

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu



Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych

Weronika Kotkowiak

**Nowe pochodne aptameru wiążącego trombinę
o potencjalnych właściwościach antykoagulacyjnych**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:
dr hab. Anna Pasternak, prof. ICHB PAN

Poznań 2016

D-250

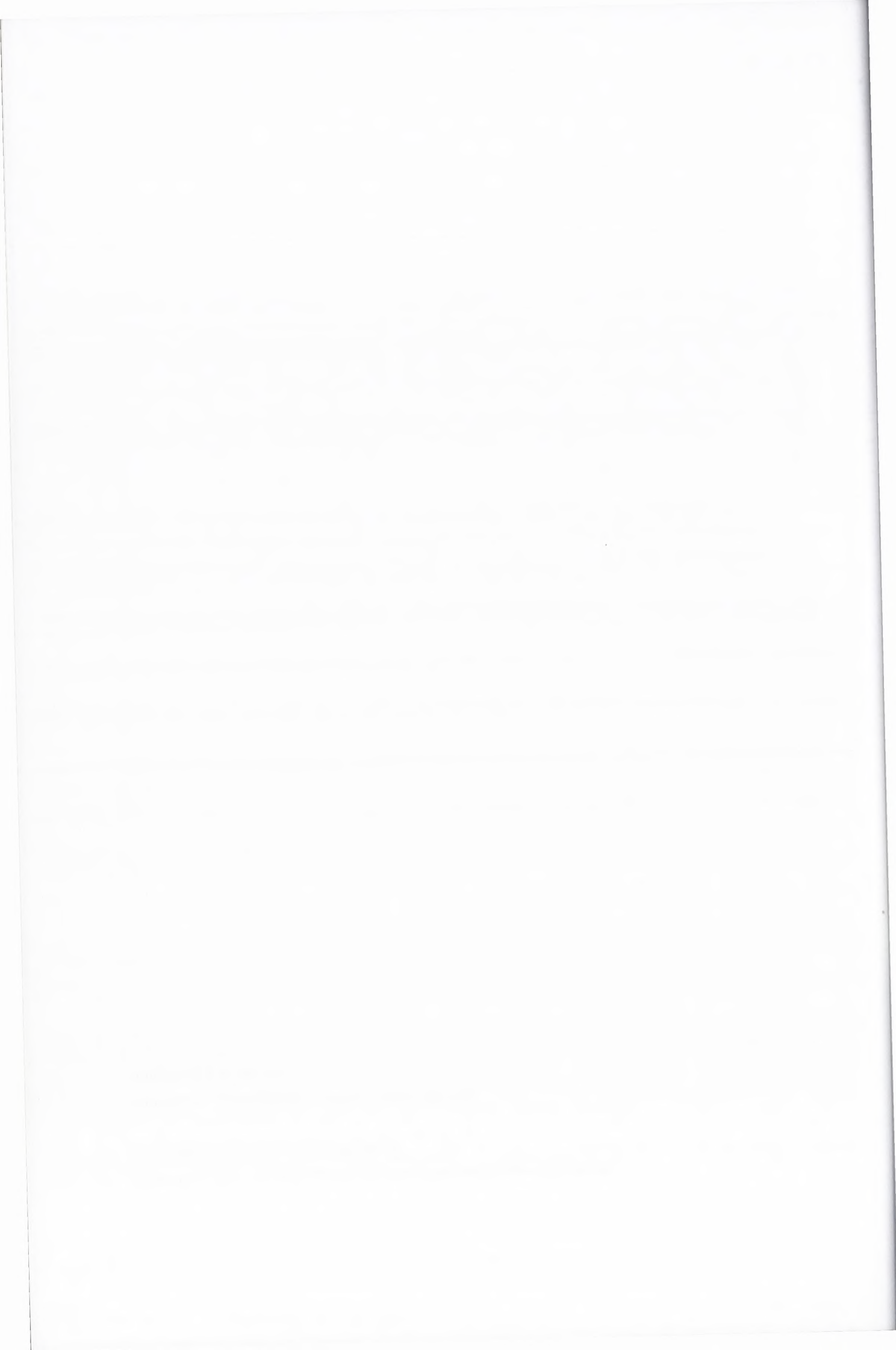
*Odkrycie naukowe polega na tym, że widząc to, co wszyscy inni,
dostrzega się to, czego nikt nie zauważył.*
(Albert Szent-Györgyi von Nagyrápolc)

Składam szczególne podziękowania
Pani dr hab. Annie Pasternak
za niezłomną wiarę w mojej możliwości,
bezgraniczne zaufanie, przekazanie cennej wiedzy,
niezliczone godziny konsultacji oraz nieocenioną pomoc
przy realizacji badań i spisaniu niniejszej pracy.



Dziękuję Michałowi
za obecność, pomoc, cierpliwość i wsparcie.

Z całego serca dziękuję Rodzicom
za możliwość rozwijania swoich zainteresowań oraz wsparcie.



Bardzo dziękuję
Panu prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi
za poświęcony czas i okazaną pomoc w trakcie
realizacji badań i spisywaniu niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania
dr Jolancie Lisowiec-Wąchnickiej
za przekazaną wiedzę, liczne dyskusje oraz
pomoc przy realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję również koleżankom i kolegom z Zakładu Bioinżynierii Kwasów
Nukleinowych, Zakładu Biologii i Chemii Kwasów Nukleinowych oraz Zespołu
Genomiki Strukturalnej RNA za wszelką pomoc i miłą atmosferę pracy.

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań, tel. 061 852-85-03
Regon 000849327
-9-

D-250

SPIS TREŚCI

WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW STOSWANYCH W PRACY	8
I. CEL PRACY	11
II. STRESZCZENIE.....	12
III. ABSTRACT	15
IV. CZĘŚĆ LITERATUROWA	17
1. Wstęp.....	17
2. Trombina	19
2.1 Powstawanie trombiny w organizmie.....	19
2.2 Struktura trombiny.....	22
2.3 Funkcje trombiny i rola w patogenezie chorób	23
2.4 Leki hamujące aktywność trombiny.....	26
3. Aptamery	29
3.1 Metody otrzymywania aptamerów	30
3.2 Aptamery hamujące aktywność trombiny	32
3.3 Pozostałe przykłady zastosowań aptamerów.....	34
4. Aptamer wiążący trombinę.....	35
4.1 Budowa i struktura TBA	35
4.2 Modyfikacje TBA.....	38
4.3 Potencjalne zastosowania TBA	49
V. WYNIKI I DYSKUSJA	52
1. Badania trwałości termodynamicznej wariantów TBA.....	52
1.1 Wpływ podstawienia kanonicznymi resztami nukleotydowymi typu UNA na trwałość termodynamiczną TBA	54
1.2 Wpływ podstawienia resztami 4-tiourydyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA	61
1.3 Wpływ podstawienia resztami izoguanozyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA	67
1.4 Wpływ równoczesnego podstawienia resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA	71
2. Badania zmian w topologii fałdowania G-kwadrupleksów.....	78
2.1 Widma dichroizmu kołowego	79
2.2 Temperaturowe widma różnicowe	81
3. Badania właściwości antykoagulacyjnych wariantów TBA.....	83
4. Test amidolityczny	93
5. Badanie stałej dysocjacji wariantów TBA.....	94

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records.

2. It also highlights the need for regular communication and collaboration between team members.

3. The following section outlines the specific steps and procedures to be followed.

4. It is essential to ensure that all data is collected and analyzed thoroughly.

5. The results of the study should be presented in a clear and concise manner.

6. Finally, it is important to draw conclusions based on the evidence gathered.

7. The document concludes with a summary of the key findings and recommendations.

8. It is hoped that this report will provide valuable insights into the subject matter.

9. The author would like to thank the participants and staff for their assistance.

10. This document is intended for internal use only and should be handled accordingly.

11. The information contained herein is confidential and should not be distributed.

12. Any questions or concerns should be directed to the appropriate authority.

13. The document is subject to change without notice.

14. It is the responsibility of the user to ensure the accuracy and integrity of the data.

15. The document is a work of the United States Government and is in the public domain.

16. It is not subject to copyright protection.

17. However, the use of the information is subject to certain restrictions.

18. For more information, please refer to the relevant regulations.

19. The document is available in both printed and electronic formats.

20. It is recommended that users review the document regularly.

21. The document is a valuable resource for all interested parties.

22. It provides a comprehensive overview of the current state of the field.

23. The document is a key reference for researchers and practitioners alike.

24. It is a testament to the hard work and dedication of the research team.

25. The document is a valuable contribution to the body of knowledge in this area.

26. It is a pleasure to share this work with the wider community.

27. The document is a reflection of the collaborative effort of all involved.

28. It is a testament to the power of teamwork and shared knowledge.

29. The document is a valuable asset to our organization and the field.

30. It is a testament to the commitment and passion of the research team.

6. Badanie właściwości antyproliferacyjnych wybranych wariantów TBA.....	96
7. Badanie stabilności biologicznej wybranych wariantów TBA w osoczu krwi ludzkiej.....	98
VI. PODSUMOWANIE	100
VII. MATERIAŁY I METODY	103
1. Materiały	103
1.1 Odczynniki	103
1.2 Gotowe zestawy do badań	103
1.3 Izotopy promieniotwórcze.....	103
1.4 Enzymy.....	103
1.5 Linia komórkowa.....	104
1.6 Oligonukleotydy	104
1.7 Akcesoria dodatkowe	105
1.8 Roztwory i bufony.....	106
1.9 Pożywki do badań na liniach komórkowych	107
1.10 Aparatura	108
1.11 Programy	108
2. Metody.....	109
2.1 Synteza chemiczna oligonukleotydów	109
2.2 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA oraz reszty izoguanozyny w serii UNA.....	109
2.3 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA.....	110
2.4 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii UNA.....	111
2.5 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA.....	111
2.6 Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	112
2.7 Pomiar trwałości termodynamicznej badanych oligonukleotydów z zastosowaniem metody topnienia UV	113
2.8 Wykonanie różnicowych widm temperaturowych	113
2.9 Wykonanie widm dichroizmu kołowego.....	113
2.10 Pomiar właściwości antykoagulacyjnych badanych oligonukleotydów.....	114
2.11 Test amidolityczny	114
2.12 Pomiar stałej dysocjacji aptamer – trombina.....	114
2.13 Znakowanie końca 5' oligonukleotydów izotopem ³² P	115

1. Introduction

2. Methodology

3. Results

4. Discussion

5. Conclusion

6. References

7. Appendix

8. Acknowledgements

9. Author Biographies

10. Contact Information

11. Declaration of Interest

12. Funding Sources

13. Data Availability

14. Ethics Approval

15. Supplementary Materials

16. Correspondence

17. Peer Review Process

18. Publication Details

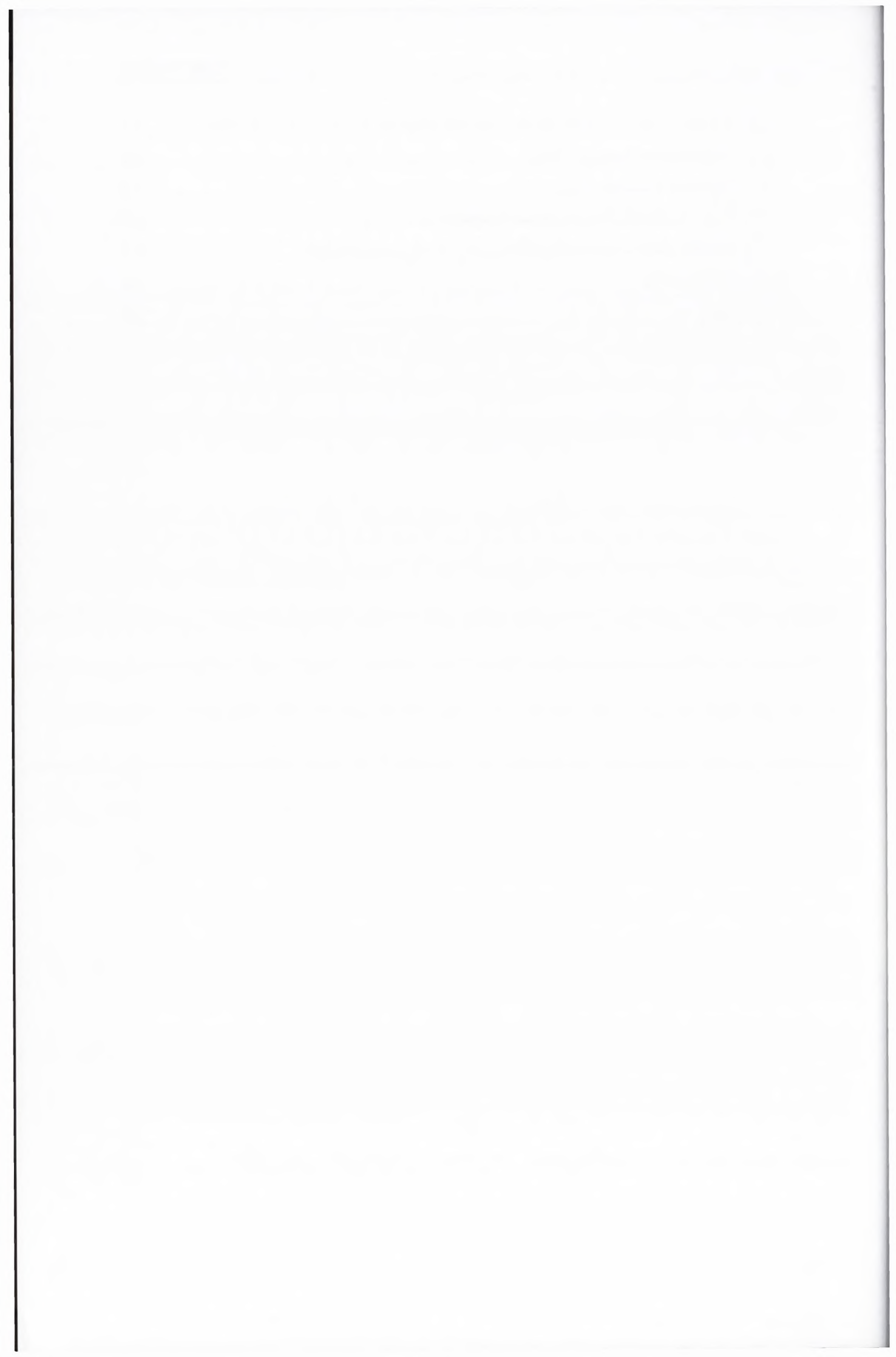
19. Copyright

20. Terms and Conditions

21. Disclaimer

22. Final Remarks

2.14 Pomiar stabilności biologicznej oligonukleotydów w osoczu krwi ludzkiej.....	115
2.15 Rozmrażanie komórek <i>HeLa</i>	116
2.16 Hodowla komórek <i>HeLa</i>	116
2.17 Pasaż komórek <i>HeLa</i> na płytkę 96-dołkową	117
2.18 Pomiar właściwości antyproliferacyjnych oligonukleotydów	117
VIII. BIBLIOGRAFIA	119
ZAŁĄCZNIKI.....	129



WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW STOSWANYCH W PRACY

2'-FaraN	2'-deoksy-2'-fluoro-D-arabinonukleozyd
5-FU	2'-deoksy-5-fluorourydyna
5-HmU	2'-deoksy-5-hydroksymetylourydyna
8-BrdG	2'-deoksy-8-bromoguanozyna
AFM	mikroskopia sił atomowych (ang. <i>atomic force microscopy</i>)
AMD	zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (ang. <i>age-related macular degeneration</i>)
APTT	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. <i>activated partial thromboplastin time</i>)
Arg	arginina
α -SMA	alfa-aktyna mięśni gładkich (ang. <i>alpha smooth muscle actin</i>)
Asn	asparagina
AT	antytrombina
At	aktywność trombiny
α TM (ART-123)	rekombinowana trombomodulina
A ^U	adenozyna w serii UNA
BSA-QD	kropki kwantowe połączone z albuminą surowicy bydłowej (ang. <i>bovine serum albumin-quantum dot</i>)
C ^U	cytydyna w serii UNA
CD	dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i>)
cpm	jednostka impulsów radioaktywnych na minutę (ang. <i>count per minute</i>)
ΔG°_{37}	energia swobodna
$\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$	zmiana energii swobodnej
DIC	zespół nadmiernego wykrzepiania naczyniowego (ang. <i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EA	efekt antykoagulacyjny
FAM	6-karboksyfluoresceina (ang. <i>6-carboxyfluorescein</i>)
FDA	Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FPA	fibrynopeptyd A
FRET	Försterowskie rezonansowe przekazywanie energii (ang. <i>Förster resonance energy transfer</i>)
GAG	heparynopodobne glikozaminoglikany
Glu	kwas glutaminowy
GPIIb α	glikoproteiny występujące na powierzchni płytek krwi
G ^U	guanozyna w serii UNA
HCII	kofaktor heparyny II (ang. <i>heparin cofactor II</i>)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
iG ^R	izoguanozyna
iG ^U	izoguanozyna w serii UNA

MEMORANDUM FOR THE RECORD

DATE: 10/15/98

TO: [Name]

FROM: [Name]

SUBJECT: [Subject]

[Faint body text paragraph 1]

[Faint body text paragraph 2]

[Faint body text paragraph 3]

[Faint body text paragraph 4]

[Faint body text paragraph 5]

[Faint body text paragraph 6]

IL-6	interleukina 6
IL-8	interleukina 8
Ile	izoleucyna
K _d	stała dysocjacji
Leu	leucyna
LMWH	heparyna drobnocząsteczkowa (ang. <i>low molecular weight heparin</i>)
LNA	kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (ang. <i>locked nucleic acids</i>)
Lys	lizyna
MAPKs	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
Met	metionina
MMP	metaloproteinaza
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotriazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu (sól tetrazolowa)
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAR	receptor aktywowany proteazami (ang. <i>protease activated receptor</i>)
PAR1	receptor aktywowany proteazami typu 1
PAR2	receptor aktywowany proteazami typu 2
PAR3	receptor aktywowany proteazami typu 3
PAR4	receptor aktywowany proteazami typu 4
PC	białko C (ang. <i>protein C</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
Phe	fenyloalanina
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
RE31	31 nukleotydowy aptamer DNA
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	obroty na minutę (ang. <i>rotations per minute</i>)
SELEX	selekcja <i>in vitro</i> (ang. <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
Ser	seryna
SPR	powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. <i>surface plasmon resonance</i>)
s4U ^R	4-tiourydyna
s4U ^U	4-tiourydyna w serii UNA
TAMRA	6-karboksytetrametylorodamina (ang. <i>6-carboxytetramethylrhodamine</i>)
TBA (ARC183, HD1)	aptamer wiążący trombinę (ang. <i>thrombin binding aptamer</i>)
TDS	temperaturowe widma różnicowe (ang. <i>thermal difference spectra</i>)
TF	czynnik tkankowy (ang. <i>tissue factor</i>)
TM	trombomodulina
T _M	temperatura topnienia dla oligonukleotydu o stężeniu 10 ⁻⁴ M
T _m	temperatura topnienia dla dowolnego stężenia oligonukleotydu
Tyr	tyrozyna
TT	czas trombinowy (ang. <i>thrombin time</i>)



UFH	heparyna niefrakcjonowana (ang. <i>unfractionated heparin</i>)
UNA	kwasy nukleinowe o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (ang. <i>unlocked nucleic acid</i>)
U ^U	urydyna w serii UNA
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	czynnik von Willebranda (ang. <i>von Willebrand factor</i>)
XNA	kwas ksenonukleinowy (ang. <i>xeno nucleic acid</i>)

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the integrity of the financial system and for the ability to detect and prevent fraud. The document also notes that records should be kept for a minimum of seven years.

The second part of the document outlines the procedures for the collection and distribution of funds. It states that all funds received should be deposited into a designated account within a specified time frame. The document also describes the process for issuing checks and the requirements for cash disbursements.

The third part of the document addresses the issue of budgeting and financial planning. It explains that a detailed budget should be prepared for each fiscal year and that it should be reviewed and approved by the appropriate governing body. The document also discusses the importance of monitoring actual performance against the budget.

The fourth part of the document discusses the role of internal controls in ensuring the accuracy and reliability of financial information. It identifies key areas where internal controls should be implemented, such as the authorization of transactions, the segregation of duties, and the independent verification of records.

The fifth part of the document discusses the requirements for financial reporting. It states that financial statements should be prepared in accordance with generally accepted accounting principles (GAAP) and should be audited by an independent accounting firm. The document also outlines the format and content of the financial reports.

The sixth part of the document discusses the importance of transparency and accountability in financial management. It emphasizes that all financial transactions should be clearly documented and that the results of financial operations should be reported to the public in a timely and accessible manner.

The seventh part of the document discusses the role of the public in financial management. It explains that the public has a right to know how their money is being spent and that they should be actively involved in the decision-making process. The document also discusses the importance of public participation in budgeting and financial planning.

The eighth part of the document discusses the importance of ethical conduct in financial management. It states that all financial managers should adhere to a code of ethics and should be held accountable for their actions. The document also discusses the consequences of unethical behavior and the importance of a strong ethical culture.

The ninth part of the document discusses the importance of continuous improvement in financial management. It explains that financial management practices should be regularly reviewed and updated to reflect changes in the environment and to improve efficiency and effectiveness. The document also discusses the importance of learning from past mistakes and best practices.

The tenth part of the document discusses the importance of communication in financial management. It states that clear and effective communication is essential for the success of any financial program. The document also discusses the importance of providing timely and accurate information to all stakeholders.

The final part of the document provides a summary of the key points discussed and offers recommendations for improving financial management. It emphasizes that financial management is a complex and dynamic process that requires ongoing attention and commitment. The document also provides a list of resources for further information.

I. CEL PRACY

Trombina to osoczowe białko pełniące rozmaite funkcje w organizmie począwszy od katalizowania najważniejszej reakcji kaskady krzepnięcia krwi – przekształcania fibrynogenu w fibrynę, poprzez udział w angiogenzie, skończywszy na zdolności stymulacji proliferacji i migracji rozmaitych typów komórek m.in. komórek nabłonkowych oraz fibroblastów. W związku z tym trombina wydaje się być doskonałym celem terapii przeciwzakrzepowej oraz antyproliferacyjnej. Przedstawicielem kwasów nukleinowych, który ma udowodnione działanie antykoagulacyjne jest aptamer wiążący trombinę (TBA, ang. *thrombin binding aptamer*). Jest to cząsteczka DNA, zdolna do inhibicji aktywności trombiny poprzez związanie się z jej miejscem zewnętrznym I.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza właściwości termodynamicznych, strukturalnych oraz biologicznych modyfikowanych chemicznie G-kwadrupleksów opartych na sekwencji aptameru wiążącego trombinę. Mając na uwadze realizację powyższych zadań badawczych określono wpływ pojedynczego oraz wielokrotnego podstawienia resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii RNA i UNA oraz resztami adenozyiny, cytydyny, guanozyny i urydyny w serii UNA na: stabilność termodynamiczną, zmiany w topologii fałdowania struktury, wartość stałej dysocjacji, właściwości antykoagulacyjne i antyproliferacyjne oraz stabilność biologiczną w osoczu krwi ludzkiej G-kwadrupleksów opartych o sekwencję TBA.

Zastosowanie kwasów nukleinowych w celach terapeutycznych jest niezwykle korzystne ze względu na odwracalność ich działania oraz stosunkowo łatwą produkcję. Co więcej, ich właściwości biologiczne i fizykochemiczne można poprawiać poprzez wprowadzanie modyfikacji szkieletu fosfocukrowego oraz zasad heterocyklicznych. Przeprowadzone badania wpłynęły na poszerzenie wiedzy z zakresu badań nad wpływem modyfikacji na właściwości fizykochemiczne i biologiczne kwasów nukleinowych.



II. STRESZCZENIE

Choroby układu krążenia stanowią plagę XXI wieku. Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia zajmują pierwsze miejsce wśród głównych przyczyn zgonów, trzykrotnie przewyższając śmiertelnością choroby nowotworowe. Szybkie tempo życia, zła dieta oraz używki przyczyniają się do rozwoju tej klasy schorzeń. Wbrew obiegowej opinii nie są to już choroby wieku podeszłego, coraz młodszy ludźmi zaczynają przejawiać symptomy niewydolności układu krążenia. Jak szacują naukowcy, problem ten dotyka już 1 na 16 osób, które ukończyły 40 lat. Z roku na rok coraz większa rzesza ludzi staje się odbiorcami leków przeciwzakrzepowych, co pociąga za sobą poważne koszty społeczne. Aktualnie dostępne antykoagulanty, chociaż wciąż udoskonalane, nadal są obarczone szerokim wachlarzem działań ubocznych takich jak małopłytkowość, epizodyczne krwawienia oraz zwiększenie skłonności do wystąpienia zmian skórnych. Firmy farmaceutyczne nie ustają w wysiłkach w opracowaniu nowych leków przeciwzakrzepowych by sprostać rosnącym potrzebom i zminimalizować niepożądane efekty.

Trombina jest osoczną proteazą serynową, która odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu hemostazy organizmu poprzez przekształcanie rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę, a także w tworzeniu usieciowienia skrzepu. Ponadto, aktywuje również czynnik V, VIII i XIII oraz wykazuje właściwości proliferacyjne względem komórek nabłonkowych i fibroblastów poprzez oddziaływanie z receptorami aktywowanymi proteazami.

Aptamer wiążący trombinę został odkryty w 1992 roku przez Louis'a Bock'a w wyniku przeprowadzenia selekcji *in vitro*. Jest to 15-nukleotydowy oligomer DNA przyjmujący strukturę wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego kwadrupleksu o konformacji krzesłowej. Jego rdzeń stanowią dwie tetrazy guanozynowe stabilizowane jonami potasu, połączone trzema pętlami: dwiema krótszymi o sekwencji TT oraz jedną dłuższą o sekwencji TGT. Na podstawie badań krystalograficznych i NMR ustalono, że TBA oddziałuje z trombiną za pomocą dwóch pętli TT. Wraz z odkryciem aptameru wiążącego trombinę pojawiły się nadzieje na jego zastosowanie jako nowego leku przeciwzakrzepowego. Niestety TBA został odrzucony w pierwszej fazie badań klinicznych ze względu na konieczność zastosowania zbyt dużej dawki w celu osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego. W związku z tym pojawiła się konieczność opracowania nowych wariantów omawianego aptameru, których użycie



wiązałoby się z osiągnięciem znakomitych korzyści leczniczych przeważających nad niepożądanymi efektami. Ponadto, w 2015 roku pojawiły się doniesienia literaturowe świadczące o użyteczności wariantów TBA jako potencjalnych związków antyproliferacyjnych zdolnych do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu obecności modyfikowanych reszt nukleotyдовых na stabilność termodynamiczną, strukturę oraz właściwości biologiczne cząsteczki TBA.

W pierwszym etapie realizacji pracy doktorskiej zaprojektowano ponad 100 wariantów TBA zawierających pojedyncze oraz wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii RNA i UNA oraz resztami adenozyiny, cytydyny, guanozyny i urydyny w serii UNA. Następnie przeprowadzono badania termodynamiczne z wykorzystaniem metody topnienia UV/VIS (ang. *UV-melting*), które umożliwiły określenie wpływu pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia wybranymi resztami modyfikowanych nukleotydiv na stabilność termodynamiczną wariantów TBA. Dodatkowo, prześledzono zmiany w topologii strukturalnej badanych oligonukleotydiv poprzez wykonanie widm dichroizmu kołowego oraz temperaturowych widm różnicowych. Ponadto, określono aktywność biologiczną wszystkich wariantów TBA wykonując test trombinowy na osoczu krwi ludzkiej. Uzyskane na tym etapie wyniki umożliwiły wyłonienie kilku najlepszych wariantów TBA, odznaczających się najkorzystniejszymi parametrami termodynamicznymi i antykoagulacyjnymi.

W dalszej części realizacji pracy doktorskiej wyznaczono stałą wiązania aptamer–trombina z wykorzystaniem zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Pomiaru wykonano dla wybranych wariantów TBA o najbardziej obiecujących parametrach biologicznych i termodynamicznych. Dodatkowo, ustalono miejsce oddziaływania pochodnych TBA z cząsteczką trombiny poprzez zastosowanie testu amidolitycznego oraz zbadano ich stabilność biologiczną w osoczu krwi ludzkiej. W ostatnim etapie realizacji pracy doktorskiej określono stopień inhibicji wzrostu linii komórkowej *HeLa*. Do tego eksperymentu wybrano warianty TBA odznaczające się mniej korzystnymi właściwościami antykoagulacyjnymi, ale wciąż dobrymi parametrami termodynamicznymi, wskazującymi na zachowanie struktury G-kwadrupleksu w warunkach fizjologicznej temperatury ludzkiego organizmu.

Szczegółowa analiza uzyskanych wyników pozwoliła stwierdzić, że wprowadzenie reszt 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii RNA lub UNA oraz reszt

The following text is extremely faint and illegible. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a report or a letter, but the content cannot be discerned. The text is arranged in approximately 10-12 horizontal lines across the page.

adenozyny, cytydyny, guanozyny i urydyny w serii UNA pozwala modulować stabilność termodynamiczną oraz biologiczną G-kwadrupleksu – uzyskany efekt jest silnie zależny od ich lokalizacji w szkielecie aptameru. Co ciekawe, warianty TBA zawierające modyfikowane reszty nukleotydowe odznaczają się niezmienną topologią fałdowania. Udowodniono również, że wprowadzenie wybranych reszt nukleotydowych w serii UNA powoduje zwiększenie właściwości antykoagulacyjnych analizowanych G-kwadrupleksów. Co więcej, niektóre warianty TBA charakteryzujące się obniżoną zdolnością inhibicji aktywności trombiny, wykazują znaczny potencjał antyproliferacyjny.



III. ABSTRACT

Cardiovascular diseases are said to be the scourge of the twenty-first century. According to World Health Organization statistics, cardiovascular diseases are leading cause of death; the mortality rates for these conditions are three times higher than those for the cancer. Unhealthy lifestyle, poor diet, drugs, excessive alcohol consumption and low economic status contribute to the development of this class of disease. Contrary to popular belief, these conditions are no longer a disease of old age, more and more young people have developed symptoms of cardiovascular failure. Scientists estimate that this problem already affects 1 of 16 people under 40 years of age. From year to year a growing number of people initiate anticoagulant therapy, what causes serious social cost. Contemporary anticoagulants, apart from their therapeutic potential, cause a wide variety of side effects such as thrombocytopenia, bleeding, and dermal changes. Pharmaceutical companies are still trying to create new anticoagulants with improved clotting properties to meet the growing need, and minimize side effects.

Thrombin is a serine protease which plays a crucial role in hemostasis, by converting fibrinogen into fibrin clot. In addition, it also activates factor V, VIII and XIII and epithelial cells and fibroblasts proliferation via interactions with protease activated receptors.

Thrombin binding aptamer (TBA) was selected for the first time in 1992 by Louis Bock using *in vitro* selection (SELEX). It is a 15-nt DNA oligonucleotide, which forms an intramolecular, antiparallel G-quadruplex structure with a chair like conformation. The core of TBA consists of the G-tetrads, stabilized with potassium ions, linked by three loops: two shorter TT edge-wise loops and one longer TGT loop. Based on crystallographic and NMR studies, it was concluded that TBA interacts with thrombin molecule via two TT loops. The great anticoagulant properties of TBA were noticed simultaneously with its discovery. However, the therapeutic dose was too high for it to successfully come through clinical trials. Therefore, there was a need to create new TBA variants that would provide significant therapeutic benefit, outweighing the side effects. In addition, in 2015, TBA variants were said to be potential antiproliferative agents able to inhibit cancer cells growth.

The main goal of this thesis was to investigate the influence of certain modified nucleotide residues on thermodynamic stability, structure and biological properties of TBA variants.



In the first stage of the project, over 100 various TBA variants, containing single and multiple incorporation of 4-thiouridine and isoguanosine in RNA and UNA (*i.e.* RNA analogue with increased flexibility) series or single and multiple incorporation of all four canonical UNAs, were designed and synthesized. Next, the thermodynamic studies using UV/VIS melting method, which allowed determination of the influence of single and multiple incorporation of certain modified nucleotide residues on thermodynamic stability TBA variants, were conducted. In addition, the possible changes in the folding topology of quadruplex structure were monitored by CD and thermal difference spectra. The biological activity of the oligonucleotides was verified by performing thrombin test on human plasma. The results obtained at this stage allowed for selection of the most beneficial TBA variants, which possess improved thermodynamic and anticoagulant properties.

In the next stage of the thesis, the binding affinity of the TBA variants to the thrombin molecule by means of surface plasmon resonance (SPR) was determined. The measurements were performed for the TBA variants with the most promising biological thermodynamic properties. In addition, the binding site of the TBA variants to the thrombin molecule by means of amidolytic assay and its biological stability in human serum were determined. In the last part of the thesis, the degree of inhibition of *HeLa* cell lines growth was specified. For this last experiment, the TBA variants characterized by less favorable anticoagulant properties, but having reasonable thermodynamic stability, indicating that G-quadruplex structure is preserved in human body physical temperature, were chosen.

The detailed analysis of results revealed that 4-thiouridine and isoguanosine in RNA and UNA (*i.e.* RNA analogue with increased flexibility) series, as well as all four canonical UNAs, can modulate G-quadruplex thermodynamic and biological stability – the effect is strongly position dependent. Interestingly, TBA variants containing modified nucleotide residues are characterized by unchanged folding topology. It was also proven that incorporation of certain modified nucleotide residues in UNA series cause an increase in the level of G-quadruplex anticoagulant properties. In addition, some TBA variants, characterized by reduced thrombin inhibition ability, possess significant antiproliferative properties.

Faint, illegible text covering the page, likely bleed-through from the reverse side of the document.

IV. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Wstęp

Leki są aktywnymi substancjami wywierającymi działanie farmakologiczne w diagnozie, leczeniu, łagodzeniu oraz zapobieganiu chorobom lub wpływającymi na funkcjonowanie ludzkiego organizmu (według definicji Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*, FDA) [1]. Stosowanie substancji leczniczych w celu zwalczania procesów patologicznych w ludzkim organizmie sięga starożytności. Początkowo leki były ściśle powiązane z religią i duchowością, składały się głównie z wyciągów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz sproszkowanych minerałów. Podstawę tworzenia preparatów leczniczych, aż do połowy XIX wieku, stanowiło określenie wpływu danej substancji na funkcjonowanie organizmu ludzkiego bez znajomości dokładnego mechanizmu jej działania. Wraz z postępem cywilizacyjnym zaczęto stosować bardziej zaawansowane techniki otrzymywania leków, w związku z czym odkrywano ich coraz więcej. Prawdziwy przełom nastąpił w 1928 roku, kiedy to A. Fleming odkrył penicylinę. Właśnie ten moment jest uważany za początek współczesnego przemysłu farmaceutycznego [1]. Jednak do prawdziwej rewolucji w tej dziedzinie doprowadził dynamiczny rozwój biochemii i biologii molekularnej w kolejnych latach. Odkrycie oraz określenie struktury kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA, ang. *deoxyribonucleic acid*), a następnie kwasu rybonukleinowego (RNA, ang. *ribonucleic acid*), mechanizmów ekspresji genów i syntezy białek, szlaków regulacji tych procesów, a w końcu poznanie ludzkiego genomu stało się kamieniem milowym w leczeniu chorób człowieka [2]. Od tej pory rozpoczęto projektowanie nowej klasy leków w oparciu o dogłębne zrozumienie podstawowych, molekularnych mechanizmów patogenezы chorób, skierowanych specyficznie przeciwko czynnikom prowadzącym do ich powstawania [3].

Do powyższej klasy terapeutyków zaliczane są leki oligonukleotydowe. W ich skład wchodzi substancje czynne będące jednoniciowymi lub dwuniciowymi polimerami DNA lub RNA, składającymi się z czterech reszt nukleozydowych: adenozyiny, cytydiny, guanozyiny, tymidiny (DNA) lub urydiny (RNA) połączonych ze sobą wiązaniem 5'-3' fosfodiesterowym. W przypadku cząsteczki DNA część cukrową stanowi deoksyryboza, natomiast w przypadku cząsteczki RNA ryboza [4, 5]. Pierwsze doniesienia o możliwości zastosowania oligonukleotydów jako terapeutyków pochodzą

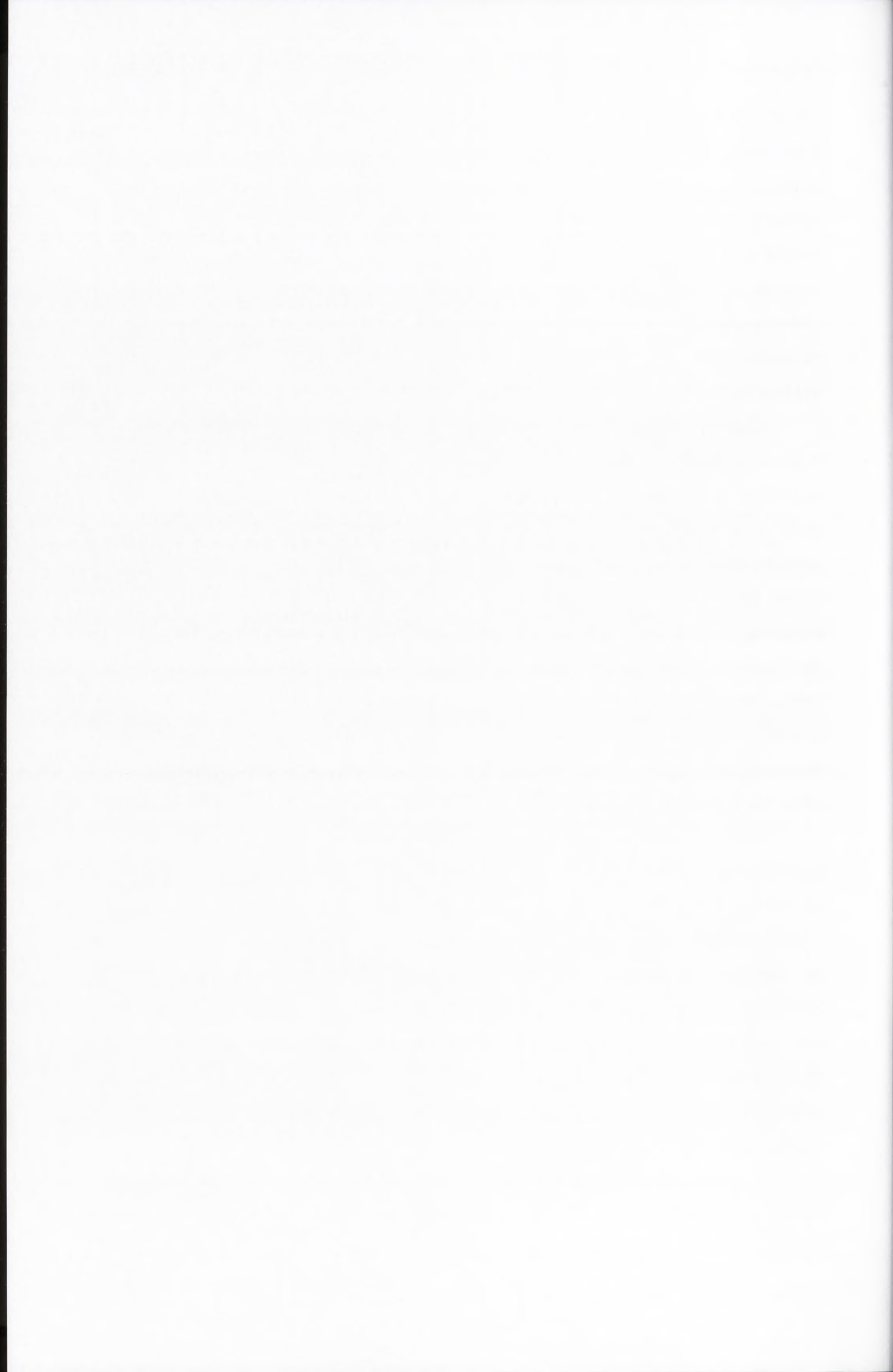


z pracy Paula Zamecnik'a oraz Mary Stephenson [6, 7]. Amerykańscy naukowcy zastosowali 13-nukleotydowy oligomer DNA komplementarny do regionów terminalnych genomu wirusa mięsaka Rousa, przez co uzyskali zahamowanie jego replikacji w fibroblastach embrionów kurzych. Chociaż badania Paula Zamecnik'a były prawdziwym przełomem w medycynie, a jego samego uważa się za ojca terapii antysensowej, dopiero automatyzacja syntezy DNA oraz rozpoczęcie prac związanych z zastosowaniem oligonukleotydów w leczeniu zakażeń ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV, ang. *human immunodeficiency virus*) doprowadziły do popularyzacji tej klasy leków [8, 9].

Choroby układu krążenia stanowią zróżnicowaną grupę schorzeń, która w ostatnich latach zajmuje pierwsze, niechlubne miejsce wśród przyczyn zgonów na świecie, wyprzedzając w zestawieniu choroby nowotworowe. Aktualne warunki życia przyczyniły się do obniżenia wieku pacjentów z pierwszymi objawami niewydolności układu sercowo-naczyniowego. Do grupy tych chorób można zaliczyć między innymi nadciśnienie tętnicze, miażdżycę, zawał mięśnia sercowego, chorobę wieńcową oraz zakrzepicę. Główną przyczyną tego ostatniego schorzenia jest tworzenie się skrzepu w miejscu uszkodzenia nabłonka wyścielającego żyłę w wyniku przewlekłej reakcji zapalnej. Prowadzi to do zmniejszenia światła naczynia krwionośnego, co może utrudnić ukrwienie zmienionego chorobowo organu. W poważniejszych przypadkach skrzep może ulec oderwaniu i doprowadzić to zatoru tętnicy płucnej, w następstwie czego może dojść do zgonu.

Jednym z głównych czynników biorących udział w rozwoju chorób układu krążenia jest trombina. To osoczowe białko pełni rozmaite funkcje w organizmie począwszy od katalizowania najważniejszej reakcji kaskady krzepnięcia krwi – przekształcania fibrynogenu w fibrynę, poprzez udział w angiogenzie, skończywszy na zdolności stymulacji proliferacji i migracji rozmaitych typów komórek m.in. komórek nabłonkowych oraz fibroblastów. W związku z tym trombina wydaje się być doskonałym celem terapii przeciwzakrzepowej oraz przeciwproliferacyjnej. Doskonałym przykładem oligonukleotydu o udowodnionych właściwościach inhibicyjnych względem cząsteczki trombiny jest odkryty w 1992 roku aptamer wiążący trombinę.

W niniejszej części pracy zostanie przedstawiona struktura i dojrzewanie trombiny z proenzymu oraz jej rola w organizmie, a także udział w patogenezie wybranych chorób człowieka. Ponadto, będzie można również zapoznać się



z zagadnieniami związanymi z tematyką aptamerów ze szczegółowym opisem kwasów nukleinowych nakierowanych na inhibicję aktywności wyżej wymienionego białka enzymatycznego.

2. Trombina

Trombina jest proteazą serynową, kluczowym enzymem kaskady krzepnięcia krwi, biorącą również udział w wielu złożonych procesach w ludzkim organizmie [10]. Historia jej odkrycia sięga początków XIX wieku, kiedy to Alexander Buchanan zaobserwował krzepnięcie osocza pod wpływem dodania skrzepu krwi. Jednak dopiero Alexander Schmidt zdołał wyizolować i oczyścić omawiane białko, a także sformułować obowiązującą do dnia dzisiejszego teorię jego funkcjonowania. Zakłada ona, że trombina powstaje z nieaktywnej formy nazywanej zymogenem pod wpływem działania czynników komórkowych, by następnie w bardzo krótkim czasie przekształcić fibrynogen w fibrynę. W związku z powyższym to właśnie A. Schmidta uważa się za odkrywcę tego enzymu.

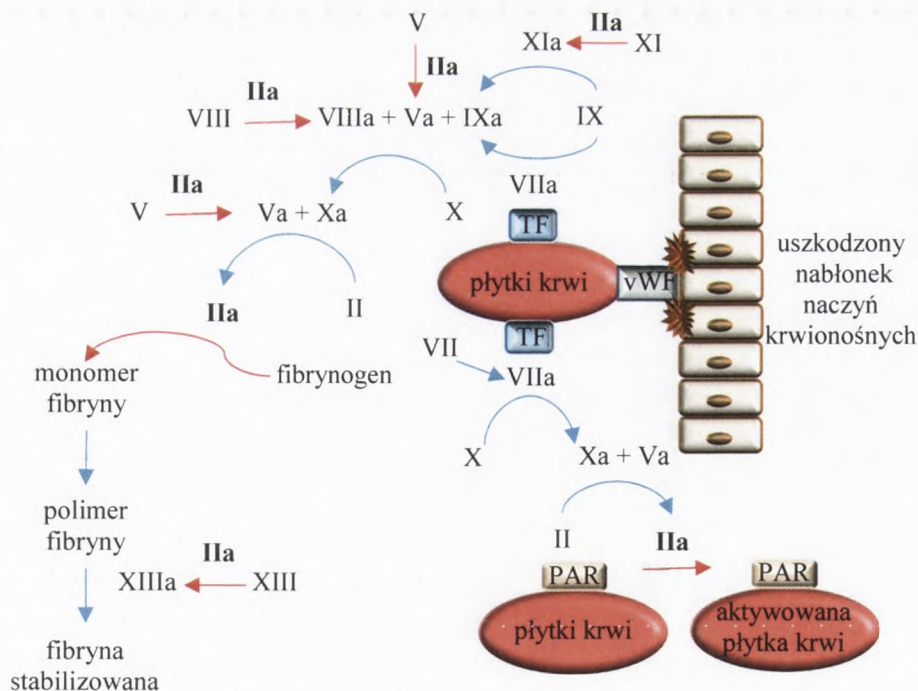
2.1 Powstawanie trombiny w organizmie

Hemostaza jest procesem występującym w warunkach fizjologicznych mającym na celu zapewnienie ciągłości przepływu krwi oraz uniemożliwienie jej nadmiernego wypływu ze światła naczyń krwionośnych [11]. W procesie tym biorą udział nieaktywne formy enzymów (zymogeny, oznaczane dużymi, rzymskimi cyframi), przekształcane następnie w postać aktywną (oznaczane dużymi, rzymskimi cyframi z dodatkiem małej litery a) w skomplikowanej kaskadzie wzajemnie powiązanych reakcji, w których produkt poprzedniej jest odpowiedzialny za przebieg następnej (Rys. 1). Hemostaza składa się z czterech zasadniczych faz: inicjacji, amplifikacji, propagacji oraz inhibicji.

Czynnikiem inicjującym pierwszy etap hemostazy jest uszkodzenie nabłonka wyściełającego naczynia krwionośne i wskutek tego odsłonięcie położonych głębiej składników macierzy zewnątrzkomórkowej (głównie kolagenu i czynników tkankowych). Krążące w krwiobiegu płytki krwi (trombocyty) przyłączają się do tego miejsca przez oddziaływanie z receptorami (czynniki von Willebranda, vWF, ang. *von Willebrand factor*), co powoduje ich częściową aktywację, degranulację i uwolnienie czynnika Va (Rys. 1). Równocześnie następuje adhezja fibrynogenu do powierzchni uszkodzonego naczynia krwionośnego [10]. Krążący we krwi czynnik VII ulega



związaniu z czynnikiem tkankowym (TF, ang. *tissue factor*) płytek krwi i przekształceniu w formę aktywną (VIIa). Powstały kompleks TF/VIIa katalizuje aktywację cząsteczek X i IX. Czynniki Xa i IXa oddziałują z czynnikiem Va tworząc protrombinazę, która odpowiada za tworzenie małych ilości trombiny (IIa) z protrombiny (II) na powierzchni płytek krwi [11]. Czynniki IIa łączy się z aktywowanymi częściowo wcześniej trombocytami, dokonuje hydrolizy receptora PAR (receptor aktywowany proteazami, ang. *protease activated receptor*) będącego śródbłonowym białkiem, odgrywającym ważną rolę w transdukcji informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. W swojej budowie posiada ukryty na N-końcowym fragmencie ligand, który w wyniku hydrolizy proteazą ulega odsłonięciu. Tak wyeksponowany nowy koniec wiąże się do receptora, powodując zwiążanie białka G w domenie cytoplazmatycznej i przeniesienie sygnału [12]. Aktywacja białka PAR powoduje pełną aktywację płytek krwi, która przejawia się ekspozycją na powierzchni ujemnie naładowanych fosfatydyloseryn oraz zmianami morfologicznymi, co w efekcie skutkuje ich degranulacją. W tej fazie hemostazy trombina tworzy małe ilości fibryny z fibrynogenu, które biorą udział w formowaniu skrzepu pierwotnego, stanowiącego pierwszy etap hamowania wycieku krwi z naczynia krwionośnego [10]. Zespół powyższych reakcji został nazwany zewnątrzpochodnym szlakiem krzepnięcia krwi.



Rysunek 1. Schemat reakcji kaskadowej krzepnięcia krwi.



Na etapie amplifikacji następuje wytworzenie większej ilości trombiny. Wspomniany wcześniej czynnik IXa łączy się na powierzchni płytek krwi z czynnikami V i VIII tworząc kompleks aktywujący czynnik X. Ten ostatni w połączeniu z czynnikiem V tworzy protrombinazę. Od tego momentu następuje wytwarzanie dużych ilości trombiny. Powyższe procesy są określane wspólnym mianem wewnątrzpochoдного szlaku krzepnięcia krwi [12].

Kolejny etap hemostazy stanowi propagacja, w której następuje wytworzenie 95% trombiny. Utworzony w stadium amplifikacji kompleks protrombinazy generuje produkcję tego enzymu na wysokim poziomie, w konsekwencji czego powstaje również duża ilość fibryny. Tworzy ona połączoną podłużnie i poprzecznie sieć włókien fibrynowych stabilizowaną wiązaniami kowalencyjnymi indukowanymi przez czynnik XIII. Trombina stymuluje zwrotnie swoje powstawanie poprzez aktywację czynników V, VIII i XI. Ten ostatni powoduje wytwarzanie aktywnej formy czynnika IX, który przekształca czynnik X w czynnik Xa. W ten sposób powstaje jeszcze więcej trombiny [10].

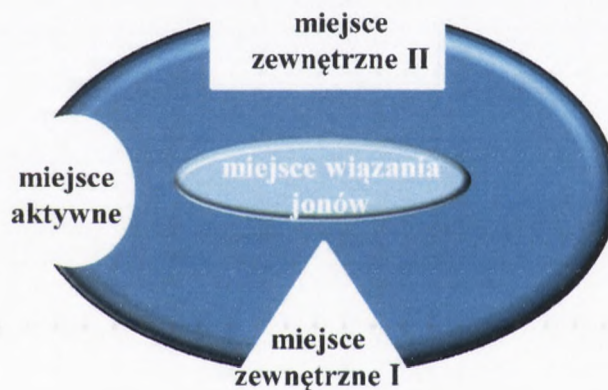
W celu zachowania równowagi w organizmie zostały wykształcone mechanizmy umożliwiające zahamowanie reakcji kaskadowej krzepnięcia krwi, by w ten sposób zapobiec rozwojowi zakrzepic. Powierzchnia nabłonka wyściełającego światło naczynia krwionośnego posiada błonowe białko, trombomodulinę (TM), która po przyłączeniu trombiny powoduje jej inaktywację oraz zwiększenie aktywacji białka C (PC, ang. *protein C*). PC powoduje zahamowanie wytwarzania czynnika IIa poprzez hydrolizę wiązania peptydowego w cząsteczkach Va i VIIIa [10, 13]. Komórki nabłonka naczyń krwionośnych wydzielają heparynopodobne glikozaminoglikany (GAG) [14], które również odgrywają ważną rolę w inhibicji reakcji kaskadowej krzepnięcia krwi poprzez związanie trombiny oraz katalizę reakcji przyłączenia do niej antytrombiny i kofaktora heparyny II (HCII, ang. *heparin cofactor II*) [10]. Cząsteczki te są również zdolne do inhibicji działania czynnika II.

Powyżej opisane szlaki powstawania trombiny zostały opracowane na podstawie oddzielnych badań w warunkach *in vitro*, w związku z czym nie można wykluczyć wzajemnego przenikania się i łączenia tych silnie ze sobą powiązanych procesów w warunkach fizjologicznych. Jak wiadomo w organizmie ludzkim proces hemostazy przebiega w świetle naczynia krwionośnego, gdzie wszystkie składniki kaskady krzepnięcia krwi mają ze sobą swobodny kontakt [11].



2.2 Struktura trombiny

Pierwszą strukturę trzeciorzędową trombiny opublikował w 1989 roku W. Bode wraz ze współpracownikami [15]. Od tamtej pory enzym ten stał się jednym z najczęstszych obiektów badań strukturalnych. Omawiane białko jest zbudowane z dwóch łańcuchów polipeptydowych: krótszego składającego się 49 reszt aminokwasowych oraz dłuższego, w skład którego wchodzi 259 reszt aminokwasowych. Obie podjednostki, połączone ze sobą mostkiem dwusiarczkowym, są zaangażowane w bliskie oddziaływania niekowalencyjne [10]. W budowie trombiny można wyróżnić 4 zasadnicze domeny strukturalne: miejsce proteolityczne (miejsce aktywne), miejsce wiązania jonów sodu oraz obdarzone dodatnim ładunkiem miejsca zewnętrzne I (miejsce wiązania fibrynogenu) i II (miejsce wiązania heparyny) (Rys. 2) [10, 16, 17]. W miejscu aktywnym trombiny występują reszty seryny, histydyny



Rysunek 2. Schemat obrazujący domeny strukturalne trombiny.

oraz kwasu asparaginowego określane mianem triady katalitycznej, zaangażowanej bezpośrednio w hydrolizę wiązania peptydowego substratu [16]. Kolejna domena strukturalna jest odpowiedzialna za oddziaływania z jonami sodu, niezbędnymi do poprawnego fałdowania i efektywnego działania trombiny. Dane strukturalne mutantów pozbawionych miejsca wiążącego jony sodu wyraźnie wskazują na fundamentalne znaczenie tych oddziaływań. Miejsce zewnętrzne I znajduje się w bliskim położeniu centrum aktywnego trombiny i zawiera reszty aminokwasów obdarzonych dodatnim ładunkiem: argininy (Arg67, Arg73, Arg75, Arg77), lizyny (Lys36, Lys70, Lys110) seryny (Ser36, Ser72), tyrozyny (Tyr76), izoleucyny (Ile82), leucyny (Leu65), metioniny (Met84) oraz fenyloalaniny (Phe34) [10, 18]. Jego główną rolę stanowi rozpoznawanie i wiązanie substratów omawianej proteazy serynowej

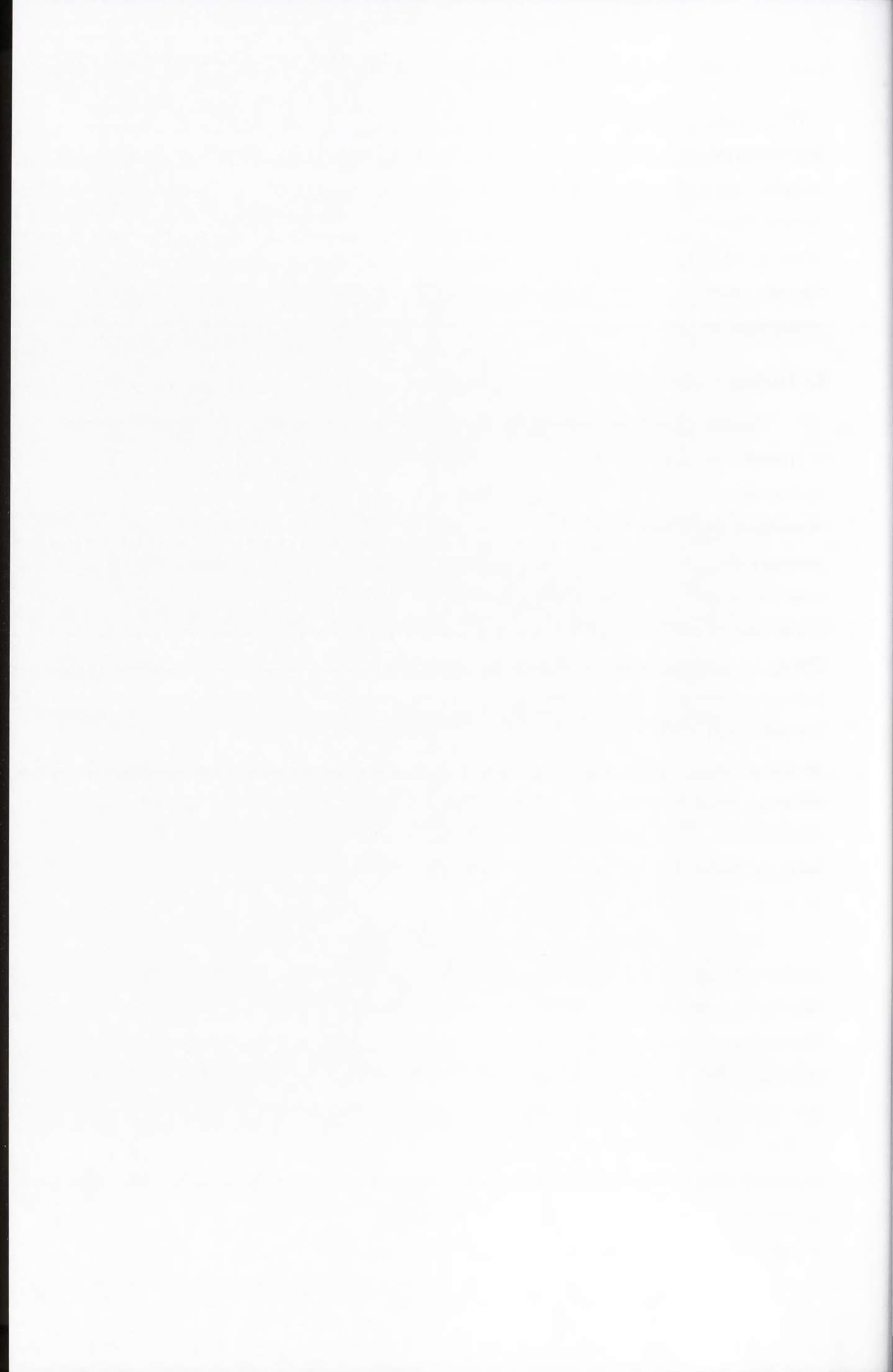


– fibrynogenu, czynników krzepnięcia krwi (V, VIII, XI, XIII), białka C, receptorów aktywowanych proteazami oraz trombomodulin. Miejsce zewnętrzne II jest najbardziej dodatnio naładowanym fragmentem trombiny, oddalonym od centrum aktywnego enzymu. Zawiera reszty aminokwasowe argininy (Arg93, Arg97, Arg101, Arg233) oraz lizyny (Lys236, Lys240). W tej części omawianego białka związaniu ulegają heparyna, siarczan heparyny, czynniki krzepnięcia krwi (V i VIII), a także glikoproteiny występujące na powierzchni płytek krwi (GPIb α), zaangażowane w ich aktywację [18].

2.3 Funkcje trombiny i rola w patogenezie chorób

Trombina jako kluczowy enzym kaskady krzepnięcia krwi odgrywa ważną rolę w procesie hemostazy. Uczestniczy w powstawaniu fibryny, której prekursor stanowi wytwarzany w wątrobie fibrynogen, zbudowany z dwóch monomerów połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Każda z tych podjednostek zawiera te same łańcuchy polipeptydowe: A α , B β oraz γ [19]. W wyniku proteolitycznej hydrolizy katalizowanej przez trombinę na N-końcach cząsteczek A α i B β następuje uwolnienie fibrynopeptydu A i B oraz odsłonięcie fragmentów odpowiedzialnych za polimeryzację monomerów fibryny w nierozpuszczalne włókna fibrynowe. Dalsza aktywność omawianej proteazy serynowej prowadzi do zwiększania usieciowienia i stabilizacji tego kompleksu w wyniku aktywacji transglutaminazy – czynnika XIIIa (aktywowanego przez trombinę), który odpowiada za tworzenie wiązań kowalencyjnych poprzecznych pomiędzy łańcuchami γ - γ oraz γ - α fibryny. Powstała sieć włókien fibrynowych stanowi rusztowanie skrzepu, do którego przyłączają się komórki nabłonka, leukocyty, płytki krwi oraz inne białka osoczowe w celu utworzenia czopu i zahamowania wycieku krwi ze światła naczynia krwionośnego [19, 20].

