INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
http://www. ibch.poznan.pl

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka
e-mail: 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-końcową domenę 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. Odziaływania 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 w*stępie* 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 – w*yniki* 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 etinylowym, 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 nukleozydów 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.

W następnym podrozdziale opisano wyniki pomiarów oddziaływań wybranych aptamerów z białkiem MDM2. Do tego celu zastosowano test immunoenzymatyczny ELONA (odpowiednik testu ELISA, w którym jedno z przeciwciał zastąpione jest przez aptamer) oraz technikę powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Do testów wykorzystano wybrane zmodyfikowane aptamery, aptamery zawierające tylko region losowy w wersji zmodyfikowanej i niezmodyfikowanej, a jako cel molekularny użyto N-końcową domenę białka MDM2 - MDM2(17-125), a także białko pełnej długości w fuzji z GST. Ten rozdział dokumentuje dużą determinację Autora w poszukiwaniu aptameru wobec MDM2 o jak najlepszych właściwościach. Wykazał, że wszystkie 13 klonów, które zostały wybrane po analizie NGS wiążą fragment białka MDM2(17-125). Natomiast, po zmianie na białko pełnej długości MDM2(1-497) w fuzji z GST jedynie dwa aptamery zachowały zdolność wiązania białka MDM2 ze stałą dysocjacji w zakresie submikromolarnym.

W rozdziale *dyskusja* Autor opisał najważniejsze wyniki otrzymane podczas realizacji poszczególnych etapów pracy doktorskiej. Wykazał przy tym umiejętność krytycznego spojrzenia na otrzymane wyniki, podjął próbę wyjaśnienia nieoczekiwanych obserwacji i sprecyzował sposób prowadzenia dalszych badań. Sprawia to, że rozdział ten czyta się z dużym zainteresowaniem. Sądzę, że rozdział ten świadczy o dużej dojrzałości Autora jako młodego badacza. Autor odpowiedział przy tym na szereg pytań, które pojawiają się podczas lektury rozprawy. Kilka zagadnień zasługuje jednak na dodatkowy komentarz, o który proszę Autora podczas publicznej obrony rozprawy.

1/ Czym kierowano się wybierając 44-nukleotydowy region typu *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej?

2/ W rozprawie nie znalazłem informacji na temat możliwych struktur drugorzędowych tworzonych przez aptamery. Czy taka analiza (komputerowa bądź eksperymentalna) była prowadzona lub jest planowana?

3/ Otrzymane aptamery są stosunkowo długimi oligonukleotydami. Co Autor sądzi o możliwości zredukowania ich długości, przy zachowaniu pożądanych właściwości? Hipotetycznie, jak mógłby wyglądać motyw strukturalny/sekwencja nukleotydowa odpowiedzialna za wiązanie białka MDM2?

4/ Jakie ewentualne działania można by podjąć aby otrzymać aptamery silniej wiążące się do białka MDM2?

Rozprawa doktorska mgr Przemysława Jurka przygotowana została starannie. Z obowiązku recenzenta muszę jednak odnotować kilka pomyłek zauważonych w tekście np.: str. 5 – jednoliterowe symbole: A, C, G i U określają nukleozydy a nie zasady nukleinowe; w spisie skrótów i tekście rozprawy – nieaktualna terminologia: trójfosforan, dwufosforan; str. 89, powtórzony

fragment tekstu. Poza drobnymi usterkami, recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo dobrze.

Realizacja pracy doktorskiej mgr Przemysława Jurka umożliwiła opracowanie platformy biotechnologicznej służącej do selekcji modyfikowanych chemicznie aptamerów DNA. Autor zweryfikował użyteczność proponowanych rozwiązań poprzez selekcję aptamerów wiążących białko MDM2. Wyniki, które otrzymał zostały w rozprawie wnikliwe przedyskutowanie, w sposób świadczący o szerokim zorientowaniu Autora w uprawianej dziedzinie. O tym świadczy także licznie cytowany artykuł przeglądowy na temat aptamerów opublikowany kilka lat temu, którego mgr Przemysław Jurek jest współautorem. Ważne, że wyniki otrzymane podczas realizacji pracy doktorskiej posłużyły do opracowania zgłoszenia patentowego obejmującego metodę otrzymywania modyfikowanych nukleotydów, ich zastosowanie do otrzymywania oligonukleotydów i wykorzystanie do selekcji aptamerów. Przyczyniły się również do pozyskania grantu badawczo-rozwojowego z NCBiR oraz są wykorzystywane w dwóch innych projektach realizowanych przez spółkę Pure Biologics.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Przemysława Jurka spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Przemysława Jurka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.