

Poznań, 20.05.2019

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr. Przemysława Jurka

Tytuł rozprawy: *Konstrukcja biblioteki aptamerów DNA w oparciu o nowe modyfikowane nukleotydy oraz jej zastosowanie do selekcji aptamerów wiążących N-końcową domenę ludzkiego białka MDM2*

Promotor: dr hab. Małgorzata Zakrzewska

Promotor pomocniczy: dr Filip Jeleń

Praca doktorska Pana mgr. Przemysława Jurka poświęcona została poszukiwaniom nowych podejść i rozwiązań pozwalających zarówno zwiększać spektrum aptamerów DNA/RNA generowanych metodą SELEX, jak i nadawać im nowe niespotykane dotąd właściwości. Zgodnie z najogólniejszą definicją aptamerem nazwać można oligonukleotyd lub peptyd, posiadający wysokie powinowactwo wobec określonej cząsteczki i zdolność do specyficznego jej wiązania. W myśl powyższej definicji za naturalne aptamery uznać można ryboprzełączniki oraz zmienne fragmenty łańcucha lekkiego przeciwciał. Badania aptamerów cieszyły się szczególną popularnością pod koniec XX wieku, gdy opracowano stosunkowo proste metody ich wytwarzania w warunkach laboratoryjnych. W przypadku oligonukleotydów najpowszechniej stosowaną metodą otrzymywania aptamerów o pożądanym właściwościach fizycznych i chemicznych była i jest nadal ich selekcja *in vitro*. Metoda nazwana w skrócie SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) polega na wyławianiu z tzw. bibliotek kombinatorycznych DNA lub RNA, oligonukleotydów o oczekiwanej charakterystyce. Niestety, ogromne nadzieje i optymizm, jakie pojawiły się wraz z pozyskiwaniem kolejnych oligonukleotydowych aptamerów, nie przełożyły się w kolejnych latach na powszechnie oczekiwane, spektakularne sukcesy w sferze ich aplikacji. Jedną z podstawowych przyczyn był równoległy dynamiczny rozwój badań dotyczących otrzymywania i wykorzystywania przeciwciał. Ze względu na ich większą różnorodność (białka zbudowane są z 20 aminokwasów, podczas gdy DNA/RNA zaledwie z 4 nukleotydów) aptamery peptydowe wydawały się przewyższać pod każdym względem oligonukleotydowe analogi. Kolejne lata badań każą nam jednak istotnie zweryfikować powyższy pogląd. Stąd w ostatnim czasie zaobserwować

można wyraźny wzrost zainteresowania aptamerami DNA i RNA. W ten właśnie nurt badań wpisuje się recenzowana rozprawa. Biorąc pod uwagę stosunkowo ubogi repertuar grup chemicznych oferowanych przez naturalne nukleotydy, Doktorant postanowił opracować techniki pozwalające selekcjonować *in vitro* aptamery DNA zawierające w swej strukturze dodatkowe grupy funkcyjne. Zgodnie z przyjętymi założeniami, osiągnięcie powyższego celu wiązało się z realizacją dwóch zadań:

- adaptacją standardowej procedury selekcji aptamerów *in vitro* do wymogów związanych z zastosowaniem modyfikowanych chemicznie nukleotydów;
- weryfikacją opracowanych procedur przez przeprowadzenie pełnego eksperymentu selekcji aptamerów wiążących wybrane białko.

W świetle przedstawionych powyżej faktów stwierdzić można, iż praca doktorska Pana mgr. Przemysława Jurka poświęcona została ważkim i aktualnym problemom badawczym, mającym zarówno istotny wymiar poznawczy, jak i praktyczny.

Strona formalna rozprawy

Pod względem formalnym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń. Została ona skomponowana w sposób klasyczny, co oznacza, iż Autor wyróżnił w niej następujące części:

- rozdział zatytułowany **Wstęp**, w którym Doktorant dość krótko i zwięźle przedstawił najważniejsze informacje dotyczące metody SELEX, a także wad i zalet stosowania aptamerów DNA/RNA oraz przeciwciał w diagnostyce i terapii medycznej. Na zakończenie krótko opisał białko mające stanowić cel molekularny w zaplanowanym eksperymencie SELEX, oraz przyczyny jego wyboru;
- rozdział **Cel pracy**, zawierający jasno sprecyzowane główne kierunki badań;
- rozdział **Materiały i Metody**, w którym wyczerpująco zaprezentowane zostały podstawowe materiały oraz metody stosowane w trakcie wykonywania badań;
- rozdział **Wyniki**, klarownie opisujący przebieg badań i uzyskane rezultaty;
- rozdział **Dyskusja**, w którym wyniki przeprowadzonych badań zostały wszechstronnie omówione na tle spostrzeżeń poczynionych przez innych badaczy;
- rozdział **Podsumowanie** krótko prezentujący najważniejsze rezultaty i dalsze perspektywy badań;
- rozdział **Literatura** oraz **Załączniki**.

Dodatkowo rozprawa zaopatrzona została w:

- bardzo bogaty **Spis skrótów** – jak to często bywa, niektóre skróty mogą budzić pewne wątpliwości np. XdUTP rozwinięto jako trójfosforan nukleotydu. Ponadto, nie wiem czy konieczne było zamieszczanie w tym rozdziale powszechnie stosowanych skrótów takich jak DNA czy RNA.