Trombina wykazuje również zdolność zwrotnej stymulacji własnego powstawania w wyniku aktywacji czynników V, VIII oraz XI. W fazie inicjacji hemostazy powstają małe ilości tego enzymu, których głównym zadaniem jest dostarczenie sygnału zwiększającego efektywność przebiegu reakcji kaskadowej krzepnięcia krwi. Co ciekawe, aktywność tego białka może w specyficznych warunkach ulec przełączeniu ze ścieżki koagulacyjnej na antykoagulacyjną. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku, gdy w wyniku rozrostu skrzepu w miejscu uszkodzenia dojdzie do kontaktu trombiny z nabłonkiem wyściełającym naczynie krwionośne i jej przyłączenia do trombomoduliny – receptora błonowego zlokalizowanego na powierzchni komórek nabłonkowych. Wskutek związania z TM następuje zmiana



profilu działania czynnika IIa: zmniejszeniu ulega zdolność hydrolizy fibrynogenu i białka PAR1, zwiększając jednocześnie jego specyficzność względem zymogenu białka C, przekształcając go w formę aktywną [21]. PC wraz ze swoim kofaktorem, białkiem S, powoduje inaktywację czynników Va i VIIIa, kofaktorów czynników Xa i IXa, kluczowych składników biorących udział w procesie powstawania trombiny. Utworzenie powyżej opisanego kompleksu ma za zadanie uniemożliwić miejscowe przekształcanie fibrynogenu w fibrynę na dużą skalę [22].

Jedną z istotniejszych funkcji trombiny w ludzkim organizmie jest aktywacja receptorów aktywowanych proteazami (PAR). Jak już nadmieniono wcześniej, stanowią one klasę śródbłonowych białek, odgrywających ważną rolę w transdukcji informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. W swojej budowie posiadają ukryty w N-końcowym fragmencie ligand, który w wyniku hydrolizy proteazą ulega odsłonięciu. Tak wyeksponowany nowy koniec wiąże się do receptora, powodując związanie białka G zlokalizowanego w domenie cytoplazmatycznej [12] i aktywację ścieżek, w których uczestniczą kinazy: białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*) oraz aktywowana mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*) [23]. Wyróżniono cztery klasy białek PAR, ale tylko trzy z nich: PAR1, PAR3 i PAR4 oddziałują z trombiną [12]. Stymulacja receptorów aktywowanych proteazami typu 1 i 4 jest odpowiedzialna między innymi za aktywację płytek krwi. S. Coughlin wraz ze współpracownikami przeprowadzili serię eksperymentów z zastosowaniem przeciwciał nakierowanych na białka PAR1 i PAR4 [24]. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że pierwsze z opisywanych białek do swojej aktywacji wymaga niskich stężeń trombiny, natomiast drugie wysokich. Poza błoną komórkową płytek krwi, receptory PAR ulegają również ekspresji na powierzchni monocytów, fibroblastów, limfocytów T, komórek nabłonkowych, nowotworowych oraz mięśni gładkich [25]. Za pośrednictwem właśnie tych transbłonowych białek zachodzi stymulowane trombiną różnicowanie i proliferacja wyżej wymienionych klas komórek [16]. Jak dotąd najmniej poznana jest rola receptorów PAR3 w ludzkim organizmie. Ostatnie doniesienia literaturowe sugerują udział tych cząsteczek, wraz z PAR4, w procesie amplifikacji wytwarzania trombiny na powierzchni mięśni gładkich aorty w wyniku jej uszkodzenia, co ma duży wpływ na procesy naprawcze tego naczynia [26]. Ponadto, udowodniono również, że trombina stymuluje wytwarzanie insuliny poprzez aktywację PAR3 [27].



Ze względu na skomplikowaną sieć powiązań oraz wzajemnie przenikanie się szlaków powstawania, działania oraz inhibicji poziomu aktywności trombiny w ludzkim organizmie niezwykle ważne dla zachowania hemostazy jest utrzymanie równowagi pomiędzy tymi procesami. Nadmierne wytwarzanie omawianego białka oraz niedobór jego naturalnych inhibitorów może doprowadzić między innymi do zespołu nadmiernego wykrzepiania naczyniowego (DIC, ang. *disseminated intravascular coagulation*) [28]. Jest to jednostka chorobowa spowodowana najczęściej patologiczną aktywacją układu krzepnięcia krwi, prowadzącą do rozwoju skrzepów w świetle małych naczyń krwionośnych narządów, czego efektem końcowym jest ich uszkodzenie. Co ciekawe, w przebiegu tego schorzenia następuje zużycie depozytu płytek krwi prowadząc do epizodów krwawienia. Występowanie DIC obserwuje się najczęściej w nowotworach, sepsie, w wyniku powikłań położniczych i pooperacyjnych oraz w ciężkich urazach.

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia literaturowe dostarczające mocnych dowodów na udział trombiny w procesie rozwoju astmy oskrzelowej [23, 29]. Uszkodzenie tkanki płucnej, które w przebiegu tej choroby występuje w wyniku nadmiernej reakcji zapalnej, zwiększa przepuszczalność ścian naczyń włosowatych płuc, ułatwiając tym samym przenikanie osoczowych białek takich jak trombina i fibrynogen oraz mediatorów stanu zapalnego do światła pęcherzyka płucnego. Opisany mechanizm zaburza hemostazę w tym organie, stymulując tym samym zwiększoną migrację i proliferację fibroblastów oraz ich różnicowanie w miofibroblasty [23, 29]. Wszystkie wyżej wymienione procesy zachodzą poprzez aktywację receptorów PAR za pośrednictwem trombiny i są ściśle związane z dalszą propagacją stanu zapalnego oraz przebudową struktury tkanki płucnej obserwowaną w rozwoju astmy oskrzelowej. N. Asokanathan wraz ze współpracownikami wykazali wyraźne powiązanie pomiędzy stymulacją receptorów PAR1 i PAR2 a różnicowaniem fibroblastów w miofibroblasty, czego przejawem jest podwyższona ekspresja alfa-aktyny mięśni gładkich (α -SMA, ang. *alpha smooth muscle actin*) oraz uwalnianie mediatorów stanu zapalnego: IL-6, IL-8 i prostaglandyny E₂ [29]. Powyższe wyniki eksperymentów *in vitro* znalazły potwierdzenie w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na grupie 164 pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową, u których zaobserwowano zwiększoną produkcję trombiny oraz zmniejszenie fibrynolizy [30].

Trombina odgrywa również istotną rolę w progresji choroby nowotworowej. Wyniki badań na myszach potwierdziły, że podanie inhibitorów opisywanego białka



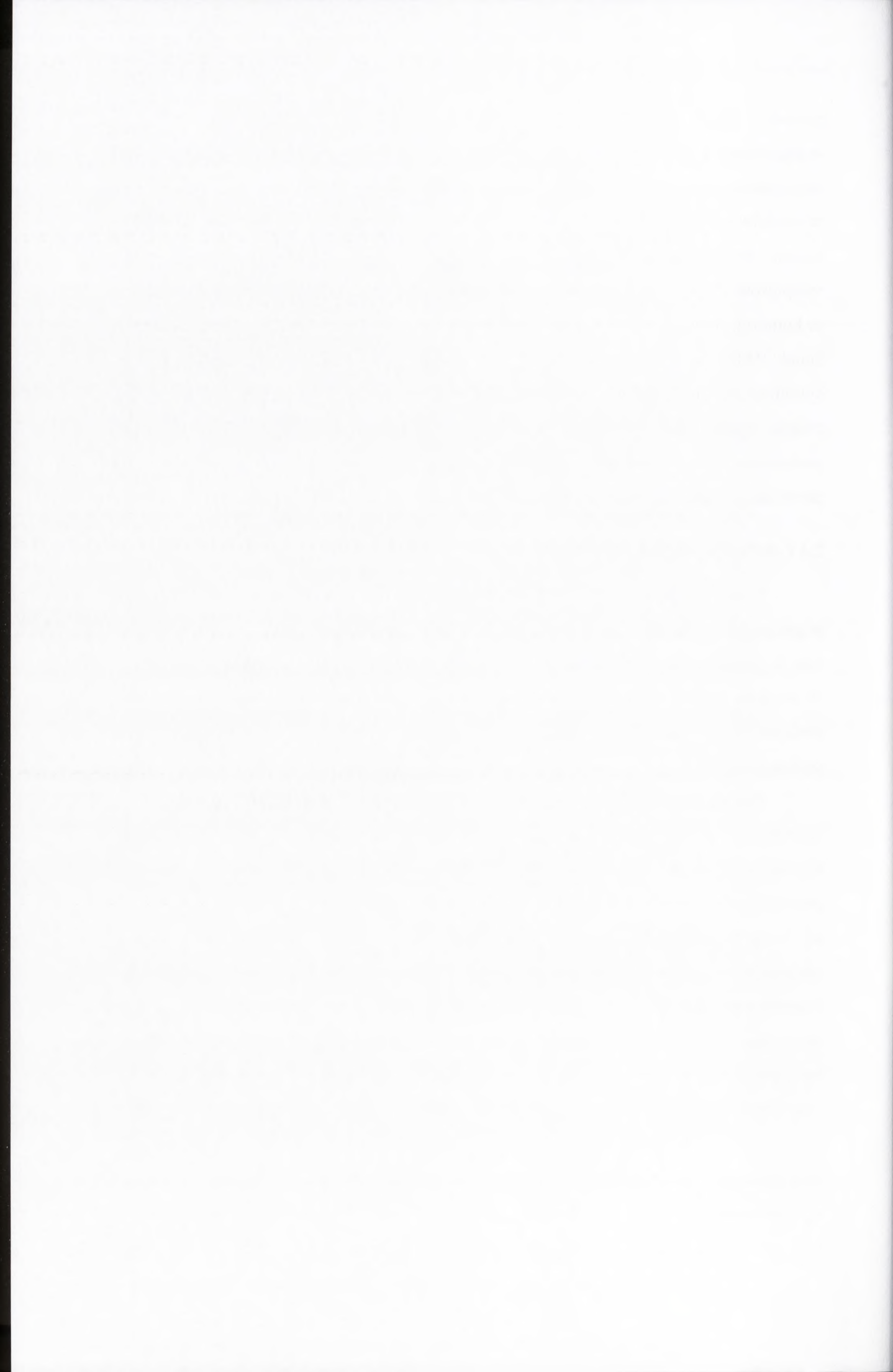
powoduje obniżenie częstości występowania przerzutów [31]. Rozsiew nowotworu w organizmie z udziałem trombiny odbywa się za pośrednictwem rodziny receptorów aktywowanych proteazami typu 1, powodując aktywację płytek krwi oraz uwolnienie czynników wzrostu, chemokin oraz czynników stymulujących angiogenezę np. czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), receptorów VEGF, metaloproteinaz (MMP) [32, 33]. Zaobserwowano również, że komórki nowotworowe charakteryzują się istotnym wzrostem poziomu ekspresji białek PAR1 na swojej powierzchni [32]. Początkowo zakładano, że rola trombiny ogranicza się do udziału w tworzeniu naczyń krwionośnych oraz przerzutów, jednak ostatecznie wyniki eksperymentów na myszach z defektem receptorów aktywowanych proteazami oraz fibrynogenu potwierdziły również udział tego białka we wzroście pierwotnego ogniska raka jelita grubego [34].

2.4 Leki hamujące aktywność trombiny

Trombina pełni w ludzkim organizmie nie tylko wiele kluczowych funkcji w procesach występujących w warunkach fizjologicznych, ale również odgrywa ważną rolę w patogenezie licznych chorób, co czyni ją doskonałym celem terapeutycznym. W związku z tym naukowcy na całym świecie podejmują próby stworzenia coraz doskonalszych preparatów zdolnych do inhibicji poziomu aktywności omawianej proteazy serynowej.

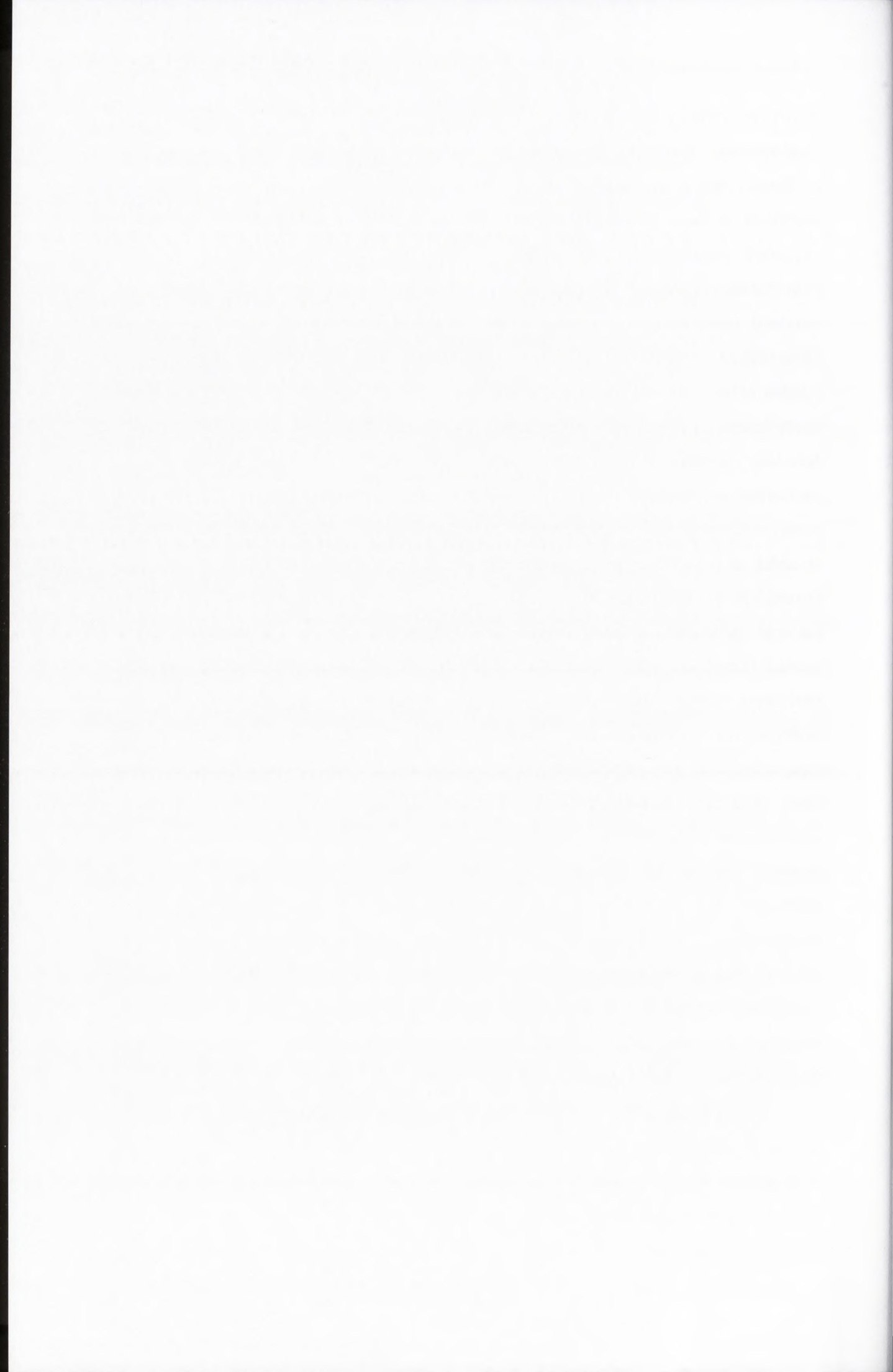
Pierwszą substancją zastosowaną w celu zahamowania działania trombiny była wyizolowana z psiej wątroby przez J. Macleana w 1916 roku heparyna [35]. Związek ten zaliczany jest do glikozaminoglikanów. Swoje działanie wywiera w sposób pośredni poprzez utworzenie kompleksu z endogenną antytrombiną (AT) i zmianę konformacji jej miejsca aktywnego. Powstały kompleks AT-heparyna odznacza się wyższą zdolnością wiązania z trombiną niż pojedyncza cząsteczka AT [36, 37]. Aktualnie w medycynie stosowane są dwa rodzaje heparyny: niefrakcjonowana (UFH, ang. *unfractionated heparin*) oraz niskocząsteczkowa (LMWH, ang. *low molecular weight heparin*) różniące się między sobą wielkością (UFH – od 4 do 40 kDa, LMWH – poniżej 6 kDa) oraz profilem działania [38, 39].

W 1956 roku grupa badawcza pod kierunkiem F. Markwardta przedstawiła dowody wskazujące na zdolność inhibicji aktywności trombiny przez substancję wyizolowaną ze ślinianek pijawek lekarskich, nazwaną hirudyną [40]. To zbudowane z 65 reszt aminokwasowych białko, wiąże się z miejscem zewnętrznym I i miejscem



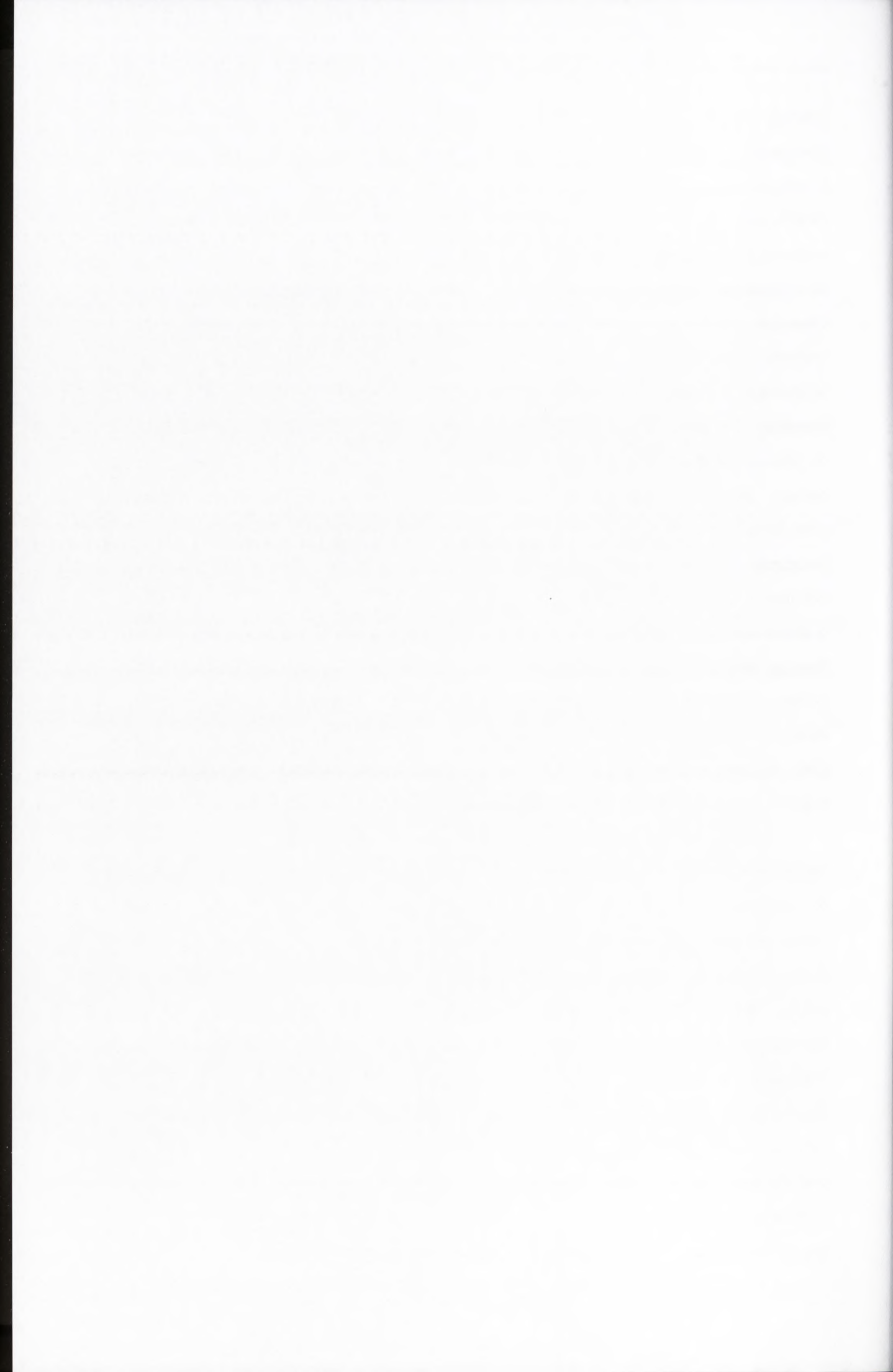
aktywnym wolnej oraz związanej z fibrynogenem trombiny tworząc niekowalencyjny, nieodwracalny kompleks [41, 42]. Pozyskiwanie naturalnej hirudyny okazało się problematyczne ze względu na trudną procedurę ekstrakcji oraz umieszczenie pijawek lekarskich na liście gatunków zagrożonych wyginięciem, w związku z tym naukowcy rozpoczęli poszukiwanie alternatywnych źródeł tej substancji [43]. Doprowadziło to do stworzenia rekombinowanej hirudyny różniącej się od naturalnego białka brakiem metylacji reszt tyrozyny w pozycji 63. Aktualnie stosowane są dwie jej formy, odznaczające się niemal identyczną z wyjściowym białkiem sekwencją aminokwasową z jedną różnicą na N-końcu cząsteczki. Pierwsza z nich nazywana leprudin zawiera reszty leucyny i tyrozyny w omawianym fragmencie, druga funkcjonująca pod nazwą desirudin posiada dwie reszty waliny [16]. Obie substancje odznaczają się poprawionymi względem heparyny właściwościami antykoagulacyjnymi i choć ich powinowactwo do cząsteczki trombiny jest niższe w porównaniu do naturalnej hirudyny to nadal są rozważane jako najbardziej obiecujące antykoagulanty [44]. Grupa pod kierunkiem K. Ramachandran poszła o krok dalej i stworzyła syntetyczny analog hirudyny składający się z jej dwudziestu C-końcowych reszt aminokwasowych, który nazwali hirugenem [45]. Cząsteczka ta charakteryzowała się odwracalnością działania, zdolnością zahamowania produkcji fibryny wskutek oddziaływania z miejscem zewnętrznym I trombiny oraz 50-krotnym spadkiem aktywności w teście APTT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, ang. *activated partial thromboplastin time*) względem naturalnego odpowiednika, co mogło rzutować na przyszłe jej zastosowania w terapii. W związku z powyższym, ta sama grupa badawcza w celu poprawy profilu działania hirugenu stworzyła biwalirudynę (hirulog) – koniugat składający się z C-końcowego fragmentu hirudyny połączonego łącznikiem zbudowanym z czterech reszt glicyny z trójpeptydową sekwencją fenyloalanina-prolina-arginina [46]. Te ostatnie reszty aminokwasowe wiążą się z miejscem aktywnym trombiny powodując jej odwracalną inhibicję z wyższą wydajnością w porównaniu do hirugenu. Ponadto, dodatkową zaletą biwalirudyny jest jej niższa immunogenność w stosunku do hirudyny [16].

Kolejną klasą związków zdolnych do zahamowania aktywności trombiny są analogi fibrynopeptydu A (FPA), będące jej naturalnym inhibitorem [47]. B. Blombäck wraz ze współpracownikami na podstawie serii eksperymentów wysunęli wniosek, że za inhibicyjne właściwości FPA odpowiadają trzy reszty aminokwasowe: fenyloalanina (w pozycji 9), walina (w pozycji 2) oraz arginina (w pozycji 1), które



zbliżają się do siebie poprzez wypełnienie oddzielających je aminokwasów [48]. Powyższe założenie znalazło potwierdzenie w badaniach strukturalnych z zastosowaniem techniki spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) [49]. Bazując na opisanych obserwacjach naukowcy rozpoczęli próby tworzenia krótkich peptydowych związków zdolnych do zahamowania aktywności trombiny. W 1972 roku grupa badawcza kierowana przez Okamoto stworzyła preparat agratroban, będący pochodną argininy odznaczający się większą aktywnością antykoagulacyjną niż heparyna [50]. Mechanizm działania opisywanej substancji opiera się na odwracalnym wiązaniu do centrum aktywnego trombiny i hamowaniu tym samym jej aktywności [51]. Zachęteni sukcesem kolegów w połowie lat 80-tych naukowcy z firmy AstraZeneca stworzyli preparat melagatran, będący pochodną benzamidyny i jednocześnie pierwszym doustnym lekiem przeciwzkrzepowym [52]. Powoduje on inhibicję aktywności trombiny poprzez wiązanie się z jej miejscem aktywnym. Ze względu na słabe wchłanianie z przewodu pokarmowego omawiana substancja jest podawana w formie proleku – ximelagatranu o charakterze lipofilowym, który następnie ulega przekształceniu do melagatranu [53]. Bazując na podobnych założeniach naukowcy z firmy Boehringer Ingelheim stworzyli kolejną pochodną benzamidyny nazwaną dabigatran i podawaną w formie proleku eteksylanu dabigatranu, przekształcanego w aktywną postać przez osoczną esterazę [54]. Opisana substancja została dopuszczona do użytku jako lek antykoagulacyjny w profilaktyce chorób zkrzepowych u pacjentów po operacjach ortopedycznych [16].

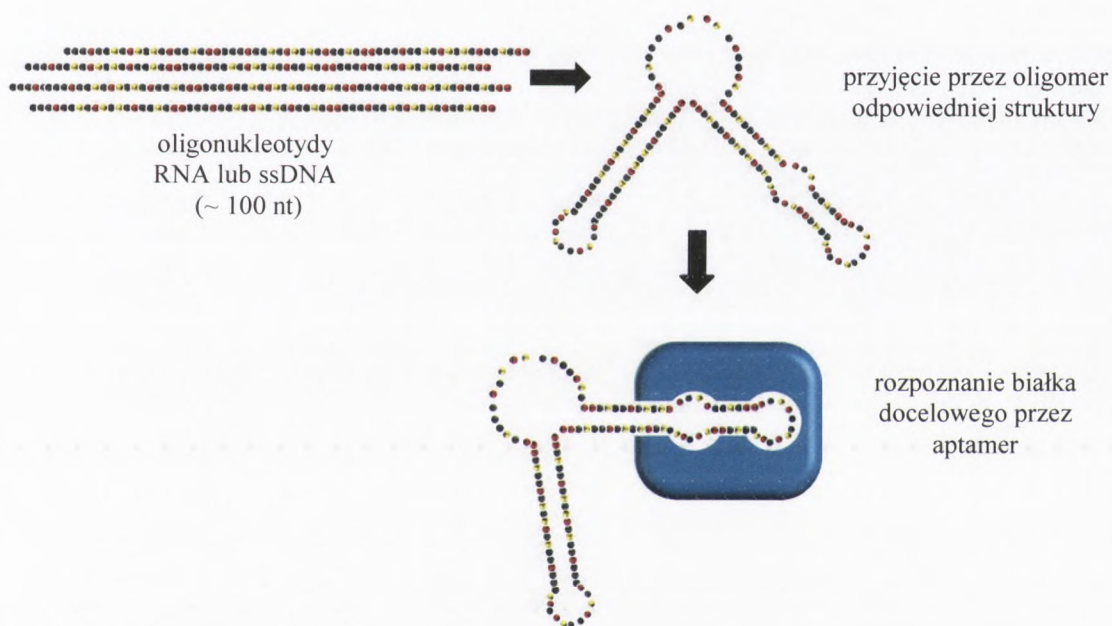
Oprócz fibrynopeptydu A stworzono również analog kolejnego naturalnego inhibitora trombiny – trombomoduliny. Wspomniane białko składa się z pięciu domen: N – końcowej (D1), podobnej do nabłonkowego czynnika wzrostu (D2), zawierającej liczne miejsca glikozylacji (D3), transbłonowej (D4) oraz cytoplazmatycznej (D5). K. Gomi wraz ze współpracownikami udowodnił, konstruując rekombinowany wariant (α TM, ART-123) i testując go na mysim modelu, że tylko trzy pierwsze domeny są kluczowe dla zahamowania aktywności trombiny [55, 56]. ART-123, produkowany w komórkach jajnika chomika chińskiego, wywiera inhibicyjny efekt poprzez aktywację szlaku białka C [56]. Rekombinowana trombomodulina przeszła pomyślnie trzy fazy badań klinicznych w Japonii i została dopuszczona do użytku w 2008 roku pod nazwą handlową ReomodulinTM jako skuteczny preparat przeciwzkrzepowy w leczeniu zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, schorzenia współtowarzyszącego między innymi chorobom onkologicznym [57-59].



Współczesne trendy projektowania i syntezy związków zdolnych do wywierania efektu terapeutycznego w oparciu o dogłębne poznanie struktury oraz mechanizmu działania cząsteczki docelowej doprowadziły do podjęcia próby modulacji poziomu aktywności trombiny przy zastosowaniu oligonukleotydów DNA lub RNA. Niewątpliwą zaletą tego podejścia jest łatwość projektowania i modyfikacji, a także szybkość syntezy kwasów nukleinowych.

3. Aptamery

Aptamery są jednoniciowymi oligonukleotydami lub polipeptydami o masie ok. 8 – 15 kDa, których sekwencja determinuje przyjęcie określonej struktury przestrzennej. Umożliwia to wysoce specyficzne wiązanie docelowego białka lub innej



Rysunek 3. Schemat obrazujący działanie aptameru.

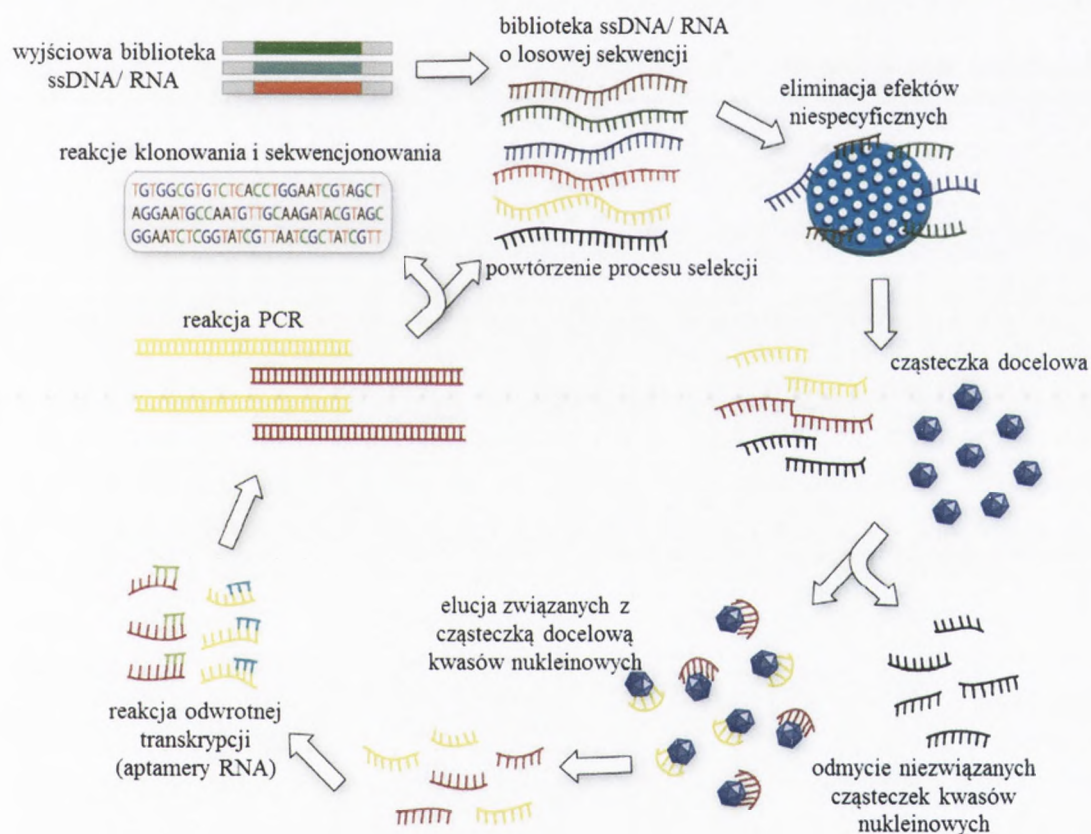
cząsteczki i w ten sposób modulację jej aktywności [60, 61] (Rys. 3). Ich nazwa pochodzi z języka greckiego od „*aptus*”, co oznacza dosłownie pasować oraz „*merus*”, cząsteczka. Aptamery często są określane mianem chemicznych przeciwciał, gdyż wartość stałej dysocjacji (K_d) dla tych cząsteczek zawiera się w zakresie mikro/nanomolarnym. Ponadto, ich niekwestionowaną przewagą nad przeciwciałami jest łatwość syntezy i przechowywania, nieograniczona możliwość wprowadzania chemicznych modyfikacji [62, 63] oraz dobre parametry farmakokinetyczne takie jak np. korzystny klirens nerkowy [61, 64]. Wyróżniono cztery podstawowe klasy aptamerów: RNA, DNA, peptydowe oraz XNA (kwas ksenonukleinowy, ang. *xeno*



nucleic acid) [64]. Te ostatnie stanowią nietypową klasę oligonukleotydów, posiadających w swojej budowie inną niż ryboza lub deoksyryboza resztę cukrową (np. arabinozę czy ksylozę) [65]. Dzięki wprowadzeniu powyższych modyfikacji nadano tym cząsteczkom większą odporność na hydrolizę katalizowaną nukleazami komórkowymi, ponadto ich parametry farmakokinetyczne uległy znacznej poprawie [64].

3.1 Metody otrzymywania aptamerów

Podstawową metodą otrzymywania aptamerów jest selekcja *in vitro* nazywana inaczej SELEX (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) [61, 64, 66] (Rys. 4). Jej pierwszy etap stanowi chemiczna synteza pełnej biblioteki

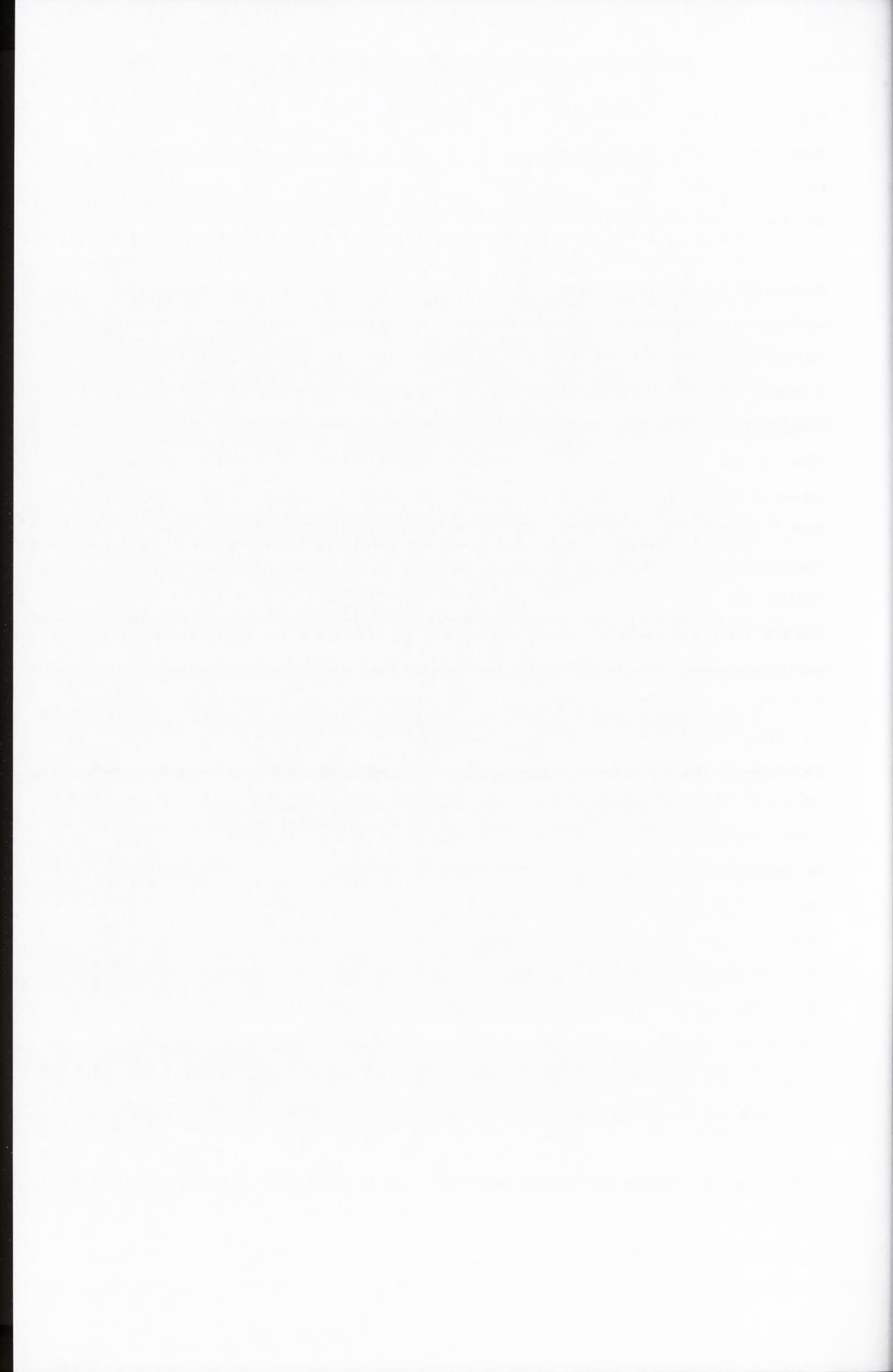


Rysunek 4. Schemat obrazujący przebieg selekcji *in vitro* [64].

oligonukleotydowej (biblioteki kombinatorycznej). Składa się ona z puli oligomerów zbudowanych z dwóch zasadniczych części: regionu o losowej sekwencji oraz dwóch regionów oskrzydających, o zdeterminowanej sekwencji, będących miejscem wiązania starterów łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR, ang. *polymerase chain reaction*).



Ilość cząsteczek w bibliotece jest zależna od długości badanej, losowej sekwencji zbudowanej z n -nukleotydów, według wzoru n^4 . Stworzoną w ten sposób bibliotekę kombinatoryczną poddaje się inkubacji z docelową cząsteczką, w celu wybrania aptamerów odznaczających się największym powinowactwem względem czynnika selekcyjnego. Niezwiązane oligonukleotydy zostają odmyte, natomiast pozostałe poddawane są powieleniu w reakcji PCR. Opisane powyżej etapy składają się na jeden cykl selekcji, który jest wielokrotnie powtarzany aż do momentu uzyskania cząsteczek odznaczających się pożądanymi właściwościami (np. nanomolarne wartości stałej wiązania, zdolność wiązania ligandów oraz odporność na hydrolizę nukleazami komórkowymi). Zwieńczenie procesu selekcji stanowi sekwencjonowanie uzyskanego aptameru oraz określenie jego parametrów kinetycznych [64]. Metoda SELEX została opracowana równoległe przez dwa niezależne zespoły A.D. Elligton i J. W. Szostaka oraz C. Tuerk i L. Gold [67, 68]. W pierwotnym kształcie selekcja dotyczyła oligomerów RNA, które z założenia odznaczają się większą różnorodnością strukturalną, co pociąga za sobą dostrzegalne różnice w sile wiązania docelowego ligandu, oraz możliwością syntezy w komórkach [64, 69]. Ze względu jednak na większą stabilność deoksyrybonukleotydów oraz mniejszą liczbę etapów wchodzących w skład jednego cyklu selekcyjnego (w selekcji aptamerów RNA występują jeszcze dwa dodatkowe etapy: reakcje transkrypcji *in vitro* oraz odwrotnej transkrypcji) SELEX znalazł większe zastosowanie przy poszukiwaniu aptamerów DNA [64]. Niemniej jednak w obu przypadkach technika ta jest bardzo czasochłonna i składa się z wielu cykli. W związku z tym podjęto próby skrócenia czasu potrzebnego na przeprowadzenie metody SELEX poprzez użycie elektroforezy kapilarnej, immobilizacji białka na magnetycznych kulkach i rozdzielaniu za pomocą magnetycznego separatora oraz komputerowego projektowania aptamerów [64]. Na uwagę również zasługują dwie, nowe odmiany tej techniki umożliwiające selekcję aptamerów bezpośrednio w komórkach tzw. Cell-SELEX oraz w żywych organizmach tzw. *in vivo* SELEX. W obu przypadkach nie jest konieczna znajomość docelowej cząsteczki będącej kryterium selekcyjnym. Co więcej, białko, które ma być docelową cząsteczką dla uzyskanego drogą Cell-SELEX aptameru, nie wymaga uprzedniego oczyszczania, a więc natywna struktura jest całkowicie zachowana wraz z ewentualnymi potranslacyjnymi modyfikacjami. Technika ta może z powodzeniem znaleźć zastosowanie w selekcji aptamerów, które mogą być wykorzystane w celowanej terapii onkologicznej oraz diagnostyce [70].



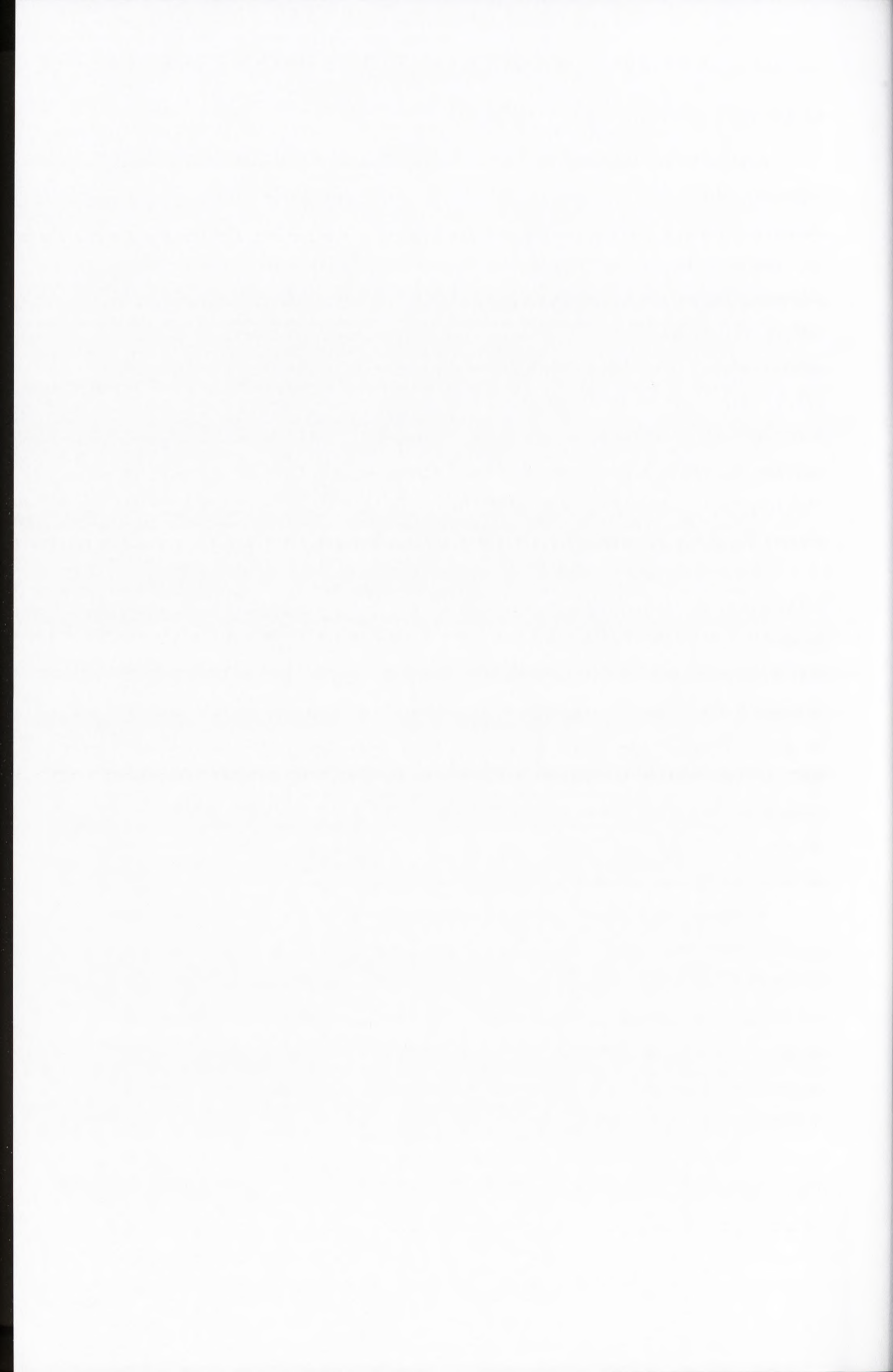
3.2 Aptamery hamujące aktywność trombiny

Aptamery ze względu na wysokie powinowactwo względem docelowej cząsteczki, niskie wartości stałej dysocjacji oraz stosunkowo łatwą syntezę znalazły szereg zastosowań w medycynie. Mogą przede wszystkim stanowić wysoce specyficzny lek, charakteryzujący się odwracalnością działania oraz wydłużonym czasem półtrwania. Pierwszym aptamerem nakierowanym na inhibicję aktywności trombiny jest odkryty w 1992 roku przez L. Bocka, w wyniku przeprowadzenia selekcji *in vitro*, aptamer wiążący trombinę, występujący również pod nazwami ARC183 oraz HD1 [71, 72]. Ten 15 nukleotydowy oligomer DNA o sekwencji: 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' przyjmuje strukturę wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego kwadrupleksu o konformacji krzesłowej [73]. Od momentu odkrycia TBA rozpoczęto szeroko zakrojone badania mające na celu stworzenie oligonukleotydu odznaczającego się poprawionymi właściwościami antykoagulacyjnymi.

Firma Archemix/Nuvelo stworzyła aptamer Nu172 o sekwencji 5'-CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG-3', który postrzegany jest jako doskonały, potencjalnie skuteczniejszy w porównaniu do TBA, lek przeciwzakrzepowy [74]. Różnice w sekwencji trzonu oraz obecność dodatkowych reszt nukleozydowych na końcach 5' i 3' tego G-kwadrupleksu spowodowało, że jego struktura przestrzenna nie jest homogenna. Co więcej, Nu172 tworzy najstabilniejsze kompleksy z jonami Ba^{2+} , Sr^{2+} oraz niskimi stężeniami K^{+} . Pomimo tych różnic, I faza badań klinicznych omawianego aptameru zakończyła się sukcesem. W związku z powyższym Nu172 skierowano do dalszych testów mających na celu wdrożenie tego oligomeru do komercyjnego zastosowania [75].

Kolejnym aptamerem DNA zdolnym do inhibicji powstawania skrzepu, występującym pod nazwą HD22, jest 29-nukleotydowy oligomer o sekwencji 5'-GTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGAC-3' [76]. Wiąże się on z dużym powinowactwem do miejsca zewnętrznego II białka docelowego (miejsce wiążące heparynę) i w ten sposób hamuje jego aktywność. Omawiany aptamer może znaleźć zastosowanie jako składnik aptasensora nakierowanego na wykrywanie trombiny w próbkach krwi pacjentów [77].

Chociaż pierwsze aptamery zdolne do inhibicji aktywności trombiny były oligonukleotydami DNA, od tamtej pory udało się stworzyć kilka cząsteczek RNA wykazujących właściwości antytrombinowe. Jedną z nich jest 25 nukleotydowy



oligomer Tog25 posiadający w wybranych pozycjach reszty nukleozydów pirymidynowych zawierające substytucję atomem fluoru przy atomie C2' pierścienia rybozy (5'-GGGAACAAAGCUGAAGUACUUACCC-3') [78]. Został on odkryty w 2001 roku przez S. Long i współpracowników w wyniku przeprowadzenia selekcji *in vitro* z zastosowaniem dwóch czynników selekcyjnych (trombiny ludzkiej oraz świńskiej). Taki zabieg umożliwił stworzenie aptameru zdolnego do oddziaływania z białkiem pochodzącym od dwóch różnych gatunków, co w znaczący sposób umożliwiło miarodajne porównanie wyników badań prowadzonych *in vitro* i na zwierzętach. Tog25 w przeciwieństwie do swoich poprzedników nie jest G-kwadrupleksem, tworzy strukturę typu spinki do włosów z obustronnym wybrzuszeniem w części helikalnej [79]. Aptamer ten powoduje inhibicję powstawania skrzepów oraz aktywacji płytek krwi poprzez związanie z miejscem aktywnym II cząsteczki trombiny. W związku z powyższym, podobnie jak wcześniej opisany HD22, może znaleźć zastosowanie jako kompetycyjny czynnik kontrolujący działanie heparyny [80]. Na podstawie wyników badań krystalograficznych stwierdzono, że Tog25 przyjmuje złożoną strukturę trzeciorzędową, umożliwiającą oddziaływanie znaczną powierzchnią z cząsteczką trombiny. W stabilizacji tego kompleksu ważną rolę odgrywają wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waals'a oraz warstwowe pomiędzy resztami adenozyne aptameru i argininy białka [78].

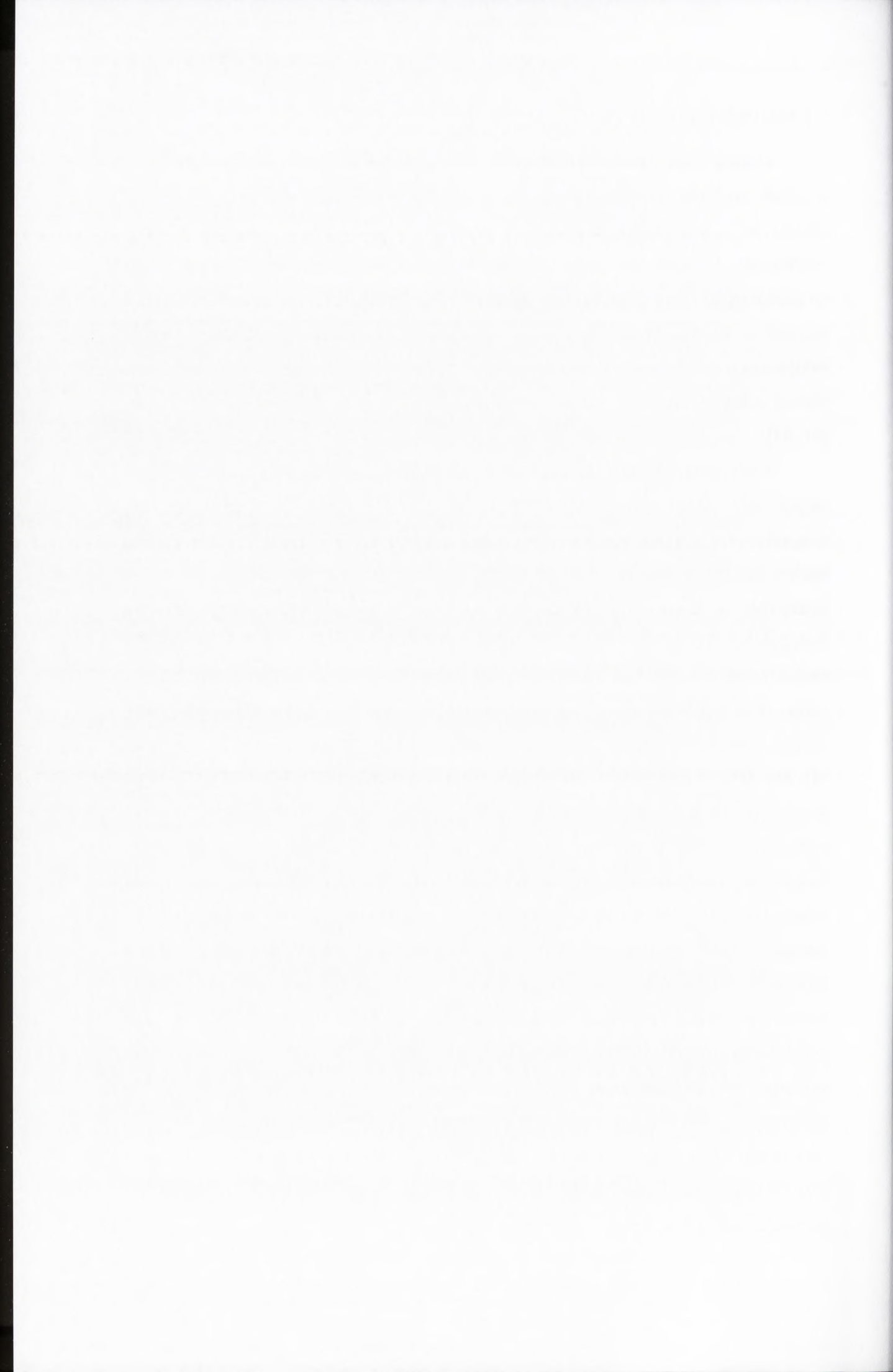
Niedawno ta sama grupa badawcza stworzyła 58 nukleotydowy oligomer RNA R9D-1T, zawierający w wybranych pozycjach reszty 2'-fluoro-2'-deoksyrybonukleozydów pirymidynowych [81]. Opisywany aptamer wiąże się specyficznie z cząsteczką protrombiny i trombiny w ich miejscu zewnętrznym I, hamując tym samym nie tylko procesy katalizowane przez docelowy enzym (tworzenie skrzepów fibrynowych, aktywację płytek krwi za pośrednictwem receptora PAR), ale również samo jego powstawanie. Dodatkową przewagą R9D-1T nad pozostałymi przedstawicielami tej klasy związków, jest jego stosunkowo duży rozmiar, który zapewnia mu większą powierzchnię oddziaływania z białkiem. Poprzez zastosowanie modyfikowanych reszt nukleozydowych aptamer ten odznacza się wydłużonym czasem półtrwania w osoczu ludzkim, co w połączeniu z jego wysokim powinowactwem do trombiny czyni go ciekawym obiektem badań mających na celu stworzenie nowego preparatu o potencjalnych właściwościach antykoagulacyjnych.



3.3 Pozostałe przykłady zastosowań aptamerów

Oprócz powyżej opisanych cząsteczek kwasów nukleinowych w 1995 roku w celach medycznych zsyntetyzowano również aptamer bogaty w reszty guanozyny zdolny do zahamowania aktywności integrazy wirusa HIV, co stworzyło nowe możliwości leczenia tej jednostki chorobowej [82]. Pierwszym dopuszczonym do użytku przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) aptamerem RNA był preparat o nazwie Macugen, którego cel terapeutyczny stanowił czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, dzięki czemu znalazł zastosowanie w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD, ang. *age-related macular degeneration*) [61, 83].

Niebywałą zdolność aptamerów do oddziaływania z cząsteczką docelową już na poziomie stężeń nanomolarnych wykorzystano również do stworzenia narzędzi terapeutycznych nakierowanych na wykrywanie i zwalczanie toksyn: botulinowej [84], cholery czy też gronkowca [85]. Co więcej, dzięki niewielkiemu rozmiarowi, stabilnej strukturze, a także możliwości dołączenia znaczników fluorescencyjnych lub izotopowych omawiana klasa oligonukleotydów z powodzeniem może znaleźć zastosowanie w szybkiej diagnostyce śródoperacyjnej oraz nieinwazyjnym obrazowaniu zmian o charakterze nowotworowym np. komórek glejaka wielopostaciowego przy użyciu aptameru nakierowanego na wykrywanie nabłonkowego receptora wzrostu [61, 86]. Wraz z postępem nauki i dzięki rozwojowi techniki Cell-SELEX, pojawiła się możliwość selekcji aptamerów będących biomarkerami chorób nowotworowych i infekcyjnych bez dokładnej znajomości docelowej cząsteczki. W tym przypadku komórki wyizolowane ze zmienionego chorobowo fragmentu narządu stanowią czynnik selekcyjny [61]. Daje to nadzieję na szybsze stworzenie platform diagnostycznych odznaczających się dużą czułością i specyficnością działania. Aptamery ze względu na wysoką swoistość wiązania cząsteczki docelowej mogą również stanowić doskonały system transportujący leki w pożądane miejsce działania. Do tej pory połączono je z doksorubicyną [87, 88], cisplatyną [89], metotreksatem [90], czy też nanocząstkami składającymi się z nanokulek złota oraz kwasów nukleinowych [91, 92]. Zawężenie spektrum działania leków poprzez połączenie z aptamerami umożliwiło eliminację ubocznych efektów chemioterapii, takich jak na przykład neuro- i nefrotoksyczność, przy jednoczesnym zwiększeniu jej czułości oraz transportu do wnętrza komórki na drodze endocytozy receptorowej [89].

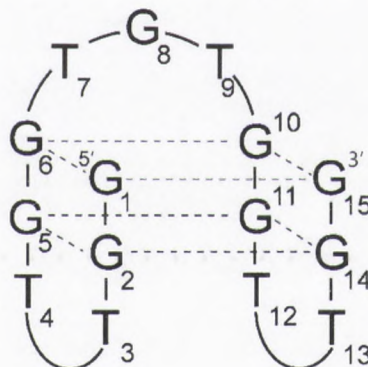


4. Aptamer wiążący trombinę

Jak już wcześniej wspomniano aptamer wiążący trombinę jest oligonukleotydem DNA odkrytym w 1992 roku przez Luisa Bocka w wyniku przeprowadzenia selekcji *in vitro* [71]. Posiada unikatową zdolność wiązania oraz inhibicji aktywności nie tylko trombiny obecnej w roztworze, ale również związanej z fibryną, co czyni go ciekawą alternatywą dla aktualnie dostępnych antykoagulantów [93]. Interesujące pod względem medycznym właściwości TBA wynikają ze szczególnej struktury tej cząsteczki, którą udało się określić dzięki licznym badaniom krystalograficznym oraz spektroskopii NMR [94-97].

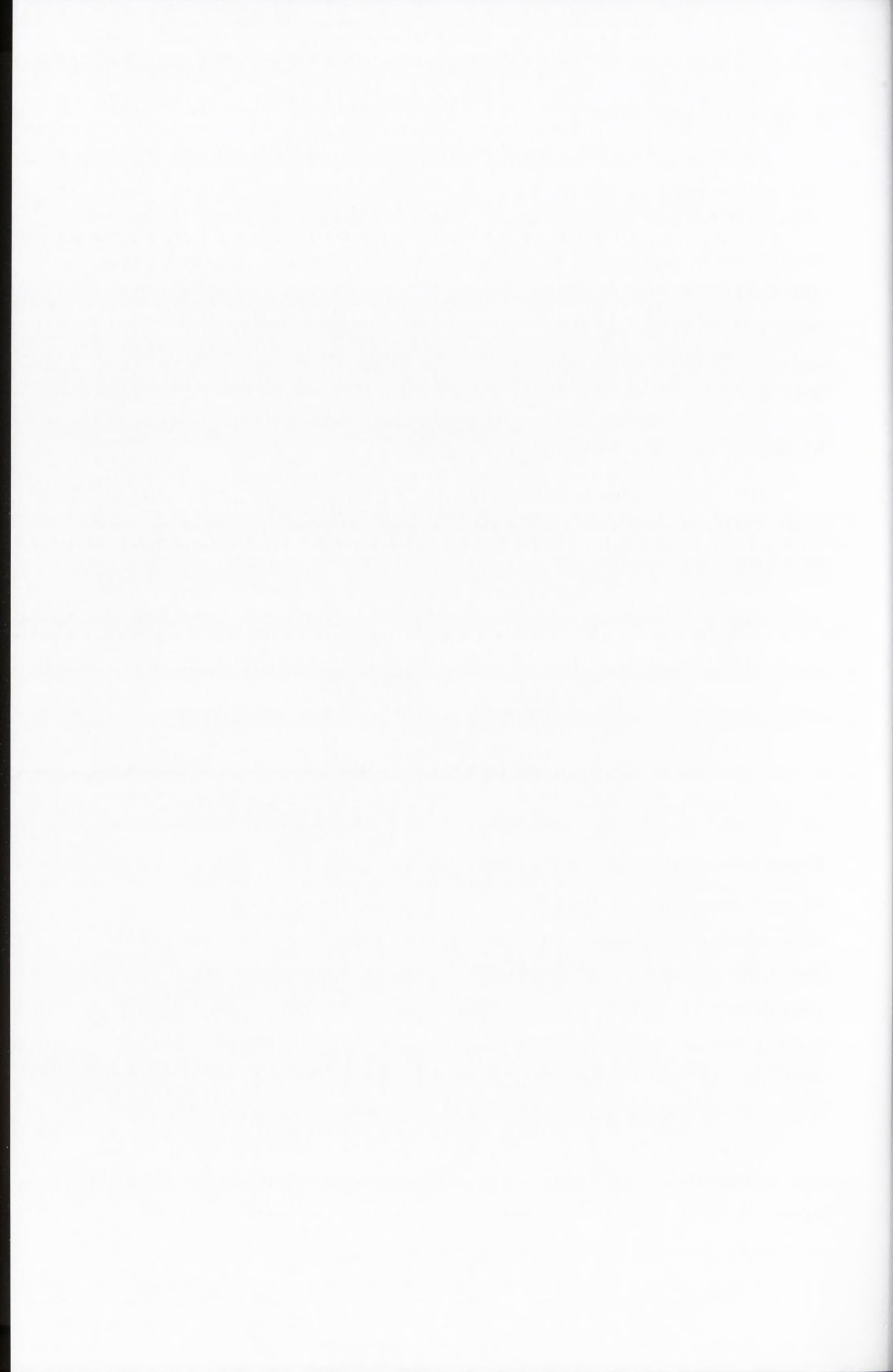
4.1 Budowa i struktura TBA

TBA jest 15-nukleotydowym oligomerem DNA o sekwencji: 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' przyjmującym strukturę wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego kwadrupleksu o konformacji krzesłowej (Rys. 5) [73].

