

Mgr Klaudia Arciszewska

Streszczenie rozprawy doktorskiej

„Identyfikacja i charakterystyka aptameru DNA wiążącego metkę lizylową – zastosowanie w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych”

Do pozyskiwania czystych preparatów białkowych wykorzystuje się m.in. metody takie jak chromatografia jonowymienna, oddziaływań hydrofobowych czy powinowactwa. Największą specyficznością charakteryzuje się ostatni z wyżej wymienionych typów chromatografii adsorpcyjnej polegającej na specyficznym oddziaływaniu dwóch cząsteczek – ligandu unieruchomionego na złożu oraz analitu obecnego np. w mieszaninie białek. Ze względu na swe właściwości chromatografia powinowactwa (CP) pozwala na uproszczenie procedury prowadzącej do pozyskiwania preparatu pożądanego białka charakteryzującego się wysokim stopniem czystości jak i aktywnością biologiczną. W metodzie CP powszechnie stosuje się tzw. metki peptydowe lub białkowe, które fuzjowane z białkami rekombinowanymi wykorzystywane są w procesie oczyszczania preparatów białkowych. Dotychczas opracowano kilka układów ligand/analit na potrzeby chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych, przykładowo jony Ni^{2+} / metka histydylowa (His-Tag) czy też glutation/ transferaza S-glutationowa (GST). Rozwój metod biologii molekularnej umożliwia produkcję coraz większej liczby różnorodnych białek. Jednak uzyskanie preparatów tych białek o zadawalających parametrach nie zawsze jest możliwe przy zastosowaniu dostępnych obecnie systemów chromatografii powinowactwa. W związku z powyższym jedną z dróg dalszego rozwoju tej metody jest poszukiwanie nowych układów ligand/ metka.

Jako ligandy do wiązania metek peptydowych wykorzystywane mogą być m.in. aptamery, czyli krótkie jednoniciowe cząsteczki DNA albo RNA, których długość zazwyczaj wynosi od 40 do 120 nukleotydów. Przybierają one charakterystyczną strukturę drugo- i trzeciorzędową, która umożliwia im specyficzne wiązanie substancji drobnocząsteczkowych (w tym jonów metali), peptydów, białek, a nawet całych komórek. Aptamery znajdują szerokie zastosowanie między innymi do tworzenia biosensorów, cząsteczek terapeutycznych czy też obrazowania.

Jedną z metek peptydowych, której wykorzystanie do oczyszczania białek rekombinowanych z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej zostało zaproponowane w XX wieku, jest peptyd lizylowy. Lizyna jest aminokwasem polarnym o ładunku dodatnim w pH neutralnym. Pośród atutów omawianej metki można wymienić jej zdolność do poprawy stabilności białek czy też fakt, że metkę

tą z łatwością można odciąć za pomocą karboksypeptydazy C. Co więcej oligopeptyd lizylowy może być wykorzystywany także jako czynnik wspomagający przechodzenie peptydów przez błonę komórkową czy wspomagający adhezję komórek eukariotycznych i tkanek zwierzęcych do tworzyw takich jak szkło czy plastik. Co ciekawe jak do tej pory nie opracowano układu specyficznego powinowactwa ligand/ analit wykorzystującego tą metkę. W związku z powyższymi celem zrealizowanej pracy doktorskiej było opracowanie nowego układu chromatografii powinowactwa, opartego na oddziaływaniu aptamer DNA/metka lizylowa, przeznaczonego do oczyszczania białek rekombinowanych. W tym celu w pierwszym etapie badań przy pomocy metody SELEX (ang. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) używając dwóch różnych bibliotek ssDNA (ang. single-stranded DNA, jednoniciowego DNA) przeprowadzono odpowiednią liczbę cykli selekcyjnych w celu uzyskania aptamerów DNA wiążących metkę lizylową. Przy użyciu techniki ilościowego PCR z analizą w czasie rzeczywistym (qPCR) dla każdej z dwóch przeprowadzonych selekcji zidentyfikowano pulę aptamerów, charakteryzujących się najwyższym współczynnikiem wzbogacenia względem peptydu lizylowego, którą sklonowano i następnie zsekwencjonowano. Z otrzymanych sekwencji wyłonione zostały te, które wykazywały najwyższy poziom wiązania do metki lizylowej. Aptamer o najlepszym współczynniku wzbogacenia wyselekcjonowany z biblioteki B i M nazwano odpowiednio aptamerem B7 i M13. Następnie wykazano, że obydwie wyselekcjonowane cząsteczki z wysokim powinowactwem i specyficznością wiążą analizowane białko rekombinowane połączone z metką lizylową, natomiast nie wiążą białka bez metki. W kolejnym etapie badań wykazano, że minimalna długość metki lizylowej konieczna do wydajnego wiązania badanych aptamerów wynosi 5 lizyn (5K). Skracanie wyjściowych cząsteczek aptameru B7 oraz M13 od końca 5' lub 3' pozwoliło ustalić kluczowy rejon sekwencji wyselekcjonowanych aptamerów, który jest niezbędny do wiązania metki 5K. Ostateczne (skrócone) formy aptamerów B7 i M13 nazwano odpowiednio B5K oraz M5K. Następnie, dla obydwu aptamerów, zoptymalizowano bufor wiążący metkę 5K wykazując, że do wiązania metki przez aptamer B5K niezbędna jest obecność jonów potasu. W dalszej części badań przeprowadzono charakterystykę struktury drugorzędowej badanych aptamerów techniką dichroizmu kołowego (CD). Natomiast za pomocą metody izotermicznej kalorymetrii miareczkowej wyznaczono stałą dysocjacji dla kompleksu aptamer B5K/ metka lizylowa. Z uwagi na zbyt niskie powinowactwo metki lizylowej do aptameru M5K, w porównaniu z aptamerem

B5K, został on wykluczony z dalszych badań. W kolejnym etapie ustalono skład buforu umożliwiającego elucję metki lizylowej ze złoża ze zimmobilizowanym aptamerem B5K. Wykazano, że w celu destabilizacji kompleksu aptamer B5K/metka lizylowa należy zastosować bufor pozbawiony KCl suplementowany 200 mM chlorowodorkiem guanidyny.

Ostatecznie zademonstrowano, że złożo chromatograficzne ze zimmobilizowanym na powierzchni aptamerem B5K może być użyte do wielokrotnego oczyszczania białek rekombinowanych sprzęgniętych z metką lizylową, z ekstraktu białkowego uzyskanego z komórek bakterii *Escherichia coli*. Dodatkowo wykazano, że aptamer B5K może być używany w metodzie ELONA (ang. Enzym Linked OligoNucleotide Assay) jako narzędzie do detekcji białek zawierających metką lizylową.

Podsumowując, w efekcie przeprowadzonych doświadczeń opracowano i scharakteryzowano system chromatografii powinowactwa bazujący na specyficznym oddziaływaniu pomiędzy aptamerem DNA i metką składającą się z pięciu lizyn. Wykazano, że z powodzeniem może być on wykorzystany do oczyszczania białek z metką lizylową. Ponadto udowodniono, że aptamer B5K może być wykorzystany jako narzędzie do detekcji białek z metką 5K.