

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka

e-mail: [jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl](mailto:jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl)

Poznań, dnia 10 maja 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Jurka pt.: Konstrukcja biblioteki aptamerów DNA w oparciu o nowe modyfikowane nukleotydy oraz jej zastosowanie do selekcji aptamerów wiążących N-końców domę ludzkiego białka MDM2**

Rozprawa doktorska mgr Przemysława Jurka wykonana została pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Zakrzewskiej w Zakładzie Inżynierii Białka Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz w spółce Pure Biologics S.A. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr Filip Jeleń. Problematyka badawcza podjęta w recenzowanej rozprawie jest bardzo atrakcyjna, zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych. Oddziaływania kwasów nukleinowych z białkami są w centrum zainteresowań wielu laboratoriów zajmujących się badaniami regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji oraz translacji. Ponadto, opracowana na początku lat 90-tych ubiegłego wieku technika otrzymywania aptamerów w drodze selekcji *in vitro* z bibliotek kombinatorycznych oligonukleotydów pozwoliła na otrzymanie nowych narzędzi oligonukleotydowych dla celów analityki laboratoryjnej i diagnostyki medycznej, a w przyszłości może także umożliwić opracowanie nowych terapeutyków. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w tą bardzo aktualną problematykę działań o charakterze badawczo-rozwojowym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest liczącym 142 strony opracowaniem, podzielonym na następujące, zasadnicze części: *wstęp* (25 stron), *materiały i metody* (36 stron), *wyniki* (39 stron) oraz *dyskusja* (10 stron). Po *wstępie* do rozprawy Autor opisał *cel pracy*, a po rozdziale *dyskusja* zamieścił *podsumowanie*. Rozprawa zawiera także *streszczenie* w wersji polsko- i anglojęzycznej, *spis skrótów* oraz *bibliografię* liczącą 395 pozycji cytowanej literatury źródłowej. Do rozprawy dołączono trzy załączniki (sumarycznie na 8 stronach).

We *wstępie* do rozprawy Autor zawarł podstawowe informacje dotyczące aptamerów, sposobu ich otrzymywania metodą SELEX oraz przedstawił krytyczne spojrzenie na zalety i wady aptamerów. W kolejnym podrozdziale opisał modyfikacje aptamerów służące poprawie parametrów wiązania celu molekularnego i poprawie ich stabilności. W kolejnym podrozdziale przedstawił zastosowania aptamerów w badaniach laboratoryjnych, diagnostyce i próbach terapeutycznych. W ostatnim podrozdziale Autor zawarł podstawowe informacje o białku MDM2, które było celem molekularnym dla aptamerów opisanych w rozprawie. Wstęp do rozprawy wprowadza czytelnika w jej tematykę,

zawiera informacje oparte na najnowszej literaturze przedmiotu i przygotowany został w sposób bardzo kompetentny. Część dotyczącą aptamerów, po odpowiednim przeredagowaniu, można by opublikować jako interesującą pracę przeglądową.

Celem badań opisanych przez mgr Przemysława Jurka było opracowanie technologii pozyskiwania na drodze selekcji *in vitro* aptamerów DNA z wykorzystaniem nowych, modyfikowanych chemicznie nukleotydów. Opracowaną technologię Autor zamierzał zastosować do pozyskania nowych aptamerów, zdolnych wiązać specyficznie cel molekularny – białko MDM2.

Zasadnicza część rozprawy – *wyniki* podzielona została na cztery części. W pierwszej części opisano rezultaty prac mających na celu otrzymanie rekombinowanej N-końcowej domeny białka MDM2 - MDM2(17-125). Celem drugiej części było otrzymanie modyfikowanych nukleotydów wykorzystywanych do otrzymywania aptamerów w dalszych pracach. Autor skoncentrował się na pochodnych uracylu (trifosforanach urydyny) modyfikowanych w pozycji 5 ugrupowaniem etynylowym, które posłużyło do koniugacji czterech różnych podstawników charakteryzującym się m.in. różnym stopniem aromatyczności. Otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane za pomocą spektroskopii w świetle UV oraz za pomocą spektrometrii mas. Co ważne, Autor wykazał, że odpowiednie trifosforany nukleotydów są substratami w reakcji wydłużania startera przez polimerazę DNA, co umożliwia ich wykorzystanie do konstrukcji zmodyfikowanych (w stosunku do złożonych z czterech podstawowych nukleotydów) bibliotek oligonukleotydowych.

W kolejnym kroku Autor przystąpił do selekcji aptamerów DNA wobec fragmentu białka MDM2(17-125) wykorzystując do konstrukcji biblioteki kombinatorycznej oligonukleotydów jeden z otrzymanych modyfikowanych trifosforanów urydyny, z podstawnikiem w pozycji 5 zasady zawierającym ugrupowanie p-chlorometylobenzenu. Wybór tej modyfikacji podyktowany był podobieństwem strukturalnym do ugrupowań p-chlorometylobenzenu znajdujących się w nutlinie-3a, znanym ligandzie wiążącym się w hydrofobowej kieszeni białka MDM2. Autor opracował protokół eksperymentalny i przeprowadził 12 cykli selekcji *in vitro*, stosując wyjściową bibliotekę kombinatoryczną z 44-nukleotydowym regionem zdegenerowanym (typu *random*) oraz fragment białka MDM2(17-125) jako cel molekularny. W trakcie selekcji zmieniana była presja selekcyjna przez użycie mniejszej ilości białka, skrócenie czasu inkubacji, zmianę sposobu odmywania niezwiązanych aptamerów, a także przeprowadzono szereg procesów kontrselekcji. Następnie, bibliotekę wyjściową oraz wzbogacone biblioteki z wybranych cykli selekcji połączono według określonego schematu i poddano sekwencjonowaniu NGS. Wyniki sekwencjonowania poddano zaawansowanej analizie bioinformatycznej. Kolejne kroki analizy zmierzały do zredukowania liczby rozpatrywanych sekwencji nukleotydowych i zebrania ich w rodziny – klastry, spośród których w końcowym etapie wytypowano jedynie 13 rodzin, których występowanie w kolejnych cyklach selekcji poddano bardziej szczegółowej analizie.