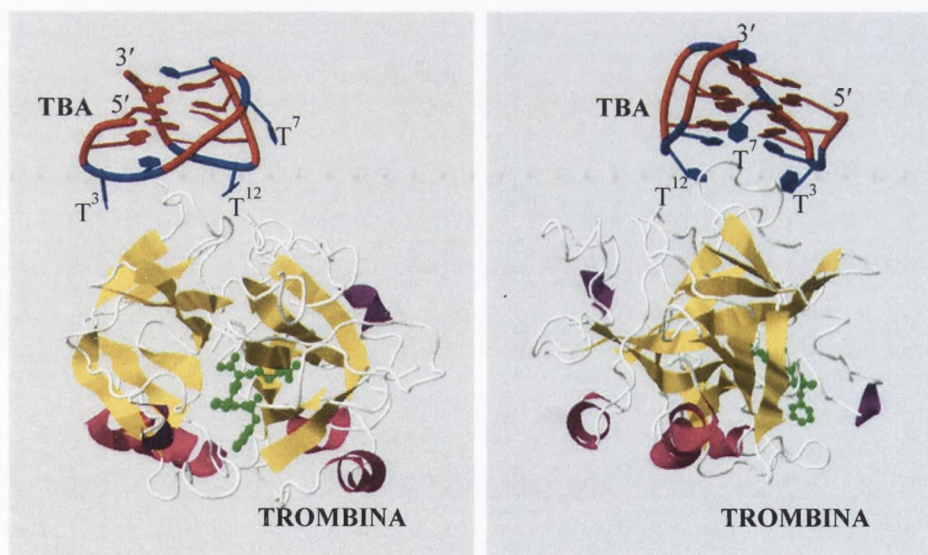


Rysunek 5. Schemat struktury TBA.

Rdzeń aptameru stanowią dwie G-tetrazy, każda zbudowana z czterech płasko ułożonych reszt 2'-deoksyguanozyn stabilizowanych wiązaniami wodorowymi typu Hoogsteen'a [98, 99]. Reszty nukleotydów purynowych wchodzące w skład tetrad guanozynowych TBA przyjmują dwie konformacje względem wiązania N-glikozydowego: *syn* – zasada heterocykliczna znajduje się bezpośrednio nad płaszczyzną pierścienia 2'-deoksyrybozy (G^1 , G^5 , G^{10} i G^{14}) oraz *anti* – zasada heterocykliczna znajduje się poza płaszczyzną pierścienia rybozy (G^2 , G^6 , G^{11} , G^{15}) [95, 100]. To specyficzne ułożenie reszt 2'-deoksyguanozyn w trzonie cząsteczki TBA oraz antyrównoległa orientacja nici ją budującej skutkuje powstaniem dwóch mniejszych i dwóch większych bruzd [95]. Wszystkie pierścienie reszt 2'-deoksyrybozy występujące w omawianym aptamerze posiadają konformację $C2'$ -endo. G-tetrazy



są połączone dwiema mniejszymi pętlami: T^3T^4 i $T^{12}T^{13}$ oraz jedną większą pętlą $T^7G^8T^9$, zlokalizowaną na przeciwległej stronie cząsteczki (Rys. 5) [101, 102]. Na podstawie wyników badań NMR wysunięto wniosek, że reszty nukleotydowe T^4 i T^{13} odgrywają ważną rolę w stabilizacji struktury TBA poprzez tworzone ze sobą wiązania wodorowe oraz oddziaływania warstwowe z G-tetradą $G^2-G^5-G^{11}-G^{14}$ [95, 103, 104]. Reszty nukleotydowe T^3 i T^{12} są natomiast zwrócone na zewnątrz cząsteczki i nie są zaangażowane w żadne oddziaływania z rdzeniem aptameru (Rys. 6) [94, 105]. Podobne obserwacje poczynił T. Coppola wraz ze współpracownikami dla pętli TGT [103]. W tym przypadku, reszty nukleotydowe G^8 i T^9 są zaangażowane w oddziaływania warstwowe z G-tetradą $G^1-G^5-G^{11}-G^{15}$. Ich obecność jest istotna nie tylko dla zachowania stabilności struktury TBA, ale również ma wpływ na wiązanie z cząsteczką trombiny. Reszta nukleotydowa T^7 jest usytuowana poza osią rdzenia G-kwadrupleksu i nie jest zaangażowana w oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe z pozostałą częścią aptameru (Rys. 6) [104]. Co więcej, stwierdzono, że zwiększając elastyczność pętli w pozycji T^7 można uzyskać poprawę powinowactwa TBA do docelowego białka [103].



Rysunek 6. Struktura trzeciorzędowa TBA w kompleksie z trombiną (plik PDB: 1HAO).

Już wiele lat temu pojawiły się pierwsze doniesienia literaturowe wskazujące, że obok sekwencji również warunki środowiska wpływają na poprawność topologii fałdowania G-kwadrupleksów [95, 106, 107]. W przypadku TBA udowodniono, że do przyjęcia odpowiedniej struktury niezbędna jest obecność jonów potasu. Początkowo zakładano centralną lokalizację K^+ w rdzeniu cząsteczki aptameru, pomiędzy G-tetradami [95]. Na podstawie kolejnych badań z zastosowaniem techniki

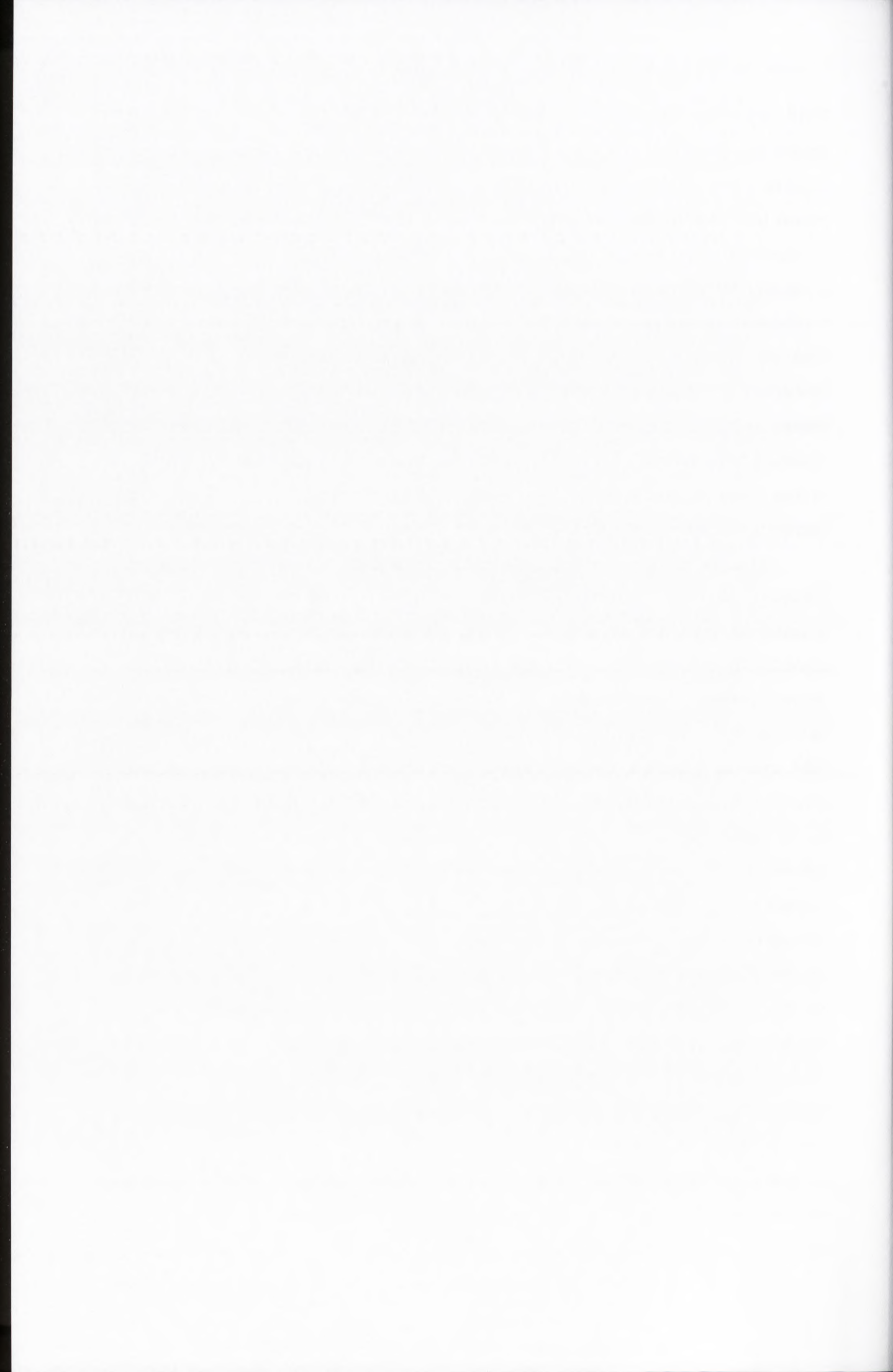
Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Second block of faint, illegible text, appearing as several lines of a paragraph.

Third block of faint, illegible text at the bottom of the page.

NMR wysunięto wniosek, że oddziaływanie K^+ z TBA zachodzi w stosunku stechiometrycznym 2:1. Jeden jon związany jest pomiędzy pętlami TT, drugi natomiast znajduje się w pobliżu pętli TGT [108, 109]. Udowodniono również, że jeden jon potasu jest wystarczający do przyjęcia przez TBA konformacji krzesłowej, jednak związanie drugiego jonu w rejonie pętli TGT powoduje jej stabilizację i bierze udział w nadaniu tej cząsteczce zdolności inhibicji aktywności trombiny [109]. Również w obecności jonów amonowych, baru, ołowiu, strontu oraz rubidu TBA przyjmuje strukturę antyrównoległego, wewnątrzcząsteczkowego kwadrupleksu o konformacji krzesłowej w temperaturze 25°C , podczas gdy jony litu, sodu, cezu, magnezu oraz wapnia są jedynie zdolne do stworzenia przejściowego kompleksu z tym aptamerem w niskich temperaturach [110, 111]. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być fakt, że jony metali o promieniu jonowym zwartym w granicach od 1.3 do 1.5 Å dobrze wpasowują się pomiędzy dwie G-tetrazy.

Kluczowym dla pełnego zrozumienia mechanizmu działania aptameru wiążącego trombinę okazało się dokładne poznanie modelu oddziaływania TBA z cząsteczką trombiny na poziomie molekularnym. Na podstawie analizy danych uzyskanych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego ustalono ogólne założenie stanowiące, że wymienione cząsteczki oddziałują ze sobą w stosunku stechiometrycznym 1:2 [112]. TBA miał się wiązać z dwiema cząsteczkami trombiny: z pierwszą w jej miejscu zewnętrznym I, powodując inhibicję jej działania oraz z drugą w miejscu zewnętrznym II, nie wpływając na jej aktywność. Pierwsze badania strukturalne nie były jednak spójne co do wskazania fragmentu aptameru bezpośrednio zaangażowanego w omawiane interakcje. Początkowo, opierając się na analizie danych eksperymentalnych uzyskanych z pomiarów krystalograficznych wysunięto wniosek, że pętla TGT może być potencjalnym miejscem oddziaływania z trombiną i odpowiadać za inhibicyjne właściwości omawianego aptameru [105]. Równocześnie bazując na interpretacji wyników badań NMR stwierdzono, że to właśnie dwie pętle TT odgrywają kluczową rolę w wiązaniu TBA z docelowym białkiem [101]. Dopiero grupa badawcza pod kierunkiem F. Sica w opublikowanej w 2011 roku krystalograficznej pracy zdołała w jednoznaczny sposób określić dokładny schemat oddziaływania TBA z trombiną [113]. W założonym przez nich modelu wskazano, że aptamer wiążący trombinę wiąże się tylko z jedną cząsteczką docelowego białka w jego miejscu zewnętrznym I poprzez dwie pętle TT. Te ostatnie działają niczym szczytce chwytające

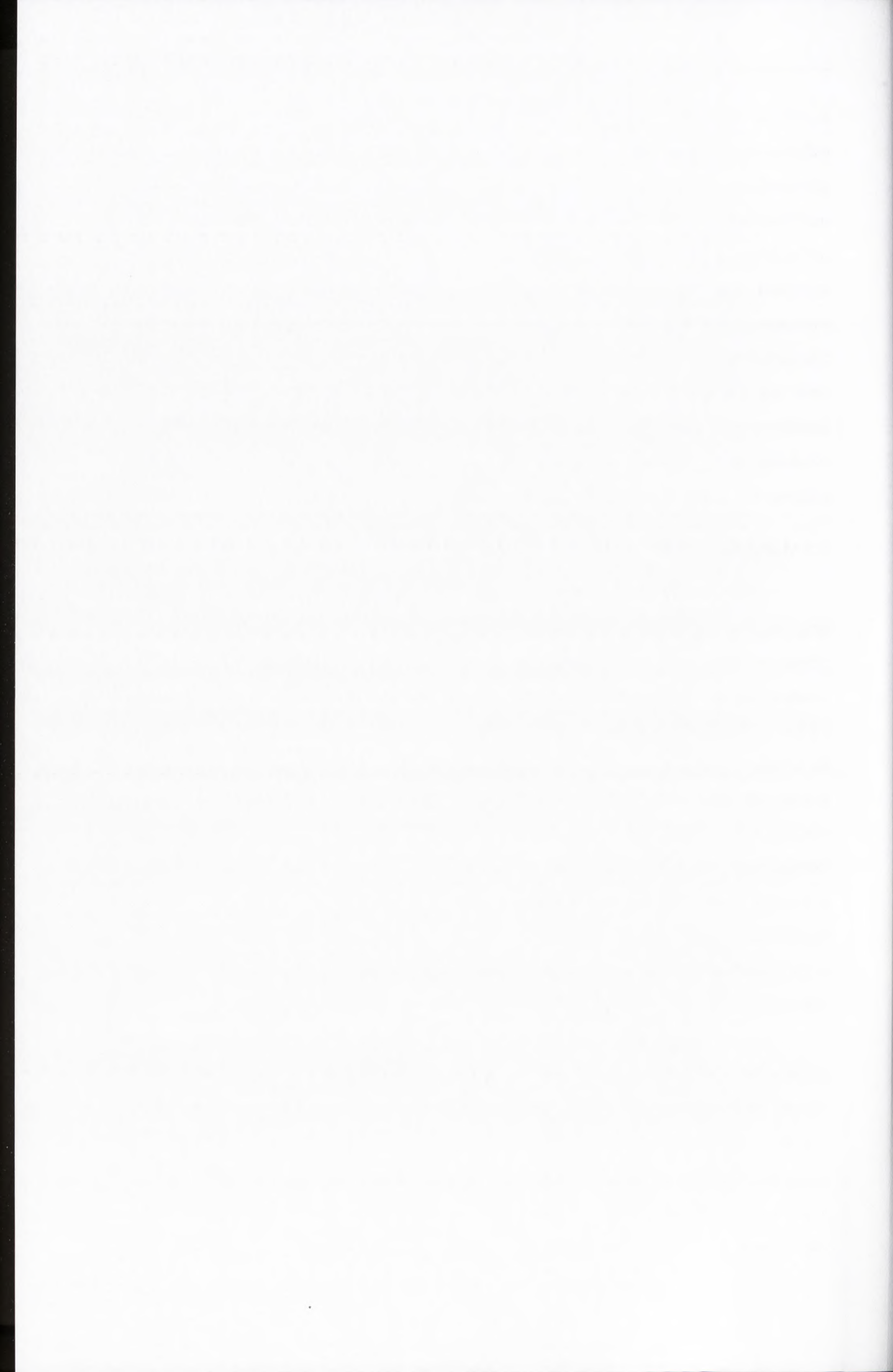


wystające fragmenty regionu trombiny wiążącego fibrynogen. Opisany kompleks jest stabilizowany poprzez oddziaływania hydrofobowe. Powyższy model został potwierdzony w pracy krystalograficznej autorstwa A. Pica i współpracowników opublikowanej w 2013 roku [94]. Co więcej, autorzy uszczegółowili opis mechanizmu oddziaływania TBA-trombina wskazując, że reszty tymidyny w pozycji 3 (T^3) i 12 (T^{12}) aptameru oraz reszty argininy (Arg75 i Arg77A), kwasu glutaminowego (Glu77), asparaginy (Asn78), izoleucyny (Ile79), tyrozyny (Tyr76) tego białka są bezpośrednio zaangażowane w omawiane oddziaływania. Dzięki powyższym badaniom możliwe stało się głębsze zrozumienie mechanizmu rozpoznawania przez TBA cząsteczki docelowej oraz zjawisk fizycznych leżących u podstaw powinowactwa i selektywności działania, co jest niezwykle istotne przy próbie ingerencji w strukturę omawianego oligomeru w celu poprawy jego aktywności biologicznej.

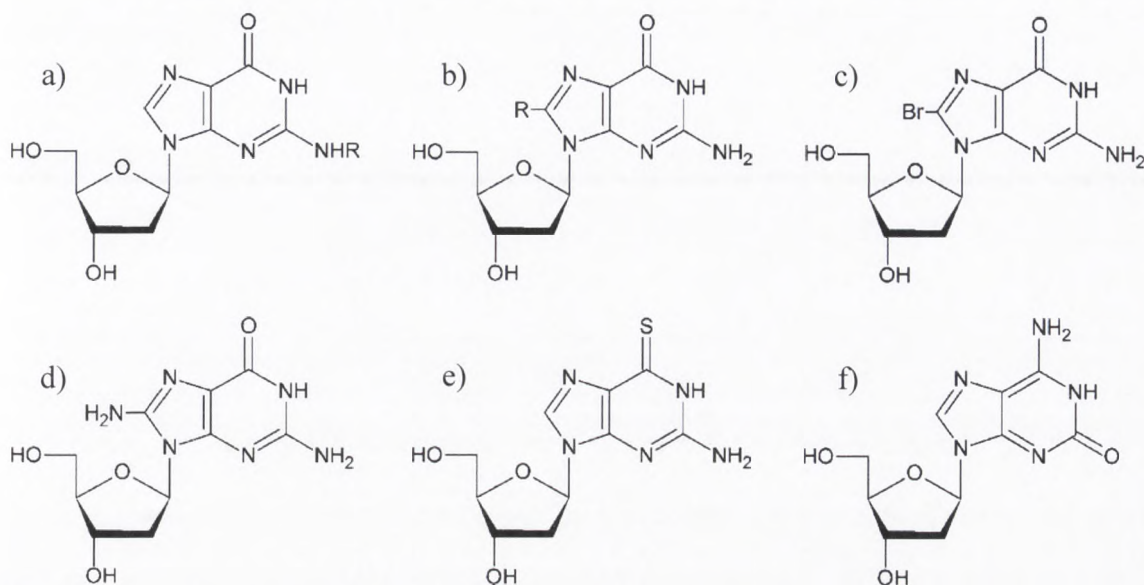
4.2 Modyfikacje TBA

Aptamer wiążący trombinę ze względu na szybkość i odwracalność działania oraz zdolność inhibicji aktywności trombiny związanej z fibryną stał się obiektem zainteresowania naukowców jako potencjalny lek antykoagulacyjny. Choć badania przeprowadzone na zwierzęcych modelach chorób układu krążenia były obiecujące i TBA poddano I fazie badań klinicznych to jednak zbyt wysokie dawki konieczne do uzyskania długotrwałego efektu leczniczego skłoniły badaczy do zaprzestania przeprowadzania testów na pacjentach [81, 114]. Mając na uwadze korzystne właściwości aptameru rozpoczęto próby poprawy jego parametrów farmakokinetycznych, takich jak powinowactwo do trombiny, okres półtrwania w osoczu oraz stabilność termodynamiczna poprzez wprowadzenie różnych modyfikacji reszt nukleotydowych. Wśród nich można wyróżnić zmiany dotyczące części zasadowej oraz cukrowej reszt nukleotydowych, wiązania 5'-3' fosfodiesterowego oraz struktury TBA.

Przez modyfikację części zasadowej reszt nukleotydów rozumiane jest podstawienie już istniejącej lub wprowadzenie nowej grupy funkcyjnej do pierścienia zasady heterocyklicznej oraz substytucję inną puryną (tranzycja) lub pirymidyną (transwersja). Najczęściej zmiany w szkielecie TBA dotyczą wprowadzenia pochodnych reszt 2'-deoksyguanozyny. Ten nukleotyd składający się z guaniny, zbudowanej z dwóch pierścieni heterocyklicznych, zawiera kilka potencjalnych miejsc modyfikacji. G. He i współpracownicy zbadali wpływ obecności N^2 -alkilguaniny



na aktywność TBA [115]. Wspomniana zasada heterocykliczna zawiera dodatkową grupę alkilową (Rys. 7a). Zaobserwowano zwiększenie właściwości antytrombinowych aptameru, gdy modyfikacja znajdowała się w pozycji G⁶ i G¹¹. Na tej podstawie autorzy



Rysunek 7. Wzory strukturalne: a) 2'-deoksy-N²-alkiloguanozyny; b) 2'-deoksy-8-alkiloguanozyny; c) 2'-deoksy-8-bromoguanozyny; d) 2'-deoksy-8-aminoguanozyny; e) 2'-deoksy-6-tioguanozyny; f) 2'-deoksy-izoguanozyny.

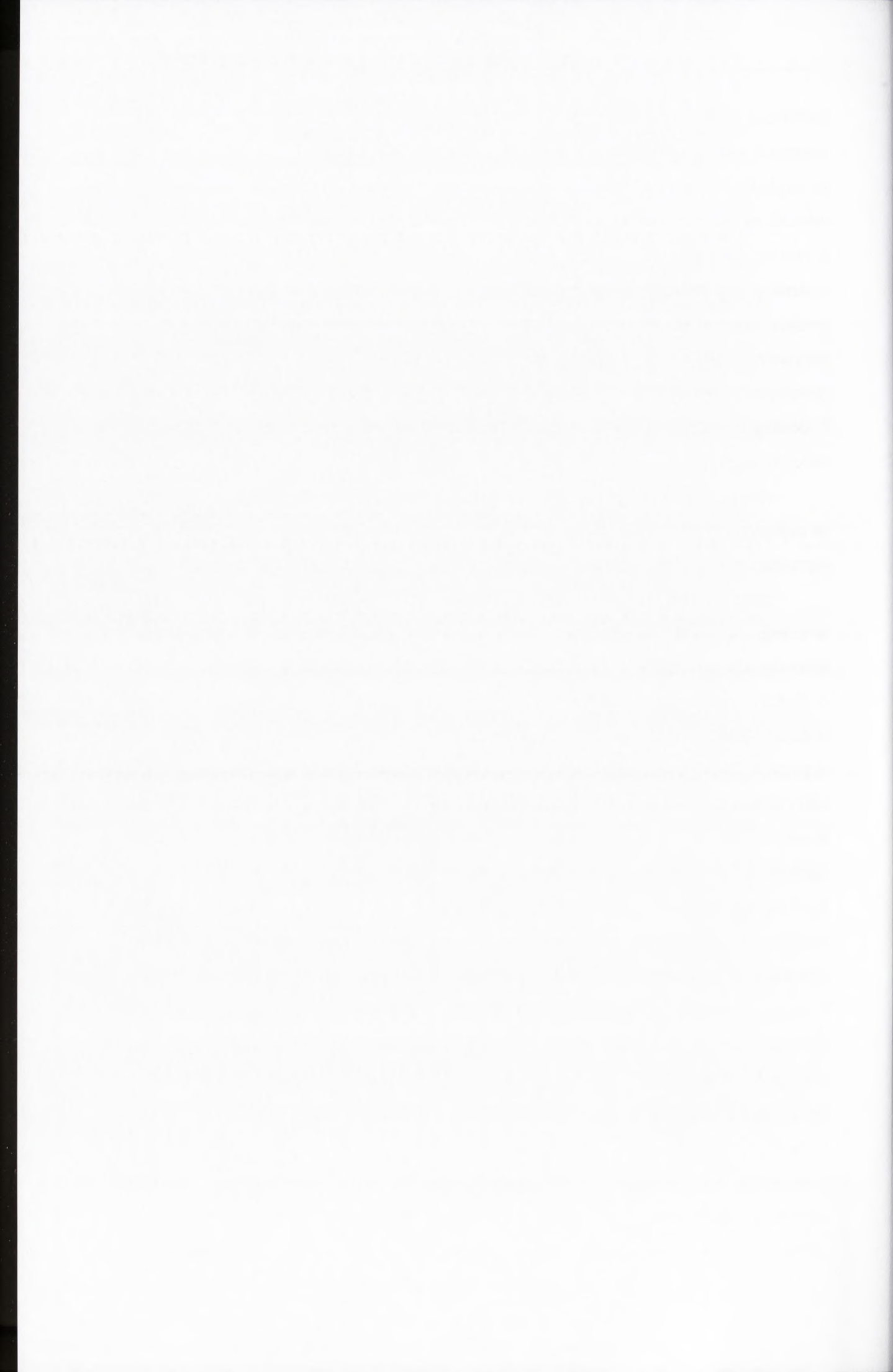
postawili tezę, że są to miejsca bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z trombiną. Grupy alkilowe wprowadzono również w pozycję C8 pierścienia guaniny (Rys. 7b). Zaobserwowano wzrost aktywności antytrombinowej badanego aptameru poprzez stabilizację reszt guanozyny w konformacji *syn* [115]. Podobny efekt uzyskano poprzez wprowadzenie w pozycję G¹ i G¹⁰ aptameru 2'-deoksy-8-bromoguanozyny (8-BrdG), która zawiera atom bromu (Br) w pozycji C8 (Rys. 7c) [116]. Stabilizacja konformacji *syn* wiązania N-glikozydowego jest spowodowana zawadą przestrzenną indukowaną obecnością atomu bromu. Warianty TBA posiadające modyfikowane reszty nukleozydowe 8-BrdG odznaczały się nie tylko niższymi wartościami stałej dysocjacji aptamer-trombina (K_d), ale także wyższą stabilnością termodynamiczną. W literaturze opisano również substytucję reszt guanozyny w pozycji G² aptameru resztami guanozyny zawierającymi grupę aminową w pozycji C8 (Rys. 7d) [117]. Zaobserwowano destabilizujący wpływ tej modyfikacji na strukturę TBA najprawdopodobniej poprzez osłabienie oddziaływań warstwowych w cząsteczce kwadrupleksu. Kolejnym testowanym modyfikowanym nukleozydem była 2'-deoksy-6-tioguanozyna, która w pozycji 6 pierścienia zasady azotowej posiada atom siarki zamiast tlenu (Rys. 7e) [118]. Substytucja tą pochodną powoduje obniżenie



stabilności termodynamicznej analizowanego aptameru poprzez zaburzenie poprawnego tworzenia wiązań wodorowych typu Hoogsteen'a w G-tetradach. Co więcej, atom siarki ze względu na większy promień jonowy oraz mniejszą elektrojemność wpływa również na osłabienie oddziaływań z cząsteczkami wody oraz jonami metali. Niezwykle korzystne dla zdolności wiązania trombiny przez TBA okazało się wprowadzenie reszt 2'-deoksy-izoguanozyny do rdzenia aptameru [119]. Jest to pochodna guanozyny, która posiada atom tlenu w pozycji C2 oraz grupę aminową w pozycji C6 pierścienia purynowego (Rys. 7f). Warianty zawierające powyższą modyfikację odznaczały się znacznym obniżeniem wartości K_d . W przypadku umiejscowienia 2'-deoksy-izoguanozyny w pozycji G⁸ TBA odnotowano dwukrotny spadek wartości stałej dysocjacji.

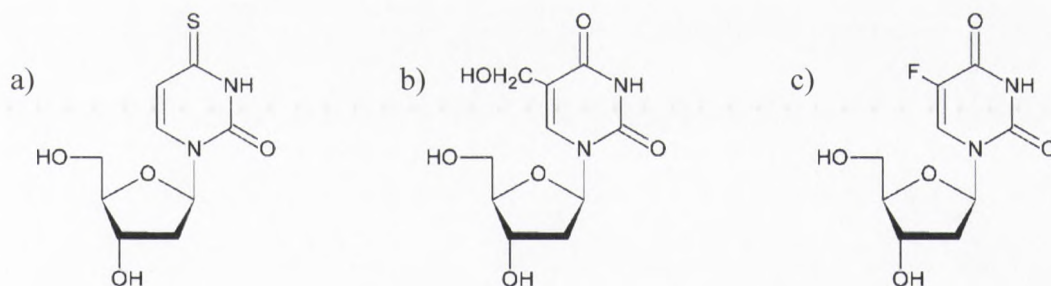
Biorąc pod uwagę powyższe dane literaturowe można było stwierdzić, że najkorzystniejsze dla poprawy właściwości antykoagualcyjnych TBA jest wprowadzenie modyfikacji reszty guanozyny w pozycje G¹, G⁶, G⁸ i G¹⁰ aptameru.

Drugą grupę związków wprowadzanych do cząsteczki aptameru wiążącego trombinę w celu zwiększenia jej aktywności biologicznej oraz parametrów termodynamicznych stanowią pochodne tymidyny. Modyfikacją reszty nukleozydowej o dobrze opisanych i udowodnionych właściwościach zwiększających zdolność wiązania białka jest 2'-deoksy-4-tiourydyna, która posiada atom siarki zamiast tlenu w pozycji C4 (Rys. 8a) [120, 121]. S. Raviv wraz ze współpracownikami zbadał jaki efekt można uzyskać poprzez wprowadzenie reszt powyższego nukleozydu w wybrane pozycje TBA [122]. Zaobserwował, że szczególnie korzystny wpływ na zdolność inhibicji indukowanego przez trombinę tworzenia się skrzepów oraz aktywacji płytek krwi ma wprowadzenie tej modyfikacji w miejsca T³, T⁷, T⁹ i T¹³ aptameru. Co więcej, warianty TBA zawierające reszty 2'-deoksy-4-tiourydyny odznaczały się większą odpornością na hydrolizę wiązania internukleotydu nukleazami komórkowymi. Kolejną testowaną pochodną tymidyny była 2'-deoksy-5-hydroksymetylourydyna (5-HmU), która w swojej budowie posiada dodatkową grupę hydroksymetylową w pozycji C5 pierścienia urydyny (Rys. 8b) [123]. Autorzy stworzyli warianty TBA posiadające pojedyncze podstawienia resztami 5-HmU w miejscach występowania reszt tymidyny. Zaobserwowali, że powyższa modyfikacja nie wpływa na topologię fałdowania omawianego G-kwadrupleksu. Co więcej, skierowane na zewnątrz cząsteczki aptameru grupy hydroksymetylowe zwiększają liczbę stabilizujących oddziaływań z otaczającymi cząsteczkami wody. W teście fibrynogenowym



zaobserwowano obniżenie właściwości antykoagulatoryjnych badanych wariantów. Co ciekawe, analogi TBA posiadające modyfikację 5-HmU w pozycji T³, T⁷, T⁹ odznaczały się zdolnością wydłużenia czasu protrombinowego w stosunku do niemodyfikowanego aptameru. Może to świadczyć o wpływie innych, dotąd niezidentyfikowanych składników osocza krwi na właściwości antykoagulatoryjne aptameru wiążącego trombinę. Jedną z nielicznych modyfikacji, której wprowadzenie w pozycje T⁴ i T¹⁴ wpływa na zwiększenie właściwości antykoagulatoryjnych TBA jest 2'-deoksy-5-fluorourydyna (5-FU) [124]. Nukleozyd ten posiada atom fluoru w pozycji C5 pierścienia urydyny (Rys. 8c). Pojedyncza substytucja 5-FU w miejscach występowania tymidyny w łańcuchu TBA zwiększa stabilność termodynamiczną analizowanych wariantów.

Na podstawie dostępnych danych literaturowych można sformułować dwa podstawowe wnioski: wprowadzenie modyfikacji części zasadowej w pozycje T³, T⁷, T¹² aptameru jest korzystne termodynamicznie i ma wpływ na wzrost jego aktywności antykoagulatoryjnych, natomiast substytucja w miejscach T⁴ i T¹³ powoduje spadek zdolności inhibicji poziomu aktywności trombiny oraz obniżenie trwałości termodynamicznej badanych wariantów. Duży wpływ na topologię fałdowania

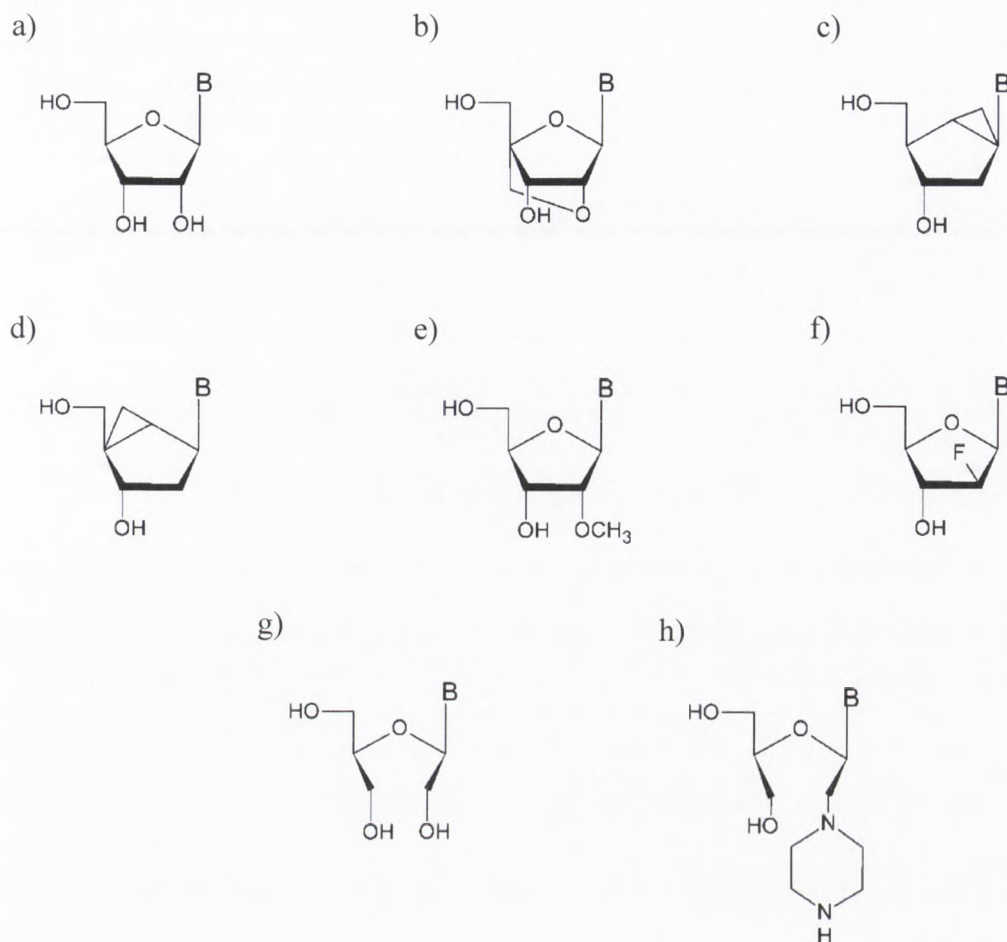


Rysunek 8. Wzory strukturalne: a) 2'-deoksy-4-tiourydyny; b) 2'-deoksy-5-hydroksymetylourydyny; c) 2'-deoksy-5-fluorourydyny.

aptameru wiążącego trombinę ma konformacja części cukrowej budujących go reszt nukleozydów. Grupa badawcza pod kierunkiem R. Shafera dowiodła poprawności powyższego stwierdzenia badając wpływ wielokrotnego lub całkowitego podstawienia reszt 2'-deoksyguanozyny jej odpowiednikiem RNA (Rys. 9a) [126]. Ryboza występuje w konformacji *C3'-endo*, co równocześnie wymusza przyjęcie przez zasadę azotową rybonukleozydu ułożenia *anti* względem wiązania N-glikozydowego. Wprowadzenie reszt guanozyny w pozycje TBA, w których wymagana była konformacja *syn* nukleozydów (G¹, G⁵, G¹⁰, G¹⁴) zaburzało topologię fałdowania omawianego aptameru

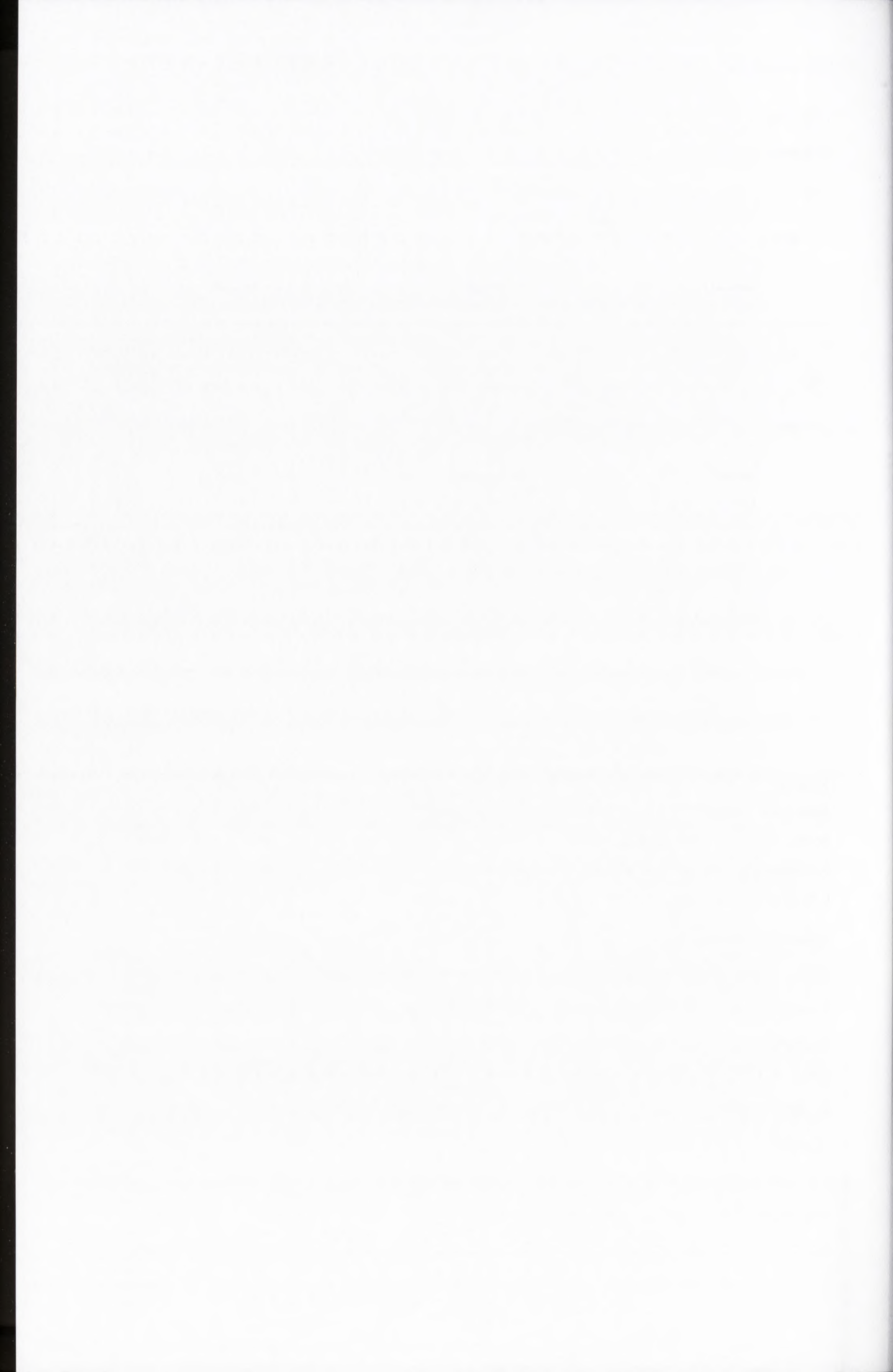


i wpłynęło na zmianę charakteru jego struktury na międzycząsteczkowy, równoległy G-kwadrupleks. Powyższe warianty TBA, w porównaniu do niemodyfikowanego

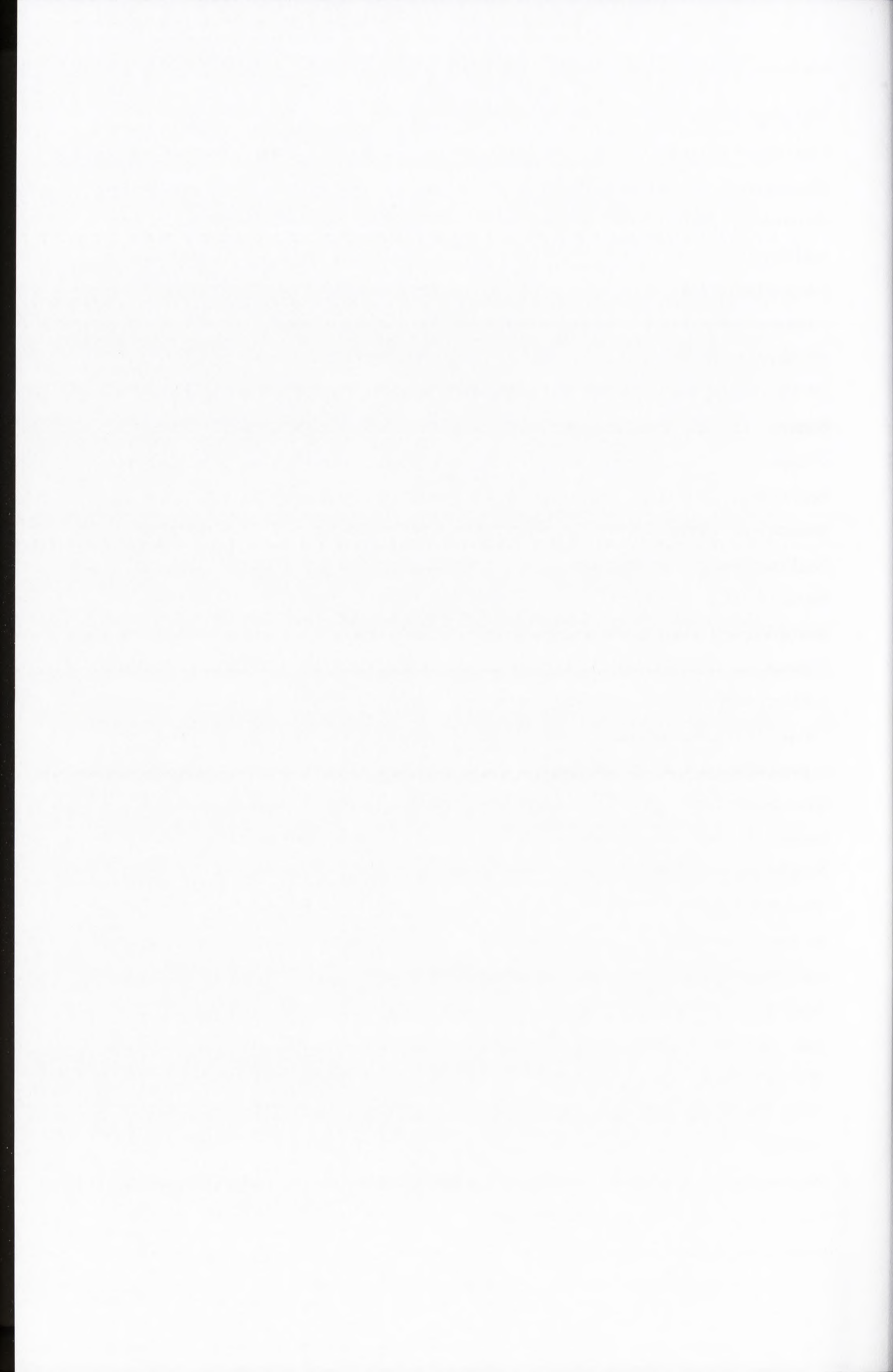


Rysunek 9. Wzory strukturalne: a) rybonukleozydu; b) nukleozydu o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (LNA); c) metanokarbanukleozydu typu North; d) metanokarbanukleozydu typu South; e) 2'-O-metylorybonukleozydu; f) 2'-deoksy-2'-fluoro-D-arabinonukleozydu; g) nukleozydu o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (UNA); h) 2'-C-piperazynonukleozydu o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (2'-piperazyno-UNA).

aptameru, odznaczały się niższą, zależną od stężenia stabilnością termodynamiczną [125, 126]. Podobny efekt uzyskano poprzez wprowadzenie reszt nukleozydów o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (LNA, ang. *locked nucleic acids*) posiadających mostek metylenowy pomiędzy atomami O2' i C4' pierścienia rybozy (Rys. 9b) [127]. Także w tym przypadku konsekwencje podstawienia modyfikowanymi resztami nukleozydowymi typu LNA były zależne od jej umiejscowienia w aptamerze. Warianty TBA całkowicie podstawione omawianymi resztami nukleozydowymi lub zawierające je w miejscu G¹ nie były ustrukturalizowane oraz odznaczały się obniżonymi właściwościami biologicznymi, co może być związane z usztywnieniem łańcucha oligomeru. Najkorzystniejsze dla zachowania topologii fałdowania aptameru



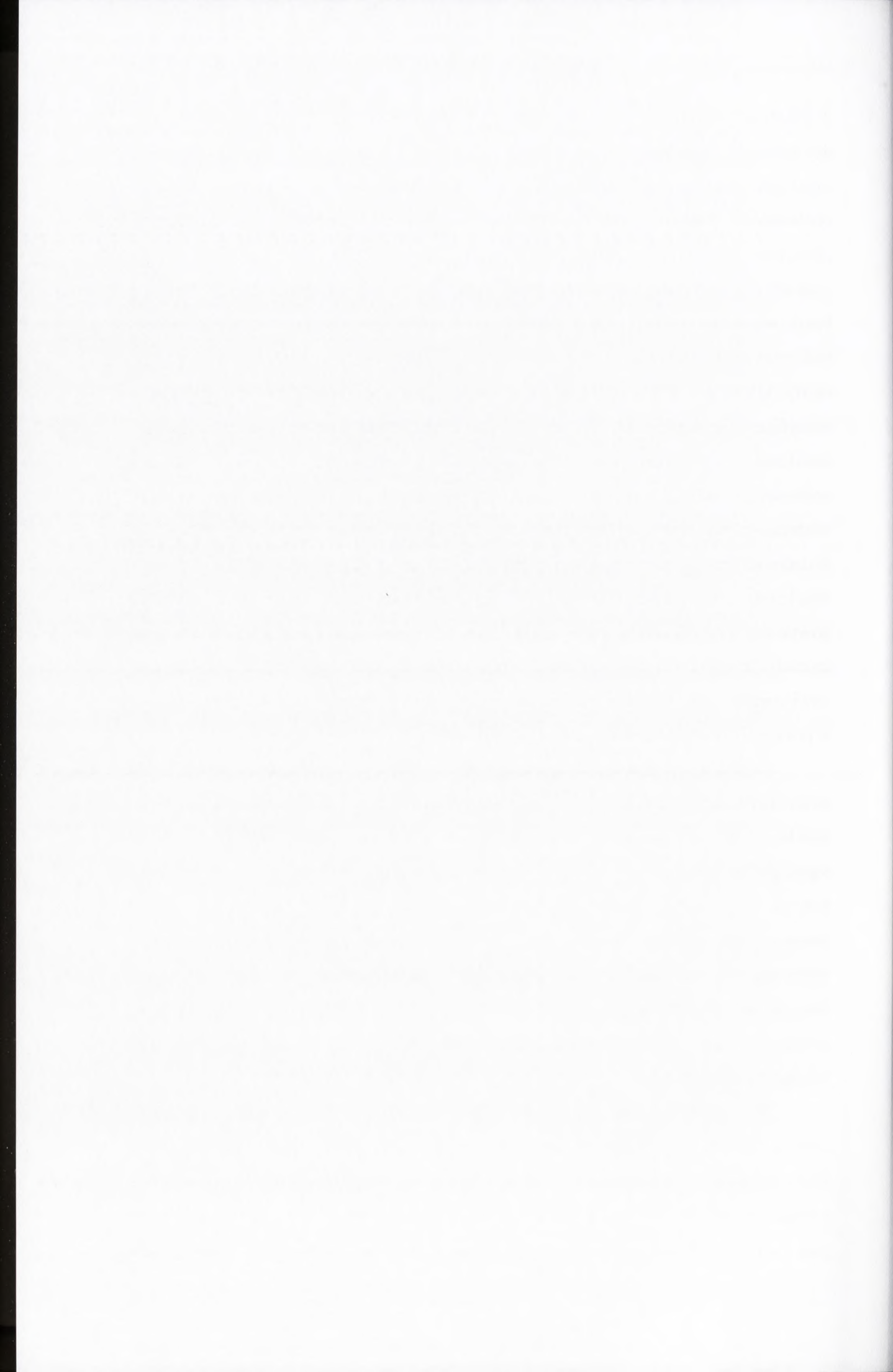
wiążącego trombinę okazało się wprowadzenie modyfikacji typu LNA w pozycję G¹⁵ tego oligonukleotydu. Co więcej, w pracy autorstwa L. Bonifacio i współpracowników udowodniono, że jest możliwe uzyskanie wariantów TBA z zachowaną częściową aktywnością biologiczną w przypadku, gdy dokonano substytucji resztami nukleotydowymi w serii LNA w miejscu G² i T⁴ aptameru [128]. H. Saneyoshi i współpracownicy wykonali serię niezwykle interesujących eksperymentów z zastosowaniem reszt metanokarbonukleozydów, zawierających modyfikowane, bicykliczne reszty pseudocukrowe o ściśle zdefiniowanej konformacji North (N, Rys. 9c) lub South (S, Rys. 9d) pozbawione atomu tlenu O4' [129]. Ta specyficzna budowa narzuca również zdefiniowaną konformację wiązania glikozydowego: w cząsteczce o konformacji N (C3'-endo) reszty pseudocukrowej przyjmuje ono konformację *anti*, natomiast w przypadku S (C2'-endo) konformację *syn*. Autorzy postanowili zbadać wpływ konformacji reszty pseudocukrowej oraz wiązania N-glikozydowego na stabilność termodynamiczną i strukturę TBA. W tym celu stworzyli serię wariantów posiadających pojedyncze podstawienie opisywanymi modyfikacjami reszt nukleozydowych w pozycjach G⁵, G¹⁰, G¹⁴ i G¹⁵ aptameru. Największą destabilizację struktury zaobserwowano w przypadku, gdy reszty nukleozydowe różniły się od pierwotnych konformacją części pseudocukrowej i wiązania N-glikozydowego. Nieco mniejszy, lecz nadal znaczący efekt odnotowano w przypadku zmiany konformacji *anti* na *syn*. Najmniejszy wpływ na stabilność termodynamiczną badanych wariantów miała ingerencja w ułożenie części pseudocukrowej (S-N). Powyższe badania potwierdziły, że to konformacja wiązania N-glikozydowego ma decydujące znaczenie dla zachowania struktury oraz stabilności termodynamicznej TBA. Również wprowadzenie reszt 2'-O-metyloguanozyny (Rys. 9e) do rdzenia aptameru wiążącego trombinę powodowało obniżenie wartości parametrów termodynamicznych oraz zmiany strukturalne i konformacyjne [126]. Jedną z niewielu modyfikacji pierścienia 2'-deoksyrybozy zwiększającą stabilność termodynamiczną oraz aktywność biologiczną TBA jest 2'-deoksy-2'-fluoro-D-arabinonukleozyd (2'-FaraN), który posiada atom fluoru w pozycji C2' pierścienia arabinozy (Rys. 9f) [130]. Część cukrowa tego nukleozydu przyjmuje konformację C2'-endo. 2'-FaraN zwiększa odporność oligonukleotydów na hydrolizę nukleazami komórkowymi. Wprowadzenie powyższej modyfikacji w miejsca występowania reszt guanozyn znajdujących się w konformacji *anti* powodowało wzrost stabilności biologicznej oraz temperatury topnienia aptameru o ok. 3°C. Co więcej, warianty TBA posiadające



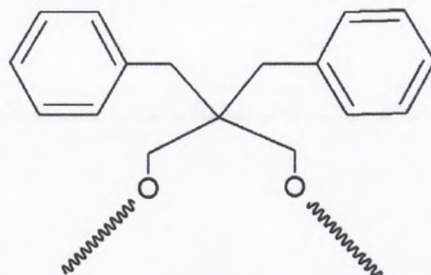
2'-FaraN w pozycji G¹³ i G¹⁴ odznaczały się czterokrotnym wzrostem powinowactwa do cząsteczki trombiny. W każdym z powyższych przypadków zachowana była topologia struktury G-kwadrupleksu. Równie korzystny efekt daje wprowadzenie reszt pochodnych kwasów nukleinowych o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (UNA, ang. *unlocked nucleic acid*). Monomer UNA odznacza się większą elastycznością względem niemodyfikowanego odpowiednika, co jest skutkiem braku wiązania pomiędzy atomami C2' i C3' pierścienia rybozy (Rys. 9g). Grupa badawcza pod kierunkiem J. Wengela zbadała wpływ pojedynczego wprowadzenia reszty UNA do TBA [131]. Zaobserwowali oni, że umiejscowienie powyższej modyfikacji w pozycji T³, T⁷ oraz T¹² aptameru miało korzystny wpływ na jego stabilność termodynamiczną. Co więcej, wariant TBA zawierający pojedyncze podstawienie resztą urydyny typu UNA w pozycji T⁷ odznaczał się lepszymi właściwościami antykoagulacyjnymi niż niemodyfikowana cząsteczka. Obecność dodatkowej grupy piperazynowej w pozycji C2' modyfikacji typu UNA (Rys. 9h) zwiększyła właściwości stabilizacyjne tej pochodnej RNA [132]. Wprowadzenie powyższej modyfikacji w wybrane pozycje TBA wpłynęło korzystnie na trwałość termodynamiczną G-kwadrupleksu. Zmiana ta jednak powodowała obniżenie powinowactwa do trombiny i jedynie wariant zawierający 2'-C-piperazyno-UNA-U w pozycji T⁷ posiadał zbliżoną do TBA wartość K_d.

Uogólniając, przedstawione dane literaturowe wskazują, że wprowadzenie modyfikacji części cukrowej w większości przypadków powoduje znaczne obniżenie stabilności termodynamicznej oraz aktywności biologicznej, a także może zaburzać topologię fałdowania TBA. Szczególnie negatywny wpływ mają zmiany dotyczące pozycji zajmowanych przez reszty guanozyn biorących udział w tworzeniu G-tetrad stanowiących szkielet omawianego aptameru. Jedną z nielicznych substytucji wpływających korzystnie na parametry termodynamiczne oraz aktywność antykoagulacyjną TBA jest wprowadzenie reszt nukleozydowych UNA. Jednakże w tym przypadku obserwowany efekt ściśle zależy od lokalizacji substytucji w cząsteczce aptameru.

M. Scutto wraz ze współpracownikami przeprowadzili niezwykle interesujące badania nad wpływem pojedynczego podstawienia reszty nukleozydowej jednej z pętli TBA łącznikiem dibenzylowym (Rys. 10) [133]. Konsekwencją wprowadzenia powyższej modyfikacji było znaczne obniżenie właściwości antykoagulacyjnych TBA, przy czym nie zaburzała ona struktury omawianego kwadrupleksu oraz nie wpływała



w sposób znaczący na jego stabilność termodynamiczną. Co ciekawe, powyższe warianty TBA odznaczały się zdolnością inhibicji wzrostu linii komórkowej raka szyjki macicy *HeLa*. Warianty odznaczające się najlepszymi właściwościami antyproliferacyjnymi posiadały modyfikację w pozycji T⁴, T¹³ oraz G⁷ TBA.

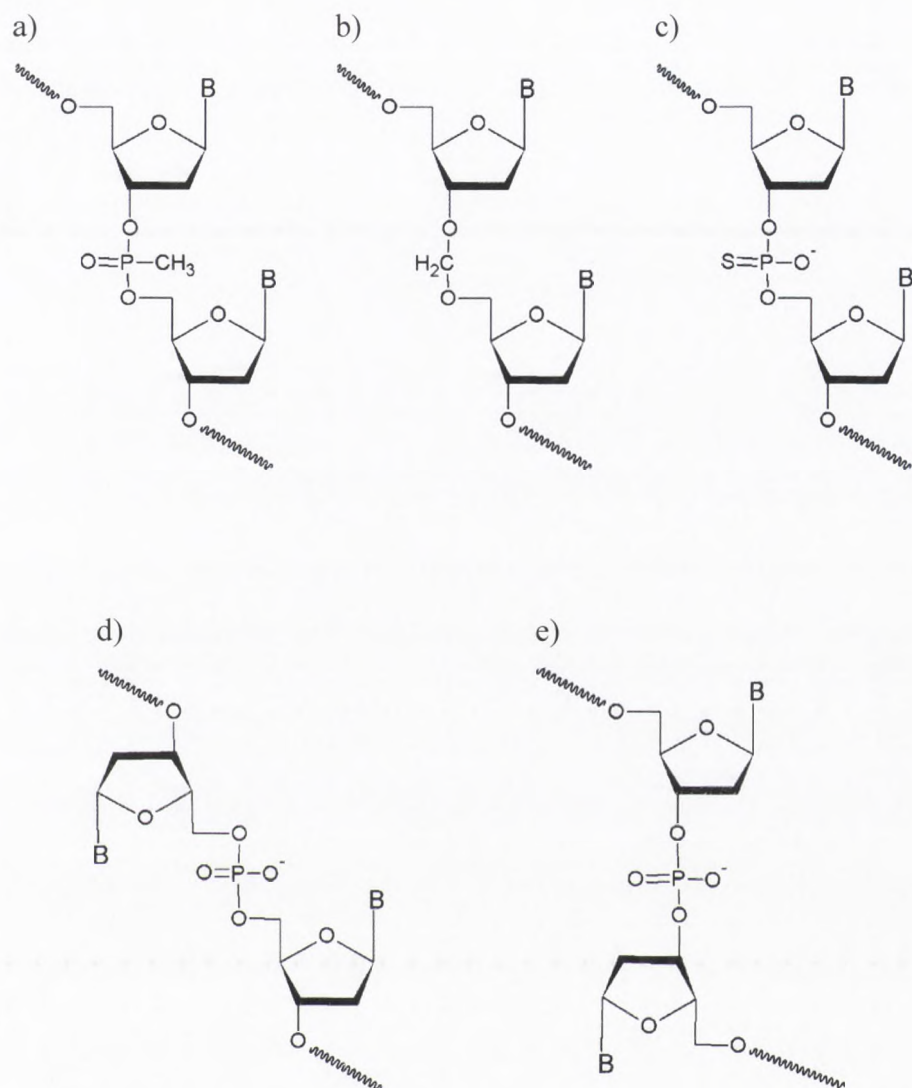


Rysunek 10. Wzór strukturalny łącznikiem dibenzylowego.

Podjęto również próbę poprawy właściwości termodynamicznych oraz biologicznych TBA poprzez modyfikację wiązania internukleotydowego. Wprowadzenie wiązania metylofosfonianowego, w którym jeden atom tlenu zastąpiono grupą metylową (Rys. 11a), wywierało silnie destabilizujący wpływ na strukturę omawianego G-kwadrupleksu [126]. Było to związane ze zmniejszeniem stopnia hydratacji cząsteczki TBA, wynikającym z braku obecności kluczowego komponenta zaangażowanego w tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy resztami zasady azotowej, cukrowej oraz otaczającymi cząsteczkami wody. Zmniejszenie ujemnego ładunku wiązania 5'-3' fosfodiesterowego w szkielecie TBA może wpłynąć na poprawę jego aktywności biologicznej poprzez wydłużenie okresu półtrwania ($T_{1/2}$). Głównym czynnikiem odpowiadającym za wielkość parametru $T_{1/2}$ jest efektywność wnikania oligonukleotydów do komórek, które zachodzi na drodze endocytozy kierowanej receptorami. Im bardziej ujemny ładunek cząsteczki, tym krótszym czasem półtrwania się ona charakteryzuje. G. He wraz ze współpracownikami przebadał wpływ pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia wiązania 5'-3' fosfodiesterowego formacetalem (Rys. 11b) na poziom aktywności antykoagulacyjnej TBA [134]. W badaniach *in vitro* (określenie czasu protrombinowego), powyższa substytucja generalnie nie wpływała na właściwości biologiczne badanego aptameru z wyjątkiem przypadku, gdy zmiana dotyczyła pozycji T⁴-G⁵ oraz T¹³-G¹⁴. W badaniach *in vivo*, przeprowadzanych na małpach, naukowcy zaobserwowali wzrost właściwości antykoagulacyjnych badanych wariantów TBA, co można pośrednio powiązać z obniżeniem poziomu efektywności endocytozy indukowanego zmianą ładunku



cząsteczki aptameru. Nie tylko zmniejszenie ujemnego charakteru wiązania 5'-3'



Rysunek 11. Schemat modyfikacji wiązania 5'-3' fosfodiesterowego: a) wiązanie metylofosfonianowe; b) wiązanie formacetalowe; c) wiązanie tiofosforanowe, d) wiązanie o zmienionej polarności (5'-5'), e) wiązanie o zmienionej polarności (3'-3').

