniowano skład buforu, który powodowałby destabilizację wiązania B5K z metką lizylową i równocześnie nie wpływałby na strukturę oczyszczanego białka. Takie warunki spełniał bufor pozbawiony chlorowodoru potasu, zawierający natomiast 200 mM chlorowodorek guanidyny. Wykorzystanie tego buforu dla związanego białka 5K-PCNA pozwoliło na uzyskanie ponad 99% wydajności elucji.

Wszystkie powyższe ustalenia sugerujące możliwość wykorzystania aptameru B5K w chromatografii powinowactwa białek opatrzonej metką lizylową zostały sprawdzone poprzez wykorzystanie kolumny upakowanej złożem agarozowym ze zimmobilizowanym aptamerem B5K do czyszczenia białek fuzyjnych z ekstraktu *Escherichia coli*. Czyszczono cztery białka opatrzone metką 5K: 5K-GST, 5K-PCNA, 5K-ProB oraz 5K-Rad1. Należy zwrócić uwagę, że dwa ostatnie białka należą do grupy białek o stosunkowo niskiej zawartości we frakcji białek rozpuszczalnych *Escherichia coli*. Użycie aptameru B5K pozwoliło na oczyszczenie wszystkich czterech białek do poziomu czystości około 80%. Co istotne pokazano także, że złożo z B5K może być używane wielokrotnie i pozwalając na uzyskanie podobnej czystości

preparatu aż do dziesiątego cyklu oczyszczania. Ilość preparatu uzyskanego po dziesiątym cyklu zmniejszyła się o około 40% w stosunku do ilości uzyskanej w pierwszym cyklu oczyszczania, co jest wynikiem nieidealnym ale akceptowalnym.

Dodatkowo doktorantka sprawdziła możliwość użycia B5K w detekcji białek opatrzonych metką lizylową w teście ELONA. Analiza wyników dla trzech białek fuzyjnych: 5K-PCNA, GFP-7K i 5K-Prob-6H wykazała skuteczność aptameru B5K w detekcji białek rekombinowanych posiadających metkę lizylową.

Z dużą przyjemnością przeczytałam interesująco i z dużą znajomością tematu napisaną dyskusję. Zawarto w niej krytyczne omówienie zalet i ale i ograniczeń wykorzystania w chromatografii powinowactwa różnych metek fuzyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem metek lizylowych. Omówiono także istotne czynniki optymalizacji układu chromatografii powinowactwa z użyciem aptamerów i nowatorskie jak sądzę użycie aptamerów w detekcji białek z metką lizylową, szczególnie wobec braku przeciwciał rozpoznających tę metkę. Specjalną uwagę zwraca część dyskusji odnosząca się do badań struktury aptamerów DNA oraz parametrów kompleksu aptamer DNA/metka 5K. W tej części oprócz krytycznego omówienia uzyskanych wyników na tle danych literaturowych autorka, w oparciu o analizę różnic pomiędzy uzyskanymi metodą dichroizmu kołowego widm badanych aptamerów z widmami wcześniej publikowanymi, zaproponowała kwadrupleksową strukturę M5K i B5K. Ta interesująca propozycja wymaga dalszych badań o charakterze bardziej podstawowym niż aplikacyjnym.

Pracę kończy zwięzłe podsumowanie przedstawiające jej główne osiągnięcia oraz bogaty spis literatury.

W moim przekonaniu cel pracy został w pełni osiągnięty, a uzyskane przez panią mgr Arciszewską wyniki uważam za interesujące i posiadające znaczące walory aplikacyjne. **Dlatego We wniosku końcowym oceniam, że rozprawa doktorska mgr Arciszewskiej spełnia wszystkie formalne i naukowe wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Arciszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Lista drobnych błędów i literówek nie omówionych w recenzji

- s. 69 Optymalizacja wiązania pomiędzy aptamerem M13 i B7 a metką lizylową - l. mnoga
- Wyznaczanie minimalnego regionu aptameru M13 i B7 koniecznego do wiązania metki lizylowej.- l. mnoga
- s. 70 Porównanie wiązania aptameru M5K i B5K do metki lizylowej - l. mnoga
- s. 83 we współpracy z drem Pawłem Hermanowiczem - taki skrót nie istnieje
- w różnych miejscach białko ProB jest pisane albo całkowicie dużymi literami albo tylko pierwsza litera jest duża.
- W części doświadczeń używane jest fuzyjne białko 5K-ProB, a w części 5K-Prob-6H autorka nie wyjaśnia przyczyny tych różnic
- s. 122 wiążącego trombinę a trombiną – literówka
- s. 122 zarówna - literówka