

PRZEMYSŁAW JUREK

Wrocław, 13 marca 2019

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

## Streszczenie

Aptamery to biomolekuły zbudowane z krótkich fragmentów kwasów nukleinowych, wykazujące zdolność wiązania wybranych celów molekularnych – antygenów – analogicznie do przeciwciał. Selekcjonowane są z losowych bibliotek oligonukleotydowych w pełni *in vitro*. Jednakże, wywodzące się z naturalnie występujących kwasów nukleinowych aptamery złożone są jedynie z czterech zasad azotowych, co może powodować trudności w ich dopasowaniu się do niektórych celów molekularnych, w szczególności hydrofobowych.

W niniejszej pracy podjąłem się opracowania technologii pozyskiwania, na drodze selekcji *in vitro*, aptamerów DNA prezentujących niewystępujące naturalnie grupy chemiczne. Aby gama nowych modyfikacji mogła być zbiorem otwartym wykorzystałem wszechstronną technikę syntezy chemicznej typu „*click chemistry*”, opartą o, katalizowaną jonami miedzi (I) reakcję cykloaddycji Huisgena (CuAAC, ang. (*Huisgen's*) *Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*)[1,2], pozwalającą ze stosunkową łatwością koniugować dwa związki, posiadające ugrupowanie azydkowe oraz terminalną grupę etynylową  $-C\equiv CH$ . Dzięki temu uzyskałem cztery nowe pochodne tymidyny, prezentujące takie ugrupowania jak chlorobenzen czy pierścień indolowy, a następnie wykazałem, że możliwa jest ich inkorporacja do DNA na drodze enzymatycznej. Tym samym nukleotydy te mogą być wykorzystane w technologii selekcji *in vitro* modyfikowanych aptamerów.

W celu zweryfikowania opracowanej technologii przeprowadziłem selekcję nowych aptamerów skierowanych wobec wybranego antygeny. Aby wykorzystać potencjał pozyskanych przeze mnie nukleotydów, prezentujących ugrupowania o wysokim stopniu hydrofobowości, za molekularny cel selekcji obrałem ludzkie białko MDM2 (*mouse double minute 2*), które posiada dobrze zdefiniowaną hydrofobową kieszeń w swojej N-końcowej domenie.

Wykorzystując wybrany modyfikowany nukleotyd, uzyskałem najpierw bibliotekę oligonukleotydów o losowej sekwencji. Następnie otrzymałem na drodze nadprodukcji w systemie bakteryjnym rekombinowaną N-końcową domenę białka MDM2, której tożsamość i natywność potwierdziłem za pomocą spektrometrii mas, dichroizmu kołowego oraz testu funkcjonalnego (wiązanie znanego partnera – peptydu pochodzącego z białka p53), opartego o technikę różnicowej fluorymetrii skaningowej. Wykorzystując technikę selekcji *in vitro* aptamerów SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment*), dostosowaną przeze mnie ze względu na konieczność wprowadzania modyfikowanego

nukleotydu, wyizolowałem pulę aptamerów potencjalnie wiążących antygen – białko MDM2. Otrzymane, z każdej z dwunastu rund, oligonukleotydy poddałem sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*), a następnie, za pomocą metod bioinformatycznych, wytypowałem sekwencje potencjalnie reprezentujące klony wiążące cel molekularny.

Wybrane zmodyfikowane chemicznie aptamery przetestowałem pod kątem wiązania N-końcowej domeny MDM2, stosując technikę testu immunoenzymatycznego (ELONA, ang. *Enzyme Linked OligoNucleotide Assay*) oraz plazmonowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *Surface Plasmon Resonance*). Uzyskałem dwa aptamery specyficznie wiążące antygen, CLB-mc8 i CLB-mc14, oraz wykazałem, że wiązanie celu molekularnego jest zależne od obecności w ich strukturze modyfikowanych nukleotydów. Stałe wiązania aptamerów CLB-mc8 oraz CLB-mc14 zostały oszacowane na submikromolarne (w modelu równowagowym). Tym samym potwierdziłem, że opracowana przeze mnie technologia selekcji *in vitro* aptamerów DNA, modyfikowanych niewystępującymi w naturalnych kwasach nukleinowych grupami chemicznymi, może być skuteczna w generowaniu aptamerów specyficznych wobec białkowych celów molekularnych, w szczególności o właściwościach hydrofobowych.