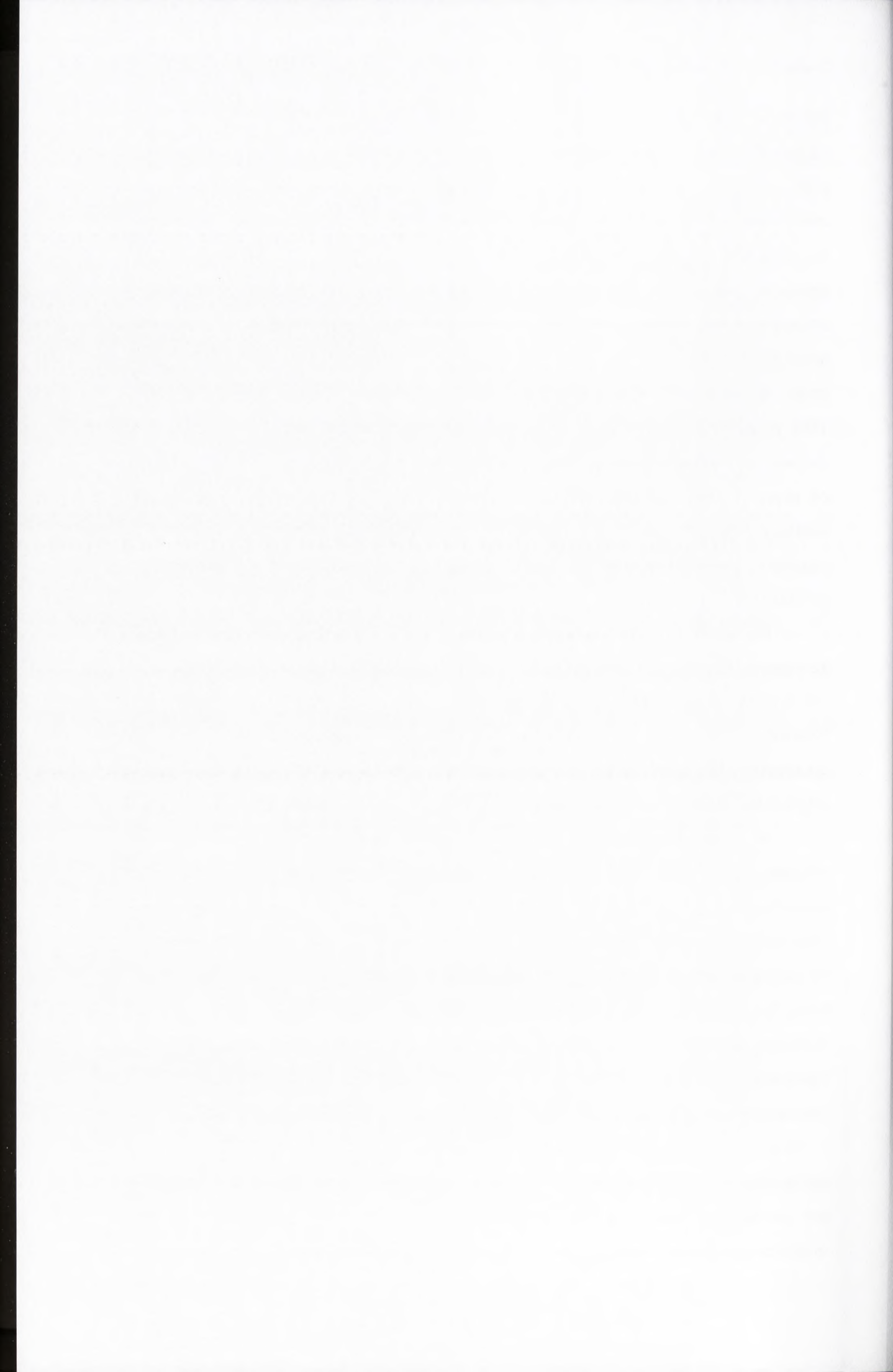
fosfodiesterowego, ale również wielkość promienia jonowego budujących je atomów wpływa na zachowanie przez TBA charakteru antyrównoległego, wewnątrzcząsteczkowego kwadrupleksu. Wprowadzenie do rdzenia G-tetrad wiązania tiofosforanowego, charakteryzującego się substytucją tlenu atomem siarki (Rys. 11c), destabilizuje strukturę omawianego aptameru [126]. Co ciekawe, powyższa modyfikacja nie zaburza topologii fałdowania TBA. Obok stabilności termodynamicznej, aktywności biologicznej oraz krótkiego okresu półtrwania degradacja przez nukleazy komórkowe jest kolejnym ważnym problemem, którego rozwiązanie zwiększyłyby szanse na zastosowanie TBA w celach terapeutycznych.



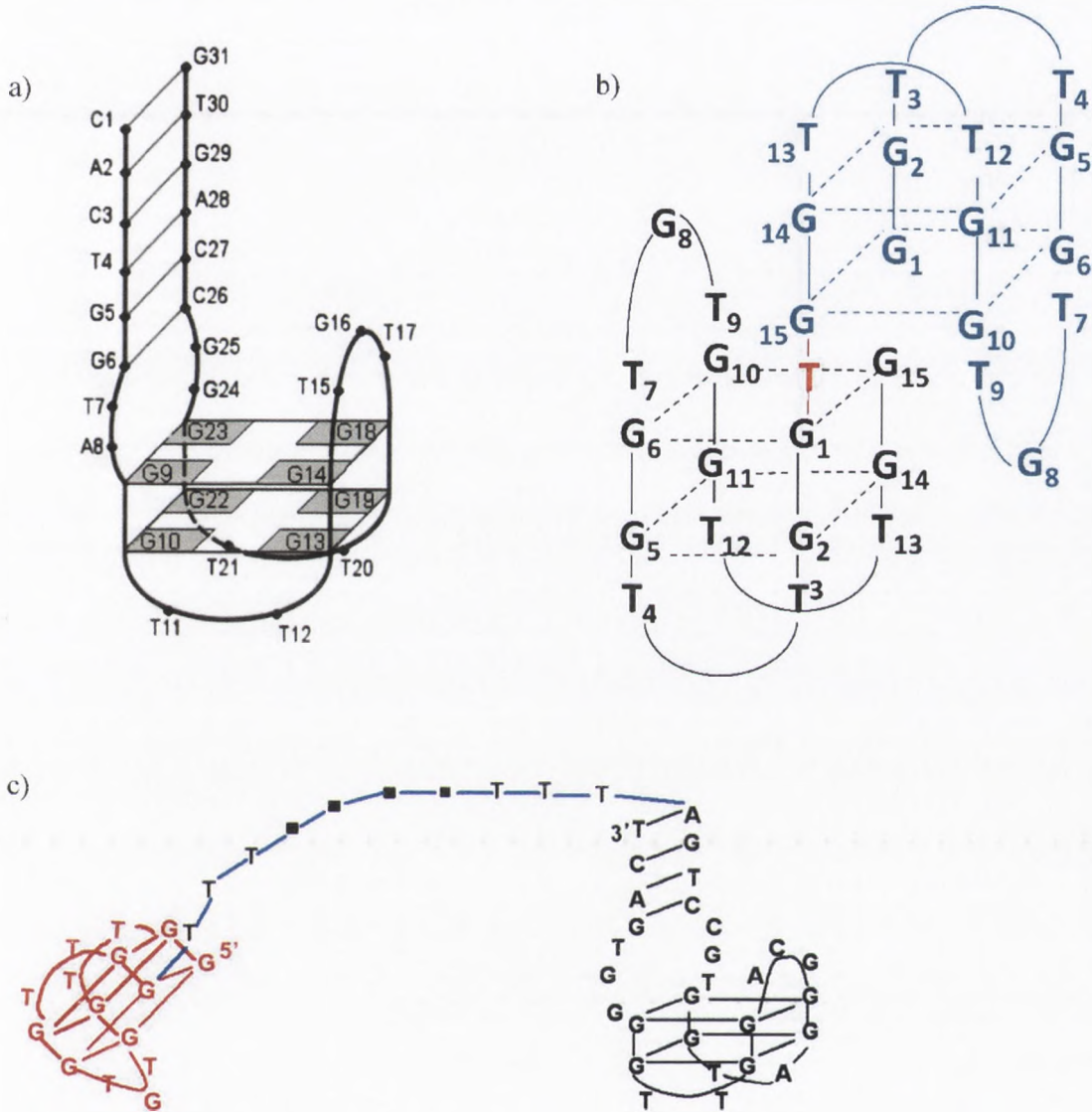
Działanie egzonukleaz polega na odłączeniu pojedynczej reszty nukleozydowej od końca 5' lub 3' oligonukleotydu w wyniku hydrolizy wiązania 5'-3' fosfodiesterowego [135, 136]. L. Martino wraz ze współpracownikami postanowili podjąć próbę zwiększenia odporności TBA na degradację nukleazami poprzez reorientację polarności wiązania internukleotydu (5'-5') między resztami tymidyny w pozycji T³ i T⁴ aptameru (Rys. 11d) [137]. Wprowadzenie powyższej modyfikacji spowodowało zmianę topologii fałdowania kwadrupleksu, przy jednoczesnym zwiększeniu stabilności termodynamicznej oraz nieznacznym obniżeniu aktywności biologicznej. Ta sama grupa badawcza określiła również wpływ równoczesnego dodania na każdym końcu TBA pojedynczej reszty nukleozydowej oraz zmiany polarności wiązania pomiędzy dwoma terminalnymi pozycjami aptameru (od strony 5' wprowadzono wiązanie 5'-5', od strony 3' wprowadzono wiązanie 3'-3', Rys. 11e) [138]. Uzyskano w ten sposób warianty odznaczające się zwiększoną odpornością na enzymatyczną hydrolizę wiązania internukleotydu, stabilnością termodynamiczną oraz znaczącym powinowactwem względem trombiny.

Na podstawie powyższego przeglądu literatury możliwe było stwierdzenie, że wprowadzenie modyfikacji wiązania internukleotydu w większości przypadków nie zmienia lub powoduje obniżenie właściwości antykoagulacyjnych wariantów TBA. Niekiedy obserwowano zwiększenie stabilności termodynamicznej badanych aptamerów oraz wydłużenie ich okresu półtrwania w osoczu w wyniku zwiększenia odporności na cięcie nukleazami komórkowymi.

W toku poszukiwania nowych analogów aptameru wiążącego trombinę, odznaczających się większym powinowactwem do docelowego białka oraz specyficznością działania, podjęto próbę stworzenia dłuższych konstruktów oligonukleotydujących, których trzon stanowiła sekwencja TBA. K. Ikebukuro wraz ze współpracownikami stworzył 31 nukleotydujący aptamer DNA, nazywany RE31, który był zbudowany z G-kwadrupleksu (sekwencja TBA, 15 nt) i dupleksu (6 nt) połączonych dwunukleotydującym, niesparowanym fragmentem DNA (Rys. 12a) [139]. Opisująca cząsteczka charakteryzowała się zdolnością dwukrotnego wydłużenia czasu protrombinowego w porównaniu do TBA. Potwierdzono, że RE31 poprzez wiązanie się z miejscem zewnętrznym I trombiny powoduje inhibicję tworzenia fibryny oraz agregacji płytek krwi [140, 141]. Co ciekawe, w badaniach strukturalnych wykluczono, aby przyłączenie fragmentu dwuniciowego zbudowanego z 6 par zasad do trzonu TBA w istotny sposób zaburzało topologię fałdowania tej cząsteczki [142]. Biorąc po uwagę



powyższe fakty V. Spiridonova wraz ze współpracownikami postanowił podjąć próbę określenia optymalnej długości części helikalnej RE31, tak by wypracować pewne ogólne zasady użyteczne przy projektowaniu podobnych związków [143]. Naukowcy



Rysunek 12. Schemat struktury: a) RE31 [142]; b) RA36; c) HD22 [144].

zaobserwowali, że choć dodanie kilku reszt nukleozydowych tworzących dupleks na końcach cząsteczki TBA wpływa korzystnie na jej aktywność biologiczną to efekt ten jest widoczny dopiero przy wprowadzeniu co najmniej 4 par nukleotydocowych. Najniższą, kilkakrotnie mniejszą od TBA, wartość parametru K_d uzyskano dla RE31 posiadającego dupleks o długości 6 par zasad. Poza dodawaniem kilku reszt nukleozydocowych na każdym z końców aptameru wiążącego trombinę, stworzono również 31-nukleotydocowy koniugat składający się z dwóch, połączonych wiązaniem kowalencyjnym (Rys. 12b), cząsteczek TBA, występujący pod nazwą RA-36



[145-147]. Wykazywał on zbliżoną do RE31 aktywność antykoagulatoryjną, jednak jak dotąd brakuje danych literaturowych informujących o dokładnej strukturze przestrzennej tego związku oraz modelu oddziaływania z białkiem docelowym. Niemalże równocześnie grupa badawcza pod kierunkiem K. Ikebukuro'a zsyntetyzowała kilka koniugatów składających się z sekwencji TBA połączonej łącznikiem poli(dT) z innym 29-nukleotydowym aptamerem (HD22; Rys. 12c) zdolnym do inhibicji aktywności trombiny [144]. Każda z części rozpoznawała i wiązała się z innym fragmentem enzymu: pierwszy z miejscem zewnętrznym I, drugi miejscem zewnętrznym II. Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono, że powyższy koniugat nie tylko odznacza się wyższym powinowactwem do cząsteczki trombiny, ale również lepszymi w porównaniu do wyjściowych cząsteczek właściwościami antykoagulatoryjnymi.

4.3 Potencjalne zastosowania TBA

Aptamer wiążący trombinę został odkryty głównie w celu inhibicji aktywności trombiny, przez co może stanowić potencjalny lek przeciwzakrzepowy, będący doskonałą alternatywą dla aktualnie stosowanych antykoagulantów. Naukowcy podejmują wytężone próby poprawy właściwości TBA dążąc do wydłużenia jego okresu półtrwania w organizmie i powinowactwa do cząsteczki docelowej, czyniąc perspektywę użycia omawianego oligonukleotydu jako terapeutyku jeszcze bliższą [71, 119, 122]. Ponadto, aptamer wiążący trombinę ze względu na łatwość syntezy oraz niewielki rozmiar stanowi doskonały model badawczy do określania wpływu rozmaitych modyfikacji na strukturę oraz stabilność G-kwadrupleksów.

Podstawowe cechy aptameru wiążącego trombinę takie jak wysoka swoistość działania oraz zdolność wiązania trombiny w bardzo niskich stężeniach skłoniły naukowców do podjęcia próby wykorzystania omawianego oligonukleotydu jako elementu wysoce specyficznych systemów detekcji czynnika IIa (aptasensorów). Jednymi z pierwszych, którzy podjęli się tego zadania była grupa badawcza pod kierunkiem D.R. Walta [148]. W opublikowanej w 2000 roku pracy prezentują oni mikromacierze składające się z cząsteczek TBA unieruchomionych kowalencyjnie na powierzchni mikrokulek, które umieszczono w studzienkach optycznych włókien. Stosowana w tym eksperymencie trombina posiadała znacznik fluorescencyjny, a detekcja sygnału odbywała się przy zastosowaniu kamery CCD (ang. *charge-coupled device*). Co ciekawe, na zasadzie kompetencyjnego wiązania możliwe okazało się także



oznaczenie stężenia nieznakowanego enzymu. Grupa M. Santona również wykorzystała aptamer wiążący trombinę do stworzenia narzędzia umożliwiającego detekcję trombiny w roztworze [149]. W tym celu zaprojektowano oligomer zawierający sekwencję TBA w ten sposób, by cząsteczka ta przyjmowała strukturę spinki, posiadając jednocześnie na końcu 5' sześć dodatkowych reszt nukleozydowych i znacznik fluorescencyjny oraz wygaszacz fluorescencji od strony 3'. Obecność trombiny w roztworze faworyzowała przyjęcie struktury G-kwadrupleksu przez opisany związek, co pociągało za sobą oddalenie barwnika fluorescencyjnego od czynnika wyciszającego i następowała emisja sygnału, którą można było skorelować z ilością białka. Na podobnej zasadzie działania opierał się system zaprojektowany przez grupę X. Su [150]. Składał się on z kropek kwantowych połączonych z albuminą surowicy bydlęcej (BSA-QD, ang. *bovine serum albumin-quantum dot*) oraz dwóch oligomerów: jednego przyjmującego strukturę spinki do włosów zawierającego sekwencję TBA (O1), drugiego komplementarnego do fragmentu trzonu poprzedniej cząsteczki (O2). Te ostatnie cząsteczki wiążąc się do BSA-QD na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych powodowały emisję sygnału fluorescencyjnego. W przypadku występowania w roztworze trombiny, następowała indukowana jej obecnością zmiana struktury oligomeru O1 i jego hybrydyzacja z cząsteczką O2. Powstały kompleks tracił zdolność oddziaływania z kropkami kwantowymi i prowadził do zaniku sygnału fluorescencyjnego, który jest odwrotnie proporcjonalny do ilości trombiny w roztworze. Oprócz powyżej opisanych przykładów, do tej pory przy tworzeniu aptasensorów opartych na sekwencji TBA jako metodę detekcji wykorzystano mikroskopię sił atomowych (AFM, ang. *atomic force microscope*) [151], spektroskopię powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) [152] i Ramana [153], natomiast do wzmocnienia sygnału użyto: nanocząstek złota [154], srebra [153, 155], nanorurek węglowych [156], grafenu [157, 158] oraz reakcji enzymatycznych [154].

Zmiany konformacyjne TBA wywołane obecnością jonów metali, głównie potasu, zostały wykorzystane do stworzenia sensorów wykrywających ich obecność. S. Nagatoishi wraz ze współpracownikami syntetyzował koniugat TBA z przyłączonymi na końcach fluorofortami: 6-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA, ang. *6-carboxytetramethylrhodamine*) i 6-karboksyfluoresceiną (FAM, ang. *6-carboxyfluorescein*) [159]. W obecności jonów potasu związek ten przyjmuje postać G-kwadrupleksu zapewniając optymalną odległość pomiędzy donorem i akceptorem, umożliwiając wystąpienie zjawiska FRET (ang. *Förster resonance energy*



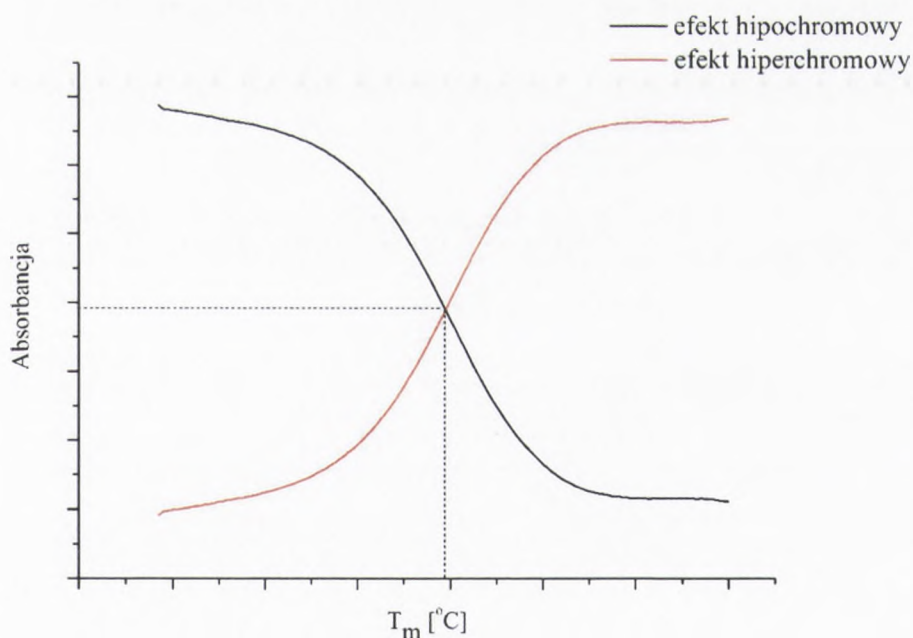
transfer). Wyżej opisany układ obarczony jest jednak pewnymi ograniczeniami, wynikającymi z występowania fałszywie dodatniego wyniku będącego efektem oddziaływania pomiędzy donorem a akceptorem dwóch różnych cząsteczek. Grupie S. Takenaka udało się uniknąć tego problemu poprzez umieszczenie na każdym z końców aptameru reszty pirenu [160]. Grupy te, wskutek utworzenia G-kwadrupleksu indukowanego obecnością jonów potasu, układają się względem siebie w określonej konfiguracji tworząc agregaty w stanie wzbudzonym (ekscymery) co skutkuje pojawieniem się silnego pasma w długofalowym zakresie widma emisji fluorescencji.

W ostatnim czasie rozpoczęto badania nad zastosowaniem TBA w celu zahamowania proliferacji nowotworowych linii komórkowych [133]. Wprowadzenie łącznika dibenzylowego w pozycje T⁴ i T¹³ opisywanego aptameru obniża jego zdolność oddziaływania z trombiną zwiększając jednak pięciokrotnie jego potencjał inhibicyjny względem komórek nowotworowych *HeLa*. Ponadto, E. Gaddes wraz ze współpracownikami udowodnił, że opisywany aptamer jest zdolny do zahamowania adhezji komórek nowotworowych do nabłonka naczyń krwionośnych poprzez inhibicję konwersji fibrynogenu w fibrynę [161]. Chociaż wyniki powyższych badań są obiecujące to wciąż nie jest znany dokładny mechanizm działania antyproliferacyjnego TBA. Dokładne poznanie istoty tych procesów na poziomie molekularnym przyczyni się nie tylko do poszerzenia wiedzy na temat wpływu całkowicie nowych modyfikacji na strukturę omawianych kwadrupleksów, ale w przyszłości może stanowić podstawę do opracowania nowych związków odznaczających się większą skutecznością działania antyproliferacyjnego.

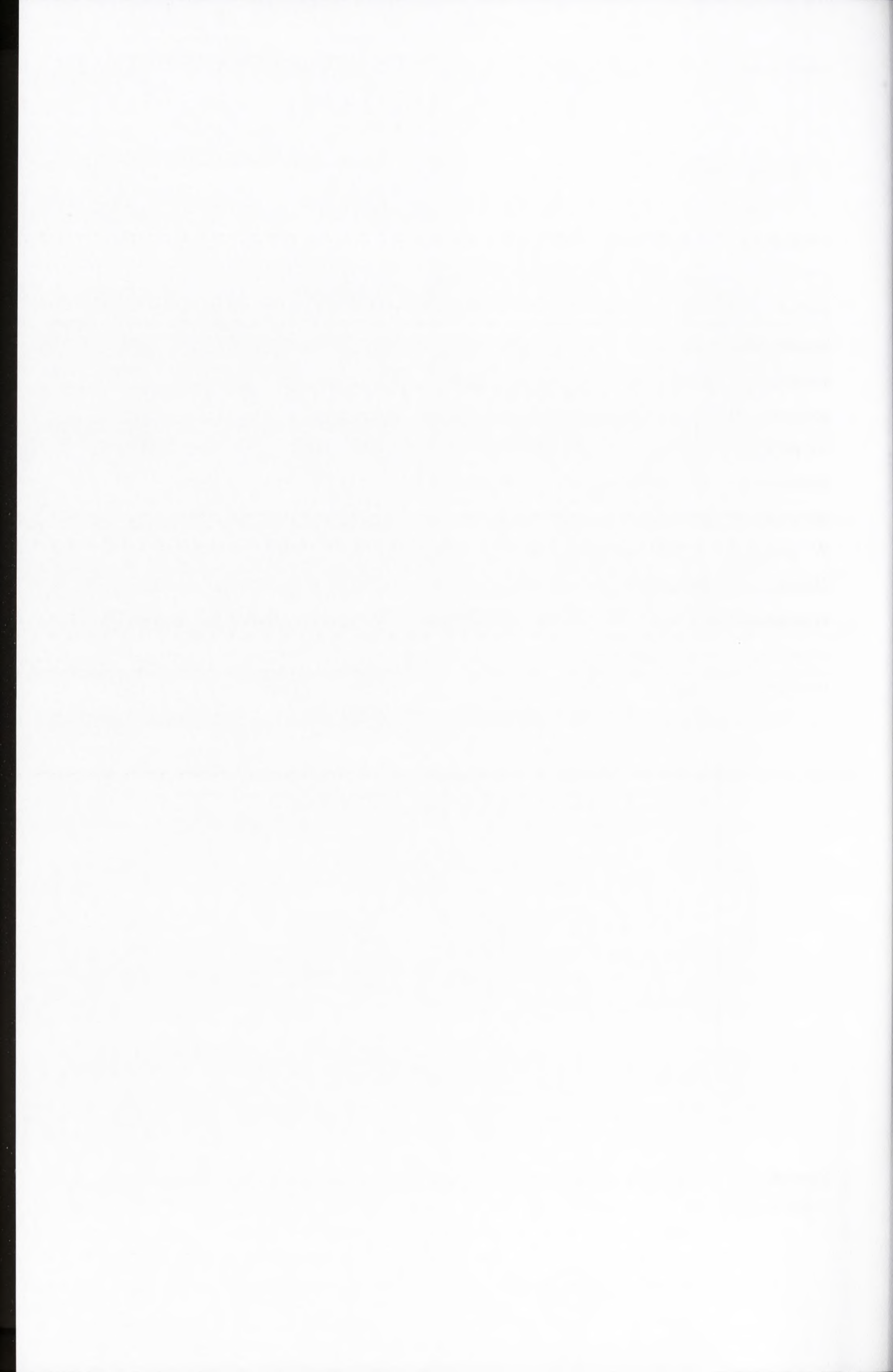
V. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Badania trwałości termodynamicznej wariantów TBA

Trwałość termodynamiczną badanych wariantów TBA określono poprzez wykorzystanie metody topnienia UV (ang. *UV melting*) przy użyciu spektrofotometru UV/VIS. Jest to technika pozwalająca na zarejestrowanie zmiany absorbancji badanej próbki (zwykle przy długości fali równej 260 nm) w funkcji temperatury [162]. Zasady heterocykliczne we fragmentach helikalnych kwasów nukleinowych oddziałują ze sobą warstwowo i są skierowane do wnętrza rdzenia, natomiast szkielet fosfocukrowy jest zorientowany na zewnątrz cząsteczki w kierunku otaczającego środowiska. Wzrost temperatury prowadzi do rozplecenia struktury i przyjęcia nieuporządkowanej formy jednoniciowej. Towarzyszy temu zjawisko hiperchromizmu czyli wzrostu absorbancji spowodowanego zanikiem asocjacji warstwowej par zasad heterocyklicznych (Rys. 13). W przypadku badań termodynamicznych G-kwadrupeksów wykonywanych przy długości fali równej 295 nm obserwuje się przeciwny efekt określany mianem hipochromizmu (Rys. 13). Wraz ze wzrostem temperatury następuje spadek absorbancji, co jest spowodowane zanikiem oddziaływań pomiędzy resztami guanozyn tworzącymi G-tetrazy. W związku z powyższym obserwowana krzywa topnienia ma

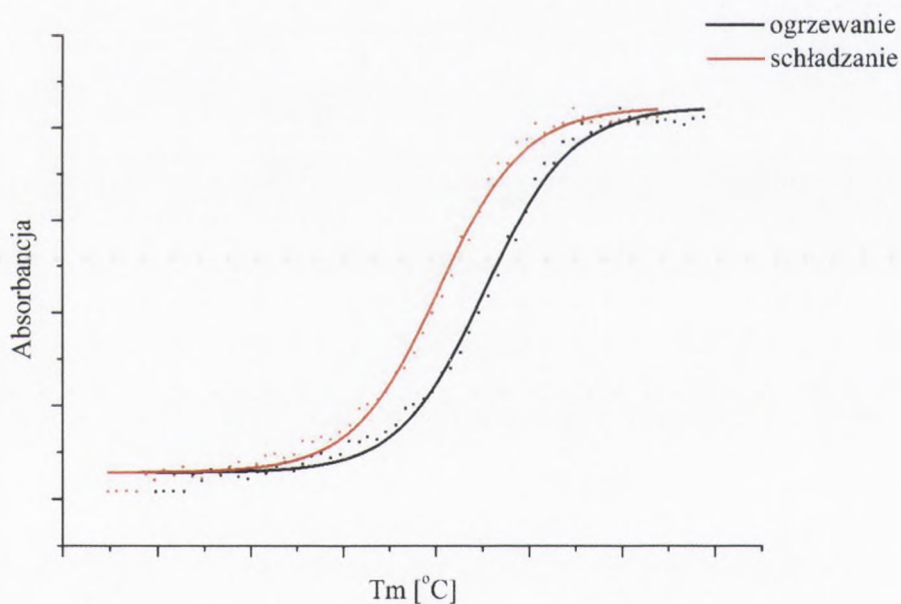


Rysunek 13. Przykładowe krzywe topnienia obrazujące odpowiednio efekt hipochromowy i hiperchromowy.



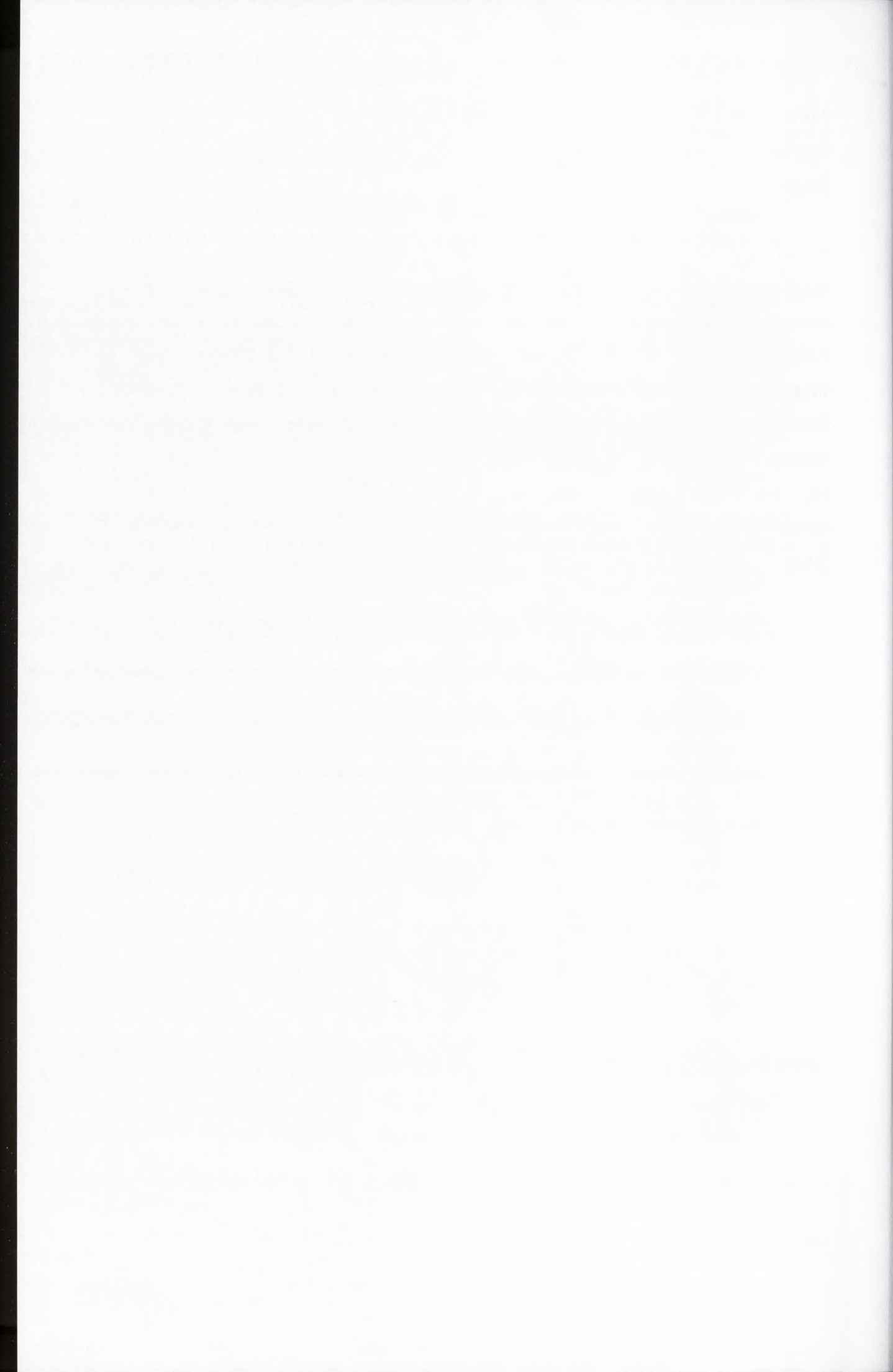
odwrotny przebieg w porównaniu z krzywą uzyskaną dla dupleksu. Dzięki temu możliwe jest równoczesne określenie trwałości termodynamicznej wspomnianych struktur [162, 163].

Temperaturę, w której ustrukturalizowane formy oligonukleotydów istnieją w równym stosunku ilościowym z postacią jednoniciową określa się mianem temperatury topnienia (T_m , ang. *melting temperature*). Na podstawie występowania zależności wartości parametru T_m od stężenia badanej cząsteczki można wnioskować o cząsteczkowości badanego układu (tzn. ile oligonukleotydów buduje badaną strukturę). Struktury o wewnątrzcząsteczkowym charakterze takie jak np. niektóre G-kwadrupeksy, zbudowane z jednej nici kwasów nukleinowych, odznaczają się brakiem występowania powiązania temperatury topnienia ze stężeniem. W przypadku, gdy układ składa się z co najmniej dwóch cząsteczek wówczas obserwuje się wzrost wartości parametru T_m wraz ze zwiększaniem stężenia badanych oligonukleotydów [162].



Rysunek 14. Przykładowe krzywe topnienia obrazujące zjawisko histerezy.

Wszystkie klasy G-kwadrupeksów odznaczają się powolną kinetyką fałdowania [164]. W przypadku zastosowania warunków eksperymentu, w których szybkość ogrzewania lub chłodzenia próbki (podczas wykonywania pomiarów termodynamicznych) jest większa niż tempo przechodzenia oligonukleotydów ze stanu uporządkowanego do rozpleczonego występuje zjawisko histerezy. Przejawia się ono

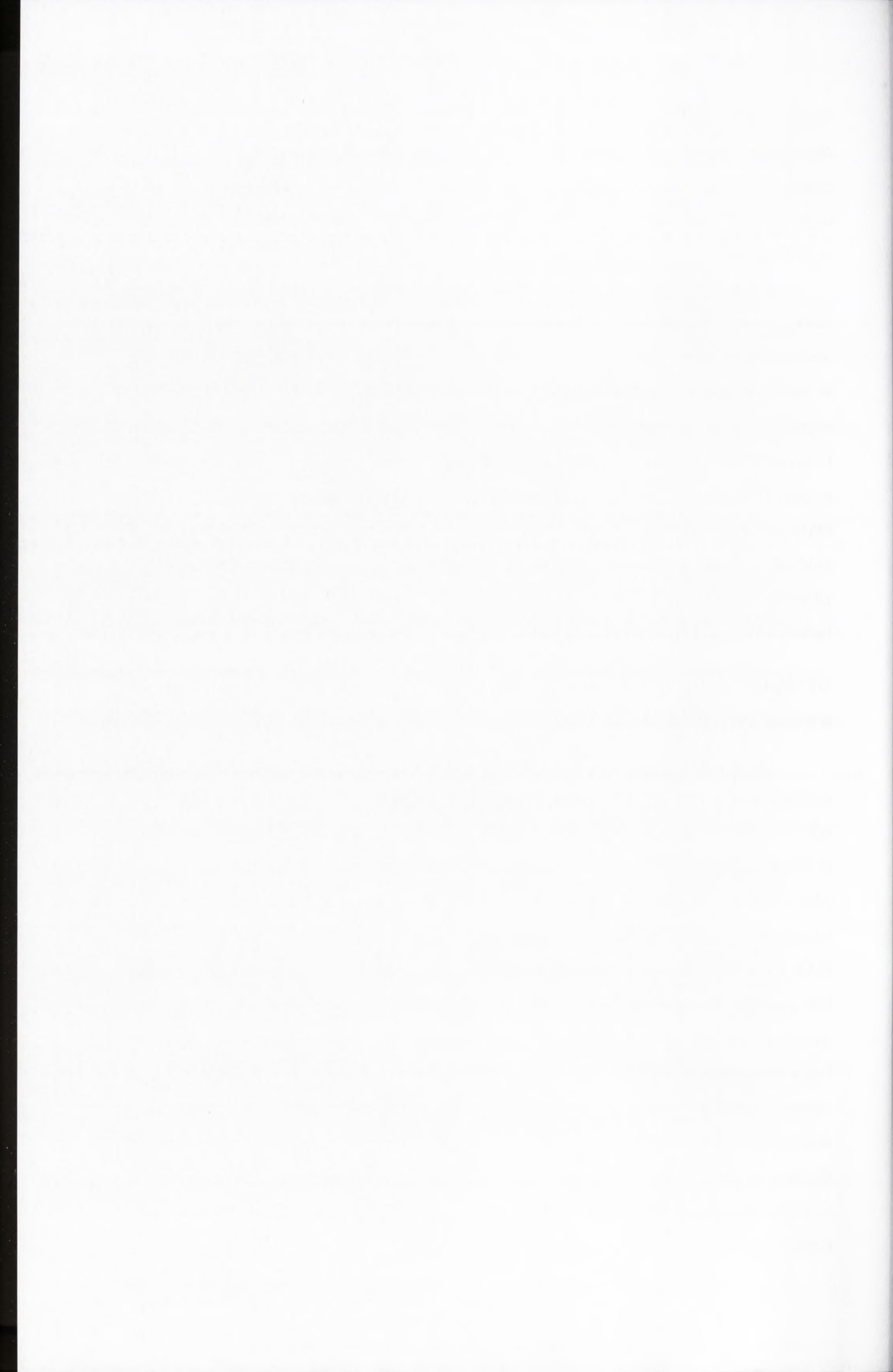


rozbieżnością przebiegu krzywych z pomiarów wykonywanych przy stopniowym chłodzeniu i ogrzewaniu próbki (Rys. 14). Prowadzi to do otrzymania różniących się między sobą wartości parametrów termodynamicznych. Można uniknąć występowania tego zjawiska poprzez przyjęcie odpowiednio wolnego tempa zmiany temperatury ($< 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

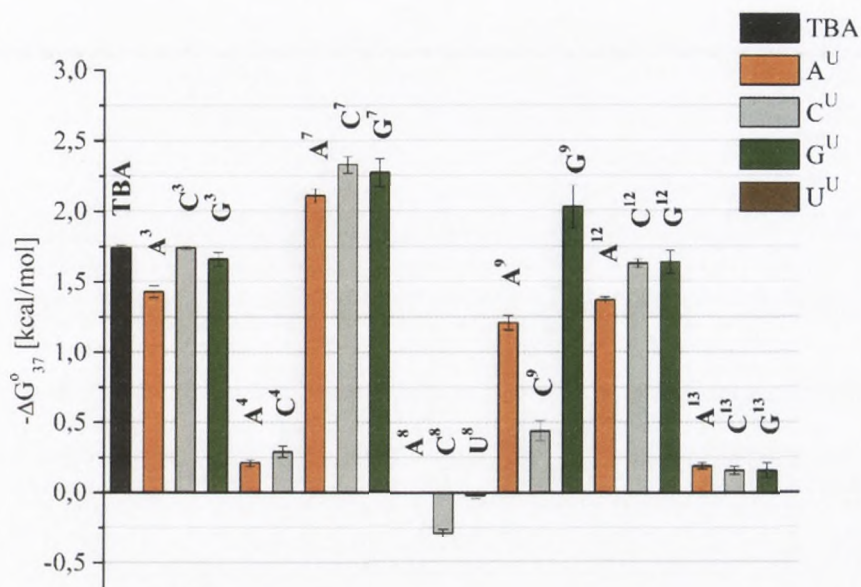
Ponieważ G-kwadrupeksy odznaczają się małymi zmianami absorpcji towarzyszącymi wzrostowi temperatury przy długości fali równej 260 nm, pomiary trwałości termodynamicznej tej klasy cząsteczek wykonano przy długości fali 295 nm, w której wspomniana różnica przyjmuje większą o 50-80% wartość [163]. Ponadto, w celu uzyskania optymalnych wartości temperatur topnienia analizowanych G-kwadrupeksów, badania prowadzono w buforze zawierającym 100 mM chlorek potasu. Dodatkowo, przed przystąpieniem do właściwych pomiarów określono również szybkość zmian temperatury próbek, gwarantującą osiągnięcie stanu równowagi kinetycznej przez badany układ, a co za tym idzie brak występowania niepożądanego zjawiska histerezy. W związku z powyższym wzrost temperatury w niniejszych badaniach był dokonywany z szybkością równą $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

1.1 Wpływ podstawienia kanonicznymi resztami nukleotydowymi typu UNA na trwałość termodynamiczną TBA

Do badania wpływu podstawienia aptameru TBA kanonicznymi resztami nukleotydowymi typu UNA wykorzystano 23 oligonukleotydy zawierające A^{U} , C^{U} , G^{U} lub U^{U} . Pojedyncze reszty UNA wprowadzono w każdą możliwą pozycję trzech pętli tj. T^3 , T^4 , T^7 , G^8 , T^9 , T^{12} lub T^{13} cząsteczki TBA. Miejsca te zostały uprzednio opisane jako charakteryzujące się, pod względem termodynamicznym, największą tolerancją na wprowadzenie reszt UNA do aptameru TBA (zmiana $d\text{T}$ na U^{U} lub $d\text{G}$ na G^{U}) [131, 132]. Ponadto, dotychczas opublikowane dane sugerują, że zamiana reszty tyminy lub guaniny w rejonie jednej z pętli na resztę innej zasady heterocyklicznej, przy zachowaniu niemodyfikowanej reszty 2'-deoksyrybozy, powoduje zachowanie struktury G-kwadrupeksu, a w niektórych przypadkach może nawet wpłynąć korzystnie na jego trwałość termodynamiczną [165]. W badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej zdecydowano się więc na rozszerzenie podstawowych danych literaturowych o dodatkową analizę wpływu nie tylko zamiany reszty 2'-deoksyrybozy na acykliczną resztę pseudocukrową występującą w UNA, ale również na podstawienie tyminy resztami adeniny, cytozyny lub guaniny (poz. T^3 , T^4 , T^7 , T^9 , T^{12} lub T^{13}) oraz

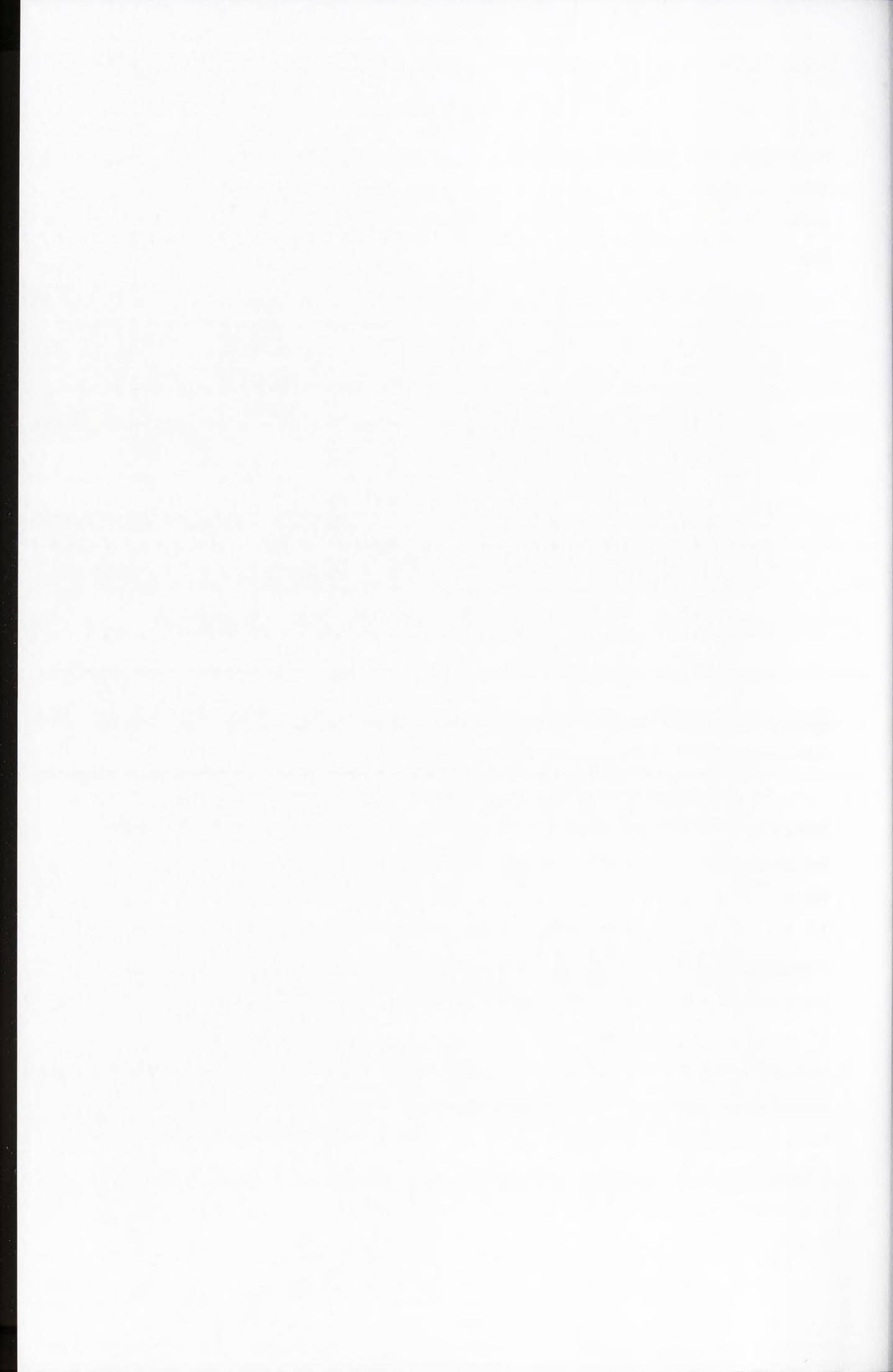


guaniny resztami adeniny, cytozyny lub uracylu. Podstawowym założeniem powyższego postępowania był fakt, iż nawet jeżeli wprowadzone reszty UNA nie spowodują wyraźnego zwiększenia trwałości termodynamicznej G-kwadrupleksu, mogą przyczynić się do poprawy jego właściwości biologicznych na późniejszym etapie badań.

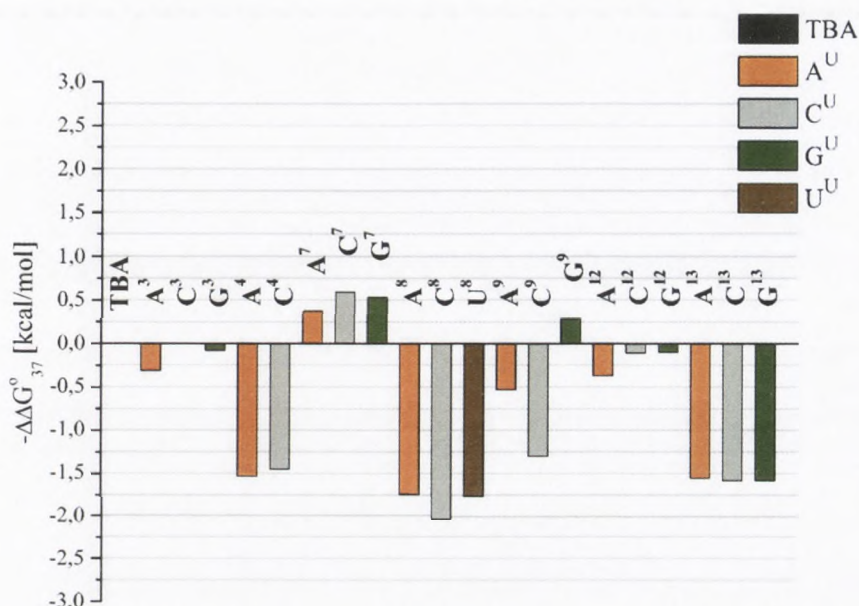


Rysunek 15. Wykres zależności wartości energii swobodnej wariantów zawierających reszty nukleotydowe UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Na podstawie uzyskanych danych możliwe było sformułowanie wniosku, że największą stabilizację cząsteczki TBA uzyskuje się poprzez wprowadzenie reszt nukleotydowych UNA w pozycję T⁷ aptameru (Rys. 15 oraz Rys. 16, Tab. 1). Zmiana energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) wynosiła -0.37, -0.59 oraz -0.53 kcal/mol odpowiednio dla A^U, C^U oraz G^U. Uzyskane efekty termodynamiczne dla wariantów zawierających w pozycji T⁷ resztę A^U, C^U lub G^U korespondują ze wcześniej uzyskanymi wynikami dla cząsteczki TBA zawierającej w tej pozycji U^U [131]. W tym przypadku, obecność U^U w pozycji T⁷ powodowała zwiększenie trwałości termodynamicznej TBA o 0.50 kcal/mol ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0.50$ kcal/mol). Porównywalne wartości efektów termodynamicznych wywołanych wprowadzeniem wszystkich czterech rodzajów reszt nukleotydowych typu UNA sugerują, że na poprawę trwałości termodynamicznej G-kwadrupleksu w pozycji T⁷ decydujący wpływ wywiera zwiększenie labilności konformacyjnej części cukrowej lub występowanie dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji C2', natomiast czynnik związany ze zmianą reszty zasady heterocyklicznej

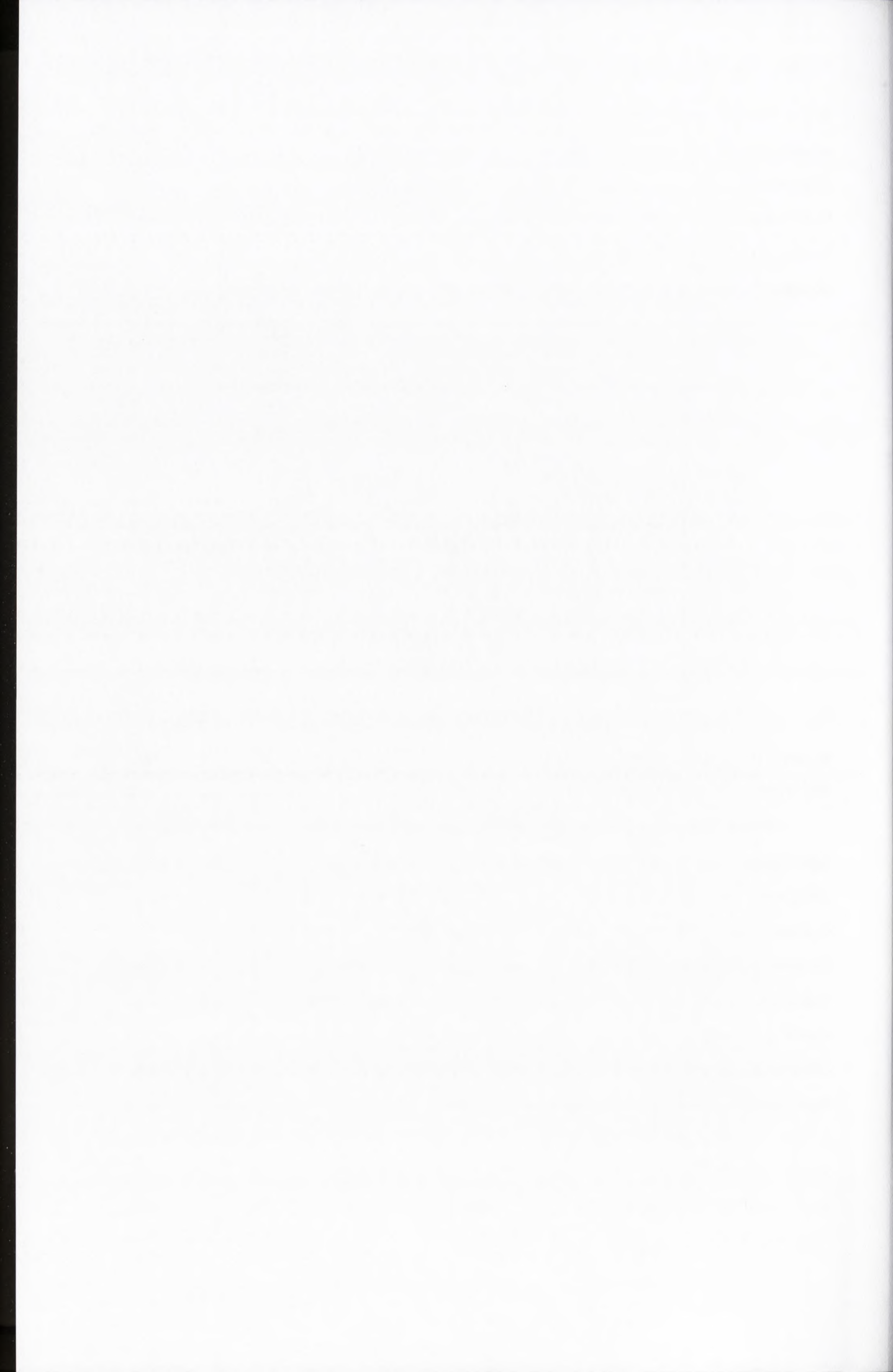


jest w tym przypadku mniej istotny. Może być to związane z nietypowym ułożeniem przestrzennym reszty nukleotydowej w pozycji T⁷, w której zasada heterocykliczna skierowana jest w stronę roztworu i nie oddziałuje z innymi fragmentami G-kwadrupleksu, przez co mało znaczące staje się wprowadzenie reszt zasad heterocyklicznych różniących się powierzchnią pierścieni aromatycznych czy też obecnością różnych grup funkcyjnych (Rys. 6, część literaturowa) [104].



Rysunek 16. Wykres zależności wartości zmian energii swobodnej wariantów zawierających reszty nukleotydowe UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Nieco mniejszy, ale nadal stabilizacyjny efekt zaobserwowano w przypadku wprowadzenia G^U w pozycję T⁹ aptameru ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0.29$ kcal/mol; Rys. 16, Tab. 1). Obecność w tej pozycji reszty A^U powodowała natomiast destabilizację G-kwadrupleksu o 0.53 kcal/mol, podczas gdy wprowadzenie C^U prowadziło do zmniejszenia trwałości termodynamicznej o 1.30 kcal/mol. Dane literaturowe wskazują, że obecność U^U w pozycji T⁹ destabilizuje strukturę G-kwadrupleksu ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1.08$ kcal/mol) [131]. Porównując tę wartość do danych opisanych w pracy doktorskiej można stwierdzić, że oprócz pochodnej guanozyny wszystkie pozostałe modyfikacje typu UNA wpływają niekorzystnie na trwałość TBA. W tym przypadku jednak obserwuje się dosyć znaczną zależność efektów termodynamicznych od rodzaju zasady heterocyklicznej. Największy efekt destabilizacyjny występuje w przypadku reszt zasad pirymidynowych (C^U, U^U), natomiast obecność reszt zasad purynowych wywołuje o wiele mniejszą destabilizację (A^U) lub wręcz stabilizację struktury (G^U).



Związane jest to najprawdopodobniej z przestrzennym ułożeniem reszty T⁹ w TBA (Rys. 6, część literaturowa). Reszta dT w pozycji T⁹ zaangażowana jest w oddziaływania warstwowe z G-tetradą stąd wprowadzenie innych reszt zasad heterocyklicznych zaburza te oddziaływania prowadząc do destabilizacji struktury. Obecność G^U może natomiast prowadzić do pewnej stabilizacji poprzez powstanie dodatkowych, korzystnych oddziaływań z tetradami guanozynowymi.

Pomimo różnej wielkości efektów termodynamicznych wywołanych obecnością reszt UNA w pozycjach T⁷ i T⁹, dla wszystkich powyższych wariantów TBA energia swobodna przyjmowała wartość ujemną, co świadczy o tym, że analizowane oligonukleotydy przyjmują strukturę kwadrupleksu w temperaturze 37°C.

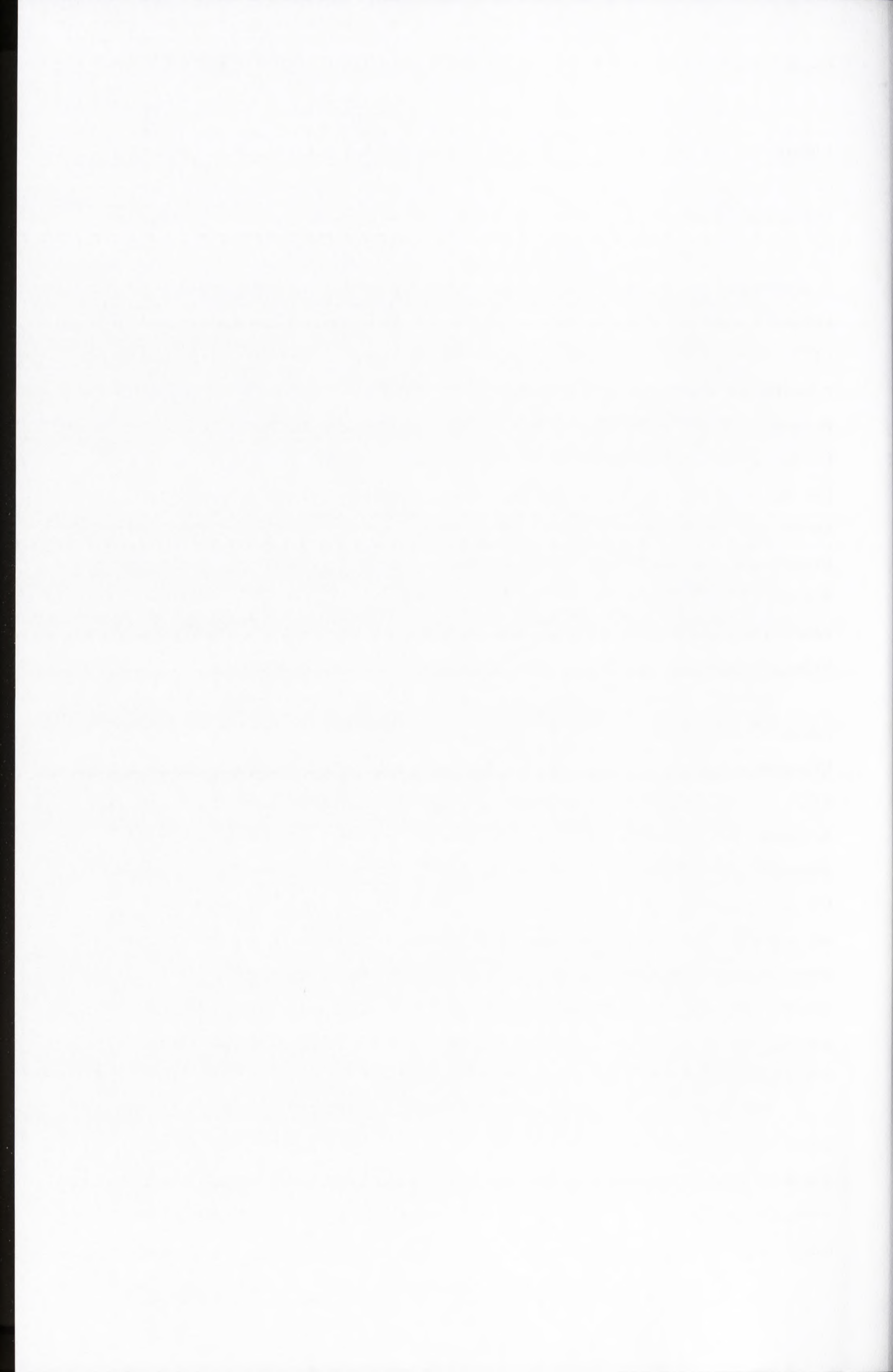
Zdecydowanie największy efekt destabilizacyjny zaobserwowano wprowadzając modyfikacje UNA w pozycję G⁸ aptameru (Rys. 16, Tab. 1). Wartość zmiany energii swobodnej wynosiła w tym przypadku 1.74, 2.03 oraz 1.76 kcal/mol odpowiednio dla A^U, C^U oraz U^U. Natomiast wprowadzenie w tę pozycję G^U wywołuje dużo mniejszą destabilizację ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1.08$ kcal/mol) [131]. Reszta guanozyny w pozycji G⁸ jest zaangażowana w oddziaływania z rdzeniem G-kwadrupleksu poprzez tworzenie wiązania wodorowego z resztą guanozyny w pozycji G¹, dokładniej pomiędzy atomem tlenu O6 pierwszej zasady heterocyklicznej a grupą egzoaminową drugiej [105]. Wprowadzenie w pozycję G⁸ modyfikacji zwiększającej elastyczność szkieletu cukrowego w regionie pętli, najprawdopodobniej uniemożliwia przyjęcie odpowiedniego ułożenia względem siebie tych dwóch reszt nukleotydowych, zmniejszając tym samym trwałość termodynamiczną całego G-kwadrupleksu. Co więcej, znaczne obniżenie stabilności termodynamicznej wariantów zawierających reszty nukleotydowe A^U oraz C^U w stosunku do cząsteczki TBA posiadającej w tej pozycji G^U może być spowodowane brakiem atomu tlenu zdolnego do utworzenia wiązania wodorowego z grupą egzoaminową reszty nukleotydowej G¹. W przypadku oligonukleotydu zawierającego U^U w pozycji G⁸ również obserwuje się zwiększenie efektu destabilizacyjnego w porównaniu do G^U, chociaż wspomniana zasada heterocykliczna zawiera atomy tlenu, które mogłyby potencjalnie uczestniczyć w tworzeniu wiązania wodorowego. Obserwowana destabilizacja może jednak wynikać z różnicy rozmiarów pierścienia uracylu i guaniny, w związku z czym prawdopodobnie nie jest możliwe przyjęcie przez U^U orientacji przestrzennej pozwalającej na efektywne oddziaływanie z grupą aminową reszty guanozyny w pozycji G¹.



Obniżenie stabilności termodynamicznej odnotowano również w przypadku wariantów TBA zawierających reszty nukleotydów UNA w rejonie mniejszych pętli (T^4 i T^{13} ; Rys. 15 oraz Rys. 16, Tab. 1). Wartość $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ wynosiła 1.53 oraz 1.45 kcal/mol dla A^U i C^U w pozycji T^4 oraz 1.55, 1.58 i 1.58 kcal/mol odpowiednio dla A^U , C^U oraz G^U w pozycji T^{13} . Destabilizujący wpływ substytucji w pozycji T^4 i T^{13} obserwowano już wcześniej w przypadku umieszczenia w tych miejscach reszt nukleotydowych U^U ($\Delta\Delta G_{37}^\circ$ wynosiła 0.84 oraz 1.41 kcal/mol odpowiednio dla T^4 i T^{13}), w związku z tym uzyskane wyniki eksperymentalne pozostają w zgodności z danymi literaturowymi [131]. Na podstawie badań krystalograficznych ustalono, że reszty tymidyny w powyższych pozycjach zaangażowane są w stabilizację rdzenia G-kwadrupleksu poprzez tworzenie wiązań wodorowych i oddziaływań warstwowych [94, 96]. W związku z tym wprowadzanie modyfikacji może utrudniać tworzenie tych korzystnych dla struktury TBA oddziaływań i negatywnie wpływać na stabilność termodynamiczną badanych wariantów. Co więcej, w przypadku wprowadzenia w pozycje T^4 i T^{13} innych niż U^U reszt nukleotydowych (A^U , C^U lub G^U) obserwuje się zwiększenie negatywnego wpływu tych substytucji na stabilność termodynamiczną badanych wariantów.

Znacznie mniej destabilizujący efekt uzyskano wprowadzając reszty nukleotydów UNA w pozycję T^3 i T^{12} aptameru (Rys. 15 oraz Rys. 16, Tab. 1). Obecność reszty A^U w obu wspomnianych położeniach powodowała destabilizację o 0.31 i 0.37 kcal/mol, odpowiednio dla T^3 i T^{12} . Zaobserwowano również, że wprowadzenie reszt G^U w pozycję T^3 oraz C^U i G^U w pozycję T^{12} aptameru prowadziło do niekorzystnej zmiany energii swobodnej o około 0.1 kcal/mol. Co ciekawe, cząsteczka TBA zawierająca C^U zamiast dT w pozycji T^3 charakteryzowała się niemalże identycznymi z niemodyfikowanym oligonukleotydem parametrami termodynamicznymi. Dużą tolerancję na wprowadzenie modyfikacji w pozycji T^3 i T^{12} aptameru potwierdzają również wcześniejsze dane literaturowe [96, 104]. Może być ona spowodowana brakiem udziału wspomnianych reszt nukleotydowych w oddziaływaniach stabilizujących G-kwadrupleks.

Analiza zależności wartości temperatur topnienia uzyskanych dla różnych stężeń próbki wskazuje, że wprowadzone modyfikacje nie zmieniają wewnątrzcząsteczkowego charakteru struktury G-kwadrupleksu większości pochodnych TBA. Wyjątkiem był wariant posiadający resztę G^U w pozycji T^4 oraz wariant TBA posiadający jednocześnie cztery reszty U^U w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} (Tab. 2). Obydwa modyfikowane



aptamery wykazywały odmienny profil termodynamiczny, który sugeruje tworzenie się międzycząsteczkowego, samokomplementarnego G-kwadrupleksu, stąd nie można w sposób bezpośredni porównać danych z pozostałymi wariantami TBA. Niemniej jednak analiza wartości temperatur topnienia dla tych cząsteczek wskazuje, że są one mniej trwałe pod względem termodynamicznym niż niemodyfikowany TBA.

Tabela 1. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupleksów zawierających reszty nukleozydowe typu UNA (A^U, C^U, G^U, U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnie dopasowania krzywych topnienia					
		$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	ΔG°_{37} (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
	GGTTGGTGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0
T ³	GG <u>A</u> ^U TGGTGTGGTTGG	39.5±0.8	122.7±2.4	-1.43±0.04	48.7	0.31	-2.0
T ³	GG <u>C</u> ^U TGGTGTGGTTGG	40.3±0.4	124.3±1.1	-1.74±0.01	51.0	0	0.3
T ³	GG <u>G</u> ^U TGGTGTGGTTGG	40.5±0.9	125.1±2.9	-1.66±0.05	50.2	0.08	-0.5
T ⁴	GGT <u>A</u> ^U GGTGTGGTTGG	33.5±0.3	107.4±0.9	-0.21±0.02	39.0	1.53	-11.7
T ⁴	GGT <u>C</u> ^U GGTGTGGTTGG	34.7±1.0	110.9±3.2	-0.29±0.04	39.6	1.45	-11.1
T ⁴	GGT <u>G</u> ^U GGTGTGGTTGG*	-	-	-	-	-	-
T ⁷	GGTTGG <u>A</u> ^U GTGGTTGG	43.6±1.0	133.9±3.1	-2.11±0.05	52.8	-0.37	2.1
T ⁷	GGTTGG <u>C</u> ^U GTGGTTGG	44.4±1.4	135.7±4.3	-2.33±0.06	54.2	-0.59	3.5
T ⁷	GGTTGG <u>G</u> ^U GTGGTTGG	44.1±1.2	134.8±3.6	-2.27±0.10	53.9	-0.53	3.2
T ⁸	GGTTGGT <u>A</u> ^U TGGTTGG	34.9±1.8	112.7±5.7	0.00±0.01	37.0	1.74	-13.7
T ⁸	GGTTGGT <u>C</u> ^U TGGTTGG	35.2±1.3	114.4±4.2	0.29±0.03	34.5	2.03	16.2
T ⁸	GGTTGGT <u>U</u> ^U TGGTTGG	36.3±0.5	117.0±1.6	0.02±0.02	36.8	1.76	-13.9
T ⁹	GGTTGGT <u>G</u> ^U GGTTGG	43.4±1.1	136.1±3.4	-1.21±0.05	45.9	0.53	-4.8
T ⁹	GGTTGGT <u>C</u> ^U GGTTGG	40.6±2.8	129.5±9.0	-0.44±0.07	40.4	1.30	-10.3
T ⁹	GGTTGGT <u>G</u> ^U GGTTGG	47.3±1.7	146.1±5.1	-2.03±0.15	50.9	-0.29	0.2
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>A</u> ^U TGG	37.8±0.7	117.3±2.2	-1.37±0.02	48.7	0.37	-2.0
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>C</u> ^U TGG	39.6±0.6	122.3±1.8	-1.63±0.03	50.3	0.11	-0.4
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>G</u> ^U TGG	39.9±1.3	123.3±4.0	-1.64±0.08	50.3	0.1	-0.4
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>A</u> ^U GG	34.8±0.2	111.7±0.7	-0.19±0.02	38.7	1.55	-12.0
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>C</u> ^U GG	34.3±1.0	109.9±3.0	-0.16±0.03	38.4	1.58	-12.3
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>G</u> ^U GG	35.3±0.7	113.4±2.1	-0.16±0.05	38.4	1.58	-12.3

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0, b – obliczone dla stężenia 10⁻⁴ M, * dane termodynamiczne umieszczono w Tabeli 2

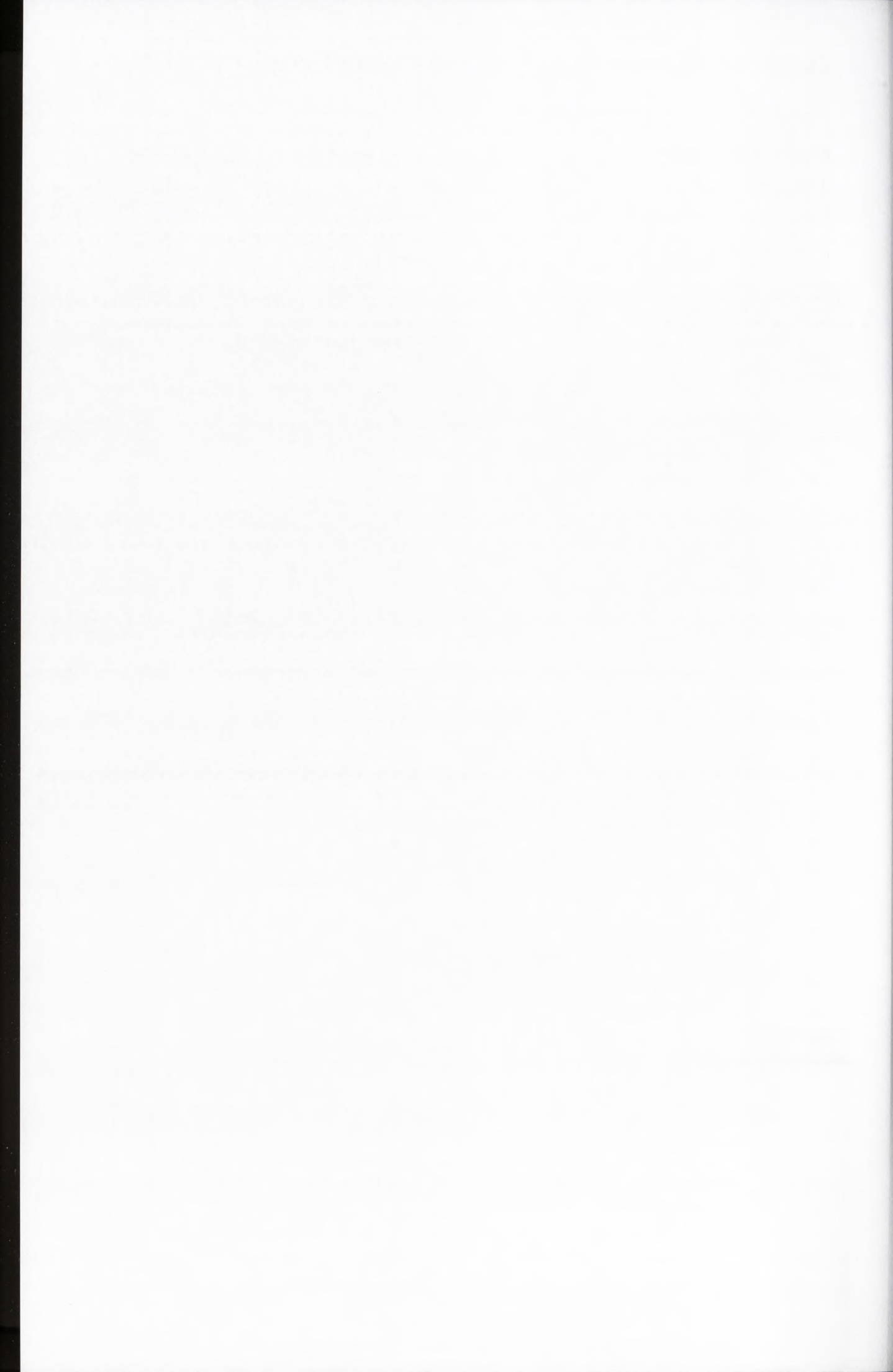
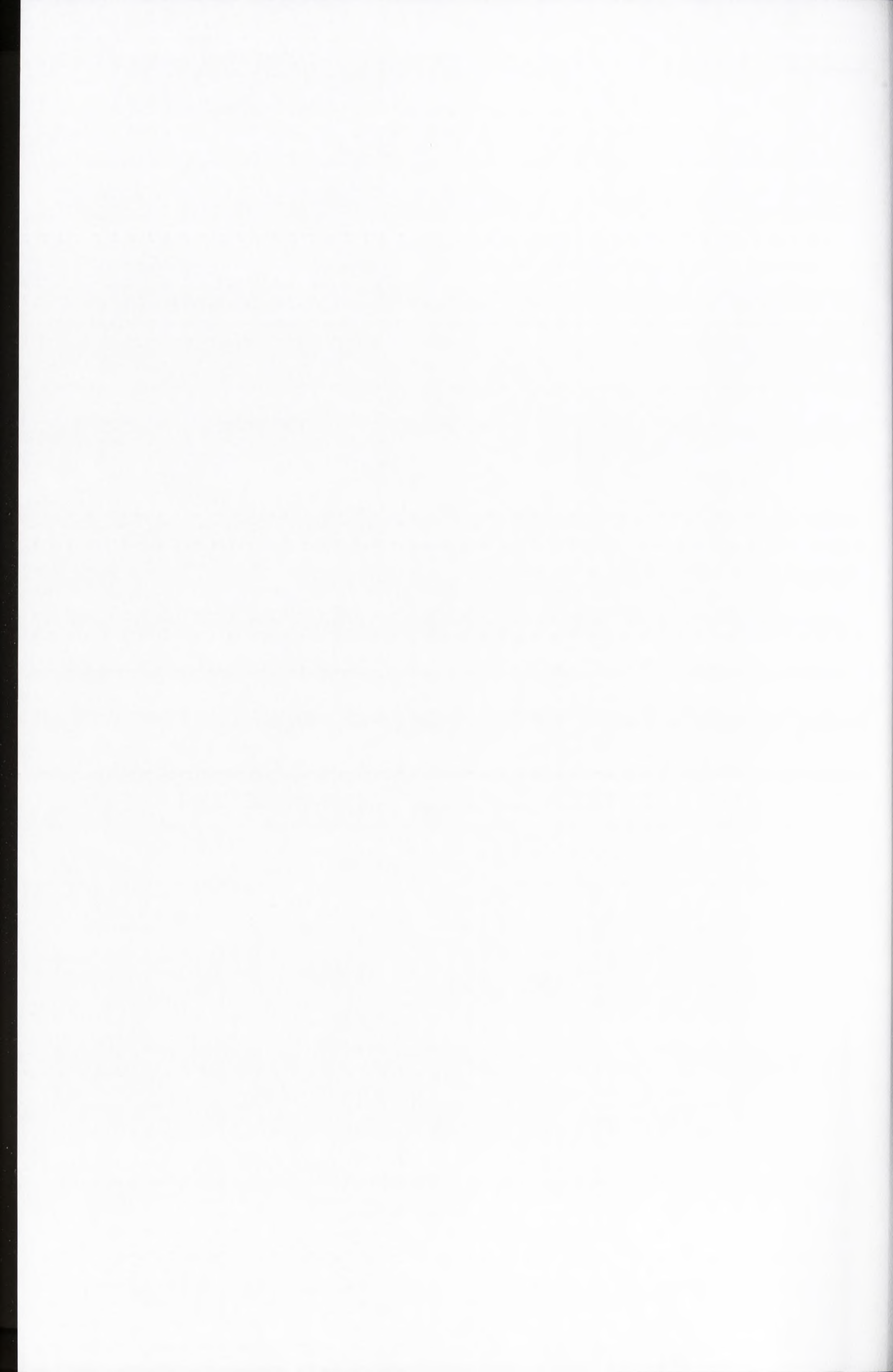


Tabela 2. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupleksów zawierających reszty nukleozydowe typu UNA (G^U , U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnie dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T_M^{-1} od $\log C_T$					
		$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	ΔG°_{37} (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	ΔG°_{37} (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta \Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
	GGTTGGTGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7						0
T^3 , T^7 , T^9 , T^{13}	GGU ^U TGGU ^U GU ^U GGTU ^U GG	61.4±10.4	176.1±33.1	-6.73±0.25	42.4	59.2±1.9	169.4±6.2	-6.66±0.02	42.2	-	-8.5
T^4	GGT ^U G ^U GGTGTGGTTGG	72.2±5.4	210.4±17.2	-6.93±0.05	42.5	79.1±3.1	232.4±10.0	-7.01±0.05	42.3	-	-8.4

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0, b – obliczone dla stężenia 10^{-4} M



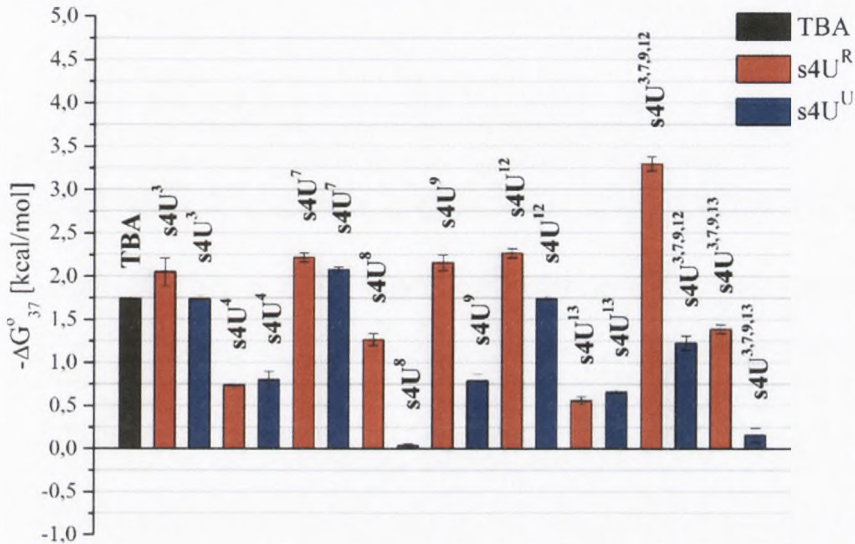
1.2 Wpływ podstawienia resztami 4-tiourydyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA

Badania wpływu podstawienia resztami 4-tiourydyny w serii UNA ($s4U^U$) lub RNA ($s4U^R$) przeprowadzono z wykorzystaniem 18 oligonukleotydów. Pojedyncze reszty 4-tiourydyny w serii UNA lub RNA wprowadzono w każdą możliwą pozycję pętli TT i TGT cząsteczki TBA. Równoczesna substytucja nukleotydów w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} resztami 4-tiourydyny w serii DNA została uprzednio opisana jako szczególnie korzystna dla poprawy właściwości antykoagulacyjnych omawianego aptameru [122]. Jak dotąd, nie określono jednak wpływu obecności powyższej modyfikacji w cząsteczce TBA na jej stabilność termodynamiczną. W niniejszej pracy postanowiono przeanalizować efekt wywierany przez pojedynczą resztę 4-tiourydyny obecną we wspomnianych pozycjach rozszerzając dodatkowo zakres lokalizacji o pozostałe miejsca pętli aptameru. Ponadto, biorąc pod uwagę wcześniejsze dane literaturowe o korzystnym wpływie podstawienia resztami nukleotydowymi UNA na poprawę właściwości antykoagulacyjnych TBA, zsyntetyzowano nową pochodną urydyny składającą się z reszty cukrowej UNA oraz zasady heterocyklicznej 4-tiouracylu. Warianty TBA zawierające opisywaną modyfikację w serii RNA pozwoliły określić czy uzyskany efekt jest spowodowany obecnością dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji 2' pierścienia rybozy czy też zwiększoną labilnością pierścienia cukrowego w resztach UNA.

Jednym z najkorzystniejszych pod względem termodynamicznym okazało się wprowadzenie reszty 4-tiourydyny w serii RNA w pozycję T^{12} aptameru (Rys. 17 oraz Rys. 18, Tab. 3). Zmiana energii swobodnej dla tego oligomeru w porównaniu do niemodyfikowanego TBA wynosiła -0.53 kcal/mol. Natomiast wprowadzenie w tę samą pozycję reszt $s4U^U$ nie zmieniało stabilności termodynamicznej badanej cząsteczki (wartość $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ przyjmowała wartość 0; Rys. 18, Tab. 3). Również stabilizujący, lecz nieco mniej korzystny efekt zaobserwowano w przypadku wprowadzenia reszt $s4U^R$ w pozycję T^3 aptameru ($\Delta\Delta G_{37}^\circ = -0.31$ kcal/mol, względem niemodyfikowanego TBA; Rys. 18, Tab. 3). Oligomer zawierający $s4U^U$ odznaczał się porównywalną z niemodyfikowanym TBA wartością energii swobodnej ($\Delta G_{37}^\circ = -1.74$ kcal/mol; Rys. 17, Tab. 3). Obecność $s4U^U$ w pozycjach T^3 i T^{12} powodowała nieznaczne obniżenie stabilności termodynamicznej tych wariantów względem cząsteczek TBA zawierających w tych miejscach U^U ($\Delta\Delta G_{37}^\circ$ dla substytucji U^U



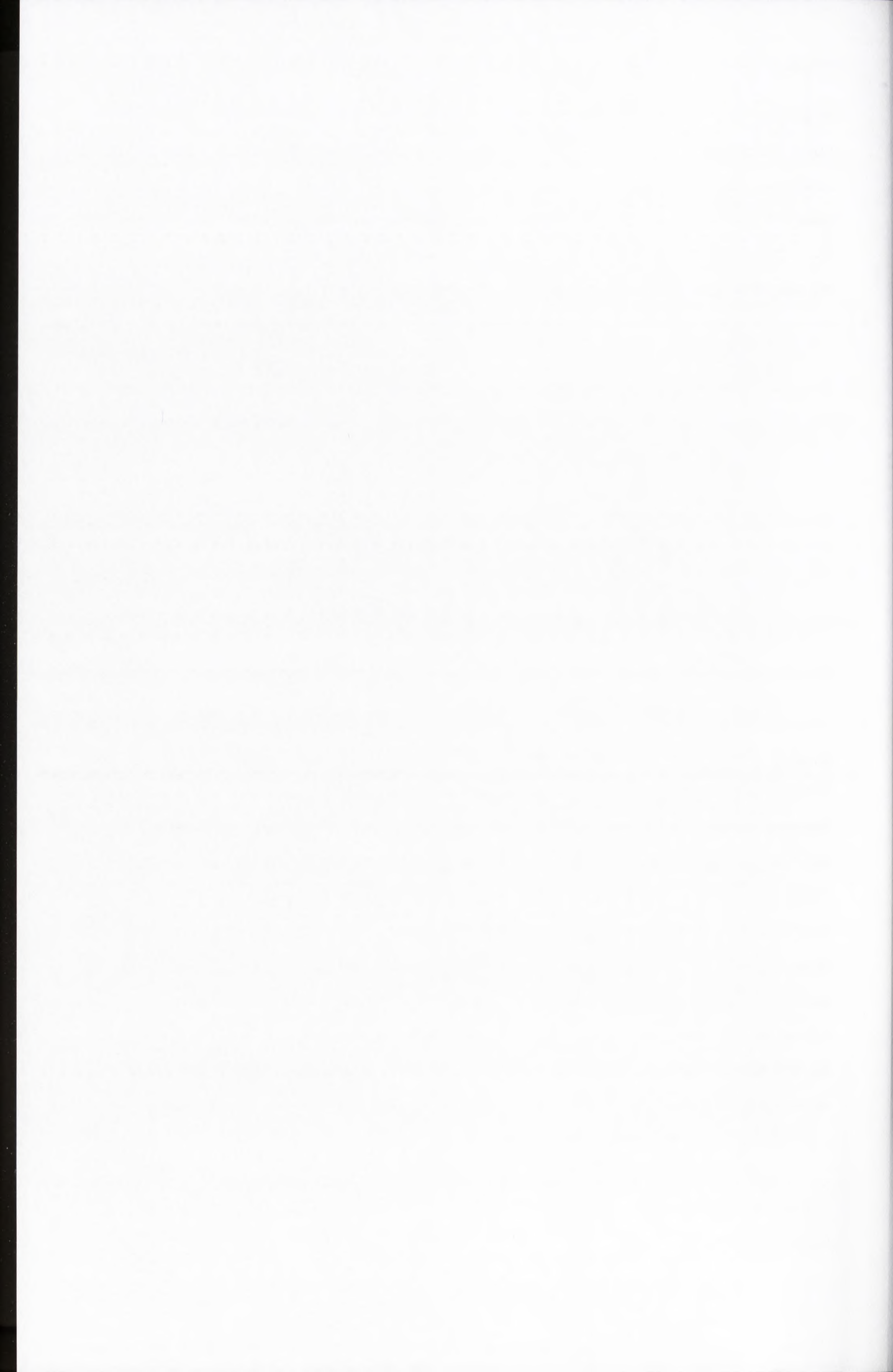
względem niemodyfikowanego wariantu TBA była równa -0.23 i -0.15 kcal/mol odpowiednio dla T^3 i T^{12} [131]). Wynik ten może być więc efektem modyfikacji części zasadowej reszty nukleotydu. Jednak ze względu na sugerowany w literaturze brak zaangażowania tych pozycji w oddziaływania stabilizujące G-kwadrupeks obserwuje się dużą tolerancję na wprowadzanie modyfikacji reszty nukleotydowej we wspomnianych fragmentach omawianego aptameru [96, 104].



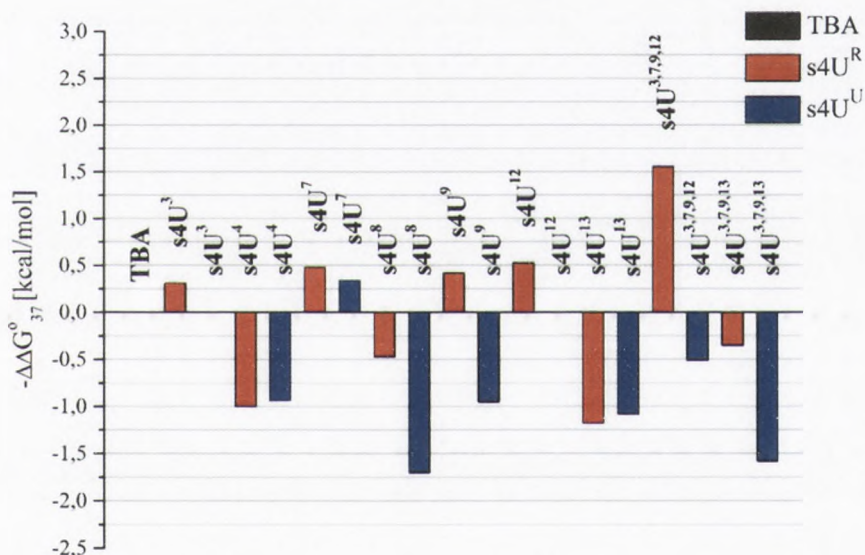
Rysunek 17. Wykres zależności wartości energii swobodnej wariantów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA i UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Poprawę parametrów termodynamicznych uzyskano również poprzez wprowadzenie s4U^R w pozycję T^7 aptameru ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0.48$ kcal/mol, względem niemodyfikowanego TBA; Rys. 18, Tab. 3). Zmiana energii swobodnej wariantu zawierającego opisywaną modyfikację w serii UNA względem niemodyfikowanego TBA wynosiła -0.34 kcal/mol (Rys. 18, Tab. 3). Niewielka różnica w stabilności termodynamicznej obu oligomerów ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0.14$ kcal/mol; Tab. 3) sugeruje, że wprowadzanie pierścienia rybozy o zwiększonej labilności w pozycję T^7 aptameru nie wpływa w sposób istotny na opisywany parametr. Uzyskane wyniki mogą być rezultatem skierowania zasady heterocyklicznej w pozycji T^7 do roztworu i brakiem obecności oddziaływań z pozostałą częścią G-kwadrupeksu [104].

Stabilizujący wpływ wprowadzenia reszty 4-tiourydyny w serii RNA zaobserwowano także w pozycji T^9 TBA ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0.42$ kcal/mol, względem niemodyfikowanego TBA; Rys. 18, Tab. 3). Biorąc jednak pod uwagę obniżenie

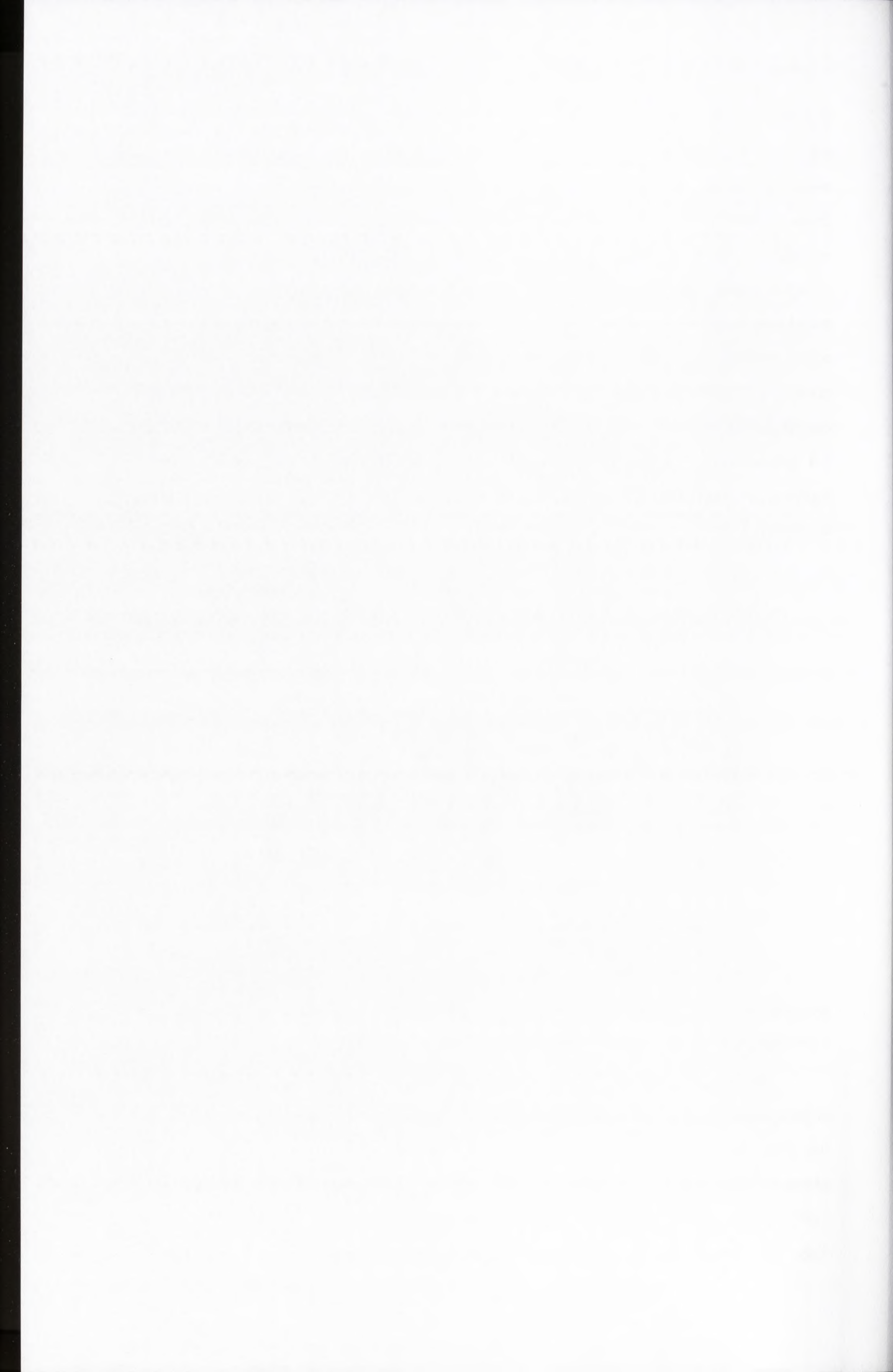


stabilności termodynamicznej kwadrupleksu zawierającego w opisywanej lokalizacji s4U^U ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0.95$ kcal/mol, względem niemodyfikowanego TBA; Rys. 18, Tab. 3), można stwierdzić, że uzyskany efekt jest zależny od typu modyfikacji reszty cukrowej. Duża różnica pomiędzy zmianami energii swobodnych poszczególnych wariantów, wynosząca 1.37 kcal/mol (Tab. 3), może wynikać z zaangażowania pozycji T⁹ w tworzenie oddziaływań warstwowych z G-tetradą. W związku z powyższym, zwiększona labilność części cukrowej w resztach UNA może utrudniać przyjęcie odpowiedniego ułożenia zasady heterocyklicznej względem reszty aptameru. Co więcej, powyższy wynik pozostaje w zgodności z danymi literaturowymi dla U^U, gdzie destabilizacja wynosiła 1.08 kcal/mol [131]. Substytucja atomu tlenu siarką w pozycji C4 pierścienia zasady heterocyklicznej w s4U^U nie ma w tym przypadku dużego wpływu na stabilność termodynamiczną badanych wariantów TBA modyfikowanych w pozycji T⁹.



Rysunek 18. Wykres zależności wartości zmian energii swobodnej wariantów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA i UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

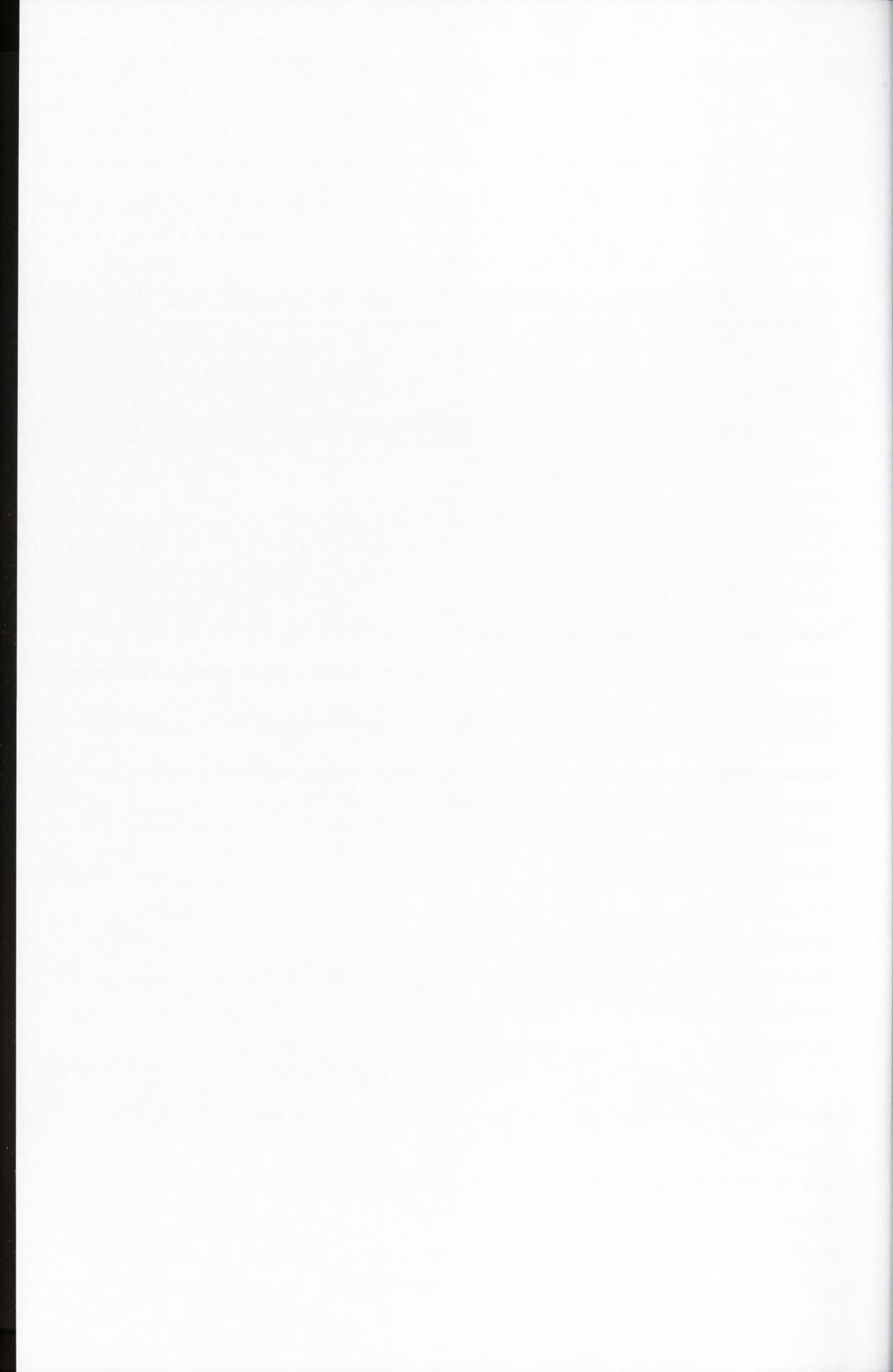
Obniżenie stabilności termodynamicznej cząsteczki TBA zaobserwowano w przypadku wariantów aptameru zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA lub UNA w pozycjach T⁴ i T¹³ pętli TT. Zmiana energii swobodnej względem niemodyfikowanego TBA wynosiła 1.00 oraz 0.94 kcal/mol odpowiednio dla s4U^R i s4U^U w pozycji T⁴ oraz 1.18 i 1.08 kcal/mol dla s4U^R i s4U^U w pozycji T¹³ (Rys. 18, Tab. 3). Uzyskany efekt może być konsekwencją zaburzenia stabilizujących



oddziaływań warstwowych z rdzeniem aptameru oraz wiązań wodorowych [94, 96]. Co więcej, tworzenie tych ostatnich może być dodatkowo utrudnione poprzez substytucję atomu tlenu mniej elektroujemnym atomem siarki w pozycji C4 pierścienia zasady heterocyklicznej. Przypuszczalnie wpływa to niekorzystnie na zdolność powstawania stabilizujących wiązań wodorowych. Mała różnica zmian energii swobodnych pomiędzy wariantami zawierającymi modyfikacje w serii UNA i RNA, wynosząca 0.06 i 0.10 kcal/mol odpowiednio dla pozycji T⁴ i T¹³ (Tab. 3), przemawia za znaczną zależnością obserwowanego efektu destabilizacyjnego od rodzaju modyfikacji części zasadowej wprowadzanej reszty nukleotydowej.

Największy efekt destabilizacyjny zaobserwowano w przypadku wariantu TBA zawierającego resztę s4U^U w pozycji T⁸ aptameru ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1.70$ kcal/mol, względem niemodyfikowanego TBA; Rys. 18, Tab. 3). Wprowadzenie w omawianą pozycję reszty U^U powoduje niekorzystną zmianę energii swobodnej Gibbsa o 1.76 kcal/mol [131]. Powyższe dane sugerują, że obecność atomu siarki w pozycji C4 pierścienia zasady heterocyklicznej nie wpływa w sposób znaczący na stabilność termodynamiczną TBA modyfikowanego w pozycji T⁸. Obserwowany efekt jest natomiast ściśle związany ze zmianą reszty purynowej na pirymidynową, co w konsekwencji zdecydowanie obniża możliwość tworzenia w tej pozycji stabilizującego wiązania wodorowego. Wyraźnie mniej destabilizujący wpływ wywierało wprowadzenie s4U^R w miejsce T⁸. Zmiana energii swobodnej względem niemodyfikowanego TBA wynosiła w tym przypadku 0.47 kcal/mol (Rys. 18, Tab. 3). Różnica wielkości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ parametru dla wariantów posiadających substytucję s4U^R i s4U^U w pozycji T⁸ była równa 1.23 kcal/mol (Tab. 3). Tak duży dysonans pomiędzy efektami wywieranymi przez reszty 4-tiourydyny w serii RNA i UNA może świadczyć o tym, że obserwowany efekt termodynamiczny jest nie tylko zależny od rodzaju reszty zasady heterocyklicznej, ale również od labilności reszty cukrowej. Pozycja T⁸ odgrywa ważną rolę w oddziaływaniach stabilizujących aptamer i każda próba jej modyfikacji manifestuje się zmianami wartości energii swobodnej.

W celu określenia wpływu wielokrotnego podstawienia resztami s4U^R i s4U^U na stabilność termodynamiczną TBA stworzono cztery warianty (zawierające równoczesne podstawienia opisywanymi modyfikacjami w pozycjach T³, T⁷, T⁹ i T¹² oraz T³, T⁷, T⁹ i T¹³). Największą stabilnością termodynamiczną odznaczał się oligonukleotyd zawierający w pozycjach T³, T⁷, T⁹ i T¹² reszty nukleotydowe s4U^R ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1.56$ kcal/mol względem niemodyfikowanego TBA, Rys. 18, Tab. 3),



a zmiana energii swobodnej względem wariantu zawierającego w tej pozycji $s4U^U$ wynosiła -2.07 kcal/mol (Tab. 3). Wprowadzenie reszt $s4U^R$ w pozycje T^3 , T^7 , T^9 oraz T^{13} aptameru powodowało niekorzystną zmianę energii swobodnej względem niemodyfikowanego TBA o 0.35 kcal/mol (Rys. 18, Tab. 3). Największą destabilizację zaobserwowano w przypadku wariantu zawierającego w tych pozycjach $s4U^U$ ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1.58$ kcal/mol, Rys. 18, Tab. 3). Co ciekawe, uzyskane wyniki świadczą o silnie addytywnym charakterze efektu będącego rezultatem wprowadzania opisywanych modyfikacji. Stabilność termodynamiczna wariantu zawierającego wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny w serii UNA lub RNA stanowiła w przybliżeniu sumę wartości stabilności termodynamicznej niemodyfikowanej cząsteczki TBA oraz efektów termodynamicznych wywołanych przez obecność pojedynczych modyfikacji w wybranych pozycjach aptameru (zgodność wartości ΔG°_{37} wyznaczonej eksperymentalnie oraz obliczonej teoretycznie wynosi od 83% do 94%). Jedyny wyjątek od tej reguły stanowił aptamer zawierający reszty $s4U^R$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} , w tym przypadku rozbieżność pomiędzy wartościami obliczonymi eksperymentalnie i teoretycznie wynosiła ponad 100%.

Na podstawie analizy uzyskanych danych możliwe było sformułowanie kilku, ogólnych wniosków. Wprowadzenie reszt 4-tiourydyny w serii RNA jest korzystniejsze termodynamicznie w porównaniu do 4-tiourydyny w serii UNA i w niektórych przypadkach zwiększa stabilność termodynamiczną badanych wariantów. Ponadto, energia swobodna przyjmuje wartość ujemną dla wszystkich badanych oligonukleotydów (Rys. 17). Potwierdziło to tym samym, że analizowane warianty TBA przyjmują strukturę kwadrupeksu w temperaturze 37°C , co jest warunkiem koniecznym do uzyskania efektu antykoagulacyjnego. Podobnie jak w przypadku wariantów modyfikowanych kanonicznymi resztami UNA, również pochodne TBA omawiane w niniejszym podrozdziale zachowują wewnątrzcząsteczkowy charakter struktury G-kwadrupeksu. Potwierdzeniem tego faktu jest brak zależności wartości temperatur topnienia uzyskanych dla różnych stężeń badanej cząsteczki. Dodatkowo, z porównania efektów termodynamicznych wywołanych obecnością U^U [131] oraz $s4U^U$ (Tab. 3) wynika, że w większości przypadków obecność atomu siarki wpływa w pewnym stopniu niekorzystnie na trwałość TBA ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} \sim 0.1 - 0.2$ kcal/mol). Co więcej, zauważono, że efekty termodynamiczne wynikające z wielokrotnego podstawienia resztami 4-tiourydyny w serii RNA i UNA mają silnie addytywny charakter.

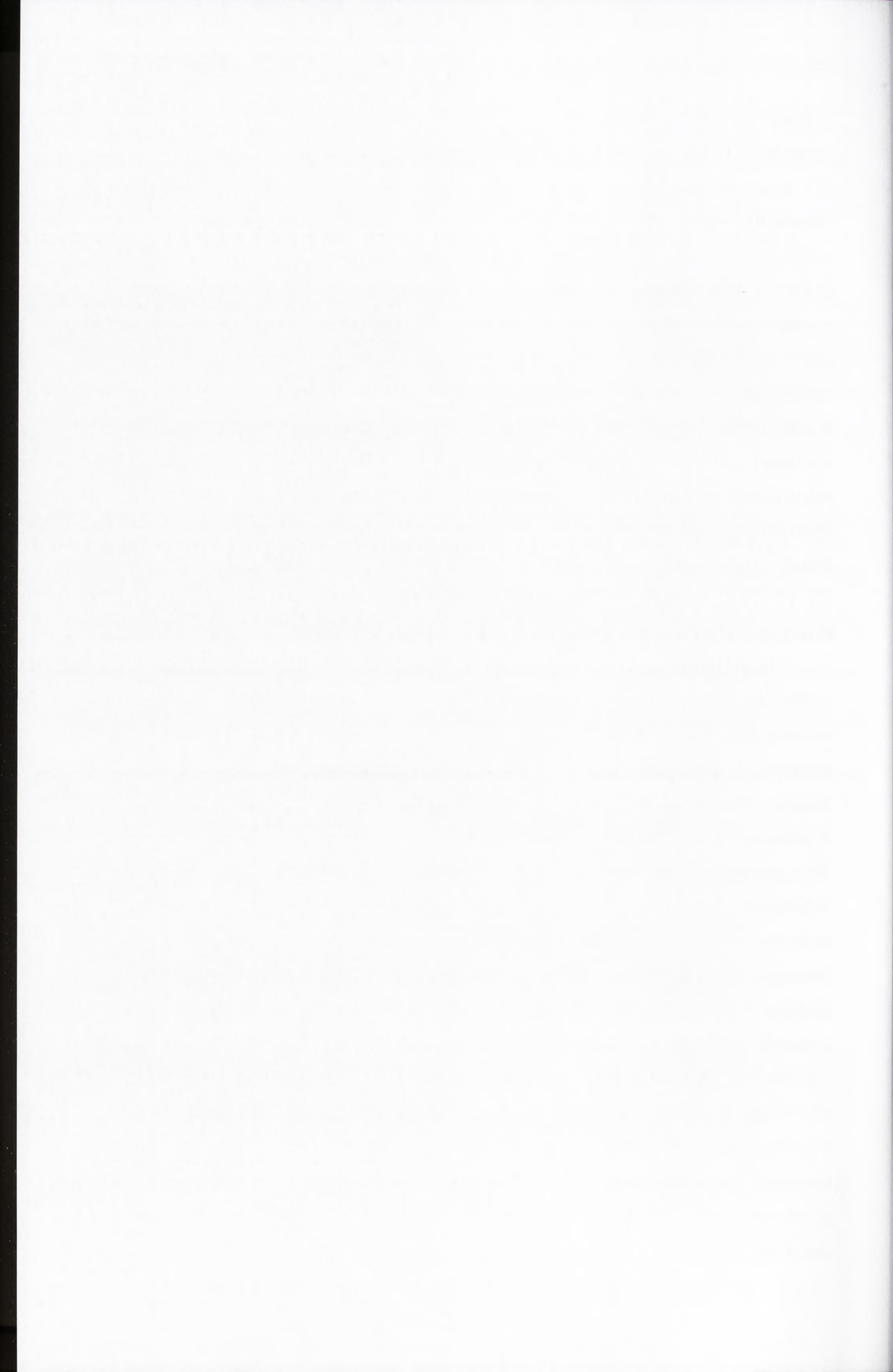
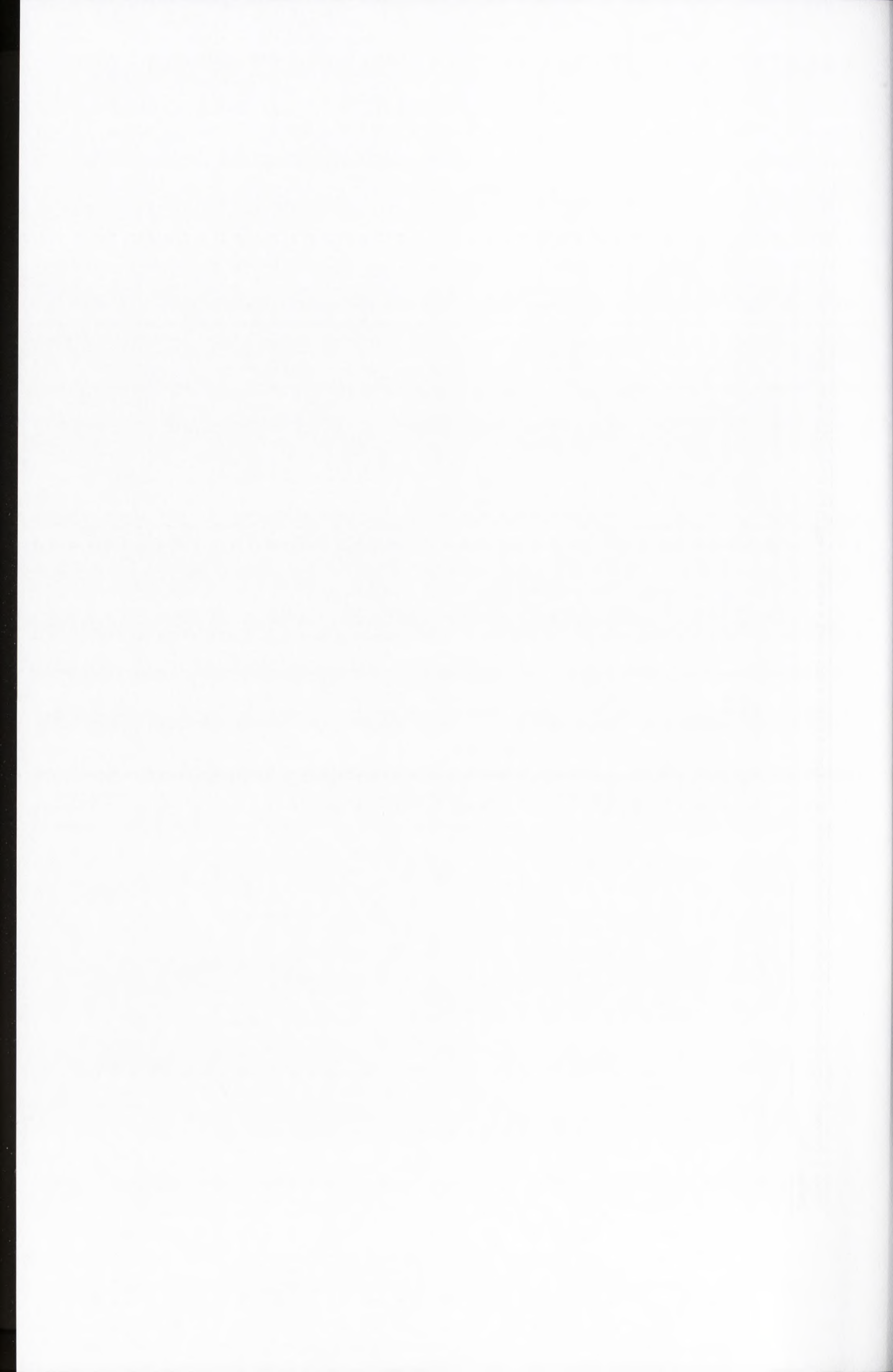


Tabela 3. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupleksów zawierających reszty 4-thiourydyny w serii RNA (s4U^b) lub UNA (s4U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

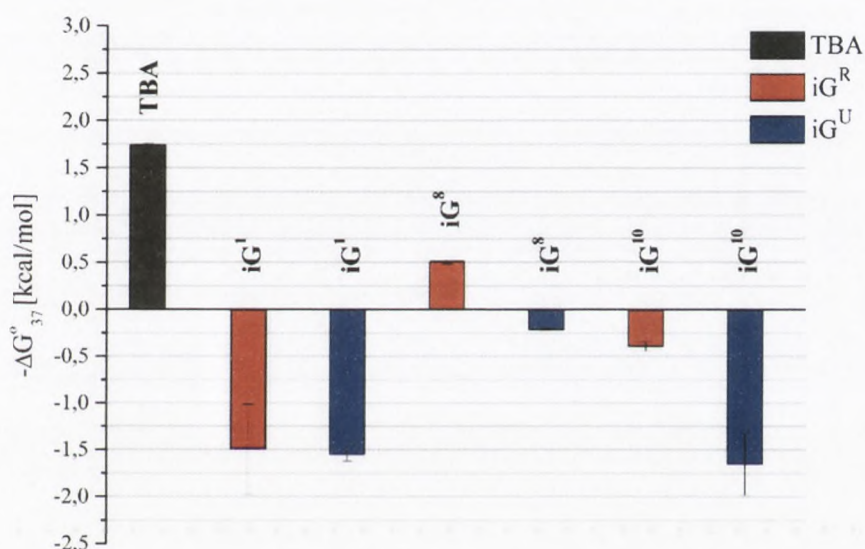
Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnie dopasowania krzywych topnienia							
		-ΔH ^a (kcal/mol)	-ΔS ^a (eu)	ΔG ^{a,37} (kcal/mol)	T _m ^b (°C)	ΔΔG ^{a,37} (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)	ΔΔG ^{a,37} (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)
	GGTTGGTGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0	0	0
T ³	GGs4U ^R TGGTGTGGTTGG	41.7±2.6	127.8±7.8	-2.05±0.16	52.7	-0.31	2.0	0	0
T ³	GGs4U ^U TGGTGTGGTTGG	40.3±1.1	124.3±3.5	-1.74±0.04	51.0	0	0.3	0.31	-1.7
T ⁴	GGT <u>s4U^R</u> GGTGTGGTTGG	40.4±3.3	127.8±7.5	-0.74±0.05	42.8	1.00	-7.9	0	0
T ⁴	GGT <u>s4U^U</u> GGTGTGGTTGG	45.6±8.6	144.4±27.7	-0.80±0.10	42.5	0.94	-8.2	-0.06	-0.3
T ⁷	GGTTGGs4U ^R TGGTTGG	44.0±1.1	134.8±3.4	-2.22±0.05	53.5	-0.48	2.8	0	0
T ⁷	GGTTGGs4U ^U TGGTTGG	40.2±0.6	122.8±1.9	-2.08±0.03	53.9	-0.34	3.2	0.14	0.4
T ⁸	GGTTGGT <u>s4U^R</u> TGGTTGG	39.6±2.3	123.5±7.1	-1.27±0.07	47.3	0.47	-3.4	0	0
T ⁸	GGTTGGT <u>s4U^U</u> TGGTTGG	37.3±0.7	120.2±2.1	-0.04±0.02	37.3	1.70	-13.4	1.23	-10.0
T ⁹	GGTTGGT <u>Gs4U^R</u> GGTTGG	43.2±3.2	132.5±10.0	-2.16±0.09	53.3	-0.42	2.6	0	0
T ⁹	GGTTGGT <u>Gs4U^U</u> GGTTGG	41.6±2.9	131.6±9.1	-0.79±0.08	43.0	0.95	-7.7	1.37	-10.3
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>s4U^R</u> TGG	44.2±1.3	135.1±4.2	-2.27±0.05	53.8	-0.53	3.1	0	0
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>Gs4U^U</u> TGG	40.6±0.6	125.2±2.0	-1.74±0.03	50.9	0	0.2	0.53	-2.9
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>s4U^R</u> GG	35.9±0.8	114.0±2.7	-0.56±0.04	41.9	1.18	-9.5	0	0
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>s4U^U</u> GG	37.3±1.1	118.2±3.5	-0.66±0.02	42.6	1.08	-8.1	-0.10	0.7
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGs4U ^R TGG	46.6±1.2	139.5±3.5	-3.30±0.08	60.6	-1.56	9.9	0	0
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGs4U ^U TGG	37.8±2.8	118.0±8.9	-1.23±0.08	47.4	0.51	-3.3	2.07	-13.2
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGT <u>s4U^R</u> GG	37.9±1.1	117.6±3.4	-1.39±0.05	48.8	0.35	-1.9	0	0
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGT <u>s4U^U</u> GG	26.2±3.6	84.0±11.5	-0.16±0.08	38.9	1.58	-11.8	1.23	-9.9

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na), pH 7.0, b – obliczone dla stężenia 10⁻⁴ M



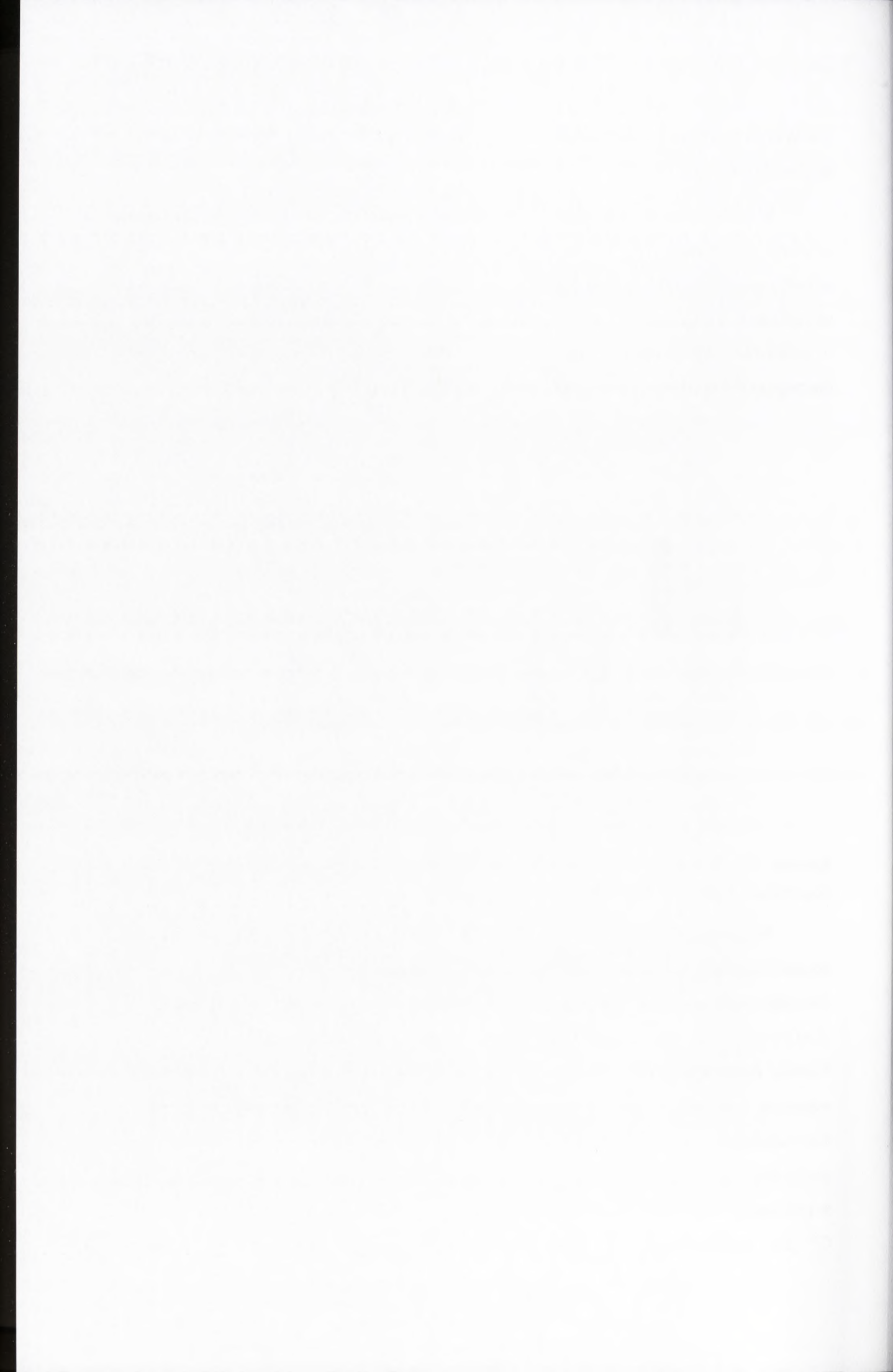
1.3 Wpływ podstawienia resztami izoguanozyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA

W celu określenia wpływu pojedynczego oraz wielokrotnego podstawienia resztami izoguanozyny w serii RNA (iG^R) lub UNA (iG^U) na stabilność termodynamiczną TBA zaprojektowano 14 aptamerów. Miejsca modyfikacji wybrano na podstawie dotychczasowych doniesień literaturowych. Obecność reszt izoguanozyny w serii DNA w pozycjach G^1 , G^8 oraz G^{10} została opisana jako wyjątkowo korzystna dla poprawy właściwości antykoagulacyjnych TBA [119].

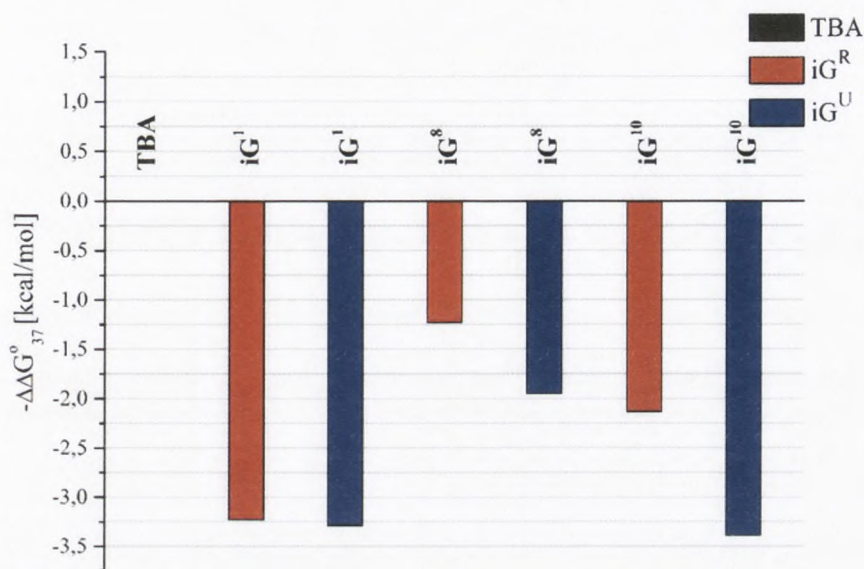


Rysunek 19. Wykres zależności wartości energii swobodnej wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Wprowadzenie reszt iG^R i iG^U w powyższe pozycje powodowało znaczne obniżenie stabilności termodynamicznej badanych wariantów TBA (Rys. 19). Najmniej destabilizujący efekt uzyskano poprzez wprowadzenie iG^R w pozycję G^8 aptameru ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ względem niemodyfikowanego TBA wynosiła 1,23 kcal/mol; Rys. 20, Tab. 4). Wariant zawierający substytucję reszty G^8 izoguanozyną w serii UNA odznaczał się wartością zmiany energii swobodnej równą 1,95 kcal/mol względem niemodyfikowanego TBA (Rys. 20, Tab. 4). Uzyskane różnice w wartości energii swobodnej są najprawdopodobniej rezultatem braku obecności atomu tlenu O6 w pierścieniu zasady heterocyklicznej, który w przypadku reszty guanozyny w pozycji G^8 jest zaangażowany w oddziaływania z rdzeniem G-kwadrupleksu poprzez



utworzenie wiązania wodorowego z grupą aminową reszty guanozyny w pozycji G¹ [105]. Co więcej, wprowadzenie w tę pozycję modyfikacji zwiększającej elastyczność szkieletu cukrowego w regionie pętli najprawdopodobniej utrudnia przyjęcie odpowiedniego ułożenia względem siebie tych dwóch reszt nukleotydowych, co znajduje odzwierciedlenie w różnicy zmian energii swobodnej wariantów zawierających modyfikacje resztami iG^R i iG^U (Tab. 4).



Rysunek 20. Wykres zależności wartości zmian energii swobodnej wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

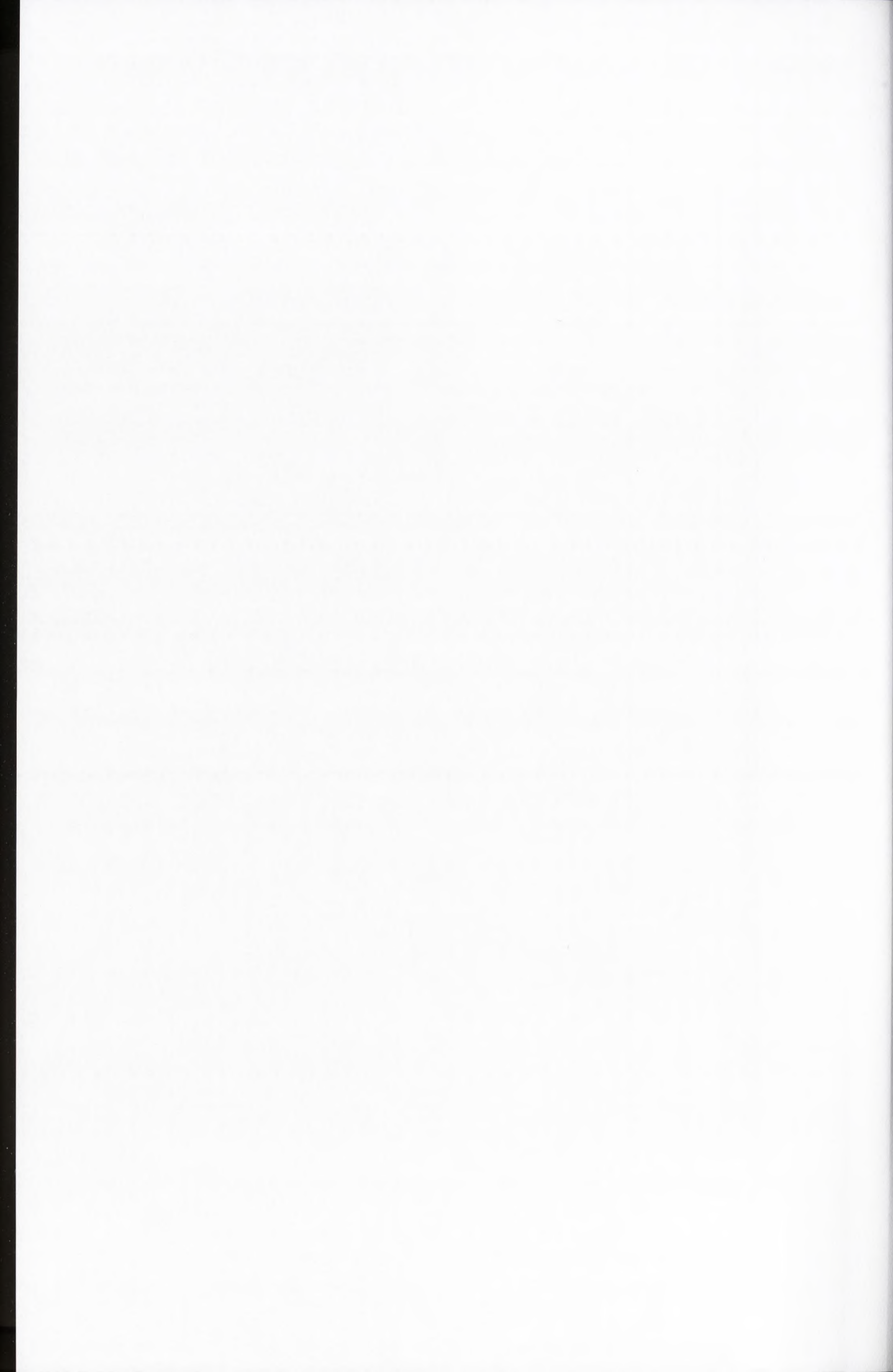
Największą destabilizację kwadrupleksu wynikającą z pojedynczego podstawienia uzyskano wprowadzając omawiane modyfikacje w pozycję G¹ aptameru. Zmiana energii swobodnej względem niemodyfikowanego aptameru wynosiła 3.23 kcal/mol i 3.29 kcal/mol dla wariantów zawierających odpowiednio reszty iG^R i iG^U (Rys. 20, Tab. 4). Obserwowana wysoka wartość parametru $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ świadczy o dużym wpływie pochodnych guanozyny na stabilność termodynamiczną TBA. Jak już wcześniej wspomniano grupa aminowa w G¹ jest zaangażowana w tworzenie stabilizującego wiązania wodorowego z atomem tlenu O6 w G⁸ [105], jej brak może zatem wpływać na poziom stabilności termodynamicznej badanych aptamerów. Ponadto, reszta guanozyny w pozycji G¹ zaangażowana jest w tworzenie G-tetrazy.



Tabela 4. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupleksów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA (iG^B) lub UNA (iG^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnie dopasowanie krzywych topnienia							
		-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _m ^b (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)
	GGTTGGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0	0	0
G ¹	iG^R GGTTGGTGGTTGG	25.6±3.8	87.3±13.6	1.49±0.48	19.9	3.23	-30.8	0	0
G ¹	iG^U GGTTGGTGGTTGG	27.9±3.7	95.0±12	1.55±0.07	20.7	3.29	-30.0	0.06	0.8
G ⁸	GGTTGGT iG^R TGGTTGG	35.3±1.0	112.3±3.2	-0.51±0.02	41.6	1.23	-9.1	0	0
G ⁸	GGTTGGT iG^U TGGTTGG	35.4±1.0	114.8±3.2	0.21±0.01	35.1	1.95	-15.6	0.72	-6.5
G ¹⁰	GGTTGGT iG^R GTTGG	23.7±5.5	77.5±17.9	0.39±0.05	31.9	2.13	-18.8	0	0
G ¹⁰	GGTTGGT iG^U GTTGG	37.1±9.3	125.0±30.5	1.65±0.33	23.8	3.39	-26.9	1.26	-8.1
G ¹ , G ⁸	iG^R GGTTGGT iG^R TGGTTGG	27.3±1.6	92.5±5.3	1.36±0.14	22.3	3.10	-28.4	-	-
G ¹ , G ⁸	iG^U GGTTGGT iG^U TGGTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGT iG^R iG^R GTTGG	32.4±2.3	105.4±7.4	0.31±0.01	34.1	2.05	-16.6	-	-
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGT iG^U iG^U GTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-
G ¹ , G ¹⁰	iG^R GGTTGGT iG^R GTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-
G ¹ , G ¹⁰	iG^U GGTTGGT iG^U GTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-
G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG^R GGTTGGT iG^R iG^R GTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-
G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG^U GGTTGGT iG^U iG^U GTTGG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0, b – obliczone dla siężenia 10⁻⁴ M

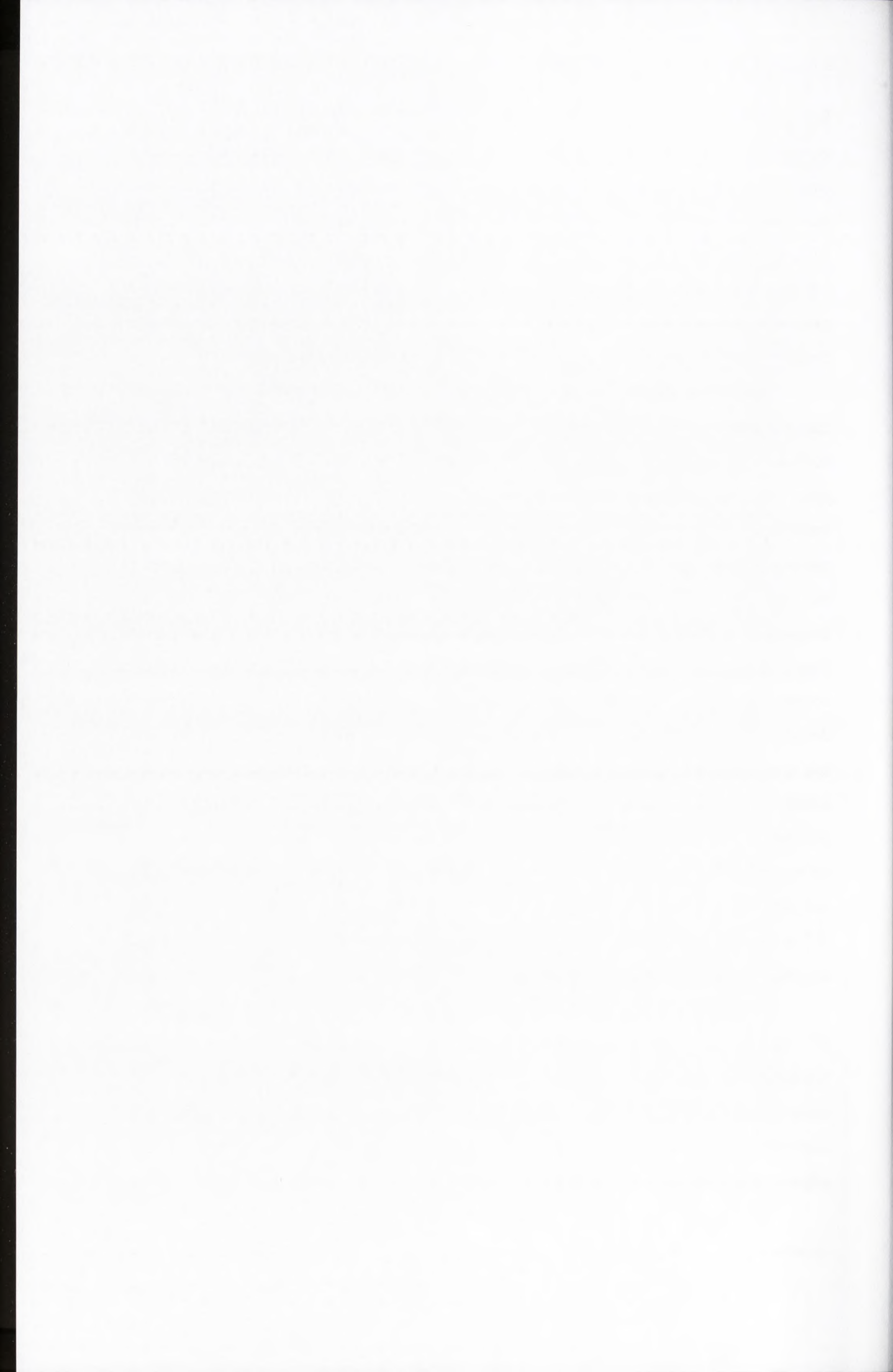


Wprowadzenie modyfikacji RNA w miejsca, w których naturalnie występują reszty guanozyny w konformacji *syn* również przyczynia się do obniżenia stabilności termodynamicznej TBA. Obserwowana destabilizacja jest więc konsekwencją zarówno zaburzenia tworzenia wiązań wodorowych w obrębie G-tetrazy spowodowanego zmianą pozycji atomu tlenu oraz grupy egzoaminowej względem reszty guanozyny, jak i przyjęcia przez pierścień rybozy konformacji *C3'-endo* wymuszającej ułożenie *anti* zasady heterocyklicznej względem reszty cukrowej. Uzyskane dane eksperymentalne znalazły potwierdzenie w aktualnych doniesieniach literaturowych [125, 166].

Największa różnica pomiędzy zmianami energii swobodnej Gibbsa wariantów zawierających substytucje resztami iG^R ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 2.13$ kcal/mol) i iG^U ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 3.39$ kcal/mol) występowała w przypadku wprowadzenia tych modyfikacji w pozycję G^{10} aptameru i przyjmowała wartość 1.26 kcal/mol (Tab. 4). Otrzymane wyniki mogą świadczyć o silnej zależności obserwowanego efektu od rodzaju modyfikacji reszty cukrowej. Podobnie jak w przypadku pozycji G^1 , reszta guanozyny w pozycji G^{10} wchodzi w skład G-tetrazy i występuje w konformacji *syn*. Wprowadzenie izoguanozyny w serii RNA wymusza najprawdopodobniej przyjęcie konformacji *anti* i wpływa tym samym na stabilność termodynamiczną badanych wariantów. Ponadto, zostaje zaburzone tworzenie wiązań wodorowych w obrębie G-tetrazy. Dodatkowa destabilizacja wynikająca z obecności reszty iG^U w porównaniu do iG^R może być spowodowana zwiększeniem elastyczności rdzenia kwadrupleksu. Podobnego efektu nie zaobserwowano dla modyfikacji iG^U obecnej w pozycji G^1 , jednakże w tym przypadku terminalne ułożenie powoduje najprawdopodobniej większą tolerancję na wprowadzone zmiany strukturalne w porównaniu z pozycją wewnętrzną G^{10} . Jak dotąd nie pojawiły się doniesienia literaturowe świadczące o zaangażowaniu reszty G^{10} w inne niż budujące G-tetradę oddziaływania, które mogłyby stanowić wyjaśnienie uzyskanych danych eksperymentalnych.

Równoczesne, wielokrotne podstawienie resztami iG^R lub iG^U w pozycjach G^1 , G^8 i G^{10} powodowało silną destabilizację i jedynie w przypadku dwóch wariantów, zawierających opisywaną modyfikację w serii RNA, możliwe było uzyskanie danych termodynamicznych (Tab. 4). Wartości zmiany energii swobodnej Gibbsa względem niemodyfikowanego TBA wynosiły 3.10 i 2.05 kcal/mol dla aptameru zawierającego odpowiednio substytucję G^1 i G^8 oraz G^8 i G^{10} .

Na podstawie analizy uzyskanych danych możliwe było stwierdzenie, że wprowadzenie reszt izoguanozyny w serii UNA i RNA wpływa niekorzystnie

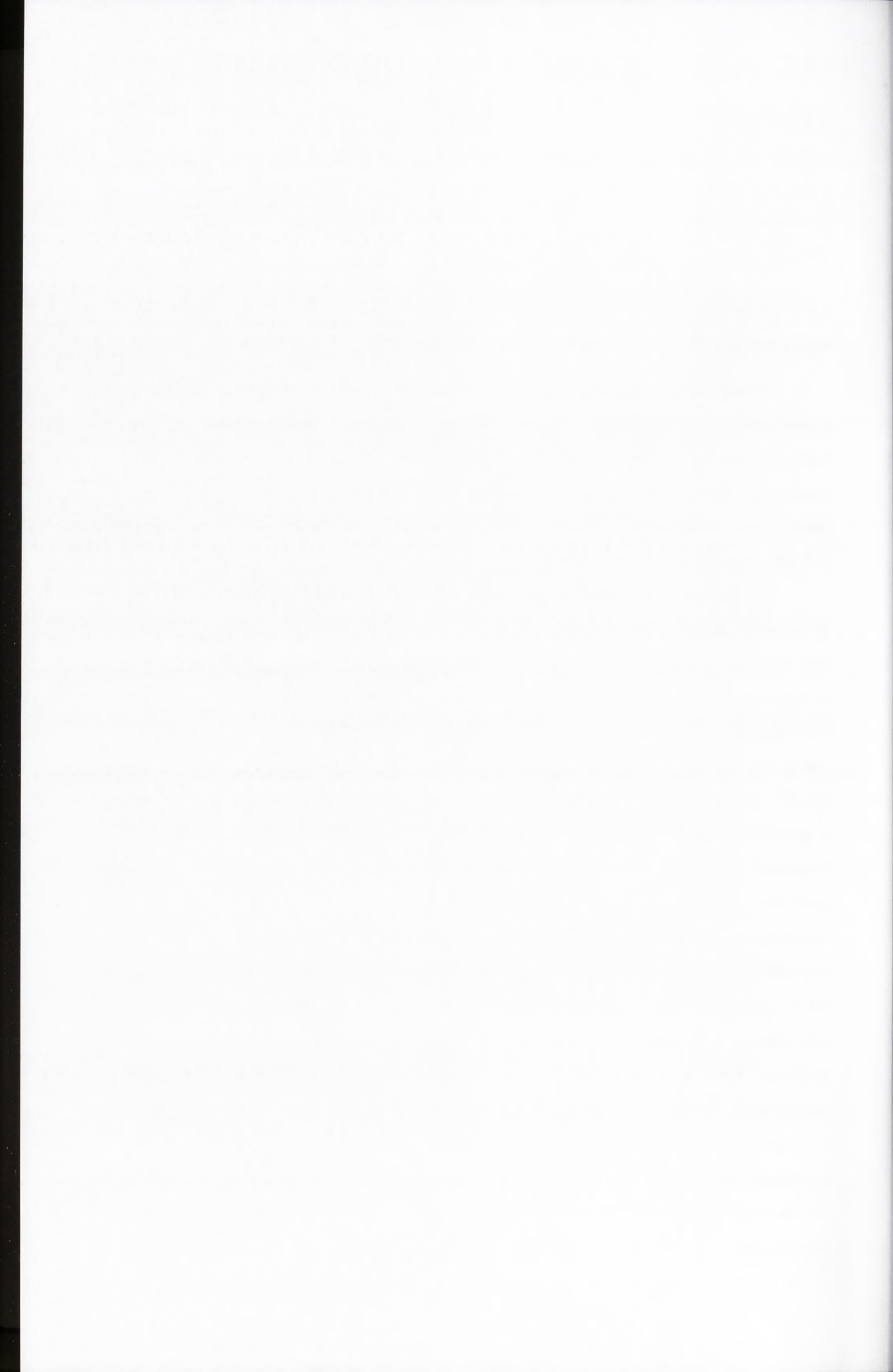


na stabilność termodynamiczną TBA, a uzyskany efekt jest silnie zależny od pozycji, w którą wprowadzono modyfikację. Energia swobodna wszystkich badanych wariantów, z wyjątkiem oligonukleotydu zawierającego iG^R w pozycji G^8 (Rys. 19), przyjmowała wartość dodatnią co świadczy o tym, że cząsteczki te w temperaturze 37°C nie przyjmują struktury G-kwadrupleksu.

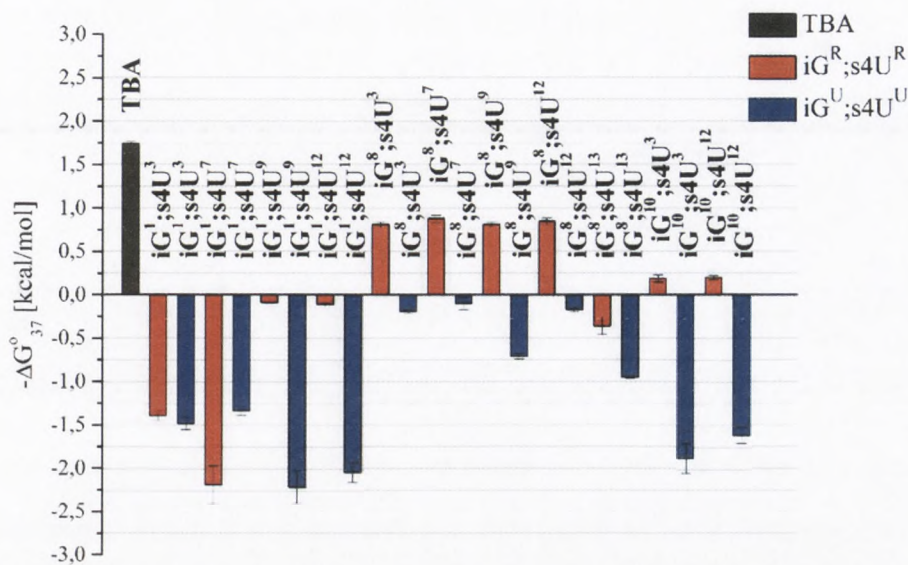
1.4 Wpływ równoczesnego podstawienia resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny typu UNA lub RNA na trwałość termodynamiczną TBA

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla pojedynczego podstawienia resztami 4-tiourydyny oraz izoguanozyny w serii RNA lub UNA postanowiono określić również wpływ równoczesnego wprowadzenia tych modyfikacji na stabilność termodynamiczną cząsteczki TBA. Zastosowane w eksperymentach oligonukleotydy zawierały jednocześnie pojedynczą resztę: $s4U^R$ lub $s4U^U$ w pozycji T^3 , T^7 , T^9 , T^{12} lub T^{13} oraz iG^R lub iG^U w pozycji G^1 , G^8 lub G^{10} .

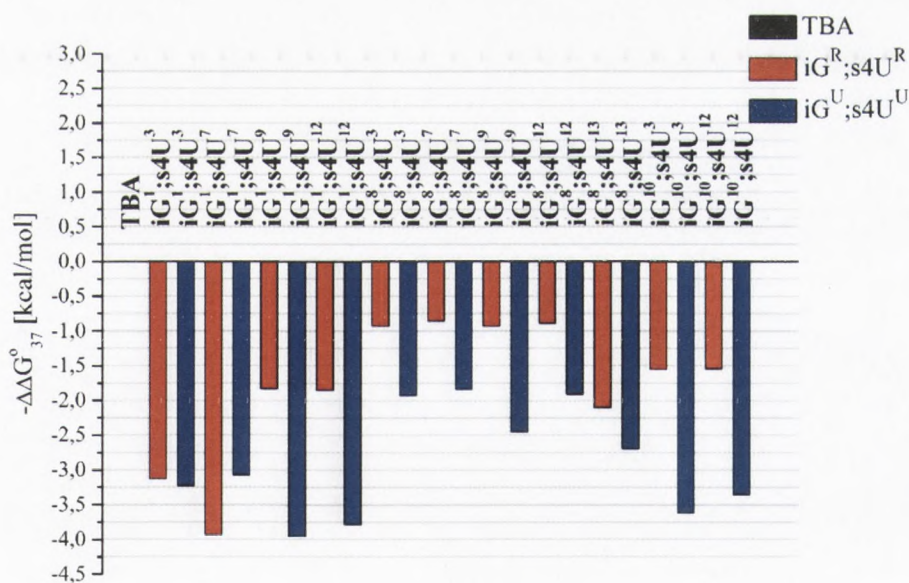
Jak już wcześniej wspomniano, wprowadzenie reszt izoguanozyny w pozycję G^1 aptameru powodowało silną destabilizację. Zmniejszenie tego niekorzystnego efektu było możliwe dzięki równoczesnemu wprowadzeniu reszt iG^R w pozycję G^1 oraz $s4U^R$ w pozycję T^9 lub T^{12} ($\Delta\Delta G_{37}^\circ$ względem niemodyfikowanego aptameru wynosiła odpowiednio 1.83 i 1.85 kcal/mol, Rys.21 oraz Rys. 22, Tab. 5). Brak wyraźnej zmiany stabilności termodynamicznej (względem wariantu TBA zawierającego reszty iG^U lub iG^R w pozycji G^1) zaobserwowano dla wariantów zawierających reszty iG^U w pozycji G^1 oraz $s4U^U$ w pozycji T^3 lub T^7 oraz dla wariantu zawierającego resztę iG^R w pozycji G^1 i $s4U^R$ w pozycji T^3 (wartość $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ względem niemodyfikowanego aptameru wynosiła odpowiednio 3.22, 3.07 oraz 3.13 kcal/mol, Tab. 5, Rys. 22). Zwiększenie destabilizującego wpływu wprowadzenia omawianych modyfikacji zauważono w przypadku równoczesnego umieszczenia reszt $iG^{R/U}$ w pozycji G^1 , reszty $s4U^U$ w pozycji T^9 lub T^{12} albo $s4U^R$ w pozycji T^7 ($\Delta\Delta G_{37}^\circ$ wynosiła odpowiednio 3.92, 3.95 oraz 3.78 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5). W większości z powyższych przypadków możliwe było obliczenie stabilności termodynamicznej badanych wariantów na podstawie sumowania wartości ΔG_{37}° dla niemodyfikowanego TBA oraz $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ otrzymanych dla wariantów zawierających pojedynczą substytucję jedną z wprowadzanych modyfikacji w poszczególnych pozycjach (zgodność wartości ΔG_{37}° wyznaczonej eksperymentalnie oraz obliczonej teoretycznie wynosiła od 70% do 98%). Wyznaczenie parametrów termodynamicznych dla wariantów TBA zawierających



równoczesną substytucję $iG^{R/U}$ i $s4U^{R/U}$ w pozycji odpowiednio G^1 i T^{13} było niemożliwe ze względu na duży destabilizujący efekt wywierany poprzez wprowadzenie powyższych modyfikacji (Tab. 5).



Rysunek 21. Wykres zależności wartości energii swobodnej wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.



Rysunek 22. Wykres zależności wartości zmian energii swobodnej wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.



Tabela 5. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-tiouracydiny w serii RNA ($iG^R_s4U^R$) lub UNA ($iG^U_s4U^U$). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnia dopasowania krzywych topnienia									
		$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	ΔG°_{37} (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_m^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_m^b (°C)		
	GGTTGGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0	0	0	0	0
G ¹	$iG^R_s4U^R$ GGTTGGTTGG	25.6±3.8	87.3±13.6	1.49±0.48	19.9	3.23	-30.8	0.06	0.8	0	0
G ¹	$iG^U_s4U^U$ GGTTGGTTGG	27.9±3.7	95.0±12	1.55±0.07	20.7	3.29	-30	0	0	0	0
G ¹ , T ³	$iG^R_s4U^R$ TGGTTGGTTGG	52.7±4.7	174.3±15.3	1.39±0.06	29.0	3.13	-21.7	0.09	-8.4	0	0
G ¹ , T ³	$iG^U_s4U^U$ TGGTTGGTTGG	26.5±1.3	90.1±4.3	1.48±0.07	20.6	3.22	-30.1	0	0	0	0
G ¹ , T ⁷	iG^R GTTGGs4U ^R GTTGGTTGG	31.9±6.2	109.8±20.6	2.18±0.22	17.1	3.92	-33.6	0	0	0	0
G ¹ , T ⁷	iG^U GTTGGs4U ^U GTTGGTTGG	27.5±1.8	93.0±6.1	1.33±0.06	22.7	3.07	-28	-0.85	5.6	0	0
G ¹ , T ⁹	iG^R GTTGGTGs4U ^R GGTTGG	26.2±1.3	84.7±4.0	0.09±0.01	36.0	1.83	-14.7	0	0	0	0
G ¹ , T ⁹	iG^U GTTGGTGs4U ^U GGTTGG	38.1±3.9	129.9±13.1	2.21±0.19	20.0	3.95	-30.7	2.12	-16.0	0	0
G ¹ , T ¹²	iG^R GTTGGTGGs4U ^R TGG	31.9±3.7	103.2±11.9	0.11±0.02	35.9	1.85	-14.8	0	0	0	0
G ¹ , T ¹²	iG^U GTTGGTGGs4U ^U TGG	33.9±3.9	115.7±12.6	2.04±0.11	19.4	3.78	-31.3	1.93	-16.5	0	0
G ¹ , T ¹³	iG^R GTTGGTGGTGs4U ^R GG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-	-	-
G ¹ , T ¹³	iG^U GTTGGTGGTGs4U ^U GG	n.d.	n.d.	n.d.	<15.0	-	-	-	-	-	-
G ⁸	GGTTGGT iG^R TGGTTGG	35.3±1.0	112.3±3.2	-0.51±0.02	41.6	1.23	-9.1	0	0	0	0
G ⁸	GGTTGGT iG^U TGGTTGG	35.4±1.0	114.8±3.2	0.21±0.01	35.1	1.95	-15.6	0.72	-6.5	0	0
T ³ , G ⁸	GGs4U ^R TGGT iG^R TGGTTGG	36.4±2.1	114.7±6.6	-0.81±0.03	44.1	0.93	-6.6	0	0	0	0
T ³ , G ⁸	GGs4U ^U TGGT iG^U TGGTTGG	34.1±0.5	110.5±1.7	0.19±0.02	35.2	1.93	-15.5	1	-8.9	0	0
T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs4U ^R iG^R TGGTTGG	37.8±0.7	119.1±2.0	-0.88±0.04	44.4	0.86	-6.3	0	0	0	0
T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs4U ^U iG^U TGGTTGG	37.5±4.2	121.3±13.6	0.1±0.07	36.1	1.84	-14.6	0.98	-8.3	0	0



Tabela 5 (cd.). Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupleksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-tiouracydyny w serii RNA (iG^Rs4U^R) lub UNA (iG^Us4U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnia dopasowania krzywych topnienia							
		-ΔH ^c (kcal/mol)	-ΔS ^c (eu)	ΔG ^{c,37} (kcal/mol)	T _m ^b (°C)	ΔΔG ^{c,37} (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)	ΔΔG ^{c,37} (kcal/mol)	ΔT _m ^b (°C)
	GGTTGGTGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0	0	0
G ⁸ , T ⁹	GGTTGGT <i>G</i> ^R s4U ^R GGTTGG	34.1±1.6	107.3±5.1	-0.81±0.03	44.5	0.93	-6.2	0	0
G ⁸ , T ⁹	GGTTGGT <i>G</i> ^U s4U ^U GGTTGG	32.7±1.0	107.8±3.3	0.71±0.03	30.4	2.45	-20.3	1.52	-14.1
G ⁸ , T ¹²	GGTTGGT <i>G</i> ^R TGGs4U ^R TGG	38.3±1.5	120.7±4.9	-0.85±0.04	44.1	0.89	-6.6	0	0
G ⁸ , T ¹²	GGTTGGT <i>G</i> ^U TGGs4U ^U TGG	33.0±1.0	107.0±3.2	0.17±0.02	35.4	1.91	-15.3	1.02	-8.7
G ⁸ , T ¹³	GGTTGGT <i>G</i> ^R TGGT <i>s4U</i> ^R GG	32.1±2.0	104.5±6.1	0.36±0.10	33.6	2.10	-17.1	0	0
G ⁸ , T ¹³	GGTTGGT <i>G</i> ^U TGGT <i>s4U</i> ^U GG	31.6±0.7	105.1±2.2	0.95±0.01	28.0	2.69	-22.7	0.59	-5.6
G ¹⁰	GGTTGGT <i>G</i> ^R TGGTTGG	23.7±5.5	77.5±17.9	0.39±0.05	31.9	2.13	-18.8	0	0
G ¹⁰	GGTTGGT <i>G</i> ^U TGGTTGG	37.1±9.3	125.0±30.5	1.65±0.33	23.8	3.39	-26.9	1.26	-8.1
T ³ , G ¹⁰	GGs4U ^R TGGT <i>G</i> ^R TGGTTGG	38.8±7.7	124.6±24.6	-0.19±0.04	38.5	1.55	-12.2	0	0
T ³ , G ¹⁰	GGs4U ^U TGGT <i>G</i> ^U TGGTTGG	37.7±1.8	127.4±5.8	1.87±0.17	22.3	3.61	-28.4	2.06	-16.2
T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^R G <i>T</i> ^R GTTGG	36.4±1.6	116.7±5.1	-0.21±0.02	38.8	1.53	-11.9	-	-
T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^U G <i>T</i> ^U GTTGG*	-	-	-	-	-	-	-	-
T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGT <i>G</i> ^R s4U ^R GTTGG	30.4±1.1	96.2±3.5	-0.54±0.02	42.6	1.2	-8.1	-	-
T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGT <i>G</i> ^U s4U ^U GTTGG*	-	-	-	-	-	-	-	-
G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGT <i>G</i> ^R Gs4U ^R TGG	35.5±0.9	113.8±2.7	-0.2±0.02	38.7	1.54	-12.0	0	0
G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGT <i>G</i> ^U Gs4U ^U TGG	30.1±0.8	102.2±2.3	1.61±0.09	21.3	3.35	-29.4	1.81	-17.4
G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGT <i>G</i> ^R G <i>T</i> ^R s4U ^R GG	28.6±0.6	94.1±1.9	0.6±0.02	30.6	2.34	-20.1	-	-
G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGT <i>G</i> ^U G <i>T</i> ^U s4U ^U GG*	-	-	-	-	-	-	-	-

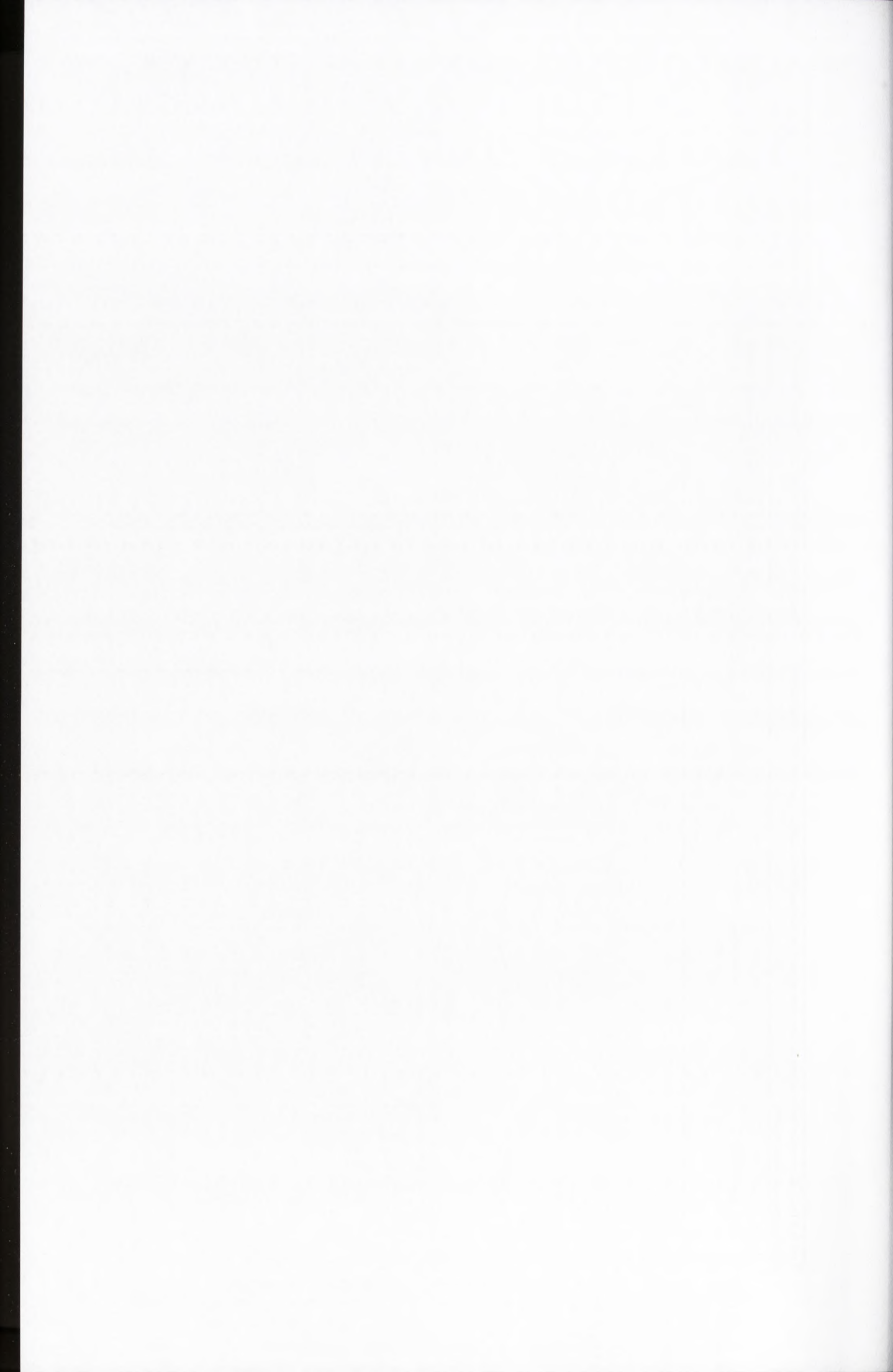


Tabela 5 (cd.). Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-tiourydyny w serii RNA (iG^R-s4U^B) lub UNA (iG^U-s4U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnia dopasowania krzywych topnienia							
		-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _M ^b (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _M ^b (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _M ^b (°C)
	GGTTGGTGGTTGG	41.2±0.9	127.2±2.7	-1.74±0.02	50.7	0	0		
G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^R Gs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R GG	24.0±2.0	80.5±6.6	0.99±0.08	24.7	2.73	-26.0		
G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG*	-	-	-	-	-	-		
T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R iG ^R s4U ^R GGTs4U ^R GG	31.1±6.9	98.5±22.0	-0.50±0.09	42.0	1.24	-8.7		
T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U GGTs4U ^U GG*	-	-	-	-	-	-		
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R iG ^R GTs4U ^R GG	30.7±3.7	98.4±11.9	-0.17±0.04	38.7	1.57	-12.0		
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U iG ^U GTs4U ^U GG*	-	-	-	-	-	-		
G ¹ , T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	iG ^R Gs4U ^R TGGs4U ^R iG ^R s4U ^R iG ^R GTs4U ^R GG	n.d.	n.d.	n.d.	<15	-	-		
G ¹ , T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U iG ^U GTs4U ^U GG	n.d.	n.d.	n.d.	<15	-	-		

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0, b – obliczone dla stężenia 10⁻⁷ M, * dane termodynamiczne umieszczono w Tabeli 6

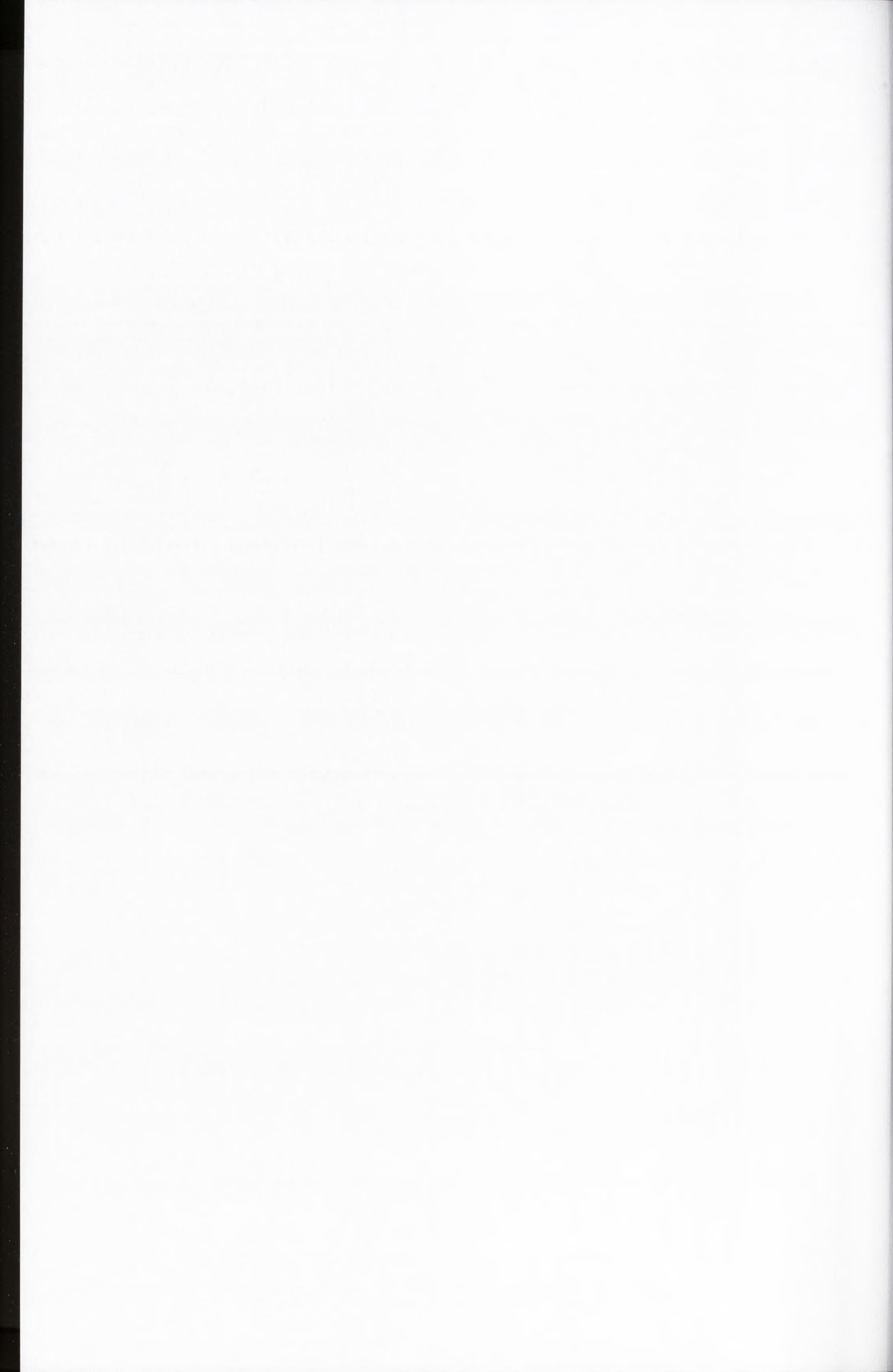
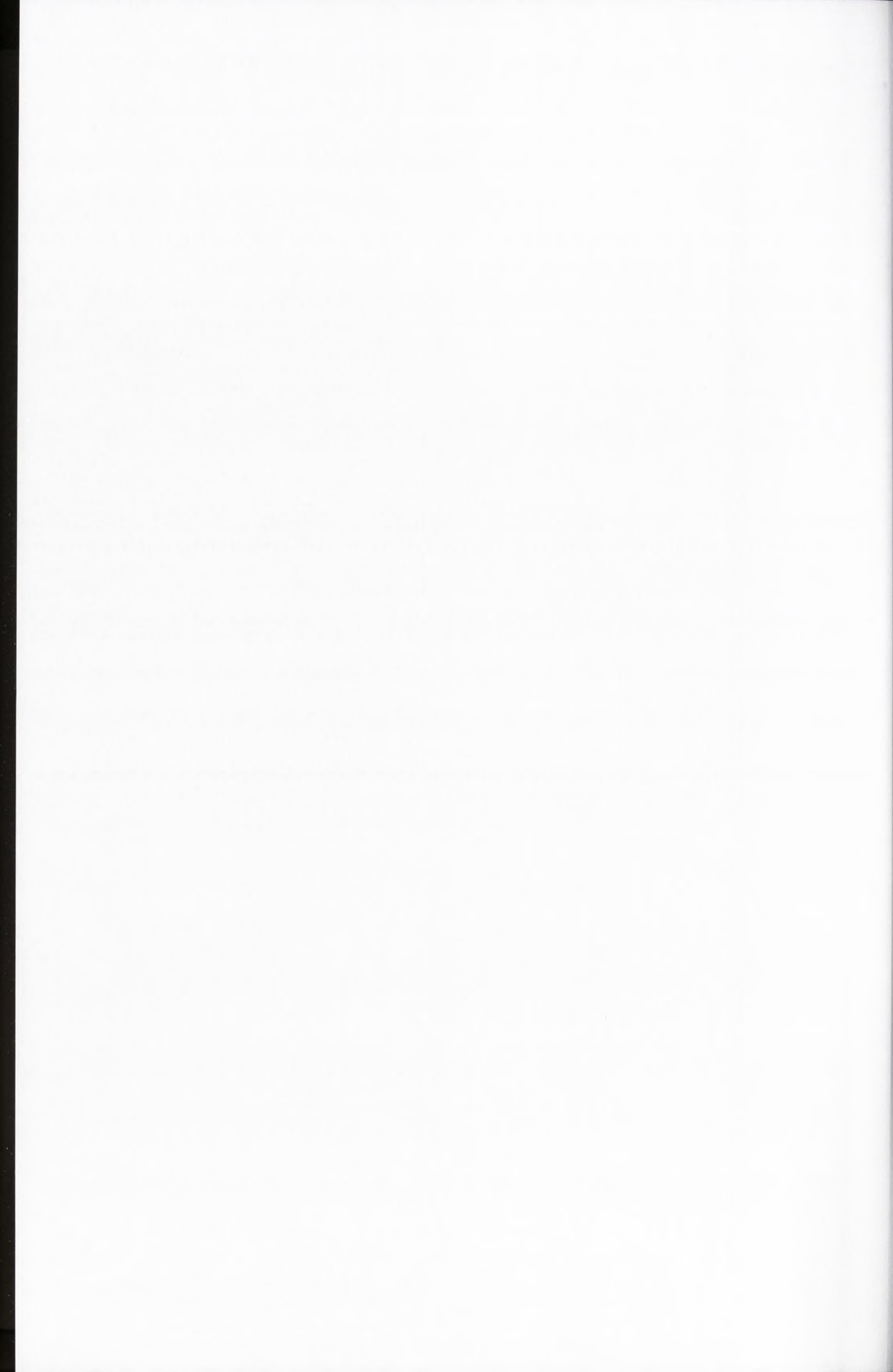


Tabela 6. Parametry termodynamiczne tworzenia G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-tiourydyny w serii RNA (iG^Rs4U^R) lub UNA (iG^Us4U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia^a.

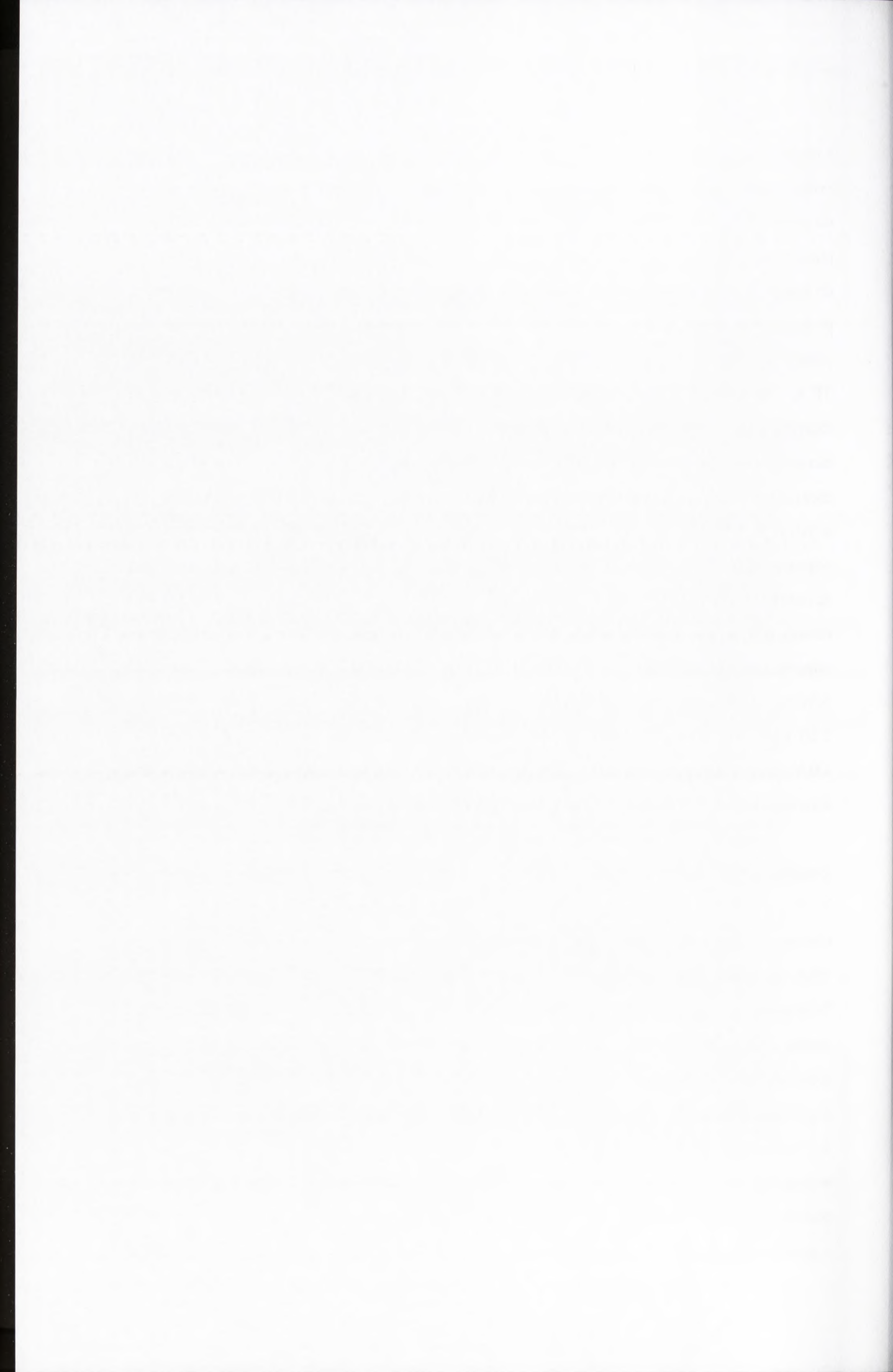
Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Średnie dopasowania krzywych topnienia					Wykres zależności T _M ⁻¹ od log C _T				
		-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _M ^b (°C)	-ΔH° (kcal/mol)	-ΔS° (eu)	ΔG° ₃₇ (kcal/mol)	T _M ^b (°C)	ΔΔG° ₃₇ (kcal/mol)	ΔT _M ^b (°C)
GGTTGGTGTGGTTGG											
T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^U GTiG ^U GTTGG	51.0±2.9	151.9±10.1	-3.87±0.25	26.4	57.5±1.6	174.2±5.3	-3.45±0.10	25.4	-	-25.3
T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGS4U ^U iG ^U GTTGG	51.3±4.0	155.3±13.5	-3.09±0.16	22.1	46.2±2.9	138.3±9.7	-3.32±0.16	21.9	-	-28.8
G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTGTiG ^U GTs4U ^U GG	51.2±2.0	155.4±6.7	-2.95±0.17	21.3	56.2±8.5	172.7±29.1	-2.63±0.54	21.1	-	-29.6
G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG	48.6±8.9	143.6±30.0	-4.01±0.49	26.7	47.6±4.1	140.7±13.7	-3.95±0.21	26.1	-	-24.6
T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U GGTs4U ^U GG	52.6±7.1	155.3±23.5	-4.39±0.17	29.6	45.9±0.7	133.3±2.4	-4.52±0.03	29.4	-	-21.3
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U iG ^U GTs4U ^U GG	58.3±1.7	175.2±5.7	-3.98±0.15	28.2	51.9±4.9	153.9±16.3	-4.19±0.19	28.4	-	-22.3

a – bufor: 100 mM KCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0, b – obliczone dla stężenia 10⁻⁴ M



Równoczesne wprowadzenie reszt $iG^{R/U}$ w pozycję G^8 oraz $s4U^{R/U}$ w jedną z następujących pozycji: T^3 , T^7 , T^9 lub T^{12} w większości przypadków powodowało zwiększenie stabilności termodynamicznej badanych wariantów w porównaniu do oligonukleotydów zawierających pojedynczą substytucję wspomnianą pochodną guanozyny (Rys. 21). Zauważono jednak znaczną destabilizację w stosunku do aptamerów posiadających pojedynczą substytucję resztami $s4U^{R/U}$. Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że obserwowane efekty termodynamiczne stanowią w przybliżeniu sumę efektów termodynamicznych uzyskanych dla wariantów TBA zawierających pojedyncze podstawienie każdym rodzajem omawianych modyfikacji nukleotydowych. Zgodność wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wyznaczonej eksperymentalnie oraz obliczonej teoretycznie wynosiła od 70% do 99%. Najmniej niekorzystny efekt uzyskano w przypadku substytucji resztami $s4U$ w serii RNA w pozycji T^3 , T^7 , T^9 lub T^{12} oraz iG^R w pozycji G^8 (wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosiła odpowiednio 0.93, 0.86, 0.93 oraz 0.89 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5). Znaczną destabilizację względem niemodyfikowanego TBA zaobserwowano, gdy do aptameru równocześnie wprowadzono: resztę iG w serii UNA bądź RNA w pozycję G^8 oraz odpowiednio resztę $s4U^U$ w pozycję T^9 lub T^{13} bądź $s4U^R$ w pozycję T^{13} (wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ względem niemodyfikowanego TBA wynosiła odpowiednio 2.45, 2.69 oraz 2.10 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5). Stabilność termodynamiczna pozostałych wariantów TBA ulegała nieznacznym zmianom lub była porównywalna z danymi uzyskanymi dla oligonukleotydów zawierających pojedynczą substytucję resztami $iG^{R/U}$.

Umieszczenie reszt $iG^{R/U}$ w pozycji G^{10} TBA powodowało silną destabilizację kwadrupleksu. Wprowadzenie dodatkowej substytucji resztami $s4U^R$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 lub T^{12} redukowało w pewnym stopniu niekorzystny efekt będący wynikiem obecności reszty $iG^{R/U}$ w pozycji G^{10} (wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ względem niemodyfikowanego TBA wynosiła odpowiednio 1.55, 1.53, 1.20 oraz 1.54 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5). Podstawienie resztami $s4U^U$ w pozycjach T^3 i T^{12} TBA (równoczesne z podstawieniem resztą iG^U w pozycji G^{10}) powodowało znaczną destabilizację względem niemodyfikowanego aptameru (wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ względem niemodyfikowanego TBA wynosiła odpowiednio 3.61 oraz 3.35 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5). Co więcej, poprzez wprowadzenie $s4U^U$ w pozycje T^7 , T^9 lub T^{13} aptameru połączoną z substytucją iG^U w pozycji G^{10} uzyskano zmianę wewnątrzcząsteczkowego charakteru fałdowania badanych oligonukleotydów na międzycząsteczkowy (Tab. 6). W związku z powyższym niemożliwe okazało się bezpośrednie porównanie stabilności



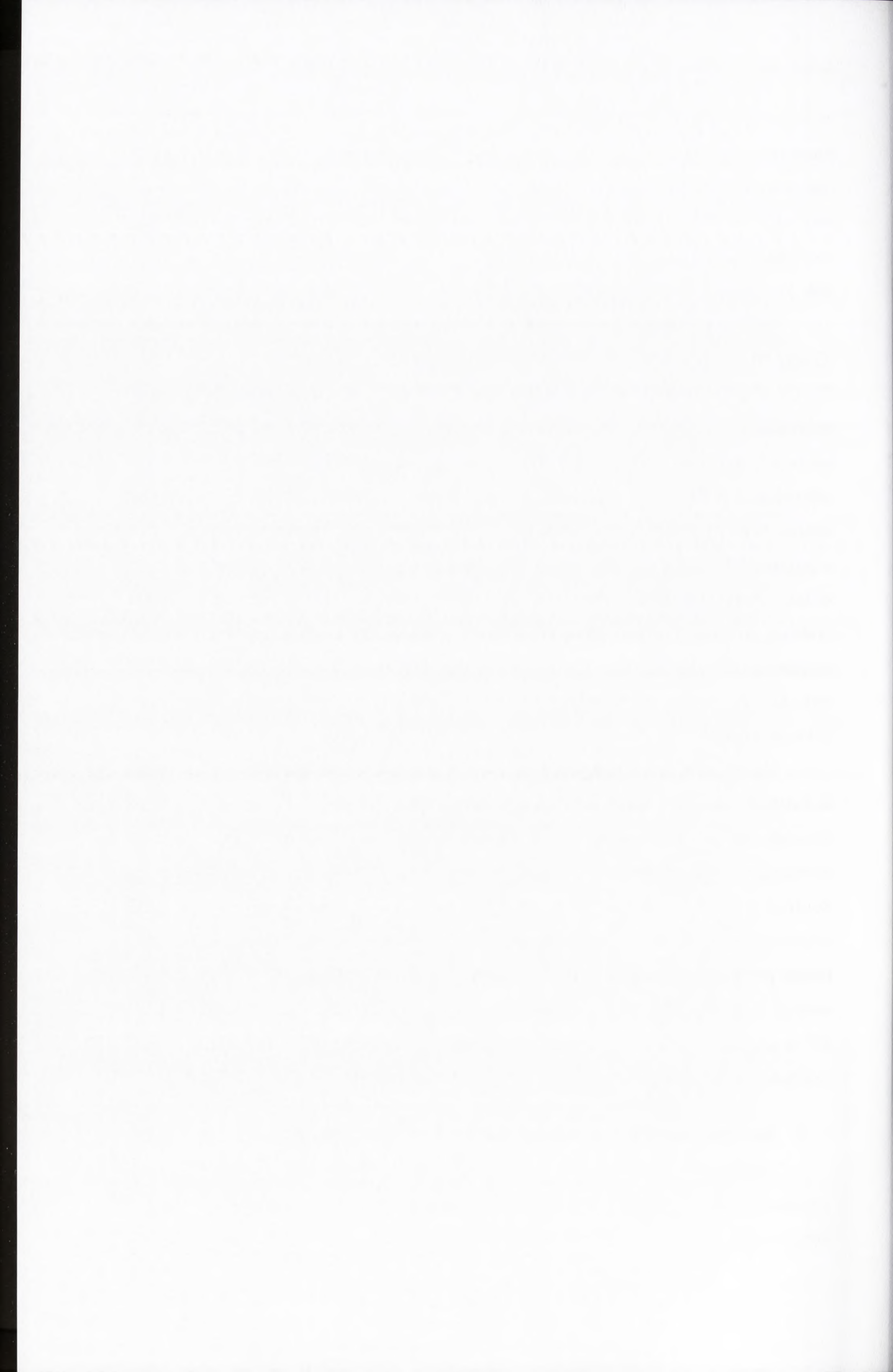
termodynamicznych uzyskanych dla tych wariantów TBA, jednak analiza wartości parametru T_M pozwoliła stwierdzić, że w temperaturze 37°C nie przyjmują one struktury G-kwadrupeksu. Aptamer zawierający równocześnie reszty iG^R w G^{10} oraz $s4U^R$ w T^{13} odznaczał się natomiast obniżeniem stabilności termodynamicznej względem niemodyfikowanego TBA (wartość $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ wynosiła 2.34 kcal/mol, Rys. 22, Tab. 5).

