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

Warszawa, 30. 08. 2018

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Filipa Bartnickiego pt.

„Zastosowanie aptamerów DNA w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych opartej na metkach fuzyjnych H3, R6, R8 oraz Tat_{49-57}"

Zastosowanie aptamerów, jako narzędzi w chemii analitycznej jest bardzo obiecującą i ekscytującą dziedziną badań aplikacyjnych ze względu na zdolność oligonukleotydów do specyficznego wiązania cząsteczek, z powinowactwem podobnym do przeciwciał. Rozwój tej dziedziny wiąże się nierozerwalnie z rozwojem techniki SELEX, która w sposób analogiczny do naturalnych mechanizmów ewolucyjnych pozwala na identyfikację, spośród licznej puli przypadkowych sekwencji i wybiórczą amplifikację oligonukleotydów o oczekiwanej charakterystyce. Technika ta pozwala na izolację aptamerów specyficznie wiążących zarówno małe cząsteczki organiczne jak i białka, wirusy czy tkanki. Celem przedstawionej do oceny pracy była identyfikacja aptamerów wiążących rekombinowane białka posiadające przyłączone na N, albo C końcu metki fuzyjne zawierające 3 histydyny, 6 lub 8 arginin albo peptyd $Tat_{49-57,}$ a także analiza wykorzystania nowo zidentyfikowanych aptamerów w chromatografii powinowactwa.

Zarówno wybór badanych metek jak i białek z nimi zrekombinowanych nie jest przypadkowy. Metki histydynowe należą do znaczników najczęściej wykorzystywanych w detekcji i czyszczeniu białek, a analizowana w pracy metka złożona z trzech histydyn zwraca dodatkową uwagę ze względu na jej minimalny rozmiar. Z kolei metki bogate w argininę należą do szalenie intensywnie badanej obecnie grupy peptydów, interesujących zarówno ze względu na możliwości immobilizacji na stałych nośnikach jak i zwiększania rozpuszczalności rekombinowanych z nimi białek. Przede wszystkim jednak, rosnące znaczenie tej grupy peptydów wiąże się z ich właściwościami umożliwiającymi wprowadzanie rekombinowanych z nimi białek do wnętrza komórki.

Użyte w badaniach białka, to powszechnie stosowane w biologii molekularnej S-transferaza glutationowa (GST) i białko zielonej fluorescencji (GFP), a także białko PCNA pełniące zasadniczą rolę w procesach replikacji i reperacji DNA i będące od szeregu lat obiektem zainteresowania prowadzonego przez dr hab. Wojciecha Strzałkę zespołu, w ramach którego została wykonana niniejsza praca.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera typowy dla prac doświadczalnych układ obejmujący Wstęp, Cel pracy, Materiały i odczynniki, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wyników oraz Bibliografię. Dodatkowo na końcu pracy dołączono sekwencje

nukleotydowe i aminokwasowe białek wykorzystanych w pracy, a także sekwencje nukleotydowe użytych starterów i aptamerów DNA

We wstępie zostały omówione systemy chromatografii powinowactwa, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali. Autor opisał nie tylko generalne zasady i rys historyczny rozwoju chromatografii powinowactwa, ale także przedstawił krytycznie rożne systemy chromatograficzne wskazując na ich zalety i wady. Zostały też omówione różnorodne zastosowania metek argininowych i generalnie peptydów penetrujących komórki. Osobny rozdział został poświęcony budowie, właściwościom i biochemicznemu zastosowaniu aptamerów oraz dotychczasowym podejściom ich użycia w chromatografii powinowactwa białek. Zastosowanie aptamerów *in vivo* zostało tylko wspomniane we wstępie i chociaż ten temat wykracza poza ścisłe ramy wprowadzenia do badań opisanych w pracy, prosiłabym doktoranta o krótkie rozszerzenie tego zagadnienia w ramach odpowiedzi na pytania. Pragnę równocześnie podkreślić, że *Wstęp* napisany został z dużą znajomością tematu, w sposób bardzo przystępny i w mojej ocenie stanowi doskonałe wprowadzenie do dalszych części pracy.

