

Karolina Zielińska

Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny.

Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna.

STRESZCZENIE

Zrozumienie informacji zawartej w sekwencjach genomu czy transkryptomu oraz terapeutyczne zarządzanie procesami komórkowymi stanowią największe wyzwanie naszych czasów. W przypadku chorób uwarunkowanych genetycznie znajomość sekwencji chorobotwórczego genu jest podstawą do projektowania leków nakierowanych na zmieniony gen lub białko powstałe na matrycy nieprawidłowego genu. Wyniki licznych badań z ostatnich lat wskazują na kluczową rolę kwadrupleksów w wielu procesach biologicznych. Struktury kwadrupleksów tworzą się z sekwencji bogatych w reszty guanozyny, które w odpowiednich warunkach tworzą oddziałujące warstwowo G-tetrazy. Sekwencje potencjalnie tworzące kwadrupleksy powszechnie występują w ludzkim genomie i transkrypcie. Zaproponowano liczne narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne, których mechanizm działania opiera się na indukowaniu i stabilizacji struktur kwadrupleksowych. Na przykład kwadrupleksy okazały się atrakcyjnymi celami terapii przeciwnowotworowej oraz w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym ze sposobów regulacji ekspresji patogennego genu, w którym kwadrupleksy odgrywają kluczową rolę, jest wykorzystanie odpowiednich ligandów specyficznych względem kwadrupleksów.

Moje badania dotyczyły poznania właściwości dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych bogatych w reszty guanozyny oraz sprawdzenia możliwości wykorzystania ich do selektywnego rozpoznania docelowych sekwencji RNA, różniących się tylko jedną resztą nukleotydową. Zaproponowane przeze mnie podejście opiera się na współdziałaniu dwóch strukturalnych domen kwasów nukleinowych, dupleksowej oraz kwadrupleksowej. Jak wykazałam, podejście takie umożliwia rozpoznanie mutacji punktowej (U→G) poprzez utworzenie różnych struktur drugorzędowych po przyłączeniu oligonukleotydu antysensowego do docelowego RNA - struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**) oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**). Wykorzystując różne techniki eksperymentalne, takie jak spektroskopia NMR, UV, CD czy analiza w żelu poliakrylamidowym, zbadalam właściwości tych struktur w różnych warunkach oraz określiłam wpływ nienukleotydowych modyfikacji chemicznych (reszty typu abasic, linkery alifatyczne) na stabilność i strukturę badanych kompleksów **DQH** i **Dss**. Pokazałam, że G4-ligand przyłączony kowalencyjnie do oligonukleotydu antysensowego wiąże się selektywnie do kwadrupleksu w strukturze hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks. Taki związany

kowalencyjnie do oligonukleotydu antysensowego G4-ligand może spowolnić proces rozplatania kwadrupleksu w komórce a także służyć jako selektywny znacznik fluorescencyjny do detekcji dwucząsteczkowych kwadrupleksów.

We współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN wykazałam, że zaprojektowane przeze mnie dwufunkcyjne oligorybonukleotydy efektywniej wyciszają ekspresję badanych genów niż klasyczne oligonukleotydy antysensowe, które tworzyły struktury dupleksów z docelową sekwencją RNA. Możliwość rozpoznania jednonukleotydowej zmiany w sekwencji docelowej przez oligonukleotyd antysensowy ma ogromny potencjał terapeutyczny. Na przykład u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca często diagnozowana jest mutacja genu w wyniku której dochodzi do zmiany sekwencji we fragmencie mRNA z GGGCUGG na GGGCGGG, co stanowi potencjalny cel dla terapii wykorzystującej dwufunkcyjne oligonukleotydy bogate w reszty guanozyny.