Podjęto również próbę oceny wpływu równoczesnego wprowadzenia kilku reszt iG oraz $s4U$ w serii RNA lub UNA. Dwa warianty zawierające reszty $s4U^R$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} oraz reszty iG^R w pozycji G^8 lub G^{10} odznaczały się korzystniejszą stabilnością termodynamiczną względem aptamerów modyfikowanych pojedynczymi resztami izoguanozyny (wartość $\Delta\Delta G_{37}^\circ$ względem niemodyfikowanego TBA wynosiła odpowiednio 1.24 i 1.57 kcal/mol, Tab. 5). W przypadku aptamerów zawierających wspomniane modyfikacje w serii UNA oraz aptamerów zawierający reszty iG^U w pozycjach G^1 , G^8 i G^{10} oraz reszty $s4U^U$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} obserwowano zmianę charakteru fałdowania kwadrupeksu z wewnątrz- na międzycząsteczkowy (Tab. 6), co uniemożliwiło porównanie zmian energii swobodnej. Również w tym przypadku opierając się o analizę wartości parametru T_M możliwe było sformułowanie wniosku, że powyższe warianty w temperaturze 37°C nie przyjmują struktury G-kwadrupeksu.

Na podstawie uzyskanych danych możliwe było sformułowanie stwierdzenia, że możliwa jest częściowa kompensacja niekorzystnego efektu termodynamicznego spowodowanego obecnością w cząsteczce TBA reszt izoguanozyny poprzez równoczesne wprowadzenie reszt 4-tiourydyny w odpowiednie pozycje aptameru. Bardziej korzystny rezultat uzyskano w przypadku zastosowania modyfikacji nukleotydowych w serii RNA w porównaniu do UNA. Niemniej jednak, w znacznej liczbie przypadków energia swobodna badanych wariantów TBA (ΔG_{37}°) przyjmowała wartość dodatnią (Rys. 21), z wyjątkiem niektórych oligonukleotydów zawierających iG^R w pozycji G^8 lub G^{10} oraz $s4U^R$ w pozycji T^3 , T^7 , T^9 lub T^{12} , co świadczy o tym, że cząsteczki te w temperaturze 37°C nie przyjmują struktury G-kwadrupeksu.

2. Badania zmian w topologii fałdowania G-kwadrupeksów

Zmiany w topologii struktury badanych G-kwadrupeksów prześlędzono z wykorzystaniem widm dichroizmu kołowego oraz temperaturowych widm różnicowych. Obie wymienione techniki są stosunkowo prostymi, powtarzalnymi

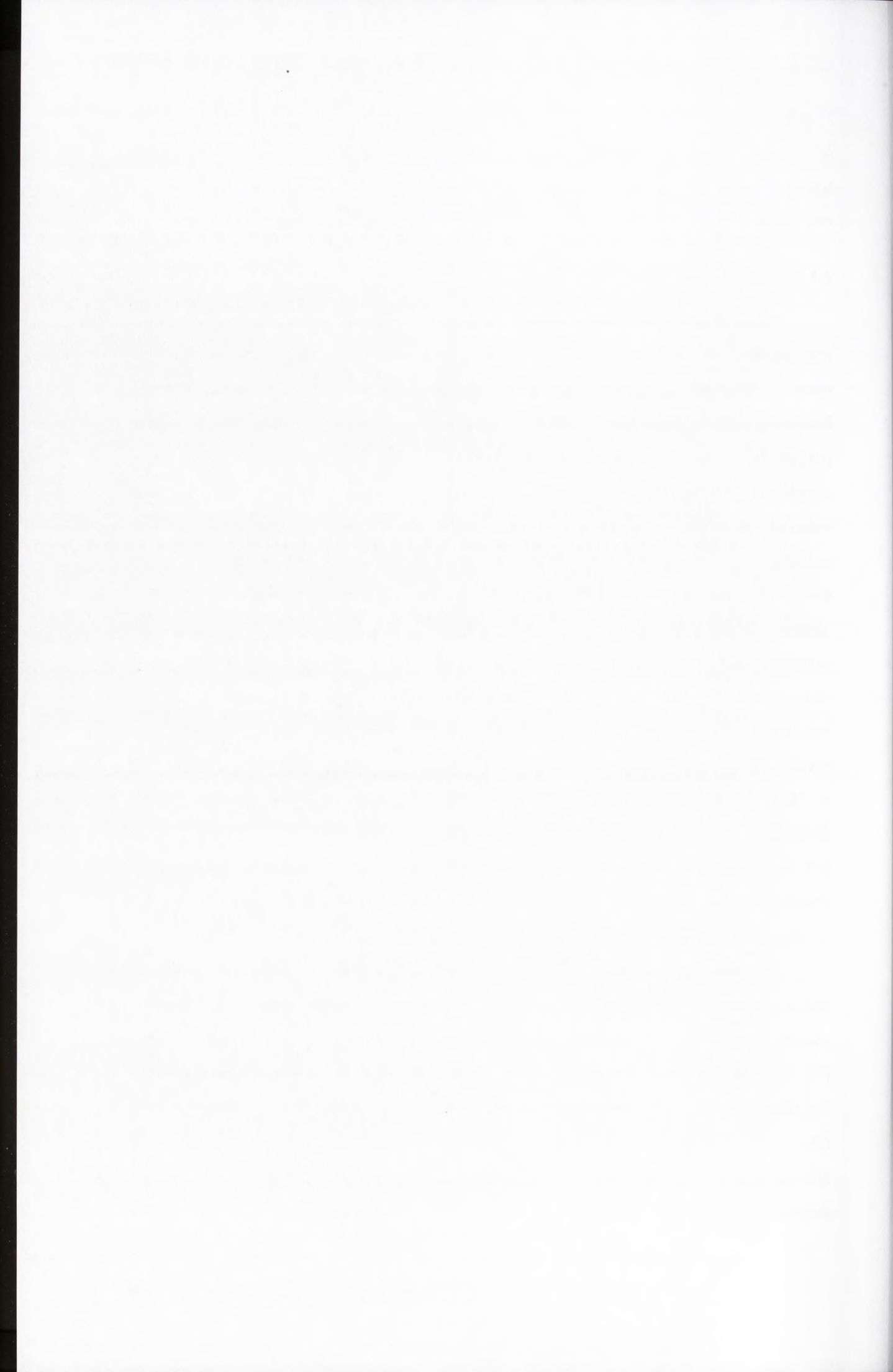


i dostarczającymi cennych informacji metodami badania struktury G-kwadrupeksów. Wykonanie zaplanowanych eksperymentów umożliwiło określenie wpływu wprowadzenia nowych pochodnych UNA i RNA na topologię fałdowania aptameru wiążącego trombinę.

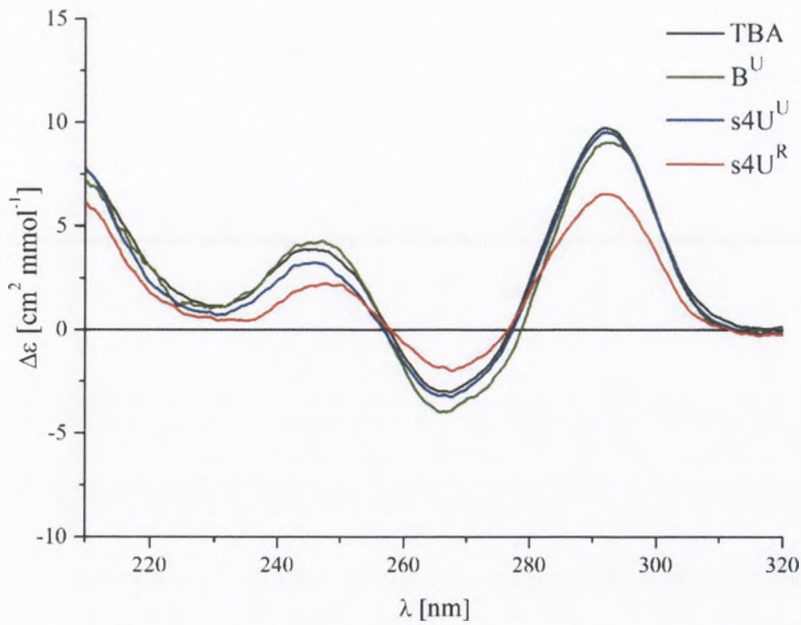
2.1 Widma dichroizmu kołowego

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) jest techniką pozwalającą na pomiar różnicy absorpcji światła spolaryzowanego kołowo prawo- i lewoskrętnie przez badane cząsteczki i na tej podstawie określania jej konformacji. Reszty cukrowe nukleotydów stanowią element optycznie czynny i dzięki połączeniu z pierścieniami aromatycznymi zasad heterocyklicznych generują sygnał CD. Odmienne orientacja przestrzenna szkieletu fosfocukrowego i zasad heterocyklicznych w poszczególnych strukturach drugorzędowych kwasów nukleinowych wiąże się z uzyskaniem charakterystycznych dla nich widm CD i na tej podstawie umożliwia wnioskowanie o ich topologii strukturalnej. Spektroskopia CD stanowi szybkie i łatwe narzędzie do określania wpływu zmian środowiskowych oraz wprowadzenia modyfikacji reszt nukleotydowych na struktury tworzone przez oligonukleotydy [167]. W przypadku G-kwadrupeksów, opisywana technika umożliwia wyróżnienie dwóch, podstawowych topologii fałdowania. Pierwsza z nich, nazywana równoległą, charakteryzuje się jednakowym kierunkiem polaryzacji nici wchodzących w skład struktury. Widma CD tych cząsteczek odznaczają się występowaniem dodatniego pasma przy ok. 260 nm oraz ujemnego przy ok. 240 nm. W sytuacji, gdy nici budujące G-kwadrupeks odznaczają się różnymi kierunkami orientacji obserwuje się antyrównoległą topologię fałdowania struktury. W przebiegu widm CD występuje pasmo dodatnie przy ok. 290 nm oraz ujemne przy ok. 260 nm [168].

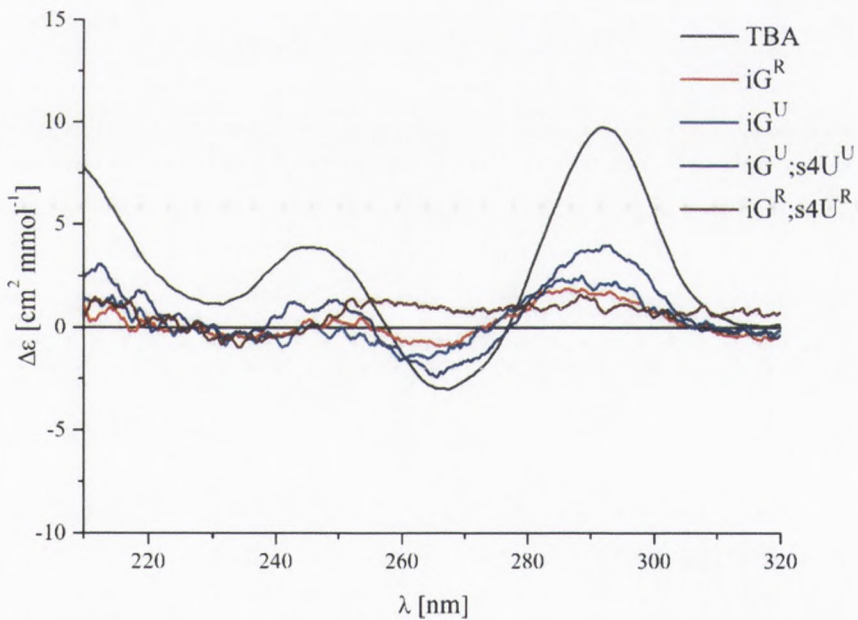
Widma CD uzyskane dla badanych wariantów TBA można było podzielić pod względem przebiegu na dwie grupy. Pierwsza z nich odznaczała się kształtem charakterystycznym dla wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego G-kwadrupeksu [73, 125]. Widma te posiadały w swoim przebiegu dwa dodatnie pasma przy długości fali około 245 nm i 295 nm oraz jedno ujemne pasmo przy długości fali około 265 nm (Rys. 23a). Takie wyniki uzyskano dla wariantów posiadających pojedyncze lub wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny w serii UNA lub RNA oraz resztami kanonicznych nukleotydów w serii UNA. Na podstawie powyższych danych



a)

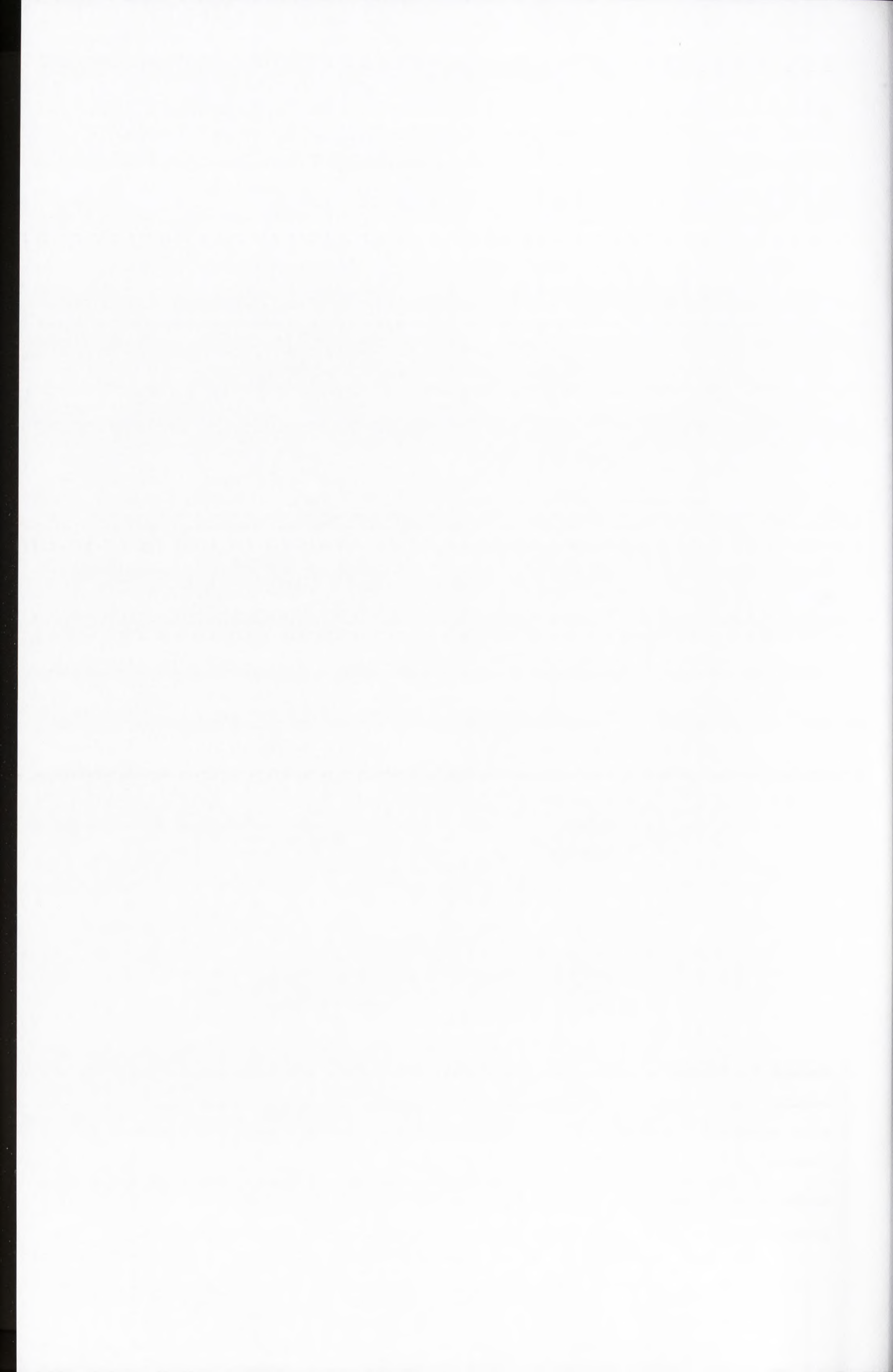


b)



Rysunek 23. Przykładowe widma dichroizmu kołowego dla: a) wariantów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii UNA/RNA lub kanoniczne reszty nukleotydów UNA; b) wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii UNA/RNA lub jednoczesną substytucję resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii UNA lub RNA.

można było stwierdzić, że wprowadzenie wymienionych modyfikacji nie wpływa na topologię fałdowania tych cząsteczek i w temperaturze 37°C zachowują one strukturę



wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego G-kwadrupleksu. Druga grupa widm charakteryzowała się zmniejszeniem intensywności lub całkowitym zanikiem pasm charakterystycznych dla G-kwadrupleksów (Rys. 23b) [125]. Widma o takim przebiegu otrzymano dla wariantów posiadających pojedyncze lub wielokrotne podstawienia resztami izoguanozyny w serii UNA i RNA oraz wariantów zawierających jednocześnie reszty 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii UNA lub RNA. Na tej podstawie można było wnioskować, że wprowadzenie powyższych modyfikacji wyraźnie zmniejsza ustrukturalizowanie G-kwadrupleksów lub uniemożliwia przyjęcie tej struktury [132].

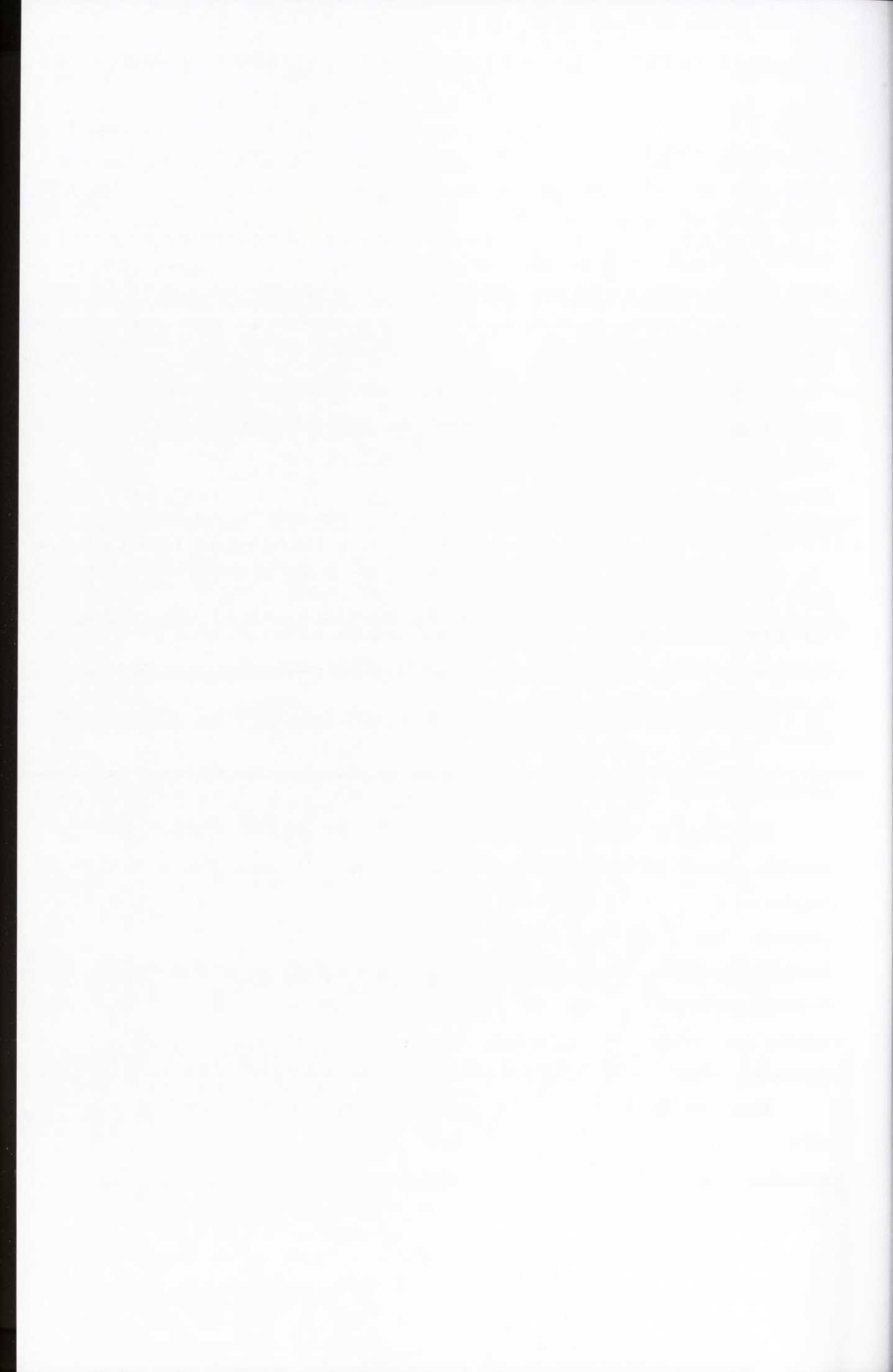
W obu grupach widm zaobserwowano korelację intensywności sygnałów CD z uzyskanymi parametrami termodynamicznymi. Powyższe wyniki pozostają więc w zgodzie z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych i pokazują ścisłą zależność pomiędzy stopniem ustrukturalizowania badanych wariantów TBA a ich stabilnością termodynamiczną.

Warto zaznaczyć, że warianty posiadające resztę G^U w pozycji T⁴ oraz cztery reszty U^U w pozycjach T³, T⁷, T⁹ i T¹³ odznaczały się przebiegiem widm CD charakterystycznym dla antyrównoległego G-kwadrupleksu (Rys. 23a). Powyższe wyniki mogą świadczyć o tym, że wprowadzenie tych modyfikacji wpływa jedynie na cząsteczkowość struktury, nie powodując istotnych zmian w topologii fałdowania aptameru.

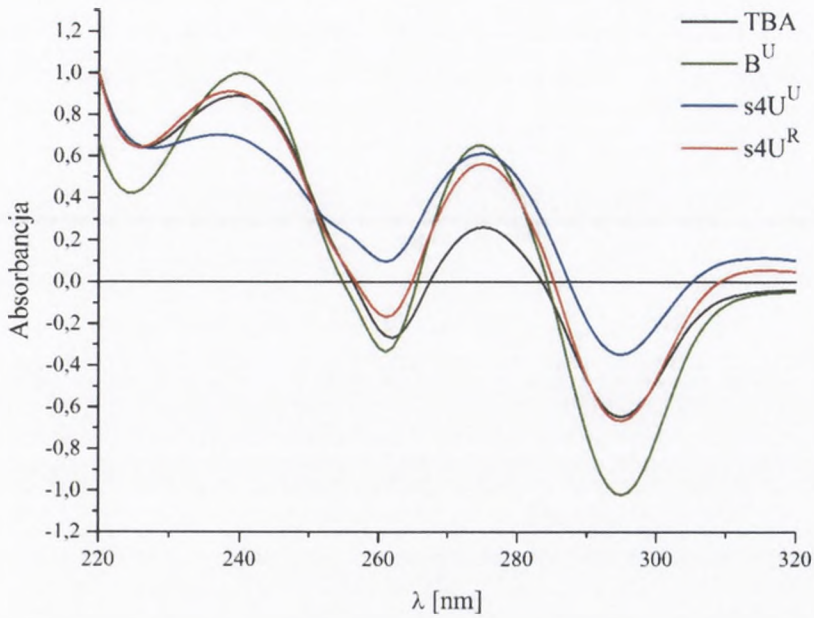
2.2 Temperaturowe widma różnicowe

Temperaturowe widma różnicowe (TDS, ang. *thermal difference spectra*) stanowią różnicę widm uzyskiwanych poprzez pomiar absorbancji badanych oligonukleotydów w dwóch temperaturach: powyżej i poniżej temperatury topnienia cząsteczki. Każdy z typów struktur kwasów nukleinowych odznacza się charakterystycznym przebiegiem widm TDS odzwierciedlającym subtelne różnice w oddziaływaniach warstwowych występujących w tych cząsteczkach [169]. Stanowią technikę uzupełniającą dla spektroskopii dichroizmu kołowego i umożliwiają strukturalną charakterystykę oligonukleotydów w roztworze.

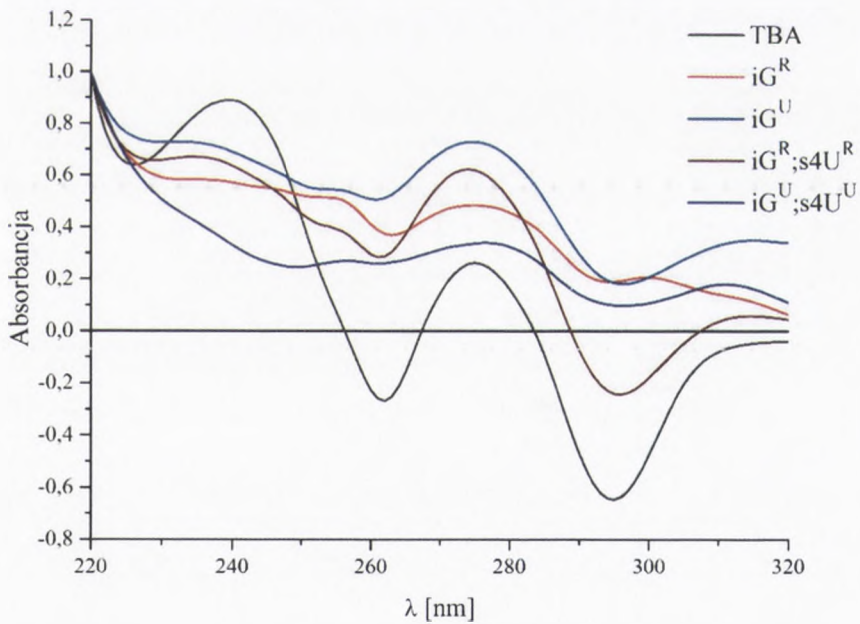
Widma TDS dla badanej puli oligonukleotydów wykonano w temperaturze 4°C i 80°C. Uzyskane krzywe można było podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich posiadała w swoim przebiegu dwa dodatnie pasma przy długości fali ok. 240 nm i 270 nm oraz dwa ujemne pasma przy długości fali ok. 260 nm oraz 295 nm (Rys. 24a).



a)

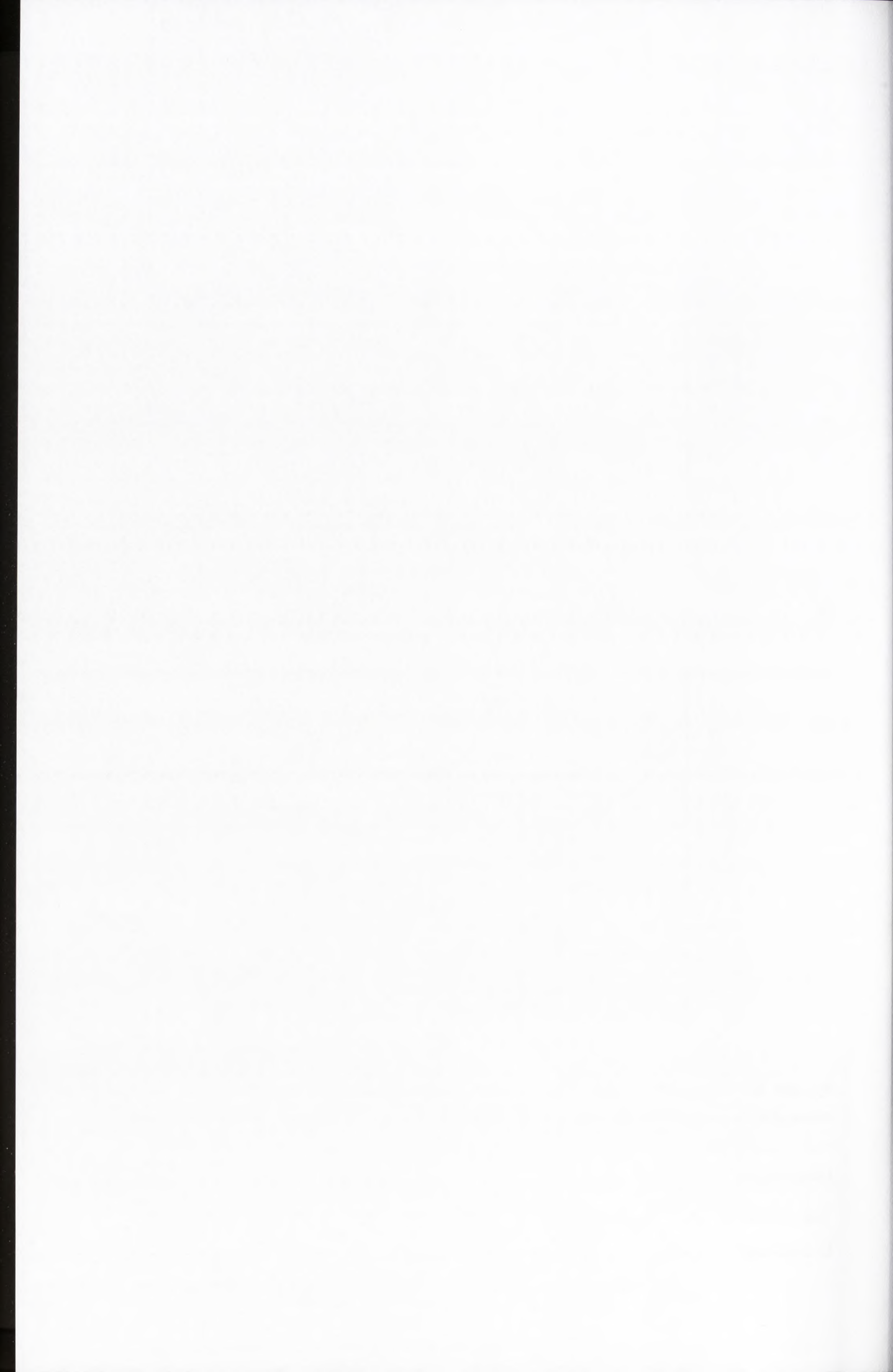


b)



Rysunek 24. Przykładowe różnicowe widma temperaturowe dla: a) wariantów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii UNA/RNA lub klasyczne reszty nukleotydów UNA; b) wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii UNA/RNA lub jednoczesną substytucję resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii UNA lub RNA.

Taki kształt widm, charakterystyczny dla antyrównoległego, wewnątrzcząsteczkowego G-kwadrupleksu, uzyskano dla większości wariantów TBA posiadających pojedyncze



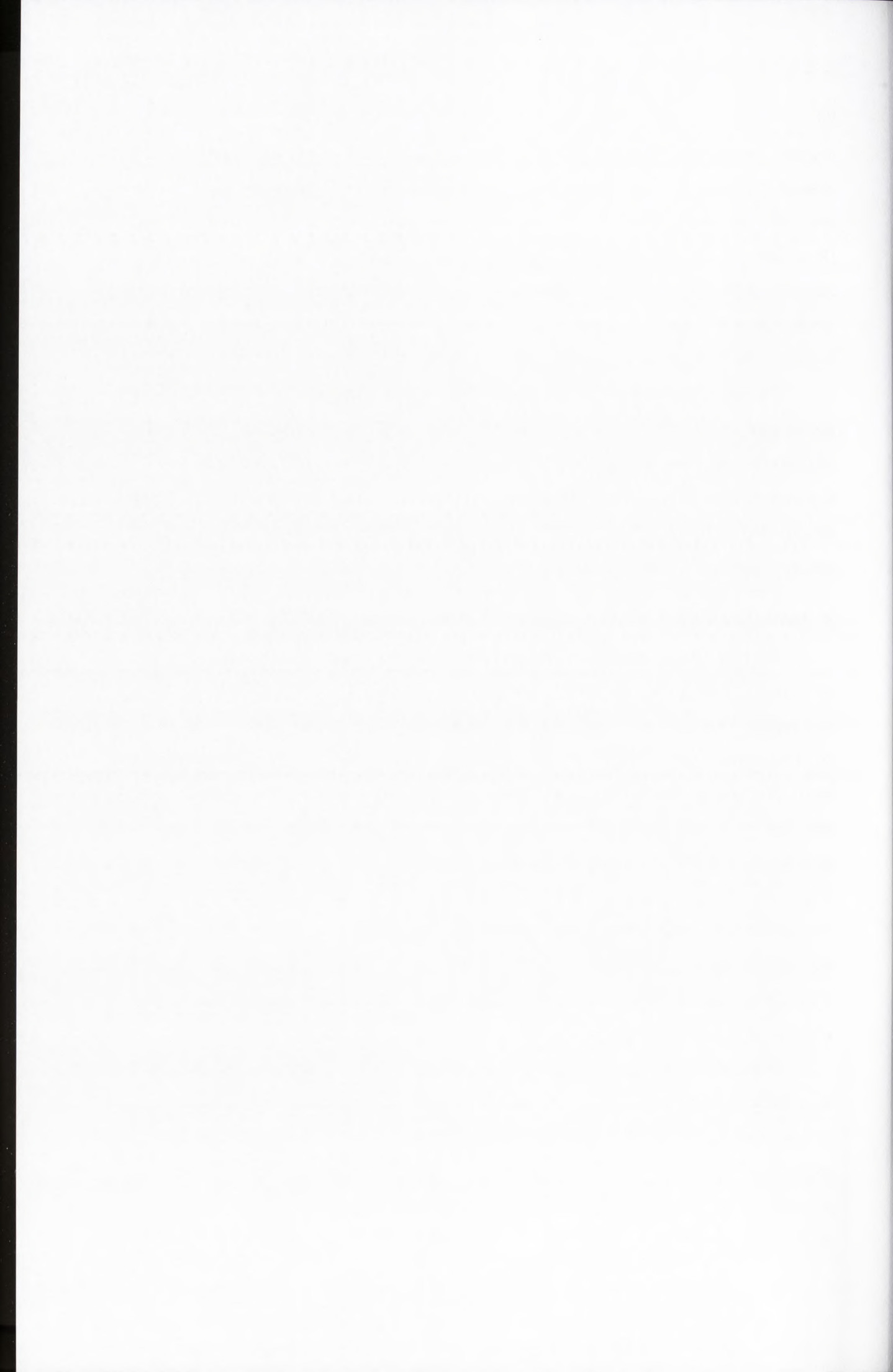
lub wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny w serii UNA lub RNA oraz resztami niemodyfikowanych nukleotydów w serii UNA. Druga grupa widm charakteryzowała się zmniejszeniem intensywności lub całkowitym zanikiem pasm charakterystycznych dla G-kwadrupleksu, głównie przy długości fali równej 260 nm (Rys. 24b). Do wyżej wspomnianego zbioru zaszeregowano wyniki dla aptamerów zawierających pojedyncze lub wielokrotne podstawienie resztami izoguanozyny w serii UNA lub RNA oraz wariantów zawierających jednoczesną substytucję resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii UNA lub RNA.

Ponadto, podobnie jak w przypadku badań spektroskopii CD, warianty posiadające resztę G^U w pozycji T⁴ oraz cztery reszty U^U w pozycjach T³, T⁷, T⁹ i T¹³ odznaczały się przebiegiem widm TDS charakterystycznym dla antyrównoległego G-kwadrupleksu (Rys. 24a). Potwierdzono tym samym, że wprowadzenie tych modyfikacji wpływa jedynie na cząsteczkowość struktury, nie powodując istotnych zmian w topologii fałdowania aptameru.

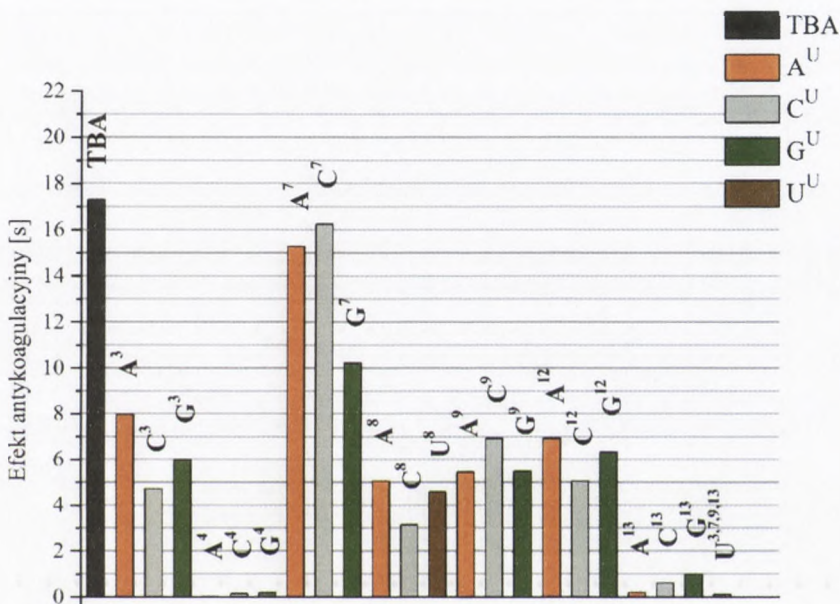
3. Badania właściwości antykoagulacyjnych wariantów TBA

Wpływ wprowadzania wybranych modyfikacji na właściwości antykoagulacyjne wszystkich badanych wariantów określono wykonując test trombinowy. Jest to standardowe narzędzie diagnostyczne umożliwiające obliczenie czasu koniecznego do utworzenia skrzepu fibrynowego w wyniku dodania egzogennej trombiny do osocza krwi (TT, ang. *thrombin time*). Jako miarę właściwości antykoagulacyjnych analizowanych oligonukleotydów przyjęto efekt antykoagulacyjny (EA). Stanowi go różnica czasów krzepnięcia uzyskanych dla osocza zawierającego badany oligonukleotyd i egzogenną trombinę oraz osocza z samą egzogenną trombiną i wyrażany jest w sekundach. Im wyższą wartość przyjmuje parametr EA, tym lepszymi właściwościami antykoagulacyjnymi charakteryzuje się dany oligonukleotyd. Pomiar TT dla wszystkich badanych aptamerów były wykonywane dla stężenia równego 0.165 μ M przy użyciu koagulometru.

Wprowadzenie reszt nukleotydowych w serii UNA w zależności od lokalizacji w szkielecie TBA wywierało różny efekt na poziom aktywności antykoagulacyjnej badanych wariantów (Rys. 25). Najkorzystniejsze okazało się wprowadzenie powyższej modyfikacji w pozycję T⁷ opisywanego aptameru. Oligomer odznaczający się najlepszymi, niemalże porównywalnymi z niemodyfikowanym TBA, właściwościami antykoagulacyjnymi posiadał resztę cytydyny w serii UNA w pozycji T⁷, a zmierzony

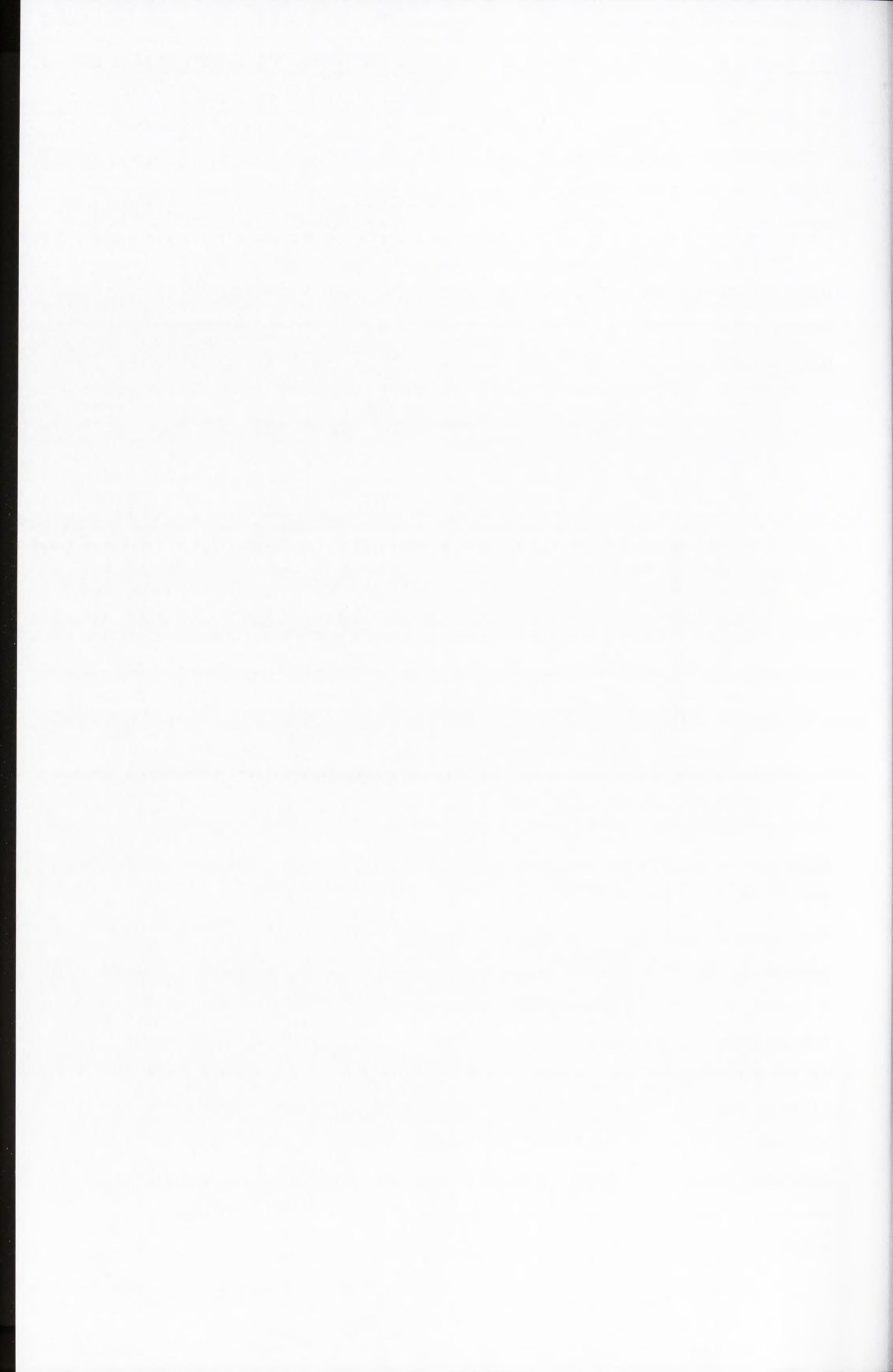


dla niego efekt antykoagulacyjny wynosił 16.25 s (Rys. 25, Tab. 7). Wprowadzenie reszt adenozyiny oraz guanozyiny w serii UNA w pozycję T⁷ miało mniej korzystny wpływ na poziom aktywności antykoagulacyjnej (EA był równy 15.28 s oraz 10.23 s odpowiednio dla A^U oraz G^U, Rys. 25, Tab. 7). Duża tolerancja na wprowadzenie w opisywaną pozycję modyfikacji chemicznych wynika z braku zaangażowania tej reszty nukleotydowej w oddziaływanie z cząsteczką trombiny oraz tworzenie wiązań stabilizujących aptamer [104]. Substytucja resztami nukleotydowymi UNA w innych pozycjach aptameru nie powodowała poprawy aktywności antykoagulacyjnej TBA.

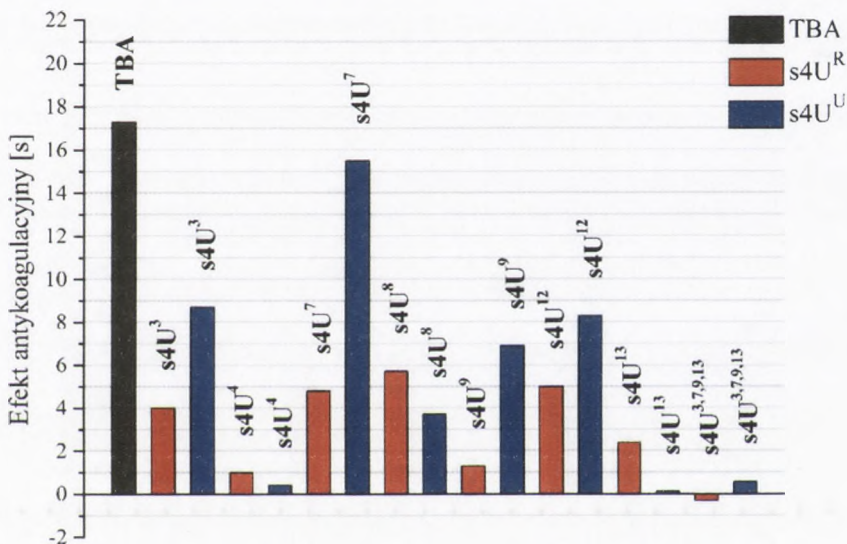


Rysunek 25. Wykres zależności wartości efektu antykoagulacyjnego wariantów zawierających reszty nukleotydowe UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Wprowadzenie reszt nukleotydowych w serii UNA w pozycje T³, T⁹, T⁸ lub T¹² powodowało obniżenie wartości efektu antykoagulacyjnego przynajmniej o połowę w stosunku do niemodyfikowanego TBA (EA w zakresie od 3.15 s do 7.98 s, Rys. 25, Tab. 7). Warianty zawierające opisywane modyfikacje w pozycji T⁴ lub T¹³ odznaczały się naj słabszymi właściwościami antykoagulacyjnymi (EA na poziomie ok. 0.20 s – 0.50 s, Rys. 25, Tab. 7). Zgodnie z obowiązującym modelem oddziaływania cząsteczki TBA z trombiną, reszty T⁴ i T¹³ odgrywają kluczową rolę w powstawaniu tego kompleksu poprzez tworzenie wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi omawianego enzymu. Ponadto, wspomniane reszty nukleotydowe biorą udział w formowaniu oddziaływań stabilizujących rdzeń aptameru [94]. W związku



z powyższym zwiększenie elastyczności struktury w tym regionie TBA poprzez wprowadzenie reszt nukleotydowych UNA może utrudniać powstawanie tych oddziaływań. Uzyskane wyniki badań pozostają w ścisłej korelacji z danymi literaturowymi [131]. W wykonanej pod kierunkiem J. Wengla pracy udowodniono, że wprowadzenie reszt U^U w pozycje T^4 lub T^{13} cząsteczki TBA powoduje znaczne obniżenie wartości efektu antykoagulacyjnego w porównaniu do substytucji pozostałych miejsc pętli. Obniżenie aktywności antykoagulacyjnej zauważono również w przypadku wariantu zawierającego równoczesną substytucję resztami U^U w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 i T^{13} TBA (EA = 0.12 s, Rys. 25, Tab. 7).



Rysunek 26. Wykres zależności wartości efektu antykoagulacyjnego wariantów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

Wprowadzanie reszt 2'-deoksy-4-tiourydyny w niektóre pozycje TBA zostało opisane w literaturze jako szczególnie korzystne dla zwiększania powinowactwa oligonukleotydów do docelowego białka [122]. W związku z powyższym postanowiono sprawdzić czy wprowadzenie reszt $s4U^R$ lub $s4U^U$ w pozycje T^3 , T^7 , G^8 , T^9 , T^{12} oraz T^{13} aptameru wpłynie na poprawę zdolności inhibicyjnych TBA względem trombiny. Wariant odznaczający się najlepszymi właściwościami antykoagulacyjnymi zawierał resztę $s4U^U$ w pozycji T^7 (EA przyjmował wartość 15.5 s, Rys. 26, Tab. 7).

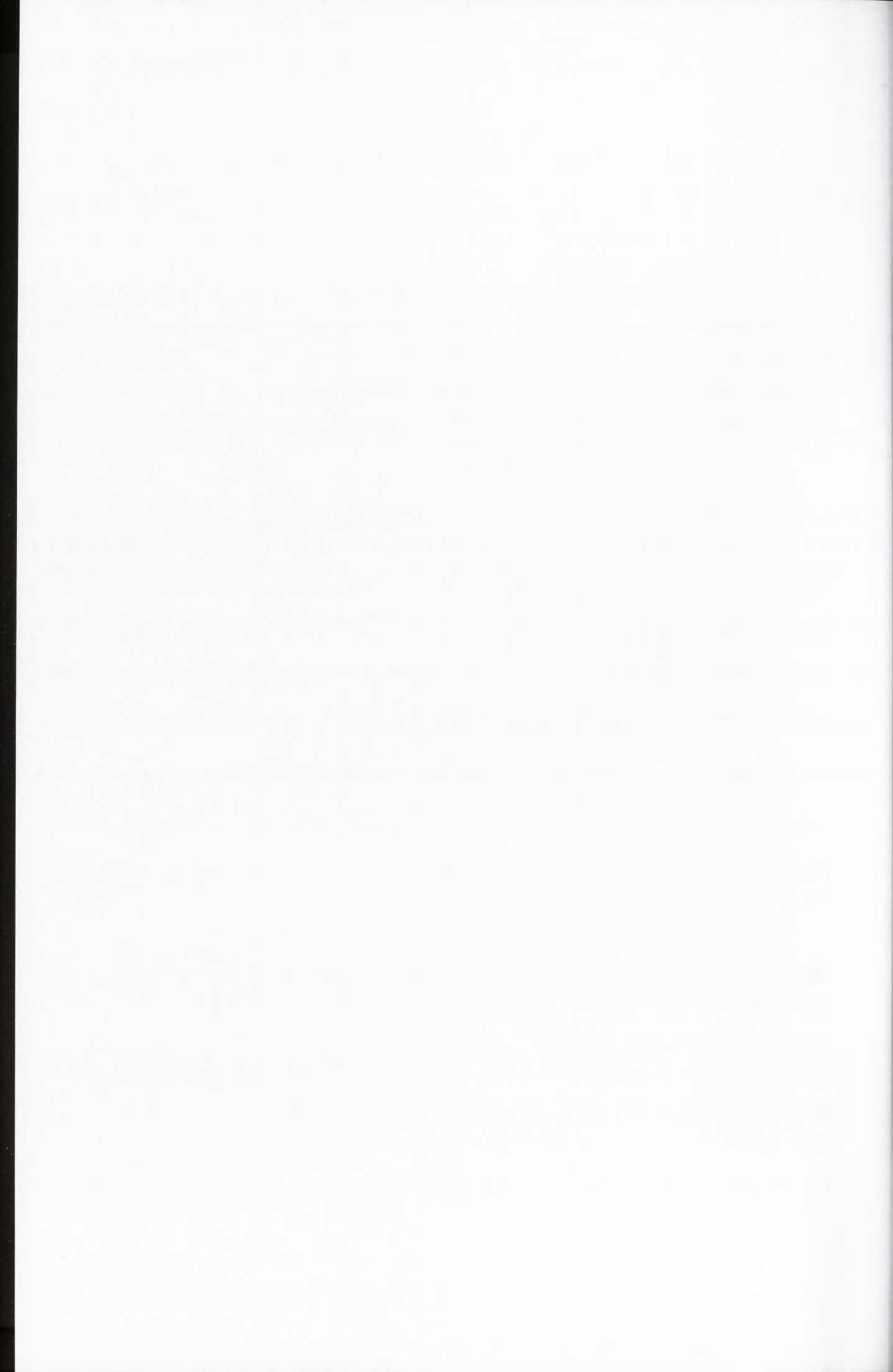
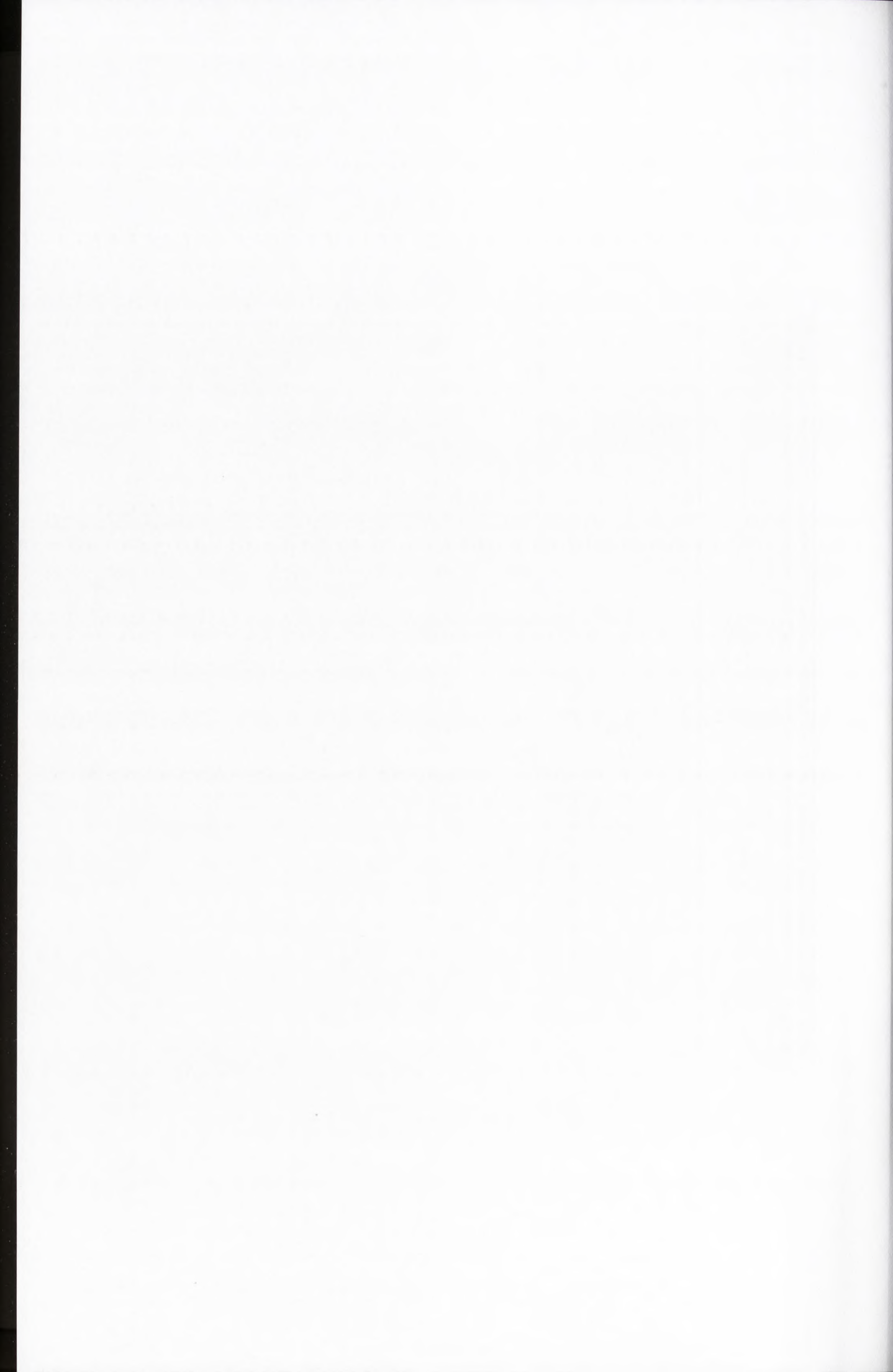


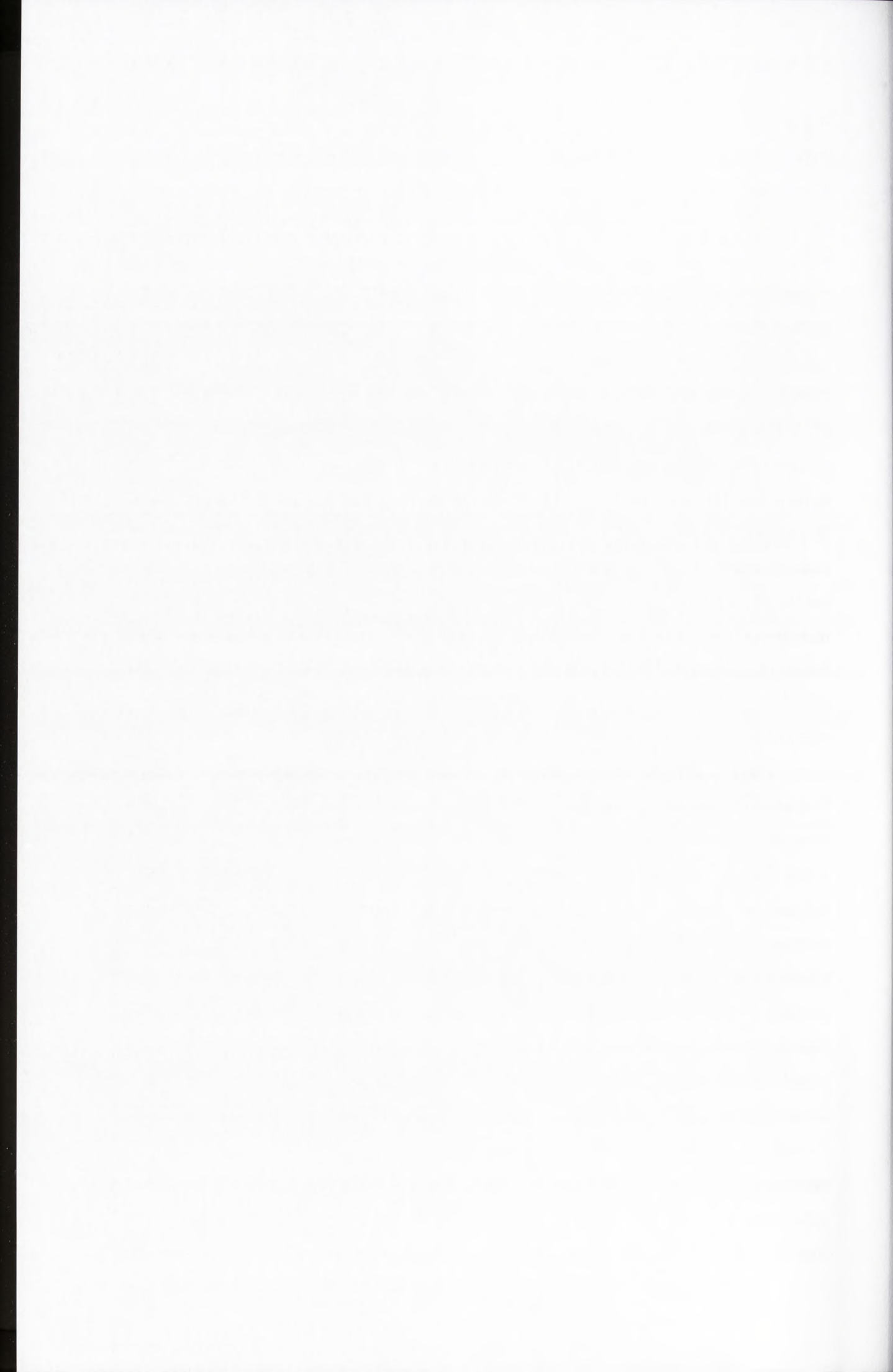
Tabela 7. Efekt antykoagulacyjny wywierany przez G-kwadrupleksów zawierających modyfikacje reszt nukleotydowych typu UNA (A^U , C^U , G^U , U^U) oraz reszty 4-tiorydyny w serii RNA ($s4U^R$) lub UNA ($s4U^U$). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	EA s	Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	EA s
	GGTTGGTGTGGTGG	17.30		GGTTGGTGTGGTGG	17.30
T ³	GG <u>A</u> ^U TGGTGTGGTGG	7.98	T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>C</u> ^U GG	0.63
T ³	GG <u>C</u> ^U TGGTGTGGTGG	4.72	T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>G</u> ^U GG	0.53
T ³	GG <u>G</u> ^U TGGTGTGGTGG	6.00	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GG <u>U</u> ^U TGGTGTGGTGG	0.12
T ⁴	GGT <u>A</u> ^U GGTGTGGTGG	0.03	T ³	GG <u>s4U</u> ^R TGGTGTGGTGG	4.00
T ⁴	GGT <u>C</u> ^U GGTGTGGTGG	0.15	T ³	GG <u>s4U</u> ^U TGGTGTGGTGG	8.70
T ⁴	GGT <u>G</u> ^U GGTGTGGTGG	0.20	T ⁴	GGT <u>s4U</u> ^R GGTGTGGTGG	1.00
T ⁷	GGTTGG <u>A</u> ^U GTGGTGG	15.28	T ⁴	GGT <u>s4U</u> ^U GGTGTGGTGG	0.40
T ⁷	GGTTGG <u>C</u> ^U GTGGTGG	16.25	T ⁷	GGTTGG <u>s4U</u> ^R GGTGGTGG	4.80
T ⁷	GGTTGG <u>G</u> ^U GTGGTGG	10.23	T ⁷	GGTTGG <u>s4U</u> ^U GTGGTGG	15.50
T ⁸	GGTTGGT <u>A</u> ^U TGGTGG	5.05	T ⁸	GGTTGGT <u>s4U</u> ^R TGGTGG	5.72
T ⁸	GGTTGGT <u>C</u> ^U TGGTGG	3.15	T ⁸	GGTTGGT <u>s4U</u> ^U TGGTGG	3.70
T ⁸	GGTTGGT <u>G</u> ^U TGGTGG	4.58	T ⁹	GGTTGGT <u>s4U</u> ^R GGTGG	1.30
T ⁹	GGTTGGT <u>A</u> ^U GGTGG	5.45	T ⁹	GGTTGGT <u>s4U</u> ^U GGTGG	6.90
T ⁹	GGTTGGT <u>C</u> ^U GGTGG	6.93	T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>s4U</u> ^R TGG	5.00
T ⁹	GGTTGGT <u>G</u> ^U GGTGG	5.48	T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>s4U</u> ^U TGG	8.30
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>A</u> ^U TGG	6.93	T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>s4U</u> ^R GG	2.40
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>C</u> ^U TGG	5.05	T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>s4U</u> ^U GG	0.10
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>G</u> ^U TGG	6.33	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GG <u>s4U</u> ^R TGG <u>s4U</u> ^R GGT <u>s4U</u> ^R GG	-0.32
T ¹³	GGTTGGTGTGGT <u>A</u> ^U GG	0.20	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GG <u>s4U</u> ^U TGG <u>s4U</u> ^U GGT <u>s4U</u> ^U GG	0.55

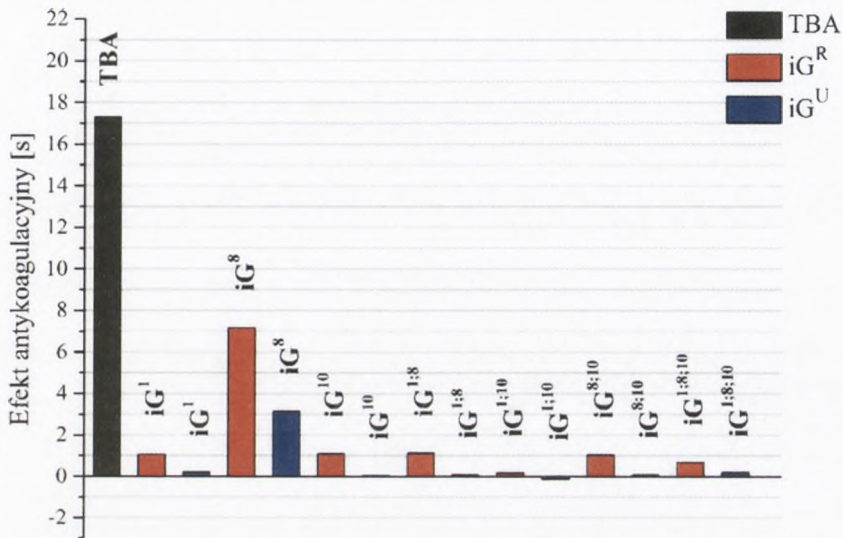


W pozostałych przypadkach wprowadzenie tej modyfikacji do badanych aptamerów wyraźnie obniżało zdolność inhibicji aktywności trombiny. Umieszczenie reszt s4U^U w pozycjach T³, T⁷, T⁹ lub T¹² miało bardziej korzystny wpływ na poziom aktywności antykoagulacyjnej badanych oligonukleotydów w porównaniu do modyfikacji w serii RNA. Wartość parametru EA dla wariantów s4U^U oraz s4U^R zawierała się w zakresie odpowiednio od 6.9 s do 15.5 s oraz od 1.3 s do 5.0 s (Rys. 26, Tab. 7). Obserwowana różnica może być rezultatem zwiększenia elastyczności regionów pętli wynikającej z obecności reszty cukrowej o zwiększonej labilności pierścienia. Co ciekawe, tendencja ta ulega odwróceniu w przypadku wprowadzenia reszt s4U^{R/U} w pozycje T⁴, G⁸ i T¹³, gdzie korzystniejsza dla poprawy właściwości antykoagulacyjnych TBA okazała się substytucja resztami 4-tiourydyny w serii RNA. Reszty T⁴ i T¹³ są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z cząsteczką trombiny [94]. W związku z powyższym konieczne jest odpowiednie ich ułożenie względem reszt aminokwasowych docelowego białka. Wprowadzenie opisywanych modyfikacji nukleozydowych w serii UNA prowadzi do niepożądanego w tym fragmencie TBA rozluźnienia struktury, co przekłada się na poziom aktywności antykoagulacyjnej badanych wariantów. Oligonukleotydy zawierające wielokrotne podstawienie resztami s4U^{R/U} w pozycjach T³, T⁷, T⁹, T¹² lub T¹³ aptameru odznaczały się jedną z najniższych wartości parametru EA (od -0.32 do 0.8 s, Rys. 26, Tab. 7).