Zgodnie z tytułem pracy doktorskiej mgr Filipa Bartnickiego, jej cel został sformułowany jako „określenie możliwości wykorzystania aptamerów jako ligandów w chromatografii powinowactwa" . Dodatkowo autor przedstawił szereg zadań, które zamierza zrealizować aby ten cel osiągnąć, dając wyjątkowo klarowny obraz drogi badawczej, którą zaplanował dla osiągnięcia celu.

Zarówno materiały jak i metody użyte w pracy zostały rzetelnie opisane dając możliwość powtórzenia poszczególnych doświadczeń. W trakcie wykonywania pracy Doktorant wykorzystał metody z zakresu biologii molekularnej, biochemii i bioinformatyki, adekwatne do realizacji postawionego celu badań. Na szczególną uwagę zasługuje klarowny opis metod związanych z selekcją i analizą aptamerów DNA

Z uwagą i dużym zainteresowaniem przestudiowałam bardzo dobrze skonstruowany rozdział *Wyniki*, w którym konsekwentnie, w 3 podrozdziałach podzielonych na kolejne części, krok po kroku, odnosząc się do kolejnych celów cząstkowych, autor opisał strategię wykonania zaplanowanych doświadczeń, przedstawił starannie opracowaną, czytelną dokumentację uzyskanych wyników oraz ich zwartą interpretację.

Przedstawienie wyników rozpoczyna opis strategii klonowania informacji genetycznej, a także ekspresji i oczyszczania metodami klasycznymi analizowanych białek GST, GFP i PCNA oraz ich pochodnych niosących metki zawierające trzy histydyny, H3 oraz metki argininowe, złożone z sześciu lub ośmiu arginin, odpowiednio R6 i R8, i metki Tat_{49-57}. Sekwencja Tat_{49-57} odpowiada fragmentowi białka TAT, kodowanego przez ludzkiego wirusa HIV-1. To pierwsze opisane w 1988 roku białko samoistnie wnikające do komórki, a minimalny zdolny do internalizacji jego fragment, Tat_{49-57}, stanowi jedną z najczęściej stosowanych obecnie metek przyłączanych do białek w celu ich wprowadzenia do wnętrza komórek.

Opis czyszczenia użytych w pracy białek opatrzono zdjęciami żeli poliakrylamidowych, na których elektroforetycznie rozdzielono w warunkach denaturujących 13 oczyszczonych

preparatów białkowych i potwierdzono ich tożsamość metodą hybrydyzacji typu western z odpowiednimi przeciwciałami przeciwko białkom GST, GFP i PCNA.

W dwóch niezależnych, następujących po sobie rozdziałach Doktorant w sposób bardzo przejrzysty przedstawił wyniki prac nad aptamerami wiążącymi metki H3 i aptamerami wiążącymi metki bogate w argininę: R6, R8 i Tat_{49-57} . Ja spróbuję omówić wyniki uzyskane dla obydwu grup metek fuzyjnych razem ze względu na w dużej mierze analogiczne podejścia eksperymentalne w realizacji obydwu zadań. Selekcję pożądanych aptamerów przeprowadzono za pomocą modyfikacji wspomnianej na początku techniki SELEX na pojedynczym ziarnie agarozowym. Zwraca uwagę strategia procesu selekcji, w którym najpierw (pierwsze dwa cykle) selekcjonowano aptamery specyficznie wiążące same metki fuzyjne, a następnie zamplifikowane specyficzne oligonukleotydy poddawano dalszej selekcji wobec zrekombinowanej formy białka PCNA. Taka strategia pozwoliła nie tylko na wyselekcjonowanie aptamerów specyficznych do odpowiednich metek fuzyjnych, ale także na ich ewentualne zastosowanie w czyszczeniu związanych z metkami białek.

