03 -01- 2018

Streszczenie Pracy Doktorskiej Jarosława Juchy pt.

**„Otrzymywanie aptamerów RNA hamujących aktywność biologiczną metaloproteaz dysintegrynowych ADAM10 i ADAM17"**

Promotor: prof. dr hab. Joanna Bereta

# STRESZCZENIE

---


ADAM10 i ADAM17 to najlepiej poznane białka z rodziny błonowych metaloproteaz dysintegrynowych (*A Disintegrin And Metalloprotease*). Enzymy te, określane jako szedazy (*sheddases*) odpowiadają za złuszczanie z powierzchni komórek ektodomen białek błonowych takich jak czynniki wzrostu, cytokiny i ich receptory jak również białka adhezji komórkowej. Aktywność ADAM10 i ADAM17 jest szczególnie ważna w procesach wzrostu i różnicowania komórek oraz w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Podwyższona ekspresja tych białek może przyczyniać się do rozwoju chorób o podłożu przewlekłego stanu zapalnego oraz chorób nowotworowych. Proteazy ADAM10 i ADAM17 są obecnie szeroko badane jako potencjalne cele terapii w tych schorzeniach.

Pomimo prowadzonych prac mających na celu otrzymanie specyficznych inhibitorów ADAM10 i/lub ADAM17 (przeciwciała i związki małocząsteczkowe), do tej pory nie udało się wprowadzić ich do terapii ze względu na niską specyficzność lub wywoływane efekty uboczne. Alternatywą dla leków małocząsteczkowymi i przeciwciał monoklonalnych, są aptamery mogące spełniać rolę potencjalnych inhibitorów proteaz. Aptamery to jednoniciowe oligonukleotydy RNA lub DNA wyłonione z kombinatorycznej biblioteki, wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność względem targetowanej cząsteczki. W toku prowadzonych badań, do wyodrębnienia aptamerów RNA specyficznych względem białek ADAM10 i ADAM17, zastosowałem zmodyfikowaną metodę SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) wykorzystującą żywe komórki (cell-SELEX). Prowadziłem selekcję pozytywną – na komórkach wykazujących ekspresję białek ADAM oraz selekcje negatywne – na komórkach pochodzących z myszy z nokautem *Adam10* lub *Adam17*. Po kilkunastu rundach selekcyjnych otrzymałem szereg aptamerów RNA, których cDNA zsekwencjonowałem.

Aby scharakteryzować aktywność aptamerów, otrzymałem rekombinowane, aktywne proteolitycznie ektodomeny białek ADAM10 oraz ADAM17 wykorzystując system bakulowirusowy. Oczyszczone proteazy pozwoliły na analizę specyficzności uzyskanych aptamerów, analizę aktywności inhibitorowej (IC50) aptamerów w stosunku do reakcji proteolizy syntetycznego substratu oraz wyznaczenie stałej dysocjacji dla wybranego kompleksu aptamer:ADAM17_mFc za pomocą elektroforezy kapilarnej.

Analizowałem również specyficzność inhibitorową aptamerów w stosunku do białek ADAM10 i ADAM17 w ich naturalnym środowisku błony komórkowej. Badałem wpływ aptamerów na migrację komórek czerniaka B16F10 promowaną przez białka ADAM oraz na uwalnianie naturalnych substratów enzymów ADAM: TNF-u oraz receptora IL-6 z powierzchni komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7 oraz B16F10 typu dzikiego oraz takich, które pozbawiłem ekspresji *Adam17* metodami edycji genomu (TALEN w B16F10 i CRISPR/Cas9 w RAW264.7).

Dla wybranych sekwencji aptamerów RNA przeprowadziłem także symulację tworzenia struktur drugo- i trzeciorzędowych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych.