

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

**Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny.
Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna.**

Karolina Zielińska

Pracę wykonano w Zakładzie Biomolekularnego NMR
pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Gdaniec

Promotor pomocniczy dr Dorota Gudanis

Poznań, 2021

*Badania częściowo finansowane w ramach grantu
z Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2014/13/B/ST5/04144
„Hybrydowe, dwufunkcyjne struktury RNA typu dupleks-kwadrupleks
jako nowe narzędzie do wyciszenia ekspresji genów”*

*Serdecznie dziękuję **Pani Prof. dr hab. Zofii Gdaniec**
za powierzony mi temat pracy doktorskiej,
przekazaną wiedzę, opiekę naukową,
cierpliwość i wyrozumiałość oraz poświęcony czas.
Dziękuję również za życzliwość, zaufanie
i gotowość do pomocy w każdej chwili,
nie tylko przy realizacji badań i redagowaniu niniejszej pracy.*

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć
dr Dorocie Gudanis za nieocenioną pomoc,
cenne wskazówki, wyrozumiałość i poświęcony czas
przy realizacji niniejszej rozprawy.
Dziękuję również za okazaną życzliwość i wsparcie.*

Dziękuję również

Panu Prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi

*za przekazaną wiedzę, wsparcie
oraz okazaną życzliwość.*

Pani Prof. dr hab. Elizie Wyszko oraz

Pani dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej

*za owocną współpracę, nieocenioną pomoc
oraz przekazaną wiedzę.*

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biomolekularnego NMR,

*za wspaniałą atmosferę, liczne dyskusje naukowe,
wszelką okazaną pomoc i wsparcie.*

Szczególnie dziękuję dr Danielowi Baranowskiemu

za pomoc i cenne wskazówki przy

badaniu oddziaływań z G4-ligandami.

Dziękuję także, dr Magdalenie Małgowskiej,

za niegdyś wspólnie spędzony czas, a teraz,

pomimo dzielącego nas oceanu cenne rady i wsparcie.

*Specjalne podziękowania pragnę złożyć
mojemu **Mężowi Karolowi i Synkowi Wojtusowi**
za nieocenioną pomoc, nieustanne wsparcie,
cierpliwość, zrozumienie i mobilizację.*

*Dziękuję moim **Rodzicom i Siostrze** za wiarę we mnie i nieustanne wsparcie.*

Publikacje i wystąpienia konferencyjne związane z tematyką rozprawy doktorskiej:

Publikacja:

- 1). M. Malgowska, K. Czajczyńska, D. Gudanis, A. Tworak, Z. Gdaniec
Overview of the RNA G-quadruplex structures
Acta Biochim. Pol. vol. **63**, 609-621 (2016)

Wystąpienia konferencyjne:

- 1). K. Zielińska
Wpływ modyfikacji chemicznych na tworzenie się struktur hybrydowych RNA typu dupleks-kwadrupleks
VI Spotkanie użytkowników BRUKER, Poznań 2017
- 2). K. Czajczyńska
RNA hybrid duplex-quadruplex structures with dual functionality as a new tool for silencing of gene expression
II Konferencja KNOW w Obrzycku, Poznań 2015
- 3). K. Zielińska, D. Gudanis, D. Baranowski, Z. Gdaniec
The effect of G4-ligands on the stability of RNA Duplex-G-Quadruplex Hybrid
Chemistry Beyond Nature, Poznań 2018
- 4). K. Zielińska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Wpływ modyfikacji chemicznych na tworzenie się struktur hybrydowych RNA typu dupleks-kwadrupleks
YUPPAS NMR, Łódź 2017
- 5). D. Gudanis, K. Czajczyńska, Z. Gdaniec
Influence of chemical modification on RNA duplex-quadruplex hybrid formation
6th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Prague, Czech Republic, 2017

- 6). D. Gudanis, K. Czajczyńska, Z. Gdaniec
Hybrydowe, dwufunkcyjne struktury RNA typu dupleks-kwadrupleks jako nowe narzędzie do wyciszania ekspresji genów
IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Poznań 2015
- 7). D. Gudanis, K. Czajczyńska, Z. Gdaniec
Hybrydowe, dwufunkcyjne struktury RNA typu dupleks-kwadrupleks jako nowe narzędzie do wyciszania ekspresji genów
58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku 2015
- 8). K. Czajczyńska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
¹H NMR, CD and UV study of duplex-quadruplex structural hybrid
Magnetic Moments in Central Europe, Krynica Zdrój 2015
- 9). K. Czajczyńska, D. Gudanis, Z. Gdaniec
Spectroscopic Study of Quadruplex-Duplex Hybrids
5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Bordeaux, France 2015
- 10). D. Gudanis, K. Czajczyńska, Z. Gdaniec
Structural Characterization of a Dimer of RNA Duplexes Composed of CGG Trinucleotide Repeats: a Novel Architecture of RNA Quadruplexes
5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Bordeaux, France 2015

Kierowanie projektami:

Kierownik w granie badawczym służącym rozwojowi młodych naukowców IChB PAN 2018: Nowe układy hybrydowe RNA typu dupleks-kwadrupleks o potencjale do regulacji ekspresji genów.

Spis treści

I.	STRESZCZENIE	18
II.	ABSTRACT	20
III.	WPROWADZENIE	22
IV.	CEL PRACY	27
V.	CZEŚĆ LITERATUROWA	30
	V. 1. Kwadrupleksy DNA i RNA	30
	V. 2. Niekanoniczne motywy strukturalne kwadrupleksów RNA	37
	V. 3. Struktury hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks	42
	V. 4. Stabilność kwadrupleksów	44
	V. 4. 1. Wpływ kationów	45
	V. 4. 2. Wpływ sekwencji i długości pętli	46
	V. 4. 3. Modyfikacje chemiczne rdzenia kwadrupleksu	48
	V. 4. 4. Rola G4-ligandów	49
	V. 5. Występowanie i biologiczna funkcja kwadrupleksów oraz struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks	53
	V. 6. Wybrane metody badań kwadrupleksów	57
	V. 6. 1. Metody biofizyczne stosowane w badaniach kwadrupleksów Dichroizm kołowy	57
	Spektroskopia UV	58
	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego	60
	V. 6. 2. Metody biochemiczne	65
	Elektroforeza żelowa	65
	Techniki mapowania chemicznego (DMS, SHALiPE, DMSLiPE)	66
	Ligandy oraz sondy fluorescencyjne do monitorowania kwadrupleksów <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	67
	V. 7. Strategie terapeutyczne	70
	V. 8. Nadekspresja EGFR – czynnik nowotworzenia	77
	V. 9. Szczepionki mRNA przeciw COVID-19	80
VI.	WYNIKI	84
	VI. 1. Badania strukturalne modelowych układów CCC/G ^T i CCC/U ^T	84
	VI. 2. Badania struktury drugorzędowej układów DNA-CCC/G ^T i DNA-CCC/U ^T	93
	VI. 3. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe zawierające modyfikacje chemiczne	97
	VI. 4. Struktura i stabilność układów DQH oraz Dss zawierających modyfikacje chemiczne	107
	VI. 5. Badanie oddziaływań G4-ligandów z modelowymi strukturami DQH oraz Dss	128
VII.	Analiza represji translacji przez oligorybonukleotydy antysensowe tworzące różne struktury drugorzędowe z docelowym mRNA	134
VIII.	DYSKUSJA I PODSUMOWANIE	151
IX.	MATERIAŁY I METODY	160
X.	LITERATURA	172

SPIS SKRÓTÓW:

HUGO - project poznania ludzkiego genomu (ang. <i>Human Genome Project</i>)	GFP - białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i>)
ASO - oligonukleotydy antysensowe (ang. <i>antisense oligonucleotides</i>)	mRNA - matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
Q - segment kwadrupleksu	U - urydyna
D - segment dupleksu	A – adenozyrna
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy	BrG - 8-bromoguanozyna
RNA - kwas rybonukleinowy	G - reszty guanozyny
RNaza H – rybonukleaza H	UV - spektroskopia UV
FDA - Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)	NMM - N-metylo mezoporfiryna IX (ang. <i>N-methyl mesoporphyrin IX</i>)
PQS - sekwencje potencjalnie tworzące kwadrupleks (ang. <i>putative quadruplex sequences</i>)	NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
PDB - baza danych (ang. <i>Protein Data Bank</i>)	TDS - różnicowe temperaturowe widma UV (ang. <i>thermal difference spectrum</i>)
G4-ligand - ligand specyficzny względem kwadrupleksów	CD - dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i>)
DQH - hybryda typu dupleks-kwadrupleks (ang. <i>duplex-quadruplex hybrid</i>)	NGS - sekwencjonowanie nowej generacji (ang. <i>Next-Generation Sequencing</i>)
DQ - dwufunkcyjny oligonukleotyd typu dupleks-kwadrupleks	UTR - rejon RNA nieulegający translacji (ang. <i>Untranslated Region</i>)
Dss - dupleks z nieuporządkowanymi końcami	NDRP - niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>non-small cell lung cancer</i>)
EGFR - receptor czynnika wzrostu naskórka, (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)	HSQC - heterojądrowe widma korelacyjne 2D NMR wykorzystujące sprzężenia skalarne poprzez jedno wiązanie (ang. <i>Heteronuclear single quantum correlation</i>)
NOESY - homojądrowe widma korelacyjne 2D NMR wykorzystujące sprzężenia dipolowe (ang. <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>)	HMBC – heterojądrowe widma korelacyjne 2D NMR wykorzystujące sprzężenia skalarne dalekiego zasięgu (ang. <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)

PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

DMSLiPE - metoda mapowania chemicznego (ang. *Dimethyl sulfate with lithium ion-based primer extension*)

SHALiPE - metoda mapowania chemicznego (ang. *Selective 2'-hydroxyl acylation with lithium ion-based primer extension*)

DMS – metoda mapowania chemicznego z zastosowaniem siarczanu dimetylu (ang. *dimethyl sulfate*)

SLQS - sekwencje potencjalnie tworzące kwadrupeksy mogące tworzyć w obrębie pętli motywy dwuniciowe (ang. *stem-loop-containing quadruplex sequences*)

I. 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-tetrydy. 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, zbadałam 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-

kwadrupeks. Taki związany kowalencyjnie do oligonukleotydu antysensowego G4-ligand może spowolnić proces rozplatania kwadrupeksu w komórce a także służyć jako selektywny znacznik fluorescencyjny do detekcji dwucząsteczkowych kwadrupeksów.

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.

II. ABSTRACT

Understanding the information contained in genome or transcriptome sequences and the therapeutic management of cellular processes are the greatest challenges of our time. In the case of genetically determined diseases, knowledge of the sequence of the pathogenic gene is the basis for the design of drugs targeting the changed gene or a protein derived from it. In recent years, the results of numerous studies have indicated the key role of quadruplexes in many biological processes. The quadruplex structures are formed from guanosine rich sequences, which under appropriate conditions, form stacked layers of guanine tetrads. Putative quadruplex sequences are commonly found in the human genome and transcriptome. Numerous diagnostic and therapeutic tools have been proposed, the mechanism of which is based on the induction and stabilization of quadruplex structures. For example, quadruplexes have proved to be attractive targets in anti-cancer therapy and in the treatment of neurodegenerative diseases. One way to regulate the expression of a pathogenic gene, in which quadruplexes play a key role, is to use appropriate quadruplex specific G4-ligands.

My research was concerned with the properties of guanine-rich bifunctional antisense oligonucleotides and examining the possibility of using them to selectively recognize target RNA sequences that differ by only one nucleotide residue. Such an approach is based on the synergistic effect of two nucleic acid structural elements, called the duplex and quadruplex domains. This approach enables the recognition of a point mutation (U→G) by the formation of different secondary structures after attaching the antisense oligonucleotide to the target RNA – either a duplex-quadruplex hybrid (**DQH**) structure or a duplex with unstructured ends (**Dss**). Using various experimental techniques, such as NMR, UV, CD spectroscopy or polyacrylamide gel electrophoresis, I investigated the properties of these types of structure under various conditions and determined the influence of non-nucleotide chemical modifications (abasic residues, aliphatic linkers) on the stability and structure of the studied **DQH** and **Dss** complexes. I showed that a G4-ligand covalently attached to an antisense oligonucleotide binds selectively to the quadruplex domain in a duplex-quadruplex hybrid structure. Such a G4-ligand covalently bound to the antisense oligonucleotide can slow down the quadruplex unwinding process in the cell and also serve as a selective fluorescent marker for the detection of bimolecular quadruplexes.

In cooperation with the Laboratory for the Analysis of Subcellular Structures IBCH PAS, I have shown that the oligoribonucleotides designed by me, silence gene expression

more effectively than classic antisense oligonucleotides, which only create duplexes with the target RNAs. The ability to recognize a single nucleotide change in the target sequence by an antisense oligonucleotide has great therapeutic potential. For example, in patients with non-small cell lung cancer a gene mutation is often diagnosed that results in a sequence change in the mRNA fragment from GGCUGG to GGC~~U~~GG, which is a potential target for therapy using bifunctional oligonucleotides rich in guanosine residues.

III. WPROWADZENIE

Zrozumienie informacji zawartej w sekwencjach genomu czy transkryptomu oraz terapeutyczne zarządzanie procesami komórkowymi stanowią największe wyzwanie naszych czasów. Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu w Projekcie HUGO (ang. *Human Genome Project*) było krokiem milowym w rozwoju nowoczesnej, spersonalizowanej farmakoterapii.(1) 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. W przypadku wielu takich chorób jednym ze sposobów terapii może być zahamowanie ekspresji genów za pomocą niewielkich cząsteczek kwasów nukleinowych, ogólnie nazywanych terapeutycznymi kwasami nukleinowymi. Wśród strategii terapeutycznych opartych na kwasach nukleinowych, w zależności od mechanizmu ich działania wyróżnia się strategię antygenową, antysensową i aptamerową.(2–4) Podczas planowania terapii opartych na modulacji ekspresji genów istotnym jej elementem jest zrozumienie zależności pomiędzy strukturą przestrzenną biomolekuła a ich rolą w procesach komórkowych.

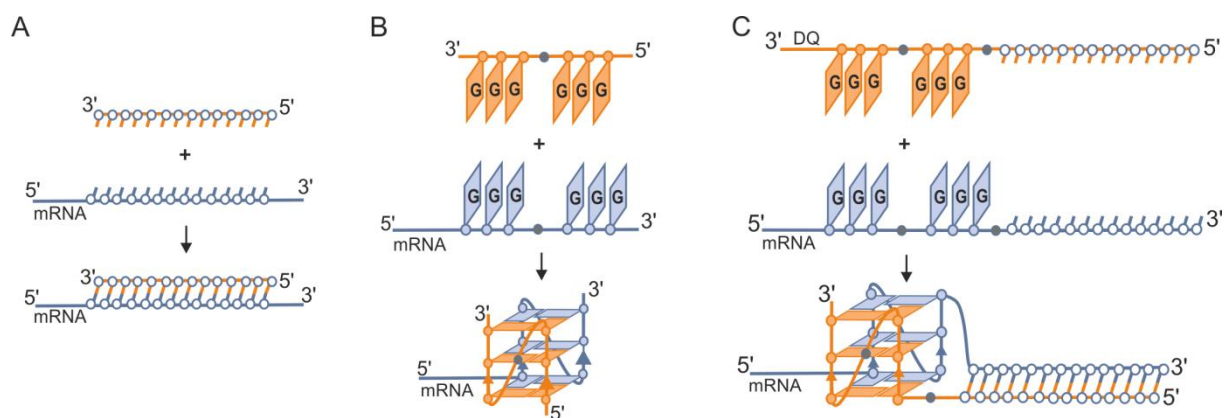
Oligonukleotydy antysensowe (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*)(5), krótkie interferujące RNA (siRNA)(6) oraz system CRISPR/Cas9(7) uważane są obecnie za najbardziej obiecujące podejścia terapeutyczne regulujące ekspresję genów w oparciu o specyficzną antysensową wobec kwasów nukleinowych. W projektowaniu skutecznego oligonukleotydu antysensowego kluczowym etapem jest wybór optymalnej sekwencji ASO, charakteryzującej się wysokim powinowactwem spośród wielu możliwych sekwencji komplementarnych do docelowego mRNA. Efektywność hybrydyzacji ASO z mRNA zależy głównie od parametrów kinetycznych i termodynamicznych tworzenia kompleksów ASO/mRNA. Niestety, oligonukleotydy antysensowe mogą ulegać degradacji powodowanej przez egzo- i endonukleazy. W celu polepszenia efektywności takich oligonukleotydów i zwiększenia ich trwałości w medium komórkowym stosuje się różne rodzaje modyfikacji chemicznych.(8) Zahamowanie ekspresji genów przez ASO odbywać się może w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku po hybrydyzacji oligonukleotydu antysensowego DNA z docelowym RNA powstaje heteroduplex DNA/mRNA, który jest rozpoznawany przez enzym RNazę H a następnie RNaza H hydrolizuje cząsteczkę mRNA. W ten sposób zdegradowana matryca uniemożliwia dalszą biosyntezę białka. Drugi mechanizm zakłada, że komplementarne oligonukleotydy ASO po hybrydyzacji z mRNA tworzą zawadę przestrzenną dla rybosomu, który napotyka trudności w przyłączeniu się

lub przesuwaniu wzdłuż matrycy mRNA, zaburzając w ten sposób proces translacji (rys. 1 A).

W 1977 roku Peterson i in.(9) po raz pierwszy dowiedli, że możliwe jest zahamowanie ekspresji genu za pomocą jednoniciowego oligonukleotydu DNA komplementarnego do mRNA. Rok później Zamecnik i Stephenson(10) zaobserwowali zahamowanie transformacji nowotworowych komórek kurzych wywołane obecnością 13-nukleotydowego oligomeru DNA komplementarnego do RNA wirusa. Dopiero po przeszło 40-tu latach amerykańska organizacja FDA (ang. *Food and Drug Administration*) zatwierdziła pierwszy lek antysensowy o nazwie Mipomersen na homozygotyczną hipercholesterolemię rodzinną spowodowaną mutacją genu receptora APOB-100. Do 2019 roku zatwierdzono kolejne pięć leków antysensowych, a co najmniej kolejne cztery znajdują się w końcowej fazie badań klinicznych. Są to leki umożliwiające leczenie lub łagodzenie objawów rzadkich chorób, takich jak przykładowo dystrofia mięśniowa Duchenne'a (Eteplirsen) czy rdzeniowy zanik mięśni (Nusinersen).(5)

Wyniki licznych badań z ostatnich lat wskazują na kluczową rolę kwadrupleksów w wielu procesach biologicznych, w tym rekombinacji, replikacji, transkrypcji i translacji. Struktury kwadrupleksów tworzą się z sekwencji bogatych w reszty guanozyny, które w odpowiednich warunkach tworzą oddziałujące warstwowo G-tetrazy. Sekwencje potencjalnie tworzące kwadrupleksy (**PQS**, ang. *Putative Quadruplex Sequences*) powszechnie występują w ludzkim genomie i transkryptomie.(11) Związek między tworzeniem się kwadrupleksu a kluczowymi procesami biologicznymi w komórkach pozwala na wykorzystanie sekwencji bogatych w reszty guanozyny do zaprojektowania narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych dla różnych chorób. Na przykład kwadrupleksy okazały się atrakcyjnymi celami terapii przeciwnowotworowej i w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.(12) Jednym ze sposobów regulacji ekspresji patogennego genu, w którym kwadrupleksy odgrywają kluczową rolę, jest wykorzystanie odpowiednich ligandów specyficznych względem kwadrupleksów (G4-ligandy).(13) Może mieć to szczególne znaczenie wówczas, gdy przebieg procesu biologicznego zależny jest od obecności struktur kwadrupleksów a ligand wydłuża czas życia kwadrupleksu w komórce. Jednak ze względu na małą selektywność znanych obecnie G4-ligandów wobec poszczególnych struktur kwadrupleksów, istotnym problemem są efekty *off-target*. Inna metoda o potencjale terapeutycznym opiera się na indukowaniu kwadrupleksów za pomocą krótkich oligorybonukleotydów bogatych w reszty guanozyny (np. sekwencja 5'-GGGCCCCGGG-3'). Oligonukleotydy te po połączeniu z sekwencją docelową mRNA,

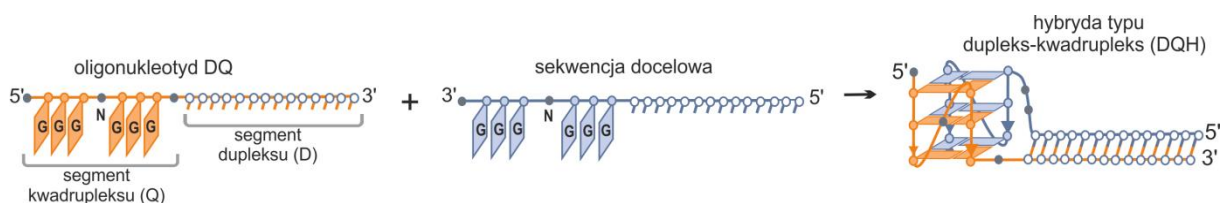
również bogatą w reszty guanozyny, tworzą dwucząsteczkowy kwadrupleks RNA:RNA, który stanowi zawadę steryczną dla rybosomu, regulując w ten sposób procesy komórkowe (rys. 1 B).(14) Jednakże i w tym przypadku indukowanie kwadrupleksów może być bardzo niespecyficzne z uwagi na dużą liczbę sekwencji PQS w transkrypcie. W 2011 roku Hagihara i in. zaproponowali inne podejście wykorzystujące tworzenie heterohybrdy DNA:RNA typu dupleks-kwadrupleks na matrycy mRNA, w przewidywalny i specyficzny dla danej sekwencji sposób.(15) Polega ono na dołączeniu do tradycyjnego oligonukleotydu antysensowego DNA, zapewniającego specyficzność rozpoznania mRNA, sekwencji bogatej w reszty guanozyny zawierającej od jednego do trzech bloków guanozynowych GGG. Wykorzystując takie oligonukleotydy DNA bogate w reszty guanozyny (**ddQ**) możliwe było skuteczne i specyficzne zahamowanie odwrotnej transkrypcji dla różnych sekwencji RNA, w tym genomu RNA wirusa HIV-1 (rys. 1 C).(15) W 2014 Bhattacharyya i in., wykorzystując jednocześnie dwa różne oligonukleotydy antysensowe **ddQ** do indukowania struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**), zaobserwowali obniżoną zdolność komórek nowotworowych do proliferacji.(16)



Rys. 1. Przykładowe strategie wyciszenia ekspresji genów: klasyczna, wykorzystująca komplementarne oligonukleotydy (A), indukująca kwadrupleksy na matrycy mRNA (B) lub struktury hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks (C).

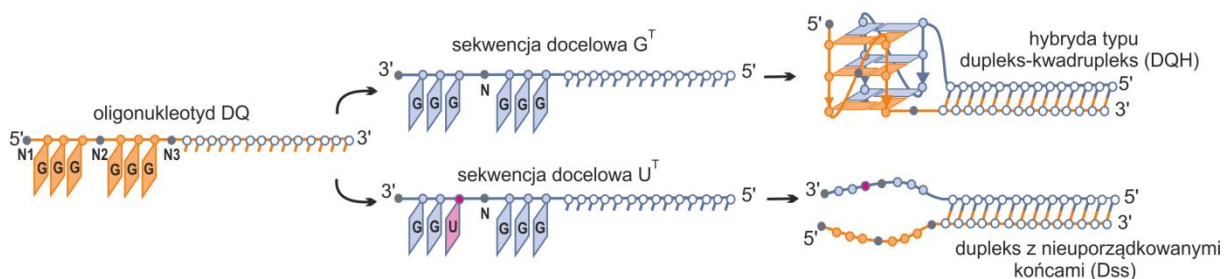
Ogólnie wiadomo, że zarówno dupleksy RNA:RNA jak i dwuniciowe kwadrupleksy RNA:RNA są stabilniejsze niż odpowiednie struktury dwuniciowe DNA:DNA oraz DNA:RNA.(17, 18) Zainspirowana możliwością wykorzystania struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**) jako narzędzia do wyciszenia ekspresji genów postanowiłam zbadać tendencję oligorybonukleotydów bogatych w reszty guanozyny (**DQ**) do tworzenia struktur typu dupleks-kwadrupleks **DQH** na matrycach

mRNA (rys. 2) oraz zbadać ich właściwości. Analogicznie do eksperymentów opisanych w pracy Hagihary i in., oligonukleotydy w serii RNA należało tak zaprojektować, aby zawierały dwa segmenty: dupleksu (**D**) i kwadrupleksu (**Q**). Segment dupleksu, odpowiedzialny przede wszystkim za selektywność oligonukleotydu antysensowego, powinien być komplementarny do fragmentu docelowego mRNA. Z kolei segment kwadrupleksu o sekwencji (-GGG-N-GGG) po związaniu z mRNA zawierającym również dwa bloki guanozynowe powinien utworzyć motyw kwadrupleksu.(15) Oligonukleotydy te dalej nazywam również dwufunkcyjnymi, gdyż każdy z tych dwóch segmentów pełni inną rolę.



Rys. 2. Schemat wiązania dwufunkcyjnego oligorybonukleotydu **DQ** do sekwencji docelowej bogatej w reszty guanozynowe z utworzeniem struktury hybrydy typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**).

Cały czas nurtowało mnie pytanie, czy dla utworzenia się struktury hybrydowej **DQH** niezbędna jest obecność dwóch bloków -GGG-N-GGG zarówno w sekwencji oligonukleotydu antysensowego jak i w sekwencji docelowego mRNA. Zastanawiałam się bowiem, czy możliwe jest wykorzystanie oligonukleotydów **DQ** do selektywnego wyciszenia ekspresji genów różniących się jedną resztą w rejonie bogatym w reszty guanozynowe, -GGG-N-GGG vs. -GGG-N-XGG, gdzie X- reszta inna niż G. Aby to było możliwe, oligonukleotydy **DQ** po połączeniu z sekwencjami docelowymi bogatymi w reszty guanozynowe, różniącymi się jednym nukleotydem, musiałyby utworzyć różne struktury drugorzędowe, hybrydę dupleks-kwadrupleks (**DQH**) i dupleks z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**) (rys. 3).



Rys. 3. Schemat wiązania dwufunkcyjnych oligonukleotydów **DQ** do sekwencji docelowych różniących się jedną resztą nukleotydową G/U z utworzeniem różnych struktur: hybrydy typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**) oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**).

Postanowiłam dowiedzieć się, czy istnieje taka mutacja, która mogłaby posłużyć, jako potencjalny cel moich badań. Okazało się, że w przypadku chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, u około 10% chorych rasy kaukaskiej i około 30-40% chorych pochodzenia azjatyckiego, jedną z najczęściej diagnozowanych mutacji jest substytucja (T→G) w pozycji 858 w eksonie 21 genu EGFR (około 40-45% wszystkich mutacji). W wyniku mutacji EGFR-L858R dochodzi do zmiany sekwencji we fragmencie genu EGFR mRNA z GGGC**U**GG na GGGC**G**GG, co mogłoby stanowić potencjalny cel dla terapii wykorzystującej dwufunkcyjne oligonukleotydy **DQ**. Zaplanowałam więc badania mające na celu sprawdzenie, czy po połączeniu antysensowego oligorybonukleotydu w serii DNA lub RNA z RNA zawierającym fragment sekwencji -GGGC**G**GG- lub -GGGC**U**GG- powstaną różne struktury a mianowicie hybryda typu dupleks-kwadrupleks lub dupleks z nieuporządkowanymi końcami (rys. 3). Planując wykorzystanie cząsteczek RNA jako oligonukleotydy antysensowe musiałam mieć na uwadze fakt, że cząsteczki te są podatne na degradację. Dlatego też w kolejnym etapie mojej pracy zaplanowałam badania, w których zamierzałam sprawdzić, jak wprowadzenie nienukleotydowych modyfikacji chemicznych i liganda do łańcucha oligorybonukleotydowego wpływa na właściwości struktur typu **DQH** i **Dss**.

IV. CEL PRACY

Celem mojej pracy była analiza spektralna oraz charakterystyka struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks i dupleksów z nieuporządkowanymi końcami za pomocą wybranych metod biofizycznych oraz zbadanie wpływu różnych nienukleotydowych modyfikacji chemicznych oraz G4-ligandów na tworzenie się i właściwości tych struktur. Dodatkowym celem moich badań było przetestowanie opracowanej przeze mnie strategii wyciszenia ekspresji genów w środowisku komórek ludzkich w układzie modelowym opartym na ekspresji białka zielonej fluorescencji (EGFP, ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Realizacja drugiego celu wymagała nawiązania współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN.

Osiągnięcie tych celów wymagało realizacji przedstawionych poniżej zadań:

- 1. Zaprojektowanie i otrzymanie modelowych, dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych w serii RNA i DNA oraz sekwencji docelowych różniących się jedną resztą nukleotydową w regionie bogatym w reszty guanozyny (rys. 3).**

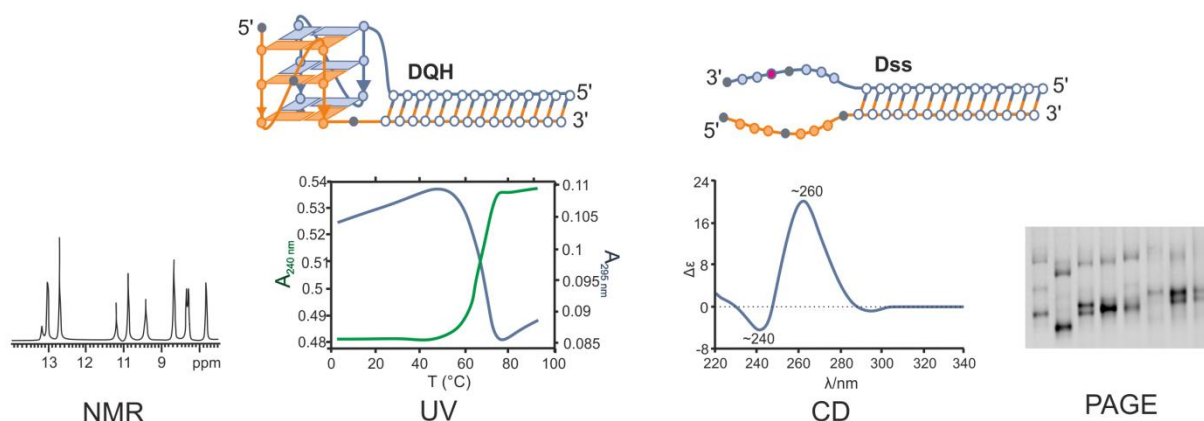
Zaprojektowane przeze mnie modelowe oligonukleotydy antysensowe CCC (DQ) i DNA-CCC (dDQ) o długości 23-reszt składały się z dwóch segmentów, segmentu dupleksu (D) i segmentu kwadrupleksu (Q) zawierającego dwa bloki guanozynowe (-GGG-N₂-GGG, N₂ = C) (tabela 1). Dodatkowe reszty cytydyny znajdowały się na końcu 5' (N₁) oraz na połączeniu segmentów D i Q (N₃). Schematycznie oligonukleotydy te pokazane są na rysunku 3.

- 2. Zaprojektowanie i otrzymanie dwufunkcyjnych oligorybonukleotydów zawierających modyfikacje chemiczne**

Do modelowego, dwufunkcyjnego oligorybonukleotydu zamierzałam wprowadzić w wybranych miejscach modyfikacje chemiczne (reszty 2'-OMe, reszty cukrowe pozbawione zasad heterocyklicznych - abasic, linkery alifatyczne) oraz grupę fosforanową (rys. 59). Celem wprowadzenia reszt typu 2'-OMe do segmentu dupleksu było zwiększenie stabilności tej domeny, z kolei głównym zadaniem łączników (abasic, linkery alifatyczne) we fragmencie zawierającym bloki guanozynowe było promowanie tworzenia struktury kwadrupleksu. Grupa fosforanowa miała zapobiegać dimeryzacji podjednostek kwadrupleksowych.

3. Charakterystyka hybrydowych struktur typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami za pomocą wybranych metod biofizycznych

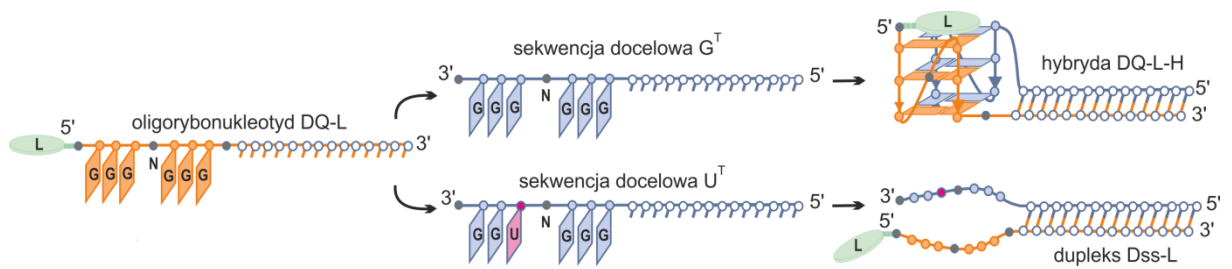
Do monitorowania tworzenia się struktur drugorzędowych **DQH** oraz **Dss** w różnych warunkach środowiska planowałam wykorzystać spektroskopię NMR, UV i CD oraz elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (PAGE) w warunkach natywnych (rys. 4). W oparciu o te metody zamierzałam wyznaczyć stabilności niemodyfikowanych oraz zawierających modyfikacje chemiczne struktur **DQH** i **Dss**.



Rys. 4. Badania biofizyczne hybrydowych struktur typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami.

4. Określenie wpływu G4-liganda na tworzenie się struktur typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami

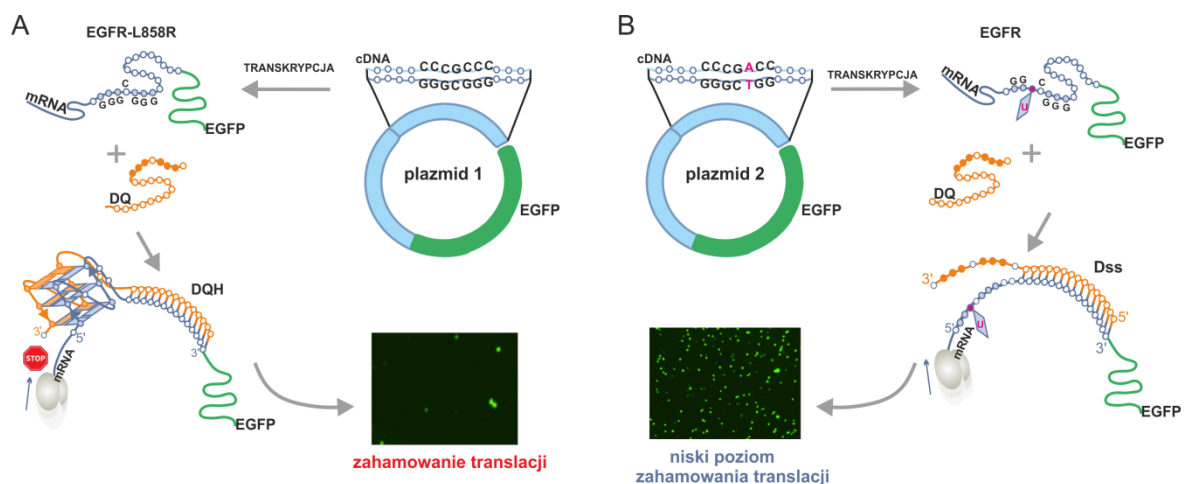
Poszukując sposobu na zwiększenie różnicy pomiędzy stabilnością struktur **DQH** i **Dss** planowałam zbadać, jaki wpływ na ich tworzenie ma obecność G4-ligandów. Mając na uwadze niską selektywność G4-ligandów postanowiłam sprawdzić, czy kowalencyjne przyłączenie G4-liganda do oligonukleotydu **DQ** będzie stabilizować i promować tworzenie struktury **DQH** oraz czy zapewni selektywną stabilizację domeny kwadrupleksowej w strukturze hybrydy (rys. 5).



Rys. 5. Schemat wiązania oligorybonukleotydu z przyłączonym kowalencyjnie ligandem **DQ-L** do sekwencji docelowych **G^T** oraz **U^T** z utworzeniem różnych struktur: hybrydy **DQ-L-H** oraz duplexu **Dss-L**.

5. Zweryfikowanie *in vitro* strategii wyciszenia ekspresji genu zależnej od powstania struktur kwadrupleksowych na matrycy mRNA w komórkach HeLa

We współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN zaplanowałam wykonanie eksperymentów na ludzkich liniach komórkowych wykorzystując plazmid kodujący gen białka docelowego (EGFR lub zmutowany punktowo EGFR-L858R) w fuzji z genem białka zielonej fluorescencji (EGFP). Oczekiwałam zróżnicowanego poziomu wyciszenia translacji zależnego od powstawania struktur **DQH** lub **Dss** na matrycy mRNA. Zamierzałam w ten sposób zbadać efektywność wyciszenia różniących się tylko jedną resztą nukleotydową sekwencji mRNA za pomocą oligorybonukleotydów **DQ**. Poglądowy schemat zaplanowanego eksperymentu przedstawiony jest na rysunku 6.



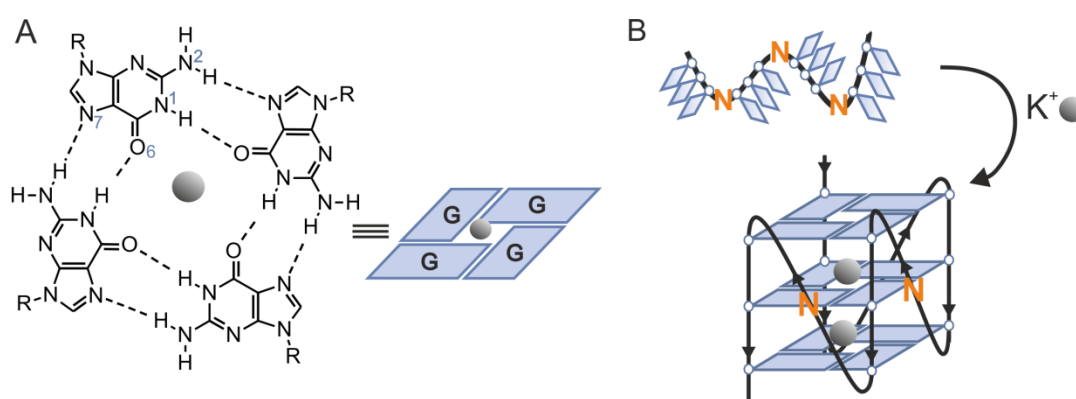
Rys. 6. Schemat badania efektu wyciszenia ekspresji genów w komórkach ludzkich z wykorzystaniem konstruków plazmidowych kodujących badany fragment genu oraz białko reporterowe EGFP.

V. CZĘŚĆ LITERATUROWA

V. 1. Kwadrupleksy DNA i RNA

Historia kwadrupleksów ma swój początek w 1910 roku, kiedy to Bang i in.(19, 20) zauważyli żelowanie kwasu guanylowego w wysokich stężeniach. W 1962 roku Gellert i in. badając włókna osuszonego żelu otrzymanego z kwasu guanylowego pokazali, że tworzą one helikalne struktury zbudowane z oddziaływających warstwowo tetrad guanozynowych.(21) Przez wiele lat odkrycie to traktowano jedynie jako ciekawostkę strukturalną. Dopiero gdy wykazano, że kwadrupleksy znajdują się na końcach telomerów(22, 23), prace badawcze nad powiązaniem ich struktury z funkcją, miejscem występowania i zrozumieniem mechanizmów regulacyjnych w komórkach żywych stały się jednym z najbardziej dynamicznie rozwijających się kierunków naukowych w ostatnich dwudziestu latach.(24–27)

Jak już wspomniałam, kwadrupleksy to struktury kwasów nukleinowych utworzone z sekwencji bogatych w reszty guanozyny, które w środowisku zawierającym kationy jednowartościowe, głównie K^+ i Na^+ , formują oddziaływające warstwowo G-tetrazy (rys. 7).(28) W G-tetradzie zawiązuje się osiem wiązań wodorowych, a każda z reszt guanozyny jest zarówno donorem, jak i akceptorem dwóch wiązań wodorowych, odpowiednio wzdłuż krawędzi Watsona-Cricka i krawędzi Hoogsteena. Wiązania wodorowe występują pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej O6 a atomem azotu N1 oraz pomiędzy atomami azotu N2 i N7. Reszty nukleotydowe (N) niezaangażowane w tworzenie G-tetrad stanowią łączące je pętle.



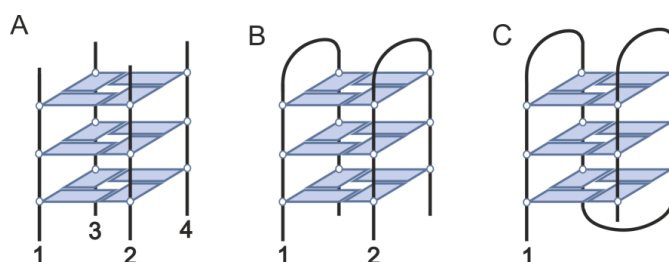
Rys. 7. G-tetrada stabilizowana przez osiem wiązań wodorowych oraz centralnie umieszczony jednowartościowy kation metalu (A). Model jednoniciowego kwadrupleksu zbudowanego z nici o sekwencji GGG N GGG N GGG N GGG (B). N – dowolne reszty nukleotydowe tworzące pętle.

Kwadrupleksy tworzą różne struktury przestrzenne a na ich budowę mają wpływ głównie takie czynniki jak:

- liczba nici zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksów,
- kierunkowość nici,
- rodzaj pętli łączących bloki guanozynowe,
- aranżacja i budowa G-tetrad.

- **Liczba nici zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksów**

W zależności od liczby nici zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksów wyróżniamy struktury **jednoniciowe**, **dwuniciowe** lub **czteroniciowe** (rys. 8). Sekwencję jednoniciowego (wewnątrzcząsteczkowego) kwadrupleksu najogólniej można przedstawić jako $G_{X_1}N_{L_1}G_{X_2}N_{L_2}G_{X_3}N_{L_3}G_{X_4}$, gdzie: G - reszty guanozyny, X - liczba kolejnych reszt guanozyny, N - dowolne reszty nukleotydowe tworzące pętle, L - liczba reszt w pętli. Bloki guanozynowe (G_X) mogą mieć różną długość, najczęściej są to 3 lub 4 reszty. Dwuniciowe i czteroniciowe kwadrupleksy powstają po połączeniu odpowiednio dwóch lub czterech nici, zazwyczaj o takiej samej lub podobnej sekwencji.



Rys. 8. Klasyfikacja kwadrupleksów oparta o liczbę nici. Kwadrupleks czteroniciowy (A), dwuniciowy (B), jednoniciowy (C).(29)

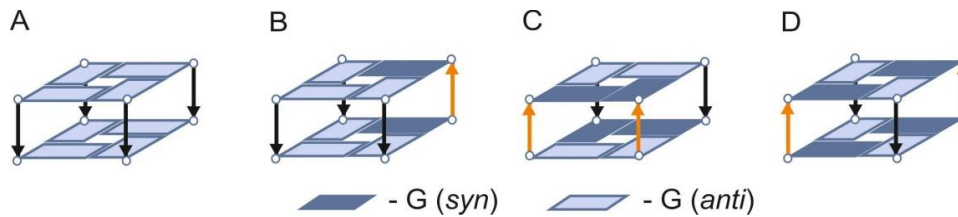
- **Kierunkowości nici**

Biorąc pod uwagę kierunek łańcucha oligonukleotydowego, 5'-3', wyróżniamy trzy typy struktur kwadrupleksów: **równoległy**, **antyrównoległy** i **typu (3+1)**.(30)

W kwadrupleksach nici mogą być ułożone względem siebie na cztery sposoby:

- 1) wszystkie cztery nici zwrócone są w jednym kierunku ($\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$), kwadrupleks **równoległy** (rys. 9 A)
- 2) trzy nici zwrócone są w jednym kierunku, czwarta nić w kierunku przeciwnym do pozostałych ($\uparrow\uparrow\uparrow\downarrow$), kwadrupleks **typu (3+1)** nazywany inaczej **hybrydowym** (rys. 9 B)

- 3) dwie przyległe nici zwrócone są w tym samym kierunku, a dwie pozostałe w przeciwnym kierunku, kwadrupleks **antyrównoległy** ($\uparrow\uparrow\downarrow\downarrow$) (rys. 9 C)
- 4) dwie naprzeciwległe nici są zwrócone w tym samym kierunku, a dwie pozostałe w przeciwnym kierunku, kwadrupleks **antyrównoległy** ($\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow$) (rys. 9 D)



Rys. 9. Typy kwadrupleksów: kwadrupleks równoległy ($\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$) (A), kwadrupleks typu (3+1) ($\uparrow\uparrow\uparrow\downarrow$) (B), kwadrupleks antyrównoległy ($\uparrow\uparrow\downarrow\downarrow$) (C), kwadrupleks antyrównoległy ($\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow$) (D), strzałki wskazują orientację nici od końca 5'→3'.

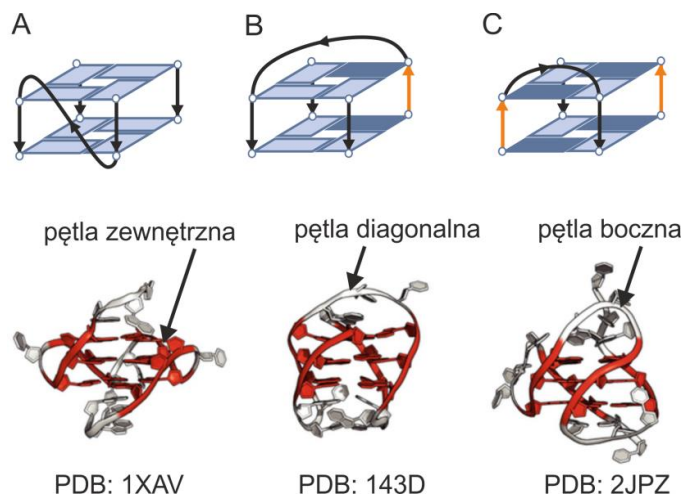
• Pętle łączące G-tetrazy

Reszty nukleotydowe, które nie są zaangażowane w powstawanie G-tetrad zazwyczaj stanowią łączące je pętle.(31) Trzy najczęściej występujące rodzaje pętli to:

- **pętla zewnętrzna** (w literaturze anglojęzycznej spotkać można różne nazwy: *external*, *propeller* lub *double-chain-reversal loop*) - łączy dwie równoległe, sąsiednie nici. Pętla zewnętrzna jest zazwyczaj bardzo krótka, zbudowana z jednej, maksymalnie trzech reszt nukleotydowych; rzadko kiedy jest dłuższa.(32) Ten typ pętli jest typowy dla kwadrupleksów RNA (rys. 10 A),

- **pętla przekątna** lub **diagonalna** (ang. *diagonal*) - łączy dwie antyrównoległe, przeciwległe nici. Z reguły złożona jest z conajmniej trzech reszt nukleotydowych (rys. 10 B),

- **pętla boczna** (ang. *lateral*, *edgewise loop*) - łączy dwie antyrównoległe, przyległe nici. Najczęściej składa się z przynajmniej dwóch reszt nukleotydowych (rys. 10 C).



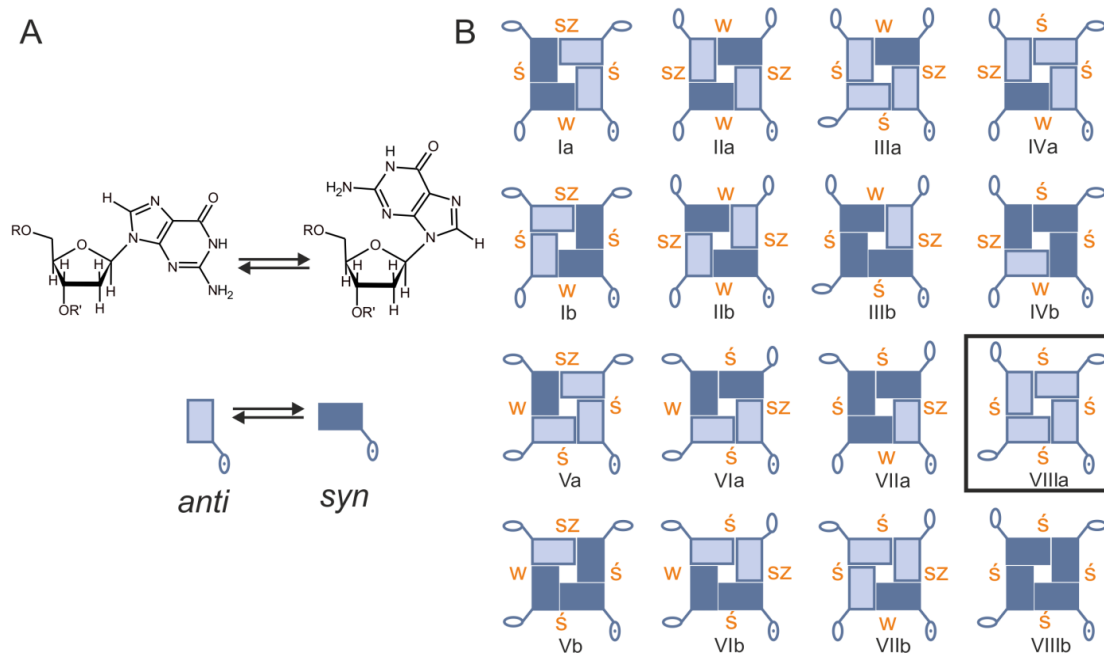
Rys. 10. Typy pętli w kwadrupleksach: pętla zewnętrzna (A), pętla przekątna (B), pętla boczna (C), oraz ich ułożenie w strukturach kwadrupleksów DNA (PDB: Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>).

- **Aranżacja i budowa G-tetrad**

Różnice strukturalne pomiędzy kwadrupleksami DNA i RNA wynikają głównie z odmiennej preferencji dla orientacji *syn/anti* wokół wiązania glikozydowego deoksyguanozyny i ryboguanozyny. W konformacji *anti* atom C8 guanozyny położony jest nad pierścieniem cukrowym, natomiast w konformacji *syn* nad pierścieniem cukrowym znajduje się atom azotu N3 (rys. 11 A).⁽³³⁾ W kwadrupleksach DNA reszty guanozyny mogą przyjmować zarówno orientację *syn* i *anti*. Z uwagi na zawadę steryczną pomiędzy atomem H3', a zasadą heterocykliczną będącą następstwem konformacji 3'-*endo* rybozy, orientacja *anti* wokół wiązania glikozydowego jest preferowana w przypadku ryboguanozyny.

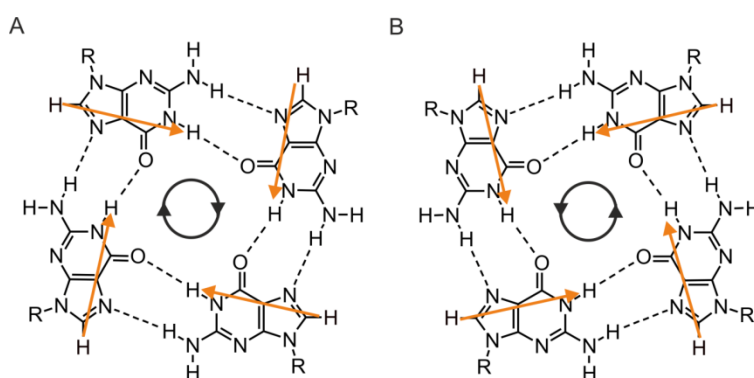
Kierunkowość nici, konformacje reszt guanozyny oraz aranżacja reszt w G-tetradach są wzajemnie powiązane. I tak, jeśli cztery nici są równoległe, to reszty guanozyny tworzące tetradę muszą mieć tę samą konformację (*anti* lub *syn*). Z kolei antyrównoległe ułożenie nici wymusza obecność mieszanych konformacji *anti/syn* w obrębie G-tetrad.

Biorąc pod uwagę możliwe kombinacje konformacji *syn/anti*, w przypadku kwadrupleksów DNA możliwych jest 16 różnych aranżacji G-tetrad (rys. 11 B). Z kolei dla kanonicznych kwadrupleksów RNA możliwa jest tylko jedna aranżacja G-tetrad, taka, w której wszystkie reszty guanozyny przyjmują konformację *anti* (rys. 11 B, VIIIa).



Rys. 11. Konformacja reszt guanozyny: *anti* oraz *syn* (A). Wszystkie możliwe aranżacje G-tetrad uwzględniające różne kombinacje *syn* i *anti* oraz szerokości bruzd (B). Symbole *sz*, *ś*, *w* oznaczają odpowiednio szeroką, średnią i wąską bruzdę.

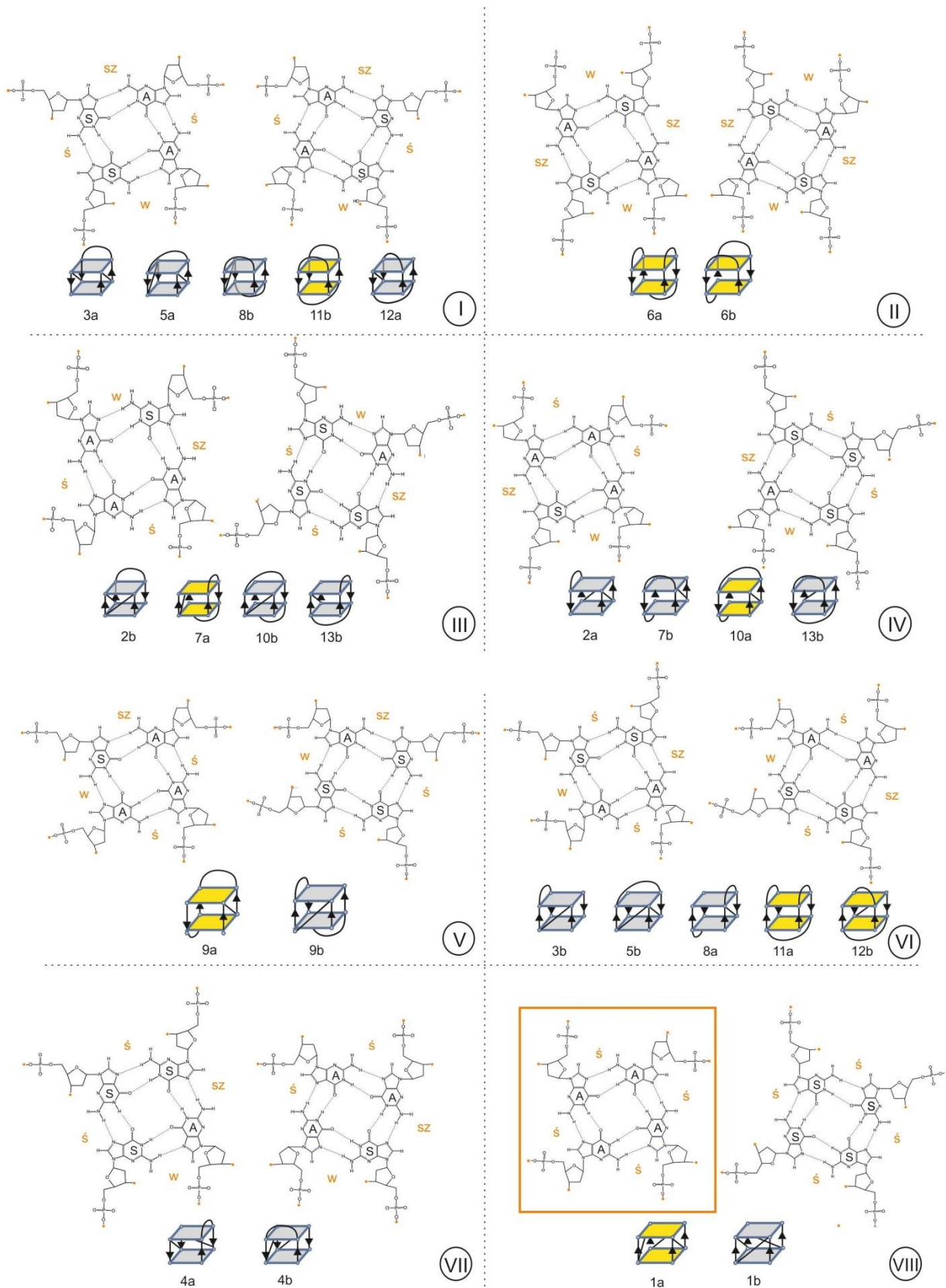
Z konformacją *syn/anti* reszt guanozyny powiązana jest także kierunkowość wiązań wodorowych w G-tetradach, która definiowana jest za pomocą wektorów skierowanych od atomu H8 do NH1. Kierunkowość G-tetrad może być zgodna z ruchem wskazówek zegara lub przeciwna (rys. 12). Oddziaływania warstwowe pomiędzy G-tetradami o przeciwnych kierunkowościach są różne.(34)



Rys. 12. Kierunkowość wiązań wodorowych w tetradzie guanozynowej zgodna z ruchem wskazówek zegara (A), przeciwna do ruchu wskazówek zegara (B).

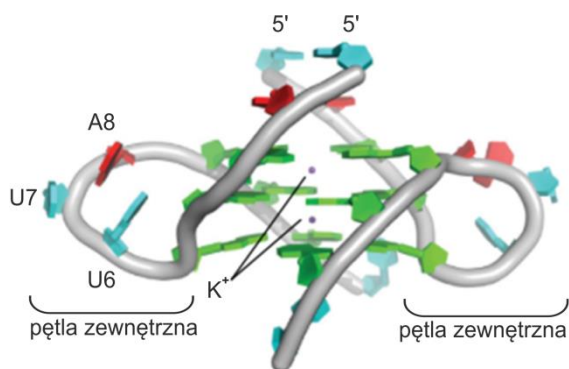
Konsekwencją możliwych orientacji *syn/anti* wokół wiązania glikozydowego w poszczególnych G-tetradach jest różna szerokość powstających bruzd. Bruzdy dzielimy na: wąskie ~12Å (ang. *narrow*), średnie ~16Å (ang. *medium*) oraz szerokie ~19Å (ang. *wide*)

(rys. 11 B, 13). Zgodnie z formalizmem geometrycznym opracowanym w zespole Webby da Silva(35), oddziałujące warstwowo G-tetrazy muszą mieć taką samą szerokość bruzd, co oznacza, że w strukturze jednoniciowego kwadrupleksu nie wszystkie przedstawione na rysunku 11 G-tetrazy mogą ze sobą sąsiadować. Zgodnie z tą regułą, dla jednoniciowych kwadrupleksów DNA, warunek ten jest spełniony jedynie w 8 przypadkach (rys. 13). Z różną szerokością bruzd ściśle powiązane są również typy pętli, które występują w strukturze kwadrupleksu. Na przykład, pętle boczne korelują z wąską lub szeroką bruzdą oraz łączą reszty guanozyny o przeciwnej konformacji *syn/anti*.(31) Natomiast dla kwadrupleksów RNA typowe są pętle zewnętrzne i średnie szerokości bruzd (rys. 13, panel VIII).



Rys. 13. Schemat wszystkich możliwych kombinacji G-tetrad uwzględniających różne orientacje wokół wiązania glikozydowego (I – VIII). S i A oznaczają odpowiednio konformację *syn* i *anti*. Na żółto oznaczone są struktury, których istnienie potwierdzono eksperymentalnie, a na niebiesko te, których dotychczas nie udało się potwierdzić.(35)

Biorąc pod uwagę 8 możliwych typów oddziaływań warstwowych pomiędzy G-tetradami oraz wszystkie dopuszczalne kombinacje pętli, nie tworząca kwadrupleks może zwinąć się aż na 26 różnych sposobów.(35) Spośród tych 26 przewidzianych teoretycznie topologii, dotychczas udało się potwierdzić eksperymentalnie istnienie jedynie 9 (rys. 13). Za przykład takiej przewidzianej teoretycznie, a dotychczas nie znalezionej eksperymentalnie struktury może posłużyć jednoniciowy, równoległy kwadrupleks RNA, w którym wszystkie reszty guanozyny przyjmowałyby konformację *anti*, a cały układ połączony byłby pętlami zewnętrznymi (rys. 13, pomarańczowa ramka, panel VIII). Chociaż struktura takiego kwadrupleksu nie jest znana, w bazie PDB zdeponowane są współrzędne innych równoległych kwadrupleksów RNA, jednak są one zbudowane z dwóch lub czterech nici. Na rysunku 14 przedstawiłam strukturę typową dla równoległego dwuniciowego kwadrupleksu RNA.



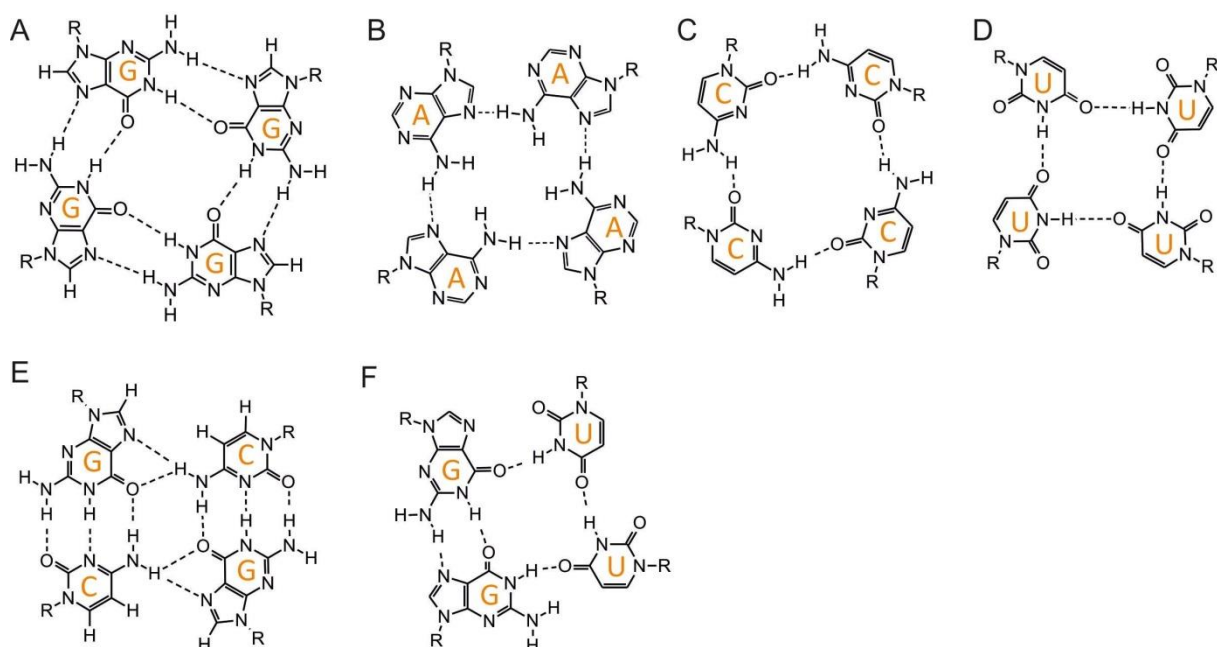
Rys. 14. Struktura dwuniciowego kwadrupleksu RNA TERRA o sekwencji r(UAGGGUUAGGGU)₂ zbudowanego z trzech G-tetrad. Wszystkie reszty guanozyny występują w konformacji *anti* a G-tetrazy połączone są za pomocą pętli zewnętrznych.(36)

V. 2. Niekanoniczne motywy strukturalne kwadrupleksów RNA

Powyżej przedstawiłam podstawowe reguły dotyczące topologii kwadrupleksów. Należy jednak wspomnieć, że wraz z nieustannie rosnącą liczbą poznawanych struktur kwadrupleksów okazuje się, że reguły te odnoszą się jedynie do jednoniciowych kanonicznych struktur kwadrupleksów, czyli takich, w których G-tetrazy połączone są za pomocą pętli bocznej, diagonalnej lub zewnętrznej. Chociaż obecność G-tetrad jest niezbędna dla utworzenia trzonu kwadrupleksu, często towarzyszą im tetrazy zbudowane z innych reszt niż guanozyny(37–39), zarówno homotetrazy jak i mieszane tetrazy.(40) Reszty znajdujące się w pętli mogą dodatkowo oddziaływać z G-tetradami tworząc pentady, heksady czy oktady.(41) W kwadrupleksach DNA liczba różnych

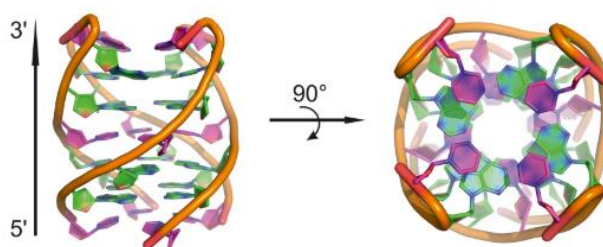
zaobserwowanych motywów strukturalnych jest większa niż dla RNA. Być może wynika to między innymi z tego, że mniej jest znanych struktur kwadrupleksów RNA, gdyż długo uznawane były za mniej ciekawe, jako znacznie bardziej zachowawcze i przewidywalne niż z natury polimorficzne struktury kwadrupleksów DNA. Dlatego też wśród struktur zdeponowanych w bazie PDB przeważają kwadrupleksy DNA - na ogólną liczbę 366 struktur kwadrupleksów, jedynie 37 stanowią kwadrupleksy RNA. Analiza dostępnych struktur kwadrupleksów RNA pokazała, że pomimo narzuconego przez konformację guanozyny ograniczenia możliwych topologii do struktur równoległych, również wśród nich znaleźć można wiele interesujących motywów strukturalnych.(42) Poniżej omówione zostały niektóre z tych motywów, ukazując jednocześnie różnorodność struktur kwadrupleksów RNA.

Jak już wspomniałam, oprócz G-tetrad możliwe jest zawiązywanie się innych, nietypowych tetrad takich jak np. przedstawione na rysunku 15 homotetrady urydynowe (U:U:U:U)(43–45), cytydynowe (C:C:C:C)(46) czy adenozynowe (A:A:A:A)(47, 48). Wśród kwadrupleksów RNA zidentyfikowano także obecność tetrad zbudowanych z mieszanych reszt nukleotydowych, np. (G:C:G:C)(49, 50), (G:G:U:U)(51) czy (G:C:U:U)(52).



Rys. 15. Schematyczne przedstawienie homotetrad G:G:G:G (A), A:A:A:A (B), C:C:C:C (C), U:U:U:U (D) oraz tetrad mieszanych G:C:G:C (E), G:G:U:U (F) w kwadrupleksach RNA.

W Zakładzie Biomolekularnego NMR szczególną uwagę poświęca się badaniom dotyczącym kwadrupleksów RNA. Jednym z obiektów będących w kręgu zainteresowań Zakładu były cząsteczki RNA zbudowane z powtórzeń trinukleotydomowych.(49, 50) Dla cząsteczek zbudowanych z powtórzeń CGG, AGG oraz UGG, wykazano, że w roztworze zawierającym kationy potasu powstają nietypowe struktury kwadrupleksów, ponieważ zawierają jedynie dwie, zamiast trzech lub czterech sąsiadujących G-tetrad. Ponadto w strukturach tych kwadrupleksów zidentyfikowano nietypowe motywy strukturalne, charakterystyczne dla danego typu powtórzeń. Dla powtórzeń AGG zaobserwowano tworzenie się heksady typu A:G:G:G:G:A (rys. 18 B), w przypadku powtórzeń CGG charakterystyczne są mieszane tetrazy typu G:C:G:C (rys. 15 E, 19 B), a dla cząsteczki o sekwencji UGGUGGU tworzącej czteroniciowy kwadrupleks potwierdzono obecność trzech U-tetrad, na końcach 3' i 5' oraz środkowej, pomiędzy dwiema G-tetradami (rys. 16).(53) Dane literaturowe wskazywały, że obecność U-tetrazy na 3'-końcu kwadrupleksów wywołuje niezwykle silną stabilizację tych układów.(44) Badania prowadzone w naszym Zakładzie wykazały, że za ten efekt odpowiedzialna jest niezwykle konformacja 3'-końcowego fragmentu cząsteczki z nagłym zwrotem łańcucha RNA tuż przed U-tetradą, tzw. „odwrócona U-tetradą”.(53, 54)

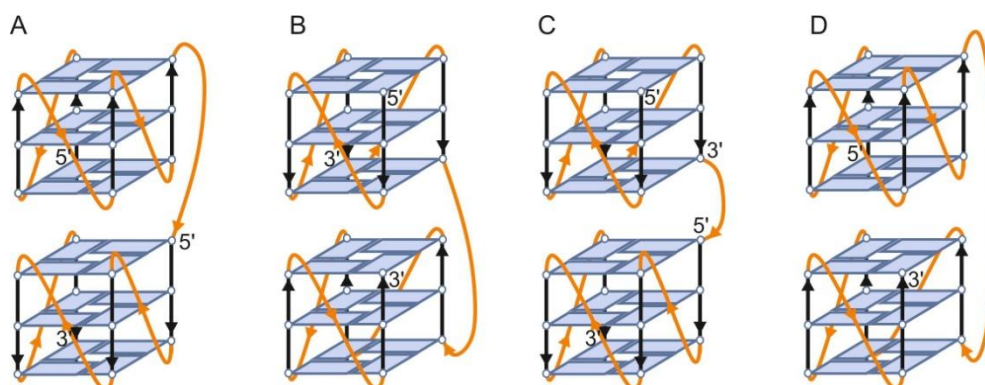


Rys. 16. Struktura kwadrupleksu o sekwencji (UGGUGGU)₄ (PDB: 6GE1). G-tetrazy i U-tetrazy mają odpowiednio kolor zielony i różowy. Na końcu 3' widoczny jest nagły zwrot łańcucha.(53)

Dimeryzacja

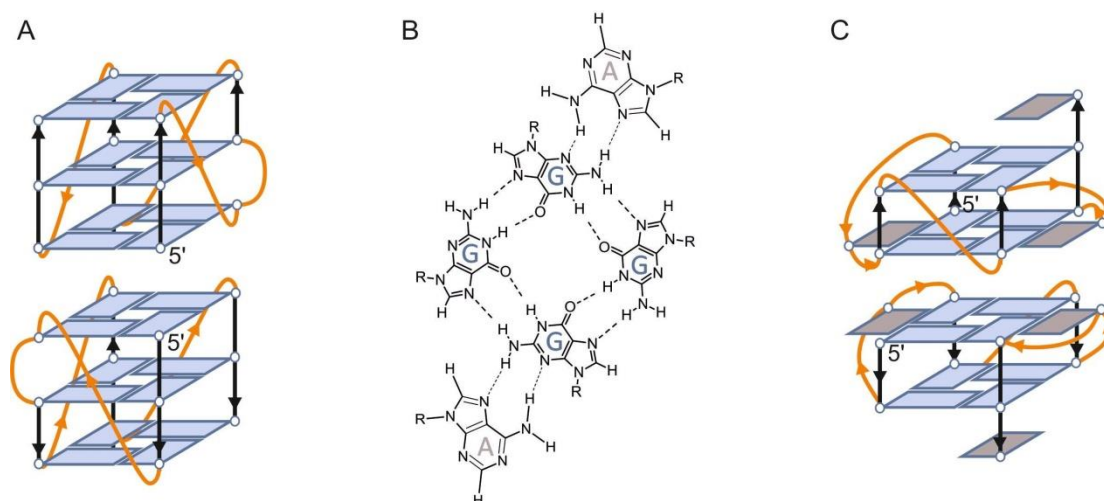
Kwadrupleksy mogą oddziaływać warstwowo tworząc struktury wyższego rzędu, takie jak dimery, tetramery czy multimery.(55) Proces dimeryzacji zależy od kilku czynników, w tym od topologii kwadrupleksów, sekwencji pętli oraz obecności reszt flankujących jak również stężenia oligonukleotydu, rodzaju oraz stężenia kationów(56) czy obecności G4-liganda(56, 57). W teorii, dwa kwadrupleksy mogą oddziaływać ze sobą poprzez terminalne G-tetrazy, 5' lub 3' na różne sposoby: 3'-3', 3'-5', 5'-3' lub 5'-5'.

Symulacje metodą dynamiki molekularnej przeprowadzone dla sekwencji telomerowej RNA składającej się z ośmiu bloków guanozynowych rozdzielonych łącznikiem UUA, wykluczyły jednak układ 5'-3' jako niestabilny (rys. 17).(58)



Rys. 17. Schemat możliwych sposobów dimeryzacji między dwiema kolejnymi jednostkami kwadrupleksowymi połączonymi pętlą UUA.

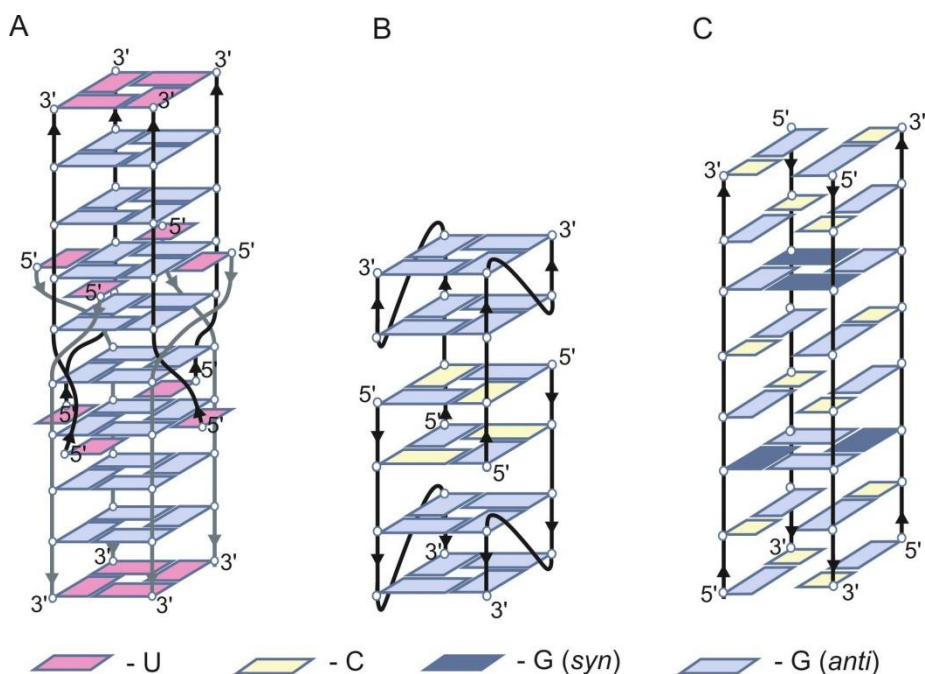
Wśród dimerów kwadrupleksów RNA obserwuje się głównie oddziaływania warstwowe typu 5'-5', w których uczestniczą końcowe G-tetrazy (rys. 18 A).(59) Analiza oddziaływań typu 5'-5' w dostępnej literaturze pokazuje, że jednym z częściej występujących motywów, przez które następuje dimeryzacja jest heksada A:G:G:G:G:A (rys. 18 B). Taki typ heksady został potwierdzony dla kilku struktur kwadrupleksów (PDB: 2RQJ(60), 1MY9(61), 2M18(58)).



Rys. 18. Modele dimerycznych kwadrupleksów utworzonych z oligorybonukleotydów o sekwencji: GGGUUGCGGAGGGUGGGC (A), GGAGGAGGAGGA (PDB 2RQJ) (C). Schemat heksady A:G:G:G:G:A (B).

Ciekawym przykładem różnorodności strukturalnej kwadrupleksów RNA jest cząsteczka o sekwencji UGGGGU. Już w 1992 roku, stosując metody spektroskopii NMR pokazano, że w roztworze zawierającym kationy potasu tworzy ona czteroniciowy, równoległy kwadrupleks, z tetradami U:U:U:U na końcach 5' i 3' (PDB 1RAU).(45) Dla cząsteczki o tej samej sekwencji UGGGGU, znane są również cztery struktury krystaliczne (PDB ID: 1J8G, 4RKV, 4RJ1, 4RNE). Wszystkie są bardzo do siebie podobne, jednak znacznie różnią się od struktury wyznaczonej metodami NMR. Gdy w mieszaninie krystalizacyjnej znajdowały się jony Sr^{2+} , w kryształach otrzymano dimery zazębiających się końcami 5' czteroniciowych kwadrupleksów.(62) Cztery reszty urydyny z końca 5' jednej jednostki kwadrupleksowej biorą udział w tworzeniu oktady lokując się w pobliżu środkowej G-tetrazy. W ten sposób, w miejscu asocjacji powstają dwie oktady (G:U:G:U:G:U:G:U) przedzielone dwiema G-tetradami (G:G:G:G) pochodzącymi od dwóch jednostek kwadrupleksowych (rys. 19 A).

Innym przykładem zazębiających się kwadrupleksów RNA jest badana w Zakładzie Biomolekularnego NMR cząsteczka o sekwencji GCGGCGGC, która w roztworze tworzy dwucząsteczkowy kwadrupleks z niesparowanymi końcami 5'-GC. Dimer tej cząsteczki powstaje w wyniku uwspólnienia tych końców i utworzeniu mieszanych tetrad (G:C:G:C) (rys. 19 B).(49)



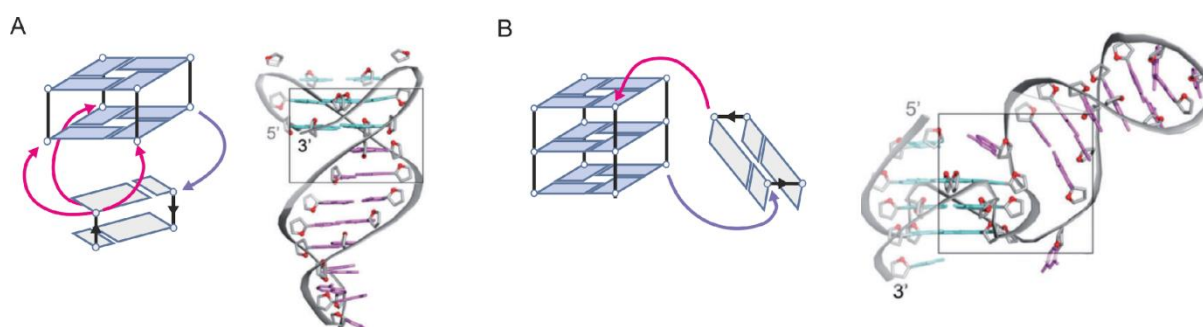
Rys. 19. Schematyczne przedstawienie dimerów kwadrupleksów utworzonych z cząsteczek o sekwencji: UGGGGU (A), GCGGCGGC (B), $GC^{Br}GGCGGC$ (C).

Zastąpienie w cząsteczce GCGGCGGC jednej z reszt guanozyny 8-bromoguanozyną (^{Br}G) doprowadziło do niezwykle interesujących rezultatów. Reszta ^{Br}G, z uwagi na obecność dużego podstawnika w pozycji C8, przyjmuje nietypową dla reszty guanozyny konformację *syn*. W konsekwencji cząsteczka GC^{Br}GGCGGC tworzy samokomplementarny dupleks, (GC^{Br}GGCGGC)₂, z dwiema niekanonicznymi parami zasad ^{Br}G:G. Dupleks ten łatwo dimeryzuje tworząc kwadrupleks zbudowany z tetrad G:(^{Br}G):G:(^{Br}G) przedzielonych dwiema mieszanymi tetradami G:C:G:C, o nietypowej dla RNA antyrównoległej topologii (rys. 19 C).

Aby zapobiec procesowi dimeryzacji, często na 5' końcu oligonukleotydu przyłącza się dodatkowe reszty nukleotydowe(63) lub grupę fosforanową(64). Modyfikacje te ograniczają oddziaływania warstwowe pomiędzy podjednostkami. Ograniczenie procesu dimeryzacji czasami jest możliwe również poprzez znaczne obniżenie stężenia oligonukleotydów lub kationów K⁺.(65)

V. 3. Struktury hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks

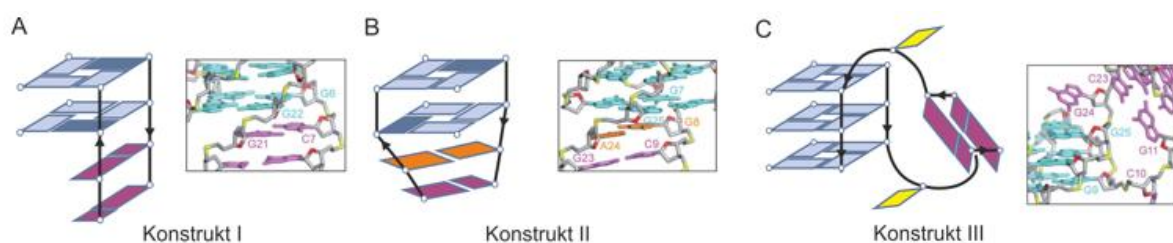
Struktura kwadrupleksu może współistnieć z innymi motywami strukturalnymi takimi jak np. spinka, dupleks czy i-motyw.(66–68) Strukturę powstałą z zestawienia kwadrupleksu z dwuniciowym motywem można sklasyfikować jako hybrydę typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**, ang. *duplex-quadruplex hybrid*) lub spinka-kwadrupleks (rys. 20). Badania dotyczące połączenia domeny dupleksu z kwadrupleksem pokazały, że zestawienie tych dwóch elementów konstrukcyjnych jest stosunkowo proste.(66)



Rys. 20. Współosiowa (A) i prostopadła (B) orientacja domeny dupleksu i kwadrupleksu na połączeniu kwadrupleks-dupleks oraz odpowiadające im struktury (PDB: 2M8Z, 2M93). Kolorem fioletowym pokazany jest stały a różowym zmienny punkt mocowania dla segmentu dupleksu.

Ten dodatkowy motyw strukturalny np. dupleks/spinka może występować w miejscu pętli bocznej (rys. 20 A; 21 A, konstrukt I), diagonalnej (rys. 20 A; 21 B, konstrukt

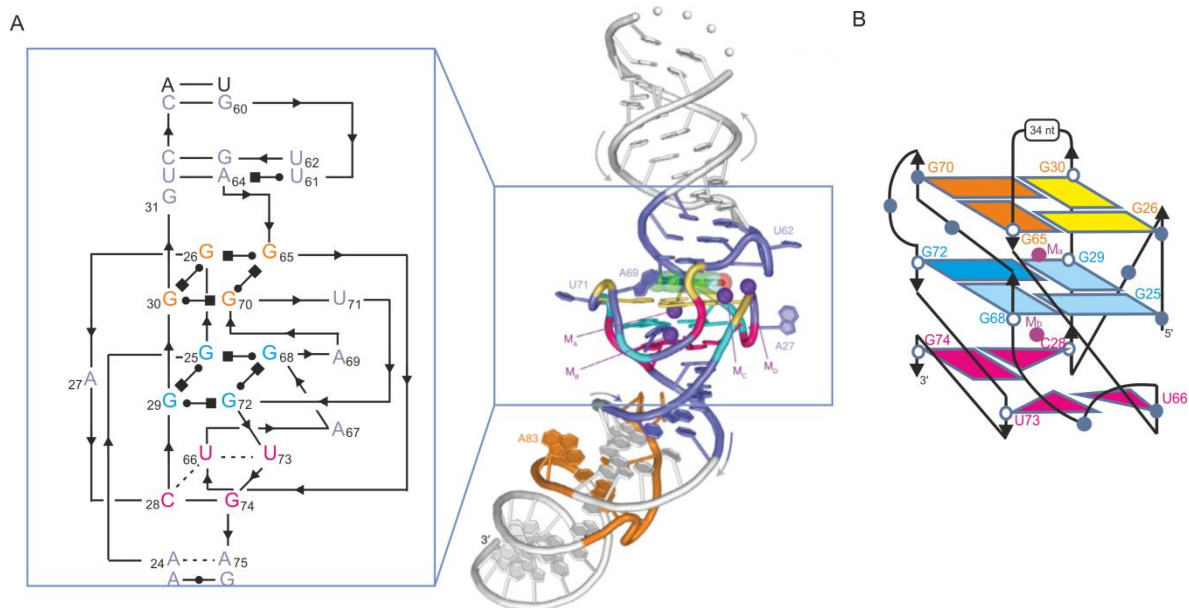
II) lub zewnętrznej (rys. 20 B; 21 C, konstrukt III).(66) W stosunku do rdzenia kwadrupleksu dupleks może być zorientowany równoległe lub prostopadłe. Współosiowe wprowadzenie dwuniciowej domeny do antyrównoległego kwadrupleksu prowadzi do powstania układów hybrydowych, gdzie pomiędzy dwiema domenami występują bezpośrednie oddziaływania warstwowe (konstrukt I, rys. 21 A) (PDB: 2M8Z) lub z udziałem niekanonicznych par zasad (ang. *mismatch base pair*) ułatwiają połączenie pomiędzy domenami (konstrukt II, rys. 21 B) (PDB: 2M91). Z kolei aby zachowana była równoległa topologia kwadrupleksu, dwuniciowa domena musi być zlokalizowana w obrębie pętli zewnętrznej (rys. 21 C). Dodatkowo, prostopadłe ułożenie względem siebie domen kwadrupleksu i dupleksu wymaga obecności co najmniej dwóch niesparowanych reszt łącznikowych w obrębie ich połączenia (ang. *junction*) (konstrukt III, rys. 21 C) (PDB: 2M93).



Rys. 21. Modele układów hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks wraz z konstrukcyjnymi detalami w miejscu połączenia obu domen. Domena kwadrupleksu zaznaczona została kolorem niebieskim, domena dupleksu kolorem fioletowym a niesparowane reszty kolorem żółtym. Domena dupleksu może być usytuowana w szerokiej bruździe kwadrupleksu łącząc się bezpośrednio z kwadrupleksem (PDB: 2M8Z) (A). Para zasad G:A (zaznaczona na pomarańczowo) umiejscowiona w pozycji pętli diagonalnej spełnia rolę pary łączącej między domenami ze względu na różne ich szerokości (PDB: 2M91) (B). Boczne (prostopadłe) usytuowanie obu domen za pośrednictwem niesparowanych reszt umożliwia połączenie obu domen (PDB: 2M93) (C).

Przykładem takich struktur hybrydowych są niektóre aptamery. Na przykład, wykorzystując metodę SELEX otrzymano aptamery RNA zawierające w swojej strukturze motyw kwadrupleksu i spinki.(52, 69, 70) Jeden z nich, o nazwie *Spinach*, selektywnie wiąże ligand aktywujący zieloną fluorescencję. Badania metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej wykazały, że hybryda ta posiada unikalny motyw kwadrupleksu zbudowany z trzech tetrad, w tym z dwóch G-tetrad oraz mieszanej tetrady G:C:U:U (rys. 22). Rdzeń kwadrupleksu powstaje w wyniku oddziaływania reszt guanozyny znacznie odległych od siebie w sekwencji, o około 40 reszt. Niektóre z reszt guanozyny, tworzących rdzeń G4,

przyjmują nietypową dla kwadrupleksów RNA orientację *syn*, przyczyniając się do powstania antyrównoległej topologii. Kwadrupleks ten charakteryzuje się również unikalną architekturą niekanonicznych pętli.



Rys. 22. Schemat oraz struktura kompleksu *Spinach*-DFHBI (ang. *(Z)*-4-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one) RNA, zawierającego nietypowy motyw kwadrupleksu (A). Model kwadrupleksu RNA, gdzie żółtym i błękitnym kolorem oznaczono odpowiednio konformację *anti* i *syn* reszt guanozyny (B). Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Warner et al., 2014).(52)

Omówione powyżej przykłady niekanonicznych struktur kwadrupleksów pokazują, że algorytmy, które są obecnie stosowane do wyszukiwania sekwencji potencjalnie tworzących kwadrupleksy oraz próby stworzenia reguł pozwalających na przewidywanie ich struktury są niewystarczające nawet dla kwadrupleksów RNA, które są z natury mniej polimorficzne niż kwadrupleksy DNA.(71)

V. 4. Stabilność kwadrupleksów

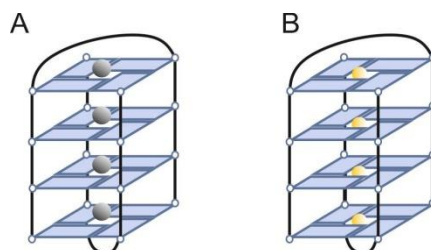
Kwadrupleksy RNA tworzą z reguły stabilniejsze struktury niż ich odpowiedniki w serii DNA.(72, 73) Za większą stabilność kwadrupleksów RNA odpowiedzialna jest między innymi grupa hydroksylowa w pozycji 2' rybozy, która stanowi rusztowanie dla uporządkowanej sieci wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody usytuowane w brzdach. W równoległych kwadrupleksach, czyli takich jak kwadrupleksy RNA, cząsteczki wody rozmieszczone są równomiernie w strukturze. Natomiast w kwadrupleksach antyrównoległych, w których niektóre reszty guanozyny występują w

konformacji *syn*, obserwuje się mniej uporządkowaną sieć hydratacji. Stabilizacja kwadrupeksów RNA pochodzi dodatkowo od oddziaływań grupy 2'-OH z atomami tlenu reszt fosforanowych i cukrowych czy grupami akceptorowymi zasad heterocyklicznych. Na stabilność kwadrupeksów mają wpływ także inne czynniki, jak na przykład typ oraz stężenie kationów(74), typ pętli, jej długość i sekwencja(32, 75), obecność modyfikacji chemicznych(76–78), skład i pH roztworu(79) czy obecność G4-ligandów(80).

V. 4. 1. Wpływ kationów

Zarówno kationy sodu jak i potasu są jonami fizjologicznie istotnymi, dlatego też większość badań skupia się na poznaniu ich wpływu na strukturę i stabilność kwadrupeksów. Duże znaczenie dla tworzenia kwadrupeksów mają także inne kationy jedno- i dwuwartościowe.(74) Typ kationów determinuje nie tylko stabilność, ale może indukować polimorfizm strukturalny kwadrupeksów. Za przykład może posłużyć kwadrupeks o sekwencji telomerowej, TAG₃(T₂AG₃)₃, którego topologia zależy od typu jonów. W obecności kationów sodu cząsteczka TAG₃(T₂AG₃)₃ tworzy antrónoległy kwadrupeks, natomiast w obecności kationów potasu przyjmuje formę równoległą. Należy jednak dodać, że pierwszą z tych struktur analizowano w roztworze a drugą w kryształach, co również mogło mieć wpływ na ich topologię.(81)

W strukturach kwadrupeksów kationy jednowartościowe takie jak np. Na⁺, NH₄⁺ lub K⁺ lokują się w centralnym kanale, gdzie neutralizują ujemny ładunek nagromadzony poprzez skierowane do wnętrza kanału karbonyłowe atomy tlenu O6. Kationy mogą oddziaływać także z innymi grupami atomów znajdujących się w pętlach i w bruzdach. Promień jonowy jest jednym z głównych czynników branych pod uwagę przy wyborze kationów. Ze względu na swój rozmiar, jony takie jak K⁺ i NH₄⁺ (promienie jonowe odpowiednio 1.33Å i 1.48Å) lokują się symetrycznie pomiędzy płaszczyznami G-tetrad. Atom potasu koordynuje osiem karbonyłowych atomów tlenu sąsiadujących tetrad, dzięki czemu silnie stabilizuje tetradę guanozynową. Mniejszy kation Na⁺ (promień jonowy 0.95Å) jest na tyle mały, że może koordynować zarówno w płaszczyźnie tetrady guanozynowej, lub podobnie jak kation potasu pomiędzy dwiema płaszczyznami (rys. 23). Ze względu na mniejszy promień jonowy kationu sodu, efekt stabilizacji tetrad jest znacznie słabszy.



Rys. 23. Struktura telomerowego DNA (GGGGTTTTGGGG) w obecności kationów K^+ (A) oraz Na^+ (B). Schematyczne reprezentacje dwucząsteczkowego kwadrupleksu przedstawiające lokalizację kationów w centralnym kanale kwadrupleksu. Jony K^+ (A) są zlokalizowane pomiędzy G-tetradami, podczas gdy jony Na^+ (B) mogą być również usytuowane w płaszczyźnie G-tetrad.

Badania dotyczące wpływu kationów jednowartościowych na tworzenie się kwadrupleksów pokazały, że preferencja do tworzenia kwadrupleksów maleje w szeregu $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Cs^+$.(78) Oprócz promienia jonowego, na stabilizację kwadrupleksów mogą mieć wpływ inne czynniki, takie jak na przykład energia hydratacji i/lub liczba koordynacyjna jonów. Na podstawie obliczeń *ab initio* ustalono, że koordynacja kationów metali przyczynia się bardziej do stabilizacji struktury kwadrupleksów niż wiązania wodorowe czy oddziaływania warstwowe G-tetrad.(82)

Oprócz kationów jednowartościowych, również obecność jonów dwuwartościowych może wpływać na tworzenie się kwadrupleksów. Na przykład w omawianej już uprzednio strukturze czteroniciowego kwadrupleksu RNA zbudowanego z nici UGGGGU, kationy Sr^{2+} promowały dimeryzację. Z kolei strukturę czteroniciowego kwadrupleksu DNA o sekwencji $d(BrU)r(GAGGU)$, zawierającego modyfikację 5BrU stabilizują zarówno kationy Ba^{2+} i Na^+ . Badania prowadzone dla kwadrupleksu DNA o sekwencji $d(G_4T_4G_4)$ pokazały, że w roztworze zawierającym kationy dwuwartościowe destabilizacja zachodzi w kolejności $Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$. Natomiast stabilne kwadrupleksy RNA, które otrzymano w obecności jonów potasu były destabilizowane wraz ze zwiększaniem stężenia kationów dwuwartościowych. Zaobserwowano następującą kolejność siły destabilizacji: $Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} >> Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$.(74)

V. 4. 2. Wpływ sekwencji i długość pętli

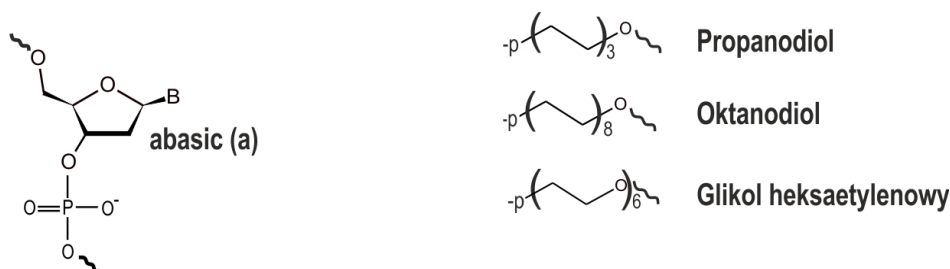
Długość pętli w kwadrupleksach jest jednym z ważniejszych czynników determinujących ich stabilność. Równoległe jednoniciowe lub dwuniciowe kwadrupleksy, zarówno RNA i DNA, posiadają jedynie pętle zewnętrzne. Badania zależności pomiędzy długością pętli a stabilnością termodynamiczną jednoniciowych, równoległych

kwadrupleksów RNA i DNA wskazują na spadek ich trwałości wraz z wydłużaniem długości pętli. Na przykład kwadrupleksy składające się z dwóch G-tetrad są stabilne ($T_m = 60\text{ }^\circ\text{C}$) tylko wtedy, gdy ich pętle są jednonukleotydowe ($G_2U_xG_2U_xG_2U_xG_2$; $X = 1$). Wydłużenie pętli do 3 lub 7 reszt obniża ich temperaturę topnienia odpowiednio do $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $19\text{ }^\circ\text{C}$.(83) Analogiczne badania nad zależnością pomiędzy stabilnością kwadrupleksów DNA a długością pętli nie dały tak jednoznacznych korelacji, ponieważ wraz z zwiększaniem długości poszczególnych pętli możliwa jest zmiana topologii kwadrupleksów.

Ważna jest nie tylko długość pętli, ale i ich sekwencja. Zamiana chociażby jednej reszty nukleotydowej w obszarze pętli może mieć ogromny wpływ na strukturę i stabilność kwadrupleksu. Na przykład dla kwadrupleksu RNA o sekwencji $G_2NG_2NG_2NG_2$ ($N = C, U, A$) najstabilniejsze struktury tworzą się, gdy pętle zbudowane są z reszty adenozyiny ($70\text{ }^\circ\text{C}$) lub urydyny ($60\text{ }^\circ\text{C}$). Najmniej trwała struktura powstaje, gdy w pętlach znajdują się reszty cytydyny ($43\text{ }^\circ\text{C}$). Przyczyną takiej różnicy w stabilności poszczególnych struktur mogą być na przykład oddziaływania warstwowe pomiędzy resztami znajdującymi się w pętlach a G-tetradami(84), bądź inne oddziaływania, na przykład zawiązywanie dodatkowych wiązań wodorowych.

Osobny przypadek reprezentują struktury hybrydowe typu spinka-kwadrupleks. Na przykład, badając zależność pomiędzy liczbą par zasad w pętli bocznej antyrównoległego kwadrupleksu a jego stabilnością zaobserwowano, że gdy trójnukleotydową pętlę GCA zastąpiono pętlą z trzema dodatkowymi parami zasad Watsona-Cricka o sekwencji CGC GCA GCG, temperatura topnienia wzrosła z $36.2\text{ }^\circ\text{C}$ do $41.6\text{ }^\circ\text{C}$ (konstrukt I, rys. 21). Z kolei w przypadku układu równoległego (konstrukt III, rys. 21), gdzie pary zasad w pętli zewnętrznej ułożone są prostopadle do trzonu kwadrupleksu, zwiększenie liczby par zasad w domenie dupleksu z trzech do sześciu, stabilizuje układ o jedynie 1 do $3\text{ }^\circ\text{C}$ w stosunku do układu z samą pętlą TGCAT. Stabilność struktur hybrydowych typu spinka-kwadrupleks zależy nie tylko od struktury fragmentu dwuniciowego w obrębie pętli, ale także od kompozycji par zasad w miejscu połączenia domen. W przypadku konstruktów typu I obecność pary C:G w miejscu połączenia domen zwiększa stabilność struktury ($T_m = 42.6\text{ }^\circ\text{C}$) w stosunku do struktur zawierających pary G:C i A:T ($T_m = 36\text{ }^\circ\text{C}$) czy pary T:A ($T_m = 32.6\text{ }^\circ\text{C}$). Natomiast dla konstruktów typu III (rys. 21) w stabilizacji struktury ważną rolę odgrywają niesparowane reszty nukleotydowe na połączeniu domen, które są wymagane dla utworzenia stabilnej struktury hybrydy. Ich optymalna liczba to dwie niesparowane reszty.

Stabilne kwadrupeksy mogą tworzyć się także wtedy, gdy reszty nukleotydowe w pętlach zastąpione zostaną nienukleotydowymi łącznikami, np. resztami pozbawionymi zasad heterocyklicznych (abasic) lub alifatycznymi linkerami (rys. 24). Dla przykładu, wprowadzenie w miejsca pętli np. reszt typu abasic może zwiększać swobodę konformacyjną tworzącego się kwadrupeksu bardziej niż w przypadku kwadrupeksów zawierających w pętli reszty tymidyny, cytydyny albo adenozyne.(85) Obecność alifatycznych łączników (rys. 24 B) w sekwencji pętli oligonukleotydu bogatego w reszty guanozyny może również promować tworzenie się równoległych kwadrupeksów.(86, 87)



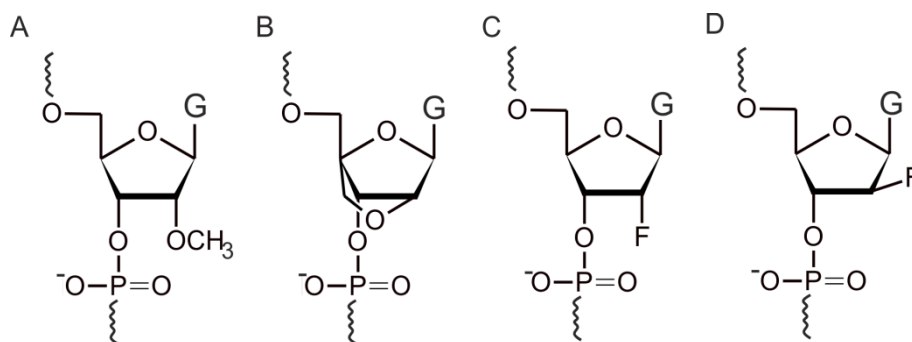
Rys. 24. Nienukleotydowy łącznik typu abasic (A) oraz przykład łączników alifatycznych (B).(86)

V. 4. 3. Modyfikacje chemiczne rdzenia kwadrupeksu

Wykorzystując modyfikacje chemiczne zasady heterocyklicznej, części cukrowej lub szkieletu fosforocukrowego możliwe jest poznanie wpływu każdego z tych elementów na powstawanie i stabilność kwadrupeksów.

Można wyróżnić trzy grupy modyfikacji reszt guanozyny.(88) Pierwsza z nich zaburza lub uniemożliwia powstawanie wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu O6 grupy karbonylowej a atomem wodoru N1 dwóch sąsiednich reszt. Do tej grupy należy na przykład 6-tioguanozyna czy O6-metyloguanozyna.(76) Druga grupa modyfikacji obejmuje takie analogi jak inozyna czy 7-deazaguanozyna, które uniemożliwiają zawiązywanie wiązań wodorowych pomiędzy atomami N7 oraz grupą NH_2 . Trzecią grupę stanowią takie analogi jak 8-oksoguanozyna, 8-aminoguanozyna, 8-bromoguanozyna czy 8-metyloguanozyna.(87) Reszty z dużymi podstawnikami w pozycji C8 wykazują preferencję do orientacji *syn*, dlatego wprowadzenie ich w miejsca reszt o takiej samej konformacji stabilizuje strukturę kwadrupeksów, może też ograniczyć polimorfizm strukturalny poprzez stabilizację głównego konformeru. Wśród modyfikacji części cukrowej wymienić można takie analogi jak LNA (ang. *locked nucleic acid*), 2'-OMe-G (2'-O-metyloguanozyna), 2'-F-G (2'-deoksy-2'-fluoro-guanozyna) lub 2'-FANA-G (2'-

deoksy-2'-fluoro-arabinoguanina). Dla kwadrupleksów modyfikowanych resztą LNA zaobserwowano znaczną stabilizację tych struktur, co spowodowane jest wymuszoną konformacją 3'-endo cukru.(89) Jednak efekt ten jest zależny od miejsca i liczby takich reszt (rys. 25). Z kolei obecność grupy 2'-OMe wpływa destabilizująco na wszystkie typy kwadrupleksów, poza krótkimi czteroniciowymi.(87)



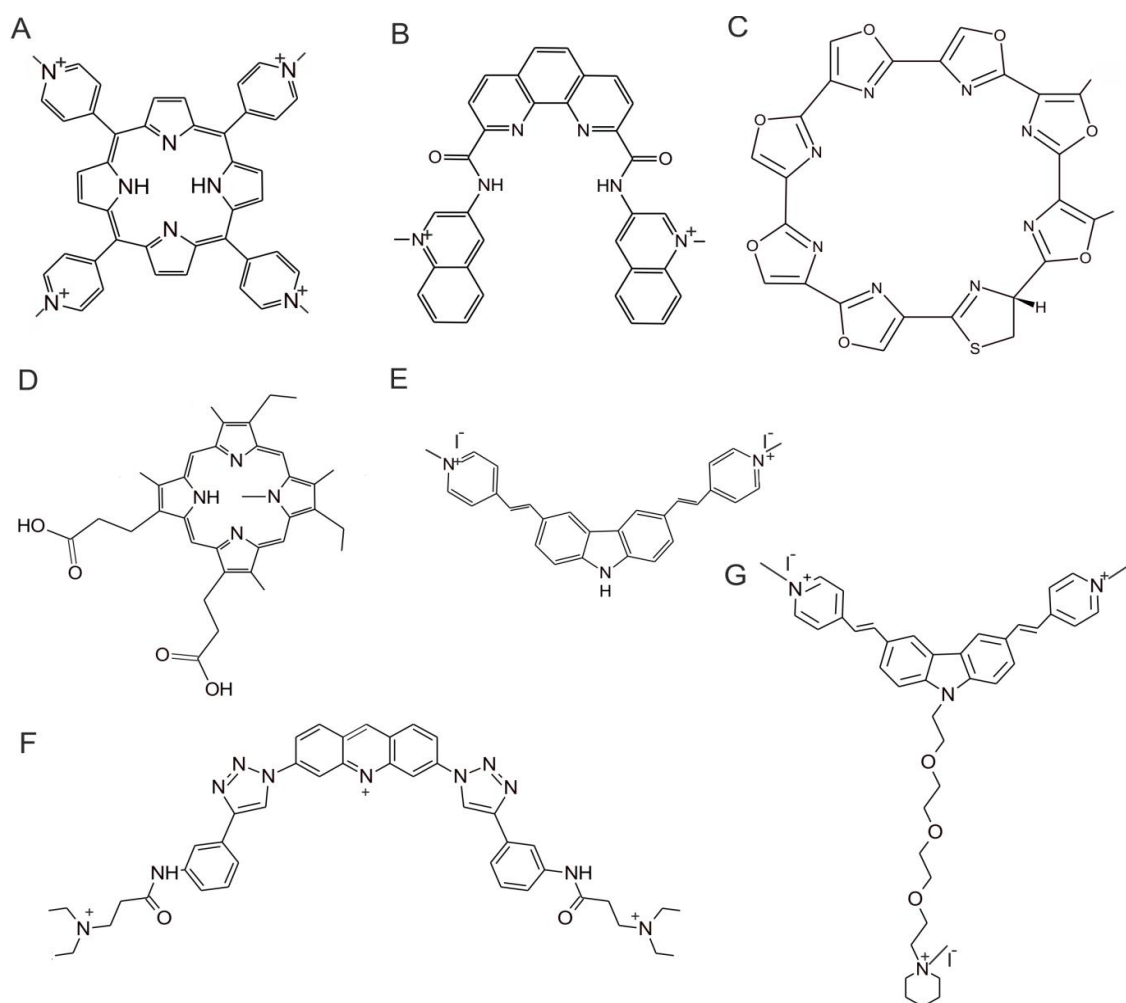
Rys. 25. Wzory strukturalne modyfikacji 2'-OMe-G (A), LNA (B), 2'-F-G (C) oraz 2'-FANA-G (D).

Najczęstszą modyfikacją szkieletu fosforocukrowego jest zastąpienie ujemnie naładowanego atomu tlenu w grupie fosforanowej innym atomem lub grupą (np. siarka, grupa metylowa). Modyfikacje te skutkują destabilizacją kwadrupleksu. Atomy tlenu w szkielecie fosforanowym są zaangażowane w tworzenie mostków pomiędzy wodą, częścią cukrową i zasadową resztą guanozyny.(90) Utworzone wiązania wodorowe powodują uporządkowany rozkład cząsteczek wody wzdłuż rowków kwadrupleksów, które są istotne dla ich stabilizacji.

V. 4. 4. Rola G4-ligandów

W ciągu ostatnich kilku lat zaprojektowano szereg związków małowcząstkowych selektywnie wiążących kwadrupleksy (G4-ligandy).(91) W bazie danych G4LDB(92) (ang. *G-quadruplex ligands database*, <http://www.g4ldb.org>) znajduje się obecnie ponad 800 takich związków. Ich zdecydowana większość posiada sztywne, aromatyczne, heterocykliczne szkielety, często sprzężone z grupami zawierającymi reszty aminowe, czwartorzędowe grupy amonowe lub pirydynowe.(93) W wyniku takich modyfikacji G4-ligand zyskuje charakter kationowy, co zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie i oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi. Przykładem takich, posiadających ładunek dodatni, G4-ligandów są TMPyP4 czy Phen-DC3 (rys. 26 A-B). Znane są również G4-ligandy, które zamiast budowy kationowej posiadają neutralny szkielet, jak przykładowo makrocycliczna telomestatina (rys. 26 C).

Z kolei NMM (N-metylomezoporfiryna IX) (rys. 26 D) posiada dwa łańcuchy boczne kwasu propionowego, które w fizjologicznym pH prawdopodobnie uzyskują ładunek ujemny.(13) G4-ligandy mogą oddziaływać z kwadrupleksami na dwa sposoby. Według pierwszego mechanizmu, który dominuje, aromatyczny fragment cząsteczki G4-liganda oddziałuje warstwowo z terminalną G-tetradą (oddziaływania typu $\pi - \pi$). Drugi mechanizm polega na elektrostatycznym oddziaływaniu liganda z polarnymi miejscami zlokalizowanymi np. w pętlach czy brzdach kwadrupleksów.

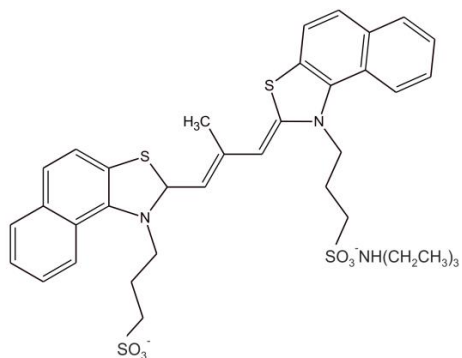


Rys. 26. Wzory strukturalne G4-ligandów: TMPyP4 (A), Phen-DC3 (B) telomestatina (C), oraz N-metylomezoporfiryna IX (D), BMVC (E), pochodna akrydyny (F), BMVC-8C3O (G).

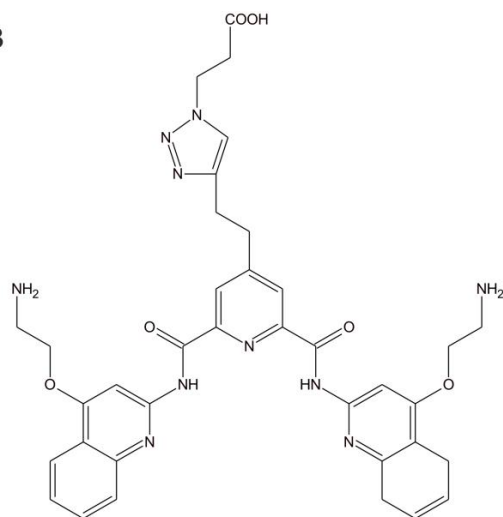
Zdecydowana większość znanych G4-ligandów wiąże się z kwadrupleksami DNA i RNA niezależnie od ich topologii. Niestety znalezienie G4-ligandów selektywnych względem poszczególnych topologii kwadrupleksów nadal pozostaje dużym wyzwaniem. Znane są jedynie nieliczne związki, takie jak NMM (rys. 26 D)(94), CyT (rys. 27 A) lub Naphtho-TASQ (rys. 27 C)(95), które selektywnie wiążą się do równoległych

kwadrupeksów DNA lub RNA. Intensywne poszukiwania G4-ligandów o większej selektywności doprowadziły do znalezienia trzech związków, karboksy-PDS (rys. 27 B), QUMA-1 (rys. 27 D) i RGB-1 (rys. 27 E) charakteryzujących się selektywnością tylko względem równoległych kwadrupeksów RNA.(96–98)

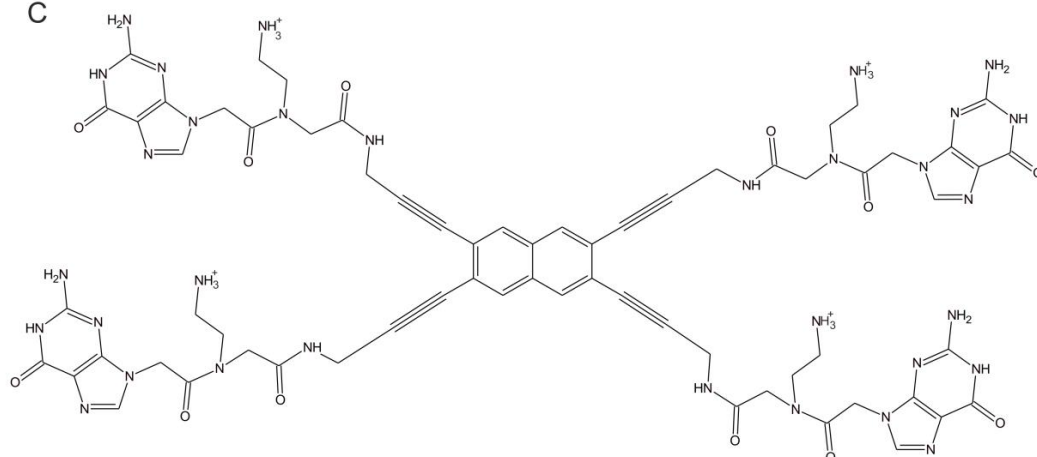
A



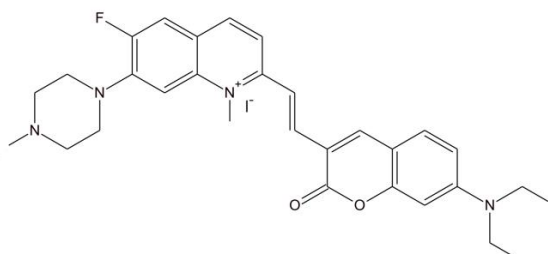
B



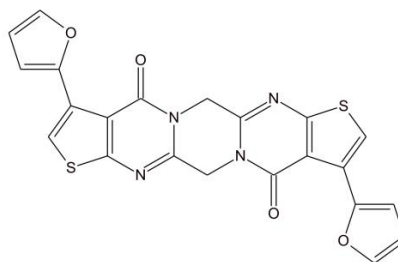
C



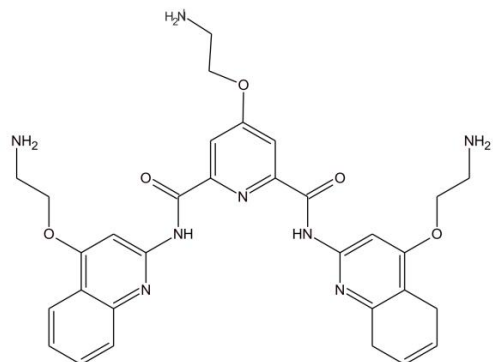
D



E



F



Rys. 27. Wzory strukturalne G4-ligandów: CyT (A), karboxy-PDS (B), Naphtho-TASQ (C) QUMA-1 (D), RGB-1(E) oraz PDS (F).

Wiązanie się G4-liganda do kwadrupleksu najczęściej zwiększa jego stabilność, jednak efekt ten zależy silnie od użytego związku oraz budowy kwadrupleksu.(99) Przykładowo, po utworzeniu kompleksów NMM z równoległymi kwadrupleksami takimi jak cMyc, Bcl, Bcl-2, cKit czy Tel22AG odnotowano wzrost stabilności termicznej rzędu 6 °C. Natomiast gdy zamiast NMM użyto pirydostatyny (PDS) (rys. 27 F) zaobserwowano znaczny wzrost stabilności przykładowo kompleksu Bcl/PDS (o 15 °C) w stosunku do kompleksu Bcl/NMM.(100)

Innym powszechnie stosowanym G4-ligandem, jest BMVC (ang. [3,6-bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide]) (rys. 26 E). Stabilizuje on zarówno kwadrupleksy równoległe jak i antyrównoległe. Na przykład dla antyrównoległego telomerowego kwadrupleksu o sekwencji d(TTAG₃)₄ zaobserwowano wzrost temperatury topnienia o 13 °C w obecności BMVC.(101) Jak pokazują najnowsze dane, ligand ten wiąże równoległy kwadrupleks MYC z większym powinowactwem i swoistością niż kwadrupleksy telomerowe.(102) Obecność G4-ligandów może indukować także zmianę topologii kwadrupleksu. Pokazano, że obecność pochodnej BMVC, BMVC-8C3O (rys. 26 G), wywołuje zmianę topologii telomerowego kwadrupleksu o sekwencji TAG₃(TTAG₃)₃ z hybrydowej do równoległej.(103) Indukcja konwersji topologii równoległej lub hybrydowej do antyrównoległej jest dość rzadka, chociaż możliwa również przy użyciu na przykład takich ligandów jak PhenDC3 (rys. 26 B) czy PDS (rys. 27 F).(13)

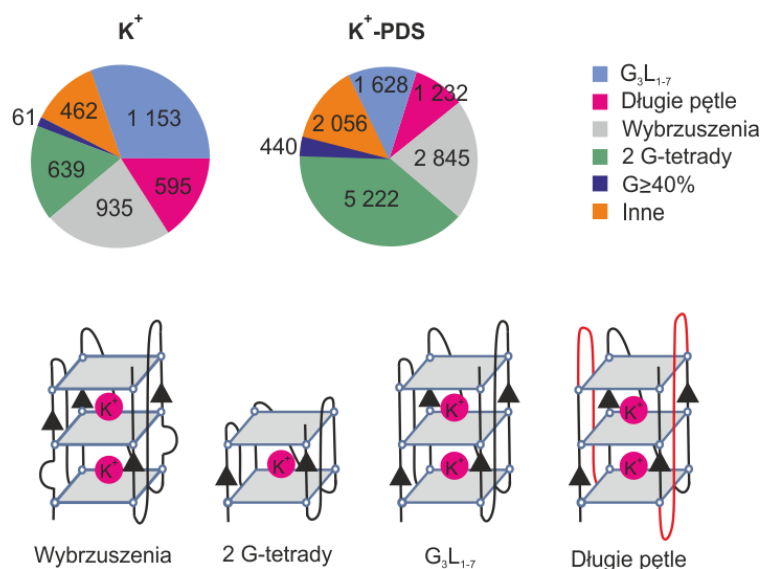
Dany G4-ligand może przyczyniać się zarówno do stabilizacji jak i destabilizacji struktur kwadrupleksów. Wspomniany już TMPyP4 stabilizuje kwadrupleksy powstające na końcach telomerów, blokując aktywność telomerazy *in vitro*(80), natomiast destabilizuje kwadrupleksy powstające z tandemowych powtórzeń d(CGG)_n.(104)

V. 5. Występowanie i biologiczna funkcja kwadrupleksów oraz struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks

Poszukiwania sekwencji DNA potencjalnie tworzących stabilne struktury kwadrupleksów początkowo opierały się na algorytmie G_xN_{L1}G_xN_{L2}G_xN_{L3}G_x (gdzie X – 3 do 6 reszt guanozyny; L1, L2, L3 – długość pętli, L_i≤7). Jednocześnie przyjęto, że reguły te można wykorzystać również dla przewidywania sekwencji kwadrupleksów w serii RNA.(72, 105, 106) Stosując taki algorytm, w ludzkim genomie znaleziono ponad 360 000 sekwencji potencjalnie tworzących kwadrupleksy DNA (PQS, ang. *Putative Quadruplex Sequences*). Wraz z poznawaniem nowych struktur kwadrupleksów DNA i RNA zdano sobie sprawę, że ten prosty algorytm nie uwzględniał wielu sekwencji PQS. Obecnie

stosowane programy typu QGRS Mapper(107) czy QuadParser(71) wykorzystują podobny algorytm, w którym dopuszcza się większą liczbę reszt w bloku guanozynowym oraz dłuższe pętle, nawet do 37 nukleotydów. Taka zmiana algorytmu pozwala na znalezienie także bardziej skomplikowanych, wielodomenowych struktur kwadrupleksów, które mogą być stabilizowane oddziaływaniami dalekiego zasięgu. Gdy przeszukiwania genomu przeprowadzono dla sekwencji, w których długość pętli wynosi od 8 do 20 reszt nukleotydowych, znaleziono aż 80 307 różnych sekwencji spełniających ten warunek w genomie oraz 2429 w dojrzałym mRNA. Kwadrupleksy utworzone z takich nici mogą tworzyć w obrębie pętli motywy dwuniciowe (SL, ang. *stem-loop*), dlatego też sekwencje takie nazwano SLQS (ang. *stem-loop-containing quadruplex sequences*), a struktury układami hybrydowymi typu dupleks-kwadrupleks (rys. 21, rozdział V. 3).

Jeszcze inne podejście, tym razem eksperymentalne, zaprezentowano w pracy Kwoka i in.(108) Stosując sekwencjonowanie nowej generacji NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*), w obecności kationów K^+ lub K^+ /PDS wykryto aż 716 310 sekwencji PQS w ludzkim genomie, z których aż 451 646 nie udało się przewidzieć wcześniej, stosując jedynie metody obliczeniowe.(26) Z kolei w transkryptomie występuje ponad 10 000 sekwencji potencjalnie tworzących kwadrupleksy RNA.(109)

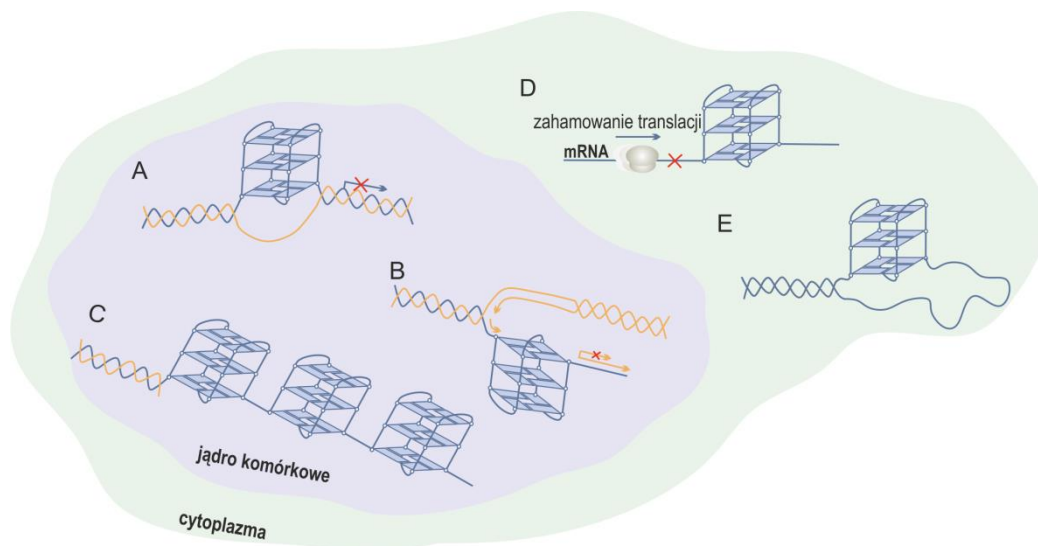


Rys. 28. Struktury kwadrupleksów RNA występujące w transkryptomie z podziałem na kategorię. Legenda: kanoniczne kwadrupleksy z pętlą o długości od 1 do 7 nukleotydów (G_3L_{1-7}); kwadrupleksy o długich pętlach >7 nukleotydów; kwadrupleksy z wybrzuszeniami; kwadrupleksy zawierające dwie G-tetrazy; $G \geq 40\%$, sekwencje z co najmniej 40% zawartością G. Diagramy kołowe obrazują liczbę struktur kwadrupleksów z podziałem na kategorie, tworzących się w obecności jonów K^+ oraz jonów K^+ i liganda PDS podczas procesu odwrotnej transkrypcji.(108)

Wśród nowo wytypowanych sekwencji PQS zarówno DNA jak i RNA znajdują się głównie te, które tworzą niekanoniczne struktury kwadrupleksowe: dwupłaszczyznowe, zawierające wybrzuszenia (ang. *bulge*) lub nietypowo długie pętle zawierające więcej niż 7 nukleotydów (rys. 28).(108, 109)

Poszukując dowodów na istnienie kwadrupleksów w komórkach, w celu ich wizualizacji stosowano małowiązujące G4-ligandy (PDS)(96), sondy fluorescencyjne (BMVC)(110) czy przeciwciała (BG4)(96). Chociaż w ciągu ostatnich lat zgromadzono wiele dowodów wskazujących na istnienie kwadrupleksów DNA i RNA *in vivo*(26), występowanie kwadrupleksów RNA w komórkach jest nadal przedmiotem dyskusji, a ich ostateczna liczba może być zupełnie inna. W 2016 roku opublikowano badania *in vivo* wykorzystujące próbkowanie za pomocą DMS, które wskazywały, że sekwencje RNA potencjalnie tworzące kwadrupleksy są globalnie rozplecione w transkryptomie ssaków.(111) (112) Z kolei inne badania, w których do wizualizacji kwadrupleksów RNA w komórkach żywych, w czasie rzeczywistym zastosowano selektywną sondę fluorescencyjną (QUMA-1) pokazały, że cząsteczki RNA istnieją w dynamicznej równowadze pomiędzy kwadrupleksem a formą rozplecioną.(113)

Podczas replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy uszkodzeń, zazwyczaj dwuniciowe cząsteczki DNA mogą przyjmować struktury inne niż regularne helisy lub ulegać rozpleceniu. Może to sprzyjać tworzeniu kwadrupleksów szczególnie w regionach promotorowych genów (rys. 29 A), podczas replikacji (rys. 29 B), lub na końcach chromosomów (telomerach) (rys. 29 C). Poza jądrem komórkowym, kwadrupleksy mogą tworzyć się w mRNA, najczęściej w regionie 5'-UTR w pobliżu miejsca startu translacji (rys. 29 D) lub w obrębie niekodujących RNA odpowiedzialnych za modulację poziomu transkrypcji danego genu (rys. 29 E). Tak szerokie rozpowszechnienie kwadrupleksów w komórce wskazuje, że muszą one pełnić różne funkcje biologiczne.



Rys. 29. Możliwe miejsca występowania kwadrupleksów *in vivo*:

- A. w obszarze dwuniciowego DNA, w regionie promotorowym genu
- B. w obębie dwuniciowego DNA, podczas replikacji
- C. w rejonie jednoniciowego DNA, w regionie telomerowym zawierającym powtórzenia sekwencji d(TTAGGG)
- D. w rejonie 5'-UTR mRNA, poza jądrem komórkowym
- E. w obrębie niekodujących cząsteczek RNA

Biologiczna rola kwadrupleksów DNA i RNA została opisana szczegółowo w wielu pracach przeglądowych(25, 114–116), a poniżej wskazuję jedynie na różnorodność pełnionych przez nie funkcji. Obecnie uważa się, że kwadrupleksy RNA biorą udział w regulacji translacji, składaniu transkryptów (ang. *splicing*), terminacji transkrypcji, obniżaniu ekspresji genów przez miRNA (ang. *microRNA*), poliadenylacji jak również podczas zlokalizowanej syntezy białek (ang. *mRNA localization*).(117) Zgodnie z najnowszą wiedzą, także sekwencje SLQS w rejonie 5'-UTR RNA zdolne do tworzenia układów hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks, mogą odgrywać rolę w regulacji translacji.(116)

Poza mRNA kwadrupleksy RNA mogą tworzyć się z niekodujących RNA, takich jak na przykład długie niekodujące RNA (lncRNA), transportujące RNA (tRNA), niekodujące cząsteczki RNA (ncRNA) i mikro RNA (miRNA).(118) Z uwagi na znaczenie biologiczne struktur kwadrupleksowych RNA, przetestowano wiele G4-ligandów pod kątem inhibicji procesów patologicznych. Na przykład po transfekcji komórek raka piersi ligandem RGB-1 wysoce specyficznym względem kwadrupleksów RNA, zaobserwowano supresję translacji mRNA protoonkogenu NRAS.(98) G4-ligandy po związaniu z kwadrupleksami mogą stabilizować ich strukturę oraz opóźnić rozplatającą aktywność G4-helikaz(119), zwiększając w ten sposób ich potencjał terapeutyczny. Ponadto stosowanie ligandów

stabilizujących kwadrupleksy to jedno z podejść do monitorowania ich obecności w żywych komórkach oraz badania ich funkcji biologicznych.(11)

Znaczenie posiadają również kwadrupleksy DNA oraz heterokwadrupleksy RNA:DNA. Dotyczy to głównie ich wpływu na wydajność transkrypcji(120), inhibicję telomerazy(121), regulację replikacji/stabilności genomu i hipometylację CpG.(122)

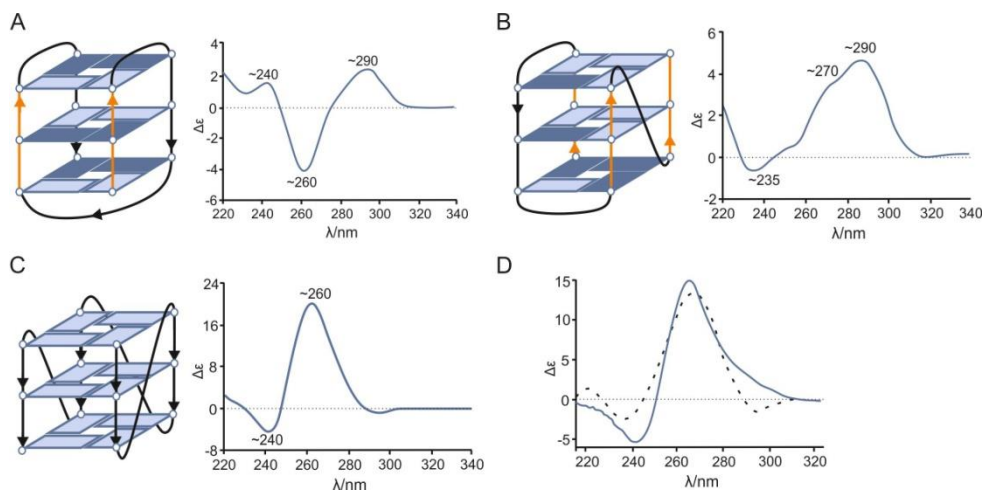
Chociaż wykazano, że kwadrupleksy wpływają na przepływ informacji genetycznej, obecnie nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów leżących u podstaw tych procesów w komórce, bowiem regulacja aktywności biologicznej przez kwadrupleksy zależy od ich lokalizacji, struktury, dynamiki fałdowania czy rozplatania, z czym ściśle związane są białka wiążące kwadrupleksy np. RBPs (ang. *RNA-binding proteins*)(118) czy helikazy np. DHX36.(123) Zrozumienie tych mechanizmów stanowi aktualne wyzwanie w dziedzinie kwadrupleksów oraz podstawę dla rozwoju nowych metod terapeutycznych.

V. 6. Wybrane metody badań kwadrupleksów

V. 6. 1. Metody biofizyczne stosowane w badaniach kwadrupleksów

Dichroizm kołowy

Obecność kwadrupleksów w roztworze można potwierdzić wykorzystując spektroskopię dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*). Dzięki unikalnym wzorom widm CD odpowiadającym różnym topologiom kwadrupleksów, stosunkowo łatwo można uzyskać wstępne informacje o ich strukturze (rys. 30).(124) W widmach CD antyrównoległe kwadrupleksy charakteryzują się dodatnim pasmem przy 290 nm i ujemnym pasmem przy 260 nm (rys. 30 A).(125) Topologię hybrydową kwadrupleksów w widmach CD cechują dwa silne, dodatnie pasma przy 290 nm i 270 nm, oraz ujemne pasmo przy 235 nm (rys. 30 B). Dla kwadrupleksów równoległych charakterystyczna jest obecność dodatniego pasma przy ~ 260 nm oraz ujemnego przy 240 nm (rys. 30 C). Jak już wcześniej wspomniałam, kanoniczne kwadrupleksy RNA są równoległe, a ich widma CD są bardzo podobne do widm dupleksów oraz spinek RNA (rys. 30 D). Dlatego też interpretacja widm CD w przypadku cząsteczek RNA, które znajdują się w równowadze typu spinka-kwadrupleks czy w przypadku struktur zbudowanych z różnych motywów strukturalnych np. dupleksu i kwadrupleksu(126) zazwyczaj nie jest jednoznaczna i dla potwierdzenia obecności kwadrupleksu konieczne jest uzyskanie dowodów za pomocą innych technik eksperymentalnych.



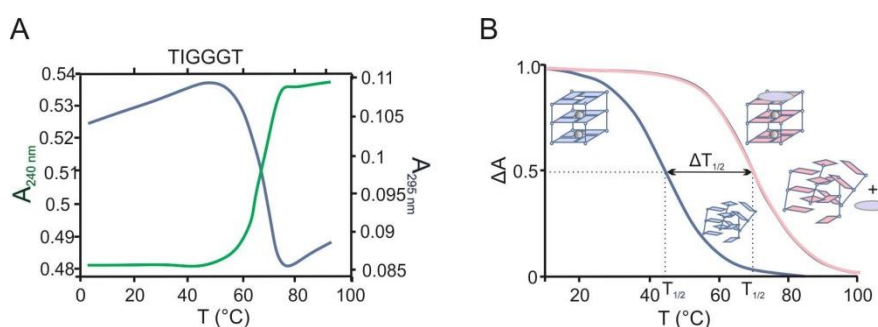
Rys. 30. Widma CD dla trzech typowych topologii kwadrupleksów DNA: antyrównoległej (A), hybrydowej (B) i równoległej (C);(13) Nałożenie widm kwadrupleksu RNA (niebieska krzywa) i dupleksu RNA (przerywana krzywa) (D).(126)

W widmach CD nie tylko położenie pasm, ale także ich intensywność jest czuła na zmiany konformacyjne. Dlatego też, aby uzyskać informację o typie badanej struktury, widma CD można zarejestrować w różnych warunkach. W przypadku kwadrupleksów RNA najlepiej zastosować dwa różne bufory np. zawierający kationy potasu lub litu. Ponieważ w obecności kationów litu kwadrupleksy nie tworzą się, to zaobserwowanie wzrostu intensywności pasm przy ~ 260 i pogłębienia się pasma przy 240 nm dla widm wykonanych w obecności jonów K^+ w stosunku do tych zarejestrowanych w obecności jonów Li^+ można przypisać tworzeniu się struktury kwadrupleksu. Spektroskopię CD wykorzystuje się także do monitorowania zmian konformacyjnych wywołanych zmianą środowiska np. obecnością G4-liganda(127) czy stłoczeniem molekularnym.(128) Analiza widm CD pozwala śledzić wpływ sekwencji oraz modyfikacji chemicznej na preferowaną konformację kwadrupleksu w roztworze. Rejestracja widm CD w funkcji temperatury wykorzystywana jest często do wyznaczania temperatury topnienia kwadrupleksów.(129)

Spektroskopia UV-Vis

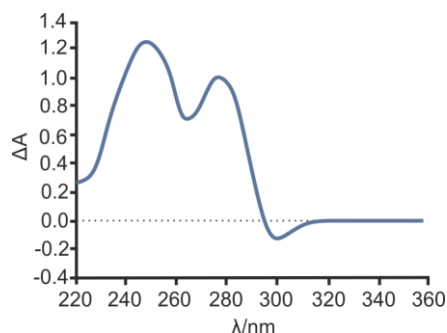
Spektroskopia UV-Vis jest jedną z metod najczęściej stosowanych do wstępnej analizy kwasów nukleinowych w roztworze. Obecność kwadrupleksów może zostać potwierdzona na podstawie analizy krzywych topnienia oraz absorpcyjnych widm różnicowych - TDS (ang. *Thermal Difference Spectrum*). (130, 131) Tworzeniu podwójnej helisy stabilizowanej parami zasad Watsona-Cricka z pojedynczych nici towarzyszy

spadek absorbancji w zakresie od 220 do 350 nm (hipochromizm). Pomiar temperatury topnienia, T_m , wykonuje się standardowo przy długości fali 240 lub 260 nm, gdyż przy tych długościach fal absorbancja jest maksymalna. Z kolei tworzeniu się kwadrupleksów towarzyszy wzrost absorbancji przy 295 nm i spadek absorbancji przy 260 nm. Przy wzroście temperatury, wraz z zanikiem G-tetrad przy 295 nm obserwuje się efekt hipochromowy. Efekt ten często wykorzystuje się w badaniach kwadrupleksów, gdzie zaobserwowanie odwróconego profilu topnienia przy 295 nm w stosunku do tego obserwowanego przy 240 lub 260 nm, uważa się za silny argument wskazujący na obecność kwadrupleksu w roztworze (rys. 31 A).(131–133) Analiza krzywych topnienia kwadrupleksów bywa trudna w interpretacji, ponieważ rozplatanie tych struktur może przebiegać przez stan pośredni. Wówczas możliwe jest wyznaczenie jedynie stabilności termicznej układu T_m , ale nie parametrów termodynamicznych.(130) Za pomocą spektroskopii UV można badać także oddziaływanie G4-ligandów z kwadrupleksami (rys. 31 B).(134)



Rys. 31. Profil topnienia dla kwadrupleksu przy długościach fali 240 nm (kolor zielony) oraz 295 nm (kolor niebieski) (A). Wzrost temperatury topnienia kwadrupleksu wywołany oddziaływaniem z G4-ligandem; wskazanie punktu $\Delta T_{1/2}$ w którym połowa próbki jest spleciona, a druga rozpleciona, jest to punkt odpowiadający wartości T_m (B).

Kolejną metodą mogącą potwierdzić występowanie kwadrupleksów w roztworze są temperaturowe widma różnicowe (TDS). Widma te otrzymuje się poprzez odjęcie widma UV zarejestrowanego w fali ciągłej w zakresie 220-350 nm poniżej temperatury topnienia od widma wykonanego powyżej temperatury topnienia kwadrupleksu. Widma TDS kwadrupleksów posiadają charakterystyczne, ujemne pasmo przy długości fali 295 nm, co odróżnia je od widm dupleksów, w których występują jedynie dwa dodatnie pasma, przy 240 nm i 270 nm (rys. 32). Amplituda pasma przy 295 nm zależy od topologii kwadrupleksu i jest zazwyczaj mała w przypadku topologii równoległej.(135)

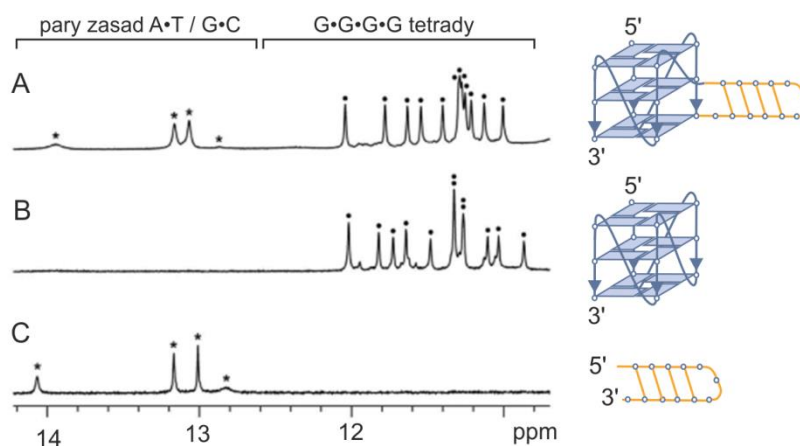


Rys. 32. Przykład typowego widma różnicowego dla cząsteczki kwadrupleksu RNA.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) podobnie jak rentgenowska analiza strukturalna(136) pozwala na poznanie struktury kwasów nukleinowych z dokładnością na poziomie atomowym. Spośród 3 484 struktur kwasów nukleinowych zdeponowanych dotychczas w bazie PDB 62.4% stanowią struktury wyznaczone za pomocą metod rentgenowskich, natomiast jedynie 37.6% to struktury otrzymane metodami wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Każda z tych metod posiada zarówno zalety jak i wady. Do badań rentgenowskich niezbędne jest otrzymanie dobrze rozprasającego monokryształu, natomiast dla badań metodą NMR kluczowe jest występowanie w roztworze pojedynczej formy oraz otrzymanie wąskich linii rezonansowych. Do badań w kryształach nie istnieją ograniczenia na wielkość badanych cząsteczek, z kolei w przypadku badań metodami NMR graniczną wielkością jest zazwyczaj kilka - kilkanaście kilodaltonów (kDa). W przypadku analizy strukturalnej kwasów nukleinowych o takich rozmiarach (około 40 reszt nukleotydowych) zazwyczaj wymagane jest otrzymanie cząsteczek całkowicie znakowanych izotopami ^{13}C i ^{15}N . Również w takim przypadku analiza widm NMR jest bardzo żmudna, a liczba dostępnych więzów strukturalnych ograniczona, co prowadzi do otrzymania nie pojedynczej struktury, a całej rodziny struktur spełniających więzy eksperymentalne. Zapewne ograniczenia te są powodem dużej różnicy pomiędzy liczbą zdeponowanych w bazie PDB struktur w kryształach i roztworze. Inaczej sytuacja wygląda w przypadku kwadrupleksów. Na ogólną liczbę 366 zdeponowanych struktur kwadrupleksów jedynie 165 dotyczy tych otrzymanych metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej, a 201 to struktury uzyskane metodami spektroskopii NMR. Wynika to głównie z trudności związanych z otrzymaniem dobrej jakości kryształów. Należy podkreślić, że w wielu badaniach znajomość struktury z dokładnością atomową nie jest konieczna, a na podstawie analizy widm NMR można uzyskać wiele cennych informacji strukturalnych.

Rdzeń kwadrupleksów stanowią G-tetrazy, w których reszty guanozyny powiązane są za pomocą wiązań wodorowych typu Hoogsteena. Sygnały pochodzące od protonów iminowych uczestniczących w tego typu wiązaniach występują zazwyczaj w rejonie 10-12 ppm. W G-tetradzie każdy z protonów iminowych znajduje się w nieco innym otoczeniu magnetycznym, dlatego na podstawie liczby pojawiających się sygnałów w rejonie 10-12 ppm można wnioskować o liczbie G-tetrad w danej strukturze. Analiza widma w tym rejonie pozwala dodatkowo na stwierdzenie, czy analizowany kwadrupleks przyjmuje w roztworze pojedynczą konformację czy też występuje w postaci dwóch lub większej liczby form. Przykładowo dla kwadrupleksu zbudowanego z trzech G-tetrad należy oczekiwać 12 sygnałów, chyba, że sygnały się nakładają (rys. 33 B).⁽¹¹⁶⁾ Zalety stosowania spektroskopii NMR w badaniach kwadrupleksów najlepiej ilustruje eksperyment przedstawiony na rysunku 33. W widmie hybrydy dupleks-kwadrupleks widoczne są dobrze oddzielone regiony, pierwszy to region, w którym pojawiają się sygnały od G-tetrad i drugi, w którym występują sygnały od protonów iminowych biorących udział w tworzeniu par zasad Watsona-Cricka. Z kolei na rys. 33 B i 33 C pokazane są widma poszczególnych domen tworzących hybrydę. Jak widać, już sama analiza jednowymiarowego widma ^1H NMR dostarcza bardzo cennych informacji.

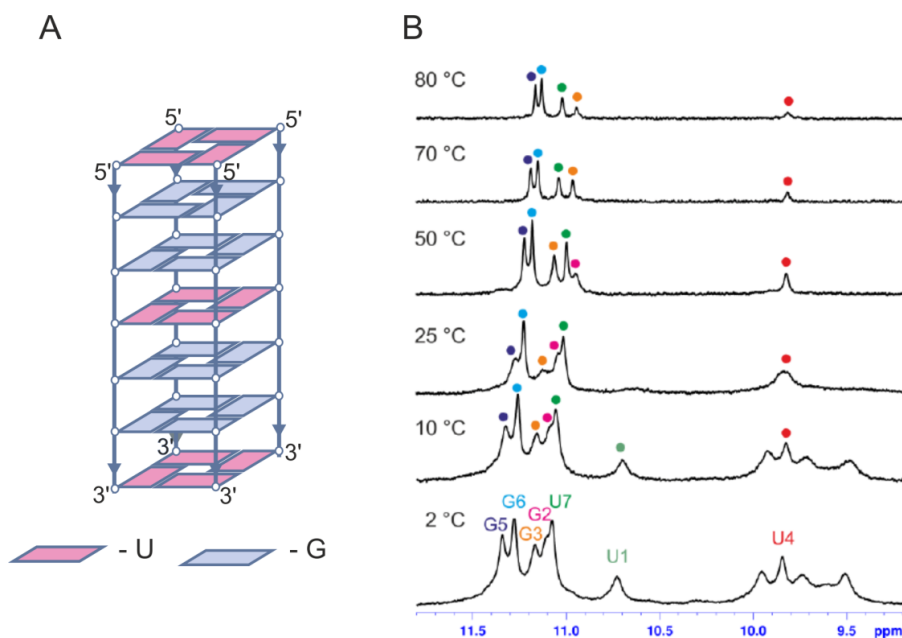


Rys. 33. Widma 1D ^1H NMR hybrydy dupleks-kwadrupleks o sekwencji 5'-CAGGGTGGGTCTGCTGTGCAGGGGTGGGT-3' (A) oraz jej składowych: kwadrupleksu (B) oraz dupleksu (C) zarejestrowane w buforze potasowym zawierającym 20 mM KCl oraz 20 mM fosforan potasu (pH 7.0) w temperaturze 25 °C.⁽¹¹⁶⁾

Za pomocą spektroskopii NMR można śledzić zmiany konformacyjne kwadrupleksów pod wpływem zmiany warunków środowiska m. in. typu kationów, ich stężenia, pH czy temperatury.⁽¹³⁷⁾ Dla iminowych atomów wodoru zaangażowanych w tworzenie G-tetrad charakterystyczna jest ich niezwykła trwałość, którą można powiązać z

budową kwadrupleksów. Niekiedy sygnały pochodzące od protonów iminowych można obserwować nawet w temperaturze $\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$. W konsekwencji iminowe atomy wodoru w G-tetradach bardzo wolno wymieniają się na deuter. Najsilniej chronione przed wymianą są zazwyczaj protony znajdujące się w głębi kanału. W niektórych przypadkach protony iminowe można zaobserwować nawet po kilku miesiącach trzymania próbki w D_2O . Należy dodać, że wymiana protonów iminowych na deuter w parach zasad Watsona-Cricka w dupleksach DNA i RNA zachodzi zazwyczaj w czasie kilku milisekund.

Rejestracja widm ^1H NMR w funkcji temperatury umożliwia wyznaczenie trwałości poszczególnych elementów struktury. Na przykład dla kwadrupleksu zbudowanego z czterech nici o sekwencji $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ zaobserwowano, że część sygnałów zanika szybko wraz ze wzrostem temperatury, inne natomiast są widoczne nawet w temperaturze $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rys. 34).^(50, 62) Najwolniej wymieniają się sygnały od G-tetrad i U-tetrazy na końcu 3'. Tę niezwykłą trwałość protonu iminowego od U-tetrazy udało się wyjaśnić dzięki poznaniu struktury przestrzennej kwadrupleksu. Za ten efekt odpowiedzialna jest konformacja 3'-końcowego fragmentu cząsteczki, tzw. „odwrócona U-tetradą”, która stabilizowana jest za pomocą wiązania wodorowego pomiędzy grupą 2'-OH 3'-końcowej urydyny a grupą fosforanową poprzedzającą ją guanozyny.

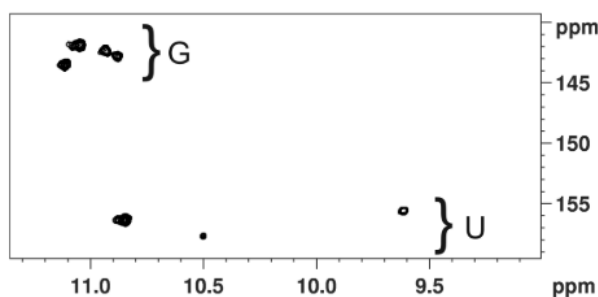


Rys. 34. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR dla czteroniciowego kwadrupleksu o sekwencji $\text{p}(\text{UGG})_2\text{U}$ w obecności 50 mM KCl, 10 mM fosforanu potasu, 0.1 mM EDTA, pH 6.8.

Przypisania sygnałów iminowych – wybrane aspekty

Analizę widm NMR ułatwia znajomość przypisania sygnałów rezonansowych poszczególnym protonom w cząsteczce. W przypadku kwasów nukleinowych niemożliwe jest jednoznaczne przypisanie sygnałów jedynie na podstawie widm jednowymiarowych, konieczne jest zastosowanie technik dwu- lub trójwymiarowych. W badaniach kwadrupleksów do przypisania sygnałów pochodzących od protonów iminowych wykorzystuje się głównie widma dwuwymiarowe hetero- i homojądrowe, takie jak ^1H - ^{15}N HSQC (ang. *Heteronuclear single quantum correlation*), ^1H - ^{13}C HMBC (ang. *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) czy ^1H - ^1H NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*).

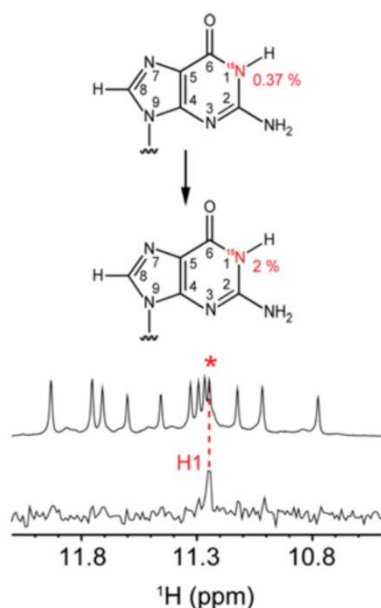
Widma typu ^1H - ^{15}N HSQC wykorzystują transfer magnetyzacji poprzez sprzężenia skalarnie, gdy jądra ^1H i ^{15}N są odległe o jedno wiązanie chemiczne. Na przykład dla omawianego już wcześniej czteroniciowego kwadrupleksu o sekwencji p(UGG)₂U w widmie ^1H - ^{15}N HSQC (rys. 35) obserwujemy dwie grupy sygnałów: protony iminowe pochodzące od reszt guanozyny oraz protony iminowe reszt urydyny. Typowe wartości przesunięć chemicznych ^{15}N dla atomów N3 urydyny to ~ 160 ppm, natomiast dla atomów N1 guanozyny typowy zakres wynosi 140-150 ppm. Na tej podstawie łatwo rozróżnić cztery sygnały pochodzące od czterech G-tetrad i trzy sygnały od U-tetrad. Z uwagi na symetrię cząsteczki, każdej tetradzie, zarówno guanozynowej jak i urydynowej, odpowiada jedynie jeden sygnał.



Rys. 35. Widmo ^1H - ^{15}N HSQC zarejestrowane dla czteroniciowego kwadrupleksu o sekwencji p(UGG)₂U.

W celu dokonania jednoznacznego przypisania sygnałów pochodzących od reszt guanozyny coraz częściej wykorzystuje się znakowanie izotopowe ^{15}N . Na drodze syntezy chemicznej otrzymuje się serię oligonukleotydów o identycznych sekwencjach, różniących się jedynie tym, że jedna z reszt guanozyny posiada atom azotu N1 znakowany za pomocą izotopu ^{15}N . Synteza takiej serii, składającej się zazwyczaj z kilkunastu oligonukleotydów, w których znakowanie byłoby bliskie 100% jest niezwykle kosztowna. Z tego względu

próbkę znakuje się na poziomie 2-10%. Następnie rejestruje się serię widm 1D ^1H NMR, w których dzięki zastosowaniu specjalnego „filtru” obserwuje się jedynie sygnały pochodzące od protonu iminowego bezpośrednio związanego z atomem azotu ^{15}N , pozostałe sygnały są natomiast niewidoczne (rys. 36).(137) Porównanie tych widm z widmem otrzymanym dla nieznakowanej cząsteczki pozwala jednoznacznie przypisać sygnały iminowe poszczególnym atomom H1 reszt guanozyny.

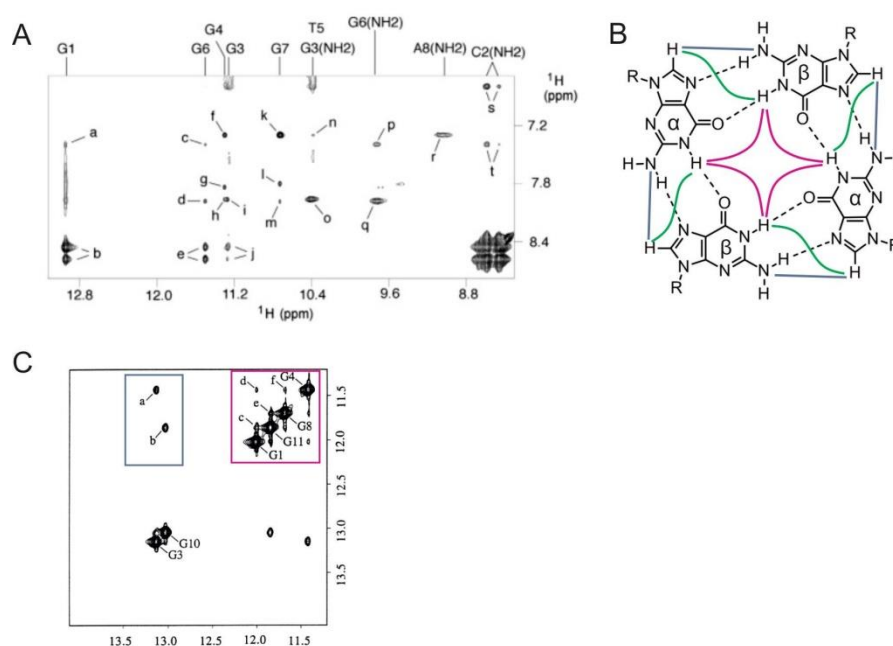


Rys. 36. Przykład selektywnego znakowania izotopowego (^{15}N) w celu jednoznacznego przypisania sygnałów protonów iminowych. Widmo górne wykonane dla kwadrupleksu o naturalnej zawartości izotopu ^{15}N (0.37%), widmo dolne dla próbki znakowanej na poziomie 2%.(137)

Inną metodą wykorzystywaną do przypisania sygnałów protonów iminowych reszt guanozyny jest eksperyment ^1H - ^{13}C HMBC pozwalający na korelację protonów z odległymi o dwa lub trzy wiązania atomami węgla ^{13}C . W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że protony H8 i H1 znajdują się w odległości trzech wiązań od atomu węgla C5, a odpowiednie stałe sprzężenia $^3\text{J}(\text{H8}-\text{C5})$ i $^3\text{J}(\text{H1}-\text{C5})$ są rzędu kilku herców. Zaobserwowanie w widmie ^1H - ^{13}C HMBC sygnałów korelacyjnych od protonów H8 i H1 do atomu węgla C5 pozwala na jednoznaczne przypisanie protonu H1 pod warunkiem, że znane jest położenie odpowiedniego protonu H8. Niestety z uwagi na małą naturalną zawartość izotopu ^{13}C (1.1%), występujące często poszerzenie sygnałów iminowych oraz stężenia rzędu 1-4 mM stosowane w badaniach NMR kwadrupleksów, widma te charakteryzuje bardzo mała czułość i słaba rozdzielczość.

Innym eksperymentem pomocnym w analizie widm NMR kwadrupleksów jest widmo 2D ^1H - ^1H NOESY, w którym obecne są sygnały korelacyjne pomiędzy protonami

znajdującymi się w odległości mniejszej niż 4-5 Å. W widmach tych o utworzeniu G-tetrazy świadczy pojawienie się trzech charakterystycznych typów sygnałów (rys. 37 A - B): sygnały korelacyjne pomiędzy protonami iminowym reszty guanozyny a aromatycznym H8 przyległej reszty (np. d, g; G α NH1-G β H8) (rys. 37 B - kolor zielony), pomiędzy protonem aminowym reszty guanozyny a protonem H8 przyległej reszty guanozyny (np. o, G β NH₂-G α H8), (rys. 37 B - kolor granatowy) oraz sygnały korelacyjne pomiędzy protonami iminowymi wewnątrz tetrazy, które zazwyczaj są o małej intensywności (c-f, rys. 37 C – kolor czerwony).(138–140)



Rys. 37. Fragment widma 2D NOESY z widocznymi sygnałami korelacyjnymi z udziałem protonów iminowych i aminowych (A), (C). Charakterystyczne atomy wodoru w G-tetradzie, dla których obserwuje się sygnały korelacyjne zaznaczono na kolor zielony (G α NH1-G β H8), niebieski (G β NH₂-G α H8) oraz czerwony (G α NH1-G β NH1) (B).(139) (140)

V. 6. 2. Metody biochemiczne

Elektroforeza żelowa

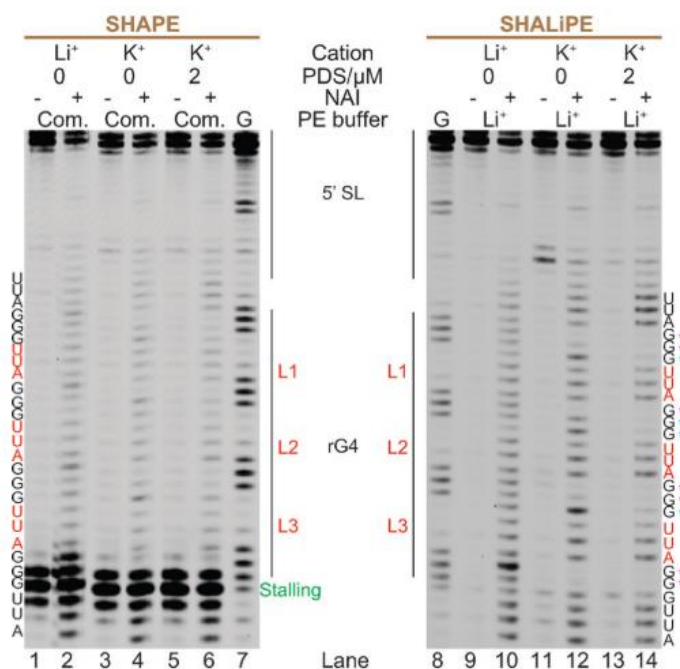
Elektroforeza żelowa stosowana jest zazwyczaj do rozdzielania mieszanin kwasów nukleinowych różnej wielkości (żele denaturujące). Gdy elektroforeza wykonana jest w warunkach natywnych (niedenaturujących), wówczas ruchliwość cząsteczek związana jest nie tylko z ich ładunkiem i masą, ale także kształtem. Ta zależność wykorzystywana jest również do weryfikacji powstałych struktur kwadrupleksów. Dla dupleksów DNA i RNA

szybkość migracji w żelu poliakrylamidowym zależy bezpośrednio od liczby par zasad i jest określana przez porównanie szybkości migracji analizowanego prążka z markerem mas. W przypadku kwadrupleksów zależność ta jest jednak obarczona dużym błędem. Wynika to z ich zróżnicowanego kształtu, różnego rozmieszczenia ładunku na ich powierzchni, a także różnego oporu hydrodynamicznego. Zazwyczaj spośród kwadrupleksów i dupleksów o podobnej masie, kwadrupleksy migrują w żelu szybciej ze względu na ich kompaktowy kształt.(141) Należy jednak przy tym pamiętać, że często migrują one z nieprzewidywalną szybkością, dlatego obrazy elektroforetyczne kwadrupleksów należy interpretować ostrożnie, stosując odpowiednie wzorce, np. drabinkę prążków, które odpowiadają fragmentom DNA o różnej długości lub inne wzorcowe kwadrupleksy o znanej topologii. Po zakończonym eksperymencie rozkład wszystkich prążków w żelu wizualizuje się w świetle UV (254 nm) lub stosując niespecyficzny interkalator jak np. SYBR Gold. W przypadku kwadrupleksów równoległych, żele można wybarwiać za pomocą NMM, liganda o wysokiej selektywności w stosunku do równoległych kwadrupleksów, który zaczyna silnie fluoryzować dopiero po związaniu się z kwadrupleksem.(142)

Techniki mapowania chemicznego (DMS, SHALiPE, DMSLiPE)

Innymi technikami, ukierunkowanymi na identyfikację kwadrupleksów w warunkach *in vitro*, są DMS (ang. *dimethylsulfate*), SHALiPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation with lithium ion-based primer extension*) i DMSLiPE (ang. *dimethyl sulfate with lithium ion-based primer extension*) (powstałe w oparciu o SHAPE i DMS).(143) Metody te, jako nieliczne, można także wykorzystać do badań *in vivo*. W mapowaniu przy użyciu DMS odczynnik modyfikujący, siarczanu dimetylu, metyluje atom azotu w pozycji N7 guaniny, atom azotu w pozycji N1 adeniny oraz atom azotu w pozycji N3 cytozyny. Metylacji ulegają tylko niesparowane oraz niezaangażowane w oddziaływania warstwowe nukleotydy, dlatego też reszty guanozyny budujące rdzeń kwadrupleksu nie są modyfikowane. Dostępność guanozyny dla odczynnika DMS jest przesłanką, że dana reszta nie jest zaangażowana w tworzenie G-tetrad.(144) Natomiast identyfikację struktury kwadrupleksu z dokładnością do pojedynczego nukleotydu umożliwiają techniki SHALiPE i DMSLiPE, które wykorzystują reakcję odwrotnej transkrypcji w środowisku litu (LiPE, ang. *lithium ion (Li⁺)-based primer extension*). Przy użyciu odczynnika acylującego, jakim jest NAI (ang. *2-methylnicotinic acid imidazolide*) w technice

SHALiPE można zidentyfikować miejsca podlegające modyfikacji pod warunkiem, że fragment bogaty w reszty guanozyny jest nieustrukturyzowany. Warunek ten jest spełniony dla roztworów zawierających jedynie jony litu. Powtórzenie eksperymentu w obecności kationów potasu daje inny rezultat, co wynika z rearanżacji struktury badanej cząsteczki i niedostępności reszt guanozyn zaangażowanych w tworzenie kwadrupleksu (rys. 38, pasmo 12, fioletowe gwiazdki). Pokazano również, że wykorzystując w eksperymencie oprócz kationów K^+ dodatkowo ligand selektywny względem kwadrupleksów, np. PDS, reszty guanozyny tworzące G-tetrazy są jeszcze bardziej chronione przed odczynnikiem NAI (rys. 38, pasmo 14). Omówione powyżej techniki dostarczają ogromnych możliwości dla sondowania struktur kwadrupleksów w całym transkryptomie.(143)



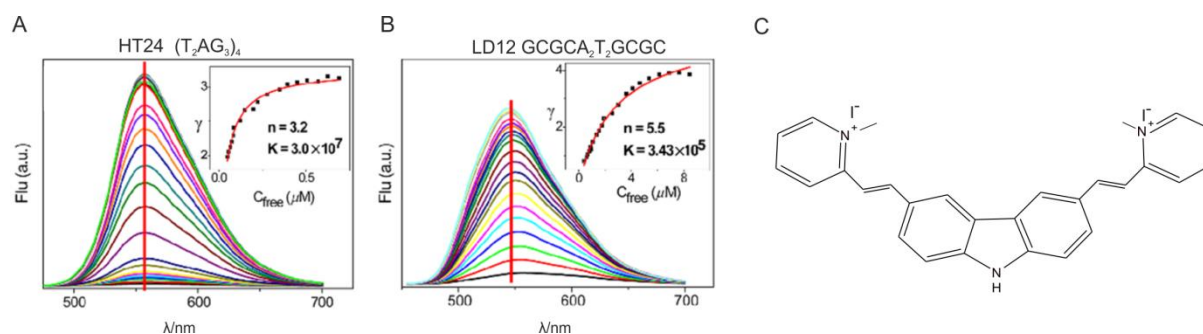
Rys. 38. Analiza SHALiPE. Sekwencję TERRA RNA o potencjale do tworzenia kwadrupleksu sondowano za pomocą NAI w obecności kationów litu, potasu oraz potasu i G4-liganda PDS.

Ligandy oraz sondy fluorescencyjne do monitorowania kwadrupleksów in vitro i in vivo

W badaniach kwadrupleksów powszechnie wykorzystuje się sondy fluorescencyjne, związki chemiczne wiążące się swoiście ze strukturą kwadrupleksu, które po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali zaczynają świecić. Cząsteczki DNA i RNA nie wykazują mierzalnej fluorescencji. Często także w wyniku rotacji wokół pojedynczych wiązań niezwiązany ligand oddaje bezpromieniście część swojej energii wzbudzenia i nie wykazuje znaczącego poziomu fluorescencji. Dopiero po unieruchomieniu fluorochromu

(np. w kompleksie G4-ligand/kwas nukleinowy), obserwuje się znaczny wzrost natężenia fluorescencji (sondy *light-up*).

Do badań oddziaływań ligandów z DNA czy RNA *in vitro*, najczęściej stosuje się metodę fluorescencyjnego miareczkowania równowagowego, gdzie obserwuje się zmiany w emisji podczas dodawania kolejnych porcji DNA/RNA do roztworu G4-liganda. Z zależności zmiany poziomu fluorescencji od stężenia kwasu nukleinowego można wyznaczyć stężenie związku niezwiązanego i związanego z kwasem nukleinowym w warunkach równowagowych, stałą wiązania K_a oraz stechiometrię wiązania.(145) Na przykład, małowczątkowa sonda fluorescencyjna jaką jest diiodek 3,6-bis (1-metylo-2-winylopirydyniowy) karbazolu (o-BMVC) rozpoznaje i wiąże jednocząsteczkowy kwadrupleks odpowiadający ludzkiej sekwencji telomerowej d(TTAG₃)₄ (HT24) ze stałą wiązania $K_a \sim 3.0 \times 10^7$ i stechiometrią $n \sim 3.2$. Dodatkowo o-BMVC może być wykorzystany w celu odróżniania struktur kwadrupleksów od dupleksów.(145) Ligand ten wykazuje duże różnice w czasie zaniku fluorescencji, powinowactwa stałej wiązania i intensywności fluorescencji pomiędzy strukturami kwadrupleksów i dupleksów (rys. 39), co czyni go dobrym kandydatem do sondowania struktur kwadrupleksów. Czas życia o-BMVC w zakresie 1.85–2.2 ns odpowiada interakcji z antyrównoległymi kwadrupleksami, podczas gdy czas zaniku fluorescencji o-BMVC dla dupleksu wynosi ~ 1.2 ns. Jednak kwestia odróżnienia poszczególnych topologii kwadrupleksów nadal pozostaje niejednoznaczna.(145)



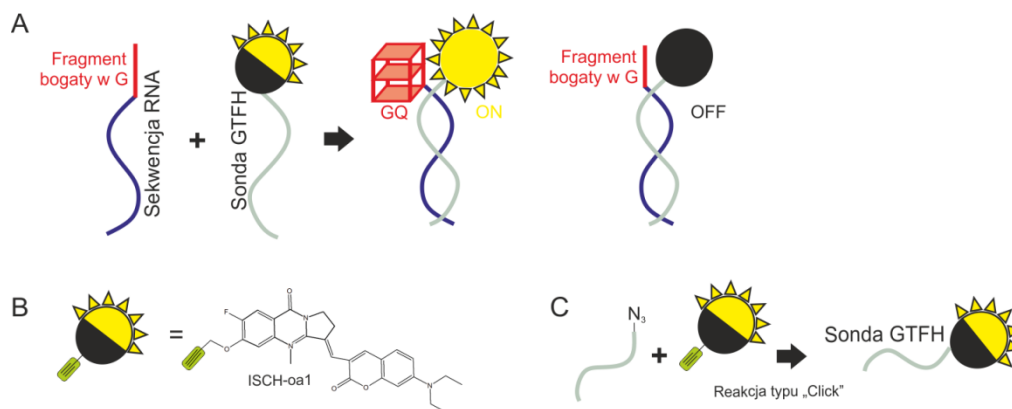
Rys. 39. Miareczkowanie fluorescencyjne 10 μM o-BMVC przez dodanie kwadrupleksu H24 (A) lub dupleksu LD12 (B) od 0.25 do 8 μM w 150 mM roztworze K^+ . Z dodatkowych wykresów wyznaczono stałą wiązania K_a oraz liczbę n tj. średnią liczbę związanych G4-ligandów przypadających na każdą strukturę.(145) Wzór strukturalny liganda o-BMVC (C).

Ligand o-BMVC, wykazuje właściwości selektywnego rozświetlania komórek rakowych, w porównaniu do komórek zdrowych. Stwarza to ogromny potencjał w wykrywaniu zmian przedrakowych.(145, 146) o-BMVC w porównaniu do izomeru BMVC

(rys. 26 E) jest bardziej specyficzny i charakteryzuje się niską cytotoksycznością, co czyni go jeszcze lepszym kandydatem do obrazowania makromolekuł w komórkach.

Innymi przykładami sond fluorescencyjnych wykorzystywanych w celu wizualizacji kwadrupleksów w komórce oprócz wspomnianego liganda o-BMVC (rys. 39 C)¹⁴⁴ są NaphthoTASQ (rys. 27 C)(95), QUMA-1 (rys. 27 D)(113), PDS (rys. 27 F)(96) czy karboksy-PDS (rys. 27 B).(110, 123, 147, 148) Idealna sonda fluorescencyjna, aby można ją było wykorzystać do obrazowania komórkowego, powinna wiązać się z kwadrupleksem z dużym powinowactwem i selektywnością, wykazywać dobrą rozpuszczalność w wodzie, niską toksyczność, przenikać przez błony komórkowe oraz wykazywać zwiększoną emisję fluorescencji po związaniu z docelową cząsteczką. Sprostanie tym wymaganiom, szczególnie selektywności, powinowactwu i dobrej wizualizacji jest bardzo trudne, dlatego też, jako sondy fluorescencyjne używa się czasami fluorescencyjnie znakowanych G4-ligandów (np. Alexa594-PDS).(149) W takim kowalencyjnym układzie znacznik fluorescencyjny jest odpowiedzialny za świecenie, z kolei ligand odpowiada za preferencyjne wiązanie do struktur kwadrupleksów.(147)

Inne podejście wykorzystano przy projektowaniu selektywnych sond do identyfikacji kwadrupleksów RNA w komórkach. Pierwszą taką sondą była dwufunkcyjna sonda GTFH (ang. *G-quadruplex-triggered fluorogenic hybridization*), która została użyta do detekcji kwadrupleksu w rejonie 5'-UTR NRAS mRNA.(150) Sonda GTFH składa się z dwóch członów: fragmentu DNA (ang. *anti-tail sequence*) komplementarnego do sekwencji przyległej do miejsca, w którym tworzy się kwadrupleks (ang. *tail sequence*) oraz fluorescencyjnej cząsteczki ISCH-oa1 (rys. 40 B) odpowiedzialnej za świecenie po rozpoznaniu struktury kwadrupleksu (rys. 40 A). Badania wykazały, że za pomocą sondy GTFH można wykryć struktury kwadrupleksu RNA NRAS, zarówno *in vitro*, jak i w komórkach. Sonda GTFH jest użytecznym narzędziem w badaniach fałdowania struktur kwadrupleksów w obrębie interesujących regionów RNA(151) i reprezentuje nowy kierunek projektowania selektywnych sond nakierowanych na kwadrupleksy RNA.



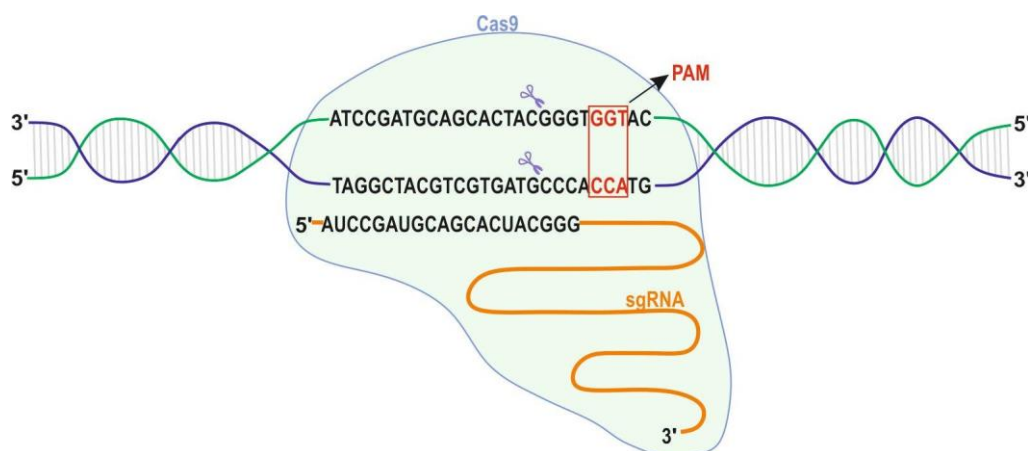
Rys. 40. Sonda GTFH. Zasady projektowania sondy GTFH (A). Struktura chemiczna ISCH-ool (B). Przygotowanie sondy (C).(150)

V. 7. Strategie terapeutyczne

Choroby o podłożu genetycznym są wynikiem mutacji genów lub zaburzenia liczby czy budowy chromosomów. Choć całkowite wyleczenie tych chorób nie jest możliwe, istnieje coraz więcej sposobów na minimalizowanie ich efektów. Strategie terapeutyczne mogą być ukierunkowane na cząsteczki DNA lub RNA, na jednym z trzech poziomów tj. poziomie transkrypcji, potranskrypcyjnym jak również na poziomie translacji. Strategie ukierunkowane na mRNA opierają się głównie o wykorzystanie antysensowych oligonukleotydów(5), małych interferujących RNA(152) oraz katalitycznych kwasów nukleinowych (rybozomy i DNAzomy).(153, 154) W zależności od wybranej koncepcji terapeutycznej wyróżniamy strategię **antygenową**, **aptamerową**, **rybozymową** i **antysensową**.

Strategia antygenowa polega na edytowaniu lub naprawie genomowego DNA. Przykładem takiej terapii jest wykorzystanie narzędzia genetycznego, jakim jest system CRISPR/Cas9 wywodzący się od bakterii.(7) W inżynierii genetycznej system CRISPR/Cas9, wykorzystywany jest jako narzędzie do precyzyjnej edycji genomu. W działanie tego systemu zaangażowane są dwa elementy: cząsteczka RNA (określana mianem *single-guide RNA*, sgRNA) oraz enzym Cas9. Geny kodujące białko Cas9 oraz fragment sgRNA są wprowadzane do wybranej komórki, najczęściej za pomocą plazmidu. Kompleks powstały z połączenia zsyntetyzowanego białka Cas9 oraz sgRNA pełni funkcję nożyczek molekularnych. Kompleks Cas9-sgRNA przeszukuje nić DNA w celu znalezienia około 20 nukleotydowej sekwencji komplementarnej do 5' końca sgRNA (rys. 41). Dodatkowo nukleaza Cas9 rozpoznaje trójnukleotydową sekwencję PAM, najczęściej NGG (N – dowolny nukleotyd), ułożoną bezpośrednio za sekwencją docelową DNA. Po

związaniu kompleksu Cas9-sgRNA do DNA, nukleaza Cas9 precyzyjnie tnie DNA w miejscu odległym o około 3 nukleotydy od sekwencji PAM. Przecięcie podwójnej helisy, naprawiane jest przez naturalnie występujące mechanizmy naprawcze.



Rys. 41. Schemat wykorzystania systemu CRISPR-Cas9 do precyzyjnej edycji genomu.

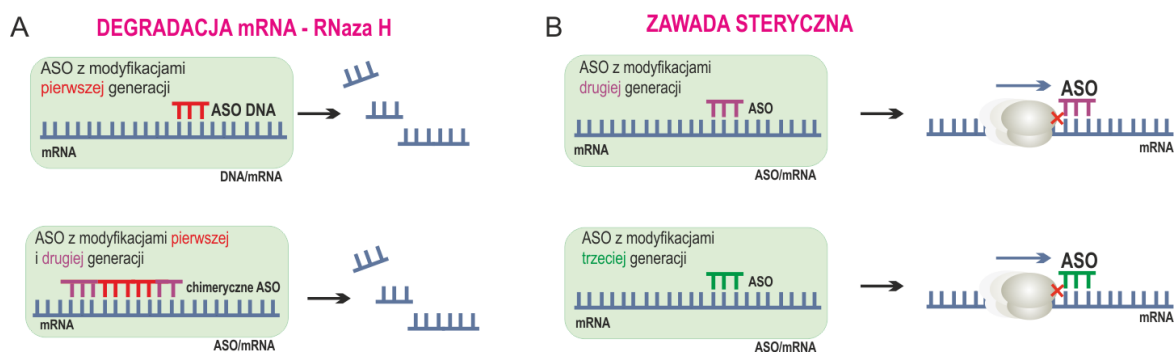
Naprawa uszkodzonych nici może przebiegać zgodnie z różnymi mechanizmami naprawy, z czego dwa uważa się za główne. Pierwszym z nich jest rekombinacja niehomologiczna (NHEJ), która może skutkować insercją lub delecją dodatkowych nukleotydów. Powoduje to zmianę ramki odczytu, przez co może nie powstać funkcjonalne białko. Drugi mechanizm, tj. rekombinacja homologiczna (HDR) daje możliwości zmiany genu na inną jego wersję, przez wprowadzenie w dane miejsce pożądanej mutacji/sekwencji. Zastosowanie mechanizmów HDR i NHEJ prowadzi do trwałych oraz ukierunkowanych zmian w genomie skutkujących wyłączeniem genu (knock-out) lub wprowadzeniem nowego genu (knock-in).(155)

Strategia rybozymowa. Rybozymy są cząsteczkami RNA obdarzonymi aktywnością katalityczną. Składają się z katalitycznej domeny, do której z obu stron przylegają fragmenty komplementarne do docelowego RNA. Utworzenie kanonicznych par zasad Watsona-Cricka z substratem umożliwia przebieg reakcji transestryfikacji i rozpad wiązania fosfodiesterowego w docelowym RNA. Strategia rybozymowa wykorzystuje syntetyczne rybozymy, które po związaniu do mRNA powodują jego degradację. W konsekwencji populacja niepożądanych w komórce cząsteczek mRNA jest eliminowana. Strategia ta ukierunkowana jest szczególnie na geny kodujące białka onkogenne, czynniki wzrostu czy cząsteczki przekazujące sygnały komórkowe.(3)

Strategia aptamerowa polega na wykorzystaniu krótkich fragmentów kwasów nukleinowych (ok. 15-80 nt), jako ligandów wiążących się specyficznym i bardzo silnym do

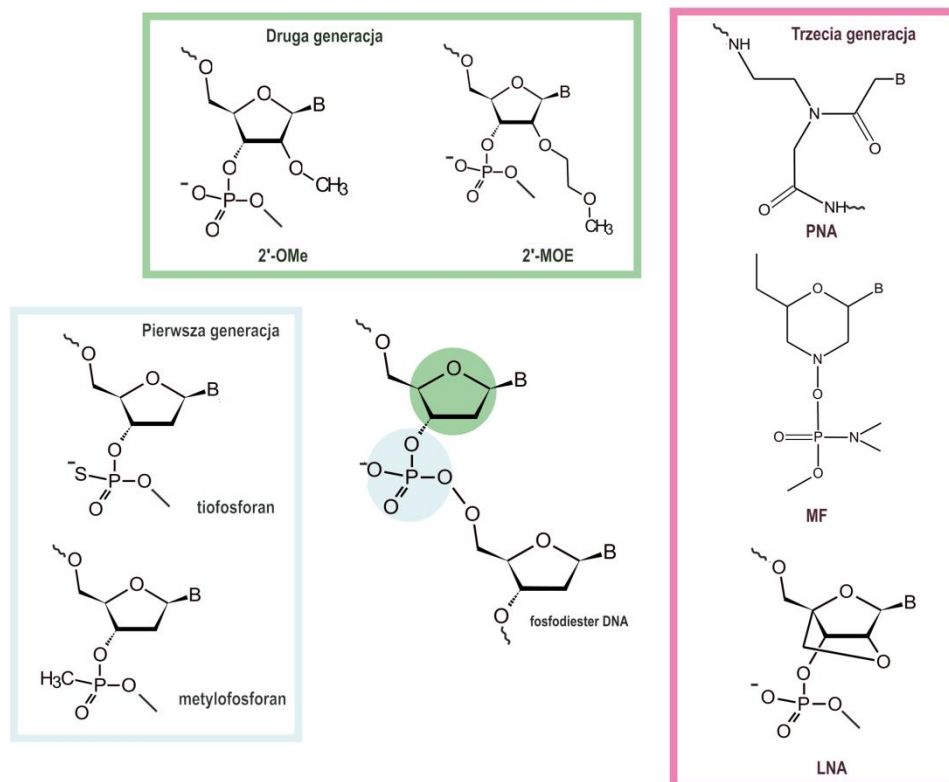
określonych biomolekuł. Wysokie powinowactwo jest wynikiem niezwyklego dopasowania struktury przestrzennej aptameru do budowy cząsteczki docelowej, np. białka. W tym przypadku aptamery działają jako inhibitory białek odpowiedzialnych za rozpoznanie i oddziaływanie z kwasami nukleinowymi. Wiązanie aptamerów blokuje interakcję między różnymi cząsteczkami, co jest podstawą wielu terapii. Aptamery znane są również z pełnienia funkcji katalitycznych czy roli ligandów wiążących inne cząsteczki o zróżnicowanej budowie, np. aminokwasy, nukleotydy, antybiotyki, witaminy czy jony metali.(2, 6)

Strategia antysensowa wykorzystuje jednoniciowe, zazwyczaj modyfikowane chemicznie cząsteczki kwasów nukleinowych, które hybrydują do mRNA, względnie DNA. Typowe oligonukleotydy antysensowe (ASO) zawierają od 18 do 21 reszt nukleotydowych i wiążą się z komplementarnymi fragmentami np. mRNA tworząc regularny dupleks. Hybrydyzacja ASO do właściwego fragmentu sekwencji docelowej prowadzić może do zahamowania procesu replikacji, transkrypcji lub translacji. W komórce hamowanie translacji przebiega głównie według dwóch mechanizmów. Pierwszy polega na aktywacji endogennego enzymu RNazy H przez powstały kompleks DNA/mRNA (rys. 42). Enzym ten przecina mRNA w kompleksie DNA/mRNA, uniemożliwiając proces biosyntezy białka poprzez degradację matrycy. Drugi mechanizm opiera się na sterycznym blokowaniu dostępu rybosomu do informacji zakodowanej w mRNA lub pre-mRNA na skutek utworzenia dupleksu ASO/mRNA. Większość leków antysensowych działa w oparciu o mechanizm zależny od RNazy H. Taka redukcja ekspresji mRNA może być bardzo skuteczna, osiągając około 80-95 %.(156)



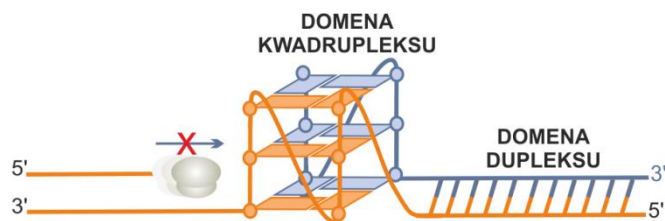
Rys. 42. Dwa główne mechanizmy działania ASO wpływające na ekspresję genów. Degradacja mRNA za pośrednictwem RNazy H (A). Zawada steryczna dla rybosomu (B). Modyfikacje chemiczne z podziałem na ich generacje zostały opisane poniżej.

Terapeutyczne oligonukleotydy antysensowe muszą spełniać szereg wymagań związanych z odpornością na degradację przez endo- i egzozonukleazy, przenikaniem przez błonę komórkową, niską toksycznością oraz wysoką specyficzną i efektywnością działania.(157) Internukleotydowe wiązania fosfodiesterowe w oligonukleotydach antysensowych są mało stabilne w surowicy i ulegają hydrolizie przez egzo- i endonukleazy. Konieczne jest zatem wprowadzenie modyfikacji chemicznych w celu poprawy ich stabilności. Modyfikowane oligonukleotydy antysensowe zostały podzielone na trzy generacje. O modyfikacjach I generacji mówimy, gdy jeden z atomów tlenu w grupie fosforanowej zostaje zastąpiony atomem siarki lub grupą metylową z wytworzeniem odpowiednio tiofosforanów (tiofosforanowych analogów kwasów nukleinowych) lub metylofosfonianów (rys. 43). Oligonukleotydy pierwszej generacji są stosowane najczęściej, gdyż charakteryzują się długim okresem półtrwania i dużą odpornością na nukleazy. Powstały po połączeniu modyfikowanego oligonukleotydu DNA z mRNA dupleks nie jest aktywny w procesie translacji, a dodatkowo aktywuje działanie enzymu RNazy H. Modyfikacje drugiej generacji dotyczą zmian w pozycji 2'-OH rybozy. Powszechnie stosowanymi modyfikacjami w tej grupie są 2'-OMe (2'-O-metyl) czy 2'-MOE (2'-O-metoksyetyl). Oprócz zwiększania odporności na nukleazę, modyfikacje te poprawiają powinowactwo wiązania ASO do docelowego mRNA. Dodatkowo oligonukleotydy z tej grupy są silniej wychwytywane w tkankach, ich okres półtrwania *in vivo* jest dłuższy, a ich efekt toksyczny jest niski. Związany ASO zawierający modyfikacje drugiej generacji nie aktywuje RNazy H, a stanowi jedynie zawadę steryczną dla rybosomu. Jednocześnie oligonukleotyd antysensowy, w którym modyfikacje drugiej generacji występują tylko w pozycjach flankujących, a centralną jego część stanowi oligonukleotyd z modyfikacjami pierwszej generacji po połączeniu z mRNA aktywuje działanie RNazy H. Z kolei najczęstszymi modyfikacjami trzeciej generacji są kwas peptydonukleinowy (PNA), morfolinoamidofosforan (MF) oraz nukleozyd o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy, LNA (ang. *locked nucleic acid*). Tak modyfikowane oligonukleotydy wykazują wysoką stabilność biologiczną za sprawą ich dużej odporności na nukleazy oraz wykazują silne powinowactwo hybrydyzacji z mRNA. Wywołują efekt antysensowy poprzez zawadę steryczną. Wadą modyfikacji trzeciej generacji jest ich neutralny elektrostatycznie charakter z wyjątkiem LNA, co stanowi duże wyzwanie dla ich rozpuszczalności i wychwytu komórkowego.(5, 8, 156)



Rys. 43. Modyfikacje chemiczne oligonukleotydów wykorzystywane w strategii antysensowej.

W badaniach nad wyciszeniem ekspresji genów próbowano wykorzystać także cząsteczki bogate w reszty guanozyny. Pokazano między innymi, że związanie się oligorybonukleotydu o sekwencji **GGGCCCGGG** z docelowym mRNA, zawierającym również dwa trójnukleotydowe bloki guanozynowe, prowadzi do powstania dwucząsteczkowego kwadrupleksu RNA:RNA, który stanowi zawadę steryczną dla rybosomu i w efekcie prowadzi do zahamowania procesu translacji *in vivo*.⁽¹⁴⁾ Słabą stroną tej metody jest duża niespecyficzność, gdyż oligonukleotyd o sekwencji **GGGCCCGGG** może hybrydyzować nie tylko do innych sekwencji bogatych w reszty guanozyny, ale również do komplementarnego fragmentu bogatego w reszty cytydyny (np. CCCGGGCC). W 2010 roku Hagihara i in. opublikowali pracę, w której zastosowane podejście częściowo rozwiązuje problem niespecyficzności. Zaproponowane przez nich oligonukleotydy antysensowe (w serii DNA) oprócz segmentu bogatego w reszty guanozyny posiadały fragment sekwencji komplementarny do mRNA. Rolą tego komplementarnego fragmentu było zapewnienie specyficzności rozpoznania. Jak pokazano, takie dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe mogą indukować tworzenie na matrycach RNA struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks, skutecznie hamując odwrotną transkrypcję RNA HIV-1 (rys. 44).⁽¹⁵⁾

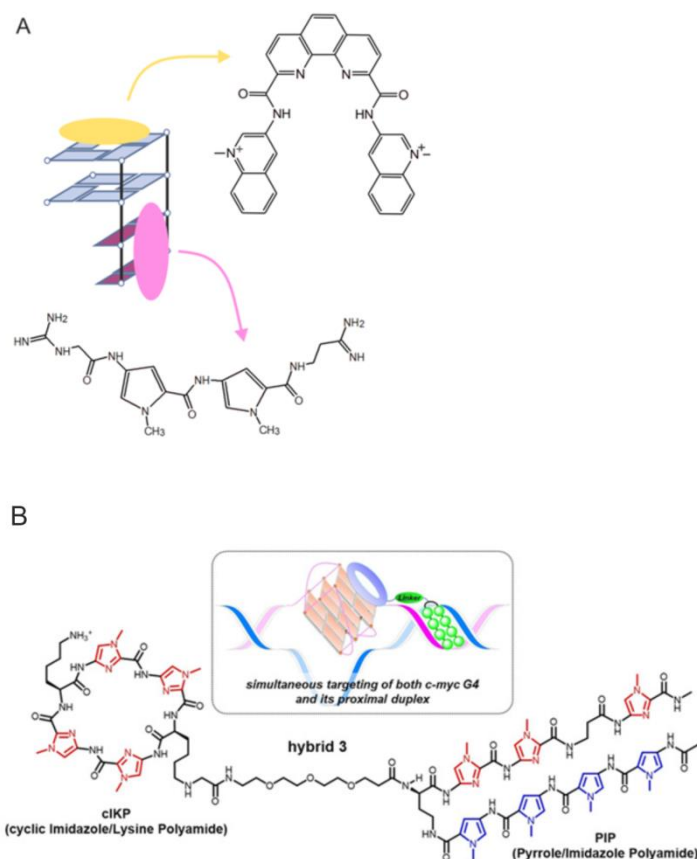


Rys. 44. Zahamowanie procesu odwrotnej transkrypcji(15) lub translacji(158) indukowane oligonukleotydem dwufunkcyjnym w serii DNA. Każda z nici posiada po dwa bloki guanozynowe GGG.

Dodatkowo badania te pokazały, że skuteczność inhibicji zależna jest głównie od stabilności powstałych struktur heterohybrzyd. Na ich stabilność wpływała głównie stabilność heterodupleksu utworzonego między matrycą RNA a domeną dupleksową oraz liczba reszt nukleotydowych pomiędzy blokami guanozynowymi zarówno w sekwencji antysensownej jak i na matrycy RNA. Najbardziej optymalną długość domeny dupleksowej określono na 12-14 reszt nukleotydowych, a najstabilniejszy kwadrupleks DNA:RNA tworzył się, gdy bloki guanozynowe rozdzielała tylko jedna reszta. Z kolei długość łącznika pomiędzy obiema domenami miała jedynie niewielki wpływ na stabilność badanych struktur.

Skuteczność podejścia opartego na kontrolowanym generowaniu struktur hybrydowych DNA:RNA w oparciu o strukturę typu dupleks – kwadrupleks do inhibicji translacji wykazał również Bhattacharyya i in. (rys. 44).(158) Stosując jednocześnie dwa różne oligonukleotydy antysensowne, z których jeden był nakierowany na region 5'-UTR a drugi na region kodujący białko eIF-4E zaobserwowano obniżoną zdolność komórek nowotworowych do proliferacji.

Układy hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks mogą być dodatkowo stabilizowane poprzez jednoczesne wykorzystanie dwóch różnych ligandów, jednego specyficznie wiążącego się do dupleksów oraz drugiego wykazującego selektywność względem kwadrupleksów. Możliwość jednoczesnego wiązania się dwóch różnych ligandów do struktur hybrydowych pokazano na przykładzie dwóch wybranych ligandów: netropsyny, antybiotyku silnie wiążącego się do dupleksów DNA bogatych w pary A:T, oraz Phen-DC3, o dużym powinowactwie do kwadrupleksów (rys. 45 A).(159)



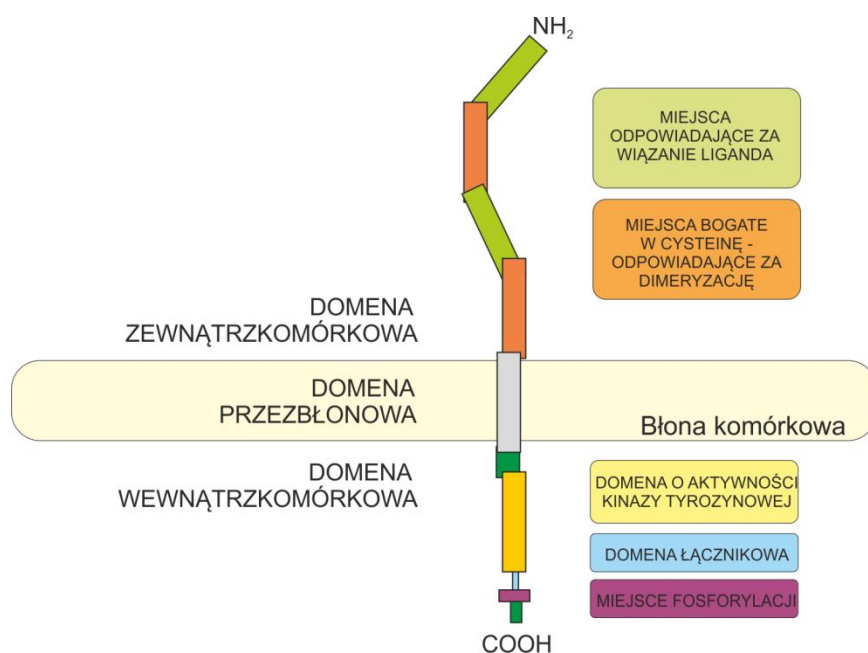
Rys. 45. Jednoczesne wiązania ligandów do dupleksu i kwadrupleksu. Ligandy netropsyna oraz Phen-DC3 wiążące odpowiednio dupleks oraz kwadrupleks (A). Oddziaływanie dwuczłonowego liganda cIKP-linker-PIP z kwadrupleksem *c-myc* i sąsiadującym z nim dupleksem (B).(159)

Interesującym rozwinięciem opisanego powyżej eksperymentu jest możliwość połączenia dwóch ligandów za pomocą linkera (rys. 45 B).(159) Jako przykład takiego rozwiązania może służyć cząsteczka powstała przez kowalencyjne połączenie dwóch ligandów: cIKP (ang. *cyclic Imidazole/Lysine Polyamide*) wiążącego kwadrupleks oraz PIP (ang. *Pyrrole/Imidazole Polyamide*), sekwencyjnie specyficznego wiążącego się do dupleksów. Pokazano, że takie podwójne rozpoznanie, kwadrupleksu i sąsiadującego z nim dupleksu, zwiększa specyficzność dwuczłonowego liganda względem kwadrupleksu *c-myc* (rys. 45 B). Metody opierające się o wykorzystanie dwóch różnych ligandów mogą przyczyniać się do synergicznego i selektywnego rozpoznania docelowej struktury hybrydowej i potencjalnie być wykorzystane w terapii antynowotworowej.

V. 8. Nadekspresja EGFR – czynnik nowotworzenia

EGFR – receptor czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor receptor*) pełni bardzo ważną rolę w kontrolowaniu proliferacji prawidłowych komórek, ich różnicowaniu i przeżywalności. Odstępstwa od prawidłowego funkcjonowania szlaku sygnałowego EGFR zidentyfikowano w przypadku wielu nowotworów m. in. w nowotworze płuc, sutka i jelita grubego.(160) Całkowita długość genu kodującego EGFR (*erbB-1*) to około 10 000 par zasad zlokalizowanych na chromosomie 7 w pozycji 7p12-14.(161) W skład tego genu wchodzi 26 eksonów, z czego za najlepiej poznany uznaje się obszar genu o sekwencji ekson 1/intron 1 zawierający zaledwie 2800 par zasad. Wydaje się być on najważniejszy ze wszystkich, gdyż poziom jego transkrypcji jest o około osiem razy wyższy niż eksonów 2-26. Co więcej, jak donoszą dane naukowe, rejon pomiędzy eksonami 1 a 2 może odpowiadać za kontrolowaną syntezę mRNA receptora EGFR.(160)

Receptor EGFR jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, składającym się z 1186 reszt aminokwasowych. Struktura tego białka posiada trzy funkcjonalne domeny: zewnątrzkomórkową wiążącą ligand, transbłonową kotwiczącą receptor w błonie komórkowej oraz domenę wewnątrzkomórkową stanowiącą miejsce efektorowe receptora kinazy tyrozynowej (rys. 46). Wystąpienie nieprawidłowości w poszczególnych wyżej wymienionych domenach będące efektem występowania mutacji w obrębie genów kodujących syntezę EGFR (rodzina *c-erbB*) powoduje powstawanie nieprawidłowych form EGFR.(162)



Rys. 46. Schematyczna budowa receptora czynnika wzrostu naskórka – EGFR.

Receptor EGFR należy do receptorów z rodziny ErbB, w obrębie której wyróżniono 4 receptory: ErbB-1/EGFR/HER-1, ErbB-2/HER-2, ErbB-3/HER-3, ErbB-4/HER-4. Agonistami dla tych receptorów jest ponad 3000 związków, a spośród nich największą liczbę stanowią czynniki i modulatory wzrostu. Receptor EGFR jest aktywowany głównie za pomocą czynnika wzrostu naskórka – EGF (ang. *epidermal growth factor*) oraz transformującego czynnika wzrostu α – TGF- α (ang. *transforming growth factor α*). Jedną z najważniejszych funkcji EGF jest pobudzenie fibroblastów do produkcji kolagenu, co ma duże znaczenie w gojeniu się naskórka. Z kolei główną rolą TGF- α jest indukcja nabłonków, pobudzenie proliferacji fibroblastów czy tworzenie naczyń krwionośnych. Przyłączenie się odpowiedniego liganda do domeny zewnątrzkomórkowej receptora uruchamia mechanizm będący ciągiem zdarzeń wewnątrzkomórkowych. Sygnał tego zdarzenia zależy od takich czynników jak rodzaj i stężenie liganda, rodzaj receptora oraz nasilenie jego ekspresji jak również od czasu trwania połączenia liganda z receptorem. Zatem receptory czynnika naskórkowego wzrostu pełnią bardzo ważne funkcje fizjologiczne. Niekiedy jednak dochodzi do zwiększenia ich ekspresji, czego konsekwencją jest niekontrolowany podział komórkowy, a dalej choroby nowotworowe. Jeden ligand może wiązać się z wieloma typami receptorów, z kolei jeden receptor może wiązać wiele ligandów. Zdecydowanie jest to zaletą w przypadku optymalizacji efektywności układu receptorowego, lecz tylko w zdrowych warunkach. Niestety, w przypadku procesów nowotworzenia, zablokowanie przekazywania sygnału w obliczu licznych ligandów komplikuje podejścia terapeutyczne w przeciwieństwie do scenariusza, gdy dany receptor łączył się tylko z jednym ligandem. Można by rzec, że z dzisiejszym zaawansowaniem nauki wyprodukowanie blokującego przeciwciała rozwiązałoby problem, niestety istnieje wiele innych uwarunkowań nadmiernej aktywności EGFR.

Wśród mutacji genu kodującego syntezę EGFR na specjalną uwagę zasługuje tak zwany wariant III mutacji EGFR(162), występujący w wielu chorobach nowotworowych. Są to mutacje punktowe lub niewielkie, składające się od kilku do kilkunastu nukleotydów delecje lub insercje w eksonach omawianego genu. Rodzaj mutacji determinuje strukturę i aktywność kinazy tyrozynowej. Substytucje wiążą się z mniejszymi zmianami, z kolei delecje czy insercje mogą zmienić większy fragment białka. Zmiany w eksonach powodują, że nie są one już zdolne do kodowania wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu, co wiąże się z ciągłym pobudzeniem kinazy tyrozynowej. Przykładowo u chorych na raka piersi, w wyniku delecji

801 par zasad występujących w eksonach 2-7 genu EGFR dochodzi do utraty aminokwasów z domeny zewnątrzkomórkowej receptora. Konsekwencją tego jest brak w strukturze receptora miejsca wiążącego ligand i ciągła aktywacja kinazy tyrozynowej EGFR bez konieczności przyłączenia liganda. Z kolei w przypadku chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), gdzie występowanie mutacji genu EGFR dotyczy około 10% chorych rasy kaukaskiej i około 30-40% chorych pochodzenia azjatyckiego, najczęściej diagnozowanymi mutacjami są delecja w eksonie 19 (45-50% wszystkich mutacji) oraz substytucja L858R w eksonie 21 (około 40-45% wszystkich mutacji). Mutacja w eksonie 21 polega na zmianie aminokwasu w pozycji 858 łańcucha białkowego z leucyny (L) na argininę (A). Mutacja ta jest wynikiem substytucji tyminy (T) do guaniny (G) w sekwencji kodującej i jest obiektem mojego zainteresowania, o czym wspominałam już we wprowadzeniu (str. 26).

Ze względu na fakt, że nadekspresja receptora EGFR występuje w większości komórek nowotworów złośliwych, badania nad pozyskaniem odpowiednich leków skupiają się nad związkami, które mogłyby wpływać na nadmierną aktywność EGFR. Jak dotąd opracowano dwie główne strategie terapeutyczne, pierwsza dotyczy inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT), druga, przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała monoklonalne blokują zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, w wyniku czego inne cząsteczki sygnałowe nie mogą wiązać się do tej domeny i aktywować kinazy tyrozynowej.(162) Stosując IKT osiągnięto duże sukcesy w leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Niestety, u większości pacjentów leczonych w ten sposób obserwuje się nabytą oporność na leki (gefitinib i erlotynib) w przeciągu 2 lat.

W związku z powyższym obserwuje się próby stworzenia nowych strategii terapeutycznych, które w przeciwieństwie do wcześniej stosowanych podejść działają na poziomie mRNA lub DNA, a nie białka. Jako przykład może posłużyć wykorzystanie modyfikowanych klasterem boru antysensowych oligonukleotydów DNA, dla których aktywność wyciszania translacji mRNA genu EGFR w zależności od miejsca wprowadzenia modyfikacji sięgała nawet 80%.(163) Pokazano, że również system CRISPR/Cas9 może być wykorzystany jako potencjalne narzędzie kliniczne do naprawy lub zniszczenia zmutowanego genu EGFR.(164) Jednak pomimo wykazania wysokiej skuteczności tych metod, badania nad IKT są nadal bardziej zaawansowane.

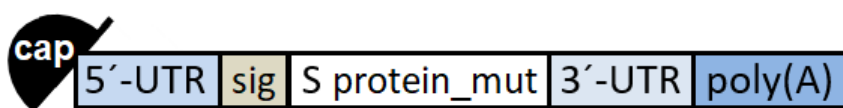
V. 9. Szczepionki mRNA przeciw COVID-19

Cały świat zмага się obecnie z pandemią COVID-19 wywołaną koronawirusem SARS-CoV-2. Badania nad bezpieczną i skuteczną szczepionką przeciw COVID-19 rozpoczęły się z chwilą opublikowania sekwencji nukleotydowej koronawirusa SARS-CoV-2 (11.01.2020 r.).(165) W efekcie intensywnych prac już kilka miesięcy od poznania sekwencji SARS-CoV-2 aż 47 szczepionek znalazło się w fazie badań klinicznych, a ponad 150 szczepionek było w fazie badań przedklinicznych. W chwili przygotowywania niniejszej rozprawy (luty 2021 r.) trzy szczepionki zostały dopuszczone do użytku w Unii Europejskiej: Pfizera/BioNTechu, Moderny oraz preparat wyprodukowany przez AstraZenecę. Szczepionki te używane są również w innych krajach, a Rosja, Chiny i Indie korzystają z preparatów własnej produkcji. Szczepionka Sputnik V, opracowana w Centrum Epidemiologii i Mikrobiologii im. Nikołaja Gamelei, została zarejestrowana w Rosji jako pierwsza na świecie.

Wyróżnić można trzy rodzaje szczepionek przeciw COVID-19: wektorowe, mRNA i rekombinowane. Szczepionki mRNA i wektorowe zawierają materiał genetyczny wirusa SARS-CoV-2, z którego w organizmie powstaje białko wirusowe. Z kolei szczepionka rekombinowana zawiera białko wirusa, nie ma zatem etapu jego produkcji przez organizm.(166) Wszystkie te szczepionki mają za zadanie wywołać pamięć immunologiczną, dzięki czemu przy ponownym kontakcie z patogenem wytworzone przeciwciała powinny uniemożliwić rozwój choroby. Do stycznia 2020 roku nie dopuszczono na świecie żadnej terapii wykorzystującej mRNA, jednak dzięki akceptacji szczepionek bazujących na mRNA i pokazaniu, że są one skuteczne i bezpieczne, otworzyły się nowe perspektywy zarówno dla innych szczepionek mRNA jak i dla zastosowań terapeutycznych.(167) Uznałam, że chociaż szczepionki nie są terapeutykami, to nie sposób je pominąć omawiając terapeutyczne kwasy nukleinowe, skoro dwie z nich wykorzystujące mRNA wirusa (*Pfizer/Biontech, Moderna*) zostały już dopuszczone do użytku. W najbliższym czasie przełoży się to z pewnością na postępy w leczeniu chorób innych niż COVID-19.

W szczepionkach wykorzystujących kwas rybonukleinowy znajduje się fragment mRNA, który zawiera informację o syntezie białka kolca (tzw. białko S; *Spike*) koronawirusa SARS-CoV-2 odpowiadającego za rozpoznanie komórki gospodarza oraz inicjujące proces zakażenia. Z dostępnych informacji wiadomo (<https://berthub.eu/articles/11889.doc>), że mRNA zawarty w szczepionce

BioNTechu/Pfizera (znanej również jako *BNT162b2* lub *Tozinameran* lub *Comirnaty*) ma długość 4284 reszt (schemat jego budowy przedstawiony jest na rysunku 47).

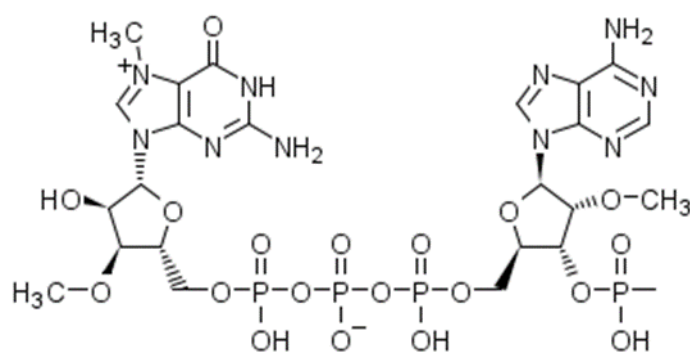


Rys. 47. Schemat mRNA zawartego w szczepionce przeciw COVID-19: **5'-UTR** - rejon mRNA niepodlegający translacji, **sig** - sekwencja sygnałowa glikoproteiny S; **S protein_mut** - region kodujący białko zawierający mutacje K986P and V987P; **poly(A)** - ogon poli(A)

Twórcy szczepionki zastosowali kilka zabiegów inżynierii genetycznej mających na celu poprawienie jej trwałości jak i usprawnienie procesu produkcji powstającego białka. Jednym z tych zabiegów zwiększających trwałość cząsteczki mRNA oraz jej ochronę przed zniszczeniem ze strony układu odpornościowego organizmu było zastąpienie wszystkich reszt urydyny przez 1-metylo-pseudourydynę.

Poniżej wymienione są informacje, do których miałam dostęp, dotyczące innych modyfikacji wprowadzonych do mRNA zawartego w szczepionce BioNTechu /Pfizera.

- Czapeczka (cap) składa się z dwóch modyfikowanych nukleozydów, m^7G i A (rys. 48). Jej rolą jest stabilizacja cząsteczki mRNA i inicjowanie syntezy białka kolca zakodowanego w mRNA.

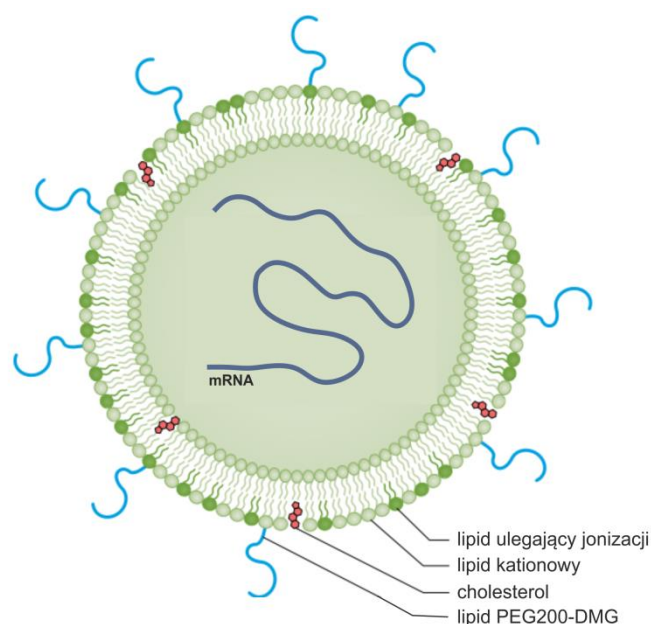


Rys. 48. Wzór strukturalny czapeczki na końcu 5' mRNA. Cap G^1A^2 : $m^7G^+m3'-5'-ppp-5'-Am2'-3'-p-$ ($m7 = 7-CH_3$; $m3' = 3'-O-CH_3$; $m2' = 2'-O-CH_3$; $-ppp = -PO_2H-O-PO_2H-O-PO_2H-$; $-p = -PO_2H$).

- Region 5'-UTR jest zbudowany z 51 nukleotydów. Twórcy szczepionki wykorzystali zoptymalizowany 5'-UTR z mRNA kodującego alfa globulinę. Białko to powstaje w komórkach szybko i w dużej ilości, dzięki czemu szczepionkowe mRNA może wyprodukować więcej białka S w krótkim czasie.

- Sekwencja sygnałowa informuje o tym, gdzie w komórce ma być skierowane wyprodukowane białko. W tej części mRNA jedyną modyfikacją w stosunku do sekwencji wirusa SARS-CoV-2 jest wykorzystanie kodonów synonimicznych (kodują ten sam aminokwas) w celu usprawnienia i przyspieszenia syntezy białka kolca.
- Właściwy region kodujący białko S zbudowany jest z 3777 zasad. Tutaj również, z dwoma wyjątkami, wprowadzono zmiany synonimiczne. Dwa kodony (K986P i V987) zostały zmienione na niesynonimiczne, w efekcie czego w miejsce dwóch aminokwasów wirusowego białka S (lizyny i waliny), w szczepionkowym białku S wbudowana jest prolina. Te dwie zmiany znacznie zwiększają skuteczność szczepionki, gdyż jak opisano w 2017 roku, umieszczenie podwójnej substytucji proliny we właściwym miejscu sprawia, że białka SARS-CoV-1 i MERS S przyjmują konformację „sprzed fuzji”, co pozwala odtworzyć kształt białka kolca, dokładnie taki jaki przyjmuje ono, gdy jest wbudowane do otoczki wirusa.(168)
- Region 3'-UTR został zaczerpnięty z mitochondrialnego 12S rRNA w celu ustabilizowania RNA i zwiększenia całkowitej ekspresji białka.
- Na sekwencję ogona poli(A) składa się 110 reszt nukleotydowych. Pierwsze 30 reszt adenozyiny połączonych jest złożonym z 10 nukleotydów (GCAUAUGACU) łącznikiem drugim fragmentem zawierającym kolejne 70 reszt adenozyiny. Rola wprowadzenia tego łącznika nie została przez twórców wyjaśniona.

Materiał genetyczny białka kolca, zmodyfikowany w opisany powyżej sposób, jest następnie kapsułowany w nanocząstkach lipidowych, które chronią mRNA przed degradacją. Te lipidowe nanocząstki pokazane schematycznie na rysunku 49 składają się z czterech lipidów: ulegającemu jonizacji lipidu SM-102, czyli 8-((2-hydroksyetylo)(6-okso-6-(undecyloksy)heksylo)amino)oktanianu heptadekan-9-yłu, cholesterolu, 1,2-distearoilosn-glicero-3-fosfocholiny (DSPC) oraz PEG2000-DMG, czyli 1-monometoksypolietylenoglikolo-2,3-dimirystyloglicerolu, w którym reszta glikolu polietylenowego ma średnią masę cząsteczkową 2000 Da.(169)



Rys. 49. Schemat przedstawiający kapsułowany materiał genetyczny białka kolca.

Z dostępnych materiałów wynika, że najistotniejszą różnicą pomiędzy szczepionkami firm *Pfizer/BioNTech* i *Moderna* są lipidy stanowiące osłonę dla mRNA. W przypadku szczepionki *Moderna* odpowiedni dobór lipidów pozwala na przechowywanie jej w wyższych temperaturach niż jest to w przypadku szczepionki *Pfizer/BioNTech*.

Obecny sukces szczepionek mRNA otwiera perspektywy wykorzystania RNA do innych zastosowań terapeutycznych, nad którymi badania prowadzone są już od wielu lat. Wymienić tu można propozycję terapii bazujących na mRNA do leczenia rzadkich chorób genetycznych, takich jak mukowiscydoza czy fenyloketonuria, a więc chorób, w których jedno z białek produkowane jest z defektem. Ponadto inne doniesienia wskazują, że mRNA można potencjalnie zastosować w regeneracji mięśnia sercowego osób po zawale czy w terapii rdzeniowego zaniku mięśni.

VI. WYNIKI

VI. 1. Badania strukturalne modelowych układów CCC/G^T i CCC/U^T

Głównym celem mojej rozprawy było zaprojektowanie i otrzymanie cząsteczek bogatych w reszty guanozyny, nazywanych dalej „dwufunkcyjnymi oligonukleotydami - DQ”, które po hybrydyzacji z oligorybonukleotydami docelowymi, różniącymi się tylko jedną resztą nukleotydową w regionie bogatym w reszty guanozyny, tworzyłyby różne struktury drugorzędowe. Nici oligonukleotydowe hybrydujące z sekwencjami docelowymi w dalszej części rozprawy nazywane są także oligonukleotydami antysensowymi.

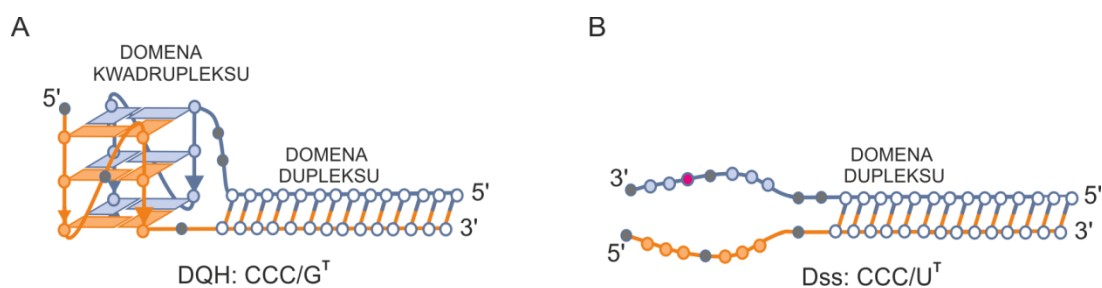
Jak wspominałam w części **WPROWADZENIE** zakładałam, że uda mi się otrzymać struktury typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**) i dupleks z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**), które różnić się będą stabilnością termiczną. Moje badania rozpoczęłam od zaprojektowania i otrzymania trzech modelowych oligorybonukleotydów. Jako oligonukleotyd antysensowy otrzymałam oligorybonukleotyd o długości 23 reszt:



oraz dwa częściowo komplementarne do niego oligorybonukleotydy docelowe o sekwencjach różniących się jedną resztą nukleotydową we fragmencie bogatym w reszty guanozyny:



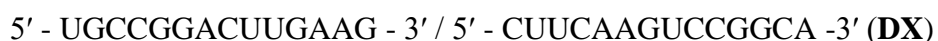
W dalszej części rozprawy dla struktur powstających po połączeniu oligorybonukleotydów docelowych G^T lub U^T z cząsteczką antysensową CCC stosuję oznaczenia odpowiednio CCC/G^T i CCC/U^T (rys. 50).



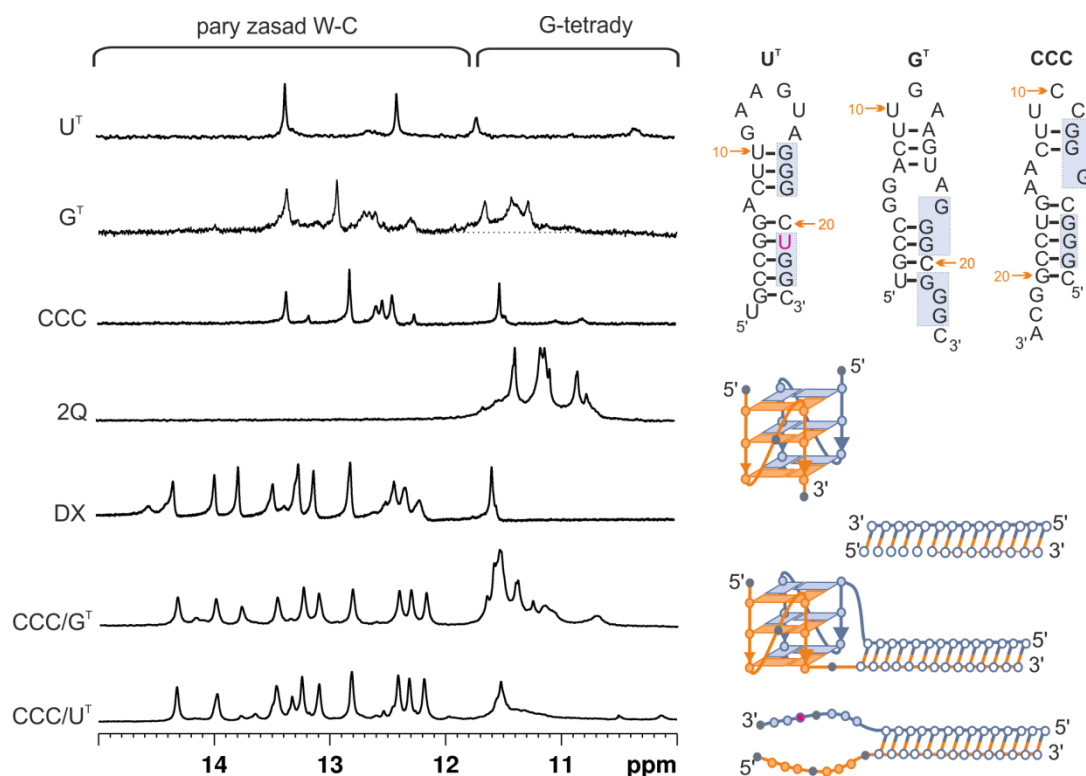
Rys. 50. Schematyczne przedstawienie struktur drugorzędowych cząsteczek CCC/G^T (A) i CCC/U^T (B).

Dla uniknięcia w tekście licznych powtórzeń przyjęłam zasadę, że warunki roztworu, w których były prowadzone poszczególne eksperymenty nazywam dalej skrótowo **buforem potasowym** lub **K⁺** (50 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6.8, 0.1 mM EDTA) lub **buforem sodowym** lub **Na⁺** (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.8, 0.1 mM EDTA). Dodatkowo, jeśli temperatura pomiaru nie jest podana, oznacza to, że dany eksperyment został wykonany w 25 °C.

Aby uzyskać informacje o strukturze drugorzędowej badanych cząsteczek wykonałam serię widm jądrowego rezonansu magnetycznego. Na rysunku 51 zestawione są widma ¹H NMR wykonane w buforze potasowym dla pojedynczych nici **CCC**, **G^T** i **U^T** oraz dla cząsteczek otrzymanych po połączeniu nici **CCC** odpowiednio z niemi **G^T** (**CCC/G^T**) i **U^T** (**CCC/U^T**). Dla porównania zamieszczone jest dodatkowo widmo dupleksu (**DX**) o sekwencji odpowiadającej wspólnemu, komplementarnemu fragmentowi obu cząsteczek, **CCC/G^T** i **CCC/U^T**, wykonane w tych samych warunkach roztworu:



Pokazane jest także widmo cząsteczki o sekwencji 5'-CGGGCGGGC-3', która w buforze potasowym tworzy kwadrupleks (**2Q**), odpowiadający domenie kwadrupleksu struktury **CCC/G^T**. Dla uproszczenia zamieściłam tylko te fragmenty widm, w których występują protony iminowe zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka lub Hoogstena, stanowiące swoisty „odcisk palca” dupleksów i kwadrupleksów. Przy każdym z widm zamieściłam schemat proponowanej lub przewidzianej przez *RNAstructure* struktury drugorzędowej.



Rys. 51. Widma ^1H NMR cząsteczek U^{T} , G^{T} , CCC , 2Q , DX , CCC/G^{T} oraz CCC/U^{T} zarejestrowane w buforze potasowym. Z prawej strony widm zaproponowane są dla poszczególnych cząsteczek ich struktury drugorzędowe.

W widmie pojedynczych nici (U^{T} , G^{T} i CCC) w rejonie 11.5 - 15 ppm widoczne są głównie sygnały pochodzące od par zasad Watsona-Cricka. Dla cząsteczki U^{T} liczba obserwowanych sygnałów pochodzących od protonów iminowych jest mniejsza niż można by oczekiwać dla przewidzianej struktury spinki. Wynika to prawdopodobnie stąd, że sygnały pochodzące od protonów iminowych terminalnych par zasad nie są na ogół obserwowane, a obecność w strukturze spinki trzech niekanonicznych par G:U może dodatkowo przyczyniać się do zwiększonej wymiany z wodą protonów sąsiadujących z nimi par G:C. W przypadku cząsteczki G^{T} widoczne są dodatkowo bardzo szerokie sygnały w rejonie 10.5-12.0 ppm, co sugerowało, że oprócz struktury spinki w roztworze może istnieć niewielka frakcja kwadrupleksu (rozdział V. 6. 1; *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego*).

W widmie dupleksu (DX) sygnały występujące w zakresie 11.5 - 15 ppm odpowiadają protonom iminowym pochodzącym od par zasad Watsona-Cricka. W widmie cząsteczki 2Q obecność sygnałów w zakresie 10.5 - 12 ppm jest charakterystyczna dla protonów iminowych reszt guanozyny zaangażowanych w tworzenie G-tetrad. Ponieważ z widm NMR nie można było jednoznacznie określić liczby nici tworzących kwadrupleks

2Q, jego cząsteczkowość została ustalona za pomocą analizy profilu migracji w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, przedstawionej w dalszej części tego rozdziału na rysunku 52 B. Okazało się, że powstający kwadrupleks jest dwucząsteczkowy $(CGGGCGGGC)_2$ i stanowi dobre odniesienie jako domena kwadrupleksu w strukturze hybrydy. Z kolei widmo cząsteczki CCC/G^T zawiera sygnały zarówno w regionie typowym dla par zasad Watsona-Cricka jak i w regionie, w którym występują protony zaangażowane w parowanie zasad na sposób Hoogstena. Porównując widmo cząsteczki CCC/G^T z widmami dupleksu **DX** i kwadrupleksu **2Q** wyraźnie widać, że jest ono sumą poszczególnych widm. Oznaczało to, że zaprojektowana przeze mnie cząsteczka CCC/G^T przyjmuje oczekiwaną strukturę hybrydy typu dupleks-kwadrupleks.

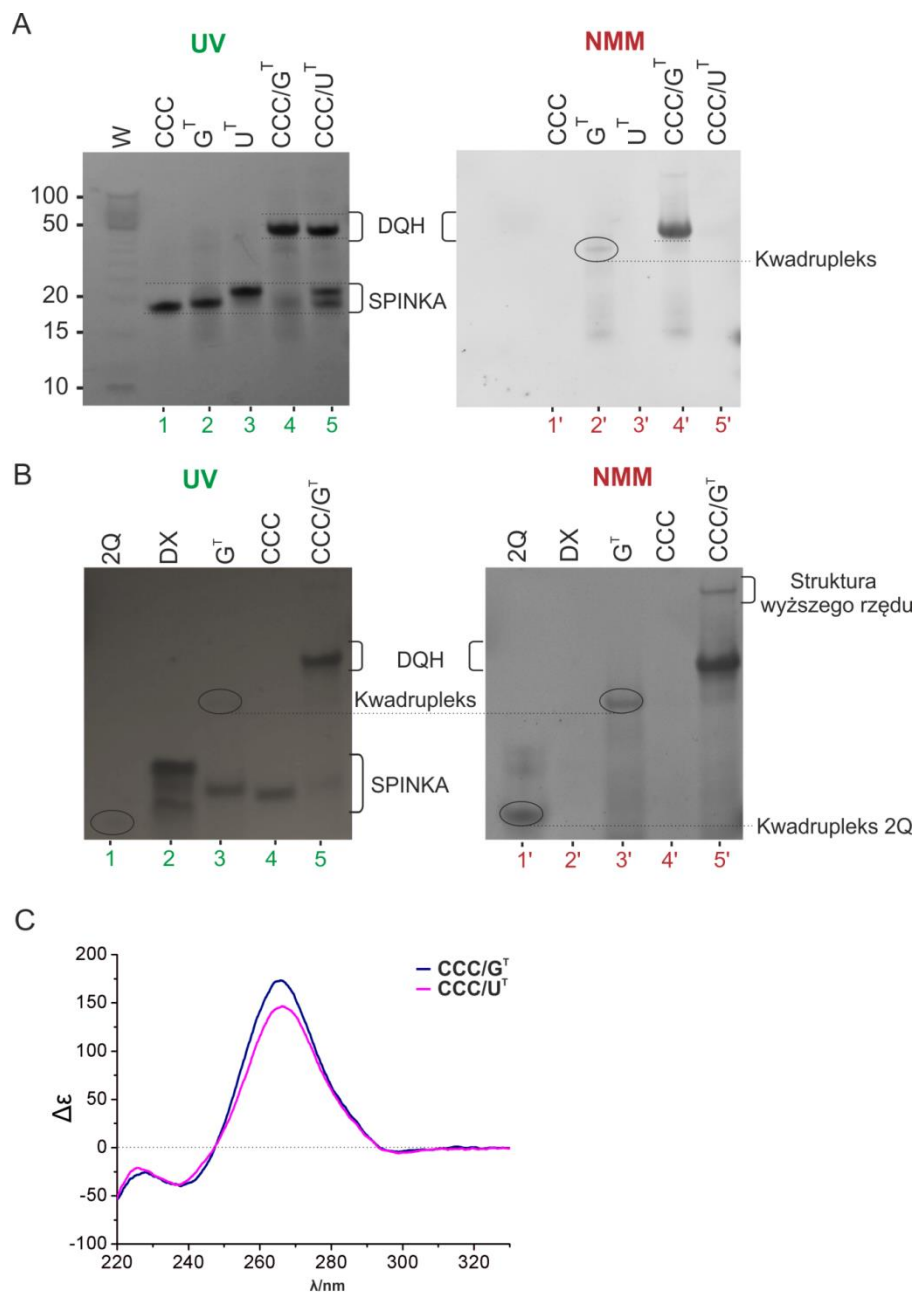
W widmie drugiej z interesujących mnie cząsteczek, CCC/U^T , widoczne są jedynie sygnały pochodzące od protonów iminowych par Watsona-Cricka i jest ono bardzo podobne do tego zarejestrowanego dla dupleksu referencyjnego (**DX**). Wynik ten wskazywał, że w warunkach NMR hybrydyzacja nici CCC i U^T prowadzi do zawiązania się dupleksu w części, gdzie obie nici są komplementarne, natomiast fragment obu nici bogaty w reszty guanozyny pozostaje nieuporządkowany.

Jedną z wad spektroskopii NMR w badaniach biomolekuł jest mała czułość metody, co skutkuje koniecznością stosowania dużych stężeń badanych związków. Wymagane stężenia są zazwyczaj rzędu jednego do kilku milimoli, co znacznie odbiega od stężeń fizjologicznych.⁽¹⁷⁰⁾ Wymagane stężenia różnią się również w zależności od typu eksperymentu. Dla jednowymiarowych widm 1H NMR stosowane stężenia mogą być dużo niższe niż te wymagane dla otrzymania dobrej jakości widm dwuwymiarowych. Spektrometr 700 MHz znajdujący się w Pracowni NMR IChB PAN zaopatrzony jest w głowicę kriogeniczną, dzięki której uzyskuje się czterokrotną poprawę stosunku sygnału do szumu. Dlatego też, wykorzystując sondę kriogeniczną dla moich eksperymentów 1H NMR mogłam stosować stężenia rzędu 0.1 - 0.2 mM. Stosowanie tak małych stężeń powodowało, że rejestracja widm 1H NMR trwająca zwykle kilka sekund lub minut zajmowała zazwyczaj kilka godzin. Zdając sobie sprawę, że struktura badanych przeze mnie związków może się różnić w zależności od warunków roztworu^(74, 79), w następnym etapie postanowiłam sprawdzić, czy wyniki, które uzyskałam z analizy widm NMR będą spójne z tymi otrzymanymi z innych metod eksperymentalnych.

Moje badania kontynuowałam wykorzystując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych. Eksperyment ten, podobnie jak widma NMR, wykonałam w buforze zawierającym 50 mM KCl. Na rysunku 52 porównana jest

migracja pojedynczych nici **CCC** (pasmo **1**), **G^T** (pasmo **2**), **U^T** (pasmo **3**) oraz cząsteczek **CCC/G^T** (pasmo **4**), **CCC/U^T** (pasmo **5**). Szybkość migracji badanych związków porównywałam z markerem mas, czyli drabinką dwuniciowych oligonukleotydów DNA w zakresie 10-100 par zasad (pasmo **W**). Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego żel wizualizowałam najpierw w świetle UV (254 nm), a następnie w celu uwidocznienia oraz identyfikacji prążków odpowiadających kwadrupleksom, żel poddałam barwieniu ligandem NMM selektywnym względem równoległych kwadrupleksów (roztwór 0.1 µg/ml) (rozdział 6. 2. 1). Najszybciej migrujące prążki pochodzące od oligonukleotydów **CCC** (**1**), **G^T** (**2**) oraz **U^T** (**3**) odpowiadają pojedynczym niciom. W pasmach **4** i **5** widoczne są intensywne prążki migrujące porównywalnie do prążka markera mas wielkości 50 par zasad, co potwierdziło tworzenie się struktur dwucząsteczkowych, **CCC/G^T** i **CCC/U^T**. Dodatkowo w pasmach **4** i **5** można zaobserwować dużo słabsze prążki pochodzące od niezasocjowanych pojedynczych nici. Eksperyment ten powtarzałam wielokrotnie i każdorazowo otrzymywałam taki sam wynik, a prążki od pojedynczych nici zawsze były intensywniejsze dla **CCC/U^T** niż dla **CCC/G^T**.

Po wybarwieniu żelu w roztworze zawierającym NMM intensywny prążek widoczny był tylko dla cząsteczki **CCC/G^T** (rys. 52 A, pasmo **4'**). Rezultat ten jest zgodny z wynikami z eksperymentu NMR, gdzie na podstawie analizy widm ¹H NMR postulowałam, że cząsteczka **CCC/G^T** przyjmuje strukturę hybrydową typu dupleks-kwadrupleks. Dodatkowo fakt, że ligand NMM wiązał się do **CCC/G^T** wskazywał na równoległą topologię kwadrupleksu, czego można było oczekiwać, gdyż jest to topologia typowa dla kwadrupleksów RNA. Topologię tę potwierdziłam również za pomocą widma dichroizmu kołowego, gdzie obserwowałam charakterystyczne dodatnie pasmo przy ~ 265 nm i ujemne przy 240 nm. Widmo CD dla cząsteczki **CCC/U^T** różniło się tylko intensywnością pasma przy ~265 nm (rys. 52 C). Ligand NMM nie wiązał się do **CCC/U^T** (rys. 52 A, pasmo **5'**), co również było zgodne z wcześniejszymi wynikami, które pokazywały, że cząsteczka przyjmuje strukturę dupleksu z nieuporządkowanymi końcami. Na rysunku 52 B pokazany jest wspomniany wcześniej eksperyment potwierdzający dwucząsteczkową budowę kwadrupleksu **2Q**. Odpowiadający mu prążek migruje bardzo szybko, co wyklucza czterocząsteczkową budowę kwadrupleksu. Dodatkowo prążek ten wybarwia się w NMM. Ani dupleks (**DX**) ani pojedyncza nić **CCC** nie wiąże NMM, co widać z żelu pokazanym na rysunku 52 B.

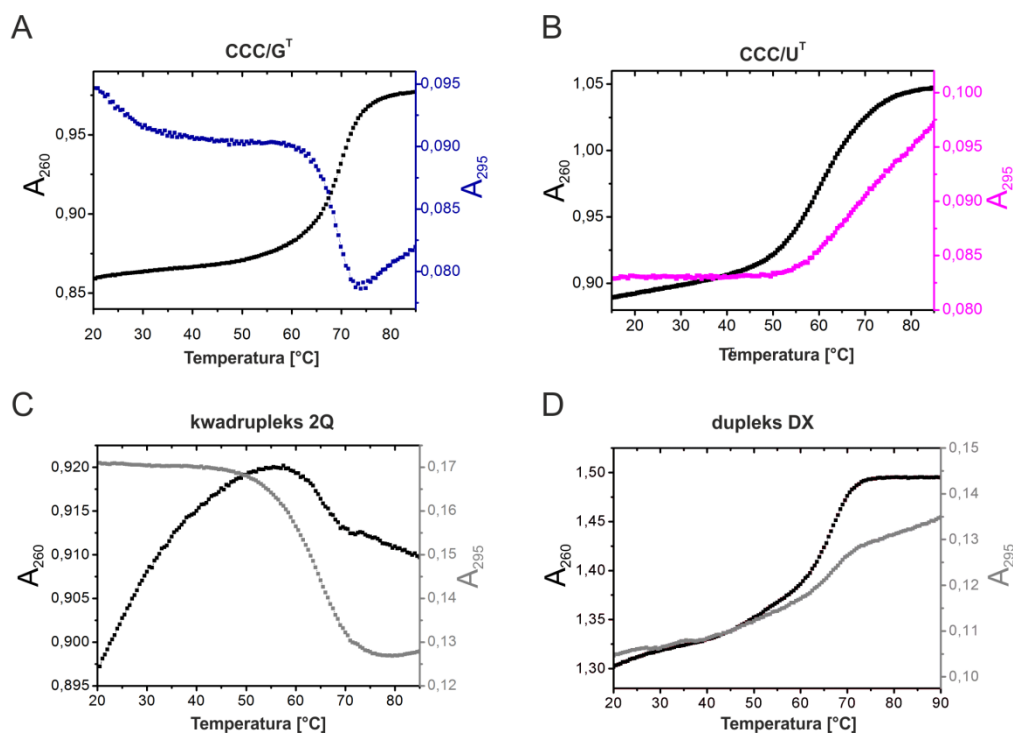


Rys. 52. Porównanie profili migracji cząstek RNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV oraz wybarwionym za pomocą NMM. Profile migracji cząstek CCC, G^T, U^T, CCC/G^T, CCC/U^T (A) oraz cząstek odpowiadającym segmentom dupleksu (DX) i kwadrupleksu (2Q) w odniesieniu do G^T, CCC, CCC/G^T (B). Widma CD cząstek CCC/G^T, CCC/U^T (C). Eksperymenty wykonano w buforze potasowym.

W kolejnym kroku postanowiłam zbadać stabilność termiczną badanych związków wykorzystując w tym celu spektroskopię UV. Wszystkie widma UV rejestrowałam przy dwóch długościach fali 260 oraz 295 nm (rozdział V. 6. 1; *Spektroskopia UV*). Jak już wcześniej wspomniałam, dla kwasów nukleinowych pomiar temperatury topnienia wykonuje się standardowo przy długości fali 240 lub 260 nm, gdyż w tym zakresie

absorbancja jest maksymalna. Natomiast w przypadku kwadrupleksów, pomiędzy 220 a 280 nm obserwuje się wzrost absorbancji wraz ze wzrostem temperatury, a przy 295 nm spadek absorbancji. W rzeczywistości próba wyznaczenia w przypadku kwadrupleksów temperatury topnienia i parametrów termodynamicznych przy 260 nm może prowadzić do niejednoznacznych wyników, gdyż podczas denaturacji/renaturacji kwadrupleksu zmiana absorbancji jest niewielka. Dlatego też dla kwadrupleksów temperaturę topnienia wyznacza się przy długości fali 295 nm. Dodatkowo analiza profili topnienia zarejestrowanych przy dwóch długościach fali może służyć potwierdzeniu lub wykluczeniu przebiegu topnienia według modelu dwustanowego. W topnieniu dwustanowym, niezależnie od długości fali, wartość T_m musi być porównywalna, a wszelkie odchylenia od tej wartości $>15\%$ są dowodem na obecność bardziej złożonego procesu renaturacji/denaturacji.

Na rysunku 53 A-B pokazane są krzywe topnienia dla CCC/G^T i CCC/U^T zarejestrowane przy obu długościach fali (260 i 295 nm) a na rysunku 53 C-D dla dupleksu DX i kwadrupleksu $2Q$.



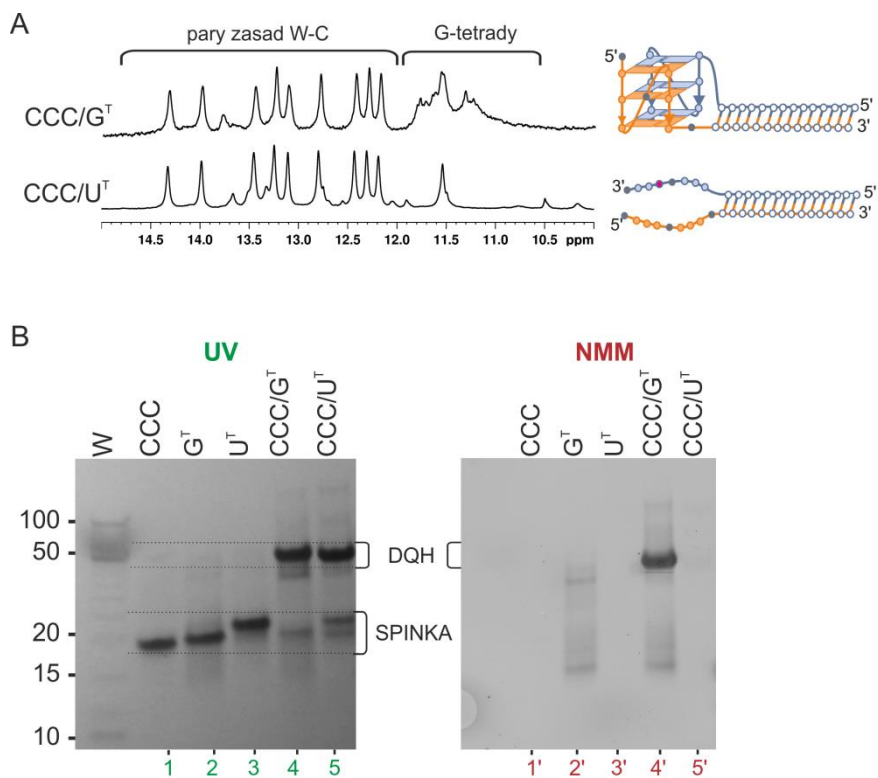
Rys. 53. Krzywe topnienia przy długościach fali 260 nm i 295 nm dla cząsteczek CCC/G^T (A), CCC/U^T (B), kwadrupleksu $2Q$ (C) oraz dupleksu DX (D). Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

Dla CCC/G^T temperatura topnienia wyznaczona przy 260 nm wynosiła 69.4 °C, a przy 295 nm - 68.8 °C. Niezależnie od długości fali, przy której wykonałam pomiar,

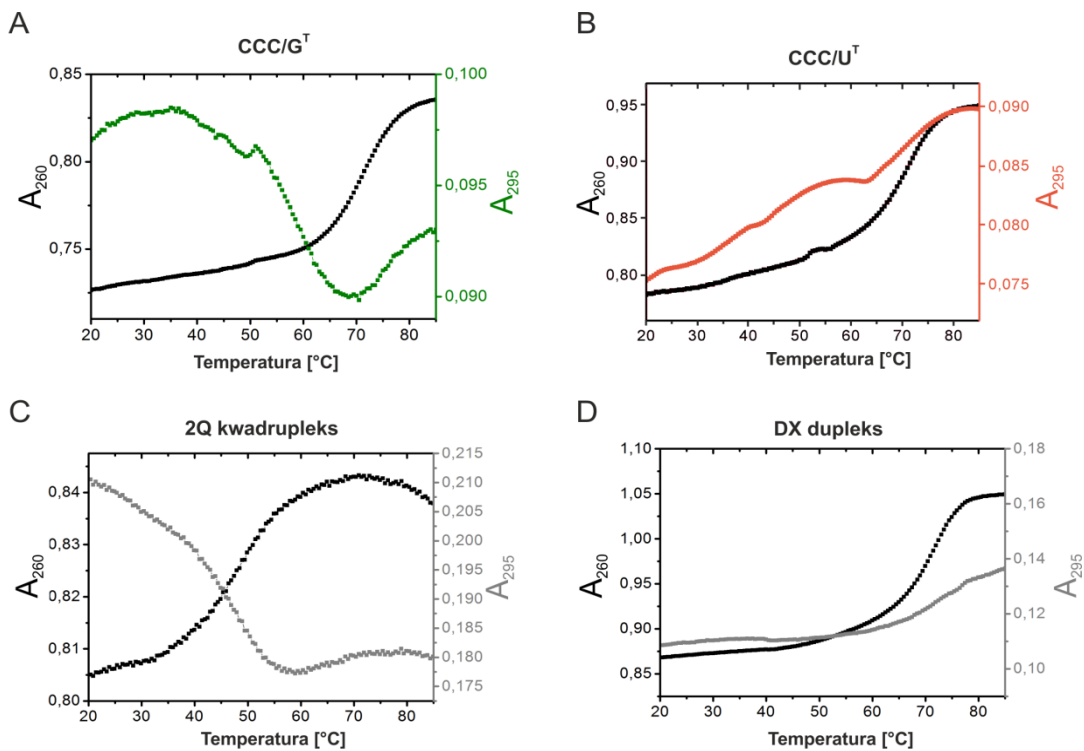
trwałość termiczna hybrydy **CCC/G^T** jest większa niż jej poszczególnych elementów, dupleksu (64.4 °C, wartość wyznaczona z krzywej przy 260 nm) (rys. 53 D) i kwadrupleksu (65.5 °C, wartość wyznaczona przy 295 nm) (rys. 53 C). Dla typowych kwadrupleksów krzywa topnienia przy długości fali 295 nm powinna mieć kształt „odwróconej” sigmoidy, jak widać to na widmie otrzymanym dla cząsteczki **2Q**. Jednak dla cząsteczki **CCC/G^T** kształt ten jest nietypowy, szczególnie w wysokich temperaturach obserwowałam ponowny wzrost absorbancji. Może to być wynikiem nakładania się dwóch efektów - jednoczesnego topienia się domeny dupleksu i kwadrupleksu, co przejawia się wzrostem absorbancji dla dupleksu i zmniejszeniem wartości absorbancji dla kwadrupleksu wraz ze wzrostem temperatury. Podobny kształt krzywej topnienia przy 295 nm obserwowano w literaturze dla będącego w równowadze układu spinka-kwadrupleks, jednak zjawisko to nie było dyskutowane.(171) W przypadku badanych przeze mnie struktur hybrydowych efekt ten utrudniał jednoznaczne wyznaczenie temperatury topnienia. W dalszej części mojej pracy w celu wyznaczenia temperatury topnienia odczyty prowadziłam przy długości fali 260 nm, a analiza przy 295 nm służyła mi jedynie do potwierdzenia obecności domeny kwadrupleksu lub jej braku (z wyjątkiem krzywej dla cząsteczki **2Q**). Mając na uwadze fakt, iż dla struktur dwucząsteczkowych wartość temperatury topnienia zależna jest od stężenia, wszystkie pomiary prowadziłam dla porównywalnych stężeń.

Dla **CCC/U^T**, brak odwróconego profilu topnienia przy 295 nm potwierdzał wcześniejsze obserwacje z widm NMR i analizy żeli, które wskazywały, że w przypadku tej cząsteczki nie zawiązuje się domena kwadrupleksu. Temperatura topnienia wyznaczona przy długości fali 260 nm wynosiła 61.0 °C i była niższa o 8.4 °C od tej wyznaczonej dla hybrydy **CCC/G^T**, co pokazywało, że obecność kwadrupleksu stabilizuje strukturę hybrydy **DQH** (rys. 53 A, tabela 2). Porównanie temperatury topnienia dla **CCC/U^T** z wartościami T_m dla cząsteczek referencyjnych, dupleksu **DX** ($T_m=64.4$ °C) (rys. 53 D) i kwadrupleksu **2Q** ($T_m=65.5$ °C) (rys. 53 C) pokazało, że obecność długich, nieuporządkowanych końców w strukturze **CCC/U^T** może destabilizować domenę dupleksu.

Równoległe do opisanych w tym rozdziale eksperymentów (¹H NMR, elektroforeza w warunkach natywnych, widma UV), które były prowadzone w obecności kationów potasu (60 mM), analogiczne badania wykonywałam w roztworze zawierającym kationy sodu (160 mM). Wyniki tych eksperymentów pokazane są na rysunkach 54 i 55.



Rys. 54. Widma ^1H NMR dla CCC/G^{T} oraz CCC/U^{T} (A). Profile migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV oraz wybarwionym w roztworze NMM (B). Eksperymenty prowadzono w buforze sodowym.



Rys. 55 Krzywe topnienia zarejestrowane przy długościach fali 260 nm i 295 nm dla cząsteczek CCC/G^{T} (A), CCC/U^{T} (B), kwadrupleksu **2Q** (C) oraz dupleksu **DX** (D). Eksperymenty prowadzono w buforze sodowym.

Porównując trwałość termiczną badanych cząsteczek w obecności kationów sodu i potasu w niektórych przypadkach zauważyłam duże różnice. Na przykład wyznaczone przeze mnie wartości T_m dla cząsteczki CCC/ U^T wynoszą 70.5 °C i 61.0 °C odpowiednio w obecności kationów Na^+ i K^+ a dla hybrydy CCC/ G^T wartości te wynoszą 71.0 °C (Na^+) i 69.4 °C (K^+). Duże różnice w stabilności termicznej, zależne od warunków roztworu, otrzymałam także dla cząsteczek referencyjnych, dupleksu **DX** oraz kwadrupleksu **2Q**. W tym przypadku wzrost T_m zaobserwowałam dla dupleksu, 71.6 °C (Na^+) *versus* 64.4 °C (K^+), natomiast dla kwadrupleksu efekt ten był odwrotny – dużo mniej stabilny kwadrupleks tworzył się w buforze sodowym, 48.6 °C (Na^+) *versus* 65.5 °C (K^+). Sprawdziłam, że za obserwowaną różnicę w trwałości termicznej w przypadku CCC/ U^T odpowiedzialna jest częściowo siła jonowa użytych buforów (160 mM Na^+ *versus* 60 mM K^+). Gdy do roztworu zawierającego 60 mM K^+ dodałam dodatkowo 100 mM LiCl, temperatura topnienia wyznaczona dla CCC/ U^T wzrosła o 11.5 °C (72.5°C). W takich samych warunkach (60 mM K^+ + 100 mM Li⁺) T_m wyznaczona dla CCC/ G^T wzrosła o 2.6 °C (72.0 °C).

VI. 2. Badania struktury drugorzędowej układów DNA-CCC/ G^T i DNA-CCC/ U^T

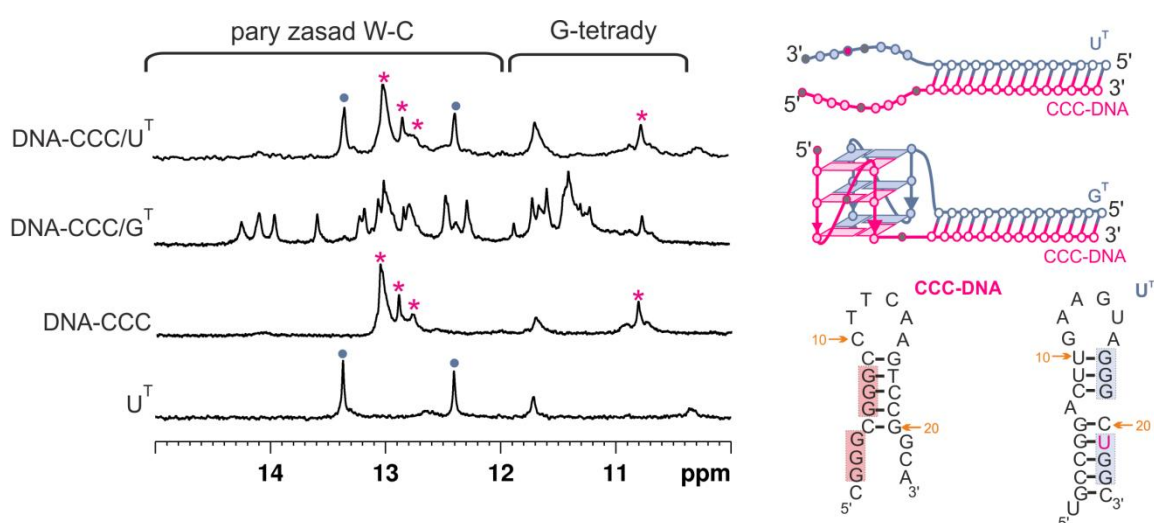
Z danych literaturowych wiadomo, że dupleksy i kwadrupleksy RNA są stabilniejsze niż ich odpowiedniki DNA:RNA, heterodupleksy oraz heterokwadrupleksy.(17, 18, 172) Jak już wspominałam w rozdziale *Struktury hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks* (V. 3.), poza jednym znanym przypadkiem, kwadrupleksy RNA są zawsze równoległe, jednak nadal niewiele wiadomo na temat preferencji strukturalnych heterokwadrupleksów DNA:RNA. Wydaje się, że również w przypadku heterokwadrupleksów DNA:RNA preferowana jest topologia równoległa, jednak z uwagi na niewielką liczbę danych eksperymentalnych każdy z nowo rozpatrywanych układów należy analizować indywidualnie.

Doniesienia literaturowe wskazują również, że stabilność struktur drugorzędowych utworzonych pomiędzy matrycą mRNA a nicią antysensową ma wpływ na efektywność hamowania różnych procesów biologicznych, np. odwrotnej transkrypcji.(15) Dlatego też planując wykorzystanie oligonukleotydów antysensowych w serii RNA, spodziewałam się otrzymać efektywniejsze narzędzie do hamowania translacji, niż gdybym stosowała ich odpowiedniki w serii DNA. Następnym etapem moich badań było więc porównanie właściwości hybrydowych struktur typu dupleks-kwadrupleks w serii DNA:RNA i

RNA:RNA. W tym celu otrzymałam odpowiednik dwufunkcyjnego oligorybonukleotydu CCC w serii DNA, **DNA-CCC**:



Aby poznać ewentualne różnice i podobieństwa pomiędzy właściwościami cząsteczek **DNA-CCC/G^T** i **DNA-CCC/U^T** oraz ich odpowiednikami w serii RNA, **CCC/G^T** i **CCC/U^T**, przeprowadziłam serię eksperymentów. Podobnie jak uprzednio, dla badanych heterokompleksów zarejestrowałam serię widm ¹H NMR, porównałam ich migrację w warunkach natywnych w żelu poliakrylamidowym oraz wyznaczyłam temperatury topnienia metodą UV w obecności jonów potasu (rys. 56-58, tabela 2).

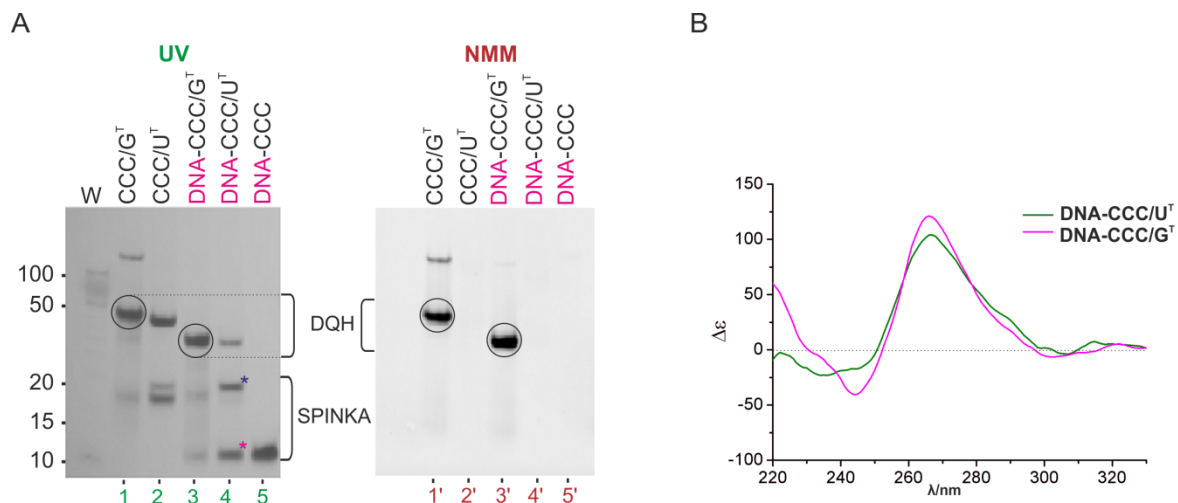


Rys. 56. Widma ¹H NMR dla **DNA-CCC/U^T**, **DNA-CCC/G^T**, **DNA-CCC**, oraz **U^T** zarejestrowane w buforze potasowym. Obok widm proponowane są dla poszczególnych cząsteczek ich struktury drugorzędowe.

Na rysunku 56 zestawione są widma ¹H NMR dwóch heterokompleksów DNA/RNA, **DNA-CCC/U^T** i **DNA-CCC/G^T** oraz pojedynczych nici, **DNA-CCC** i **U^T**. W widmie cząsteczki **DNA-CCC/G^T** widoczne są sygnały w regionie typowym dla dupleksu (11.5-15 ppm) oraz kwadrupleksu (10.5-12 ppm), co wskazywało na zawiązywanie się struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks. Specjalnego omówienia wymaga natomiast widmo cząsteczki **DNA-CCC/U^T**, które różni się od widma **DNA-CCC/G^T** nie tylko brakiem sygnałów w rejonie 10.5-12 ppm, ale również brakiem sygnałów, które świadczyłyby o zawiązywaniu się dupleksu. W widmach pojedynczych nici, **DNA-CCC**

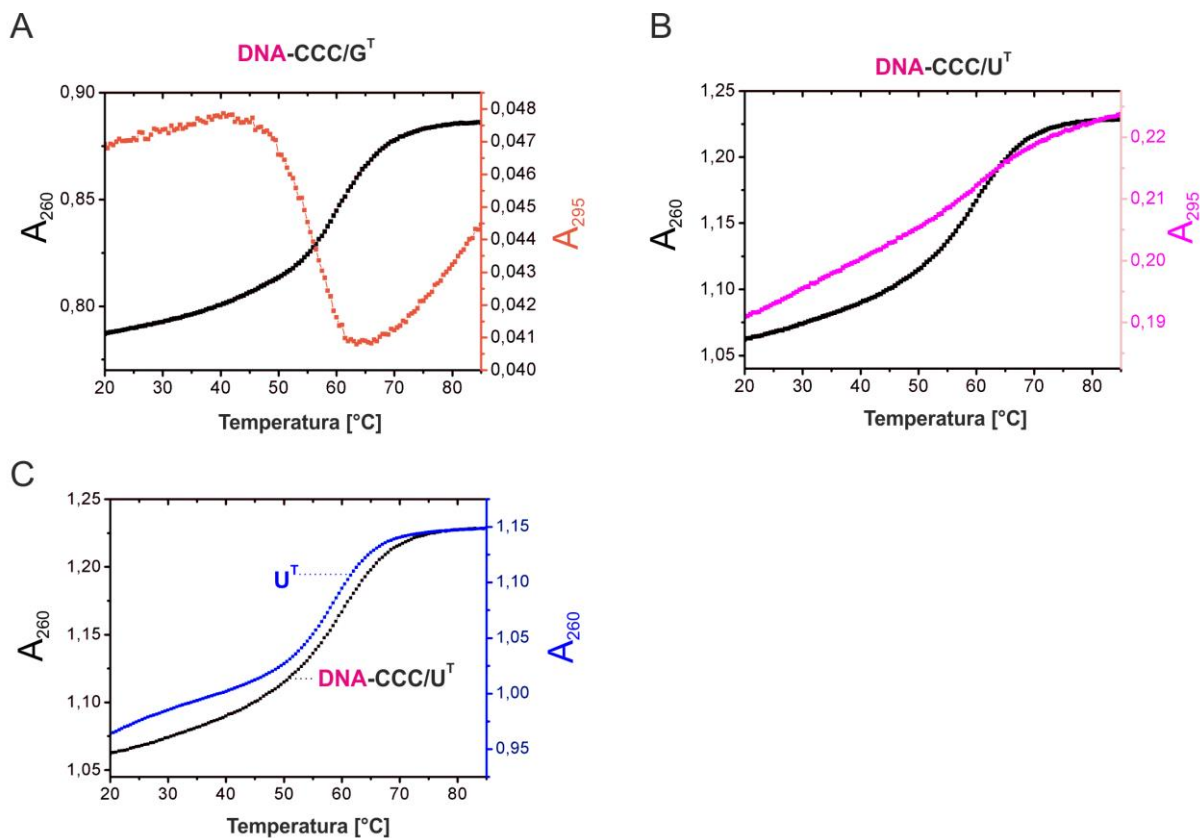
oraz U^T , widoczne są sygnały pochodzące od protonów iminowych, co wskazywało, że obie cząsteczki formują strukturę drugorzędową stabilizowaną parami zasad. Na rysunku 56 pokazane są także zaproponowane przez program *RNAstructure* struktury spinek dla nici **DNA-CCC** oraz U^T (pokazanej już wcześniej na rys. 51). Porównanie widma zarejestrowanego dla **DNA-CCC**/ U^T z widmami **DNA-CCC** oraz U^T sugeruje, że jest ono najprawdopodobniej sumą sygnałów pochodzących od ustrukturyzowanych pojedynczych nici, co wskazywałoby, że w warunkach pomiaru NMR nie obserwuje się powstawania struktury heterodupleksu DNA/RNA z nieuporządkowanymi końcami.

Następnie przeprowadziłam rozdział elektroforetyczny (rys. 57 A) dla **CCC**/ G^T , **CCC**/ U^T , **DNA-CCC**/ G^T , **DNA-CCC**/ U^T oraz **DNA-CCC** (pasma 1-5) używając jako wzorca mas drabinki dwuniciowych oligonukleotydów DNA w zakresie 10-100 bp (**W**). Dla cząsteczek **DNA-CCC**/ G^T i **DNA-CCC**/ U^T pojawiły się prążki odpowiadające struktrom dwuniciowym, które migrowały nieco szybciej niż ich odpowiedniki w serii RNA. Dodatkowo zauważyłam, że intensywność prążka odpowiadającego cząsteczce **DNA-CCC**/ U^T (pasmo 4) była słabsza niż intensywność prążków pochodzących od tworzących ją nici **DNA-CCC** i U^T , (oznaczone gwiazdkami na rysunku 57 A). Wyniki te wskazywały, że zastąpienie oligorybonukleotydu **CCC** oligodeoksynukleotydem **DNA-CCC** prowadzi do utworzenia bardzo niestabilnej struktury **DNA-CCC**/ U^T . Gdy żel ten wybarwiłam w roztworze zawierającym NMM zaobserwowałam obecność jedynie dwóch prążków pochodzących od **CCC**/ G^T i **DNA-CCC**/ G^T , potwierdzając tym samym tworzenie się struktur zawierających motyw kwadrupleksu o równoległej topologii (rys. 57 A, pasma 1', 3'). Topologię tę potwierdziłam również za pomocą widma dichroizmu kołowego, gdzie obserwowałam charakterystyczne dodatnie pasmo przy ~265 nm i ujemne przy 240 nm (rys. 57 B, **DNA-CCC**/ G^T).



Rys. 57. Profile migracji cząsteczek RNA i DNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV oraz wybarwionym w roztworze NMM (A). Widma CD cząsteczek **DNA-CCC/U^T**, **DNA-CCC/G^T** (B). Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

Różnicę w stabilności cząsteczek **CCC/G^T** i **DNA-CCC/G^T** potwierdziły także pomiary temperatury topnienia (rys. 58). Wartości T_m wynoszą 61.4 °C dla **DNA-CCC/G^T**, 59.5 °C dla **DNA-CCC/U^T**. Hybryda **DNA-CCC/G^T** jest aż o około 8 °C mniej stabilna niż jej odpowiednik w serii RNA, **CCC/G^T**. Na rysunku 58 C pokazana jest również krzywa topnienia zarejestrowana dla **DNA-CCC/U^T** wraz z nałożoną na nią krzywą topnienia pojedynczej nici **U^T**, która jest mniej stabilna niż **DNA-CCC/U^T**. Biorąc pod uwagę wyniki opisanych powyżej eksperymentów, można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że obserwowana krzywa jest wypadkową krzywych topnienia pochodzących od co najmniej trzech struktur będących w równowadze: spinki **U^T**, spinki **DNA-CCC** i kompleksu **DNA-CCC/U^T**. Co prawda, w widmie ¹H NMR zarejestrowanym dla **DNA-CCC/U^T** nie widać sygnałów od dupletu z nieuporządkowanymi końcami, **Dss**, jednak z uwagi na znaczne poszerzenie sygnałów oraz mały stosunek sygnału do szumu, nie można wykluczyć obecności niewielkiej populacji (rzędu kilku procent) również i tej formy.(150)

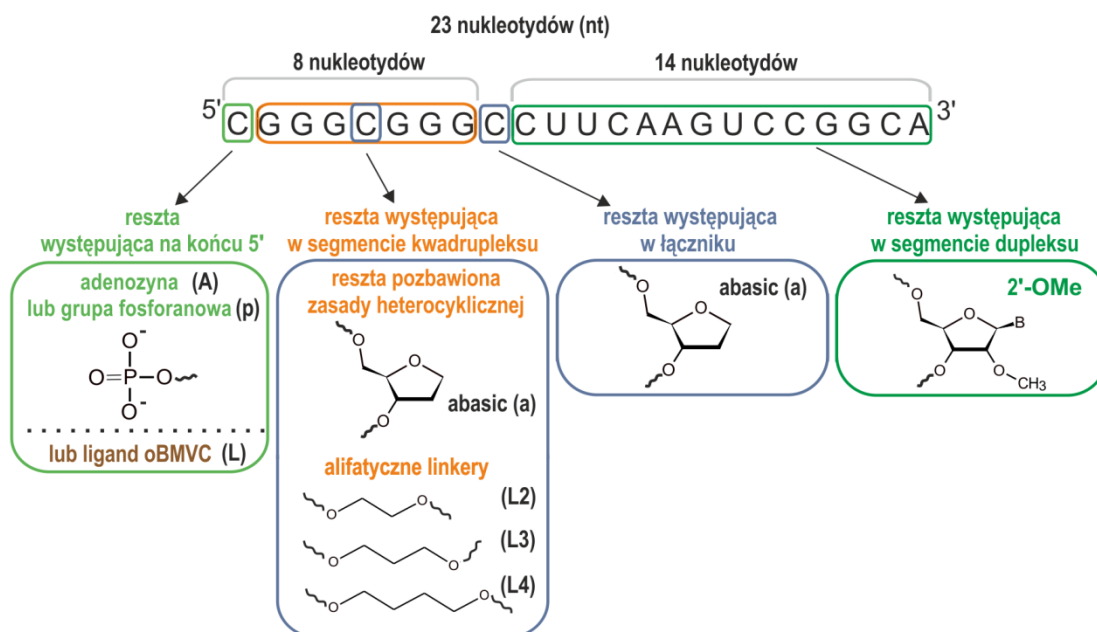


Rys. 58. Krzywe topnienia zarejestrowane przy długościach fali 260 nm i 295 nm dla cząsteczek DNA-CCC/G^T (A), DNA-CCC/U^T (B) oraz przy długości fali 260 nm dla cząsteczek DNA-CCC/G^T i U^T. Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

VI. 3. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe zawierające modyfikacje chemiczne

Obiecujące wyniki dotychczasowych badań zainspirowały mnie, aby sprawdzić, czy poprzez wprowadzenie nienukleotydowych modyfikacji chemicznych do nici antysensowej można będzie sterować właściwościami badanych przez mnie struktur. Sądziłam, że dzięki zastosowaniu odpowiednich modyfikacji będę potrafiła doprowadzić do utworzenia bardziej stabilnych struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupeks (DQ/G^T), jednocześnie obniżając stabilność struktur z nieuporządkowanymi końcami (DQ/U^T). Założyłam, że im większe uzyskam zróżnicowanie stabilności struktur DQ/G^T i DQ/U^T, tym większe będzie prawdopodobieństwo, że dany oligonukleotyd antysensowy będzie w komórce działał bardziej selektywnie względem sekwencji docelowych różniących się jedną resztą nukleotydową. Dodatkowym powodem zastosowania modyfikacji chemicznych była chęć potencjalnego zabezpieczenia oligorybonukleotydów antysensowych przed działaniem nukleaz w komórkach ludzkich. Modyfikacje

wprowadziłam w trzy różne miejsca: do domeny dupleksu, do łącznika pomiędzy segmentem dupleksu a kwadruplexu oraz pomiędzy bloki guanozynowe (rys. 59).

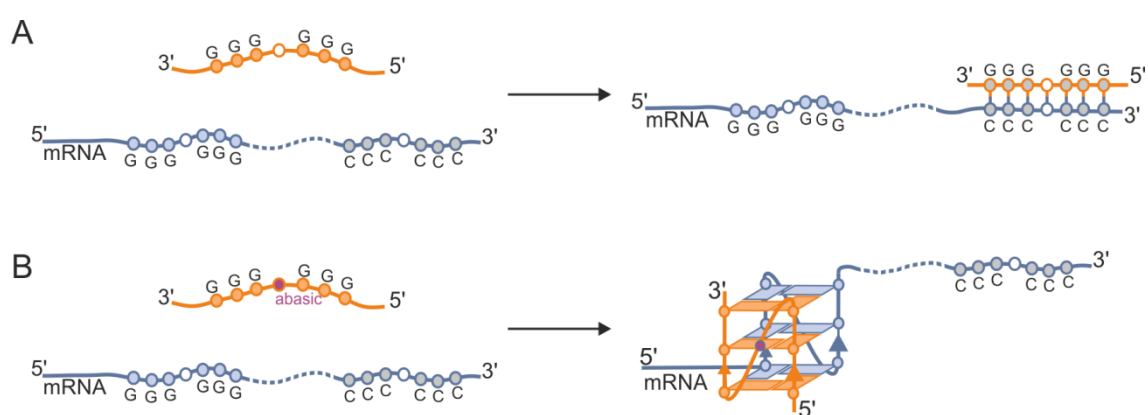


Rys. 59. Schemat modelowego oligonukleotydu antysensownego oraz modyfikacji chemicznych z zaznaczonymi miejscami ich wprowadzania.

Do badań wybrałam opisane poniżej 4 typy modyfikacji.

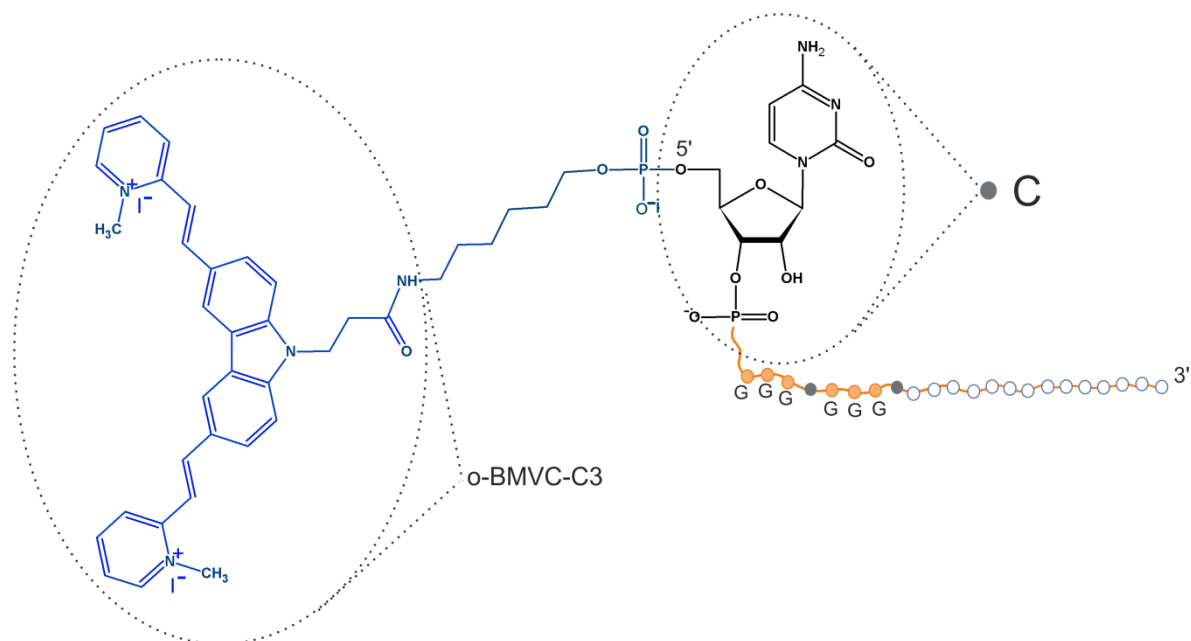
- Modyfikacja **2'-OMe** została wprowadzona do 14 nukleotydowego fragmentu komplementarnego do sekwencji docelowej. Długość tego fragmentu była dobrana na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych przez Hagiharę i in.(15) Celem wprowadzenia tej modyfikacji było zwiększenie stabilności dupleksu oraz zabezpieczenie go w przyszłości przed potencjalnym działaniem nukleaz. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi wprowadzenie jednej reszty 2'-OMe zwiększa stabilność termodynamiczną dupleksu średnio o 0.9 kcal/mol.(173) Zdawałam sobie jednak sprawę, że utworzenie bardzo stabilnej struktury dupleksu nie jest korzystne, gdyż jeśli struktura dupleksu z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**) okazałaby się być zbyt stabilna, mogłoby to prowadzić do znacznego wyciszenia translacji.
- Kolejne zaproponowane przeze mnie miejsca wprowadzenia modyfikacji to pozycje łączników tj. pomiędzy dwoma blokami guanozynowymi (-GGG-N2-GGG-) oraz na połączeniu segmentów kwadruplexu i dupleksu (N3) (rys. 3, 59; tabela 1). Przy wyborze modyfikacji kierowałam się dostępnymi w literaturze informacjami dotyczącymi ich potencjału do stabilizacji struktur

kwadrupleksowych oraz promowaniem struktury równoległego kwadrupleksu. Uznałam, że optymalnymi do tego celu będą modyfikacje nienukleotydowe, takie jak reszty pozbawione zasad heterocyklicznych (**abasic**) czy **alifatyczne linkery** o różnej długości (rys. 59).(86) Dodatkowo, w kontekście planowanych przeze mnie badań biologicznych, uznałam, że obecność alifatycznych linkerów w obrębie bloków guanozynowych potencjalnie może zapobiegać niespecyficznemu wiązaniu się nici antysensowej do innych mRNA o częściowej komplementarności zasad(174) np. fragmentów bogatych w reszty cytydyny (efekt *off-target*) co zobrazowałam na rysunku 60.



Rys 60. Schemat przedstawiający możliwości wiązania oligonukleotydu antysensowego bogatego w reszty guanozyny do różnych miejsc w sekwencji docelowej mRNA. Utworzenie struktury dupleksu (A) oraz struktury kwadrupleksu za sprawą obecności łącznika abasic (B).

- Znana jest tendencja kwadrupleksów do dimeryzacji i agregacji.(55) Aby sprawdzić, czy obecność sekwencji flankującej ma wpływ na proces dimeryzacji kwadrupleksów lub ich strukturę, na końcu 5' sekwencji antysensowej w miejsce reszty cytydyny zaplanowałam wprowadzenie dodatkowej **grupy fosforanowej**(64) lub reszty **adenozy**(63) (rys. 59).
- W celu zwiększenia stabilności i selektywności dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych zaplanowałam również użycie **oligonukleotydu z przyłączoną kowalencyjnie do końca 5' pochodną oBMVC**, ligandem selektywnym względem kwadrupleksów (rys. 61).



Rys 61. Schemat oligonukleotydu o-BMVC-C3-CCC.

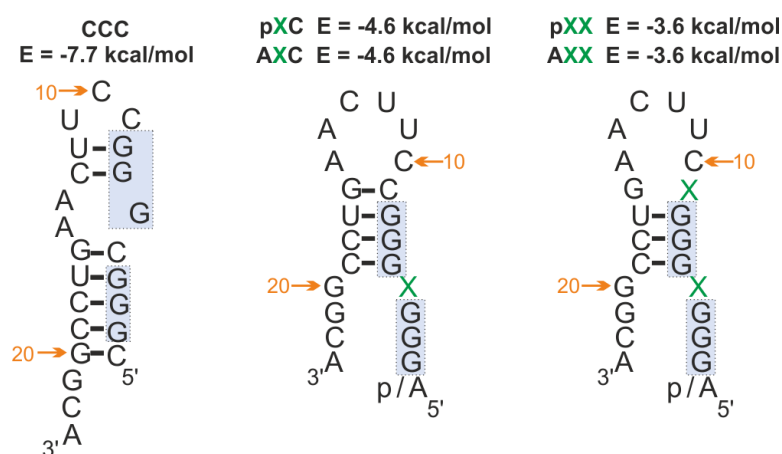
W tabeli 1 zebrane są sekwencje wszystkich oligonukleotydów, ich oznaczenia oraz konwencja przyjęta przeze mnie do opisu dwuniciowych struktur **DQH** i **Dss**.

Tabela 1. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w niniejszej pracy, ich oznaczenia oraz konwencja przyjęta przeze mnie do opisu dwuniciowych struktur **DQH** i **Dss**.

Nazwa	Sekwencje oligonukleotydów antysensowych (od 5' do 3')	DQH	Dss
CCC	C- GGG-C-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	CCC/G ^T	CCC/U ^T
CCC-OMe	C- GGG-C-GGG-C -(CUUCAAGUCCGGCA) ^{2'OMe}	CCC-OMe/G ^T	CCC-OMe/U ^T
paa	p- GGG-a-GGG-a -CUUCAAGUCCGGCA	paa/G ^T	paa/U ^T
Aaa	A- GGG-a-GGG-a -CUUCAAGUCCGGCA	Aaa/G ^T	Aaa/U ^T
paC	p- GGG-a-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	paC/G ^T	paC/U ^T
AaC	A- GGG-a-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	AaC/G ^T	AaC/U ^T
pCa	p- GGG-C-GGG-a -CUUCAAGUCCGGCA	pCa/G ^T	pCa/U ^T
pL2C	p- GGG-L2-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	pL2C/G ^T	pL2C/U ^T
pL3C	p- GGG-L3-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	pL3C/G ^T	pL3C/U ^T
pL4C	p- GGG-L4-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	pL4C/G ^T	pL4C/U ^T
o-BMVC-C3-CCC	o- BMVC-C3-C-GGG-C-GGG-C -CUUCAAGUCCGGCA	o-BMVC-C3-CCC/G ^T	o-BMVC-C3-CCC/U ^T
CCC-DNA	d[C- GGG-C-GGG-C -CTTCAAGTCCGGCA]	CCC-DNA/G ^T	CCC-DNA/U ^T
	Sekwencje oligonukleotydów docelowych (od 5' do 3')		
G ^T	UGCCGGACUUGAAG-UA- GGGCGGC		
U ^T	UGCCGGACUUGAAG-UA- GGGCUGGC		
GL ^T	UGCCGGACUUGAAG-UA- GGGCGGC CAUAGUUGCA		
UL ^T	UGCCGGACUUGAAG-UA- GGGCUGGC CAUAGUUGCA		

Tworzenie stabilnych struktur drugorzędowych bądź agregatów może obniżać aktywność oligonukleotydów antysensowych w komórce, obniżając ich zdolność hybrydyzacji z docelowymi sekwencjami mRNA. Jak już wcześniej pokazałam, modelowa

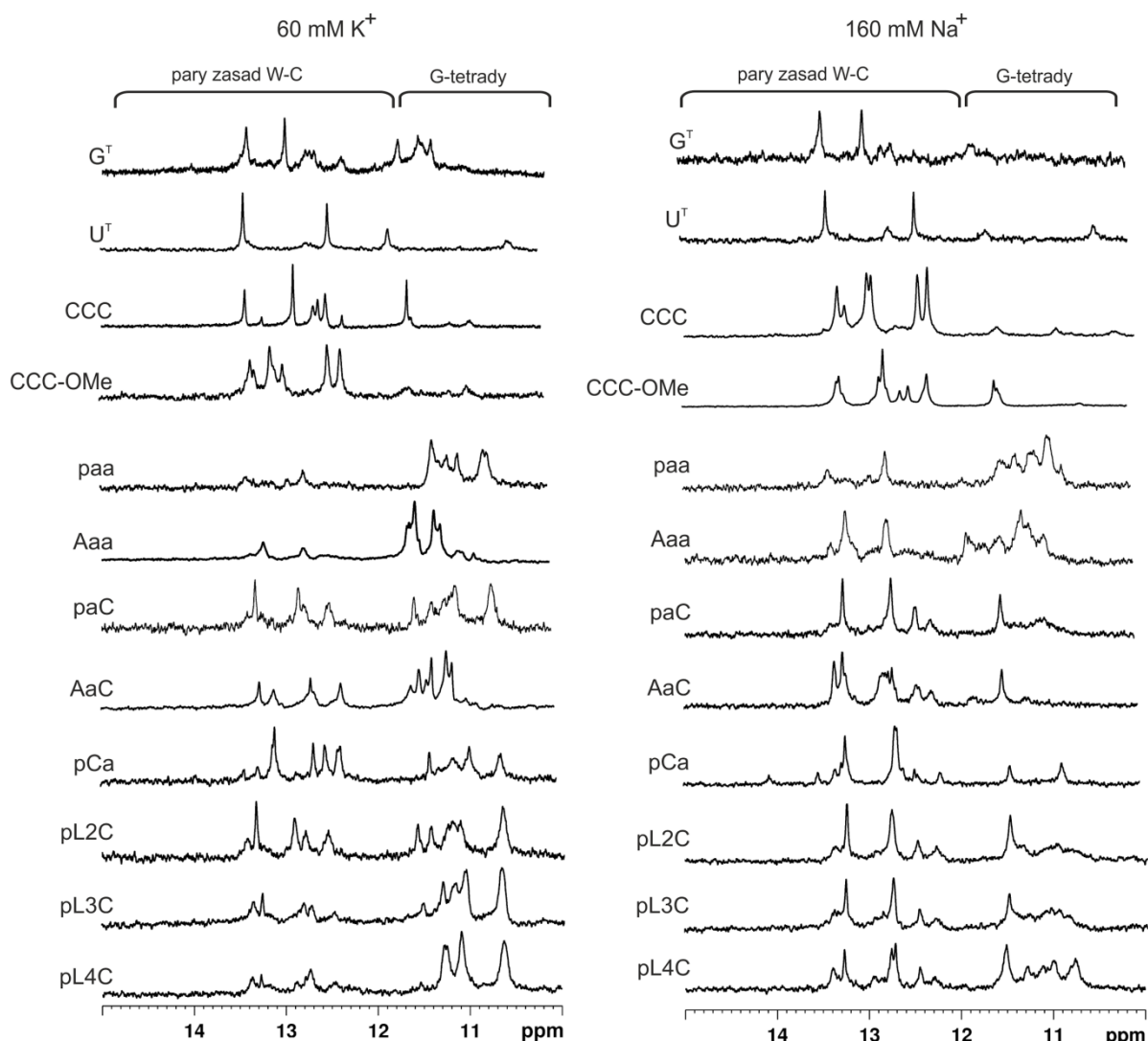
cząsteczka CCC przyjmuje w roztworze strukturę spinki (rys. 51, 62), jednak wprowadzenie nienuklotydowych modyfikacji (abasic, linkery alifatyczne) może prowadzić do powstania innych stabilnych struktur. Według przewidywań za pomocą programu *RNAstructure*, cząsteczka CCC przyjmuje strukturę spinki o energii swobodnej - 7.7 kcal/mol. Wprowadzenie jednej lub dwóch nienuklotydowych modyfikacji, oznaczonych jako **X** i przedstawionych na rysunku 62 powoduje wzrost energii swobodnej, gdyż maleje liczba potencjalnych par zasad Watsona-Cricka oraz G:U stabilizujących strukturę spinki. Z kolei obecność dwóch bloków guanozynowych w sekwencjach badanych oligonukleotydów, wobec ich obniżonej tendencji do tworzenia spinek, może promować powstawanie struktur kwadrupleksów, dwu- lub czterocząsteczkowych.



Rys. 62. Przewidziane za pomocą programu *RNAstructure* struktury drugorzędowe dla pojedynczych nici CCC, pXC i AXC oraz pXX i AXX. Oznaczenia pXC i AXC odpowiadają oligonukleotydům paC, pL2C, pL3C, pL4C, AaC, natomiast oznaczenia pXX i AXX odpowiadają sekwencjom paa i Aaa. Zielonym kolorem zaznaczone są miejsca wprowadzenia modyfikacji nienuklotydowych.

Aby sprawdzić, jak obecność modyfikacji chemicznych wpływa na właściwości pojedynczych nici, wykonałam serię widm ^1H w obecności kationów sodu lub potasu (rys. 63). Analiza tych widm pokazała, że większość modyfikowanych oligonukleotydów występuje w roztworze w równowadze między dwiema konformacjami, spinką i kwadrupleksem. Tylko w przypadku trzech cząsteczek: CCC, CCC-OMe i U^{T} , spinka była dominującą formą niezależnie od warunków roztworu. Ponadto analiza widm ^1H NMR pokazała, że w obecności jonów potasu silniej promowane jest tworzenie się struktur zawierających motyw kwadrupleksu, niż w obecności jonów sodu. Jedynie w przypadku

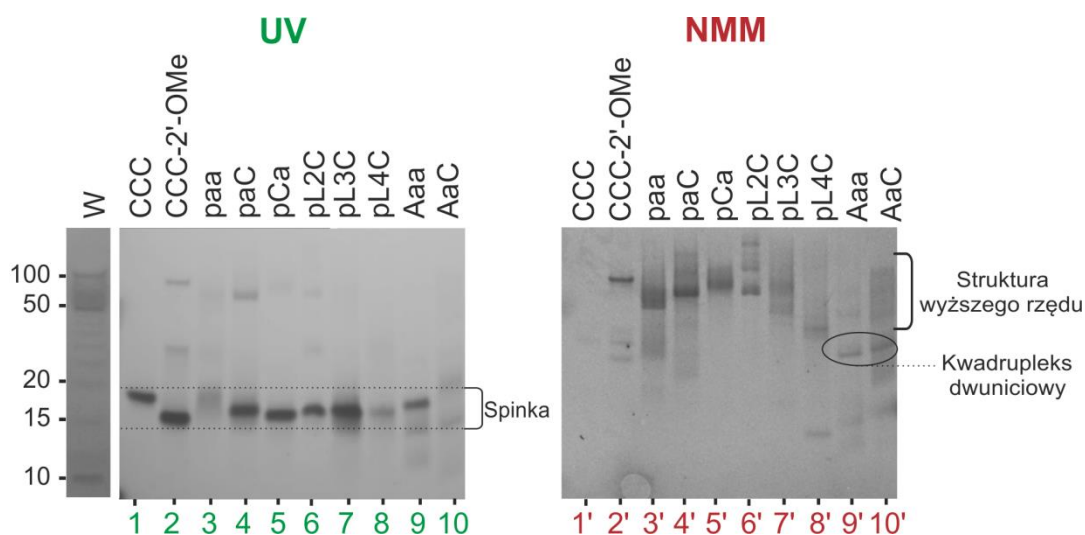
cząsteczek **paa** i **Aaa** kwadrupleks jest dominującą formą w roztworze, zarówno w obecności jonów potasu i sodu.



Rys. 63. Rejon iminowy widm ^1H NMR pojedynczych nici oligorybonukleotydowych. Widma wykonane w buforze potasowym (A) oraz w buforze sodowym (B).

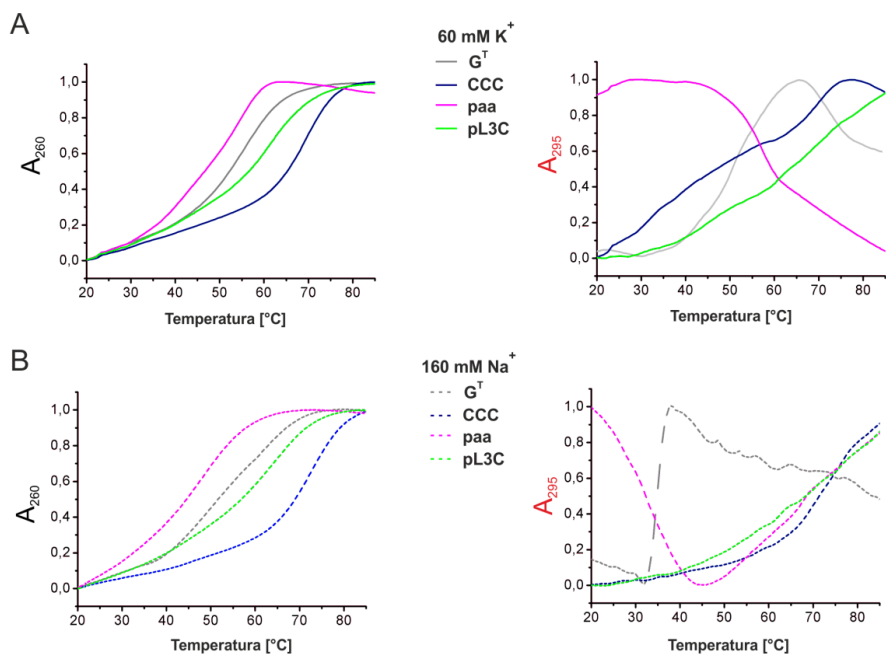
W celu uzyskania dodatkowych informacji, równolegle monitorowałam tworzenie się struktur drugorzędowych przez pojedyncze nici oligonukleotydowe za pomocą elektroforezy w żelu natywnym. Jak widać na rysunku 64, większość oligonukleotydów migrowała w żelu z szybkością odpowiadającą prążkowi markera DNA długości ~ 20 bp, co wskazywało na tworzenie się spinek. Po wybarwieniu żelu w roztworze NMM pojawiły się dodatkowe prążki o migracji odpowiadającej markerowi DNA o długości 100 par zasad, co świadczyło o powstaniu struktur kwadrupleksów zbudowanych z czterech nici (rys. 64, prążki 2' - 6'). Prążki odpowiadające oligonukleotydów zawierającym adenozyne

na końcu 5' (**AaC** i **Aaa**), migrowały zauważalnie szybciej od pozostałych (rys. 64, prążki 9' - 10') i pochodzą prawdopodobnie od dwucząsteczkowej, a nie czterocząsteczkowej struktury kwadrupleksu. Prążki świadczące o powstawaniu kwadrupleksów były słabo widoczne w świetle UV, co oznaczało, że ich populacja w warunkach elektroforetycznych była niewielka.



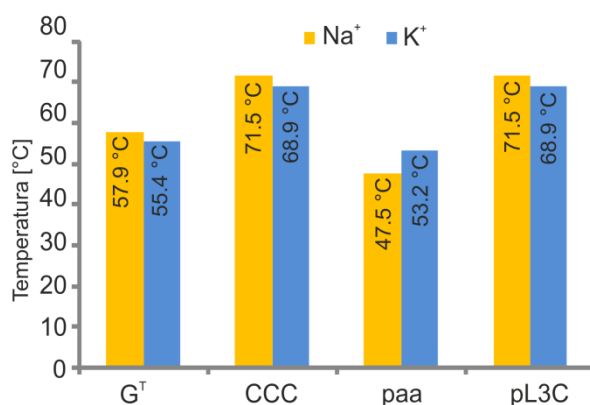
Rys. 64. Porównanie profili migracji pojedynczych nici oligorybonukleotydy w żelu poliakrylamidowym. Wizualizacja w świetle UV oraz żel wybarwiony za pomocą roztworu NMM. Eksperyment prowadzono w buforze potasowym.

Mając na uwadze tworzenie struktur drugorzędowych przez pojedyncze nici zarówno antysensowe jak i docelowe, postanowiłam przyjrzeć się ich stabilnościom termicznym. Do kolejnego eksperymentu wyłoniłam cztery oligorybonukleotydy. Były to cząsteczki niezawierające modyfikacji (**CCC** i **G^T**), **paa** reprezentująca te, które w warunkach wykonywania widm ¹H NMR tworzyły głównie kwadrupleksy, oraz **pL3C** reprezentująca cząsteczki z linkerami alifatycznymi (rys. 65).



Rys. 65. Krzywe topnienia zarejestrowane przy długościach fali 260 nm i 295 nm dla cząsteczek G^T, CCC, paa oraz pL3C w obecności kationów K⁺ (A) i Na⁺ (B).

Jak widać na rysunku 65, jedynie w przypadku oligorybonukleotydu z dwiema modyfikacjami typu abasic (**paa**) obserwovałam tworzenie kwadrupleksu, zarówno w obecności kationów potasu oraz sodu (odwrócony profil krzywej topnienia przy 295 nm). Dla **paa** temperatura topnienia wyznaczona przy 295 nm wynosiła 57 °C oraz 35 °C odpowiednio w obecności kationów K⁺ oraz Na⁺. Na rysunku 66 porównane są wartości T_m wyliczone na podstawie analizy krzywej topnienia zarejestrowanej przy długości fali 260 nm dla badanych cząsteczek. Spośród nich najstabilniejszą strukturę tworzy oligonukleotydu CCC przyjmujący postać spinki i nieposiadający żadnej modyfikacji.

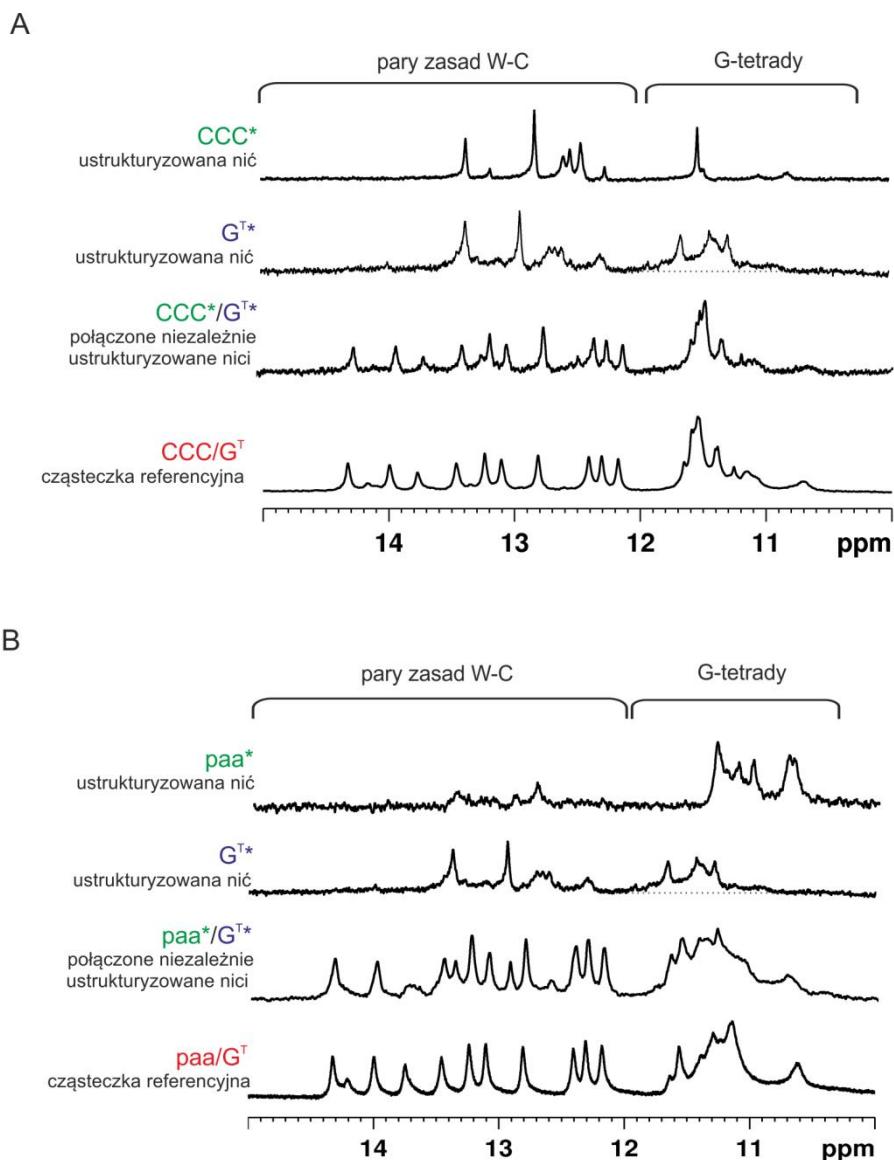


Rys 66. Porównanie temperatur topnienia [°C] oligonukleotydu G^T, CCC, paa i pL3C w buforze potasowym (niebieskie słupki) i sodowym (pomarańczowe słupki).

Zadawałam sobie pytanie, czy tworzenie się stabilnych struktur drugorzędowych przez oligorybonukleotydy antysensowe nie będzie konkurowało z powstawaniem struktur hybrydowych **DQH**, co w konsekwencji mogłoby osłabiać ich skuteczność w komórce. Zaproponowałam więc eksperyment ^1H NMR, dzięki któremu miałam możliwość prześledzić tworzenie się struktury hybrydowej w zależności od sposobu przygotowania próbki (rys. 67). Do tego eksperymentu wytypowałam dwie cząsteczki, jedną niemodyfikowaną, **CCC/G^T**, oraz drugą, **paa/G^T**, zawierającą modyfikacje typu abasic. Przygotowałam następujące próbki w buforze potasowym:

- dwie próbki NMR zawierały pojedyncze nici, **CCC** i **paa**, które zostały wcześniej poddane procesowi podgrzewania i powolnego schładzania. Obecność struktur spinek potwierdziłam za pomocą widm ^1H NMR; tak ustrukturyzowane cząsteczki nazywam odpowiednio **CCC*** oraz **paa***;
- kolejne dwie próbki NMR zawierały ustrukturyzowaną pojedynczą nić **G^T**, dalej nazywaną **G^{T*}**, która również była wcześniej poddana procesowi podgrzewania i powolnego schładzania. Za pomocą widm ^1H NMR potwierdziłam obecność będących w równowadze struktur spinki i kwadrupleksu;
- następnie połączyłam równomolowo roztwory **CCC*** z **G^{T*}** oraz **paa*** z **G^{T*}** (nie poddając ich już procesowi powolnego podgrzewania i schładzania) i wykonałam widma ^1H NMR;
- otrzymane widma porównałam z widmami cząsteczek **CCC/G^T** oraz **paa/G^T**, które zostały przygotowane w sposób omówiony w rozdziale **MATERIAŁY I METODY** (równomolowe połączenie nieustrukturyzowanych nici, **CCC** z **G^T**, oraz **paa** z **G^T** i następnie ich podgrzewanie i powolne schładzanie).

Wszystkie widma dla par oligonukleotydów, **CCC** z **G^T** oraz **paa** z **G^T**, zostały zarejestrowane w tym samym dniu po zlaniu obu nici. Wyniki opisanego powyżej eksperymentu zestawione są na rysunku 67.



Rys. 67. Widma ^1H NMR ustrukturyzowanych pojedynczych nici $\text{G}^{\text{T}*}$, CCC^* , hybrydy $\text{CCC} / \text{G}^{\text{T}*}$ oraz referencyjnej cząsteczki $\text{CCC}/\text{G}^{\text{T}}$ (A) i ustrukturyzowanych pojedynczych nici $\text{G}^{\text{T}*}$, paa^* hybrydy $\text{paa}^*/\text{G}^{\text{T}*}$ oraz $\text{paa}/\text{G}^{\text{T}}$ jako referencyjnej cząsteczki (B). Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

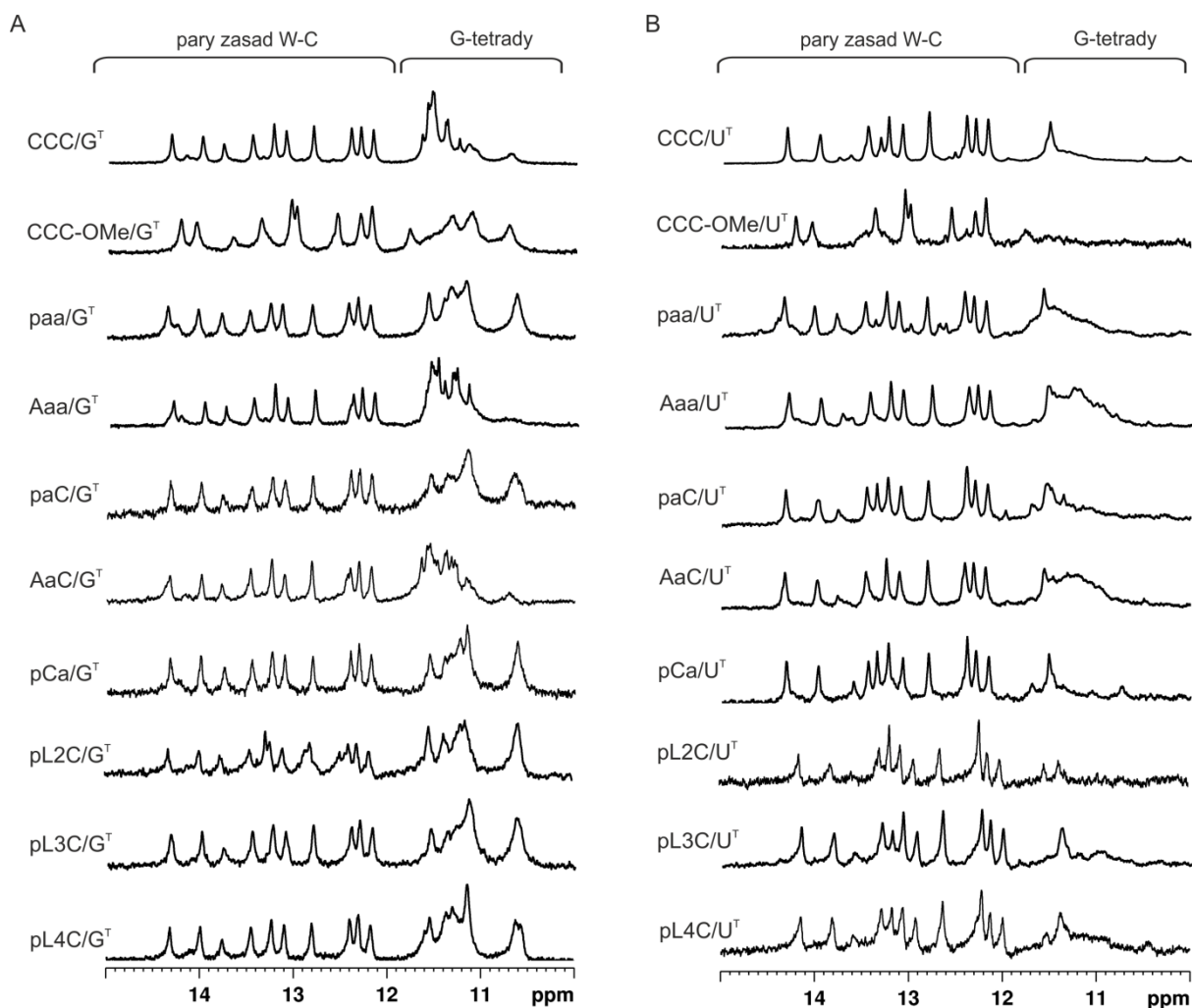
Widmo otrzymane po połączeniu uprzednio ustrukturyzowanych nici (CCC^* z $\text{G}^{\text{T}*}$) oraz widmo cząsteczki $\text{CCC}/\text{G}^{\text{T}}$ (otrzymanej przez równomolowe połączenie nieustrukturyzowanych nici, CCC z G^{T} , a następnie ich podgrzanie i powolnie schładzanie) są bardzo podobne. Jediną widoczną różnicą jest obecność dodatkowych, słabych sygnałów iminowych występujących w widmach $\text{CCC}^*/\text{G}^{\text{T}*}$, które są pozostałością niewielkiej frakcji ustrukturyzowanych, niezasocjowanych pojedynczych nici. Porównanie widm cząsteczek $\text{paa}/\text{G}^{\text{T}}$ i $\text{paa}^*/\text{G}^{\text{T}*}$ pokazuje, że również w tym przypadku po zlaniu ustrukturyzowanych, stabilnych nici równowaga przesuwa się

zdecydowanie w stronę struktury hybrydowej. Gdy widma powtórzyłam po dwóch dniach, zaobserwowałam jedynie nieistotne zmiany. Na podstawie analizy otrzymanych wyników mogę stwierdzić, że wstępne ustrukturyzowanie nici nie przeszkadza w powstawaniu struktury hybrydy typu dupleks-kwadrupleks. Mniej stabilne od spinki CCC struktury kwadrupleksowe utworzone przez modyfikowane oligonukleotydy np. **paa** łatwiej ulegają hybrydyzacji z sekwencją docelową.

VI. 4. Struktura i stabilność układów DQH oraz Dss zawierających modyfikacje chemiczne

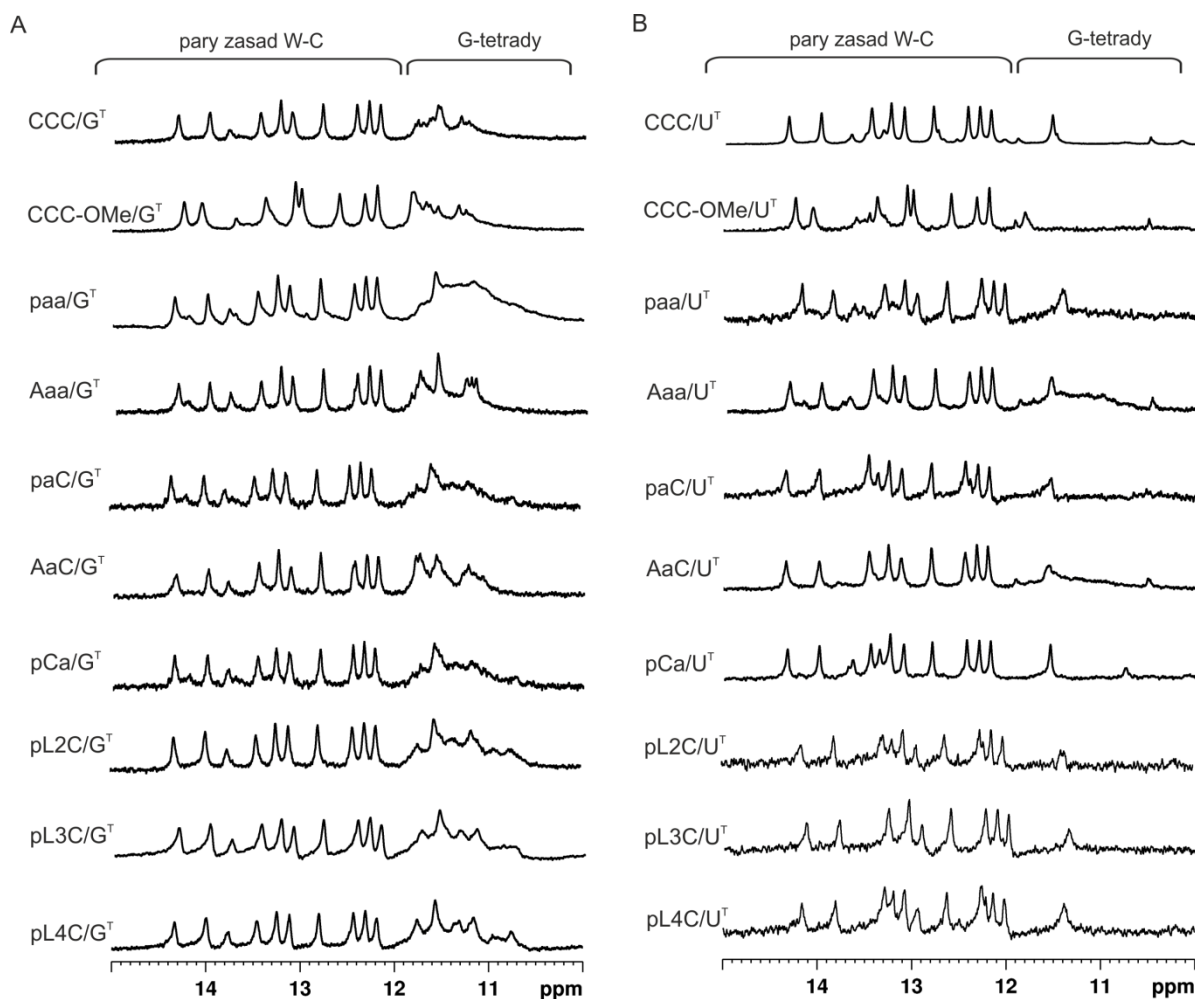
W kolejnym kroku postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ mają nienukleotydowe modyfikacje chemiczne na tworzenie i stabilność struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami. Wpierw, aby potwierdzić formowanie się tych struktur zarejestrowałam serię widm ^1H NMR dla oligorybonukleotydów zawierających modyfikacje (tabela 1) w kompleksie z sekwencjami docelowymi G^{T} i U^{T} . Widma te wykonane w obecności kationów potasu (rys. 68) i obecności kationów sodu (rys. 69) zestawione są z widmami ich niemodyfikowanych odpowiedników, cząsteczek $\text{CCC}/\text{G}^{\text{T}}$ i $\text{CCC}/\text{U}^{\text{T}}$. Analiza widm wykonanych dla nici oligorybonukleotydowych zawierających modyfikacje (abasic, linkery alifatyczne L2-L4) po hybrydyzacji z nicią G^{T} pokazuje, że niezależnie od typu modyfikacji i typu jonów (K^+ lub Na^+) powstają oczekiwane struktury hybrydowe dupleks-kwadrupleks. W widmach widoczne są sygnały pochodzące zarówno od par zasad Watsona-Cricka jak i od G-tetrad. Wszystkie te widma są bardzo podobne, jedynie dla cząsteczek $\text{AaC}/\text{G}^{\text{T}}$ oraz $\text{Aaa}/\text{G}^{\text{T}}$ kształt szerokiego sygnału w rejonie 10.5 - 12 ppm jest nieco różny; brak jest charakterystycznego sygnału przy 10.5 ppm. Jest to zapewne związane z obecnością reszty adenozyiny na 5' końcu. Obraz inny od oczekiwanego zaobserwowałam natomiast po połączeniu nici antysensowych zawierających niektóre modyfikacje z cząsteczką o sekwencji U^{T} (rys. 68 B, 69 B). Podobnie jak w przypadku kompleksu pozbawionego modyfikacji, $\text{CCC}/\text{U}^{\text{T}}$, spodziewałam się, że nie pojawią się żadne sygnały, które by wskazywały na zawiązywanie się G-tetrad. Niestety, w kilku przypadkach w regionie tym zaobserwowałam sygnały, których intensywność była porównywalna z intensywnością sygnałów w widmach zarejestrowanych po połączeniu nici antysensowych z nicią G^{T} . Efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku widm cząsteczek $\text{paa}/\text{U}^{\text{T}}$, $\text{Aaa}/\text{U}^{\text{T}}$, $\text{paC}/\text{U}^{\text{T}}$ i $\text{AaC}/\text{U}^{\text{T}}$, wykonanych, w obecności kationów potasu (rys. 68 B). Nie można

było wykluczyć obecności kwadrupleksów również w widmach otrzymanych dla **pCa/U^T**, **pL3C/U^T** i **pL4C/U^T**, gdyż w rejonie 10.5 – 12 ppm zauważyłam pojawienie się bardzo szerokiego sygnału, choć o dużo niższej intensywności (rys. 68 B). Z kolei w roztworze zawierającym kationy sodu, sygnały w tym rejonie były znacznie słabsze lub nieobecne. Jedynie dla kwadrupleksów zawierających dwie reszty typu abasic (**paa/U^T** i **Aaa/U^T**) sygnały te są dobrze widoczne, choć o słabszej intensywności (rys. 69 B).



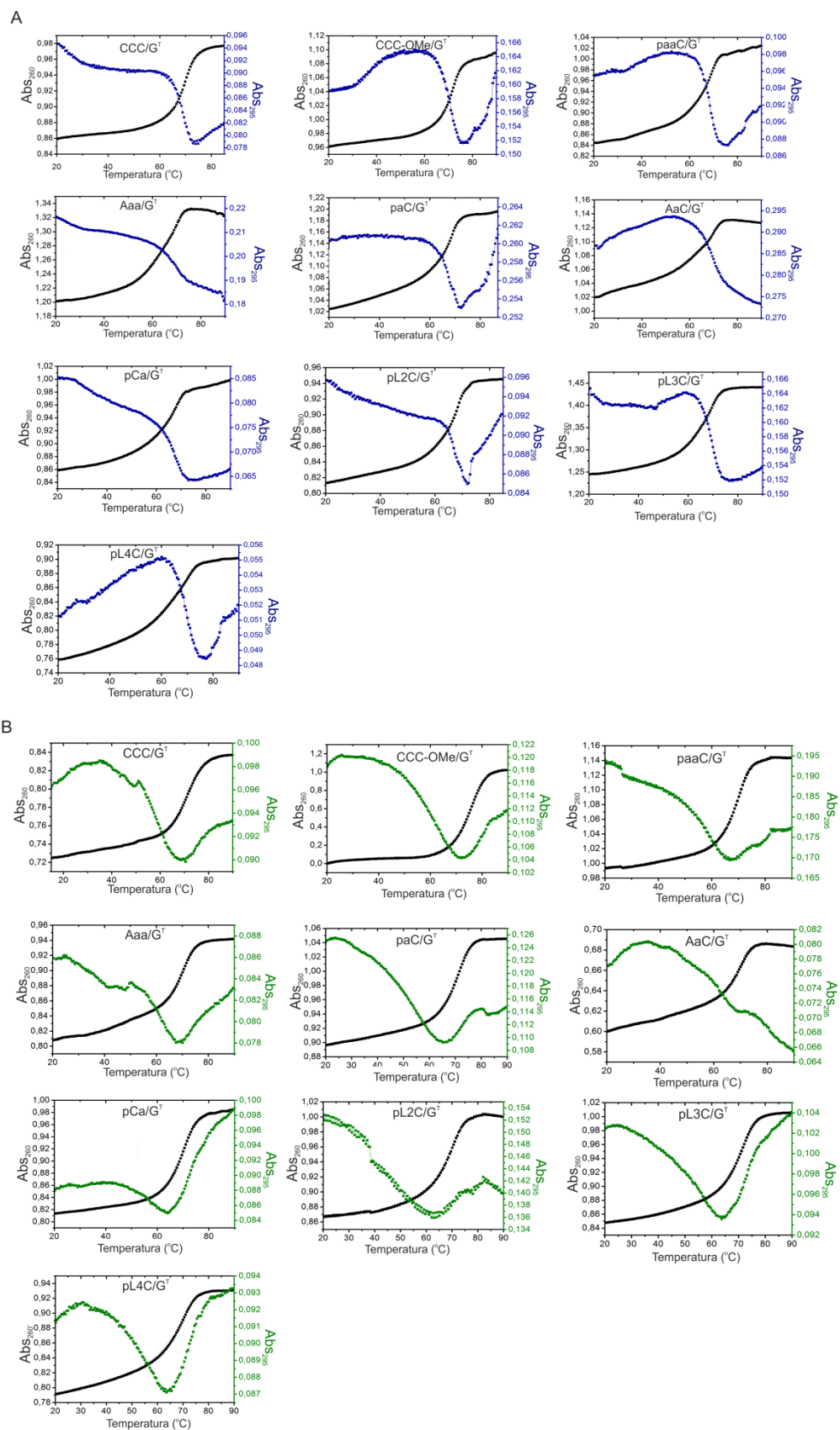
Rys. 68. Widma ¹H NMR otrzymane po połączeniu nici antysensowych z nicią o sekwencji G^T (A) i U^T (B).

Widma wykonano w buforze potasowym.

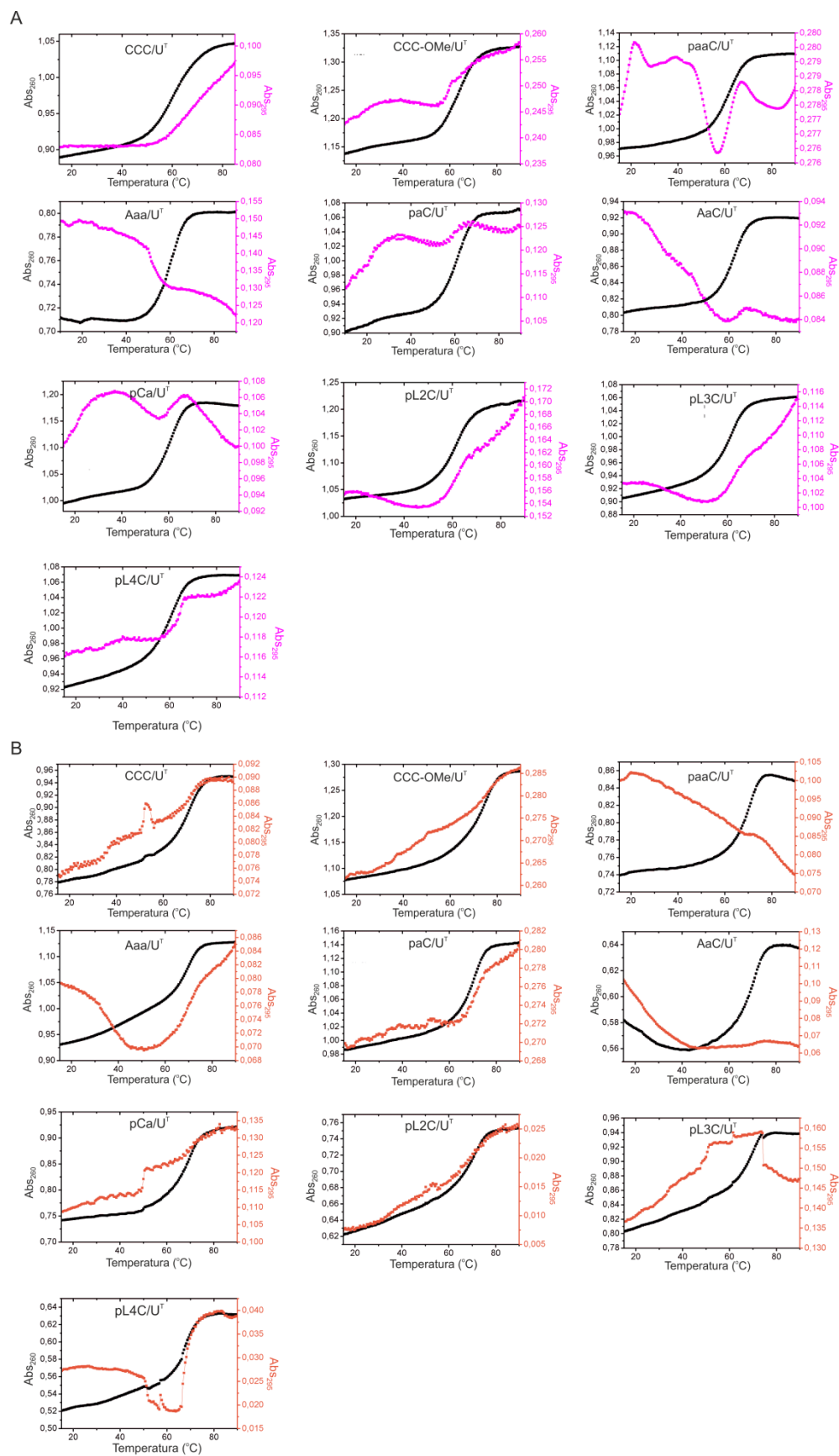


Rys. 69. Widma ^1H NMR otrzymane po połączeniu nici antysensowej z nicią o sekwencji G^{T} (A) i U^{T} (B). Widma wykonano w buforze sodowym.

Chcąc uzyskać dodatkowe informacje o właściwościach badanych cząsteczek, określiłam ich stabilności metodą spektroskopii UV. Na rysunku 70 i 71 przedstawiłam profile topnienia zarejestrowane przy długościach fali 260 i 295 nm otrzymane po asocjacji nici antysensowych z niemi G^{T} i U^{T} w obecności kationów potasu (rys. 70 A i 71 A) oraz sodu (rys. 70 B i 71 B). Wyznaczone temperatury topnienia zebrane są w tabeli 2. Wszystkie wartości T_m wyznaczałam z profili topnienia zarejestrowanych przy długości fali 260 nm. Jak już wcześniej wspomniałam, monitorowanie stabilności struktur kwadrupleksów odbywa się zazwyczaj przy 295 nm, jednak w przypadku współistnienia struktur dupleksu i kwadrupleksu odczytanie wartości T_m z profilu topnienia przy 295 nm jest niejednoznaczne z uwagi na nietypowy kształt krzywych.



Rys. 70. Krzywe topnienia cząsteczek otrzymanych po połączeniu nici antysensowych z nicią G^T , zarejestrowane przy długościach fali 260 oraz 295 nm w obecności 60 mM kationów K^+ (A) i 160 mM kationów Na^+ (B).



Rys. 71. Krzywe topnienia cząsteczek otrzymanych po połączeniu nici antysensowych z nicią U^\dagger , zarejestrowane przy długościach fali 260 oraz 295 nm w obecności 60 mM kationów K^+ (A) i 160 mM kationów Na^+ (B).

Analiza danych zamieszczonych w tabeli 2 wskazuje, że trwałość termiczna hybryd zawierających nienukleotydowe modyfikacje (abasic, linkery alifatyczne o długości od dwóch grup metylenowych do czterech) jest porównywalna z trwałością hybryd niezawierających modyfikacji. Jedynie w przypadku modyfikacji 2'-OMe wprowadzonej do domeny dupleksowej zaobserwowałam wzrost T_m , co jest szczególnie widoczne w obecności kationów Na^+ . Z kolei porównanie temperatur topnienia struktur hybrydowych **DQH** z ich odpowiednikami **Dss** pokazuje różnice zależne od warunków roztworu. W obecności kationów potasu struktury hybrydowe typu dupleks-kwadrupeks są średnio o 8 °C stabilniejsze w stosunku do struktur **Dss**, natomiast w buforze zawierającym kationy sodu, stabilności obu typów struktur są zbliżone. Jest to związane z obecnością domeny kwadrupeksowej, która tworzy stabilniejsze formy w obecności kationów potasu. Z kolei, jak już to dyskutowałam na stronie 93, obserwowana różnica stabilności dupleksu w warunkach K^+ i Na^+ związana jest z różną siłą jonową obu użytych do badania buforów, potasowego i sodowego (60 mM K^+ versus 160 mM Na^+).

Tabela 2. Temperatury topnienia [°C] niemodyfikowanych i zawierających modyfikacje chemiczne struktur hybrydowych **DQH** oraz odpowiadających im struktur **Dss**. Pomiary wykonano w buforze potasowym (A) i w buforze sodowym (B).

A

DQH	T_m [°C] 60 mM K^+	Dss	T_m [°C] 60 mM K^+
CCC/G^T	69.4	CCC/U^T	61.0
CCC-OMe/G^T	71.7	CCC-OMe/U^T	63.5
paa/G^T	68.0	*paa/U^T	61.5
Aaa/G^T	69.0	*Aaa/U^T	61.0
paC/G^T	67.5	paC/G^T	61.0
AaC/G^T	68.5	*AaC/G^T	62.0
pCa/G^T	67.4	pCa/G^T	60.5
pL2C/G^T	68.0	pL2C/G^T	61.5
pL3C/G^T	68.5	pL3C/G^T	61.5
pL4C/G^T	68.5	pL4C/G^T	60.5
DNA-CCC/G^T	61.4	DNA-CCC/U^T	59.5
DX	64.4		
2Q	65.5		

B

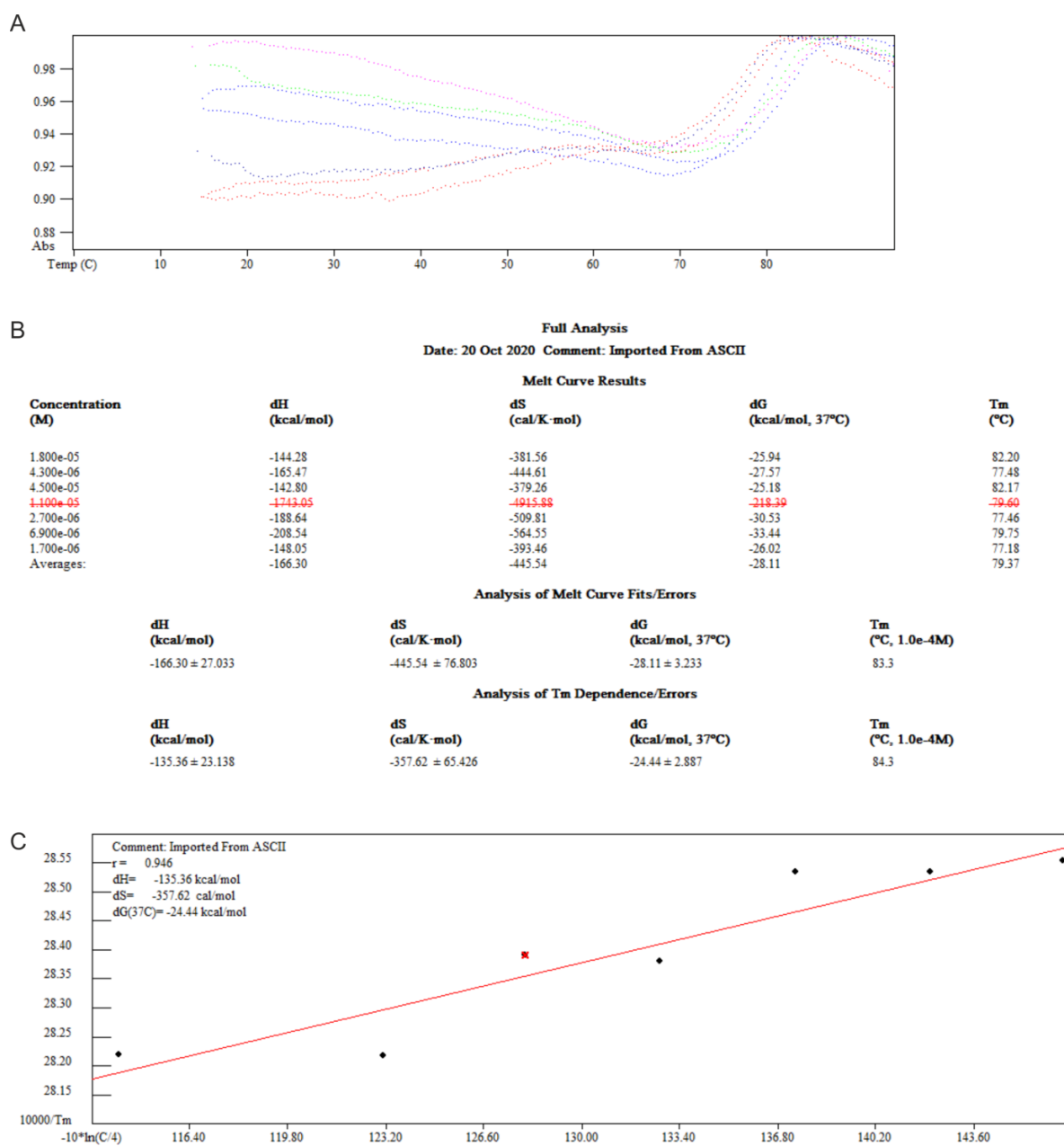
DQH	T _m [°C] 160 mM Na ⁺	Dss	T _m [°C] 160 mM Na ⁺
CCC/G ^T	71.0	CCC/U ^T	70.5
CCC-OMe/G ^T	75.6	CCC-OMe/U ^T	74.5
paa/G ^T	69.6	*paa/U ^T	70.0
Aaa/G ^T	69.5	*Aaa/U ^T	69.0
paC/G ^T	69.8	paC/G ^T	70.0
AaC/G ^T	69.5	AaC/G ^T	70.0
pCa/G ^T	69.5	pCa/G ^T	69.0
pL2C/G ^T	69.6	pL2C/G ^T	70.7
pL3C/G ^T	70.7	pL3C/G ^T	69.0
pL4C/G ^T	69.5	pL4C/G ^T	67.2
DX	71.6		
2Q	48.6		

* oznaczenie cząsteczek **DQ/U^T**, dla których przy długości fali 295 nm obserwowalam odwrócony profilu topnienia świadczący o obecności domeny kwadrupleksowej

Analiza profilu krzywych topnienia zarejestrowanych przy 295 nm w obecności kationów potasu oraz sodu potwierdziła wcześniejsze obserwacje z widm NMR, że cząsteczki **paa/U^T**, **Aaa/U^T** i **AaC/U^T** mają tendencję do zawiązywania domeny kwadrupleksowej. Niestety dla tych kwadrupleksów na podstawie dostępnych danych, nie można zaproponować powstawania jednej najbardziej prawdopodobnej struktury. Zgodnie z przesłankami literaturowymi można zaproponować istnienie kilku potencjalnych form kwadrupleksów w zawiązywaniu których może także brać udział reszta urydyny.(51) Osobnego omówienia wymagają wyniki uzyskane dla cząsteczki **paC/U^T**, której widmo ¹H NMR wykonane w buforze potasowym wskazywało na obecność znacznej populacji kwadrupleksu (rys. 68 B). Z kolei kształt krzywej topnienia dla **paC/U^T**, również w obecności kationów potasu, nie był typowy ani dla formy kwadrupleksu ani dla dupleksu (rys. 71 A). Najprawdopodobniej, wraz ze wzrostem stężenia oligomerów, czyli w warunkach pomiaru NMR, występująca w roztworze równowaga pomiędzy strukturą zawierającą motyw kwadrupleksu a dupleksem z nieuporządkowanymi końcami jest przesunięta w stronę struktury z kwadrupleksem.

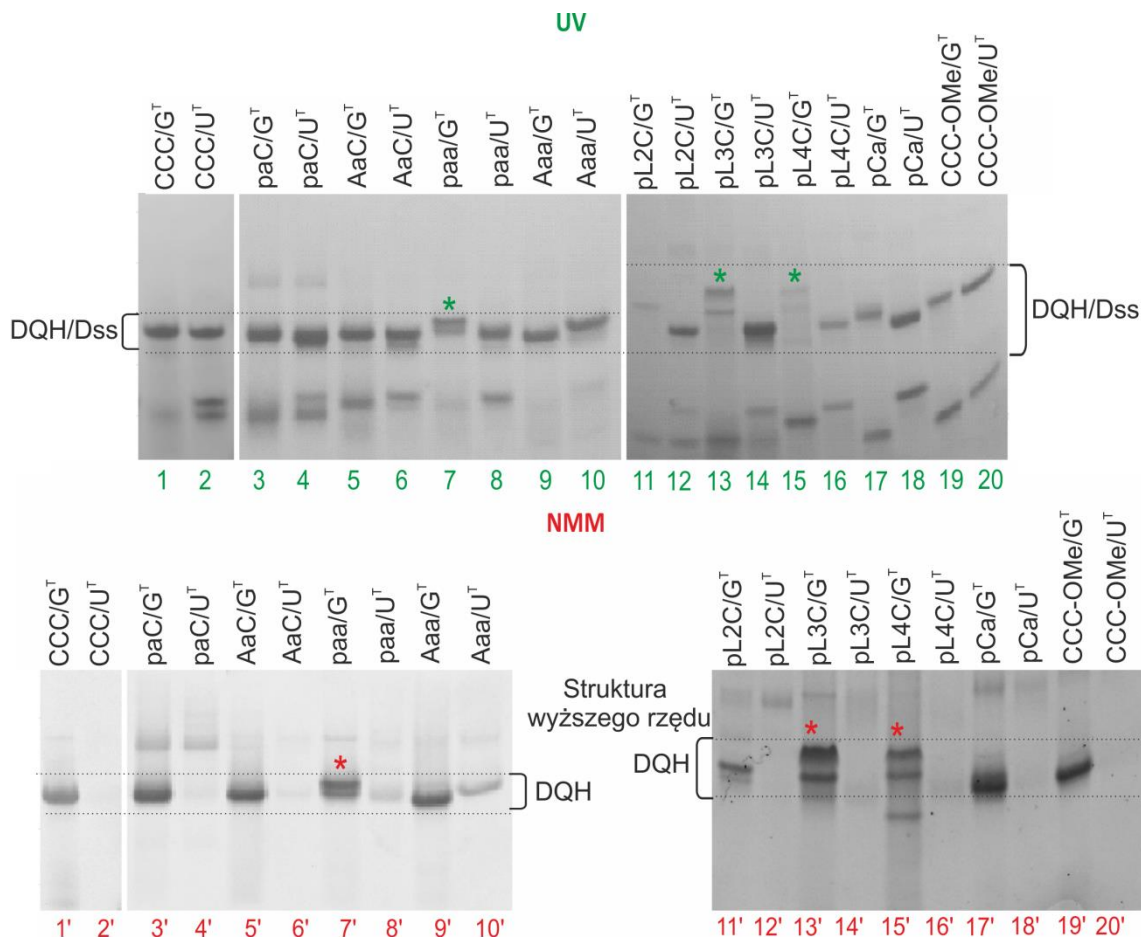
Dla omawianych struktur podjęłam również próbę wyznaczenia parametrów termodynamicznych (rys. 72). Przy ich wyznaczaniu korzystałam z programu MeltWin 3.5 używając dwóch metod: dopasowania topnienia dziewięciu różnych stężeń (regresja

liniowa) oraz zależności wartości parametru T_m od stężenia badanej cząsteczki (T_m^{-1} od $\log C_T$). Pomimo przetestowania wielu zmiennych (zmiana warunków topnienia: od 8 °C do 90 °C i od 90 °C do 8 °C, różna szybkość topnienia 0.2 °C/min do 0.5 °C/min, różne sposoby przygotowania próbek do badań) wyznaczone parametry termodynamiczne, czyli entropia (ΔS°), entalpia (ΔH°) i energia swobodna (ΔG°_{37}) zawsze różniły się między sobą o więcej niż 15%. Takie wyniki świadczyły o niedwustanowym przebiegu termicznej denaturacji i nie pozwalały na wyciągnięcie wniosków w oparciu o parametry termodynamiczne.



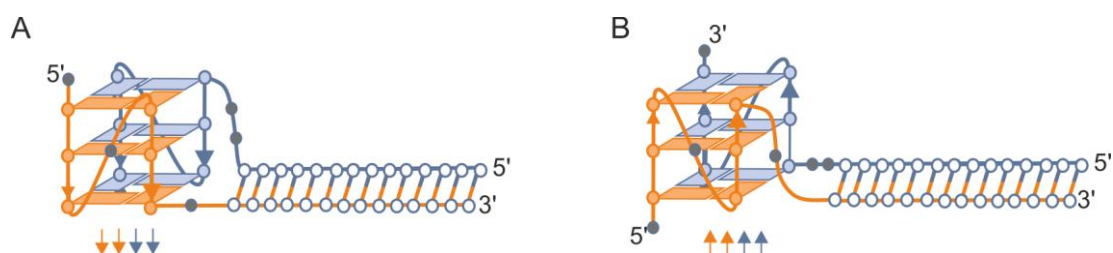
Rys. 72. Nałożenie krzywych topnienia cząsteczki CCC/G^T dla siedmiu stężeń (A), Zestawione dane termodynamiczne (B). Wykres zależności odwrotności temperatury $1/T_m$ od logarytmu stężenia oligorybonukleotydu (C).

Dodatkowe informacje o wpływie poszczególnych modyfikacji na właściwości badanych kompleksów uzyskałam na podstawie obrazów elektroforetycznych (rys. 73). Rozdział elektroforetyczny w warunkach natywnych prowadziłam w obecności kationów potasu. Tak jak poprzednio, żel wizualizowałam początkowo w świetle UV a następnie wybarwiałam go w roztworze zawierającym NMM. Po hybrydyzacji z nicią docelową G^T , wszystkie oligorybonukleotydy antysensowe zawierające modyfikacje migrowały podobnie jak hybryda CCC/G^T a odpowiadające im prążki wybarwiała się w roztworze zawierającym NMM. W przypadku trzech cząsteczek: paa/G^T , $pL3G/G^T$ i $pL4C/G^T$ zaobserwowałam, że odpowiadające im pasma są rozdwojone (rys. 73, zaznaczone zieloną gwiazdką, górny żel) i fluoryzują z podobną intensywnością po dodaniu NMM (zaznaczone czerwoną gwiazdką, dolny żel). Obecność dwóch prążków może odzwierciedlać obecność dwóch konformerów o podobnej stabilności. Powstawanie dwóch różnych form może być następstwem zwiększonej swobody konformacyjnej nienukleotydowej pętli (abasic, linker L3, L4). Na rysunku 74 pokazane są dwie możliwe formy tych hybryd, różniące się jedynie sposobem połączenia obu motywów, dupleksu i kwadrupeksu. Niestety, z uwagi na ich duże podobieństwo, nie istnieje prosta metoda, za pomocą której można by analizować ich strukturę nie w mieszaninie. Są one na tyle podobne, że w widmach NMR nie jest możliwe zaobserwowanie sygnałów od poszczególnych form, zwłaszcza dla cząsteczek o tak dużych masach. Prawdopodobnie problem ten dałoby się łatwo rozwiązać stosując np. selektywne znakowanie izotopowe ^{13}C lub ^{15}N w odpowiednio zaplanowanych pozycjach, wykraczało to jednak poza ramy mojej rozprawy doktorskiej.



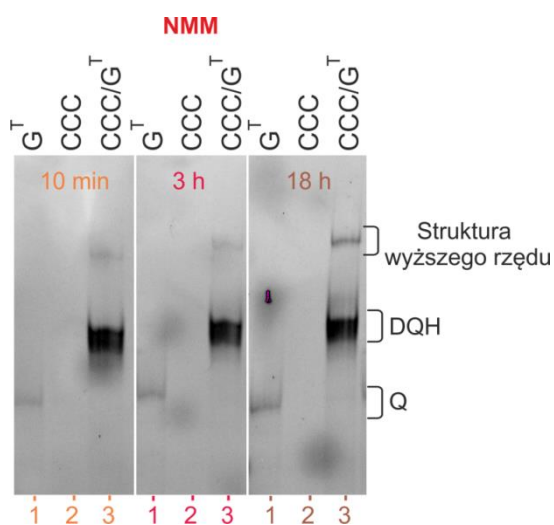
Rys. 73. Porównanie profili migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV (prążki 1-20) oraz wybarwionym w roztworze NMM (prążki 1'-20'). Za wzorzec migracji posłużyły scharakteryzowane wcześniej cząsteczki CCC/G^T oraz CCC/U^T. Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

Analiza żeli pokazała również, że prążki odpowiadające cząsteczkom zawierającym linkery alifatyczne pL2, pL3 i pL4 migrują wolniej niż pozostałe hybrydy. Wszystkie te cząsteczki posiadają zmniejszony ładunek ujemny w wyniku zastąpienia jednej reszty nukleotydowej różnej długości linkerami alifatycznymi. Zmniejszony ładunek ujemny może przejawiać się wolniejszą migracją elektroforetyczną tych cząsteczek.



Rys. 74. Proponowane struktury hybryd typu dupleks-kwadrupleks, różniące się kierunkowością nici (↑↑↑↑) (A) oraz (↓↓↓↓) (B).

Na żelu pokazanym na rysunku 73 oprócz prążków odpowiadających strukturom hybrydowym (prążki 1'-20'), obserwowałam także dużo wolniej migrujące prążki o małej intensywności, wskazujące na tworzenie się struktur wyższego rzędu. Wykonałam dodatkowy eksperyment, w którym monitorowałam zmianę intensywności tego wolno migrującego prążka w czasie. Jak pokazane jest to na rysunku 75, dla cząsteczki **CCC/G^T**, intensywność tego prążka rosła, im więcej czasu minęło pomiędzy hybryzacją nici **CCC** i **G^T** a nałożeniem próbki na żel. Wyniki tego eksperymentu wskazywały jednoznacznie, że cząsteczki te dimeryzują, najprawdopodobniej poprzez oddziaływania warstwowe pomiędzy domenami kwadrupleksowymi.



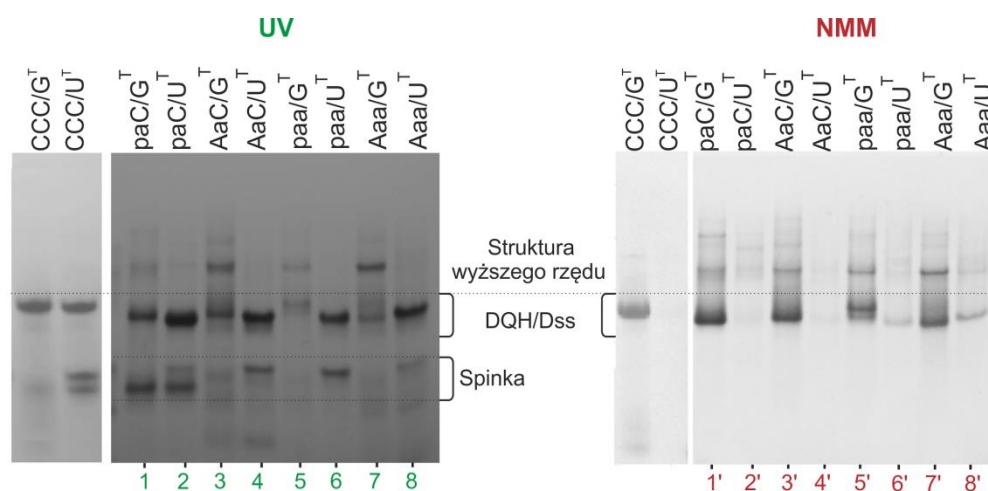
Rys. 75. Porównanie profili migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym wybarwionym za pomocą NMM. Cząsteczki przed nałożeniem na żel pozostawiono na 10 min, 3h oraz 18h w temperaturze pokojowej. Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

Jak już wcześniej wspomniałam (str. 99), planując sekwencje oligorybonukleotydów antysensowych zaproponowałam, aby na końcu 5' umieścić grupę fosforanową. Obecność ujemnego ładunku na końcu 5' miała zapobiegać dimeryzacji kwadrupleksów, gdyż za ten proces są zazwyczaj odpowiedzialne oddziaływania warstwowe typu 5' - 5'. Jednak w przypadku badanych przeze mnie cząsteczek nie zaobserwowałam takiego efektu i dla większości cząsteczek pojawiały się prążki wskazujące na dimeryzację. Zaskoczeniem był dla mnie natomiast brak obecności wolno migrujących prążków dla cząsteczek **Aaa/G^T** oraz **AaC/G^T**, co sugerowało, że obecność reszty adenozyiny na 5' końcu najskuteczniej ogranicza ten niepożądany proces w obecności kationów potasu. Na nieco inne struktury tych cząsteczek wskazywały też widma ¹H NMR, w których obserwowałam zauważalnie różny wzór sygnałów protonów

iminowych pochodzących od G-tetrad w stosunku do widm pozostałych cząsteczek hybryd (rys. 68 A).

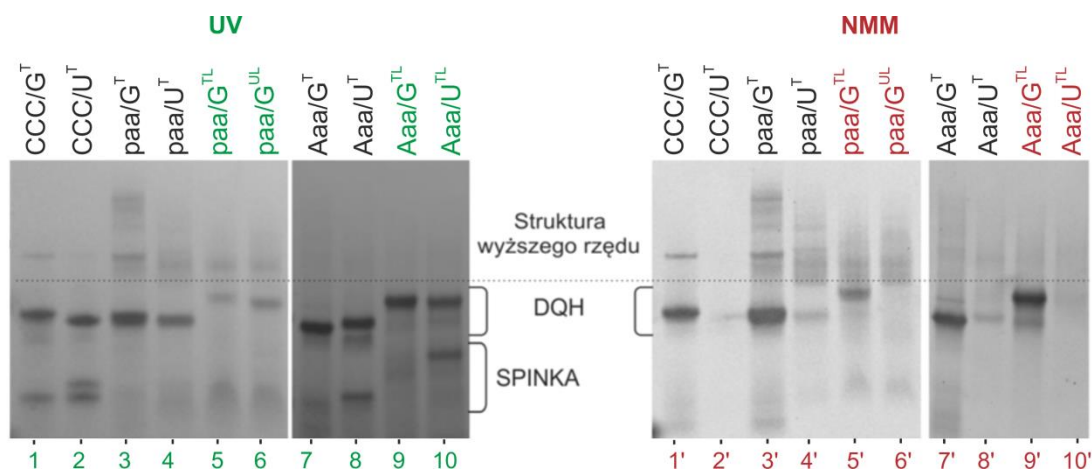
Oligorybonukleotydy antysensowe zawierające modyfikacje po hybrydyzacji z nicią U^T , migrowały podobnie jak wzorcowa cząsteczka CCC/U^T . Odpowiadające im prążki w większości nie wybarwiały się w NMM (parzyste linie), co potwierdzało tworzenie struktur typu **Dss** jako dominującej formy. Wyjątek stanowią cząsteczki **paa/ U^T** , **Aaa/ U^T** , **paC/ U^T** , dla których powstawanie kwadrupleksu w obecności kationów potasu było wcześniej potwierdzone za pomocą analizy widm 1H NMR oraz UV. Po wybarwieniu żelu za pomocą NMM prążek odpowiadający cząsteczce **paC/ U^T** (rys. 73 prążek 4') obserwowany był na poziomie struktur wyższego rzędu. Natomiast prążki pochodzące od cząsteczek **paa/ U^T** (prążek 8') oraz **Aaa/ U^T** (prążek 10') wybarwione za pomocą NMM, migrowały z podobną szybkością do prążków odpowiadających hybrydom **paa/ G^T** oraz **paa/ G^T** . Należy podkreślić, że intensywność prążków przypisanych cząsteczkom **paa/ U^T** i **Aaa/ U^T** po związaniu NMM jest wyraźnie niższa niż odpowiadających im struktur z domeną kwadrupleksu, **paa/ G^T** i **Aaa/ G^T** .

Dla oligorybonukleotydów antysensowych zawierających modyfikacje typu abasic, które po hybrydyzacji z nicią U^T w obecności kationów potasu wykazywały zdolność do tworzenia struktur kwadrupleksowych, przeprowadziłam także rozdział elektroforetyczny w środowisku kationów sodu. Po wybarwieniu żelu roztworem NMM (rys. 76) zaobserwowałam zróżnicowaną intensywność prążków. Prążki odpowiadające cząsteczkom zawierającym nic G^T są dużo bardziej intensywne niż te po asocjacji z nicią U^T . Prążki wskazujące na tworzenie domeny kwadrupleksu w obecności kationów sodu obserwowałam dla cząsteczek **paa/ U^T** oraz **Aaa/ U^T** , jednak ich intensywność była niewielka. Nie obserwowałam natomiast prążków świadczących o zawiązywaniu kwadrupleksu w przypadku cząsteczki **paC/ U^T** . Najprawdopodobniej jest to związane z mniejszą stabilnością domeny kwadrupleksowej w środowisku jonów sodu (48.6 °C) w stosunku do jej stabilności w obecności kationów potasu (68.6 °C).



Rys. 76. Porównanie profili migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV (prążki 1-10) oraz wybarwionym w roztworze NMM (prążki 1'-10'). Za wzorec migracji posłużyły cząsteczki CCC/G^T oraz CCC/U^T scharakteryzowane wcześniej. Eksperymenty wykonano w buforze sodowym.

Planując sekwencje nici docelowych G^T i U^T skupiałam się głównie na fragmencie bogatym w reszty guanozyny oraz zachowaniu ich komplementarności w domenie dupleksowej. Z uwagi na fakt, że dużą część moich badań stanowiły eksperymenty NMR, zależało mi na tym, aby jak najbardziej ograniczyć wielkość badanych cząsteczek. Jednakże otrzymane wyniki, które wskazywały na tworzenie się struktur kwadrupleksowych po związaniu z nicią U^T skłoniły mnie, aby sprawdzić, czy długość sekwencji docelowych może mieć wpływ na struktury powstające po zasocjowaniu ich z oligorybonukleotydami antysensowymi. W tym celu zaprojektowałam i przebadalam, wydłużone o 9 reszt nukleotydowych, cząsteczki RNA o sekwencjach docelowych GL^T i UL^T (tabela 1). Na rysunku 77 pokazany jest rozdział elektroforetyczny po wybarwieniu za pomocą NMM, na którym różnica intensywności prążków odzwierciedla tendencje badanych cząsteczek do tworzenia kwadrupleksów. Jak widać, niezależnie od długości sekwencji, G^T vs GL^T , po hybrydyzacji z nicią antysensową **paa** oraz **Aaa** powstające struktury drugorzędowe zawierają domeny kwadrupleksowe (prążek 5', 9'). Z kolei zastąpienie sekwencji U^T jej dłuższym odpowiednikiem UL^T , zapobiegało tworzeniu się kwadrupleksów (prążek 6', 10'). Wynik tego eksperymentu był dla mnie bardzo ważny, gdyż pokazywał, że być może niezależnie od typu modyfikacji (**paa**, **Aaa**) w warunkach komórkowych będzie można obserwować powstawanie zróżnicowanych struktur **DQH** i **Dss** w zależności od jednonukleotydowej różnicy w sekwencji docelowej.

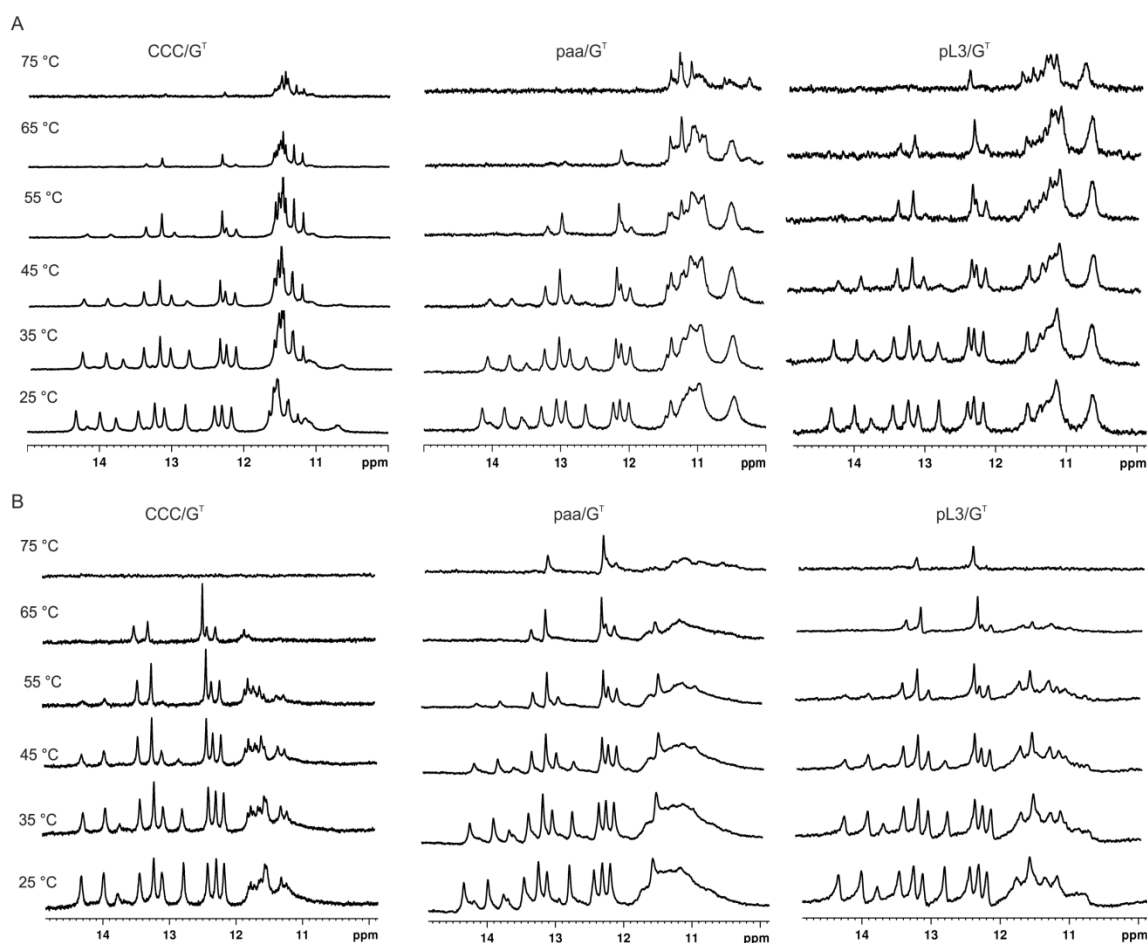


Rys. 77. Porównanie migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych wizualizowanym w świetle UV (prążki 1-10) oraz wybarwionym za pomocą roztworu NMM. Za wzorec szybkości migracji posłużyły cząsteczki CCC/G^T oraz CCC/U^T . Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

Na podstawie analizy krzywych topnienia nie mogłam uzyskać informacji o wpływie modyfikacji chemicznych na stabilności poszczególnych domen, dupleksowej i kwadrupleksowej. Postanowiłam sprawdzić, czy za pomocą widm ^1H NMR, w których sygnały pochodzące od obu domen są dobrze rozdzielone, będę w stanie uzupełnić te brakujące informacje. Z uwagi na ograniczenia wynikające ze specyfikacji głowicy (CryoProbe), na której wykonywałam pomiary, maksymalną temperaturą było $75\text{ }^\circ\text{C}$. Na rysunku 78 przedstawiłam zależności temperaturowe widm ^1H NMR dla cząsteczek CCC/G^T , paa/G^T oraz pL3C/G^T w obecności kationów K^+ oraz Na^+ . Jak widać na rys. 78 A, domena kwadrupleksu jest stabilniejsza w środowisku kationów potasu od domeny dupleksu. Sygnały pochodzące od G-tetrad są widoczne nawet w temperaturze $75\text{ }^\circ\text{C}$, podczas gdy te od dupleksu zanikają już wcześniej. Dodatkowo, w porównaniu do cząsteczki modelowej CCC/G^T , dla cząsteczek zawierających nienukleotydowe modyfikacje intensywność sygnałów protonów iminowych wydaje się być nieco większa. Natomiast, jak można się było spodziewać, stabilność domeny dupleksu jest porównywalna dla wszystkich trzech badanych cząsteczek. Z kolei w obecności kationów sodu (rys. 78 B) domena kwadrupleksu jest wyraźnie mniej trwała od domeny dupleksu. W tych warunkach tylko dla hybrydy paa/G^T , zawierającej dwie reszty abasic, sygnały iminowe pochodzące od domeny kwadrupleksu zanikały wolniej niż w przypadku dwóch pozostałych cząsteczek.

Obserwacje te są w zasadzie zgodne z wnioskami otrzymanymi z analizy widm UV. Dane NMR jednoznacznie pokazały, że w obecności kationów potasu, które powszechnie

występują w komórce, to domena kwadrupleksowa ma większy przyczynek do stabilności całej hybrydy niż domena dupleksowa a wprowadzenie nienukleotydowych modyfikacji dodatkowo, choć w niewielkim stopniu, stabilizuje domenę kwadrupleksu.

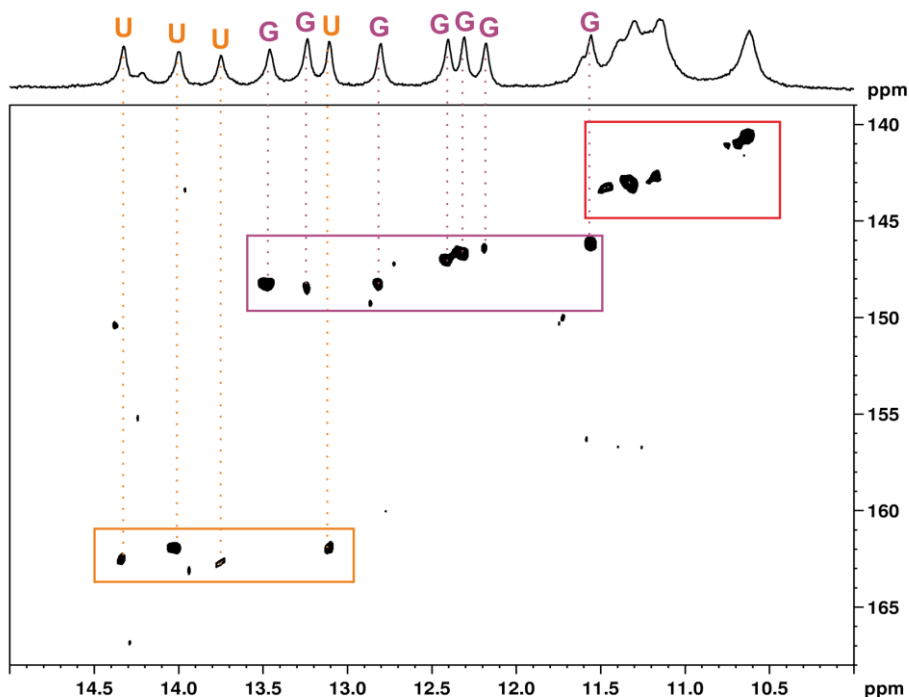


Rys. 78. Zależność temperaturowa widm ^1H NMR dla cząsteczek CCC/G^{T} , paa/G^{T} oraz pL3C/G^{T} w obecności kationów potasu (A) oraz sodu (B).

Jak widać na rysunku 78, nie wszystkie sygnały od domeny dupleksowej zanikają jednocześnie. Oprócz monitorowania zaniku poszczególnych domen w hybrydzie typu dupleks-kwadrupleks, spektroskopię NMR postanowiłam wykorzystać do sprawdzenia, które z par zasad lub G-tetrad, jako pierwsze, ulegają rozpleceniu. Sądziłam, że zidentyfikowanie tych miejsc w strukturze hybrydy pomoże mi zrozumieć, dlaczego proces topnienia jest niezgodny z modelem dwustanowym. W tym celu konieczne było przypisanie sygnałów w widmie poszczególnym resztom.

Widma ^1H NMR badanych przeze mnie cząsteczek wykazują duże podobieństwo w regionie iminowym (rys. 68 - 69). Dlatego też widma dwuwymiarowe zarejestrowałam tylko dla reprezentatywnej cząsteczki, paa/G^{T} . W celu przypisania sygnałów protonów iminowych poszczególnym typom par zasad (G:C, A:U) lub G-tetrad, w pierwszej

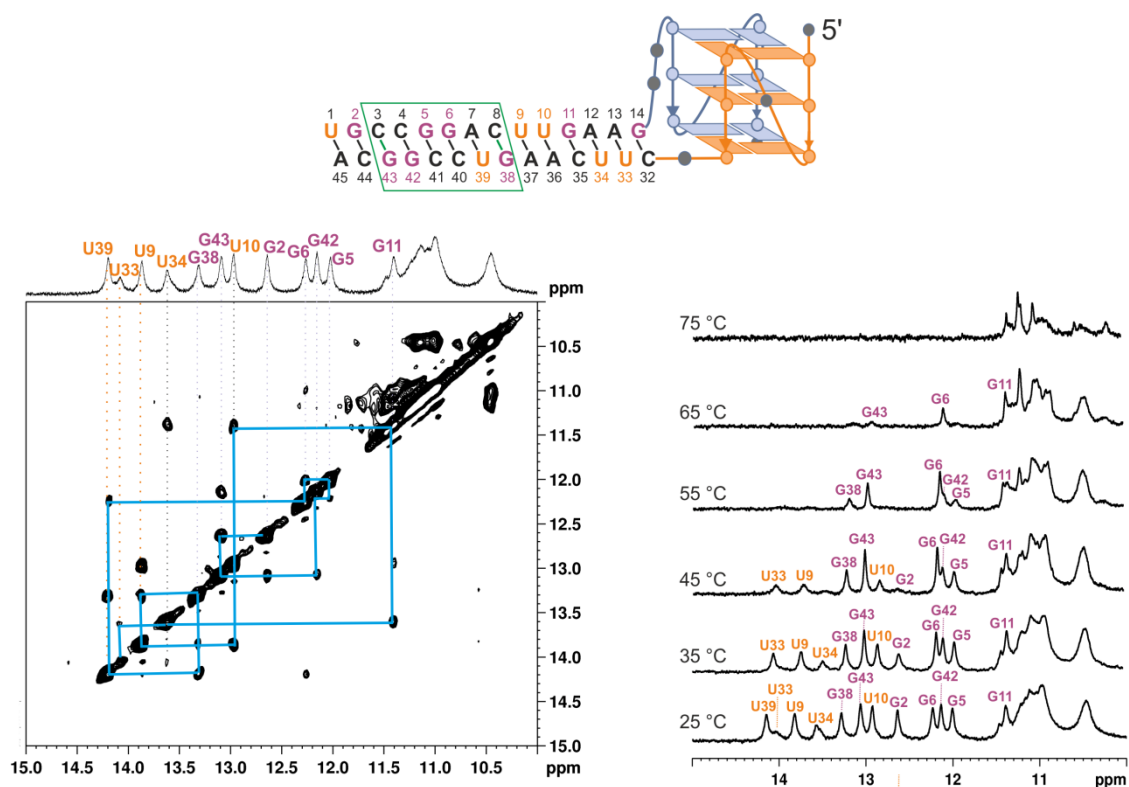
kolejności otrzymałam heterojądrowe widmo korelacyjne 2D ^1H - ^{15}N HSQC (ryc. 79). W widmie tym obserwuje się sygnały korelacyjne pomiędzy atomem wodoru a bezpośrednio związanym z nim atomem azotu ^{15}N . Na podstawie charakterystycznych przesunięć chemicznych atomów azotu ^{15}N dla reszt guanozyny (~147 ppm) i urydyny (~162 ppm) w parach zasad Watsona-Cricka oraz reszt guanozyny w G-tetradach (~142 ppm) przypisałam sygnały pochodzące od tych reszt.(138) Jednocześnie ze względu na znaczne poszerzenie i nałożenie się sygnałów protonów iminowych G-tetrad (~11.7-10.3 ppm), ich jednoznaczne przypisanie nie jest możliwe.



Rys. 79. Widmo ^1H - ^{15}N HSQC zarejestrowane dla cząsteczki **paa/G^T** w buforze potasowym.

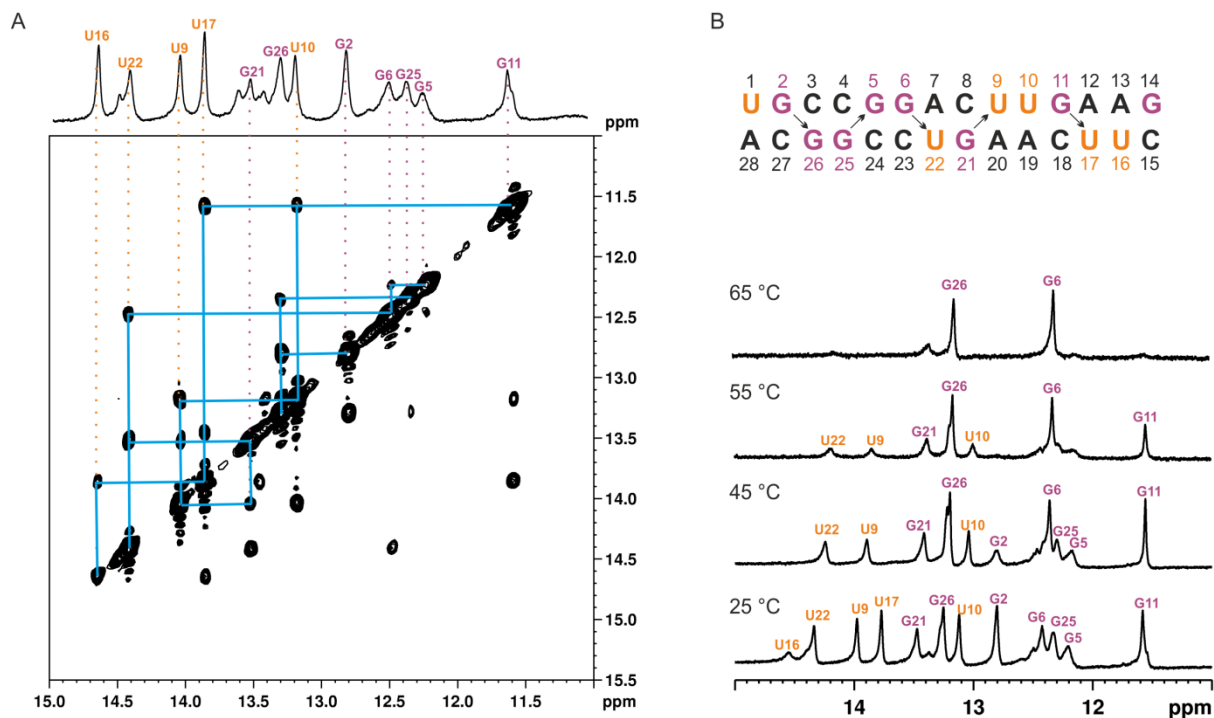
Ponieważ sygnały pochodzące od domeny dupleksu są dobrze rozdzielone, postanowiłam przypisać je stosując standardowe metody przypisywania sygnałów w widmach NMR dla cząsteczek RNA.(138) Zarejestrowałam w tym celu widmo 2D ^1H - ^1H NOESY i analizując sygnały korelacyjne NOE pomiędzy protonami iminowymi sąsiadujących ze sobą par zasad (rys. 80) przypisałam 12 sygnałów, które odpowiadają parom zasad od G2:A13 do U33:C44. Przypisania sygnałów do poszczególnych reszt zaznaczone są na rysunkach. Z uwagi na zwiększoną szybkość wymiany z wodą, w widmie nie obserwowałam sygnałów pochodzących od końcowej pary zasad (U1:A45) oraz od znajdującej się na połączeniu domen pary G14:C32.

Znając przypisania sygnałów iminowych w domenie dupleksowej powróciłam do analizy widm ^1H NMR wykonanych w funkcji temperatury (rys. 80). Obserwując zanikanie poszczególnych sygnałów wraz ze wzrostem temperatury zauważyłam, że najtrwalszym rejonem w domenie dupleksu jest fragment pomiędzy parami G43:C3 a G38:C8 (rys. 80, zielona ramka) a topnienie dupleksu rozpoczyna się jednocześnie w miejscu połączenia obu domen oraz od końca U1:A45.



Rys. 80. Rejon iminowo-iminowy widma 2D ^1H - ^1H NOESY zarejestrowanego dla cząsteczki **paa/G^T** wraz z wyznaczoną ścieżką połączeń sekwencyjnych. Temperaturowa zależność widma ^1H NMR dla **paa/G^T**. Widma wykonano w buforze potasowym.

Również dla cząsteczki referencyjnej, dupleksu **DX**, przeprowadziłam podobną analizę. Przypisałam sygnały iminowe (na podstawie analizy widma 2D ^1H - ^1H NOESY) oraz zarejestrowałam widma protonowe w zakresie temperatur 25 - 65 °C (rys. 81). W widmach dupleksu **DX**, także jako pierwsze zanikają sygnały pochodzące od protonów iminowych par zasad na końcach 5' i 3' a najstabilniejszy fragment usytuowany jest w jego środkowej części.



Rys 81. Fragment iminowo-iminowy widma 2D ^1H - ^1H NOESY wraz z wyznaczoną ścieżką połączeń sekwencyjnych (A). Zależność temperaturowa widm ^1H NMR dla cząsteczki dupleksu (DX) w obecności kationów potasu (B).

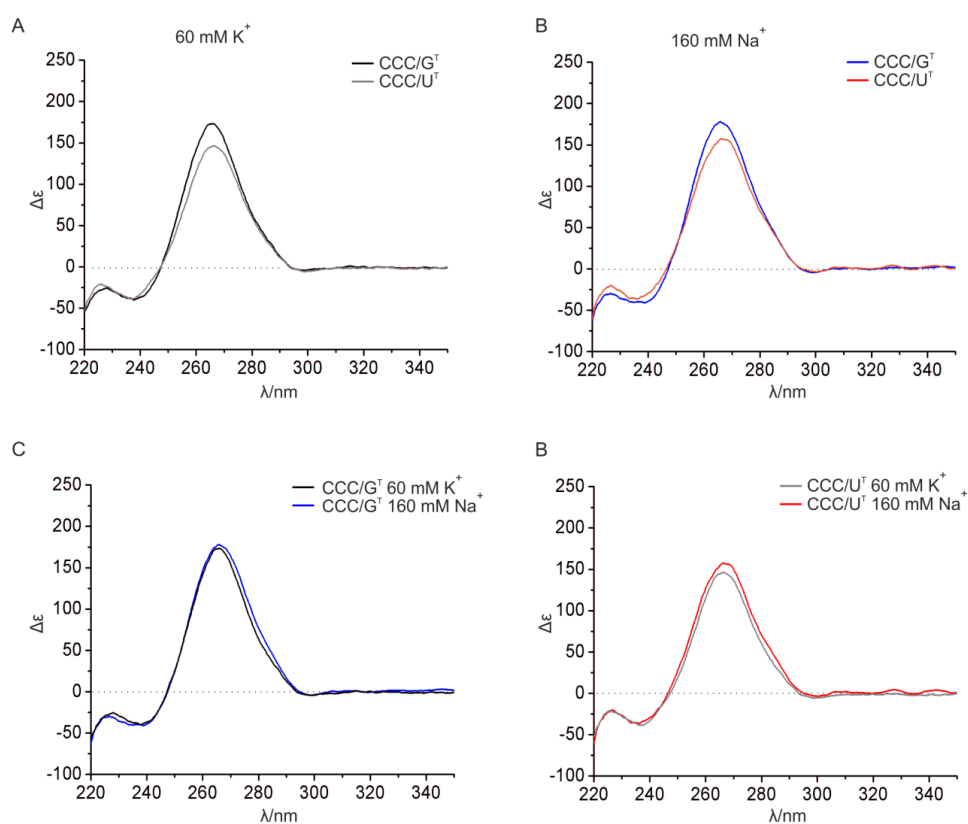
Próbując wyjaśnić przyczyny niezgodnego z modelem dwustanowym procesu denaturacji układów hybrydowych w oparciu o wyniki otrzymane z analizy widm NMR, uważam, że może to być wynikiem różnej stabilności poszczególnych domen, dupleksu i kwadrupleksu. W momencie, gdy dupleks ulega rozpleceniu, kwadrupleks nadal pozostaje ustrukturyzowany (rys. 78). Niezgodność procesu topnienia z modelem dwustanowym może zależeć także od innych czynników, jednak aby móc to jednoznacznie wyjaśnić, konieczne byłyby dalsze eksperymenty, w których np. analizowane byłyby hybrydy o różnej długości domeny dupleksu, czy sekwencji zasad. Zagadnienie to jednak nie było głównym celem moich badań.

Widma CD

Dzięki charakterystycznym wzorom widm, spektroskopia CD dostarcza cennych informacji o strukturach kwadrupleksów, w szczególności kwadrupleksów DNA (rozdział V.6.1; *Dichroizm kołowy*). Niestety, w przypadku badanych przeze mnie hybrydowych układów RNA typu dupleks-kwadrupleks, technika CD ma jedynie ograniczone zastosowanie, gdyż widma CD równoległych kwadrupleksów są bardzo podobne do widm

dupleksów A-RNA. Niemniej jednak, wykorzystując spektroskopię CD mogłam wykluczyć antyrównoległą topologię domeny kwadrupleksowej (rys. 30 A). Choć typowe kwadrupleksy RNA są w przeważającej większości równoległe, to znane są wyjątki od tej reguły nawet dla ich niemodyfikowanych chemicznie cząsteczek (rozdział V.3.).

Na rysunku 82 A i B porównane są widma CD cząsteczek **CCC/G^T** i **CCC/U^T** zarejestrowane w obecności kationów potasu i sodu. W przypadku obu cząsteczek widoczne jest dominujące pasmo z maksimum absorpcji przy ~ 265 nm i ujemne pasmo z minimum przy 240 nm, co jest charakterystyczne dla dupleksów typu A-RNA oraz równoległych kwadrupleksów. W obu przypadkach amplituda pasma absorpcji przy 265 nm jest większa dla **CCC/G^T** niż dla **CCC/U^T**.

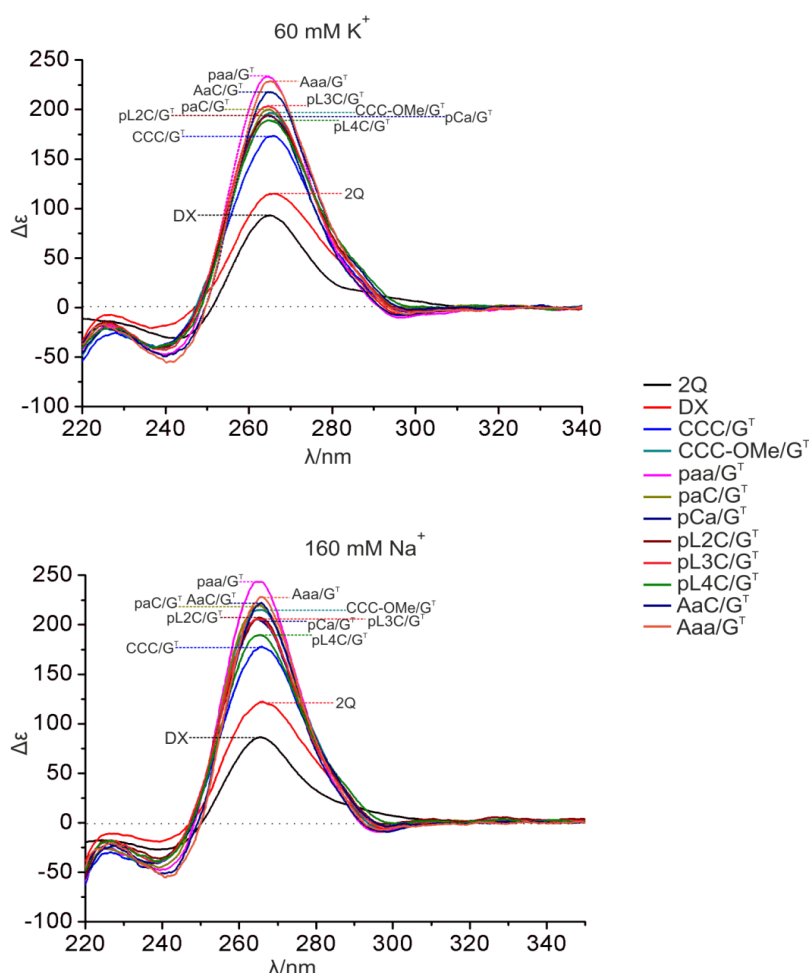


Rys 82. Porównanie widm CD cząsteczek **CCC/G^T** i **CCC/U^T** zarejestrowanych w buforze potasowym (A) oraz sodowym (B). Widma CD cząsteczki **CCC/G^T** w obecności kationów K^+ (linia czarna) i Na^+ (linia niebieska) (C) oraz cząsteczki **CCC/U^T** w obecności kationów K^+ (linia szara) i Na^+ (linia czerwona) (D).

Jest to wynik zgodny z oczekiwanym, gdyż na kształt i amplitudę widma CD struktury hybrydowej sumują się efekty Cottona pochodzące zarówno od motywu kwadrupleksu jak i dupleksu. W przypadku cząsteczek **Dss** widmo CD powinno odzwierciedlać motyw dupleksu oraz ewentualny przyczynek do całkowitej amplitudy, pochodzący od końców bogatych w reszty guanozyny. Profile widm CD cząsteczek

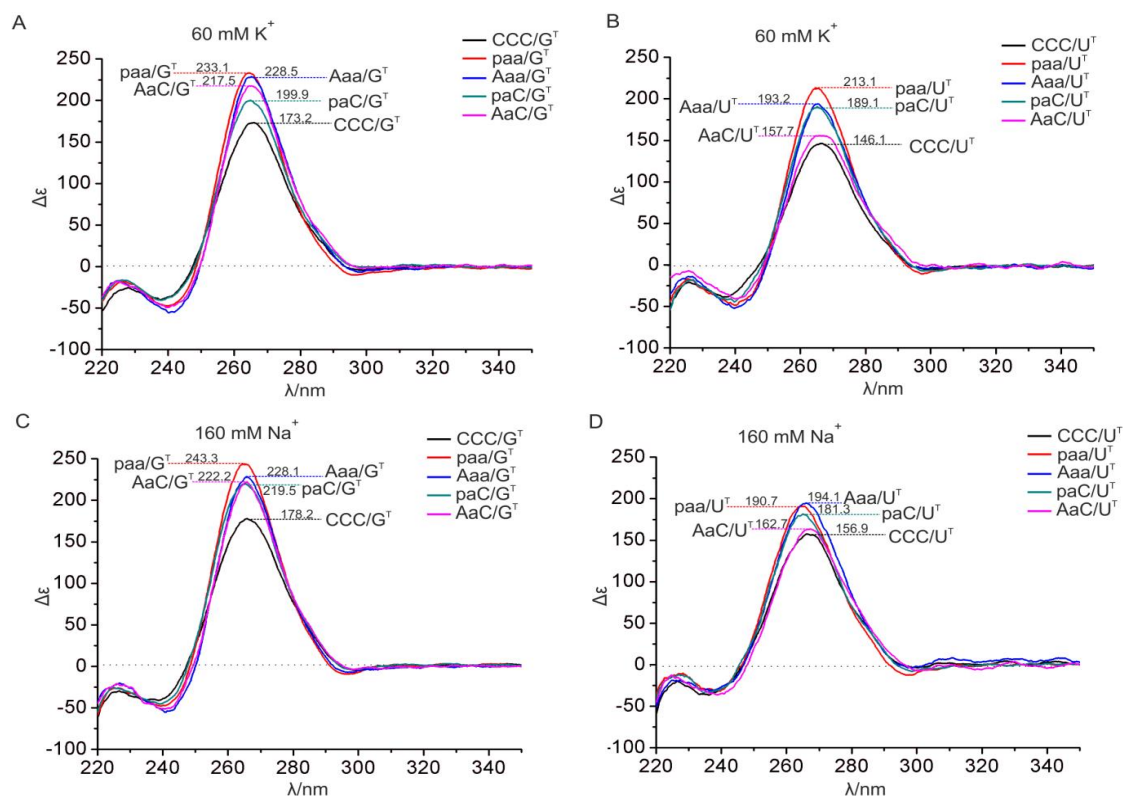
CCC/G^T i CCC/U^T pozostają takie same, niezależnie od użytego buforu, potasowego lub sodowego. Obserwacja ta stanowi dodatkowe potwierdzenie, że niezależnie od warunków roztworu cząsteczka CCC/G^T przyjmuje strukturę hybrydy typu dupleks-kwadrupleks a w przypadku cząsteczki CCC/U^T zawsze tworzy się dupleks z nieuporządkowanymi końcami.

Na rysunku 83 zebrane są widma zarejestrowane dla wszystkich badanych przeze mnie struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleksu (**DX**) i kwadrupleksu (**2Q**), zarówno w obecności kationów K^+ jak i Na^+ . Wszystkie krzywe CD struktur hybrydowych mają podobny kształt, co jednoznacznie wskazywało, że obecność modyfikacji chemicznych nie wpływa na równoległą topologię domeny kwadrupleksu. Widać natomiast, że maksima intensywności pasma przy 265 nm są największe dla cząsteczek zawierających modyfikacje typu abasic.



Rys 83. Widma CD cząsteczek hybrydowych DQ/G^T oraz dupleksu (**DX**) i kwadrupleksu (**2Q**) w obecności kationów potasu oraz sodu.

W widmach ^1H NMR cząsteczek **paa/U^T**, **Aaa/U^T**, **paC/U^T** i **AaC/U^T** zarejestrowanych w obecności kationów K^+ obserwowaliśmy sygnały świadczące o tworzeniu się niepożądanych struktur kwadrupleksowych (rys. 68 B). Zarejestrowane widma ^1H NMR w obecności kationów Na^+ jednoznacznie potwierdzały tworzenie się struktur kwadrupleksowych dla cząsteczek **paa/U^T** i **Aaa/U^T**, z kolei dla dwóch pozostałych cząsteczek sygnały w rejonie typowym dla G-tetrad były zdecydowanie mniej intensywne. Analiza żelu w warunkach natywnych wskazywała na dwucząsteczkową budowę kwadrupleksu tylko w przypadku cząsteczek **paa/U^T** i **Aaa/U^T**, niezależnie od warunków prowadzenia eksperymentu (Na^+ lub K^+) (rys. 73, 76). Zastanawiałam się, czy porównując widma CD będę potrafiła znaleźć dodatkowe argumenty potwierdzające obecność G-tetrad w cząsteczkach zawierających modyfikacje abasic oraz sekwencję docelową **U^T**. Na rysunku 84 zestawione są widma CD z naniesionymi wartościami amplitud (w obecności kationów K^+ oraz Na^+) cząsteczek **Aaa/G^T**, **paa/G^T**, (rys. 84 A, C) oraz **Aaa/U^T**, **paa/U^T** (rys. 84 B, D). Dla porównania zestawione są z widmami modelowych cząsteczek **CCC/G^T** oraz **CCC/U^T**.



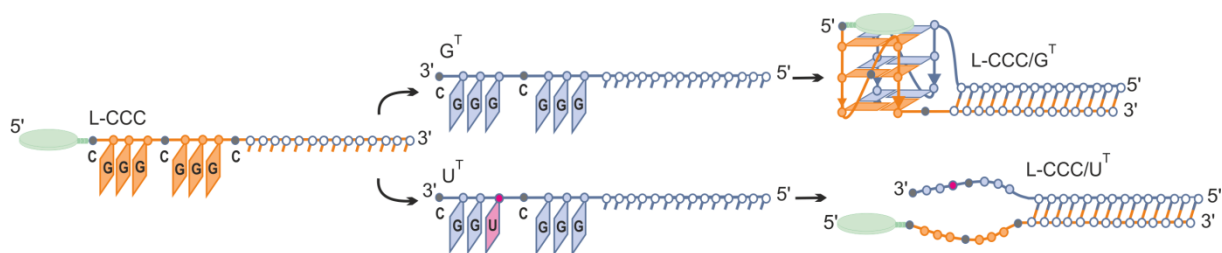
Rys. 84. Widma CD dla cząsteczek **CCC/G^T**, **paa/G^T**, **Aaa/G^T**, **paC/U^T**, **AaC/U^T** (A) oraz **CCC/U^T**, **paa/U^T**, **Aaa/U^T**, **paC/U^T**, **AaC/U^T** (B) w obecności jonów K^+ . Eksperyment prowadzony w obecności jonów Na^+ (C, D). Dla każdej z cząsteczek wpisane zostały wartości ich amplitud przy długości fali 265 nm.

Jak widać, wartości amplitudy w widmach CD cząsteczek zawierających dwie modyfikacje abasic (**paa/U^T**, **Aaa/U^T**) są znacznie większe niż w przypadku cząsteczki **CCC/U^T**. Efekt ten nie zależy znacząco od warunków roztworu (K^+ vs. Na^+). Można więc przypuszczać, że wyższa amplituda widm CD obserwowana dla cząsteczek **paa/U^T** i **Aaa/U^T** jest wynikiem obecności w roztworze pewnej populacji kwadrupleksu. Dokładne wyjaśnienie tego zjawiska wymagałoby jednak dodatkowych badań.

VI. 5. Badanie oddziaływań G4-ligandów z modelowymi strukturami DQH oraz Dss

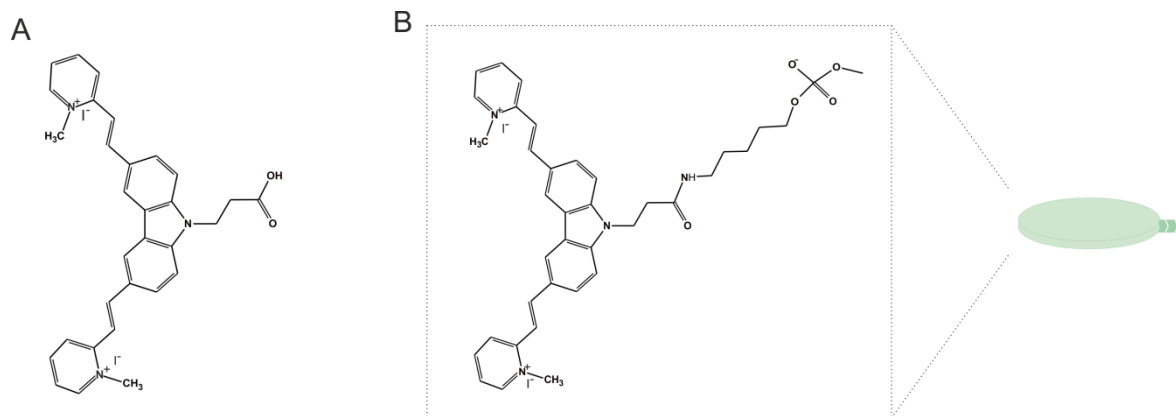
Aby zapewnić wysoką efektywność i selektywność dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na wyciszenie mRNA zawierającego mutację punktową U→G, zależało mi, aby struktury **DQH** i **Dss** znacznie różniły się stabilnością (rys. 50).

Niestety okazało się, że nie wszystkie uzyskane przeze mnie wyniki były w tym względzie zadowalające. Znaczącą różnicę, około 8 °C, pomiędzy stabilnością struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks a odpowiadającymi im dupleksami z nieuporządkowanymi końcami obserwowałam jedynie w obecności kationów potasu. Dlatego też postanowiłam poszerzyć moje badania o wykorzystanie G4-ligandów. Jak już wcześniej opisałam w części literaturowej (rozdział V. 4. 4.), większość G4-ligandów wiąże się z kwadrupleksami DNA lub RNA niezależnie od ich topologii i zazwyczaj je stabilizuje. Obecnie dużym wyzwaniem dla naukowców jest otrzymanie takich ligandów, które nie tylko rozróżniałyby kwadrupleksy DNA od RNA, ale aby ich selektywność zależna była od struktury danego kwadrupleksu. Mając na uwadze zdolność G4-ligandów do stabilizacji kwadrupleksów postanowiłam zbadać, jaki wpływ na stabilność struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks ma kowalencyjne dołączenie do oligorybonukleotydu antysensowego liganda wykazującego powinowactwo względem kwadrupleksów (rys. 85). Uznałam, że takie podejście oparte na kontrolowanym tworzeniu hybrydy strukturalnej typu dupleks-kwadrupleks na matrycy mRNA, indukowane antysensowym oligorybonukleotydem z przyłączonym kowalencyjnie G4-ligandem (L-DQ), powinno przyczynić się do efektywniejszej inhibicji translacji.



Rys. 85. Schematyczne przedstawienie efektu wiązania się **L-CCC** do sekwencji docelowych **G^T**, **U^T** z utworzeniem struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks, **L-CCC/G^T**, oraz duplexu z nieuporządkowanymi końcami, **L-CCC/U^T**.

Pierwszym problemem, z jakim przyszło mi się zmierzyć, był wybór odpowiedniego liganda. Spośród powszechnie znanych G4-ligandów, rozważałam wykorzystanie NMM, PDS lub o-BMVC (rozdział V. 4. 4.), które zazwyczaj stabilizują kwadrupleksy. Ligand o-BMVC wydał mi się najbardziej odpowiedni z kilku powodów. Związek ten wykazuje 80-120 krotne wzmocnienie fluorescencji w obecności kwadrupleksów, a stała wiązania do kwadrupleksów jest rzędu 10^7 M^{-1} . Ponadto duża wartość przesunięcia Stokesa (przesunięcie maksimum pasma absorpcji względem emisji dla tego samego stanu wzbudzonego wynosi ok. 100 nm) oraz przesunięcie o około 25 nm w stronę dłuższych fal pasma absorpcji o-BMVC w kompleksie z kwadrupleksem w porównaniu z dupleksem, minimalizuje jego addytywny wpływ na emisję fluorescencji kompleksu o-BMVC:kwadrupleks. Warto również wspomnieć o 2.0-2.5 krotnym wydłużeniu czasu zaniku fluorescencji o-BMVC w obecności kwadrupleksu w stosunku do duplexu lub pojedynczej nici, co znalazło zastosowanie w bioobrazowaniu kwadrupleksów w komórkach techniką FLIM (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*).⁽¹⁷⁵⁾ Dodatkowym atutem o-BMVC była jego budowa chemiczna i stosunkowo łatwa synteza nowych pochodnych tego liganda przystosowanych do kowalencyjnego przyłączenia do oligorybonukleotydu antysensowego.⁽¹⁴⁵⁾ Ligand o-BMVC (rys. 39 C) nie jest dostępny komercyjnie i został zsyntezowany przez dr Daniela Baranowskiego z Zakładu Biomolekularnego NMR. Dr Baranowski otrzymał dodatkowo pochodną o-BMVC podstawioną kwasem 9-propionowym (**o-BMVC-C3**, rys. 86 A). Pochodna ta została dalej wykorzystana do syntezy aktywnego estru, o-BMVC-C3-NHS, który następnie został przyłączony do 5'-końca modelowego oligorybonukleotydu antysensowego CCC poprzez C6-aminolinker (**o-BMVC-C3-CCC**) (rys. 85).



Rys. 86. Wzory strukturalne: o-BMVC-C3 (A) oraz fragmentu cząsteczki o-BMVC-C3-CCC od końca 5' (o-BMVC-C3-aminolinker-) (B).

Badania rozpoczęłam od wyznaczenia stechiometrii wiązania i stałej asocjacji, K_a , dla obu ligandów: **o-BMVC** (rys. 39 C) i **o-BMVC-C3** (rys. 86 B). Do dalszych eksperymentów wytypowałam 4 cząsteczki hybryd (**CCC/G^T**, **paa/G^T**, **Aaa/G^T** oraz **pL3C/G^T**), jedną cząsteczkę o strukturze duplesu z nieuporządkowanymi końcami (**CCC/U^T**) oraz duples (**DX**).

Ligandy **o-BMVC** oraz **o-BMVC-C3** w buforze zawierającym 50 mM KCl wykazywały bardzo słabą emisję fluorescencji. Miareczkowanie roztworu liganda roztworem wymienionych powyżej oligorybonukleotydów posłużyło do wyznaczenia stałej asocjacji na podstawie analizy krzywej wzrostu intensywności fluorescencji w zależności od stężenia oligorybonukleotydów. Dane te zostały zebrane w tabeli 3. Otrzymane wyniki wskazują, że badane ligandy mają 7-22 krotnie większe powinowactwo do struktur zawierających motyw kwadrupleksu niż do pozostałych struktur (**CCC/U^T** oraz **DX**). Stałe wiązania obu ligandów do struktur hybrydowych są porównywalne i poza jednym przypadkiem, **paa/G^T**, wartości te są nieznacznie większe dla pochodnej **o-BMVC-C3**. Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 3, wartości stałej wiązania obu ligandów do hybrydy **paa/G^T** są co najmniej dwukrotnie większe niż dla pozostałych struktur hybrydowych. Wydaje się, że to obecność grupy fosforanowej na końcu 5' oraz obecność reszt abasic są odpowiedzialne za silniejsze wiązanie ligandów.

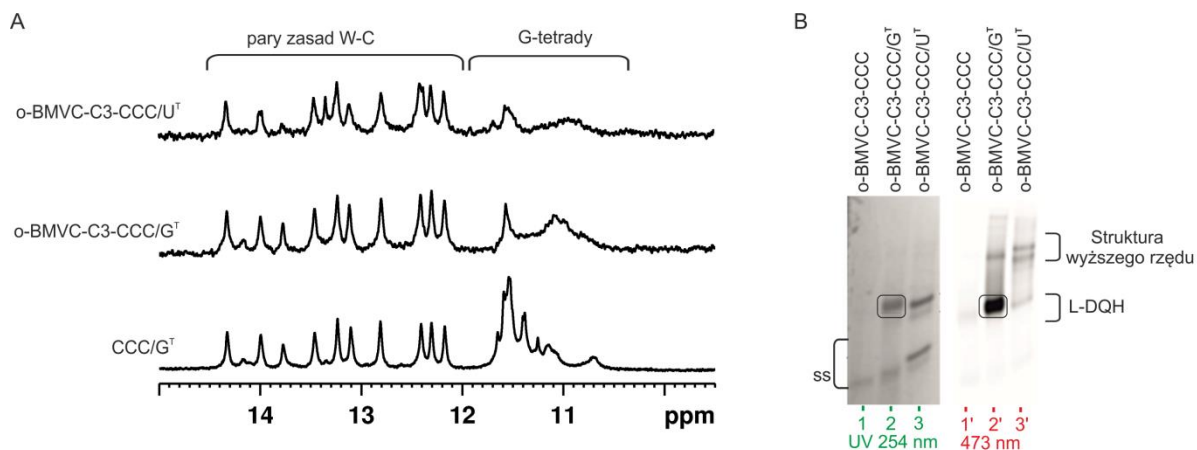
Analiza otrzymanych danych pozwoliła również na oszacowanie liczby miejsc wiązania cząsteczek ligandów w poszczególnych strukturach. Do każdej cząsteczki hybrydy wiążą się dwie cząsteczki liganda, co sugeruje oddziaływania warstwowe z końcowymi G-tetradami. Natomiast wyznaczona liczba miejsc wiązania ligandów do duplesów wynosi od siedmiu do ośmiu. Najprawdopodobniej odzwierciedla to fakt, że w

przypadku struktur dupleksowych dodatkowo naładowane ligandy mogą oddziaływać niespecyficycznie za pomocą oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi.

Tabela 3. Wartości stałych asocjacji K_a [M^{-1}] dla oddziaływania ligandów **o-BMVC** i **o-BMVC-C3** z badanymi cząsteczkami w buforze zawierającym 50 mM KCl.

Nazwa	Stała wiązania [K_a]; o-BMVC	Liczba n	Stała wiązania [K_a]; o-BMVC-C3	Liczba n
Hybrydy typu dupleks-kwadrupleks				
paa/G^T	$2.2 \pm 0.1 \times 10^6$	1.9 ± 0.1	$1.9 \pm 0.1 \times 10^6$	1.9 ± 0.1
Aaa/G^T	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$	2.2 ± 0.1	$1.3 \pm 0.1 \times 10^6$	2.5 ± 0.1
pL3C/G^T	$1.0 \pm 0.1 \times 10^6$	2.3 ± 0.1	$1.3 \pm 0.1 \times 10^6$	2.1 ± 0.1
CCC/G^T	$0.7 \pm 0.01 \times 10^6$	2.2 ± 0.1	$0.9 \pm 0.01 \times 10^6$	2.2 ± 0.1
Dupleksy				
CCC/U^T	$0.27 \pm 0.01 \times 10^6$	8.0 ± 0.1	$0.2 \pm 0.01 \times 10^6$	7.0 ± 0.1
DX	$0.1 \pm 0.01 \times 10^6$	8.0 ± 0.1	$0.09 \pm 0.001 \times 10^6$	8.0 ± 0.1

W kolejnym kroku postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ na strukturę i stabilność badanych cząsteczek ma kowalencyjne przyłączenie **o-BMVC-C3**. Na rysunku 87 A zestawione są widma 1H NMR cząsteczek **CCC/G^T**, **o-BMVC-C3-CCC/G^T** oraz **o-BMVC-C3-CCC/U^T**. Obecność sygnałów iminowych w widmie **o-BMVC-C3-CCC/G^T** w regionie typowym dla par zasad Watsona-Cricka oraz dla G-tetrad potwierdza powstawanie obu domen, dupleksowej oraz kwadrupleksowej. Ponadto silne poszerzenie sygnałów iminowych tylko w rejonie 10.5 - 12 ppm wskazuje, że ligand ten wiąże się selektywnie do motywu kwadrupleksu. W przypadku cząsteczki **o-BMVC-C3-CCC/U^T** widoczne są nieposzerzone sygnały pochodzące od domeny dupleksu oraz poszerzone lecz o bardzo małej intensywności sygnały w rejonie 10.5 - 12 ppm. Oznacza to, że prawdopodobnie **o-BMVC-C3** może również oddziaływać niespecyficycznie z nieuporządkowanym fragmentem bogatym w reszty guanozyny.

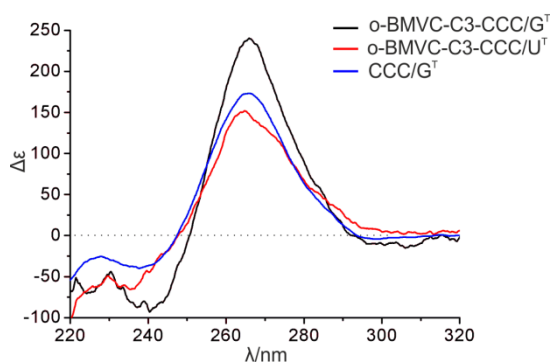


Rys. 87. Widma ^1H NMR cząsteczek **o-BMVC-C3-CCC/G^T**, **o-BMVC-C3-CCC /U^T** oraz wzorcowej **CCC/G^T** (A). Profile migracji cząsteczek RNA w żelu poliakrylamidowym wizualizowanym w świetle UV (254 nm) oraz przy długości fali 473 nm (B). Eksperymenty prowadzono w buforze potasowym.

W celu uzyskania dodatkowych informacji o strukturze badanych związków przeprowadziłam rozdział elektroforetyczny (rys. 87 B) w warunkach niedenaturujących dla cząsteczek **o-BMVC-C3-CCC** (pasma 1), **o-BMVC-C3-CCC/G^T** (pasma 2) i **o-BMVC-C3-CCC/U^T** (pasma 3). Na rysunku pokazany jest żel, który był wizualizowany wpraw w świetle UV. Ponieważ ligand **o-BMVC-C3** wykazuje właściwości fluorescencyjne po związaniu się do domeny kwadrupleksu, nie było konieczności wybarwienia żelu w roztworze NMM. Powstały fluoryzujący kompleks (**o-BMVC-C3-CCC/G^T**) obserwowałam po zeskanowaniu żelu za pomocą skanera laserowego przy długości fali wzbudzenia 473 nm. W świetle UV zaobserwowałam prążki potwierdzające tworzenie się struktur dwuniciowych **o-BMVC-C3-CCC/G^T** (pasma 2), **o-BMVC-C3-CCC/U^T** (pasma 3) oraz prążki pochodzące najprawdopodobniej od pojedynczych nici (spinka lub nieustrukturyzowana nić, pasmo 1). Duża różnica w intensywności fluorescencji pomiędzy cząsteczkami **o-BMVC-C3-CCC/G^T** i **o-BMVC-C3-CCC/U^T** (rys. 87 B, prawy żel) potwierdzała tworzenie się struktury hybrydowej tylko w przypadku cząsteczki **o-BMVC-C3-CCC/G^T**. Pojawienie się słabo fluoryzujących pasm pochodzących od **o-BMVC-C3-CCC/U^T** mogło wskazywać na obecność niespecyficznego oddziaływań przyłączonego kowalencyjnie G4-liganda z fragmentem bogatym w reszty guanozyny czy powstaniu form wyższego rzędu, co sugerowały również widma NMR.

Aby sprawdzić, czy związanie się liganda do motywu kwadrupleksu zwiększa stabilność struktury **o-BMVC-C3-CCC/G^T** w stosunku do hybrydy **CCC/G^T**, porównałam ich temperatury topnienia. Wyznaczona dla **o-BMVC-C3-CCC/G^T**

temperatura topnienia wynosiła $T_m = 72.1\text{ }^\circ\text{C}$ i była jedynie o $2.7\text{ }^\circ\text{C}$ wyższa od tej wyznaczonej uprzednio dla CCC/G^T (tabela 2). Chociaż zaobserwowany dla o-BMVC-C3-CCC/G^T wzrost stabilności termicznej nie jest taki duży jak oczekiwałam, to oddziaływanie liganda z domeną kwadrupleksu może mieć potencjalnie duże znaczenie. Mianowicie w warunkach komórkowych utworzenie takiej struktury może zapobiegać rozplataniu kwadrupleksu przez G4-helikazy lub przynajmniej spowalniać ten proces, może także posłużyć do wizualizacji kwadrupleksu metodami wykorzystującymi zjawisko fluorescencji.(176) Temperaturę topnienia wyznaczyłam też dla cząsteczki o-BMVC-C3-CCC/U^T . Okazało się, że stabilności termiczne cząsteczek o-BMVC-C3-CCC/U^T i CCC/U^T są takie same w granicach błędów i wynoszą odpowiednio $61.2\text{ }^\circ\text{C}$ i $61.0\text{ }^\circ\text{C}$.



Rys. 88. Porównanie widm CD cząsteczek o-BMVC-C3-CCC/G^T , o-BMVC-C3-CCC/U^T oraz CCC/G^T . Eksperymenty wykonano w buforze potasowym.

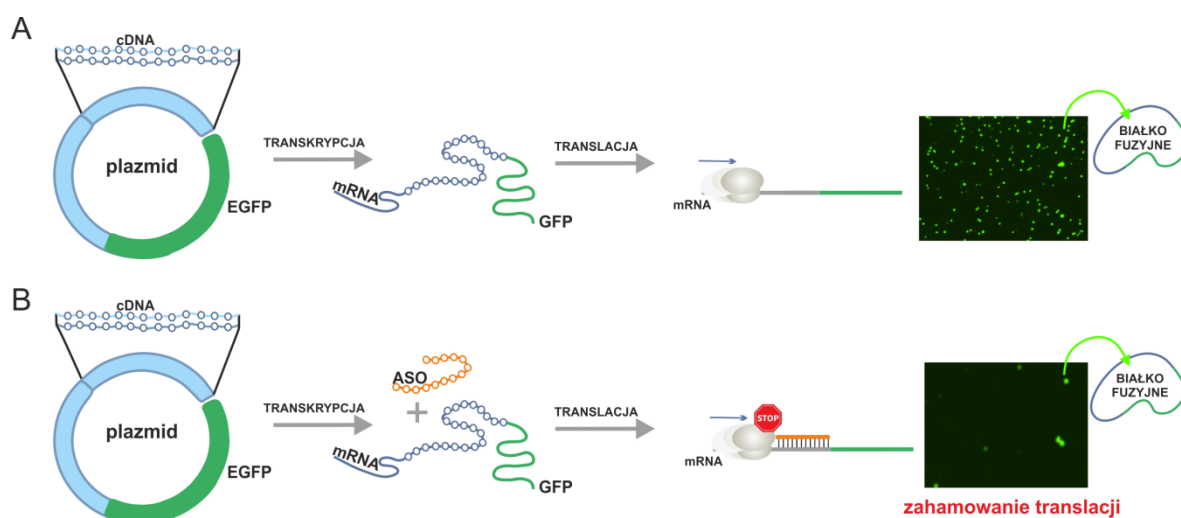
Na rysunku 88 zestawione są widma CD cząsteczek o-BMVC-C3-CCC/G^T i o-BMVC-C3-CCC/U^T z widmem hybrydy CCC/G^T . Jak widać, intensywność pasma przy 265 nm w przypadku o-BMVC-C3-CCC/G^T jest znacznie większa niż dla cząsteczki o-BMVC-C3-CCC/U^T , co potwierdza tworzenie się domeny kwadrupleksu. Podobny efekt zaobserwowałam uprzednio porównując widma CD cząsteczek DQH oraz Dss bez przyłączonego kowalencyjnie liganda (rys. 82). Wyższa amplituda pasma przy 265 nm dla cząsteczki o-BMVC-C3-CCC/G^T względem cząsteczki CCC/G^T może świadczyć o jej silniejszym ustrukturyzowaniu.

VII. Analiza represji translacji przez oligorybonukleotydy antysensowe tworzące różne struktury drugorzędowe z docelowym mRNA

Jak przedstawiłam w rozdziale V. 5. kwadrupleksy RNA pełnią w komórce różne funkcje regulatorowe, a jedną z nich jest kontrola procesu translacji. Jest to proces złożony i zależy nie tylko od lokalizacji kwadrupleksu w nici mRNA, ale także obecności białek wiążących te motywy (ang. *G4-binding protein*). Wiele kwadrupleksów występujących w regionach 5'-UTR i w otwartej ramce odczytu (ORF) uważa się za inhibitory translacji.(11) W regulacji procesu translacji zależnym od kwadrupleksu, główną rolę odgrywa zawada steryczna, gdyż kwadrupleksy stanowią przeszkodę dla poruszającego się wzdłuż mRNA rybosomu. Kwadrupleksy, zwłaszcza RNA, w komórce mogą ulegać dynamicznemu rozplataniu i ponownemu zwijaniu, a regulacja tego procesu jest złożona i nadal mało poznana.(111, 113) Najważniejszą rolę w tym procesie pełnią G4-helikazy. Przykładem takiej helikazy jest DHX36, wspomagająca translację *Nkx2-5* mRNA poprzez rozwijanie struktur kwadrupleksów.(177) Obecnie poszukuje się głównie takich rozwiązań, w których struktury kwadrupleksów byłyby dodatkowo stabilizowane, aby mogłyby spełniać rolę inhibitorów procesów biologicznych. Przykładem takiego rozwiązania są strategie terapeutyczne ukierunkowane na inhibicję translacji, w których wykorzystuje się G4-ligandy do stabilizacji endogennych kwadrupleksów (ang. *intrinsic G4*) powstałych z należących do grupy wysokiego ryzyka onkogennych mRNA.(178) Inną metodą regulacji ekspresji genów bogatych w reszty guanozyny jest podejście antysensowe, w którym do komórki podaje się oligonukleotydy DNA bogate w reszty guanozyny (**DNA-DQ**). Oligonukleotydy te hybrydując z docelowym mRNA tworzą strukturę heterohybrydy DNA:RNA typu dupleks-kwadrupleks i stanowią zawadę steryczną dla rybosomu, hamując w ten sposób proces translacji (rys. 44). Zaletą drugiej metody jest możliwość wygenerowania struktury kwadrupleksu w wybranym fragmencie mRNA. Dodatkowo, strategia ta może być w przyszłości rozwijana ze względu na opracowanie selektywnych dwuczłonowych ligandów (rys. 45 B), które zapewnić mogą podwójne rozpoznanie, kwadrupleksu i sąsiadującego dupleksu.(159)

W badaniach regulacji ekspresji genów, aktywności czy funkcji białek stosuje się narzędzia inżynierii genetycznej z wykorzystaniem genów reporterowych np. białka zielonej fluorescencji (*GFP*, ang. *green fluorescent protein*). Możliwe jest zintegrowanie cDNA białka *GFP* z sekwencją kodującą lub fragmentem dowolnego genu. Takie podejście może być wykorzystane jako model doświadczalny w badaniach nad regulacją ekspresji

konkretnych genów. Konstrukt zawierający docelowe cDNA wprowadzany jest do plazmidowego wektora ekspresyjnego (rys. 88). Takie połączenie genu kodującego interesujące nas białko z genem *GFP* (białko fuzyjne), pod wspólnym promotorem, umożliwia pośrednio jego identyfikację, dostarcza informacji o wydajności reakcji transfekcji jak również umożliwia analizę poziomu wyciszenia ekspresji badanego genu.(179) Jest to bardzo dobry układ modelowy, który umożliwia ocenę aktywności nowo opracowywanych cząsteczek antysensowych lub innych czynników o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Poziom zielonej fluorescencji białka *GFP* mierzony w transfekowanych wektorem, komórkach kontrolnych w obecności np. lipofektaminy jako nośnika, do których nie podano oligonukleotydów antysensowych, przyjmuje się jako eksperymentalny poziom 100%. Gdy komórka jest kotransfekowana wektorem oraz ASO (w serii RNA) w cytoplaźmie dochodzi do hybrydyzacji oligonukleotydu z nicią docelowego mRNA. Powstaje wówczas kompleks ASO/mRNA przyjmujący zazwyczaj formę dupletu, który stanowi zawadę przestrzenną dla rybosomu utrudniając lub uniemożliwiając płynny odczyt informacji niezbędnej do biosyntezy białka (rys. 42). Struktura kompleksu ASO/mRNA zależy od sekwencji oligorybonukleotydów antysensowych oraz docelowych mRNA i wpływa na zróżnicowanie poziomu translacji (rys. 88).



Rys. 88. Schemat eksperymentu wykorzystującego wektor białka zielonej fluorescencji do oceny: ekspresji badanego genu (A) poziomu wyciszenia docelowego genu z wykorzystaniem ASO (B).

Eksperymenty opisane w rozdziale **WYNIKI** pokazały, że dla sekwencji docelowej z mutacją punktową U→G, można zaprojektować dwufunkcyjne oligonukleotydy DNA

lub RNA bogate w reszty guanozyny w taki sposób, aby w wyniku hybrydyzacji z nimi o sekwencjach G^T lub U^T tworzyły się dwie różne struktury, odpowiednio hybryda typu dupleks-kwadrupleks (**DQH**) lub dupleks z nieuporządkowanymi końcami (**Dss**) (rys. 50). Następnym, niezwykle ważnym etapem moich badań było zweryfikowanie *in vitro* strategii wyciszania ekspresji genu zależnej od powstania struktur kwadrupleksowych RNA na matrycy mRNA w ludzkich komórkach. Zrealizowanie tego zadania było możliwe dzięki współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN kierowanej przez prof. dr hab. Elizę Wyszko. Wszystkie eksperymenty biologiczne opisane w tej części rozprawy zostały wykonane przez dr Agnieszkę Fedoruk-Wyszomirską.

Planując sprawdzenie skuteczności *in vitro* zaprojektowanych przeze mnie oligorybonukleotydów antysensowych należało najpierw wytypować odpowiednie sekwencje docelowe, zaprojektować sekwencje oligorybonukleotydów antysensowych oraz oligorybonukleotydów kontrolnych. Następnie dr Fedoruk-Wyszomirska opracowała modelowy system do monitorowania ekspresji badanego fragmentu genu zintegrowanego z *EGFP* (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) oraz przeprowadziła analizę poziomu jego wyciszenia po podaniu do komórek HeLa różnych oligorybonukleotydów antysensowych. Poniżej opisane są poszczególne etapy tych badań:

a) wybór docelowych sekwencji mRNA bogatych w reszty guanozyny

Początkowo do badań biologicznych zamierzałam wykorzystać te same sekwencje docelowe, które używałam w opisanych w rozdziale **VI** eksperymentach biofizycznych. Okazało się jednak, że sekwencje G^T i U^T są komplementarne do fragmentu DNA kodującego *EGFP* w wybranym do badań wektorze ekspresyjnym pEGFP-N3. Nie mogły więc być użyte do eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich komórek. Planując eksperymenty, jako potencjalne cząsteczki docelowe postanowiłam wykorzystać dwa fragmenty genu odpowiadające mutacji chorobotwórczej. Jak już wcześniej wspomniałam, dzięki pomocy prof. dr hab. Piotra Kozłowskiego, kierownika Zakładu Genetyki Molekularnej IChB PAN udało się znaleźć taką mutację punktową w genie **EGFR**, która idealnie spełniała stawiane wymagania. W zmutowanym punktowo odpowiedniku genu **EGFR**, znanym jako **EGFR-L858R**, substytucja tyminy (T) do guaniny (G) w sekwencji kodującej prowadzi do powstania interesującego mnie motywu GGG-C-GGG. W dalszej części rozprawy wybrane do klonowania do wektora pEGFP-N3 sekwencje oparte o fragmenty kodujące geny **EGFR** i **EGFR-L858R** oznaczone są skrótowo, jako **EGFR-U** i **EGFR-G** (Tabela 4). Oprócz sekwencji bazujących na genie **EGFR**, w miejsce sekwencji

G^T i U^T , wytypowane zostały dodatkowo dwie sekwencje docelowe, niewystępujące naturalnie w sekwencji kodującej białko EGFP. Sekwencje tych oligonukleotydów, oznaczonych skrótowo **los-U** i **los-G** zamieszczone są w tabeli 4.

Tabela 4. Sekwencje fragmentów mRNA ulegających kotranslacji wspólnie z mRNA reporterowego białka *GFP*: **los-G**, **los-U** - sekwencje losowe, **EGFR-G** oraz **EGFR-U** oparte o sekwencje genów **EGFR** i **EGFR-L858R**.

Nazwa plazmidu	Sekwencja fragmentu mRNA kodowana przez cDNA
Plazmid 1: los-G	5' A UGA UAG UUG CAG AGA UCG AUA GUC GUA GGG C GGG CAU AGU UGC ACU GGG 50nt
Plazmid 2: los-U	5' A UGA UAG UUG CAG AGA UCG AUA GUC GUA GGG C UGG CAU AGU UGC ACU GGG 50nt
Plazmid 3: EGFR-G	5' AUG GUC AAG AUC ACA GAU UUU GGG C GGG CCAAAC UGC UGG GUG CGG AAG AG 51nt
Plazmid 4: EGFR-U	5' AUG GUC AAG AUC ACA GAU UUU GGG C UGG CCAAAC UGC UGG GUG CGG AAG AG 51nt

b) projektowanie oligorybonukleotydów antysensowych oraz oligorybonukleotydów kontrolnych

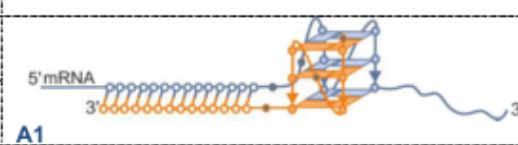
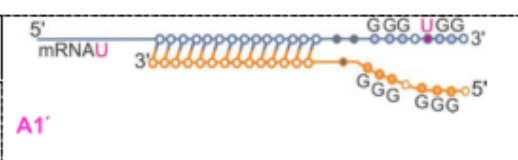
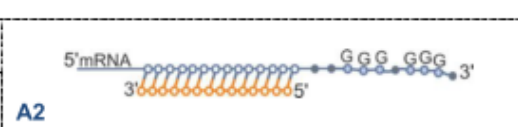
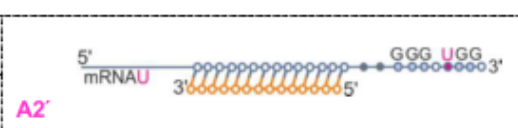
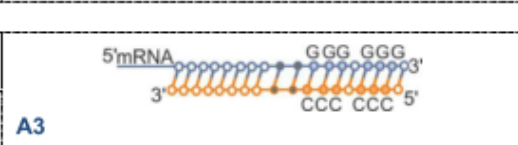
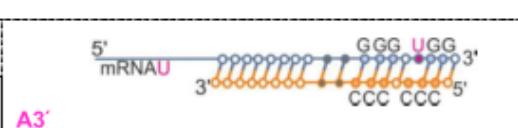
Wszystkie opisane dotychczas badania w rozdziale VI skupiały się głównie na identyfikacji tworzących się struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks i dupleksu z nieuporządkowanymi końcami pokazanych na rysunku 49 oraz charakterystyce ich właściwości. Planując badania w warunkach komórkowych postanowiłam sprawdzić efekt wyciszenia zależny nie tylko od sekwencji docelowej, ale również od typu tworzącej się struktury hybrydy dupleks-kwadrupleks. Sekwencje oligorybonukleotydów antysensowych zostały tak zaprojektowane, aby domena dupleksu mogła powstać od 5' końca kwadrupleksu (**DQ**), od końca 3' (**QD**) lub z obu stron kwadrupleksu, 3' i 5' (**DQD**). Modele drugorzędowe potencjalnie tworzących się różnych struktur pokazane są schematycznie w tabeli 5 (modele: **A1**, **B1**, **C1**) wraz z odpowiadającymi im sekwencjami oligorybonukleotydów antysensowych oraz ich oznaczeniami (**1**, **1A**, **4**, **4A**, **7**, **7A**).

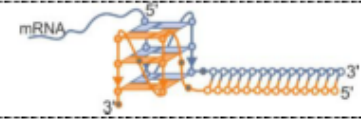
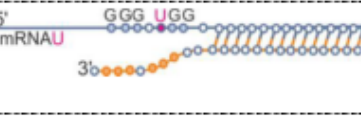
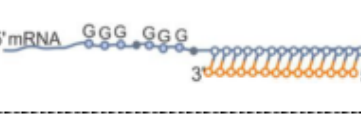
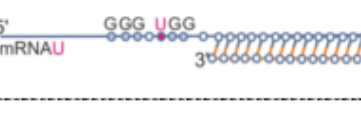
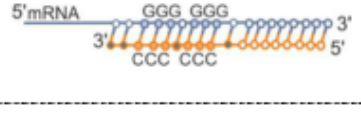
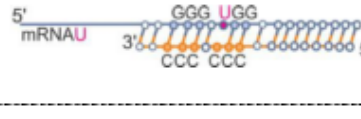
Dodatkowo zaprojektowanych zostało kilka oligorybonukleotydów kontrolnych. Jako pierwsza, wytypowana została cząsteczka o sekwencji 5'-CGGGCGGGC-3' (tabela 5: sekwencja **10**) zdolna do utworzenia dwucząsteczkowego kwadrupleksu z bogatym w reszty guanozyny fragmentem mRNA. Inny typ sekwencji kontrolnych stanowiły oligorybonukleoty komplementarne do mRNA (od 5' końca lub od 3' końca) o długości 14 reszt, tworzące dupleks po związaniu z sekwencją docelową (tabela 5: sekwencje: **2**, **2A**,

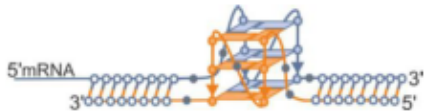
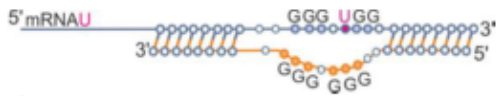
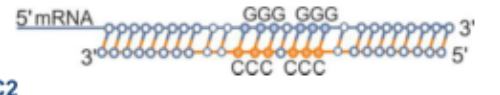
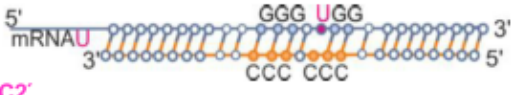


5, 5A; modele: A2, B2). Oligorybonukleotydy o długości 18 reszt zostały zaplanowane jako komplementarne do bogatego w reszty guanozyny fragmentu mRNA wraz z sąsiadującym do niego fragmentem sekwencji mRNA (z końca 3' lub 5'), tak aby po związaniu z nicią docelową powstawał dupleks składający się z 18 par zasad Watsona-Cricka (tabela 5: sekwencje: **3, 3A, 6, 6A; modele: A3, B3).** Sekwencje oligorybonukleotydów oznaczone jako **8 i 8A** są komplementarne do sekwencji mRNA obejmującej fragment bogaty w reszty guanozyny oraz sąsiadujące z nim z końców 5' i 3' krótkie odcinki sekwencji i tworzą z nim 26 nukleotydowy dupleks (tabela 5: model: **C2).** Kolejne kontrole stanowiły oligorybonukleotydy antysensowe, które zaprojektowano w ten sposób, aby od końców 5' i 3' mogły tworzyć się krótkie, składające się z 8 par zasad dupleksy a sekwencja w centralnej części oligorybonukleotydu miała uniemożliwić tworzenie się par zasad Watsona-Cricka (tabela 5: sekwencje: **9, 9A; model: C3).** Z kolei 14 nt cząsteczka poliU (tabel 5: sekwencja **11)** skierowana była na ogon poli(A) mRNA. Skuteczność oligorybonukleotydów zamieszczonych w tabeli 5 była sprawdzana porównując poziom ekspresji genów zawierających motyw GGG-C-GGG (**los-G, EGFR-G**) lub GGG-C-UGG (**los-U, EGFR-U**) (rys. 89).

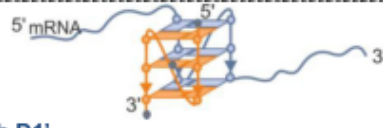
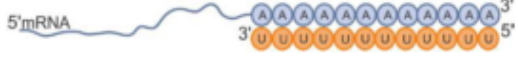
Zaplanowałam również eksperyment, którego celem było zbadanie wpływu G4-liganda na efektywność translacji. Jako testowy G4-ligand wybrałam NMM.

Tabela 5. Zestawienie modeli potencjalnych struktur drugorzędowych tworzących się po połączeniu odpowiedniego mRNA/mRNAU z oligorybonukleotydami antysensowymi. W tabeli tożsame oligorybonukleotydy ASO mają to samo oznaczenie. Ostatnia kolumna przedstawia wartości poziomu fluorescencji białka *EGFP* dla odpowiedniego genu po transfekcji oligorybonukleotydem ASO (200 nM).

mRNA/ mRNAU	Sekwencja oligorybonukleotydów antysensowych			nt	Nazwa	Model struktury drugorzędowej	Poziom fluorescencji EGFP [%]
	5'	G, C, R	3'				
los-G		CGGGCGGGC	CGACUAUCGAUCUC	23	1	 5'mRNA 3' A1	21
EGFR-G		CGGGCGGGC	AAUCUGUGAUCUUG	23	1A		28
los-U		CGGGCGGGC	CGACUAUCGAUCUC	23	1	 5' mRNAU 3' A1'	33
EGFR-U		CGGGCGGGC	AAUCUGUGAUCUUG	23	1A		43
los-G			CGACUAUCGAUCUC	14	2	 5'mRNA 3' A2	72
EGFR-G			AAUCUGUGAUCUUG	14	2A		49
los-U			CGACUAUCGAUCUC	14	2	 5' mRNAU 3' A2'	79
EGFR-U			AAUCUGUGAUCUUG	14	2A		61
los-G		GCCC GCCUA	CGACUAUC	18	3	 5'mRNA 3' A3	61
EGFR-G		GCCC GCCAA	AAUCUGUG	18	3A		46
los-U		GCCC GCCUA	CGACUAUC	18	3	 5' mRNAU 3' A3'	70
EGFR-U		GCCC GCCAA	AAUCUGUG	18	3A		59

mRNA/ mRNAU	Sekwencja oligorybonukleotydów antysensowych			nt	Nazwa	Model struktury drugorzędowej	Poziom fluorescencji EGFP [%]
	5'	G, C, R	3'				
los-G	CCCAGUGCAACUAU	UAGGGCGGGC		24	4	B1 	31
EGFR-G	CACCCAGCAGUUUG	UAGGGCGGGC		24	4A		27
los-U	CCCAGUGCAACUAU	UAGGGCGGGC		24	4	B1' 	36
EGFR-U	CACCCAGCAGUUUG	UAGGGCGGGC		23	4A		45
los-G	CCCAGUGCAACUAU			14	5	B2 	69
EGFR-G	CACCCAGCAGUUUG			14	5A		61
los-U	CCCAGUGCAACUAU			14	5	B2' 	84
EGFR-U	CACCCAGCAGUUUG			14	5A		73
los-G	GCAACUAU	GCCC GCCUA		18	6	B3 	61
EGFR-G	GCAGUUUG	GCCC GCCAA		18	6A		42
los-U	GCAACUAU	GCCC GCCUA		18	6	B3' 	87
EGFR-U	GCAGUUUG	GCCC GCCAA		18	6A		48

mRNA/ mRNAU	Sekwencja oligonukleotydów antysensowych			nt	Nazwa	Model struktury drugorzędowej	Poziom fluorescencji EGFP [%]
	5'	G, C, R	3'				
los-G	GCAACUAU	UAGGGCGGGC	CGACUAUC	26	7	 5'mRNA 3' mRNA 5'	14
EGFR-G	GCAGUUUG	UAGGGCGGGC	AAUCUGUG	26	7A		C1
los-U	GCAACUAU	UAGGGCGGGC	CGACUAUC	26	7	 5'mRNA 3' mRNA 5'	25
EGFR-U	GCAGUUUG	UAGGGCGGGC	AAUCUGUG	26	7A		C1'
los-G	GCAACUAU	GCCCGCCCUA	CGACUAUC	26	8	 5'mRNA 3' mRNA 5'	44
EGFR-G	GCAGUUUG	GCCCGCCCAA	AAUCUGUG	26	8A		C2
los-U	GCAACUAU	GCCCGCCCUA	CGACUAUC	26	8	 5'mRNA 3' mRNA 5'	57
EGFR-U	GCAGUUUG	GCCCGCCCAA	AAUCUGUG	26	8A		C2'
los-G	GCAACUAU	UAAACUUGCC	CGACUAUC	26	9	 5'mRNA 3' mRNA 5'	36
EGFR-G	GCAGUUUG	UAAACUUGCCC	AAUCUGUG	27	9A		C3
los-U	GCAACUAU	UAAACUUGCC	CGACUAUC	26	9	 5'mRNA 3' mRNA 5'	42
EGFR-U	GCAGUUUG	UAAACUUGCCC	AAUCUGUG	27	9A		C3'

mRNA/ mRNA ^U	Sekwencja oligorybonukleotydów antysensowych			nt	Nazwa	Model struktury drugorzędowej	Poziom fluorescencji EGFP [%]
	5'	G, C, R	3'				
los-G		<u>CGGG</u> CGGGC		9	10	 D1 lub D1'	94
EGFR-G							83
los-U							91
EGFR-U							87
los-G	UUUUUUUUUUUUUUUU			14	11	 D2 lub D2'	82
EGFR-G							90
los-U							87
EGFR-U							86

* sekwencje oligorybonukleotydów antysensowych zostały zaprojektowane tak, aby po hybrydyzacji z sekwencjami docelowymi mRNA lub mRNA^U powstały struktury drugorzędowe przedstawione w kolumnie "Model struktury drugorzędowej". Dla uproszczenia opisu, każdy z modeli ma dodatkowe oznaczenie np. A1, A2, itd. Kolumna **Sekwencja oligorybonukleotydów antysensowych** została w tabeli podzielona na trzy części. Pierwsza część oznaczona 5' odpowiada fragmentowi sekwencji od końca 5', druga część odpowiada środkowemu fragmentowi ASO. W części tej mogą występować bloki guanozynowe (G), cytydynowe (C) lub różne reszty (R). Kolorem niebieskim zaznaczone są reszty nukleotydowe stanowiące łączniki między poszczególnymi segmentami ASO. Na kolor czerwony zaznaczono pętle. Ostatnia część odpowiada sekwencji oligorybonukleotydu od końca 3'. W ostatniej kolumnie zamieszczone są wyznaczone eksperymentalnie wartości poziomu fluorescencji białka GFP w stosunku do komórek kontrolnych do których nie podano ASO. Niebieskim tłem zaznaczono symbol sekwencji docelowej losG, fioletowym tłem symbol sekwencji docelowej EGFR-G, żółtym tłem symbol sekwencji docelową losU oraz różowym symbol sekwencji docelowej EGFR-U.

nt: liczba reszt nukleotydowych

nazwa: oznaczenie ASO

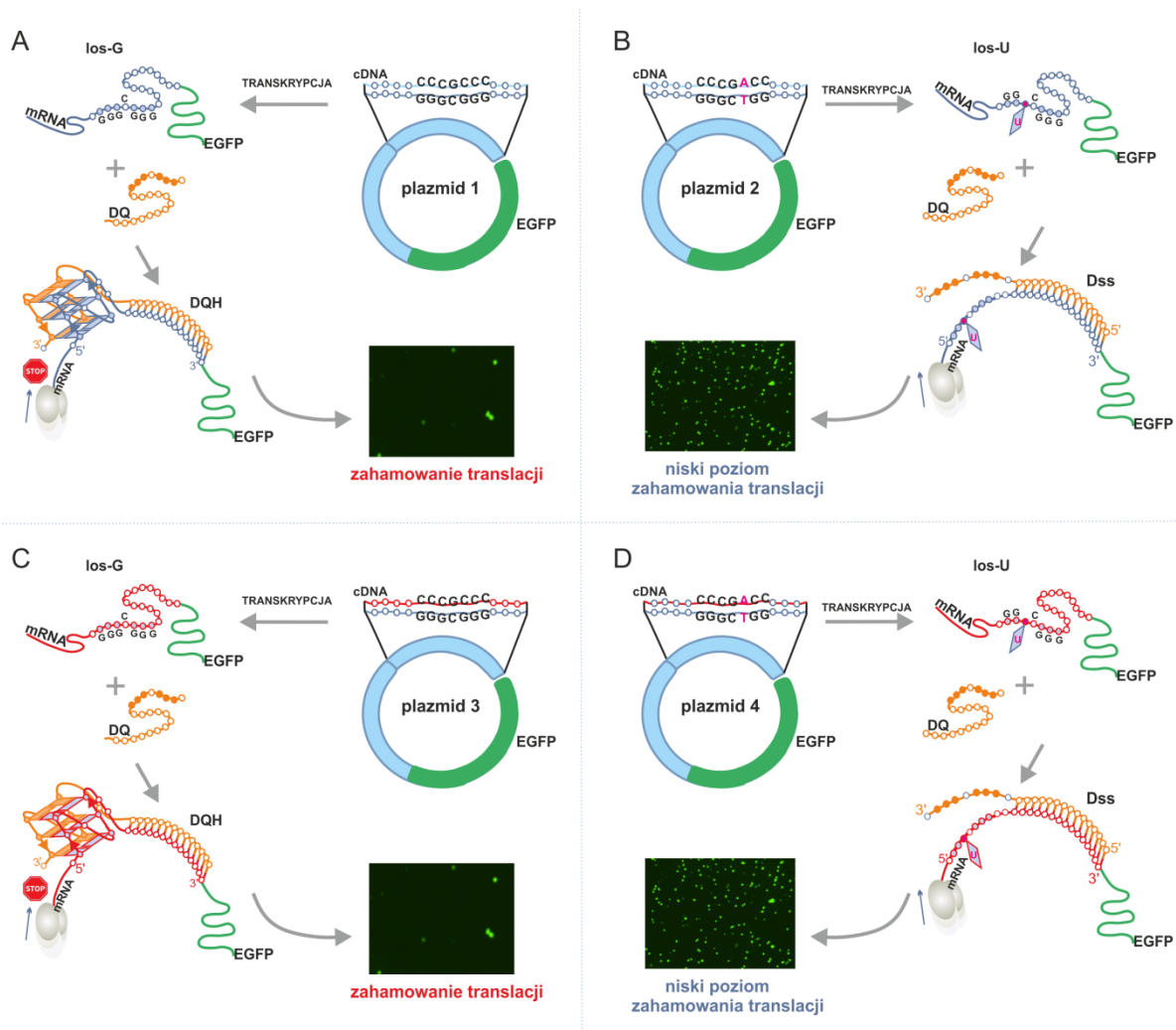
mRNA/mRNA^U sekwencja docelowa

c) modelowy system do monitorowania poziomu translacji

Aby ocenić wpływ poszczególnych oligorybonukleotydów antysensowych (tabela 5) na efektywność wyciszenia docelowego genu zawierającego sekwencje kodujące **los-G**, **EGFR-G** oraz **los-U** i **EGFR-U** wykorzystano wektor plazmidowy pEGFP-N3 kodujący białko *EGFP* (<https://www.addgene.org/vector-database/2493/>). Konstrukty plazmidowe zawierały wklonowane, w miejscu wielokrotnego klonowania plazmidu, fragmenty cDNA kodujące docelowe sekwencje (tabela 4). Poprawność sekwencji nukleotydowej otrzymanych konstruktów została zweryfikowana za pomocą sekwencjonowania. Wydajność ekspresji docelowego genu oceniano na podstawie detekcji reporterowego białka *EGFP* przy użyciu technik mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej. W kolejnym etapie analizowano poziom wyciszenia ekspresji białka zielonej fluorescencji w zależności od typu struktury drugorzędowej kompleksu ASO/mRNA (tabela 5) powstającego w cytoplazmie komórek jednocześnie transfekowanych wektorem oraz odpowiednimi ASO.

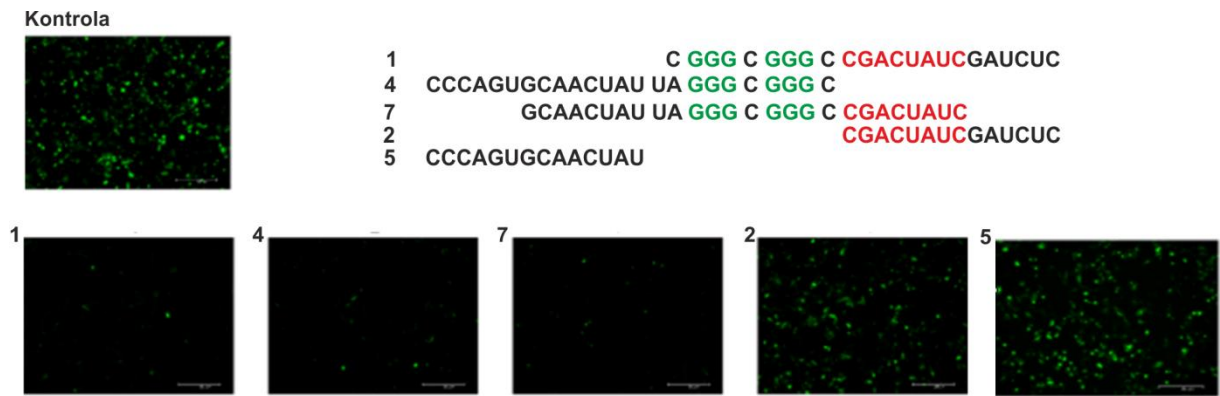
d) poziom ekspresji białka zielonej fluorescencji zależny od sekwencji oligorybonukleotydu antysensowego i sekwencji docelowej

Na rysunku 88 przedstawiony jest schemat ideowy eksperymentu, którego celem była ocena poziomu represji translacji w zależności od sekwencji oligorybonukleotydu antysensowego.



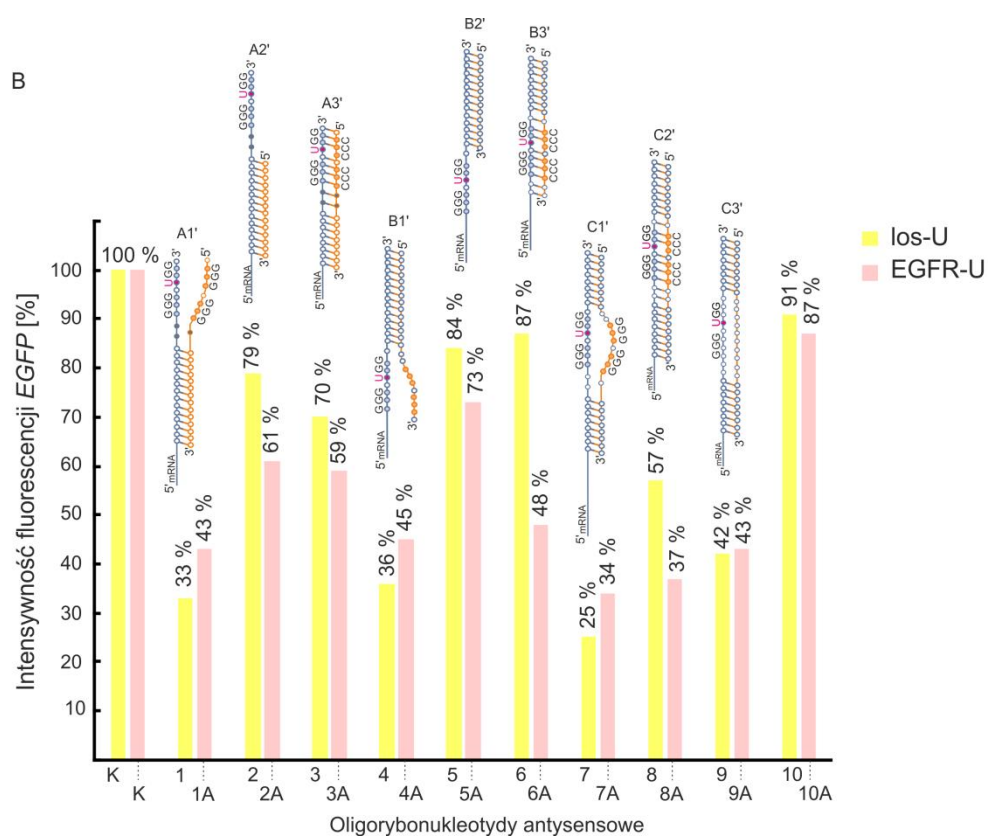
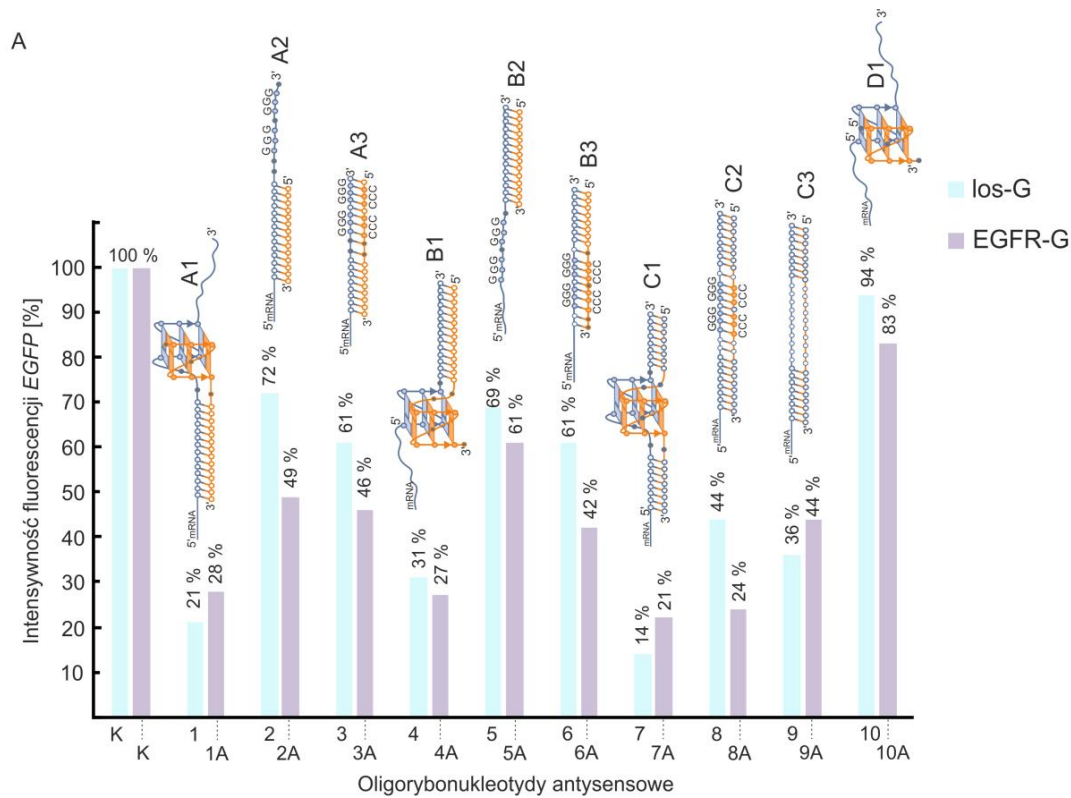
Rys. 89. Schemat ideowy eksperymentów wykorzystujących konstrukty plazmidowe 1 - 4 (tabela 4) zawierające sekwencje **los-G** i **los-U** (A) oraz **EGFR-G** i **EGFR-U** (B).

Aktywność wewnątrzkomórkową zaprojektowanych ASO badano w ludzkiej linii komórek HeLa. W tym celu, w kilku niezależnych eksperymentach, komórki poddano kotransfekcji jednym z wektorów ekspresyjnych pEGFP-N3 kodujących sekwencje: **los-U-GFP**, **los-G-GFP**, **EGFR-U-GFP** lub **EGFR-G-GFP**, oraz oligorybonukleotydami antysensowymi (1-11 do **los-U** i **los-G** oraz 1A-9A, 10, 11 do **EGFR-G** i **EGFR-U**) w stężeniu końcowym 50, 100 lub 200 nM w obecności lipofektaminy jako nośnika. Efektywność wyciszenia ekspresji docelowego genu analizowano na podstawie intensywności fluorescencji białka *EGFP* po 24 h od podania ASO, za pomocą cytometrii przepływowej (tabela 5) oraz mikroskopii fluorescencyjnej (rys. 90).

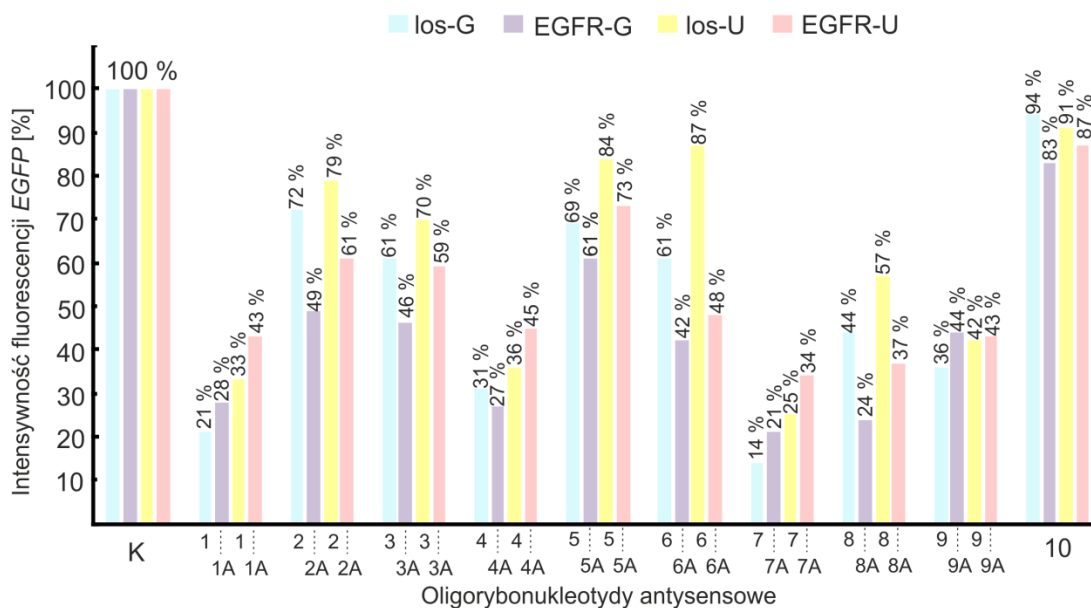


Rys. 90. Wyciszenie ekspresji białka *EGFP* w ludzkich komórkach HeLa, 24 h po kotransfekcji wektorem pEGFP-N3 oraz oligonukleotydami RNA w stężeniu 200 nM. Mikroskopowa analiza poziomu ekspresji białka *EGFP* dla wybranych oligorybonukleotydów antysensowych (1, 4, 7, 2, 5, tabela 5) hybrydujących z sekwencją docelową *los-G*.

Analiza wyników uzyskanych ze wstępnych eksperymentów wskazywała, że poziom wyciszenia ekspresji docelowego genu jest zależny od stężenia użytych ASO, a największy spadek intensywności fluorescencji białka obserwowano przy 200 nM. Wartości procentowe poziomu fluorescencji białka *EGFP* przedstawione w tabeli 5, dotyczą tego właśnie stężenia. Wyniki omówionych powyżej eksperymentów zebrane są w tabeli 5 i na rysunkach 91 - 92.



Rys. 91. Intensywność fluorescencji białka *EGFP* w transfekowanych komórkach HeLa w zależności od użytych oligonukleotydów RNA (przy końcowym stężeniu 200 nM) oraz sekwencji docelowych. K oznacza kontrolę. Rysunek przedstawia także modele potencjalnie tworzących się struktur drugorzędowych wraz z ich oznaczeniem. Wartości intensywności fluorescencji *EGFP* wyznaczono na podstawie analizy cytometrycznej.



Rys. 92. Zestawienie wyników analizy cytometrycznej intensywności fluorescencji białka *EGFP* transfekowanych komórek HeLa w zależności od użytych oligorybonukleotydów (przy końcowym stężeniu 200 nM oraz sekwencji docelowych). K oznacza kontrolę.

Dla sekwencji **los-G** mRNA najmniejsze wartości intensywności fluorescencji białka zaobserwowano, gdy komórki transferowano dwufunkcyjnymi oligorybonukleotydami zawierającymi segment kwadrupleksu: **1**, **4** oraz **7** (tabela 5, rys. 91 A). Wartości te wynosiły 21%, 31% i 14% odpowiednio dla sekwencji **1**, **4** i **7**, co odpowiada wyciszeniu ekspresji białka zielonej fluorescencji odpowiednio o 79%, 69% i 86%. W tej grupie sekwencji najefektywniejszym okazał się oligonukleotyd **7**. Po hybrydyzacji z nicią **los-G** powinien on utworzyć strukturę hybrydy, w której po obu stronach domeny kwadrupleksowej znajdują się krótkie fragmenty dupleksu (model **C1**). Równie zadowalające wyniki otrzymano dla sekwencji oligorybonukleotydów antysensowych tworzących dupleks od 5' końca kwadrupleksu (model **A1**) i od końca 3' (model **B1**).

Z kolei spośród oligorybonukleotydów kontrolnych, których działanie opierało się na tworzeniu dupleksu z docelowym mRNA (tabela 5; modele **A2**, **A3**, **B2**, **B3**), ekspresję genu najefektywniej wyciszał oligonukleotyd o sekwencji **9** (64%) (tabela 5, model **C3**). Nieco słabszy efekt zaobserwowano dla oligorybonukleotydu **8** o długości 26 nt w pełni komplementarnego do sekwencji docelowej (tabela 5; model **C2**). Gdy do transfekcji komórek użyto oligorybonukleotydy **3** i **6** o długości 18 reszt oraz **2** i **5** o długości 14 reszt

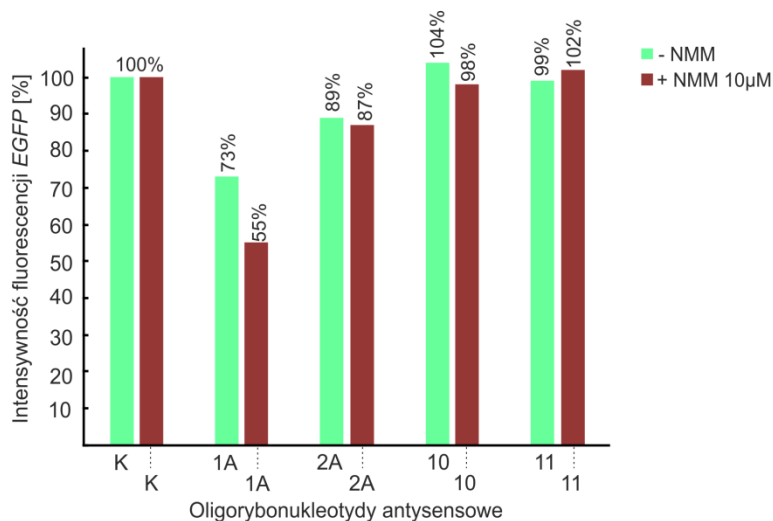
tworzące dupleksy z mRNA (tabela 5; modele **A3** i **B3** oraz **A2** i **B2**), ekspresja białka *EGFP* obniżyła się jedynie o 39% oraz 28 – 31% odpowiednio. Najśłabszy efekt wyciszenia translacji zaobserwowano, gdy do transfekcji użyto oligorybonukleotydów kontrolnych o sekwencjach **10** oraz **11**. W przypadku sekwencji **10**, potencjalnie tworzącej kwadrupleks z sekwencją docelową (model **D1**), zaobserwowano obniżenie ekspresji *EGFP* zaledwie na poziomie 6%.

W kolejnym etapie porównano względny poziom wyciszenia genów różniących się tylko jedną resztą (**los-G** vs **los-U**), gdy do transfekcji komórek zostały użyte te same oligorybonukleotydy antysensowe. Jak widać na rysunku 91, transfekcja oligorybonukleotydami **1**, **4** i **7** powodowała nieco słabsze wyciszenie ekspresji w przypadku genu **los-U** niż było to obserwowane dla genu **los-G**. Różnica ta choć niewielka, jednak obserwowana była w przypadku wszystkich trzech oligorybonukleotydów (12% dla oligorybonukleotydu **1** - model **A1** vs **A1'**, 5% dla oligorybonukleotydu **4** -model **B1** vs **B1'**) oraz 11% dla **7** - model **C1** vs **C1'**).

Analogiczne badania przeprowadzono dla wektorów zawierających geny **EGFR-G** lub **EGFR-U** (tabela 5). Podobnie jak w przypadku sekwencji **los-G**, najefektywniejsze wyciszenie ekspresji **EGFR-G-EGFP** zaobserwowano dla oligorybonukleotydów **7A** (79%), **1A** (72%) oraz **4A** (73%). Poziom wyciszenia ekspresji genów **los-G-EGFP** i **EGFR-G-EGFP** za pomocą tych samych oligorybonukleotydów antysensowych był porównywalny. Niewielkie widoczne różnice (4 – 7%) mogą wynikać z różnych sekwencji obu fragmentów mRNA, co z kolei może się przekładać na różne stabilności domen dupleksowych.

Spośród oligorybonukleotydów kontrolnych tworzących dupleksy, te o długości 14 par zasad (tabela 5; sekwencje: **2A**, **5A**, modele: **A2** i **B2**), wyciszały ekspresję genu **EGFR-G-EGFP** na poziomie 39 - 51%. Dla dłuższych oligorybonukleotydów (**3A**, **6A**), które dodatkowo tworzyły motyw dupleksu z fragmentem GGGCGGG mRNA (modele **A3** i **B3**) efekt ten był rzędu 54 - 58%. Natomiast najefektywniejszy w działaniu (ekspresja białka na poziomie 24%) był oligorybonukleotyd **8A** tworzący z mRNA regularny dupleks o długości 26 par zasad (tabela 5, model **C2**). Należy zaznaczyć, że oligorybonukleotydy **1A** - **9A**, **10** - **11** hamują proces translacji **EGFR-G-EGFP** silniej niż **EGFR-U-EGFP** mRNA. Jest to taki sam rezultat, jaki uzyskano dla sekwencji losowych **los-U** i **los-G**, co potwierdza rolę domeny kwadrupleksowej w efektywnej represji translacji.

Bardzo ciekawych wyników dostarczyły badania, w których analizowano wpływ oligorybonukleotydów antysensowych w obecności G4-liganda na aktywność zintegrowanych genów **EGFR-G-EGFP** (rys. 93). W stosunku do poprzednich eksperymentów zmniejszono jedynie stężenie ASO do 100 nM, gdyż przy 200 nM poziom ekspresji genu białka *EGFP* był już na tyle niski, że mogłoby to utrudnić zaobserwowanie dodatkowego efektu pochodzącego od NMM. Dla oligorybonukleotydu **1A** różnica pomiędzy poziomem wyciszenia ekspresji *EGFP* w obecności 10 μ M NMM względem eksperymentu bez NMM wynosiła > 15%. W przypadku kotransfekcji komórek oligonukleotydem kontrolnym tworzącym dupleks o długości 14 par zasad, **2A** i NMM, różnica w poziomie intensywności fluorescencji *EGFP* wynikająca z obecności NMM była nieistotna (2%). Podobny rezultat uzyskano w eksperymentach, w których razem z NMM użyto oligorybonukleotydy **10** (ciąg G) i **11** (poliU). Chociaż badania te należy potraktować jako pilotażowe, istnieją silne przesłanki, że NMM selektywnie wiąże się do kwadrupleksu i stabilizuje tworzący się kompleks G4-ligand/kwadrupleks. Niestety do badań tych nie nadawał się ligand o-BMVC, gdyż wykazuje on emisję fluorescencji w podobnym zakresie jak białko *EGFP*.



Rys. 93. Analiza intensywności fluorescencji białka fuzyjnego **EGFR-G-GFP** w obecności wybranych ASO (100 nM) w obecności 10 μ M liganda NMM oraz bez.

Badania przeprowadzone przez dr Fedoruk-Wyszomirską stanowią punkt odniesienia dla przeprowadzonych przeze mnie badań spektralnych i biofizycznych oraz pozwalają na wstępną weryfikację założeń dotyczących potencjału terapeutycznego oligorybonukleotydów bogatych w reszty guanozyny. Otrzymane rezultaty pokazują, że

zaprojektowane przeze mnie dwufunkcyjne oligorybonukleotydy zawierające segment dupleksu oraz kwadrupleksu mogą stanowić efektywniejsze narzędzie do wyciszania ekspresji genów niż klasyczne oligorybonukleotydy antysensowe. Skuteczność hamowania translacji zależna od tworzenia struktur hybrydowych była bardzo wysoka, rzędu 69-86%, podczas gdy efektywność klasycznego oligorybonukleotydu antysensowego o długości 14 nt (tabela 5, sekwencje **2**, **5**) była zdecydowanie niższa, na poziomie 28-51%.

Dla przedstawionych w tym rozdziale układów modelowych, zawierających jedynie fragment docelowego cDNA, uzyskane zróżnicowanie poziomu ekspresji genów różniących się jedną resztą (**los-G** vs **los-U** oraz **EGFR-G** vs **EGFR-U**) nie jest jeszcze zadowalające. Jednak aby ocenić ostateczny efekt wywołany przez dwufunkcyjne oligorybonukleotydy, konieczne będzie powtórzenie eksperymentów w odpowiednich liniach komórkowych zawierających mutację L858R oraz białko typu dzikiego. W przyszłości planuję rozszerzyć badania o dwufunkcyjne oligorybonukleotydy antysensowe zawierające modyfikacje chemiczne oraz oligonukleotydy w serii DNA. Jestem przekonana, że rezultaty uzyskane podczas realizacji niniejszej rozprawy pozwolą w przyszłości na otrzymanie dwufunkcyjnych oligonukleotydów, dzięki którym możliwe będzie zwiększenie selektywności rozpoznania sekwencji zmutowanych punktowo.

VIII. Dyskusja Wyników

Moje badania dotyczyły poznania właściwości dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych bogatych w reszty guanozyny (**DQ**) oraz sprawdzenia możliwości wykorzystania ich do selektywnego rozpoznania docelowych sekwencji RNA, różniących się tylko jedną resztą nukleotydową. Jak pokazałam, oligonukleotydy antysensowe w serii DNA i RNA zawierające blok -GGGCGGG- po hybrydyzacji z oligonukleotydami **G^T** (blok -GGGCGGG-) i **U^T** (blok -GGGCUGG-) tworzą różne struktury, odpowiednio hybrydę dupleks-kwadrupeks oraz dupleks z nieuporządkowanymi końcami. Dla oligonukleotydów antysensowych w serii RNA zbadalam wpływ nienukleotydowych modyfikacji chemicznych oraz liganda o-BMVC-C3 na stabilność termiczną oraz strukturę badanych kompleksów **DQ/G^T** i **DQ/U^T**. We współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN zostały przeprowadzone badania mające na celu sprawdzenie potencjału terapeutycznego badanych oligorybonukleotydów. Eksperymenty wyciszenia ekspresji genów w środowisku komórek ludzkich wykonane były dla oligorybonukleotydów antysensowych niezawierających modyfikacji chemicznych. Poniżej przedstawione są najważniejsze rezultaty otrzymane przeze mnie w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Przy projektowaniu sekwencji oligonukleotydu antysensowego **CCC**, który składał się z 14 reszt nukleotydowych w segmencie dupleksu oraz dwóch bloków GGG w segmencie kwadrupeksu, opierałam się na wynikach badań dotyczących wpływu liczby G-traktów, długości pętli oraz długości domeny dupleksu na stabilność dwuniciowych struktur hybrydowych DNA:RNA typu dupleks-kwadrupeks (tabela 6).⁽¹⁵⁾ Liczba bloków GGG uwarunkowana była mutacją punktową zidentyfikowaną w genie EGFR, w wyniku której dochodzi do zmiany sekwencji z GGGCUGG na GGGCGGG. Ograniczenie długości łącznika pomiędzy blokami GGG w nici antysensowej do jednej reszty wynikało z analizy stabilności znanych dwuniciowych równoległych struktur hybrydowych DNA:RNA typu dupleks-kwadrupeks.

W moich badaniach zastosowałam kilka technik eksperymentalnych - spektroskopię NMR, UV, CD i elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Spektroskopia NMR pozwalała mi monitorować powstawanie struktur **DQH** i **Dss**, gdyż sygnały protonów iminowych reszt guanozyny zaangażowanych w tworzenie się G-tetrad występują w innym regionie niż sygnały od protonów iminowych uczestniczących w tworzeniu par zasad Watsona-Cricka. Niestety, w widmach badanych

przeze mnie cząsteczek sygnały NMR były szerokie, zwłaszcza te pochodzące od domeny kwadrupleksowej. W regionie 10.5 -12.0 ppm widoczna była górka z ledwo zaznaczonymi szczytami niektórych sygnałów. Na szerokość sygnałów w widmach NMR ma wpływ kilka czynników. Dla badanych przeze mnie cząsteczek o masie rzędu 14 kDa może to być wynikiem efektywnej relaksacji poprzecznej T_2 przejawiającej się poszerzeniem sygnałów, choć w dostępnych w literaturze widmach NMR hybryd DNA o podobnej masie, sygnały są znacznie węższe.(129) Jest to jedna z często obserwowanych różnic pomiędzy widmami NMR cząsteczek DNA i RNA, gdzie obecność dodatkowej grupy 2'-OH wpływa niekorzystnie na szerokość sygnałów. Gdy domena kwadrupleksu stanowi część dużej struktury RNA, ich sygnały iminowe mogą poszerzyć się do tego stopnia, że widać je dopiero w podwyższonej temperaturze. Kwadrupleksy są z natury bardzo polimorficzne, w zależności od warunków środowiska jedna cząsteczka może związać się na wiele sposobów. Z uwagi na silną preferencję guanozyny do przyjmowania konformacji *anti* wokół wiązania glikozydowego, liczba możliwych topologii dla kwadrupleksów RNA jest ograniczona a wszystkie znane kanoniczne kwadrupleksy RNA są równoległe. Analizując kwadrupleksy za pomocą widm NMR zazwyczaj udaje się policzyć wszystkie sygnały iminowe pochodzące od G-tetrad, co pozwala stwierdzić, czy w roztworze mamy do czynienia z jedną tylko formą kwadrupleksu, czy jest ich więcej. Niestety, z uwagi na poszerzenie sygnałów iminowych informacja ta była niedostępna w moich badaniach.

Stabilność struktur kwasów nukleinowych ma bezpośredni wpływ na procesy zachodzące w komórce. Badania inhibicji odwrotnej transkrypcji za pomocą oligonukleotydów antysensowych zawierających bloki guanozynowe pokazały, że proces ten zależny jest od stabilności tworzących się struktur DNA:RNA typu dupleks-kwadrupleks.(15, 16) Sugerowało to, że oligonukleotydy antysensowe w serii RNA będą wykazywać większą skuteczność inhibicji translacji niż oligonukleotydy DNA o takiej samej sekwencji, gdyż zarówno dupleksy jak i kwadrupleksy RNA są stabilniejsze niż ich odpowiedniki DNA:RNA czy DNA:DNA. W przypadku badanych przeze mnie cząsteczek temperatura topnienia dla struktury RNA:RNA (**CCC/G^T**) była o około 8 °C wyższa niż dla odpowiedniej cząsteczki DNA:RNA o takiej samej sekwencji oraz strukturze drugorzędowej (**DNA-CCC/G^T**) (rys. 55, 58) (Tabela 2 A). Powstawanie struktury typu **DQH** po połączeniu nici **DNA-CCC** i **G^T** potwierdziłam za pomocą widm NMR, w których obserwowałam pojawienie się sygnałów iminowych charakterystycznych zarówno dla struktury dupleksu jak i kwadrupleksu. Natomiast po połączeniu nici **CCC-DNA** z **U^T** w temperaturze pokojowej widoczna była jedynie niewielka populacja (rzędu kilku

procent) struktury **CCC-DNA/U^T**. Analizując widma ¹H NMR ustaliłam, że nić **U^T** tworzy w roztworze głównie strukturę spinki a **DNA-CCC** przyjmuje formę statystycznie nieuporządkowanej struktury. Powstawanie względnie stabilnego kompleksu **DNA-CCC/G^T** oraz niestabilnej struktury **CCC-DNA/U^T** mogłoby być korzystnym zjawiskiem w kontekście potencjalnych badań biologicznych. W sytuacji, w której oligonukleotyd antysensowy **CCC-DNA** wiązałyby się silnie do mRNA zawierającego fragment -GGGCGGG-, natomiast słabo do zmutowanego mRNA (-GGGCUGG-), mogłoby to prowadzić do zwiększenia selektywności wyciszenia ekspresji zmutowanego genu **EGFR-L858R**. Stosowanie oligonukleotydów antysensowych w serii DNA, zamiast RNA, stanowiłoby wówczas dobrą alternatywę. Efektywność takiej metody może byłaby niższa, ale za to selektywność rozpoznania zdrowego i zmutowanego punkto mRNA mogłaby być większa. W przyszłości planuję porównać aktywność biologiczną cząsteczek **CCC-DNA** oraz **CCC** dla różniących się jednonukleotydową zmianą U/G mRNA, wpierw w warunkach *in vitro* w komórce a następnie *in vivo*.

Dwucząsteczkowe struktury hybrydy typu dupleks-kwadrupeks, które mogą się tworzyć, na przykład, w komórce po transfekcji oligonukleotydem antysensowym DNA lub RNA, są znacznie mniej poznane niż ich jednoniciowe odpowiedniki. Badane przeze mnie oligonukleotydy antysensowe zarówno RNA jak i DNA po związaniu z sekwencją docelową RNA tworzyły struktury DNA:RNA lub RNA:RNA, w których kwadrupeks przyjmował topologię równoległą a domeny dupleksu i kwadrupeksu połączone były za pomocą niesparowanych reszt nukleotydowych. Wykorzystując spektroskopię CD potwierdziłam, że wprowadzenie modyfikacji chemicznych i G4-liganda do nici antysensowej nie zmieniało kierunkowości nici w kwadrupeksie, wszystkie były nadal równoległe. Zachowawczość ta może wynikać z większej trwałości termicznej kwadrupeksów równoległych w stosunku do pozostałych topologii.

Różnice stabilności termicznej pomiędzy strukturami **DQH** i **Dss** spowodowane były głównie różnymi warunkami roztworu. W obecności jonów K⁺ temperatury topnienia dla struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupeks były średnio o 8 °C wyższe niż dla struktur **Dss**, natomiast w buforze zawierającym jony Na⁺, stabilności obu typów struktur były zbliżone. Wynikało to z różnej stabilności domeny kwadrupeksowej w obecności kationów potasu i sodu. Stabilność domeny kwadrupeksowej w niewielkim stopniu zależała od typu modyfikacji (tabela 2). Jak to wyjaśniłam na stronie 89 wartości T_m wyznaczałam przy długości fali 260 nm, gdyż w większości przypadków kształt krzywej topnienia przy 295 nm uniemożliwiał poprawną interpretację wyników. Z moich

obserwacji wynikało również, że ani modyfikacje typu abasic ani linkery alifatyczne nie wpływały na kinetykę tworzenia się domeny kwadrupleksu. Krzywe topnienia UV były takie same niezależnie od tego, czy pomiar wykonywałam w kierunku od niższej temperatury do wyższej, czy odwrotnie – od wyższej do niższej (brak histerezy).

Dla trzech cząsteczek, **CCC/G^T**, **paa/G^T** i **pL3C/G^T**, w roztworze zawierającym kationy sodu lub potasu zarejestrowałam widma ¹H NMR w funkcji temperatury. Śledząc szybkość zaniku sygnałów pochodzących od obu domen mogłam prześledzić różnicę w ich stabilności. Na widmach wyraźnie widać, że w obecności kationów sodu sygnały od kwadrupleksu zanikają szybciej niż te od dupleksu. Najstabilniejszą strukturą w obecności jonów Na⁺ okazała się hybryda **paa/G^T** zawierająca dwie reszty abasic, w widmie której sygnały iminowe pochodzące od domeny kwadrupleksu zanikały wolniej niż w przypadku dwóch pozostałych cząsteczek. Z kolei w środowisku jonów K⁺ kwadrupleks jest wyraźnie stabilniejszy od dupleksu. Sygnały pochodzące od G-tetrad były widoczne nawet w temperaturze 75 °C, podczas gdy te od dupleksu zanikały wcześniej.

Analiza żeli otrzymanych w warunkach niedenaturujących dostarczyła interesujących wyników. Dla trzech cząsteczek: **paa/G^T**, **pL3G/G^T** i **pL4C/G^T** zaobserwowałam rozdwojenie odpowiadających ich pasm (rys. 73), co wskazywało na możliwość tworzenia się dwóch różnych struktur. Zakładając, że struktura dupleksu pozostała niezmienną a kwadrupleks jest równoległy, to formy te najprawdopodobniej musiały się różnić jedynie sposobem połączenia obu motywów, dupleksu i kwadrupleksu, jak pokazałam schematycznie na rys. 74. Powstawanie różnych form może być następstwem zwiększonej swobody konformacyjnej pętli wynikającej z zastąpienia nukleotydów w pętli zewnętrznej modyfikacjami abasic, linker L3 czy L4. Niestety, za pomocą analizy widm NMR nie udało mi się potwierdzić obecności dwóch różnych form, gdyż sygnały rezonansowe w części odpowiadającej za tworzenie się kwadrupleksów są bardzo szerokie i zaobserwowanie oddzielnych sygnałów od dwóch bardzo podobnych struktur kwadrupleksów było niemożliwe. Jednoznacznego potwierdzenia na tworzenie się dwóch różnych form mogłyby dostarczyć dalsze badania NMR, co wymagałoby jednak kupna kosztownych oligorybonukleotydów znakowanych izotopami ¹³C lub ¹⁵N. Tworzenie się struktur hybrydowych posiadających bardzo zbliżone konformacje zaobserwowano również w przypadku jednocząsteczkowej struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks w serii DNA.(180) Analizując wpływ zmian sekwencji w obrębie połączenia domen spinki i kwadrupleksu na stabilność cząsteczek zauważono, że zmiana terminalnej pary zasad z pary G:C na parę T:A w domenie dupleksu, tuż na połączeniu obu

domen, prowadziła do powstania dwóch form. Sugeruje to, że nie tylko większa swoboda konformacyjna pętli zewnętrznej, ale także typ reszt na połączeniu domen, spinki i kwadrupleksu, może prowadzić do powstania dwóch różniących się form.

Tendencja kwadrupleksów do dimeryzacji, głównie poprzez oddziaływania warstwowe pomiędzy 5'-terminalnymi G-tetradami jest powszechnie znana. Dlatego też aby uniknąć dimeryzacji, projektując oligonukleotydy antysensowe wykorzystałam szeroko stosowane podejście polegające na dołączeniu dodatkowej grupy fosforanowej na końcu 5'. Ku mojemu zaskoczeniu okazało się, że obecność grupy fosforanowej nie zapobiegła dimeryzacji, co potwierdziłam za pomocą elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Dla cząsteczki **CCC/G^T** intensywność wolno migrującego prążka rosła (migrującego wolniej niż odpowiadający mu prążek markera mas o wielkości 100 par zasad, rysunek 75), im więcej czasu upłynęło od połączenia nici **CCC** i **G^T** do nałożenia próbki na żel.

Badania przeprowadzone dla niemodyfikowanych oligonukleotydów pokazały, że w obecności kationów sodu i potasu hybrydyzacja oligonukleotydu antysensowego **CCC** z nicią docelową **U^T** prowadzi do powstania struktury dupleksu z nieuporządkowanymi końcami. Zakładałam, że wprowadzenie nienukleotydowych modyfikacji do domeny kwadrupleksu nici **DQ** nie wpłynie na strukturę **Dss**. Tymczasem okazało się, że dla trzech modyfikowanych oligonukleotydów w obecności jonów **K⁺** zarówno widma NMR, UV jak analiza w żelu poliakrylamidowym wskazywały na obecność struktury dwucząsteczkowej zawierającej domenę kwadrupleksu. Gdy eksperymenty powtórzyłam dla roztworów zawierających jony **Na⁺**, niewielka populacja struktury z kwadrupleksem widoczna była jedynie dla cząsteczek **paa/U^T**, **Aaa/U^T**. Wyniki te były dość nieoczekiwane, dlatego też zastanawiało mnie, jak taki kwadrupleks może być zbudowany. Po pierwsze, musiałby składać się tylko z dwóch G-tetrad, chyba że dodatkowo utworzyłaby się mieszana tetradą **G:G:G:U**. Kwadrupleks RNA zawierający tetradę **G:G:U:U** znany jest w literaturze, jednak jego powstanie stymulowane było warunkami stłoczenia molekularnego.(51) Był on aż o 36 °C mniej stabilny niż odpowiadający mu kanoniczny kwadrupleks zbudowany z trzech G-tetrad. Zaobserwowano ponadto, że po związaniu liganda NMM, kwadrupleks ten wykazywał niską fluorescencję emisji. Być może również w przypadku cząsteczek **paa/U^T** i **Aaa/U^T** obecność reszty abasic ułatwia utworzenie dodatkowej tetrady, w której jedna z reszt guanozyny zastąpiona jest przez resztę urydyny.

W moich badaniach obie nici, antysensowa i docelowa RNA, były podobnej długości. Pomyślałam więc, że tworzenie się nietypowej struktury kwadrupleksu może być częściowo uwarunkowane nie tylko obecnością reszt abasic, ale również labilnością konformacyjną 3'- terminalnego fragmentu nici U^T (-GGGCUGGC-). W komórce, gdzie sekwencja docelowa jest częścią długiego mRNA, prawdopodobieństwo utworzenia kwadrupleksu powinno być mniejsze. Rzeczywiście, gdy wydłużyłam sekwencję docelową o 9 reszt na końcu 3' (UL^T), po połączeniu jej z cząsteczkami **Aaa** oraz **paa**, po wybarwieniu żelu za pomocą roztworu NMM, nie obserwowałam już prążków wskazujących na obecność kwadrupleksu. Wynik tego eksperymentu sugerował, że w warunkach komórkowych oligorybonukleotydy **Aaa** oraz **paa** powinny utworzyć oczekiwaną przeze mnie strukturę **DQH** lub **Dss**, w zależności od jednonukleotydowej zmiany G/U w sekwencji docelowej.

Nieoczekiwanych wyników dostarczyła analiza widm 1H NMR i UV pojedynczych nici. Okazało się bowiem, że w obecności kationów potasu wszystkie modyfikowane oligorybonukleotydy antysensowe występują w roztworze w równowadze między dwiema konformacjami, spinką i kwadrupleksem. Jak można się było spodziewać, kwadrupleksy tworzyły się łatwiej w obecności jonów K^+ niż Na^+ . W przypadku cząsteczek **paa** i **Aaa**, w których reszta abasic znajduje się pomiędzy blokami guanozynowymi i na połączeniu obu domen, kwadrupleks był dominującą formą w obu warunkach roztworu. Otrzymane wyniki potwierdziły, że obecność modyfikacji typu abasic w pętli może promować powstawanie struktury kwadrupleksu. Wzrost populacji formy kwadrupleksu był również zauważalny wraz ze wzrostem długości linkera alifatycznego.

Obawiałam się, że tworzenie stabilnych struktur drugorzędowych przez oligorybonukleotydy antysensowe może konkurować z powstawaniem struktur hybrydowych **DQH**, co w konsekwencji mogłoby osłabiać ich skuteczność w komórce. Przeprowadziłam więc eksperyment, w którym połączyłam ze sobą dwie ułożone uprzednio pojedyncze nici, stabilną spinkę **CCC** i nić G^T , która w obecności kationów potasu była w równowadze pomiędzy spinką a kwadrupleksem oraz kwadrupleks **paa** i nić G^T . Okazało się, że wstępne ustrukturyzowanie poszczególnych nici nie przeszkadzało w powstaniu struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks. Wynik ten był dla mnie bardzo ważny, gdyż w przeciwnym przypadku skłonność oligorybonukleotydów antysensowych do tworzenia stabilnych struktur drugorzędowych uniemożliwiłaby wykorzystanie ich w terapii antysensowej.

W celu zwiększenia efektywności i selektywności dwufunkcyjnych oligorybonukleotydów antysensowych nakierowanych na wyciszenie mRNA zawierającego mutację punktową U→G, postanowiłam poszerzyć moje badania o wykorzystanie G4-ligandów. Do moich badań wybrałam ligand **o-BMVC** o stałej wiązania do kwadrupleksów rzędu 10^7 M^{-1} , który po związaniu z kwadrupleksem wykazuje 80-120 krotne wzmocnienie fluorescencji. Ponadto wykorzystałam zsyntetyzowaną w naszym Zakładzie pochodną **o-BMVC-C3**. Stałe asocjacji wyznaczone dla obu tych ligandów były porównywalne i wykazały 7 – 22 krotnie większe powinowactwo do struktur typu **DQH** niż do dupleksów **Dss** lub **DX**. Wartości stałej wiązania obu ligandów do cząsteczki **paa/G^T** były co najmniej dwukrotnie większe niż dla pozostałych struktur hybrydowych, co sugerowało iż może ona oddziaływać z ligandami **o-BMVC** i **o-BMVC-C3** w nieco inny sposób niż pozostałe struktury hybrydowe. Na podstawie otrzymanych danych oszacowałam, że do każdej cząsteczki hybrydy wiążą się dwie cząsteczki liganda, co wskazywało, że najprawdopodobniej oddziałują one z terminalnymi G-tetradami.

Sprawdziłam również wpływ liganda **o-BMVC-C3** przyłączonego kowalencyjnie do oligorybonukleotydu antysensowego, na strukturę i stabilność badanych cząsteczek. Pokazałam, że ligand **o-BMVC-C3** przyłączony kowalencyjnie do oligonukleotydu **CCC** wiąże się selektywnie do domeny kwadrupleksu w strukturze **o-BMVC-C3-CCC/G^T**. Temperatura topnienia tej hybrydy była o około 2.7 °C wyższa niż dla cząsteczki **CCC/G^T**. Natomiast gdy oligorybonukleotyd **o-BMVC-C3-CCC** połączony został z nicią **U^T**, wyznaczone temperatury topnienia były takie same dla cząsteczek **o-BMVC-C3-CCC/U^T** i **CCC/U^T** (w granicach błędu). Pomimo, iż efekt stabilizacji termicznej nie był duży, w warunkach komórkowych obecność oddziaływania ligand-kwadrupleks może wpływać na zmniejszenie aktywności komórkowych helikaz i spowolnić proces rozplatania kwadrupleksu w komórce. Co ważniejsze, taki ligand związany kowalencyjnie do oligorybonukleotydu antysensowego może służyć też jako doskonale selektywny znacznik fluorescencyjny do detekcji dwucząsteczkowych kwadrupleksów.(176)

Dzięki badaniom, które zostały wykonane we współpracy z dr Fedoruk-Wyszomirską mogłam dokonać wstępnej oceny efektywności strategii antysensowej opartej na tworzeniu się struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks. Jak się okazało, poziom wyciszenia ekspresji badanych genów, zintegrowanych z białkiem zielonej fluorescencji, był różny i zależał nie tylko od sekwencji docelowego RNA (**los-G**, **los-U**, **EGFR-G**, **EGFR-U**), ale również od typu struktury drugorzędowej (tabela 5). Oligorybonukleotydy

zawierające segment dupleksu i kwadrupleksu efektywniej wyciszały ekspresję genów niż klasyczne oligonukleotydy antysensowe, tworzące dupleksy z docelowym RNA. Poziom wyciszenia translacji, mierzony poziomem intensywności fluorescencji białka GFP, różnił się znacznie dla klasycznych oligonukleotydów antysensowych (14 reszt nukleotydowych, tabela 5, sekwencje: **2**, **2A**, **5**, **5A**) i dla oligonukleotydów, które z docelowym RNA miały utworzyć różne struktury hybryd typu dupleks-kwadrupleks (tabela 5; modele: **A1**, **B1**, **C1**). Klasyczne oligorybonukleotydy antysensowe (tabela 5, sekwencje: **2**, **2A**, **5**, **5A**,) wyciszały na poziomie 28 - 51% podczas gdy struktury hybrydowe wykazywały bardzo wysoką skuteczność hamowania translacji, rzędu 69 - 86%. Chociaż poziom wyciszenia translacji w niewielkim stopniu zależał od pozycji domeny kwadrupleksowej, najefektywniejszym okazał się oligonukleotyd **7**, który z nicią **los-G** tworzył strukturę, w której po obu stronach domeny kwadrupleksowej znajdują się krótkie fragmenty dupleksu (tabela 5, model **C1**). W tym wypadku poziom wyciszenia translacji wyniósł aż 86%.

Jednym z głównych celów mojej pracy było zbadanie zdolności oligonukleotydów antysensowych bogatych w reszty guanozyny do selektywnego rozpoznania docelowych sekwencji RNA, różniących się tylko jedną resztą nukleotydową. Porównując względny poziom wyciszenia genów **los-G** vs **los-U** i **EGFR-G** vs **EGFR-U** okazało się, że różnica ta, choć niewielka, obserwowana była dla wszystkich oligorybonukleotydów tworzących z docelowym RNA strukturę hybrydy typu dupleks-kwadrupleks (**1** i **1A**, **4** i **4A**, **7** i **7A**). Możliwość rozpoznania jednonukleotydowej zmiany w sekwencji docelowej przez oligonukleotydy antysensowe ma ogromny potencjał terapeutyczny. Jak wcześniej wspomniałam, narzędzie takie mogłoby potencjalnie stanowić alternatywę dla dostępnych terapii u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.

W przyszłości planuję wykonać analogiczne badania dla oligonukleotydów w serii RNA i DNA zawierających modyfikacje chemiczne. Jak pokazałam, wprowadzenie w odpowiednie pozycje modyfikacji chemicznych, takich jak linkery alifatyczne czy reszty abasic może stabilizować lub promować powstawanie kwadrupleksów, co powinno przyczynić się do skuteczniejszego zahamowania procesu translacji. Chciałabym również sprawdzić, czy kowalencyjne przyłączenie G4-liganda do oligorybonukleotydu antysensowego będzie efektywniej wyciszać ekspresję genów dzięki zwiększeniu specyficzności rozpoznania sekwencji docelowej (efekt *on-target*) i wzrostowi stabilności kwadrupleksu.

Za najważniejsze osiągnięcia mojej pracy uważam:

- wykazanie, że hybrydyzacja oligonukleotydów antysensowych DNA i RNA bogatych w reszty guanozyny z cząsteczkami RNA, których sekwencje różnią się jedną resztą nukleotydową prowadzi do powstania hybrydowej struktury typu dupleks-kwadrupleks i dupleksu z nieuporządkowanymi końcami,
- określenie wpływu nienukleotydowych modyfikacji chemicznych na tworzenie się i właściwości hybrydowych struktur hybrydowych RNA typu dupleks-kwadrupleks i dupleksów z nieuporządkowanymi końcami,
- udowodnienie, że ligand **o-BMVC-C3** przyłączony kowalencyjnie do oligonukleotydu **CCC** wiąże się selektywnie do domeny kwadrupleksu w strukturze **o-BMVC-C3-CCC/G^T**,
- wykazanie, że oligorybonukleotydy zawierające segment dupleksu i kwadrupleksu efektywniej wyciszają ekspresję genów niż klasyczne oligorybonukleotydy antysensowe,
- wykazanie potencjału oligorybonukleotydów antysensowych bogatych w reszty guanozyny do selektywnego wyciszenia docelowych sekwencji mRNA (EGFR i EGFR-L858R), różniących się tylko jedną resztą nukleotydową.

IX. MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1. Odczynniki

NH₄OH 32% - amoniak, *Merck*, 105426
LiCl – chlorek litu, *Sigma-Aldrich*, L4408-100G
KCl – chlorek potasu, *Sigma-Aldrich*, P3911-500G
NaCl – chlorek sodu, *Sigma-Aldrich*, S9888-500G
(Et)₃N·3HF – fluorowodorek trietyloamonowy, *Sigma-Aldrich*, 344648-25G
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, *Lab Empire*, EDT001.500
CH₃NH₂ 40% – metyloamina, *Sigma-Aldrich*, S01152-021
NMM – N-metylo-mezoporfiryna IX, *Frontier Scientific*, NMM580
TEA – trietyloamina, *Sigma-Aldrich*, 471283-2L
TRIS – tri(hydroksymetylo)aminometan, *Lab Empire*, TRS001.500
H₃BO₃ – kwas borowy, *Lab Empire*, BOR001.1
TEAA 2M – octan trietyloaminy, przygotowany w laboratorium
K₂HPO₄ – wodorofosforan potasu, *Sigma-Aldrich*, P3786-500G
KH₂PO₄ – diwodorofosforan potasu, *Sigma-Aldrich*, P0662-500G
Na₂HPO₄ – wodorofosforan sodu, *Sigma-Aldrich*, S9763-500G
NaH₂PO₄ – diwodorofosforan sodu, *Sigma-Aldrich*, S0751-500G
NH₄HCO₃ – wodorowęglan amonu, *Sigma-Aldrich*, 09830-500G
Quenching Buffer, TRIS Buffer Solution for RNA, tzw. bufor stop, *Glen Research*, 60-4120-80
o-BMVC – diodek 3,6-bis (1-metylo-2-winylopirydyniowy)karbazolu
o-BMVC-C3 – pochodna o-BMVC podstawiona kwasem 9-propionowym
o-BMVC-C3-NHS – ester aktywny o-BMVC-C3
o-BMVC oraz jego pochodne zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Biomolekularnego NMR

Wzorce:

TSP – 3-(trimetylosililo)propionan-2,2,3,3-D₄ sodu, *Sigma-Aldrich*, 269913-1G
Wrzorzec DNA (drabinka w zakresie od 10 – 100 bp) – *Thermo Fisher*, SM1303

Linkery:

Abasic – Abasic phosphoramidite, *Chem Genes*, ANP-7058
L2 – DMT-ethane-Diol phosphoramidite, *Chem Genes*, CLP-2250
L3 – DMT-propane-Diol phosphoramidite, *Chem Genes*, CLP-9908
L4 – DMT-butane-Diol phosphoramidite, *Chem Genes*, CLP-9775
C6 – MMT Amino C-6 CED phosphoramidite, *Chem Genes*, CLP-1563

Rozpuszczalniki

ACN – acetonitryl, *Thermo Fisher*, 02-002-180
CH₂Cl₂ – chlorek metylenu, *POCH*, BA8410114
D₂O – ciężka woda, *Sigma-Aldrich*, 151882-100G
DMF – dimetyloformamid, *POCH*, 355120112
CH₃OH – metanol, *CHEMPUR*, 666219904

Przygotowanie odczynników

2M TEAA – odczynnik wykorzystywany do oczyszczania oligonukleotydów.
Do 50 ml autoklawowanej wody dodano 11.45 ml lodowatego kwasu octowego oraz 27.88 ml trietyloaminy.
Roztwór doprowadzono do pH 7 (HCl) i uzupełniono wodą do objętości 100 ml.

0.001 M (1 µg/ml) NMM – odczynnik wykorzystywany do wybarwiania żelu.
Roztwór przygotowano w buforze 0.5xTBE w objętości 50 ml.

10xTBE – stężony bufor stosowany do elektroforezy żelowej.
121.1 g TRIS, 61.8 g oraz
9.3 g EDTA całość uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 1l.

Akcesoria dodatkowe

- ✓ kolumnienka filtracyjna, *Fiberbrand Filter Column*, 11-387-50
- ✓ Płytki żelowe – Novex TBE Gels, 20% *Thermo Fisher SCIENTIFIC* EC63155BOX
- ✓ Kolumny Trytyl-ON:
Glen-Pak RNA Purification Cartridge (60-6100, 60-6200)
Glen-Pak DNA Purification Cartridge (60-5100, 60-5200)
- ✓ Amicon Ultra-4 – probówka ultrafiltracyjna, punkt odcięcia 3000 Da, *Merck*, UFC800396

Oligonukleotydy na potrzeby badań biologicznych zostały zakupione w *IBA Lifesciences*.
Poniżej podane są ich sekwencje od końca 5':

5' AGCTTATGGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTG
CGGAAGAG G 3' / 3' ATACCAGTTCTAGTGTCTAAAACCCGACCGGTTTG
ACGACCCACGCCTTCTCCCTAG 5'

5' AGCTTATGGTCAAGATCACAGATTTTGGGCGGGCCAAACTGCTGGGTGC
GGAAGAGG 3' / 3' ATACCAGTTCTAGTGTCTAAAACCCGCCCGGTTTGAC
GACCCACGCCTTCTC CCTAG 5'

5' AGCTTATGATAGTTGCAGAGATCGATAGTCGTAGGGCTGGCATAGTTGC
ACTG G 3' / 3' A TACTATCAACGTCTCTAGCTATCAGCATCCCGACCGTATC
AACGTGACCCTAG 5'

5' AGCTTATGATAGTTGCAGAGATCGATAGTCGTAGGGCGGGCATAGTTGC
ACTG G 3' / 3' A TACTATCAACGTCTCTAGCTATCAGCATCCCGCCCGTATC
AACGTGACCCTAG 5'

5' CGGGCGGGCCGACUAUCGAUCUC
 5' CGGGCGGGCAAUCUGUGAUCUUG
 5' CGACUAUCGAUCUC
 5' AAUCUGUGAUCUUG
 5' GCCCCGCCCUACGACUAUC
 5' GCCCCGCCCAAAAUCUGUG
 5' CCCAGUGCAACUAUUAGGGGCGGGC
 5' CACCCAGCAGUUUGUAGGGGCGGGC
 5' CCCAGUGCAACUAU
 5' CACCCAGCAGUUUG
 5' GCAACUAUGCCCCGCCCUA
 5' GCAGUUUGGCCCGCCCAA
 5' GCAACUAUUAGGGGCGGGCCGACUAUC
 5' GCAGUUUGUAGGGGCGGGCAAUCUGUG
 5' GCAACUAUGCCCCGCCCUACGACUAUC
 5' GCAGUUUGGCCCGCCCAAAAUCUGUG
 5' GCAACUAUUAACUUGCCCCGACUAUC
 5' GCAGUUUGUAAACUUGCCCAAUCUGUG
 5' CGGGCGGGC
 5' UUUUUUUUUUUUUU

1.2. Aparatura pomiarowa

- ✓ syntetyzer DNA/RNA, MerMade 12, firmy BioAutomation
- ✓ syntetyzer DNA/RNA, Synthesizer H6/H-8, firmy K&A
- ✓ spektrometr NMR Bruker AVANCE III 700 MHz wyposażony w głowicę kriogeniczną
- ✓ spektrofotometr UV-Vis JASCO V-750 z termoprogramatorem
- ✓ pH-metr Mettler Toledo
- ✓ blok grzejny Eppendorf ThermoMixerC
- ✓ wirówka MiniSpinEppendorf
- ✓ wirówka Eppendorf Centrifuge 5430R
- ✓ koncentrator próżniowy firmy Labconko
- ✓ aparat do żelu XCell SureLock Mini-Cell EI0001
- ✓ skaner materiałów promieniotwórczych i fluorescencyjnych FLA-5100 (PhosphorImager) FujiFilm

1.3. Programy stosowane do przetwarzania, analizy i prezentacji danych eksperymentalnych

- ✓ TopSpin 3.0 Bruker – procesowanie i analiza otrzymanych widm NMR
- ✓ SpectraMenager – porównywanie, przetwarzanie i raportowanie danych z dowolnego systemu spektroskopii JASCO
- ✓ MeltWin 3.5 – analiza danych z pomiarów UV, wyznaczenie wartości T_m
- ✓ Origin Pro 8.0 – przygotowanie wykresów krzywych topnienia
- ✓ RNAstructure 5.6 – przewidywanie struktur drugorzędowych RNA
- ✓ MultiGauge V3.0 – analiza prążków na żelu i przygotowanie rysunków otrzymanych żeli

- ✓ ChemSketch – rysowanie wzorów strukturalnych związków chemicznych
- ✓ CorelDraw x5 – przygotowanie rysunków

2. METODY

Synteza chemiczna i przygotowanie oligonukleotydów do badań

- ✓ Poniżej wymienione cząsteczki RNA oraz DNA, zsyntezowane zostały w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych (syntetyzer DNA/RNA MerMade 12, firmy BioAutomation) lub w Pracowni Biomolekularnego NMR (syntetyzer DNA/RNA Synthesizer H6/H-8, firmy K&A).

Sekwencje otrzymanych oligonukleotydów (od 5' do 3'):

5' CGGGCGGGC
 5' UUCAAGUCCGGCA
 5' AAGUUCAGGCCGU
 5' CGGGCGGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' CGGGCGGGC(CUUCAAGUCCGGCA)^{2'OMe}
 5' pGGGaGGGaCUUCAAGUCCGGCA
 5' AGGGaGGGaCUUCAAGUCCGGCA
 5' pGGGaGGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' AGGGaGGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' pGGGCGGGaCUUCAAGUCCGGCA
 5' pGGGL2GGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' pGGGL3GGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' pGGGL4GGGCCUUCAAGUCCGGCA
 5' d[CGGGCGGGCCTTCAAGTCCGGCA]
 5' UGCCGACUUGAAGUAGGGCGGGC
 5' UGCCGACUUGAAGUAGGGCUGGC
 5' UGCCGACUUGAAGUAGGGCGGGCAUAGUUGCA
 5' UGCCGACUUGAAGUAGGGCUGGCAUAGUUGCA
 5' C6-NH₂-CGGGCGGGCCUUCAAGUCCGGCA

Cząsteczki te otrzymano na drodze syntezy chemicznej stosując metodę amidofosforynową na podłożu stałym.^{(181) (182)} Synteza w skali 1 μmol prowadzona była przy użyciu handlowo dostępnych amidofosforynów, C6-aminolinkera (C6) oraz łączników nienukleotydowych (abasic, linkerów alifatycznych L2, L3, L4). Otrzymane po syntezie oligonukleotydy poddawałam dalszej procedurze opisanej poniżej.

Po zakończonej syntezie otrzymywałam oligonukleotydy, które były połączone z podłożem stałym poprzez koniec 3' oraz posiadały grupę blokującą DMT na końcu 5'.

Oligonukleotydy te poddawałam następnie kilkuetapowej procedurze w celu uzyskania próbek odpowiedniej czystości (tabela 1):

- *odcięcie RNA od podłoża*

Do oligorybonukleotydu osadzonego na podłożu stałym dodano 1.5 ml roztworu AMA ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{CH}_3\text{NH}_2$ 40%; 1.5 ml, 1:1 v/v). Reakcję prowadzono przez 10 min w temperaturze 65 °C. Następnie materiał wymrażano przez 10 min w temperaturze - 20 °C. Po tym czasie podłoże stałe odsączono na kolumnie filtracyjnej i przemywano kilkakrotnie autoklawowaną wodą w ilości 3 x 0.25 ml. Przesącze odparowywano do sucha w koncentratorze próżniowym w temperaturze 15 °C.

- *usunięcie grup ochronnych*

Odblokowanie grupy tert-butyldimetylosililowej (TBDMS) w pozycji 2' RNA metodą DMT-ON

Oligorybonukleotyd odcięty od podłoża rozpuszczono w 150 μl bezwodnego DMSO i następnie dodano 60 μl TEA oraz 75 μl roztworu $(\text{Et})_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$. Reakcję prowadzono przez 2.5 godziny w temperaturze 65 °C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 1.75 ml buforu zatrzymującego reakcję tzw. bufor stop (RNA Quenching Buffer).

- *oczyszczenie oligorybonukleotydów metodą DMT-ON*

W celu oczyszczenia oligonukleotydów RNA wykorzystano kolumnienki Glen-Pak dedykowane RNA. Przed nałożeniem roztworu RNA, kolumnienki przepłukano w pierwszej kolejności 0.5 ml ACN, potem 1 ml 2M TEAA. Następnie na poszczególne kolumnienki naniesiono roztwór oligomeru RNA w objętości 1 ml. Po naniesieniu całego materiału RNA, kolumnienki przemyto w pierwszej kolejności mieszaniną ACN/2M TEAA (1ml, 1/9, v/v), następnie 1 ml dejonizowanej wody, dwukrotnie 1 ml 2% TFA i kolejno dwukrotnie 1 ml dejonizowanej wody.

Właściwy oligorybonukleotyd wymyto z kolumnienek przemywając je 1.5 ml roztworu $\text{NH}_4\text{HCO}_3:\text{ACN}$ (7:3, v/v).

- *odsolenie oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny*

Do odsolenia oligomerów i oddzielenia małowcząsteczkowych zanieczyszczeń używano ultrafiltrów Amicon Ultra-4 z membraną z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia 3000 Da i pojemności 4 ml. Do czterokrotnie przefiltrowanych sterylną i dejonizowaną wodą próbek ultrafiltracyjnych dodawano roztwór zasolonych oligomerów oraz dopełniano wodą do 4 ml. Probówki wirowano z prędkością 7830 obrotów na minutę, w temperaturze 25 °C przez 35 min. Czynność powtarzano dla każdej z próbek czterokrotnie. Następnie pozostały roztwór oligomeru przenoszono do probówek typu eppendorf i dodawano bufor 150 mM LiCl w objętości 1.5 ml. Roztwór ogrzewano w temperaturze 90 °C przez 3 min w celu denaturacji oligomeru i ułatwienia wymiany pozostałych kationów amonowych na litowe. Po wystygnięciu, roztwór oligomeru przenoszono ponownie do probówek ultrafiltracyjnych, uzupełniano buforem litowym do 4 ml. Procedurę tę powtarzano trzykrotnie. W kolejnym kroku roztwór oligomeru czterokrotnie przefiltrowano stosując za każdym razem 4 ml sterylnej wody. Ostatecznie zatężony i odsolony roztwór oligomeru (~ 50 µl) przeniesiono do probówki typu eppendorf i uzupełniono sterylną wodą do objętości 1 ml.

Przygotowanie oligonukleotydów DNA:

- *odcięcie DNA od podłoża*

Do oligonukleotydu na podłożu stałym dodano 1 ml roztworu AMA

(NH₄OH:CH₃NH₂ 40%; 1:1 v/v). Podłoże stałe odsączono na kolumnie filtracyjnej i przemyto kilkakrotnie autoklawowaną wodą w ilości 3 x 0.25 ml. Następnie przed nałożeniem materiału DNA na kolumnienki Glen-Pak dedykowane dla DNA dodano do niego 1 ml 100 mg/ml NaCl.

- *oczyszczenie oligonukleotydów DNA metodą DMT-ON*

Przed nałożeniem zasolonego roztworu DNA na kolumnienki przepłukano je 0.5 ml ACN oraz 1 ml 2M TEAA. Następnie na poszczególne kolumnienki наносono roztwór oligomeru DNA w objętości 1 ml. Dalej, kolumnienki przemywano dwukrotnie 1 ml roztworem soli 5% ACN/100 mg/ml NaCl, kolejno dwukrotnie 1ml 2% TFA oraz dwukrotnie 1 ml dejonizowanej wody. Po zmianie odbieralnika,

materiał DNA eluowano przy użyciu 1 ml 50% ACN w wodzie zawierającej 0.5% NH₄OH.

- *odsolenie próbek DNA bogatych w reszty guanozyny*

Postępowano zgodnie z procedurą opisaną dla cząsteczek RNA

Przy przygotowaniu próbek RNA i DNA korzystałam z procedur zamieszczonych na stronie producenta kolumnienek DMT-ON:

https://www.glenresearch.com/media/productattach/import/tbn/GlenPak_UserGuide.pdf

Obliczanie ilości kwasów nukleinowych

Stężenia próbek oligonukleotydów wyznaczałam w oparciu o pomiar absorbancji w temperaturze 80 °C oraz współczynnik ekstynkcji badanych próbek.

Ilość odsolonych oligonukleotydów obliczałam na podstawie wzorów:

$$OD = A_{260} \cdot rozc \cdot V$$

A₂₆₀ – wartość absorbancji przy długości fali 260 nm;

rozc – rozcieńczenie próbki umieszczonej w kuwecie o drodze optycznej 1 cm;

V – całkowita objętość roztworu [ml]

$$C = A / \epsilon \cdot l$$

C – stężenie [mol/dm³]

ε – współczynnik ekstynkcji [dm³/mol · cm], obliczony przy użyciu kalkulatora internetowego: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

l – droga optyczna [cm]

- Bufory stosowane do badań:

Bufor potasowy: 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.8

K₂HPO₄ – 24.85 ml, 0.2 M - (1.7418 g w 50 ml wody)

KH₂PO₄ – 25.15 ml, 0.2 M - (1.3609 g w 50 ml wody)

KCl – 372.7 mg

EDTA – 0.1 mM, 3.72 mg

Połączono 24.85 ml K₂HPO₄ oraz 25.15 ml KH₂PO₄, następnie uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 90 ml. Zmierzono wartość pH. Zależnie od

wskazań pH-metru dodawano K_2HPO_4 lub KH_2PO_4 . Po ustaleniu pH dodano KCl oraz EDTA i uzupełniono wodą do 100 ml.

Bufor sodowy: 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.8
 Na_2HPO_4 – 24.5 ml, 0.2 M - (1.4196 g w 50 ml wody)
 NaH_2PO_4 – 25.5 ml, 0.2 M - (1.1998 g w 50 ml wody)
NaCl – 876.6 mg
EDTA – 0.1 mM, 3.72 mg
Połączono 24.5 ml Na_2HPO_4 oraz 25.5 ml NaH_2PO_4 , następnie uzupełniono sterylną, dejonizowaną wodą do 90 ml. Zmierzono wartość pH. Zależnie od wskazań pH-metru dodawano Na_2HPO_4 lub NaH_2PO_4 . Po ustaleniu pH dodano NaCl oraz EDTA i uzupełniono wodą do 100 ml.

Bufor litowy: 10 mM Tris, 150 mM LiCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.8
Tris - 60.5 mg
LiCl - 317.9 mg
EDTA – 1.86 mg
Tris dodano do 49 ml sterylnej, dejonizowanej wodzie a po doprowadzeniu pH roztworu do wymaganej wartości za pomocą HCl dodano pozostałe składniki. Następnie całość uzupełniono wodą do 50 ml.

2.3. Rejestracja widm NMR

Wszystkie widma prezentowane w rozprawie doktorskiej zostały zarejestrowane na spektrometrze AVANCE III 700 MHz firmy Bruker. Do pomiarów używano głowicy kriogenicznej (ang. *Cryo Probe*) wyposażonej w cewki 1H - $^{31}P/^{13}C/^{15}N/D$. Przygotowaną mieszaninę dwóch oligonukleotydów połączonych równomolowo odparowywano do sucha, następnie rozpuszczano w odpowiednim buforze (180 μ l buforu, 20 μ l D_2O) uzyskując próbkę o stężeniu rzędu 0.1 - 0.2 mM (pomiar 1D). Próbkę oligonukleotydu przenoszono do próbówki o średnicy 3 mm i podgrzewano w temperaturze 95 °C przez 3 minuty a następnie powoli schładzano do temperatury pokojowej. Przesunięcia chemiczne w widmie 1H NMR były mierzone względem wzorca, częściowo deuterowanego 3-(trimetylosililo)propionianu sodu (TSP- d_4).

Jednowymiarowe widma 1H NMR rejestrowano głównie w temperaturze 25°C przy szerokości spektralnej 24 ppm. Widma temperaturowe 1H NMR rejestrowano w zakresie temperatur 25°C - 75°C, co 10 stopni. Silny sygnał pochodzący od H_2O był tłumiony za pomocą gradientowych impulsów metodą *excitation sculpting* stosując sekwencję impulsów zgesgp.(183)

Dwuwymiarowe widma 2D ^1H - ^1H NOESY (sekwencja impulsów: noesyegsgpph) wykonano dla próbek **paa/G^T** oraz **DX**. Widmo dla próbki **paa/G^T** wykonano w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (v/v, 9:1) w temperaturze 15 °C, a czas mieszania wynosił 200 ms przy szerokości spektralnej 24 ppm. W eksperymencie zostało zebranych 256 inkrementów z liczbą zliczeń 448. Widmo dla drugiej próbki wykonano w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (v/v, 9:1) w temperaturze 5 °C, a czas mieszania wynosił 400 ms przy szerokości spektralnej 24 ppm. W eksperymencie zostało zebranych 272 inkrementów z liczbą zliczeń 160.

Heterojądrowe widmo korelacyjne 2D ^1H - ^{15}N HSQC (sekwencja impulsów: hsqcpcf3gpphwg) zarejestrowano dla próbki **paa/G^T** o stężeniu 1 mM w zakresie spektralnym obejmującym przesunięcia chemiczne iminowych atomów azotu (zakres 140-165 ppm) w temperaturze 25 °C. W eksperymencie zostało zebranych 60 inkrementów z liczbą zliczeń 7360.

Pomiar temperatury topnienia

Krzywe topnienie zarejestrowano przy użyciu spektrofotometru JASCO V-750 z termoprogramatorem. Aby uniknąć powstawania pęcherzyków w kuwecie pomiarowej, przed rozpuszczeniem oligonukleotydu bufor używany do pomiarów ogrzewano przez 4 min w 95 °C a następnie schładzano i wirowano z prędkością 10000 obrotów na minutę. Do pomiarów stosowano oligonukleotydy o stężeniu ~ 6.2 μM w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 0.5 cm i objętości 150 μl . Roztwory oligonukleotydów przed przeniesieniem do kuwetek kwarcowych przygotowywano w probówkach typu eppendorf. Ogrzewano je przez 3 minuty w 95 °C a następnie pozostawiano do wystygnięcia i przenoszono do kuwetek. Aby zapobiec odparowaniu rozpuszczalnika, na powierzchnię roztworu w kuwecie nanoszono olej silikonowy a kuweczkę zamykano koreczkiem. Pomiar rejestrowano przy dwóch długościach fali, 260 nm oraz 295 nm, obserwując zmiany wartości absorbancji wraz ze wzrostem temperatury. Pomiar prowadzono w zakresie temperatur od 8 °C do 90 °C a szybkości zmian temperatury wynosiła 0.2°C/min.

Od widma UV zarejestrowanego dla roztworu oligonukleotydu w buforze automatycznie odejmowane było widmo samego buforu. Za wzorzec służył ten sam bufor, w którym rozpuszczono analizowane próbki. Do procesowania i analizowania otrzymanych krzywych użyto programów SpectraMenager, MeltWin 3.5 oraz Origin 8.

Pomiary termodynamiczne

W celu wyznaczenia parametrów termodynamicznych badanych cząsteczek wykorzystano metodę topnienia UV przy długości fali 260 nm lub 295 nm. Dla określenia parametrów termodynamicznych stosowano do dziewięciu stężeń każdego oligomeru w zakresie 10^{-4} do 10^{-6} M. Przygotowane w odpowiednich stężeniach próbki umieszczano w kuwetach o drodze optycznej 0.1 cm, 0.5 cm, 1.0 cm i objętościach odpowiednio 30 μ l, 150 μ l oraz 300 μ l. Jako wzorzec, w osobnej kuwecie, stosowany był ten sam bufor, w którym przygotowane były badane próbki oligonukleotydów (bufor sodowy lub potasowy). Po zakończonym pomiarze, dla pierwszych trzech stężeń, roztwory oligomerów oddzielano od oleju, następnie rozcieńczano zgodnie z wyliczeniami przedstawionymi poniżej (rys. 94) uzyskując kolejne stężenia oligonukleotydów. Rozcieńczony materiał oligonukleotydów przenoszono do kuwetek i prowadzono ponownie analizę. Czynności tę powtarzano do uzyskania dziewięciu krzywych topnienia.

Sequence	Abs. (80C) in water	V (ml)	Dilution	# OD	Ext. Coeff	# Mol	Abs. (20C) in buffer		
GT	3,038	1	75	155,6	248300	9,18E-07			
paC	0,484	1	75	36,3	203200	1,79E-07			
AP171		$\epsilon_{260} =$	225750						
Conc. #	Conc. (M)	Path (cm)	Th. Abs	Volume (ul)	# Mol	Vol. Stock A (ul)	Vol. Stock B (ul)	Vol. Prevs. (ul)	Vol. Buffer (ul)
1	8,0E-05	0,100	1,80	30	2,392E-09	1,30	6,69	Dry Down	30
2	4,8E-05	0,100	1,08	30	1,434E-09			17,98	12,02
3	2,9E-05	0,100	0,65	30	8,595E-10			17,98	12,02
4	1,7E-05	0,500	1,94	150	2,576E-09	1,40	7,21	Dry Down	150
5	1,0E-05	0,500	1,16	150	1,544E-09			89,91	60,09
6	6,2E-06	0,500	0,70	150	9,255E-10			89,91	60,09
7	3,7E-06	1,000	0,83	300	1,110E-09	0,60	3,10	Dry Down	300
8	2,2E-06	1,000	0,50	300	6,651E-10			179,83	120,17
9	1,3E-06	1,000	0,30	300	3,987E-10			179,83	120,17

Rys. 94. Przykładowe obliczenia dotyczące rozcieńczeń wykorzystywane w eksperymentach topnienia UV.

W celu wyznaczenia parametrów termodynamicznych: entalpii (ΔH°), entropii (ΔS°), energii swobodnej (ΔG°) otrzymane dane z spektrometru JASCO V-750 analizowano w programie MeltWin 3.5.

Pomiar dichroizmu kołowego (CD)

Pomiary dichroizmu kołowego wykonano przy użyciu spektrofotometru JASCO model J-815 CD wyposażonego w przystawkę Peltiera zapewniającą stabilne warunki temperatury. Pomiary prowadzono dla próbek kwasów nukleinowych o stężeniu około 13 μM . Próbki przed pomiarem ogrzewano przez 3 minuty w 95 °C a następnie pozostawiano do wystygnięcia. Widma zostały zarejestrowane w zakresie fali o długości 220 – 330 nm, w temperaturze 25 °C. Pomiar był wykonywany z szybkością skanowania 100 nm/min dla trzech powtórzeń. Od widma CD zarejestrowanego dla roztworu oligonukleotydu w buforze automatycznie odejmowane było widmo samego buforu. Za wzorzec służył ten sam bufor, w którym rozpuszczono analizowane próbki. Pomiar prowadzono w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0.5 cm i objętości 1200 μl . Do procesowania i analizowania otrzymanych widm użyto programu Origin 8.

Widma CD zostały znormalizowane zgodnie ze wzorem:

$$\Delta\varepsilon = \theta / (32.980 \times C \times l)$$

$\Delta\varepsilon$ – molowa różnica absorpcji [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$]

θ – pierwotna amplituda CD [mdeg]

C – stężenie próbki [mol/L]

l - długość drogi optycznej [cm](184)

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (PAGE)

Elektroforezę w warunkach niedenaturujących prowadzono korzystając z zestawu Invitrogen firmy Termo Fisher Scientific, który umieszczony był w łaźni lodowej. W eksperymentach PAGE używano gotowych płytek żelowych firmy Invitrogen o zawartości 20% TBE i rozmiarze 10 cm x 10cm. Rozdział prowadzono w buforze 0.5xTBE, przy stałym napięciu 180 V przez 2.5 h w temperaturze ~ 4 °C. Każdą elektroforezę poprzedzano preelektroforezą (30 minut). Odpowiednie ilości oligonukleotydów (~ 851 pmol) rozpuszczone w buforze fosforanowym zawierającym 150 mM NaCl lub 50 mM KCl w probówkach typu eppendorf, w objętości 6 μl , ogrzewano przez 3 min w temperaturze 95 °C i pozostawiano do wystygnięcia. Próbki obciążano 50% glicerolem w stosunku 1:3 (2 μl). Następnie 8 μl próbki nakładano do osobnych kieszonek w płytkach żelowych. W kieszonkach pierwszej i ostatniej nakładano barwnik oraz wzorzec szybkości migracji DNA. Po zakończonej elektroforezie żel wizualizowano w świetle UV (254 nm, zdjęcie aparatem fotograficznym) a następnie wybarwiano w roztworze NMM o stężeniu 1

µg/ml przez 10 min. Obraz elektroforetyczny po wybarwieniu ligandem wizualizowano przy użyciu skanera materiałów promieniotwórczych i fluorescencyjnych Fuji FLA-5100 (długość fali wzbudzenia - 473 nm).

Rejestracja widm fluorescencyjnych

Widma fluorescencyjne zarejestrowano na spektrofotometrze JASCO J-815 CD w temperaturze 25 °C w zakresie długości fali 450-650 nm przy długości fali wzbudzenia wynoszącej 470 nm. Każdy z pomiarów powtarzano trzykrotnie w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 0.5 cm oraz szerokości spektralnej 1.5 nm. Miareczkowanie fluorescencyjne liganda (o-BMVC lub o-BMVC-C3, otrzymanych w Zakładzie Biomolekularnego NMR) przeprowadzono dodając porcjami roztwór badanego oligonukleotydu w buforze potasowym w zakresie stężeń od 0-3.4 µM/L rejestrując wartości emisji fluorescencji liganda przy 550 nm. Zebrane dane poddano nieliniowemu dopasowaniu do poniższego równania wyznaczając stałe wiązania [K_a] oraz liczbę n.

$$\frac{F}{F_0} = 1 + \frac{F_{final} - 1}{2} \left[\frac{1}{(K_a L)} + 1 + n \frac{ON}{L} - \sqrt{\left(\frac{1}{(K_a L)} + 1 + n \frac{ON}{L} \right)^2 - 4n \frac{ON}{L}} \right]$$

F - intensywność fluorescencji liganda przy badanym stężeniu oligonukleotydu

F₀ - intensywność fluorescencji liganda przy zerowym stężeniu oligonukleotydu

F_{final} - intensywność fluorescencji, gdy cały ligand jest związany z RNA

L - suma stężenia liganda

ON – stężenie badanego oligonukleotydu

K_a – stała wiązania

n – liczba cząsteczek liganda wiążąca się do badanego oligonukleotydów

2.7. Synteza o-BMVC-C3-CCC

Oligonukleotyd o-BMVC-C3-CCC został zsyntezowany w Zakładzie Biomolekularnego NMR. Próbkę CCC modyfikowaną grupą C6-aminową rozpuszczono w buforze fosforanu sodu (0.1 M, pH 7.0) następnie dodano do niej 5-krotny molowy nadmiar estru o-BMVC-C3-NHS (zsyntezowany przez dr Baranowskiego) w DMSO. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37 °C bez dostępu światła przez noc. Koniugat o-BMVC-C3-CCC oddzielono od soli i wolnego o-BMVC-C3-NHS przez strącanie 2% roztworem NaClO₄ w acetonie.(185)

X. LITERATURA:

1. Lander,E.S., Linton,L.M., Birren,B., Nusbaum,C., Zody,M.C., Baldwin,J., Devon,K., Dewar,K., Doyle,M., Fitzhugh,W., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **412**, 565–566.
2. Tyczewska,A. and Twardowski,T. (2008) Choroby cywilizacyjne – terapeutyczne zastosowania strategii antysensu. *Nauka*, **1**, 45–62.
3. Phylactou,L.A., Kilpatrick,M.W. and Wood,M.J.A. (1998) Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1649–1653.
4. Nimjee,S.M., White,R.R., Becker,R.C. and Sullenger,B.A. (2017) Aptamers as Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **57**, 61–79.
5. Bennett,C.F. (2019) Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu. Rev. Med.*, **70**, 307–321.
6. Odrzywolski,A. and Waśko,A. (2016) Wykorzystanie aptamerów oligonukleotydowych w terapii nowotworów. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **70**, 400–409.
7. Czarnek,M. and Bereta,J. (2016) The CRISPR-Cas system – from bacterial immunity to genome engineering. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **70**, 901–916.
8. Gurav,B. and Srinivasan,G. (2017) Antisense oligonucleotides as therapeutics and their delivery. *Curr. Sci.*, **112**, 490–498.
9. Paterson,B.M., Roberts,B.E. and Kuff,E.L. (1977) Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 4370–4374.
10. Zamecnik,P.C. and Stephenson,M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 280–284.
11. Tian,T., Chen,Y.Q., Wang,S.R. and Zhou,X. (2018) G-Quadruplex: A Regulator of Gene Expression and Its Chemical Targeting. *Chem*, **4**, 1314–1344.
12. Grigg,J.C., Shumayrikh,N. and Sen,D. (2014) G-Quadruplex Structures Formed by Expanded Hexanucleotide Repeat RNA and DNA from the Neurodegenerative Disease-Linked C9orf72 Gene Efficiently Sequester and Activate Heme. *PLoS One*, **9**, 1–8.
13. O’Hagan,M.P., Morales,J.C. and Galan,M.C. (2019) Binding and Beyond: What Else Can G-Quadruplex Ligands Do? *European J. Org. Chem.*, **2019**, 4995–5017.
14. Ito,K., Go,S., Komiyama,M. and Xu,Y. (2011) Inhibition of Translation by Small RNA-Stabilized mRNA Structures in Human Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19153–19159.
15. Hagihara,M., Yamauchi,L., Seo,A., Yoneda,K., Senda,M. and Nakatani,K. (2010) Antisense-Induced Guanine Quadruplexes Inhibit Reverse Transcription by HIV-1 Reverse Transcriptase. *J Am Chem Soc*, **132**, 11171–11178.
16. Bhattacharyya,D., Nguyen,K. and Basu,S. (2014) Rationally induced RNA:DNA G-Quadruplex structures elicit an anticancer effect by inhibiting endogenous eIF-4E expression. *Biochemistry*, **53**, 5461–5470.

17. Lesnik,E.A. and Freier,S.M. (1995) Relative Thermodynamic Stability of DNA, RNA, and DNA:RNA Hybrid Duplexes: Relationship with Base Composition and Structure. *Biochemistry*, **34**, 10807–10815.
18. Zaccaria,F. and Fonseca Guerra,C. (2018) RNA versus DNA G-Quadruplex: The Origin of Increased Stability. *Chem. - A Eur. J.*, **24**, 16315–16322.
19. Schmidt,V. (1986) Ivar Christian Bang (1869-1918), Founder of Modern Clinical Microchemistry. *Clin. Chem.*, **32**, 213–215.
20. Lagnado,J. (2013) The story of quadruplex DNA – it started with a Bang! *Biochem. Soc.*, **35**, 44–46.
21. Gellert,M., Lipsett,M. and Davies,D. (1962) Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 2013–2018.
22. Paeschke,K., Simonsson,T., Postberg,J., Rhodes,D. and Lipps,H.J. (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 847–854.
23. Xu,Y., Kaminaga,K. and Komiyama,M. (2008) G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na⁺ solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 11179–84.
24. Collie,G.W. and Parkinson,G.N. (2011) The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5867–5892.
25. Rhodes,D. and Lipps,H.J. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8627–8637.
26. Kwok,C.K. and Merrick,C.J. (2017) G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends Biotechnol.*, **35**, 997–1013.
27. Kharel,P., Becker,G., Tsvetkov,V. and Ivanov,P. (2020) Properties and biological impact of RNA G-quadruplexes: from order to turmoil and back Prakash. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12534–12555.
28. Burge,S., Parkinson,G.N., Hazel,P., Todd,A.K. and Neidle,S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402–5415.
29. Edwards,D.N., Machwe,A., Wang,Z. and Orren,D.K. (2014) Intramolecular Telomeric G-quadruplexes Dramatically Inhibit DNA Synthesis by Replicative and Translesion Polymerases, Revealing their Potential to Lead to Genetic Change. *PLoS One*, **9**, e80664.
30. Gudanis,D. and Gdaniec,Z. (2013) Różnorodność Strukturalna Kwadrupleksów DNA i RNA. *Na Pogran. Chem. i Biol.*, **7**, 225–242.
31. Simonsson,T. (2001) G-quadruplex DNA structures - Variations on a theme. *Biol. Chem.*, **382**, 621–628.
32. Guedin,A., Gros,J., Alberti,P. and Mergny,J. (2010) How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7858–7868.
33. Webba,M. (2007) Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem. - A Eur. J.*, **13**, 9738–9745.

34. Tran,P.L.T., Mergny,J.L. and Alberti,P. (2011) Stability of telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3282–3294.
35. Karsisiotis,A.I., O’Kane,C. and Webba da Silva,M. (2013) DNA quadruplex folding formalism - A tutorial on quadruplex topologies. *Methods*, **64**, 28–35.
36. Collie,G.W., Haider,S.M., Neidle,S. and Parkinson,G.N. (2010) A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5569–5580.
37. Patel,P.K., Koti,A.S.R. and Hosur,R. V (1999) NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: observation of a novel A-tetrad. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3836–3843.
38. Patel,P.K., Bhavesh,N.S. and Hosur,R. V (2000) NMR observation of a novel C-tetrad in the structure of the SV40 repeat sequence GGGCGG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 967–971.
39. Patel,P.K. and Hosur,R. V. (1999) NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2457–2464.
40. Viladoms,J., Escaja,N., Frieden,M., Gomez-Pinto,I., Pedroso,E. and Gonzales,C. (2009) Self-association of short DNA loops through minor groove C:G:G:C tetrads. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3264–3275.
41. Meier,M., Moya-torres,A., Krahn,N.J., Mcdougall,M.D., Orriss,G.L., Mcrae,E.K.S., Booy,E.P., McEleney,K., Patel,T.R., McKenna,S.A., *et al.* (2018) Structure and hydrodynamics of a DNA G-quadruplex with a cytosine bulge. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5319–5331.
42. Banco,M. and Ferre-D’Amare,A. (2021) The emerging structural complexity of G-quadruplex RNAs. *RNA*, 10.1261/rna.078238.120.
43. Kimura,T., Xu,Y. and Komiyama,M. (2009) Human telomeric RNA r(UAGGGU) sequence forms parallel tetraplex structure with U-quartet. *Nucleic Acid Symp. Ser.*, **53**, 239–240.
44. Xu,Y., Ishizuka,T., Kimura,T. and Komiyama,M. (2010) A U-tetrad stabilizes human telomeric RNA G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7231–7233.
45. Cheong,C. and Moore,P.B. (1992) Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures. *Biochemistry*, **31**, 8406–8414.
46. Zhang,Y., Roland,C. and Sagui,C. (2018) Structural and dynamical characterization of DNA and RNA quadruplexes obtained from the GGGGCC and GGGCCT hexanucleotide repeats associated with C9FTD/ALS and SCA36 diseases. *ACS Chem. Neurosci.*, **9**, 1104–1117.
47. Xiao,C.-D., Ishizuka,T., Zhu,X.-Q., Li,Y., Sugiyama,H. and Xu,Y. (2017) An Unusual Topological RNA Architecture with an Eight-Stranded Helical Fragment Containing A-, G-, and U-Tetrads. *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 2565–2568.
48. Pan,B., Xiong,Y., Shi,K., Deng,J. and Sundaralingam,M. (2003) Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads : Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *Structure*, **11**, 815–823.
49. Gudanis,D., Popena,L., Szpotkowski,K., Kierzek,R. and Gdaniec,Z. (2016) Structural characterization of a dimer of RNA duplexes composed of 8-bromoguanosine modified CGG

- trinucleotide repeats: a novel architecture of RNA quadruplexes. *Nucleic Acid Ther.*, **44**, 2409–2416.
50. Malgowska, M., Gudanis, D., Kierzek, R., Wyszko, E., Gabelica, V. and Gdaniec, Z. (2014) Distinctive structural motifs of RNA G-quadruplexes composed of AGG, CGG and UGG trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10196–10207.
51. Endoh, T., Kawasaki, Y. and Sugimoto, N. (2013) Stability of RNA quadruplex in open reading frame determines proteolysis of human estrogen receptor α . *Nucleic Acids Res.*, **41**, 6222–6231.
52. Warner, K.D., Chen, M.C., Song, W., Strack, R.L., Thorn, A., Jaffrey, S.R. and Amaré, A.R.F. (2014) Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein. *Nat. Publ. Gr.*, **21**, 658–663.
53. Andrałojć, W., Małgowska, M., Sarzyńska, J., Pasternak, K., Szpotkowski, K., Kierzek, R. and Gdaniec, Z. (2019) Unraveling the structural basis for the exceptional stability of RNA G-quadruplexes capped by a uridine tetrad at the 3' terminus. *RNA*, **25**, 121–134.
54. Andralojc, W., Pasternak, K., Sarzynska, J., Zielinska, K., Kierzek, R. and Gdaniec, Z. (2020) The origin of the high stability of 3'-terminal uridine tetrads. The contributions of hydrogen bonding, stacking interactions and steric factors evaluated using modified oligonucleotide analogs. *RNA*, **26**, 2000–2016.
55. Varizhuk, A.M., Protopopova, A.D., Tsvetkov, V.B., Barinov, N.A., Podgorsky, V. V., Tankevich, M. V., Vlasenok, M.A., Severov, V. V., Smirnov, I.P., Dubrovin, E. V., *et al.* (2018) Polymorphism of G4 associates: from stacks to wires via interlocks. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8978–8992.
56. Kogut, M., Kleist, C. and Czub, J. (2019) Why do G-quadruplexes dimerize through the 5'-ends? Driving forces for G4 DNA dimerization examined in atomic detail. *PLoS Comput. Biol.*, **15**, 1–22.
57. Sjekloca, L. and Ferre-D'Amare, A.R. (2019) Binding between G Quadruplexes at the Homodimer Interface of the Corn RNA Aptamer Strongly Activates Thioflavin T Fluorescence. *Cell Chem. Biol.*, **26**, 1159–1168.
58. Martadinata, H. and Phan, A.T. (2013) Structure of human telomeric RNA (TERRA): Stacking of two G-quadruplex blocks in K⁺ solution. *Biochemistry*, **52**, 2176–2183.
59. Martadinata, H. and Phan, A.T. (2014) Formation of a stacked dimeric G-quadruplex containing bulges by the 5-terminal region of human telomerase RNA (hTERC). *Biochemistry*, **53**, 1595–1600.
60. Mashima, T., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2009) Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6249–6258.
61. Liu, H., Kugimiya, A., Matsugami, A., Katahira, M. and Uesugi, S. (2002) Quadruplex structures of RNA 14-mer, r(GGAGGUUUUGGAGG) and DNA 14-mer, d(GGAGGTTTTGGAGG). *Nucleic Acid Symp. Ser.*, **2**, 177–178.
62. Deng, J., Xiong, Y. and Sundaralingam, M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)₄ with divalent Sr²⁺ ions at subatomic resolution (0.61 Å). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 13665–13670.

63. Borbone,N., Amato,J., Oliviero,G., D'Atri,V., Gabelica,V., De Pauw,E., Piccialli,G. and Mayol,L. (2011) D(CGGTGGT) forms an octameric parallel G-quadruplex via stacking of unusual G(:C):G(:C):G(:C):G(:C) octads. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7848–7857.
64. Uddin,M.K., Kato,Y., Takagi,Y., Mikuma,T. and Taira,K. (2004) Phosphorylation at 5' end of guanosine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4618–4629.
65. Pedersen,E.B., Nielsen,J.T., Nielsen,C. and Filichev,V. V (2011) Enhanced anti-HIV-1 activity of G-quadruplexes comprising locked nucleic acids and intercalating nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2470–2481.
66. Lim,K.W. and Phan,A.T. (2013) Structural Basis of DNA Quadruplex – Duplex Junction Formation **. *Angew. Chemie*, **52**, 8566–8569.
67. Chu,B., Zhang,D. and Paukstelis,P.J. (2019) A DNA G-quadruplex/i-motif hybrid. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 11921–11930.
68. Krauss,I.R., Pica,A., Merlino,A., Mazzarella,L. and Sica,F. (2013) Duplex – quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **D69**, 2403–2411.
69. Huang,H., Suslov,N.B., Li,N.S., Shelke,S.A., Evans,M.E., Koldobskaya,Y., Rice,P.A. and Piccirilli,J.A. (2014) A G-quadruplex – containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 686–691.
70. Trachman III,R.J., Autour,A., Jeng,S.C.Y., Abdolahzadeh,A., Andreoni,A., Cojocaru,R., Garipov,R., Dolgosheina,E. V, Knutson,J.R., Ryckelync,M., *et al.* (2019) Structure and functional reselection of the Mango-III fluorogenic RNA aptamer. *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 472–479.
71. Huppert,J.L. and Balasubramanian,S. (2005) Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2908–2916.
72. Zhang,A.Y., Bugaut,A. and Balasubramanian,S. (2011) A Sequence-Independent Analysis of the Loop Length Dependence of Intramolecular RNA G-Quadruplex Stability and Topology. *Biochemistry*, **50**, 7251–7258.
73. Bugaut,A. and Balasubramanian,S. (2008) A Sequence-Independent Study of the Influence of Short Loop Lengths on the Stability and Topology of Intramolecular DNA G-Quadruplexes †. *Biochemistry*, **47**, 689–697.
74. Bhattacharyya,D., Arachchilage,G.M. and Basu,S. (2016) Metal cations in G-quadruplex folding and stability. *Front. Chem.*, **4**, 1–14.
75. Hazel,P., Huppert,J., Balasubramanian,S. and Neidle,S. (2013) Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *J Am Chem Soc*, **126**, 16405–16415.
76. Gros,J., Rosu,F., Amrane,S., De Cian,A., Gabelica,V., Lacroix,L. and Mergny,J.L. (2007) Guanines are a quartet's best friend: Impact of base substitutions on the kinetics and stability of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3064–3075.
77. Gros,J., Aviñó,A., Lopez De La Osa,J., González,C., Lacroix,L., Pérez,A., Orozco,M., Eritja,R. and Mergny,J.L. (2008) 8-Amino guanine accelerates tetramolecular G-quadruplex formation. *Chem. Commun.*, **25**, 2926–2928.

78. Sannohe, Y. and Sugiyama, H. (2010) Overview of formation of G-quadruplex structures. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **Chapter 17**, 1–17.
79. Brčić, J. and Plavec, J. (2017) ALS and FTD linked GGGGCC-repeat containing DNA oligonucleotide folds into two distinct G-quadruplexes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1861**, 1237–1245.
80. Izbicka, E., Wheelhouse, R.T., Raymond, E., Davidson, K.K., Lawrence, R.A., Sun, D., Windle, B.E., Hurley, L.H. and Von Hoff, D.D. (1999) Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res.*, **59**, 639–644.
81. Patel, D.J., Phan, A.T. and Kuryavyi, V. (2007) Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7429–7455.
82. Gu, J., Leszczynski, J. and Bansal, M. (1999) A new insight into the structure and stability of Hoogsteen hydrogen-bonded G-tetrad: An ab initio SCF study. *Chem. Phys. Lett.*, **311**, 209–214.
83. Lightfoot, H.L., Hagen, T., Tatum, N.J. and Hall, J. (2019) The diverse structural landscape of quadruplexes. *FEBS Lett.*, **593**, 2083–2102.
84. Kettani, A., Basu, G., Gorin, A., Majumdar, A., Skripkin, E. and Patel, D.J. (2000) A two-stranded template-based approach to G·(C-A) triad formation: Designing novel structural elements into an existing DNA framework. *J. Mol. Biol.*, **301**, 129–146.
85. Rachwal, P.A., Brown, T. and Fox, K.R. (2007) Sequence effects of single base loops in intramolecular quadruplex DNA. *FEBS Lett.*, **581**, 1657–1660.
86. Risitano, A. and Fox, K.R. (2004) Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2598–2606.
87. Sagi, J. (2014) G-quadruplexes incorporating modified constituents: a review. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **32**, 477–511.
88. Kumar, A. (2015) Guanine Quadruplexes: Bonding Structure and Biological Significance. *J. Harmon. Res.*, **4**, 269–280.
89. Randazzo, A., Esposito, V., Ohlenschla, O., Ramachandran, R. and Mayol, L. (2004) NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3083–3092.
90. Saccà, B., Lacroix, L. and Mergny, J.L. (2005) The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1182–1192.
91. Sun, Z.Y., Wang, X.N., Cheng, S.Q., Su, X.-X. and Ou, T.-M. (2019) Developing novel G-quadruplex ligands: From interaction with nucleic acids to interfering with nucleic acid–protein interaction. *Molecules*, **24**, 1–29.
92. Li, Q., Xiang, J., Yang, Q., Sun, H., Guan, A. and Tang, Y. (2013) G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1115–1123.
93. Monchaud, D. and Teulade-Fichou, M. (2008) A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 627–636.

94. Asamitsu,S., Bando,T. and Sugiyama,H. (2019) Ligand design to acquire specificity to intended G-quadruplex structures. *Chem. - A Eur. J.*, **25**, 417–430.
95. Laguerre,A., Hukezalie,K., Winckler,P., Katranji,F., Chanteloup,G., Pirrotta,M., Perrier-Cornet,J.-M., Wong,J.M.Y. and Monchaud,D. (2015) Visualization of RNA-Quadruplexes in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 8521–8525.
96. Biffi,G., Tannahill,D., McCafferty,J. and Balasubramanian,S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.*, **5**, 182–186.
97. Song,J., Perreault,J.-P., Topisirovic,I. and Richard,S. (2016) RNA G-quadruplexes and their potential regulatory roles in translation. *Transl.*, **4**, 1–16.
98. Katsuda,Y., Sato,S.I., Asano,L., Morimura,Y., Furuta,T., Sugiyama,H., Hagihara,M. and Uesugi,M. (2016) A Small Molecule That Represses Translation of G-Quadruplex-Containing mRNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9037–9040.
99. Varizhuk,A., Ischenko,D., Tsvetkov,V., Novikov,R., Kulemin,N., Kaluzhny,D., Vlasenok,M., Naumov,V., Smirnov,I. and Pozmogova,G. (2017) The expanding repertoire of G4 DNA structures. *Biochimie*, **135**, 54–62.
100. Vlasenok,M., Varizhuk,A., Kaluzhny,D., Smirnov,I. and Pozmogova,G. (2017) Data on secondary structures and ligand interactions of G-rich oligonucleotides that defy the classical formula for G4 motifs. *Data Br.*, **11**, 258–265.
101. Huang,F.C., Chang,C.C., Lou,P.J., Kuo,I., Chien,C.-W., Chen,C.-T., Shieh,F.-Y., Chang,T.-C. and Lin,J.-J. (2008) G-quadruplex stabilizer 3,6-bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide induces accelerated senescence and inhibits tumorigenic properties in cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **6**, 955–964.
102. Liu,W., Lin,C., Wu,G., Dai,J., Chang,T.C. and Yang,D. (2019) Structures of 1:1 and 2:1 complexes of BMVC and MYC promoter G-quadruplex reveal a mechanism of ligand conformation adjustment for G4-recognition. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 11931–11942.
103. Wang,Z.-F., Li,M.-H., Chen,W.-W., Hsu,S.-T.D. and Chang,T.-C. (2016) A novel transition pathway of ligand-induced topological conversion from hybrid forms to parallel forms of human telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3958–3968.
104. Weisman-Shomer,P., Cohen,E., Hershco,I., Khateb,S., Wolfowitz-Barchad,O., Hurley,L.H. and Fry,M. (2003) The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)_n. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3963–3970.
105. Todd,A.K., Johnston,M. and Neidle,S. (2005) Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2901–2907.
106. Kwok,C.K., Marsico,G. and Balasubramanian,S. (2018) Detecting RNA G-quadruplexes (rG4s) in the transcriptome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, 1–14.
107. Kikin,O., Antonio,L.D. and Bagga,P.S. (2006) QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 676–682.
108. Kwok,C.K., Marsico,G., Sahakyan,A.B., Chambers,V.S. and Balasubramanian,S. (2016) RG4-seq reveals widespread formation of G-quadruplex structures in the human transcriptome. *Nat. Methods*, **13**, 841–844.

109. Chambers, V.S., Marsico, G., Boutell, J.M., Antonio, M. Di, Smith, G.P. and Balasubramanian, S. (2015) High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.*, **33**, 877–881.
110. Chilka, P., Desai, N. and Datta, B. (2019) Small molecule fluorescent probes for G-quadruplex visualization as potential cancer theranostic agents. *Molecules*, **24**, 752.
111. Guo, J.U. and Bartel, D.P. (2016) RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. *Science (80-.)*, **353**, 1382–1390.
112. Yang, S.Y., Lejault, P., Chevrier, S., Boidot, R., Robertson, A.G., Wong, J.M.Y. and Monchaud, D. (2018) Transcriptome-wide identification of transient RNA G-quadruplexes in human cells. *Nat. Commun.*, **9**, 4730.
113. Chen, X.C., Chen, S. Bin, Dai, J., Yuan, J.H., Ou, T.M., Huang, Z.S. and Tan, J.H. (2018) Tracking the Dynamic Folding and Unfolding of RNA G-Quadruplexes in Live Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **57**, 4702–4706.
114. Lipps, H.J. and Rhodes, D. (2009) G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.*, **19**, 414–422.
115. Fay, M.M., Lyons, S.M. and Ivanov, P. (2017) RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *J. Mol. Biol.*, **429**, 2127–2147.
116. Lim, K.W., Jenjaroenpun, P., Low, Z.J., Khong, Z.J., Ng, Y.S., Kuznetsov, V.A. and Phan, A.T. (2015) Duplex stem-loop-containing quadruplex motifs in the human genome: a combined genomic and structural study. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5630–5646.
117. Agarwala, P., Pandey, S. and Maiti, S. (2015) The tale of RNA G-quadruplex. *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 5570–5585.
118. Cammas, A. and Millevoi, S. (2017) RNA G-quadruplexes: emerging mechanisms in disease. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 1584–1595.
119. Chen, M.C., Murat, P., Abecassis, K., Ferre-D'Amare, A.R. and Balasubramanian, S. (2015) Insights into the mechanism of a G-quadruplex-unwinding DEAH-box helicase. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2223–2231.
120. Du, Z., Zhao, Y. and Li, N. (2008) Genome-wide analysis reveals regulatory role of G4 DNA in gene transcription. *Genome Res.*, **18**, 233–241.
121. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-Quadruplex-Interactive compound. *J. Med. Chem.*, **40**, 2113–2116.
122. Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M.F. and Mandel, J.L. (1991) Instability of a 550-Base Pair DNA Segment and Abnormal Methylation in Fragile X Syndrome. *Science (80-.)*, **252**, 1097–1102.
123. Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D. and Balasubramanian, S. (2014) Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat. Chem.*, **6**, 75–80.
124. Vorlickova, M., Kejnowvska, I., Bednarova, K., Renciuik, D. and Kypr, J. (2012) Circular Dichroism Spectroscopy of DNA: From Duplexes to Quadruplexes. *Chirality*, **24**, 691–698.

125. Kypr,J., Kejnovská,I., Renciuik,D. and Vorlickova,M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acid Ther.*, **37**, 1713–1725.
126. Kralovicova,J., Lages,A., Patel,A., Dhir,A., Buratti,E., Searle,M. and Vorechovsky,I. (2014) Optimal antisense target reducing INS intron 1 retention is adjacent to a parallel G quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8161–8173.
127. Yett,A., Lin,L.Y., Beseiso,D., Miao,J. and Yatsunyk,L.A. (2019) N-methyl mesoporphyrin IX as a highly selective light-up probe for G-quadruplex DNA. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **23**, 1195–1215.
128. Xue,Y., Kan,Z.Y., Wang,Q., Yao,Y., Liu,J., Hao,Y.H. and Tan,Z. (2007) Human telomeric DNA forms parallel-stranded intramolecular G-quadruplex in K⁺ solution under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11185–11191.
129. Lim,K.W., Khong,Z.J. and Phan,A.T. (2014) Thermal Stability of DNA Quadruplex – Duplex Hybrids. *Biochemistry*, **53**, 247–257.
130. Mergny,J.-L. and Lacroix,L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, **13**, 515–537.
131. Małgowska,M., Gudanis,D., Teubert,A., Dominiak,G. and Gdaniec,Z. (2012) How to study G-quadruplex structures. *BioTechnologia*, **4**, 381–390.
132. Mergny,J.L., Phan,A.T. and Lacroix,L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74–78.
133. Rachwal,P.A. and Fox,K.R. (2007) Quadruplex melting. *Methods*, **43**, 291–301.
134. Murat,P., Singh,Y. and Defrancq,E. (2011) Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5293–5307.
135. Mergny,J.-L., Li,J., Lacroix,L., Amrane,S. and Chaires,J.B. (2005) Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e138.
136. Campbell,N.H. and Parkinson,G.N. (2007) Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods*, **43**, 252–263.
137. Adrian,M., Heddi,B. and Phan,A.T. (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*, **57**, 11–24.
138. Fürtig,B., Richter,C., Wöhnert,J. and Schwalbe,H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*, **4**, 936–962.
139. Da Silva,M.W. (2003) Association of DNA Quadruplexes through G:C:G:C Tetrads. Solution Structure of d(GCGGTGGAT). *Biochemistry*, **42**, 14356–14365.
140. Kettani,A., Kumar,R.A. and Patel,D.J. (1995) Solution Structure of a DNA Quadruplex Containing the Fragile X Syndrome Triplet Repeat. *J. Mol. Biol.*, **254**, 638–656.
141. Lane,A.N., Chaires,J.B., Gray,R.D. and Trent,J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482–5515.

142. Lyons,S.M., Gudanis,D., Coyne,S.M., Gdaniec,Z. and Ivanov,P. (2017) Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nat. Commun.*, **8**.
143. Kwok,C.K., Sahakyan,A.B. and Balasubramanian,S. (2016) Structural Analysis using SHALiPE to Reveal RNA G-Quadruplex Formation in Human Precursor MicroRNA. *Angew. Chemie*, **55**, 8958–8961.
144. Kotkowiak,W., Szabat,M. and Kierzek,R. (2013) Struktura drugorzędowa RNA i metody jej określania. *Na Pogran. Chem. i Biol.*
145. Tseng,T.-Y., Chien,C.-H., Chu,J.-F., Huang,W.-C., Lin,M.-Y., Chang,C.-C. and Chang,T.-C. (2013) Fluorescent probe for visualizing guanine-quadruplex DNA by fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Biomed. Opt.*, **18**, 101309.
146. Kang,C.C., Huang,W.C., Kouh,C.W., Wang,Z.F., Cho,C.C., Chang,C.C., Wang,C.L., Chang,T.C., Seemann,J. and Huang,L.J.S. (2013) Chemical principles for the design of a novel fluorescent probe with high cancer-targeting selectivity and sensitivity. *Integr. Biol. (United Kingdom)*, **5**, 1217–1228.
147. Vummidi,B.R., Alzeer,J. and Luedtke,N.W. (2013) Fluorescent Probes for G-Quadruplex Structures. *ChemBioChem*, **14**, 540–558.
148. Malgowska,M., Czajczynska,K., Gudanis,D., Tworak,A. and Gdaniec,Z. (2016) Overview of the RNA G-quadruplex structures. *Acta Biochim. Pol.*, **63**, 609–621.
149. Arttamangkul,S., Plazek,A., Platt,E.J., Jin,H., Murray,T.F., Birdsong,W.T., Rice,K.C., Farrens,D.L. and Williams,J.T. (2019) Visualizing endogenous opioid receptors in living neurons using ligand-directed chemistry. *Elife*, **8**, e49319.
150. Chen,S. Bin, Hu,M.H., Liu,G.C., Wang,J., Ou,T.M., Gu,L.Q., Huang,Z.S. and Tan,J.H. (2016) Visualization of NRAS RNA G-Quadruplex Structures in Cells with an Engineered Fluorogenic Hybridization Probe. *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 10382–10385.
151. Lyu,K., Chen,S. Bin, Chan,C.Y., Tan,J.H. and Kwok,C.K. (2019) Structural analysis and cellular visualization of APP RNA G-quadruplex. *Chem. Sci.*, **10**, 11095–11102.
152. Han,H. (2018) Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol. Biol.*, **1706**, 293–302.
153. Breaker,R.R. and Joyce,G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.*, **1**, 223–229.
154. Altman,S. (1990) Enzymatic Cleavage of RNA by RNA (Nobel Lecture). *Biosci. Rep.*, **10**, 317–337.
155. Jinek,M., Chylinski,K., Fonfara,I., Hauer,M., Doudna,J.A. and Charpentier,E. (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.)*, **337**, 816–822.
156. Dias,N. and Stein,C.A. (2002) Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 347–355.
157. Shen,X. and Corey,D.R. (2018) Chemistry , mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1584–1600.

158. Bhattacharyya,D., Nguyen,K. and Basu,S. (2014) 2014 - Bhattachary, Rationally Induced RNADNA G-Quadruplex Structures Elicit an Anticancer Effect by Inhibiting Endogenous eIF-4E Expression Soumitra Basu.pdf.
159. Nguyen,T.Q.N., Lim,K.W. and Phan,A.T. (2017) A Dual-Specific Targeting Approach Based on the Simultaneous Recognition of Duplex and Quadruplex Motifs. *Sci. Rep.*, **7**, 11969.
160. Bryś,M., Nawrot,M. and Krajewska,W.M. (1999) Struktura i funkcja receptora czynnika wzrostu naskórka. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **14**, 83–96.
161. Martin,P., Kelly,C.M.A. and Carney,D. (2006) Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer. *Cancer Control*, **13**, 129–140.
162. Wojtukiewicz,M.Z., Rybałtowski,M. and Sierko,E. (2008) Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Nowotw. J. Oncol.*, **58**, 260–271.
163. Ebenryter-Olbińska,K., Kaniowski,D., Sobczak,M., Wojtczak,B., Janczak,S., Wielgus,E., Nawrot,B. and Leśnikowski,Z. (2017) Versatile method for the site specific modification of DNA with boron clusters - Anti-EGFR antisense oligonucleotide case. *Chem. - A Eur. J.*, **23**, 16535–16546.
164. Tang,H. and Shrager,J.B. (2016) CRISPR /Cas-mediated genome editing to treat EGFR -mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. *EMBO Mol. Med.*, **8**, 83–85.
165. Cłapa,T., Cieślak,D., Gronek,P., Kolanowski,T., Kwapich-Lenik,E., Narożna,D., Słomski,R., Szalata,M. and Twardowski,T. (2020) Biotechnologia 2020. O co najczęściej pytamy?
166. Ferbeyre,G. and Vispo,N.S. (2020) The race for a coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature*, **580**, 576–577.
167. Pardi,N., Hogan,M.J., Porter,F.W. and Weissman,D. (2018) mRNA vaccines-a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 261–279.
168. Pallesen,J., Wang,N., Corbett,K.S., Wrapp,D., Kirchdoerfer,R.N., Turner,H.L., Cottrell,C.A., Becker,M.M., Wang,L., Shi,W., *et al.* (2017) Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, E7348–E7357.
169. Roberts,T.C., Langer,R. and Wood,M.J.A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 673–694.
170. Cheung,M.C., Lacroix,R., Mckenna,B.K., Liu,L., Winkelman,J. and Ehrlich,D.J. (2013) Intracellular Protein and Nucleic Acid Measured in Eight Cell Types Using Deep-Ultraviolet Mass Mapping. *Cytometry*, **83**, 540–551.
171. Granqvist,L. and Virta,P. (2016) Characterization of G-Quadruplex/Hairpin Transitions of RNAs by¹⁹F NMR Spectroscopy. *Chem. - A Eur. J.*, **22**, 15360–15372.
172. Hall,K.B. and McLaughlin,L.W. (1991) Thermodynamic and Structural Properties of Pentamer DNA·DNA, RNA·RNA, and DNA·RNA Duplexes of Identical Sequence. *Biochemistry*, **30**, 10606–10613.
173. Kierzek,E., Mathews,D.H., Ciesielska,A., Turner,D.H. and Kierzek,R. (2006) Nearest neighbor parameters for Watson-Crick complementary heteroduplexes formed between 2'-O-

- methyl RNA and RNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3609–3614.
174. Risitano,A. and Fox,K.R. (2003) Stability of Intramolecular DNA Quadruplexes: Comparison with DNA Duplexes†. *Biochemistry*, **42**, 6507–6513.
 175. Tseng,T.Y., Chu,I. Te, Lin,S.J., Li,J. and Chang,T.C. (2019) Binding of Small Molecules to G-quadruplex DNA in Cells Revealed by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of o-BMVC Foci. *Molecules*, **24**, 35.
 176. Gudanis,D., Kaniowski,D., Kulik,K., Baranowski,D., Gdaniec,Z. and Nawrot,B. (2020) Formation of an RNA Quadruplex-Duplex Hybrid in Living Cells between mRNA of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and a G-Rich Antisense Oligoribonucleotide. *Cells*, **9**, 2375.
 177. Nie,J., Jiang,M., Zhang,X., Tang,H., Jin,H., Huang,X., Yuan,B., Zhang,C., Lai,J.C., Nagamine,Y., *et al.* (2015) Post-transcriptional Regulation of Nkx2-5 by RHAU in Heart Development. *Cell Rep.*, **13**, 723–732.
 178. Asamitsu,S., Obata,S., Yu,Z., Bando,T. and Sugiyama,H. (2019) Recent progress of targeted G-quadruplex-preferred ligands toward cancer therapy. *Molecules*, **24**, 429.
 179. Matejczyk,M. and Rosochacki,S.J. (2007) Gen gfp jako fluorescencyjne narzędzie w analizie ekspresji genów i konstrukcji biosensorów. *Biotechnologia*, **76**, 53–62.
 180. Fotticchia,I., Amato,J., Pagano,B., Novellino,E., Petraccone,L. and Giancola,C. (2015) How are thermodynamically stable G-quadruplex–duplex hybrids? *J. Therm. Anal. Calorim.*, **121**, 1121–1127.
 181. Beaucage,S.L. and Caruthers,M.H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859–1862.
 182. Xia,T., SantaLucia,J., Burkard,M.E., Kierzek,R., Schroeder,S.J., Jiao,X., Cox,C. and Turner,D.H. (1998) Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson - Crick Base Pairs †. *Biochemistry*, **37**, 14719–14735.
 183. Hwang,T.L. and Shaka,A.J. (1995) Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. - Ser. A*, **112**, 275–279.
 184. Del Villar-Guerra,R., Gray,R.D. and Chaires,J.B. (2017) Characterization of quadruplex DNA structure by circular dichroism. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **68**, 17.8.1-17.8.16.
 185. Koralewska,N., Szczepanska,A., Ciechanowska,K., Wojnicka,M., Pokornowska,M., Milewski,M.C., Gudanis,D., Baranowski,D., Nithin,C., Bujnicki,J.M., *et al.* (2020) RNA and DNA G-quadruplexes bind to human Dicer and inhibit its activity. *bioRxiv*, 10.1101/2020.05.05.078592.