Wybór metki H3 jako najkrótszej z metek histydynowych, którą będzie można zastosować w chromatografii powinowactwa, został poprzedzony analizą *in silico* proteomu szeroko stosowanego w produkcji białek rekombinowanych szczepu *Escherichia coli*, z której wynikło, że ciąg trzech histydyn występuje naturalnie stosunkowo rzadko. Z drugiej strony doktorant zadbał o stworzenie koniecznych, do prawidłowego funkcjonowania systemu chromatografii, warunków pozwalających na regulację oddziaływania aptameru z ligandem. Dla metki H3 zaprojektowano nowatorską modyfikację metody SELEX, w której aptamery oddziałujące z metką polihistydynową selekcjonowano w obecności jonów sodu. Pozwoliło to na dysocjację powstałych kompleksów i elucję swoiście związanych molekuł w buforze pozbawionym tych jonów. Ta strategia pozwoliła jak pisze Doktorant uniknąć użycia do elucji roztworów imidazolu. Prosiłabym o wyjaśnienie, dlaczego użycie powszechnie stosowanego dla metek histydynowych imidazolu było w tym przypadku rozwianiem niekorzystnym.

W selekcji aptamerów wiążących metki bogate w argininę, w wyniku krytycznej oceny danych literaturowych, jako pierwotny ligand zastosowano metkę R8, a do dysocjacji aptamerów związanych z metkami argininowymi z powodzeniem wykorzystano stosunkowo niskie stężenia chlowodorku guanidyny.

Postęp selekcji aptamerów związanych z analizowanymi metkami fuzyjnymi monitorowano przy pomocy ilościowego PCR i wykazano, że po piątym cyklu selekcyjnym uzyskuje się maksymalne wzbogacenie apamerów wiążących H3-PCNA, natomiast wzbogacenie w cząsteczki wiążące K8-PCNA wrasta aż do ósmego cyklu selekcyjnego.

Klonowanie i sekwencjonowanie wyselekcjonowanych aptamerów pokazało, że pula aptamerów specyficznie wiążących metkę H3 zawiera pięć wielokrotnie powtarzających się sekwencji. Przy pomocy ilościowego PCR ustalono, która z tych sekwencji wiąże się z H3-PCNA z największą wydajnością i dla tej sekwencji elegancko udokumentowano specyficzność wiązania do zrekombinowanego biała H3-PCNA w stosunku do samego PCNA.

Podobna analiza aptamerow wiążących K8-PCNA doprowadziła do wyizolowania dwunastu unikatowych sekwencji jednoniciowego DNA i wyboru cząsteczki najwydajniej i specyficznie wiążącej białko fuzyjne K8-PCNA, a także zrekombinowane białko GST niosące te samą metkę. Ponadto pokazano metodą „pull-down" specyficzność wiązania wybranego jednoniciowego DNA z pochodnymi białek GST, GFP i PCNA zrekombinowanymi ze wszystkimi badanymi metkami bogatymi w argininę K6, K8, i Tat_{49-57}.

Istotnym etapem pracy było określenie, które regiony w wyselekcjonowanych aptamerach są niezbędne do wiązania badanych metek fuzyjnych. Ustalono to w wyniku analizy delecyjnej i wykazano, że obcięcie 20 nukleotydów 5'-końca DNA wiążącego metkę H3 nie tylko nie obniża, ale zdecydowanie zwiększa wiązanie H3-PCNA, wpływając też pozytywnie na specyficzność tego wiązania. Dla uzyskanego w wyniku selekcji aptameru wiążącego metki bogate w argininę ustalono, że skrócenie o 30 nukleotydów od 5'-końca i 10 nukleotydów od 3'-końca powoduje zwiększenie wydajności wiązania metki R8 nie wpływając znacząco na wiązanie metek R6 i Tat_{49-57}. Powstałe w ten sposób zoptymalizowane aptamery, nazwane odpowiednio: H3T dla metki histydynowej i AR dla metek bogatych w argininę, poddano dalszej szczegółowej charakterystyce. Wykazano, specyficzny udział jonów sodu w odróżnieniu od jonów potasu, w procesie wiązania H3T z białkiem opatrzonym metką histydynową . Ustalono także stężenie NaCl stymulujące ten proces, które równocześnie nie ma negatywnego wpływu na aktywność biologiczną oczyszczanych białek.

