

Klaudia Arciszewska

Zakład Biotechnologii Roślin, WBBiB, Uniwersytet Jagielloński

Promotor: dr hab. Wojciech Strzałka

Tytuł rozprawy:

Identyfikacja i charakterystyka aptameru DNA wiążącego metkę lizylową –
zastosowanie w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych.

Streszczenie:

Do pozyskiwania czystych preparatów białkowych wykorzystuje się metody takie jak chromatografia jonowymienna, oddziaływań hydrofobowych czy powinowactwa. Największą specyficnością charakteryzuje się ostatni z wyżej wymienionych typów chromatografii adsorpcyjnej polegającej na specyficznym oddziaływaniu dwóch cząsteczek – ligandu unieruchomionego na złożu oraz analitu obecnego w mieszaninie białek. Ze względu na swe właściwości chromatografia powinowactwa pozwala na uproszczenie procedury pozyskiwania wybranego białka z możliwością zachowania jego biologicznej aktywności. W metodzie tej powszechnie stosuje się tzw. metki peptydowe lub białkowe, które sprzęgane są z białkami rekombinowanymi docelowo poddawanych procesowi oczyszczania. Dotychczas opracowano kilka układów ligand/ analit przykładowo jony Ni^{2+} /metka histydylowa (His-Tag) czy też glutation/ transferaza glutationowa-S (GST). Rozwój metod biologii molekularnej umożliwi produkcję coraz większej liczby różnorodnych białek. Jednak uzyskanie czystych preparatów tych białek nie zawsze jest możliwe przy zastosowaniu dostępnych obecnie systemów chromatografii powinowactwa. W związku z powyższym jedną z dróg dalszego rozwoju tej metody jest poszukiwanie nowych układów ligand/metka.

Do wiązania metek peptydowych wykorzystywane mogą być m.in. aptamery, czyli krótkie cząsteczki DNA albo RNA, których długość zazwyczaj wynosi od 40 do 120 nukleotydów. Przybierają one charakterystyczną strukturę drugo- i trzeciorzędową, która umożliwia im wiązanie substancji drobnocząsteczkowych (w tym jonów metali), peptydów, białek, a nawet całych komórek. Aptamery wykorzystywane są w wielu obszarach nauki, między innymi do tworzenia biosensorów, cząsteczek terapeutycznych czy obrazowania.

Jedną z metek peptydowych wykorzystywanych do oczyszczania białek rekombinowanych jest peptyd lizylowy. Znalazł on zastosowanie w chromatografii jonowymiennej, jednak to tej porze nie opracowano układu ligand/ analit z zastosowaniem tej metki. Lizyna jest aminokwasem polarnym o ładunku dodatnim w pH neutralnym, dlatego może oddziaływać z innymi cząsteczkami o ujemnym ładunku np. DNA. Do atutów tej metki można zaliczyć możliwość poprawy stabilności białek, czy fakt że metkę tą z łatwością można odciąć za pomocą karboksypeptydazy C. Co więcej polipeptyd lizylowy może być wykorzystywany jako czynnik: antibakteryjny, wspomagający przechodzenie peptydów przez błonę komórkową czy wspomagający adhezję komórek i tkanek do tworzyw takich jak szkło czy plastik.

Celem zrealizowanej pracy doktorskiej było opracowanie nowego układu chromatografii powinowactwa, opartego na oddziaływaniu aptamer DNA/ metka lizylowa, przeznaczonego do

oczyszczania białek rekombinowanych. W tym celu w pierwszym etapie badań przeprowadzono selekcję aptamerów rozpoznających metkę lizylową przy pomocy metody SELEX (ang. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) oraz przy użyciu dwóch bibliotek ssDNA (ang. single-strand DNA, pojedyncza nić DNA). Przy użyciu techniki ilościowego PCR (qPCR) z każdej biblioteki wyznaczono pulę aptamerów o największym powinowactwie do peptydu lizylowego, a następnie je zsekwencjonowano. Z otrzymanych sekwencji wyłonione zostały te, które wykazywały najwyższy poziom wiązania do metki lizylowej. Zidentyfikowane cząsteczki nazwano aptamerami B7 oraz M13. Wykazano, że obydwie cząsteczki z wysokim powinowactwem wiążą białka sprzęgnięte z metką fuzyjną, natomiast nie wiążą białka bez metki. W następnym etapie badań określono minimalną długość metki lizylowej, która wyniosła 5 lizyn (5K). Skracanie wyjściowych cząsteczek od końca 5' lub 3' pozwoliło ustalić sekwencję wyselekcjonowanych aptamerów niezbędną do wiązania metki. Ostateczne formy aptamerów B7 i M13 nazwano odpowiednio B5K oraz M5K. Następnie dla obydwu aptamerów zoptymalizowano bufor wiążący wykazując, że do wiązania metki 5K niezbędna jest obecność jonów potasu. Przeprowadzono charakterystykę struktury drugorzędowej badanych aptamerów techniką dichroizmu kołowego, potwierdzając tym samym, iż jest ona zależna od obecności jonów potasu. Wyznaczono stałą dysocjacji dla kompleksu aptamer B5K/metka lizylowa. Z uwagi na znacząco niższe powinowactwo do metki lizylowej aptameru M5K w porównaniu do aptameru B5K został on wykluczony z dalszych badań. W kolejnym etapie badań ustalono skład buforu umożliwiającego elucję metki lizylowej ze złoża ze zimmobilizowanym aptamerem B5K. Wykazano, że w celu destabilizacji kompleksu aptamer B5K/ metka lizylowa należy usunąć z roztworu jony potasu i dodać 200 mM chlorowodorek guanidyny.

Ostatecznie zademonstrowano, że złożo chromatograficzne z immobilizowanym na powierzchni aptamerem B5K może być użyte do wielokrotnego oczyszczania białek rekombinowanych sprzęgniętych z metką lizylową z ekstraktu białkowego uzyskanego z bakterii *Escherichia coli*. Dodatkowo wykazano, że aptamer B5K może być używany w metodzie ELONA (ang. Enzym Linked OligoNucleotide Assay) jako narzędzie do detekcji białek zawierających metkę lizylową.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń po raz pierwszy zidentyfikowano i scharakteryzowano aptamer DNA specyficznie wiążący metkę składającą się z pięciu lizyn. Wykazano, że z powodzeniem może być on wykorzystany jako ligand w chromatografii powinowactwa białek z metką lizylową oraz narzędzie do detekcji takich białek.

Kludie Aruszeńska