- **Spis treści**
- **Streszczenie i Abstract**

Generalnie strona formalna rozprawy nie budzi większych zastrzeżeń. W tekście występuje jednak kilka niezbyt fortunnych określeń takich jak np.: „fragment DNA” (A czym jest fragment DNA? To przecież także DNA, chyba że Autorowi chodziło o samą tylko resztę cukrową lub zasadę.), „losowa biblioteka” (sądzę, że w kontekście omawianych zagadnień losowe są sekwencje oligonukleotydów, losowe biblioteki też można by sobie wyobrazić, ale to już całkiem inny problem), „odwrotnie komplementarne matryce” (nie bardzo rozumiem co oznacza to w odniesieniu do kwasów nukleinowych) czy określenie „szereg nieodzownych wad”. Dodatkowo na stronach 89/90 jeden paragraf został zduplikowany. Wszystkie te zastrzeżenia nie zmieniają jednak zasadniczo pozytywnej oceny pracy.

Strona merytoryczna rozprawy

Uważam, że przedstawione w pracy badania zostały zarówno dobrze zaprojektowane, jak i konsekwentnie przeprowadzone. Stanowią one zwartą, logiczną całość. Przeważająca część rozprawy nie budzi istotnych zastrzeżeń merytorycznych. Mając na uwadze jej zasadniczy cel, Doktorant rozpoczął od wyboru celu molekularnego dla selekcyonowanych aptamerów. Stał się nim 109-aminokwasowy fragment ludzkiego białka MDM2 stanowiący domenę N-końcową odpowiedzialną za wiązanie z białkiem p53. Myślę, że decyzja ta nie była do końca trafna. Rozumiem, iż ludzkie białko MDM2 jest bardzo interesujące z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej, jednak niekoniecznie jako modelowy cel molekularny w badaniach zmierzających do optymalizacji nowych rozwiązań eksperymentalnych. W takim przypadku może lepiej byłoby wybrać białko dobrze rozpuszczalne, którego struktura została poznana i nie wzbudza żadnych wątpliwości. Stosując standardowe podejścia Doktorant wyprodukował wspomniany fragment białka MDM2 w systemie bakteryjnym. Ponieważ białko było akumulowane w komórkach w formie ciałek inkluzyjnych, podczas oczyszczania zostało poddane denaturacji. Na zakończenie preparat o wysokiej homogenności był renaturowany i poddawany analizom fizykochemicznym, mającym na celu potwierdzenie, iż białko przyjęło natywną strukturę.

W kolejnym etapie badań Doktorant otrzymał zmodyfikowane nukleotydy, które zamierzał wykorzystać do otrzymania bibliotek kombinatorycznych oraz wykazał, że nukleotydy te są kompatybilne z enzymami stosowanymi w metodzie SELEX. Oznacza to, że ich trójfosforany są substratami dla zastosowanych w badaniach polimerazy oraz że możliwe jest sekwencjonowanie wyselekcjonowanych oligomerów. Tak przygotowany przystąpił do właściwego eksperymentu selekcji *in vitro*. Po każdym etapie selekcji uzyskiwane pule oligonukleotydów poddawane były analizie metodą sekwencjonowania nowej generacji.

Po 12 etapach selekcji zgromadzone dane zostały poddane obróbce bioinformatycznej. Sekwencje potencjalnych aptamerów przeanalizowano metodą grupowania hierarchicznego, w wyniku czego wyłoniono sekwencje reprezentatywne dla każdej z grup. Na tej podstawie uzyskano reprezentatywne aptamery i scharakteryzowano ich zdolność do wiązania celu molekularnego metodą immunoenzymatyczną oraz analizy rezonansu plazmonów powierzchniowych.

Zaprezentowane w rozprawie wyniki jednoznacznie świadczą, iż Doktorant zdołał osiągnąć podstawowy cel swoich badań. Wykazał, że metodą SELEX można uzyskiwać aptamery zawierające otrzymane przez Niego zmodyfikowane nukleotydy. Mam jednak wrażenie, że przebieg selekcji, jej wynik, czyli zestaw uzyskanych aptamerów oraz charakterystyka ich zdolności do wiązania celu molekularnego nie poddają się łatwej i jednoznacznej interpretacji. Analiza zaprezentowanych danych pozwala sądzić, że wprowadzenie do oligomerów silnie hydrofobowych grup może prowadzić do niespecyficznego oddziaływań z celem molekularnym oraz zaburzeń w jego strukturze. W przypadku niektórych z obserwowanych efektów nie można zatem stwierdzić, czy są one wynikiem oczekiwanych od aptamerów specyficznych oddziaływań, czy dziełem przypadku. Problem ten chciałbym przedyskutować z Doktorantem podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Wydaje się, że rozwiązanie tych kwestii wymagałoby przeprowadzenia szeregu dodatkowych eksperymentów wybiegających poza zakres prac zaplanowanych w ramach niniejszych badań.

Biorąc pod uwagę całokształt dokonań zaprezentowanych w ocenianej rozprawie sądzę, że na specjalne uznanie zasługuje sposób, w jaki Doktorant zdołał połączyć szereg technik eksperymentalnych, od typowych dla chemii metod syntezy modyfikowanych nukleotydów, poprzez charakterystyczne dla biologii molekularnej metody produkcji białek i analizy DNA, bioinformatyczne metody analizy danych NGS, aż do wyrafinowanych metod fizykochemicznych stosowanych do oceny oddziaływań aptamer-białko. Fakt ten świadczy o dobrym przygotowaniu i dojrzałości naukowej Kandydata.

Zamieszczone powyżej drobne uwagi krytyczne nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę pracy. Uważam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Przemysława Jurka do dalszych etapów przewodu.



Prof. Marek Figlerowicz