Wykorzystując ogólnie dostępne oprogramowanie *The mfold Web Server* zaproponowano struktury drugorzędowe dla aptamerów H3R i AR i wyznaczono ich energię swobodną dla zadanych warunków. Jednym z warunków była obecność jonów sodu i o ile obecność tych jonów jest oczywista w badaniu struktury aptameru H3T, ze względu na warunki oddziaływania tego aptameru z metką H3, o tyle niezrozumiała jest dla mnie obecność jonów sodu w badaniu struktury aptameru AR. Prosiłabym Doktoranta o wyjaśnienie tej kwestii.

Aptamery H3T i AR immobilizowane na złożu streptawidynowo –agarozowym (HCSA), tworzące odpowiednio złoża H3T-HCSA i AR-HCSA, wykorzystano do ustalenia warunków elucji związanych na złożu modelowych białek fuzyjnych. Zgodne ze strategią selekcji użycie buforu pozbawionego jonów sodu do destabilizacji kompleksu H3-PCNA z aptamerem H3T zaowocowało wydajnością elucji tego białka przekraczającą 93%. Do elucji białek opatrzonych metkami bogatymi w argininę użyto roztwory chlorowodorku guanidyny i ustalono dla zrekombinowanych form GST związanych ze złożem AR-HCSA stężenia chlorowodorku guanidyny pozwalające na uzyskanie ponad 90% wydajności elucji dla każdej z badanych metek.

Ukoronowaniem pracy było udowodnienie możliwości zastosowania złóż H3T-HCSA i AR-HCSA do czyszczenia białek rekombinowanych z ekstraktów białkowych *E. coli* zarówno w skali analitycznej jak i preparatywnej. Przy tym pokazano wyższy stopień oczyszczenia białek opatrzonych metką histydynową przy wykorzystaniu złoża z aptamerem H3T niż na tradycyjnym złożu niklowym. Pokazano także możliwość dalszego zwiększenia czystości preparatu poprzez sekwencyjne użycie obydwu metod czyszczenia. Została dodatkowo zademonstrowana możliwość wielokrotnego użycia zarówno złoża bazującego na aptamerze

H3T jak i na AR do czyszczenia rekombinowanych białek, niosących odpowiednio metkę H3 i metki bogate w argininę, bez obniżenia wydajności procesu czyszczenia.

Przedstawione wyniki zostały opatrzone interesującą dyskusją, która objęła omówienie znanych z literatury systemów wykorzystujących aptamery w czyszczeniu białek i szerokie krytyczne omówienie znaczenia białek penetrujących komórki i różnych metod stosowanych dotychczas w ich czyszczeniu. Integralną część dyskusji stanowi rozdział dotyczący perspektyw wdrożenia rynkowego złóż H3T-HCSA i AR-HCSA, w którym uwagę zwraca część podsumowujące zalety, ale także rzetelnie przedstawiająca wady proponowanych do komercjalizacji złóż.

Pracę kończy zwięzłe podsumowanie przedstawiające główne jej osiągnięcia i bogaty spis literatury, w którym ponad 25% pozycji to artykuły opublikowane w trakcie ostatnich dziesięciu lat.

Podsumowując uważam, że cel pracy został w pełni osiągnięty, a uzyskane przez pana mgr Bartnickiego wyniki za bardzo ciekawe i posiadające znaczące walory aplikacyjne. Szczególnie cenię heurystyczny sposób przedstawienia wyników i ich znakomitą dokumentację. **Dlatego we wniosku końcowym wyrażam pełne przekonanie, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie formalne i naukowe wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym, 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 Pana mgr Filipa Bartnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Równocześnie, jeżeli regulamin Rady na to pozwala, zgłaszam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.