Dane literaturowe wskazują również, że wprowadzenie reszt 2'-deoksy-izoguanozyny w pewne pozycje szkieletu TBA ma korzystny wpływ na poprawę powinowactwa tego aptameru do oddziaływania z cząsteczką trombiny [119]. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia podjęto próbę określenia efektu uzyskanego poprzez wprowadzenie pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia resztami iG^{R/U} w pozycji G¹, G⁸ i G¹⁰ na wielkość wywieranego efektu antykoagulacyjnego. We wszystkich analizowanych przypadkach zaobserwowano znaczne obniżenie właściwości antykoagulacyjnych badanych wariantów (Rys. 27, Tab. 8). Natomiast wariant posiadający w pozycji G⁸ resztę iG^U charakteryzował się ponad sześciokrotnym obniżeniem poziomu aktywności antykoagulacyjnej względem niemodyfikowanego TBA (EA przyjmował wartość 3.15 s, Rys. 27, Tab. 8). Co ciekawe, podobną zależność można było dostrzec w wynikach dotyczących pozostałych badanych aptamerów. Warianty zawierające pojedynczą lub wielokrotną substytucję resztami iG^R (wartość EA zawierała się w zakresie od 0.17 s do 1.13 s, Rys. 27, Tab. 8) odznaczały się wyższymi wartościami parametru EA w stosunku do ich

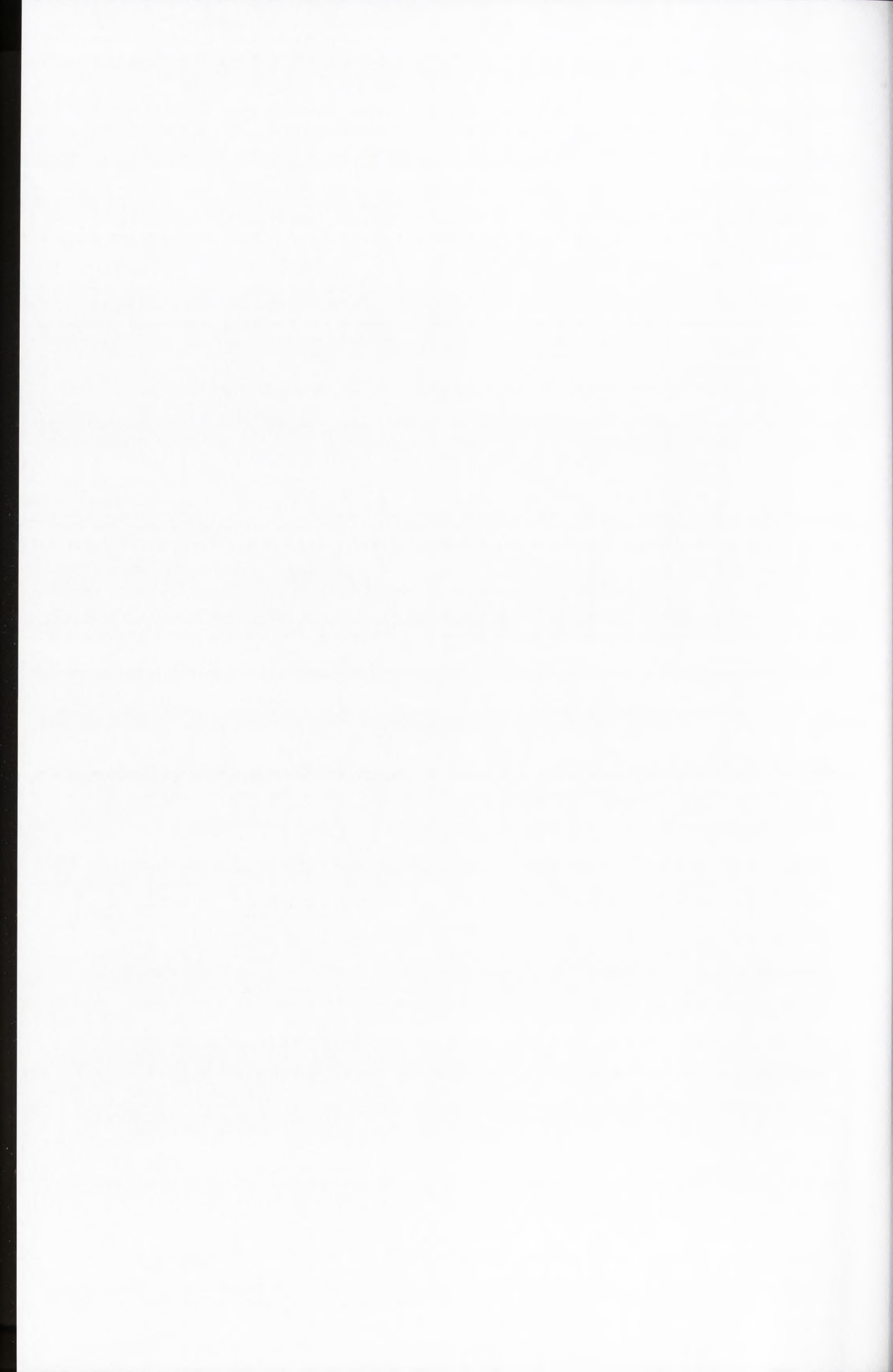


analogów w serii UNA (wartość EA zawierała się w zakresie od -0.12 s do 0.21 s, Rys. 27, Tab. 8). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na istotność integralności struktury G-tetrad w zachowaniu właściwości antykoagulacyjnych TBA. Wprowadzenie modyfikacji reszt nukleotydowych powodujących jej rozluźnienie prowadzi do obniżenia zdolności inhibicji aktywności trombiny przez badane aptamery.

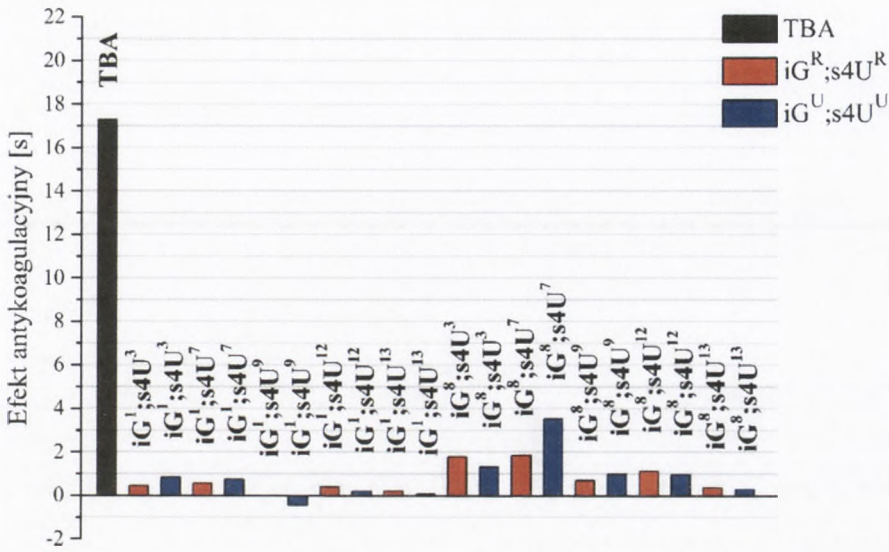


Rysunek 27. Wykres zależności wartości efektu antykoagulacyjnego wariantów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA.

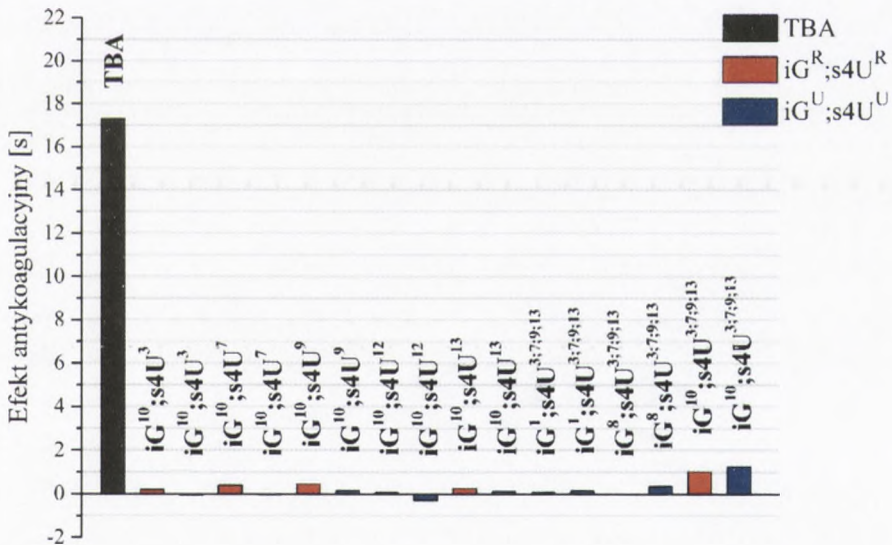
Próba poprawy właściwości antykoagulacyjnych wariantów TBA zawierających reszty $iG^{R/U}$ poprzez wprowadzenie dodatkowej reszty $s4U^{R/U}$ nie przyniosła pożądanego efektu (Rys. 28a oraz Rys. 28b, Tab. 8). Jedynie aptamer zawierający równoczesną substytucję resztami $s4U^U$ i iG^U odpowiednio w pozycji T^7 i G^8 charakteryzował się nieco poprawioną wartością parametru EA względem posiadającego jedną resztę iG^U w pozycji G^8 (wartość EA była równa 3.53 s, Rys. 28a, Tab. 8). Pozostałe warianty TBA były zdolne do wydłużenia czasu trombinowego badanego osocza maksymalnie o około 1.90 s. Uzyskane wyniki mogą być konsekwencją destabilizacji struktury analizowanych wariantów.



a)



b)



Rysunek 28. Wykres zależności wartości efektu antykoagulacyjnego wariantów zawierających równocześnie reszty 4-tiourydyny oraz izoguanozyny w serii RNA lub UNA od położenia modyfikacji w cząsteczce TBA. a) warianty zawierające pojedyncze reszty iG i s4U odpowiednio w pozycji G¹ i G⁸ oraz T³, T⁷, T⁹, T¹² i T¹³; b) warianty zawierające pojedyncze reszty iG i s4U odpowiednio w pozycji G¹⁰ oraz T³, T⁷, T⁹, T¹² i T¹³, a także warianty zawierające wielokrotne podstawienia wyżej wymienionymi resztami modyfikowanych nukleotydów.

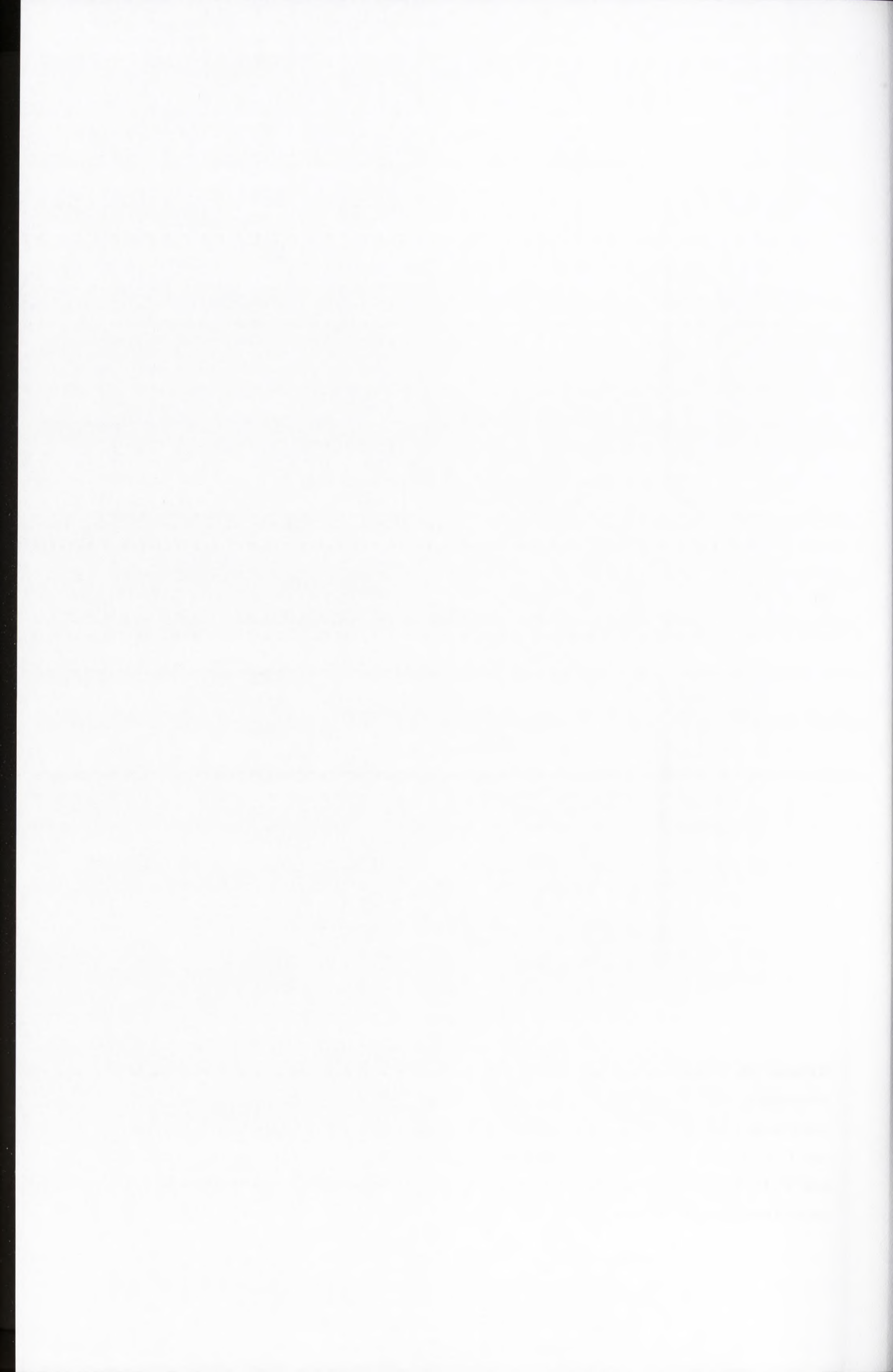


Tabela 8. Efekt antykoagulacyjny wywierany przez G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA (iG⁸) lub UNA (iG^U) oraz G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-thiourydyny w serii RNA (iG^Rs4U^R) lub UNA (iG^Us4U^U). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	EA s	Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	EA s
	GGTTGGTGTGGTGG	17.30		GGTTGGTGTGGTGG	17.30
G ¹	iG ^R GTTGGTGTGGTGG	1.07	G ¹ , T ¹²	iG ^R GTTGGTGTGGs4U ^R TGG	0.40
G ¹	iG ^U GTTGGTGTGGTGG	0.21	G ¹ , T ¹²	iG ^U GTTGGTGTGGs4U ^U TGG	0.22
G ⁸	GGTTGGTiG ^R TGGTGG	7.17	G ¹ , T ¹³	iG ^R GTTGGTGTGGTs4U ^R GCG	0.20
G ⁸	GGTTGGTiG ^U TGGTGG	3.15	G ¹ , T ¹³	iG ^U GTTGGTGTGGTs4U ^U GG	0.07
G ¹⁰	GGTTGGTGTiG ^R GTTGG	1.10	T ³ , G ⁸	GGs4U ^R TGGTiG ^R TGGTGG	1.80
G ¹⁰	GGTTGGTGTiG ^U GTTGG	0.04	T ³ , G ⁸	GGs4U ^U TGGTiG ^U TGGTGG	1.32
G ¹ , G ⁸	iG ^R GTTGGTGTGGTGG	1.13	T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs4U ^R iG ^R TGGTGG	1.87
G ¹ , G ⁸	iG ^U GTTGGTGTGGTGG	0.08	T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs4U ^U iG ^U TGGTGG	3.53
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGTiG ^R TiG ^R GTTGG	1.04	G ⁸ , T ⁹	GGTTGGTiG ^R s4U ^R GTTGG	0.71
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGTiG ^U TiG ^U GTTGG	0.08	G ⁸ , T ⁹	GGTTGGTiG ^U s4U ^U GTTGG	0.74
G ¹ , G ¹⁰	iG ^R GTTGGTGTiG ^R GTTGG	0.17	G ⁸ , T ¹²	GGTTGGTiG ^R TGGs4U ^R TGG	1.13
G ¹ , G ¹⁰	iG ^U GTTGGTGTiG ^U GTTGG	-0.12	G ⁸ , T ¹²	GGTTGGTiG ^U TGGs4U ^U TGG	0.97
G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG ^R GTTGGTGTiG ^R TiG ^R GTTGG	0.70	G ⁸ , T ¹³	GGTTGGTiG ^R TGGTs4U ^R GCG	0.37
G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG ^U GTTGGTGTiG ^U TiG ^U GTTGG	0.20	G ⁸ , T ¹³	GGTTGGTiG ^U TGGTs4U ^U GG	0.30
G ¹ , T ³	iG ^R Gs4U ^R TGGTGTGGTGG	0.46	T ³ , G ¹⁰	GGs4U ^R TGGTGTiG ^R GTTGG	0.19
G ¹ , T ³	iG ^U Gs4U ^U TGGTGTGGTGG	0.85	T ³ , G ¹⁰	GGs4U ^U TGGTGTiG ^U GTTGG	-0.05
G ¹ , T ⁷	iG ^R GTTGGs4U ^R GTTGGTGG	0.57	T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^R TiG ^R GTTGG	0.40
G ¹ , T ⁷	iG ^U GTTGGs4U ^U GTTGGTGG	0.75	T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^U TiG ^U GTTGG	-0.03
G ¹ , T ⁹	iG ^R GTTGGTGS4U ^R GTTGG	-0.01	T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGS4U ^R TiG ^R GTTGG	0.45
G ¹ , T ⁹	iG ^U GTTGGTGS4U ^U GTTGG	-0.45	T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGS4U ^U TiG ^U GTTGG	0.15

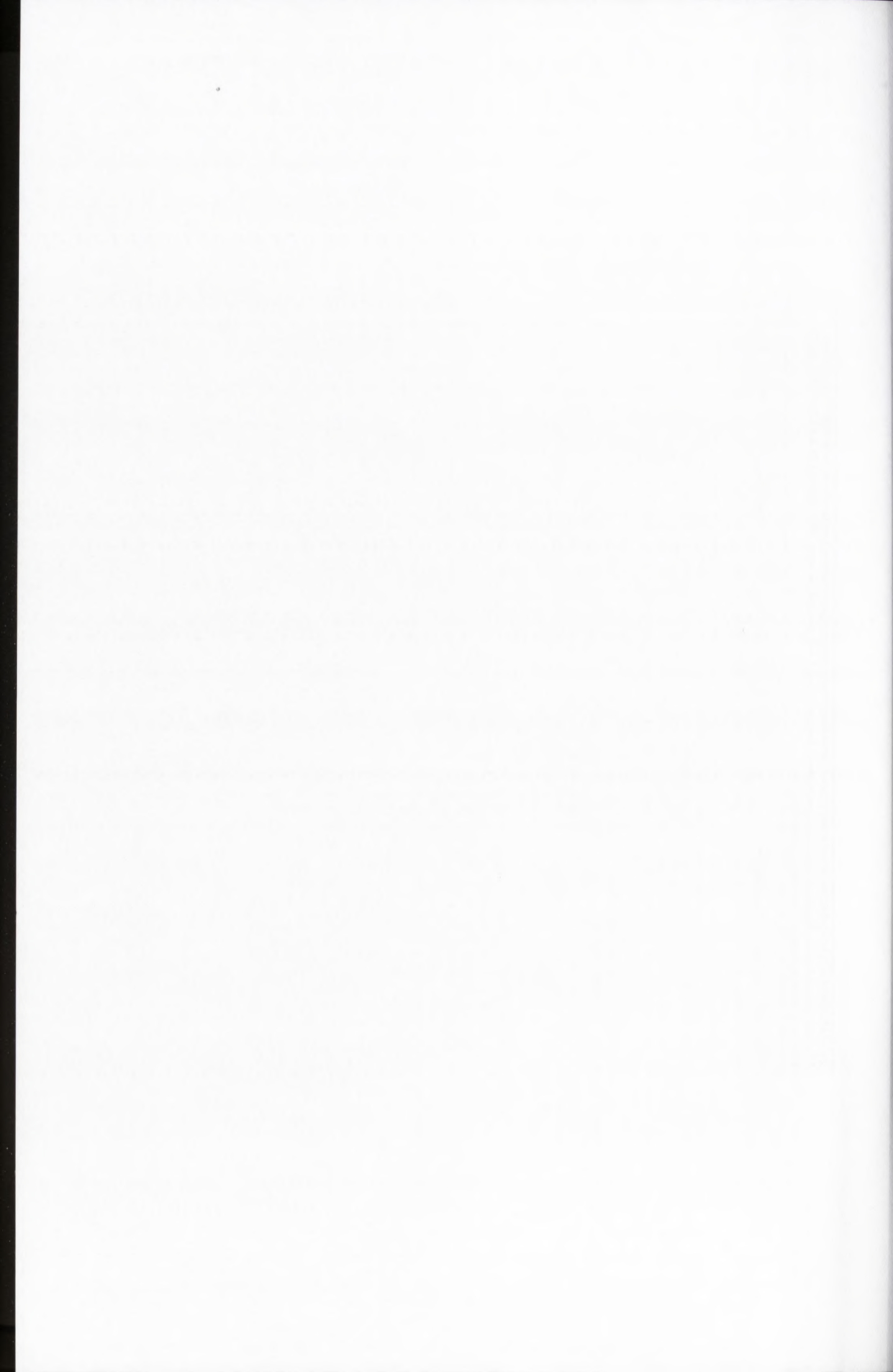
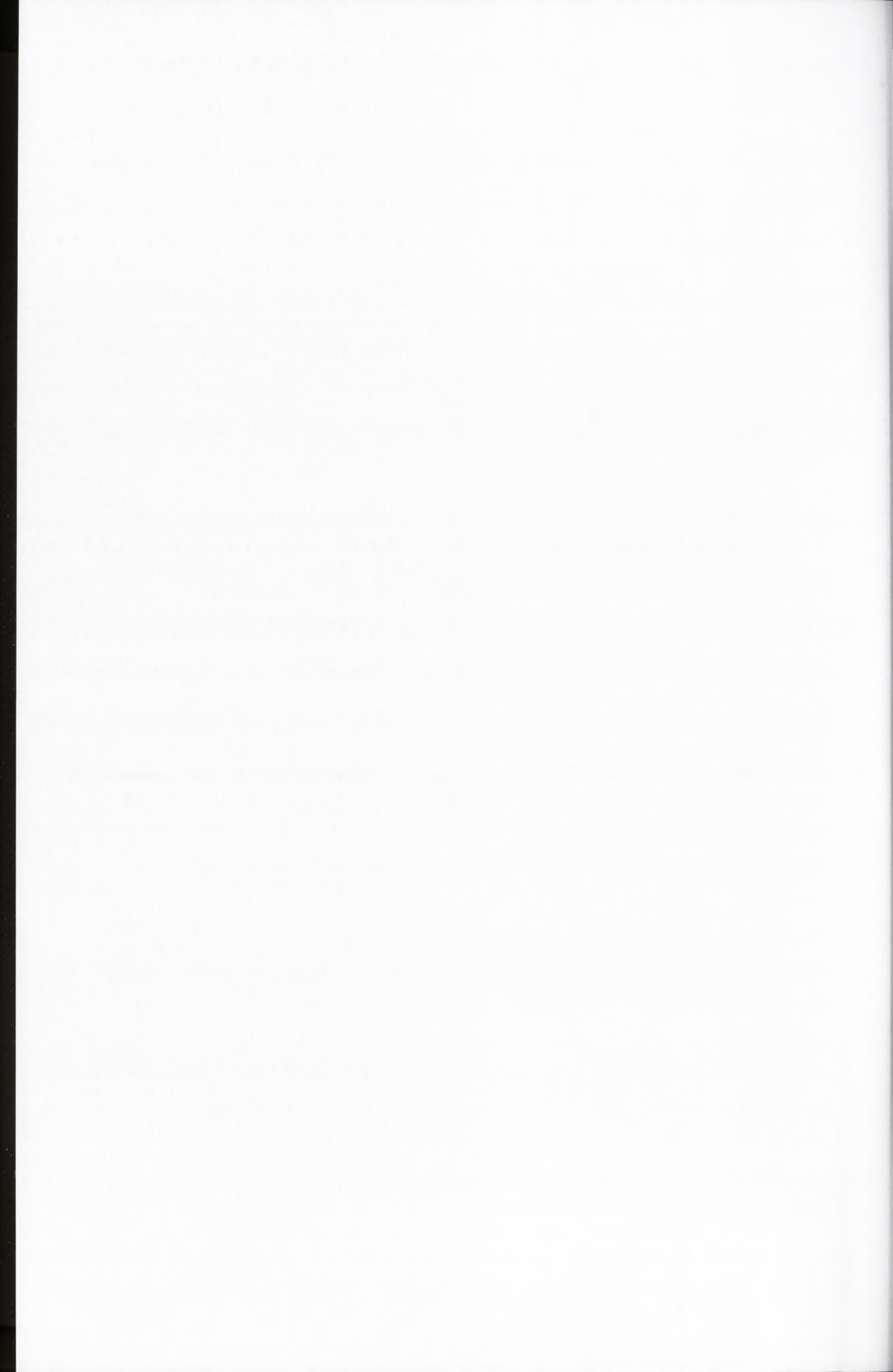
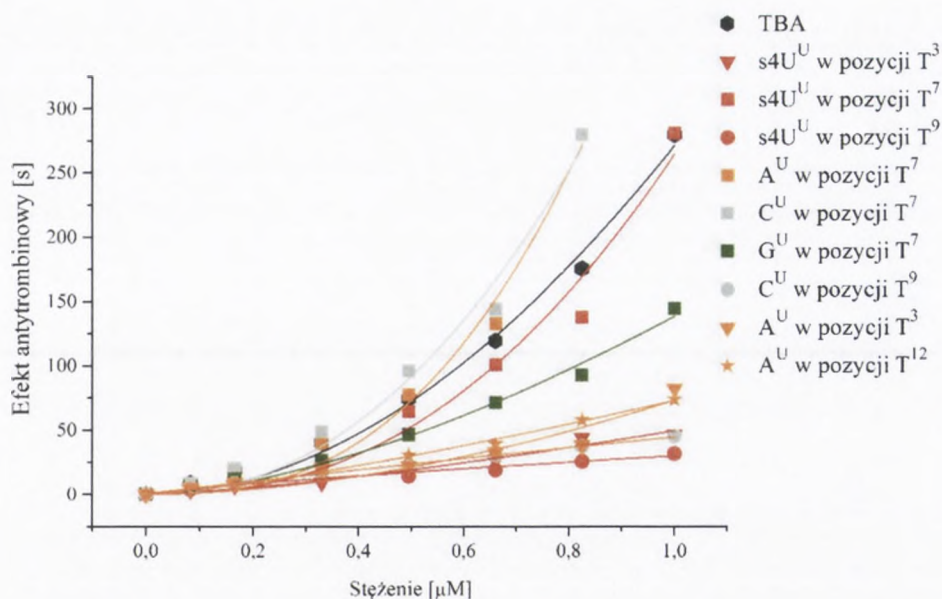


Tabela 8 (cd.). Efekt antykoagulacyjny wywierany przez G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA (iG^R) lub UNA (iG^U) oraz G-kwadrupeksów zawierających reszty izoguanozyny i 4-tiourydyny w serii RNA ($iG^R, s4U^R$) lub UNA ($iG^U, s4U^U$). Efekt pojedynczego lub wielokrotnego podstawienia.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	EA [s]
G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGTGT <i>iG^RGs4U^R</i> TGG	0.07
G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGTGT <i>iG^UGs4U^U</i> TGG	-0.30
G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTGT <i>iG^RGTs4U^R</i> GG	0.25
G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTGT <i>iG^UGTs4U^U</i> GG	0.10
G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	<i>iG^RGs4U^R</i> TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R GG	0.07
G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	<i>iG^UGs4U^U</i> TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG	0.15
T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R <i>iG^Rs4U^R</i> GGTs4U ^R GG	-0.03
T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U <i>iG^Us4U^U</i> GGTs4U ^U GG	0.35
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R <i>iG^RGTs4U^R</i> GG	1.02
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U <i>iG^UGTs4U^U</i> GG	1.25

W celu sprawdzenia czy zdolność inhibicji aktywności trombiny przez wybrane warianty TBA jest zależna od ich stężenia wykonano test trombinowy z zastosowaniem 7 różnych rozcieńczeń badanych oligonukleotydów: 0.0825, 0.165, 0.330, 0.495, 0.660, 0.825 oraz 1 μ M. Wyselekcjonowane aptamery zawierały reszty 4-tiourydyny lub kanonicznych reszt nukleotydydowych w serii UNA w pozycjach T³, T⁷, T⁹ lub T¹². W przypadku wariantów zawierających reszty A^U i C^U w pozycji T⁷ możliwe było wyraźne zwiększenie efektu antykoagulacyjnego wraz ze wzrostem stężenia tych oligomerów (EA dla A^U przyjmował wartość 16.40 s oraz 279.66 s dla stężenia odpowiednio 0.165 μ M i 0.825 μ M; EA dla C^U przyjmował wartość 19.83 s oraz 279.66 s dla stężenia odpowiednio 0.165 μ M i 0.825 μ M, Rys. 29, Tab. 9). Wyniki testu TT uzyskane dla powyższych aptamerów w stężeniu równym 0.825 μ M były lepsze o ok. 100 s od wielkości parametru EA otrzymanego dla niemodyfikowanego TBA (Rys. 29, Tab. 9). Warianty zawierające we wspomnianej pozycji reszty s4U^U oraz G^U również odznaczały się wyraźną poprawą właściwości antykoagulacyjnych, jednak wartość zmierzonego dla nich parametru EA była niższa w porównaniu do niemodyfikowanego TBA (Rys. 29, Tab. 9). W pozostałych przypadkach obserwowano nieznaczny wzrost wartości efektu antykoagulacyjnego wraz ze zwiększaniem stężenia tych aptamerów (EA przyjmowało niższą wartość niż dla niemodyfikowanego TBA, Rys. 29, Tab. 9).



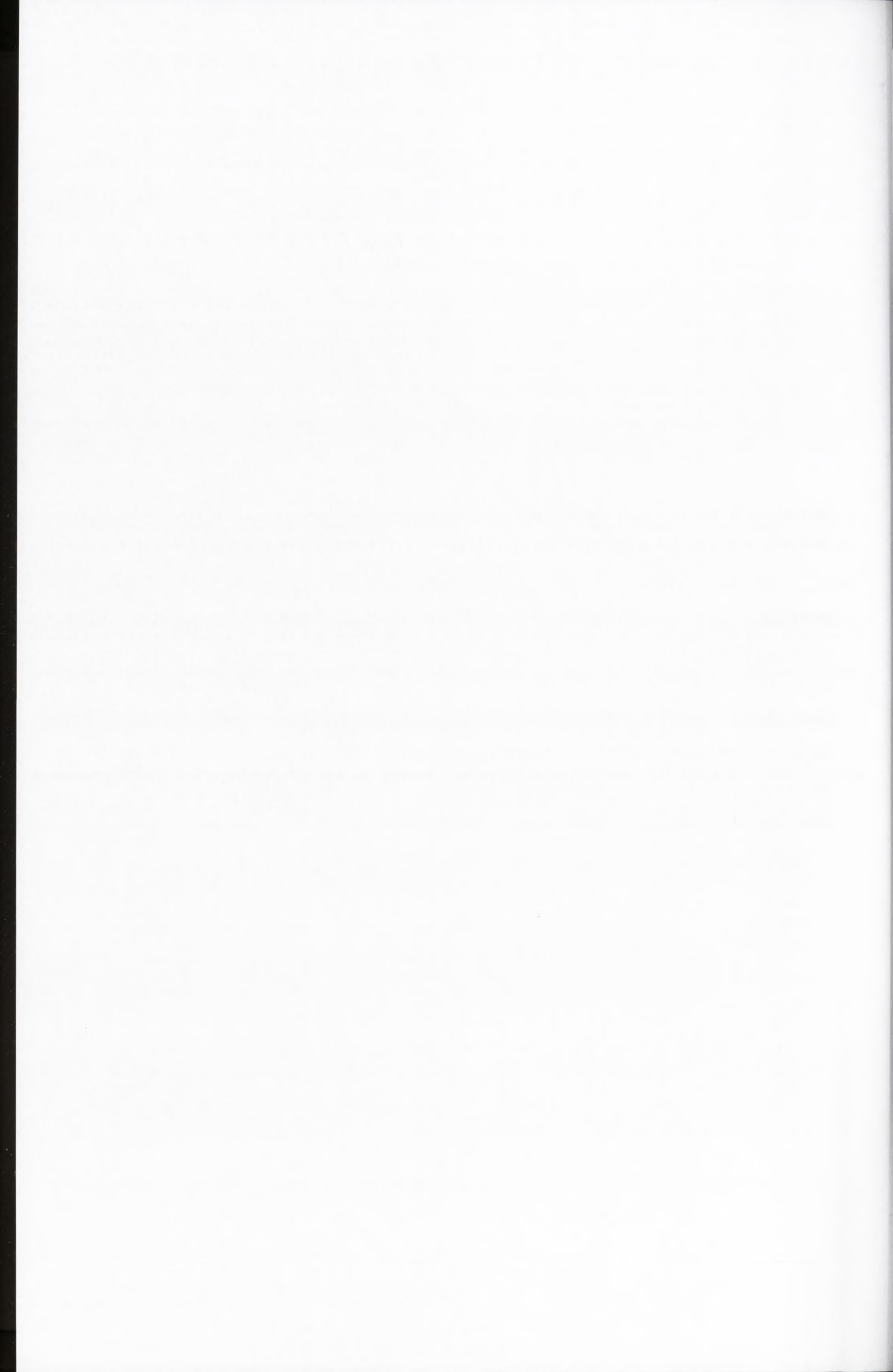


Rysunek 29. Wykres zależności wartości efektu antykoagulacyjnego wybranych wariantów TBA od ich stężenia.

Uzyskane wyniki świadczą o szczególnie korzystnym wpływie wprowadzania modyfikacji reszt nukleotydowych w pozycji T^7 na poprawę właściwości antykoagulacyjnych TBA. Co więcej, obserwowany efekt antykoagulacyjny wywierany przez badane aptamery jest zależny od ich stężenia. Zwiększanie potencjału inhibicyjnego wspomnianych oligonukleotydów jest możliwe poprzez dodanie większej ich ilości do osocza. Wszystkie analizowane warianty odznaczały się właściwościami antykoagulacyjnymi, jednak tylko dla dwóch z nich uzyskana wartość parametru EA była większa od wartości parametru EA niemodyfikowanego TBA.

Tabela 9. Zależność efektu antykoagulacyjnego od stężenia oligomeru.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Stężenia [μM]						
		0.0825	0.165	0.33	0.495	0.66	0.825	1
		Czas trombinowy [s]						
	GGTTGGTGTGGTTGG	8.75	18.68	40.43	74.84	119.55	175.51	279.66
T^3	GG <u>A</u> TGGTGTGGTTGG	4.91	8.89	20.43	22.23	32.61	38.25	82.31
T^3	GG <u>s4U</u> TGGTGTGGTTGG	3.46	6.88	9.16	16.31	26.79	44.21	46.89
T^7	GGTTGG <u>A</u> GTGGTTGG	6.19	16.40	39.68	77.36	132.64	279.66	280.11
T^7	GGTTGG <u>C</u> GTGGTTGG	8.38	19.83	48.82	95.94	143.91	279.66	279.66
T^7	GGTTGG <u>G</u> GTGGTTGG	5.88	11.85	26.43	46.58	71.60	92.56	144.38
T^7	GGTTGG <u>s4U</u> GTGGTTGG	6.78	14.96	41.09	64.74	100.81	137.78	280.89
T^9	GGTTGGT <u>G</u> CGTTGG	5.93	8.63	16.18	22.56	30.54	37.43	45.20
T^{12}	GGTTGGTGTGG <u>A</u> TGG	4.14	7.84	19.05	30.71	39.18	57.90	73.93
T^{12}	GGTTGGTGTGG <u>s4U</u> TGG	3.94	7.73	16.49	14.28	19.08	25.84	31.80



4. Test amidolityczny

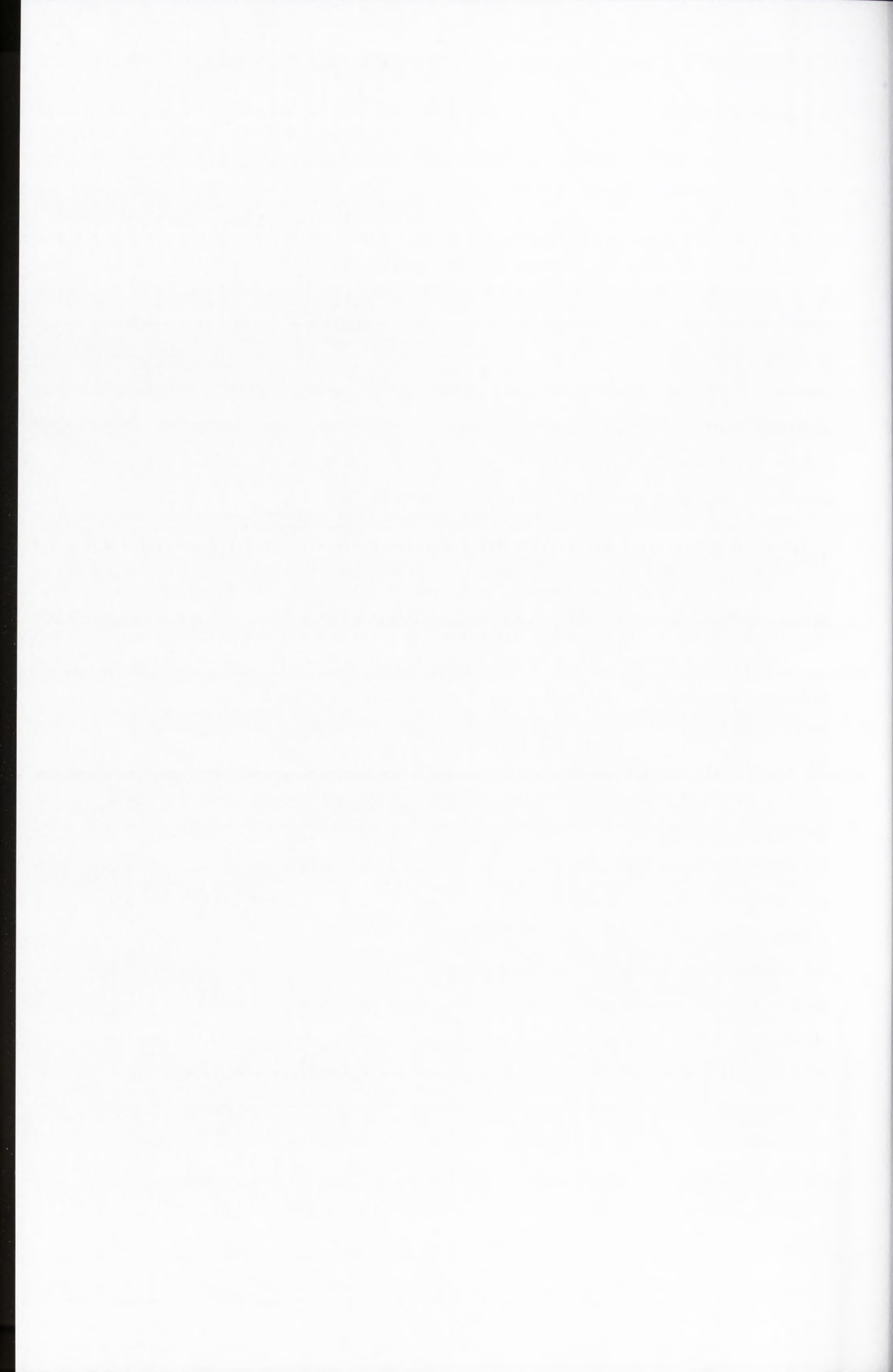
W celu sprawdzenia czy wybrana pula wariantów TBA o najbardziej korzystnych właściwościach antykoagulacyjnych (9 wariantów zawierających modyfikacje resztami 4-tiourydyny oraz kanonicznych zasad heterocyklicznych w serii UNA w pozycjach T³, T⁷, T⁹ lub T¹²) powoduje wydłużenie czasu trombinowego bez jednoczesnego obniżenia poziomu aktywności amidolitycznej trombiny (zdolność hydrolizy wiązania peptydowego) wykonano test amidolityczny. Jest to metoda pozwalająca na określenie dostępności centrum katalitycznego opisywanej proteazy serynowej poprzez dodanie substancji chromogennej S-2238 i rejestracji spektrofotometrycznej zmiany natężenia barwy próbki, będącej wynikiem hydrolizy wiązania peptydowego i przekształcania substratu w *p*-nitroanilinę (Rys. 30). Pomiar absorbancji jest dokonywany przy długości fali równej 405 nm.



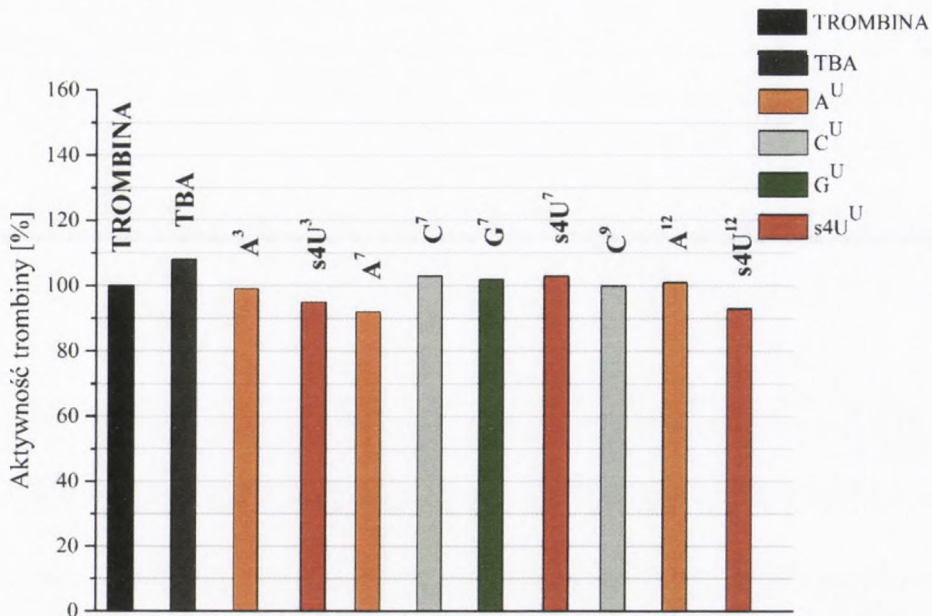
Rysunek 30. Schemat hydrolizy chromogennego substratu przez trombinę.

Zdolność trombiny do hydrolizy krótkiego, peptydowego substratu w obecności badanej puli wariantów TBA określono poprzez wyznaczenie procentu jej aktywności (At). Za 100% wartości tego parametru przyjęto wielkość absorbancji przy długości fali 405 nm dla roztworu samej trombiny.

Najwyższy poziom aktywności trombiny uzyskano w obecności wariantów zawierających reszty C^U, G^U, s4U^U w pozycji T⁷, C^U w T⁹, A^U w T¹² oraz niemodyfikowanego TBA (Rys. 31). Dla wszystkich wymienionych wcześniej aptamerów parametr ten przyjmował wartość powyżej 100%. Nieznacznie obniżony poziom aktywności trombiny (At < 100%) zaobserwowano, gdy w roztworze obecne były warianty zawierające reszty A^U w pozycjach T³ lub T⁷ raz s4U^U w pozycjach U³ lub U¹² (Rys. 31). Na podstawie analizy statystycznej z zastosowaniem testu *p*-studenta określono wartość parametru *p* dla wszystkich obserwowanych różnic poziomu aktywności trombiny w obecności analizowanych, modyfikowanych wariantów TBA. We wszystkich przypadkach wynik był większy od 0.05, na podstawie czego stwierdzono, że uzyskane zróżnicowanie poziomu aktywności trombiny w obecności badanych wariantów nie ma znaczenia statystycznego. W związku z powyższym można w sposób jednoznaczny stwierdzić, że analizowane aptamery nie wpływają na zdolność hydrolizy peptydowego substratu S2238TM przez trombinę. Wynik ten wskazuje,



że badane warianty TBA swoje działanie inhibicyjne wywierają poprzez związanie się z miejscem aktywnym I cząsteczki trombiny.

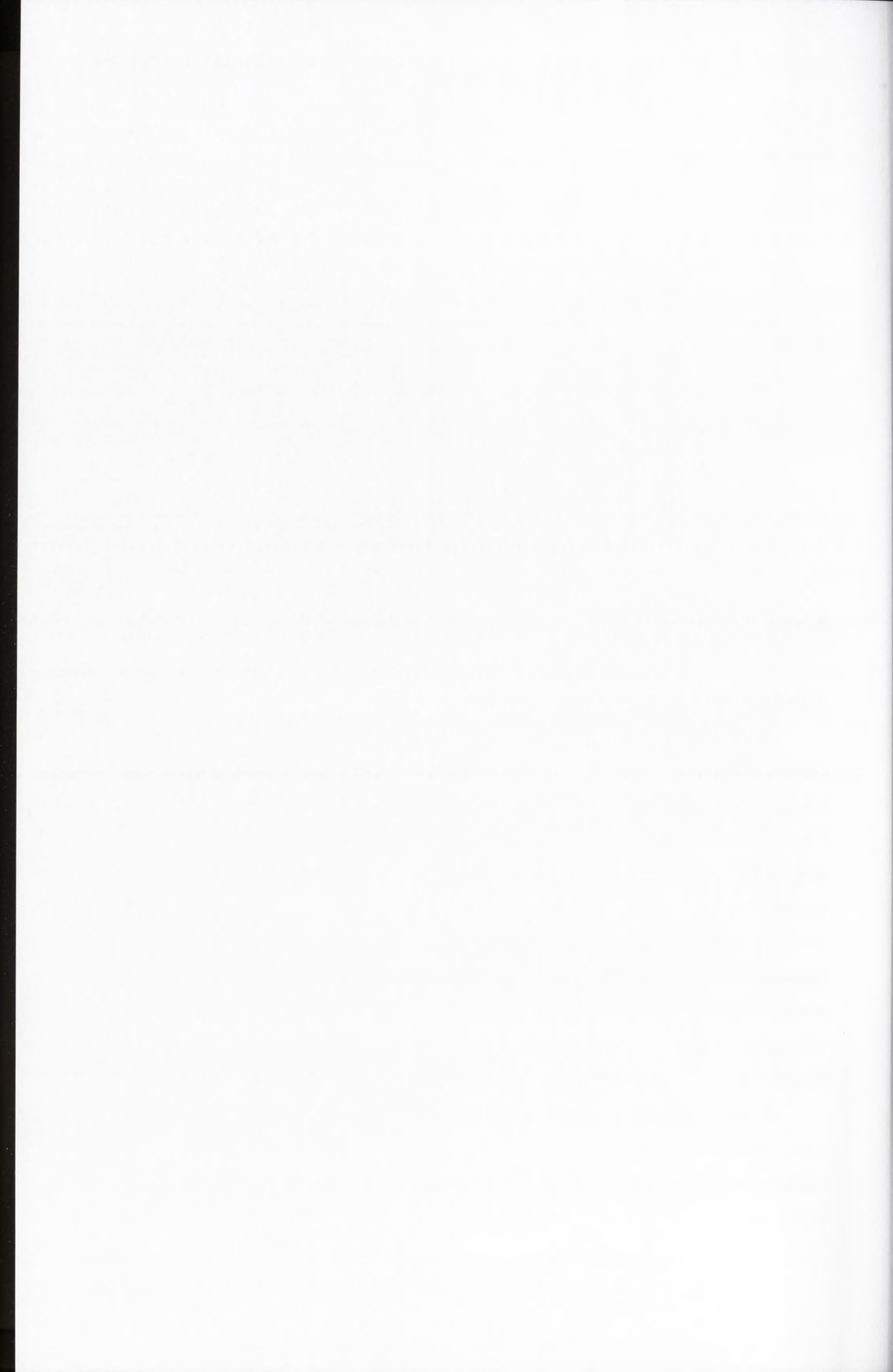


Rysunek 31. Wykres poziomu aktywności trombiny w obecności niemodyfikowanego TBA oraz modyfikowanych wariantów TBA.

5. Badanie stałej dysocjacji wariantów TBA

Stała dysocjacji (K_d) jest parametrem charakteryzującym oddziaływanie dwóch cząsteczek tworzących kompleks, a jej znajomość jest kluczowa dla określenia siły tego procesu. W niniejszej pracy K_d kompleksu trombiny z TBA wyznaczono z wykorzystaniem spektroskopii plazmonowego rezonansu powierzchniowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) w czasie rzeczywistym. Jest to technika optyczna umożliwiającą określenie siły oddziaływania dwóch molekuł: jednej zawieszonych w roztworze oraz drugiej unieruchomionej na metalicznej powierzchni, na podstawie rejestracji zmiany współczynnika załamania światła [170]. Badania techniką SPR zostały wykonane w ramach realizacji pracy doktorskiej w trakcie 2 miesięcznego stażu naukowego w grupie badawczej kierowanej przez prof. Jespera Wengla w Centrum Kwasów Nukleinowych na Uniwersytecie Południowej Danii w Odense.

Dane literaturowe wskazują, że korzystne wartości stałej dysocjacji TBA z trombiną obserwowane są przeważnie, gdy wprowadzona modyfikacja reszt nukleotydowych nie zaburza struktury kwadrupleksu i znajduje się w jednej z trzech pętli aptameru [99]. W związku z powyższym pomiary przeprowadzono

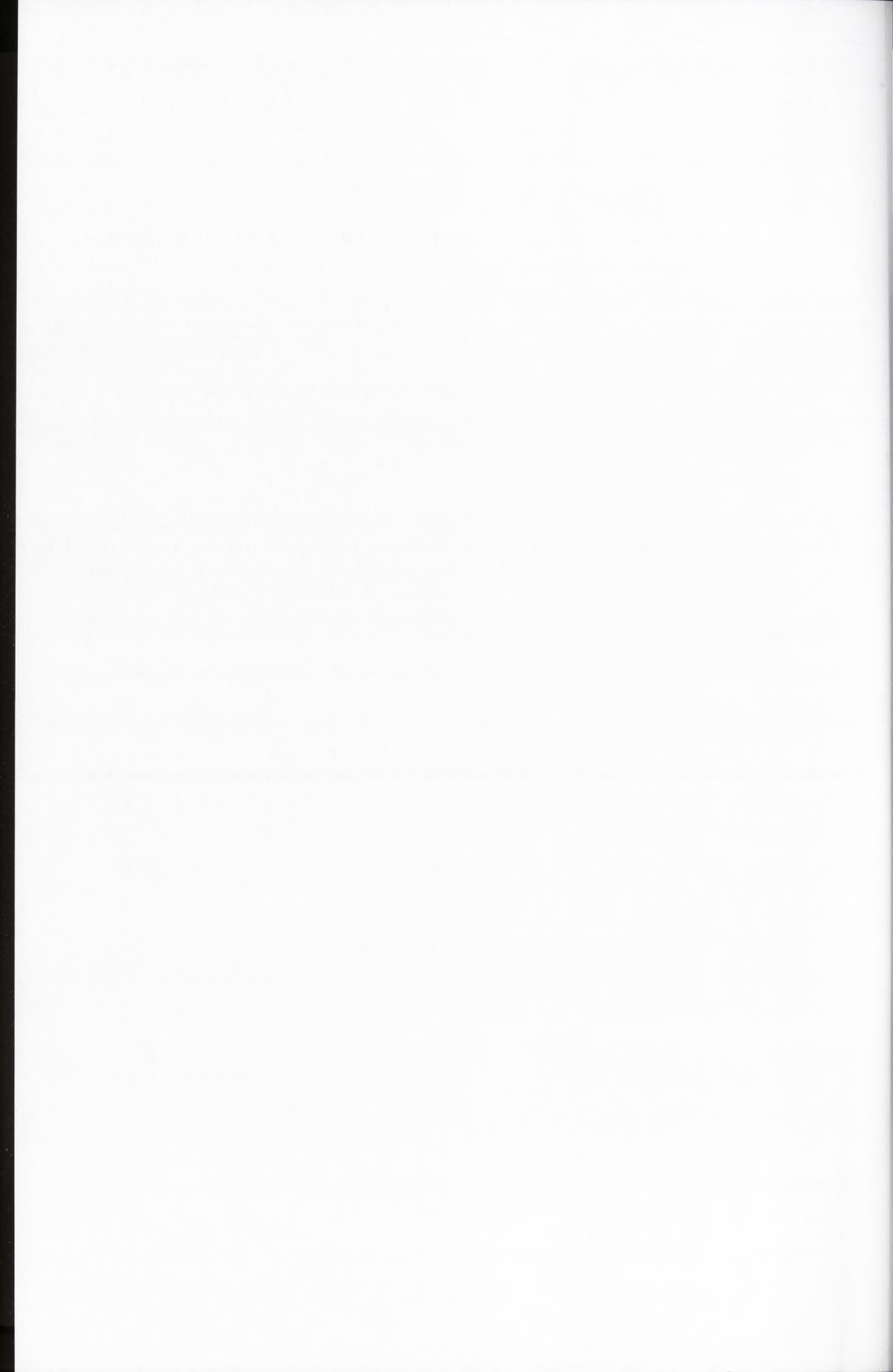


na wyodrębnionej grupie cząsteczek odznaczających się najlepszymi parametrami termodynamicznymi oraz właściwościami antykoagulacyjnymi (Tab. 10).

Tabela 10. Wartości stałej dysocjacji dla wybranych wariantów TBA.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja 5'-3'	Stała dysocjacji [nM]
	GGTTGGTGTGGTTGG	4.23
T ³	GG <u>A</u> ^U TGGTGTGGTTGG	5.99
T ³	GG <u>s4U</u> ^U TGGTGTGGTTGG	6.67
T ⁷	GGTTGG <u>A</u> ^U GTGGTTGG	4.75
T ⁷	GGTTGG <u>C</u> ^U GTGGTTGG	4.39
T ⁷	GGTTGG <u>G</u> ^U GTGGTTGG	4.25
T ⁷	GGTTGG <u>s4U</u> ^U GTGGTTGG	5.00
T ⁹	GGTTGGTGTGG <u>C</u> ^U GGTTGG	8.77
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>A</u> ^U TGG	10.91
T ¹²	GGTTGGTGTGG <u>s4U</u> ^U TGG	15.99

Najbardziej korzystne wartości stałej dysocjacji uzyskano dla wariantów TBA zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA oraz 4-tiourydyny w serii UNA w pozycji T⁷ aptameru (parametr K_d przyjmował wartość 4.25, 4.39, 4.75 oraz 5.00 nM odpowiednio dla G^U, C^U, A^U oraz s4U^U, Tab. 10), które były porównywalne z K_d zmierzonym dla niemodyfikowanego TBA (4.23 nM, Tab. 10). Otrzymane dane eksperymentalne pozostają w zgodzie z wynikami testu trombinowego, co może świadczyć o dużej tolerancji na wprowadzanie modyfikowanych reszt nukleotydowych typu UNA w pozycję T⁷ aptameru. Podobne obserwacje poczyniła grupa badawcza J. Wengla analizując wpływ pojedynczego podstawienia reszt nukleotydowych DNA resztami urydyny lub guanozyny w serii UNA [131]. Większą wartość stałej dysocjacji zaobserwowano w przypadku wariantów zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA lub 4-tiourydyny w serii UNA w pozycji T³ i T⁹ (K_d przyjmowała wartość 5.99, 6.67 oraz 8.77 nM odpowiednio dla A^U w T³, s4U^U w T³ oraz C^U w T⁹, Tab. 10). Osłabienie oddziaływania TBA z cząsteczką trombiny zauważono również w sytuacji, gdy reszty A^U i s4U^U wprowadzono w pozycję T¹² TBA (K_d wynosiła 10.91 oraz 15.99 nM odpowiednio dla A^U i s4U^U, Tab. 10). We wszystkich analizowanych przypadkach warianty zawierające w danej pozycji modyfikacje resztami s4U^U charakteryzowały się wyższymi wartościami parametru K_d w porównaniu do aptamerów posiadających w tym miejscu reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA. Uzyskane wyniki znalazły częściowo odzwierciedlenie

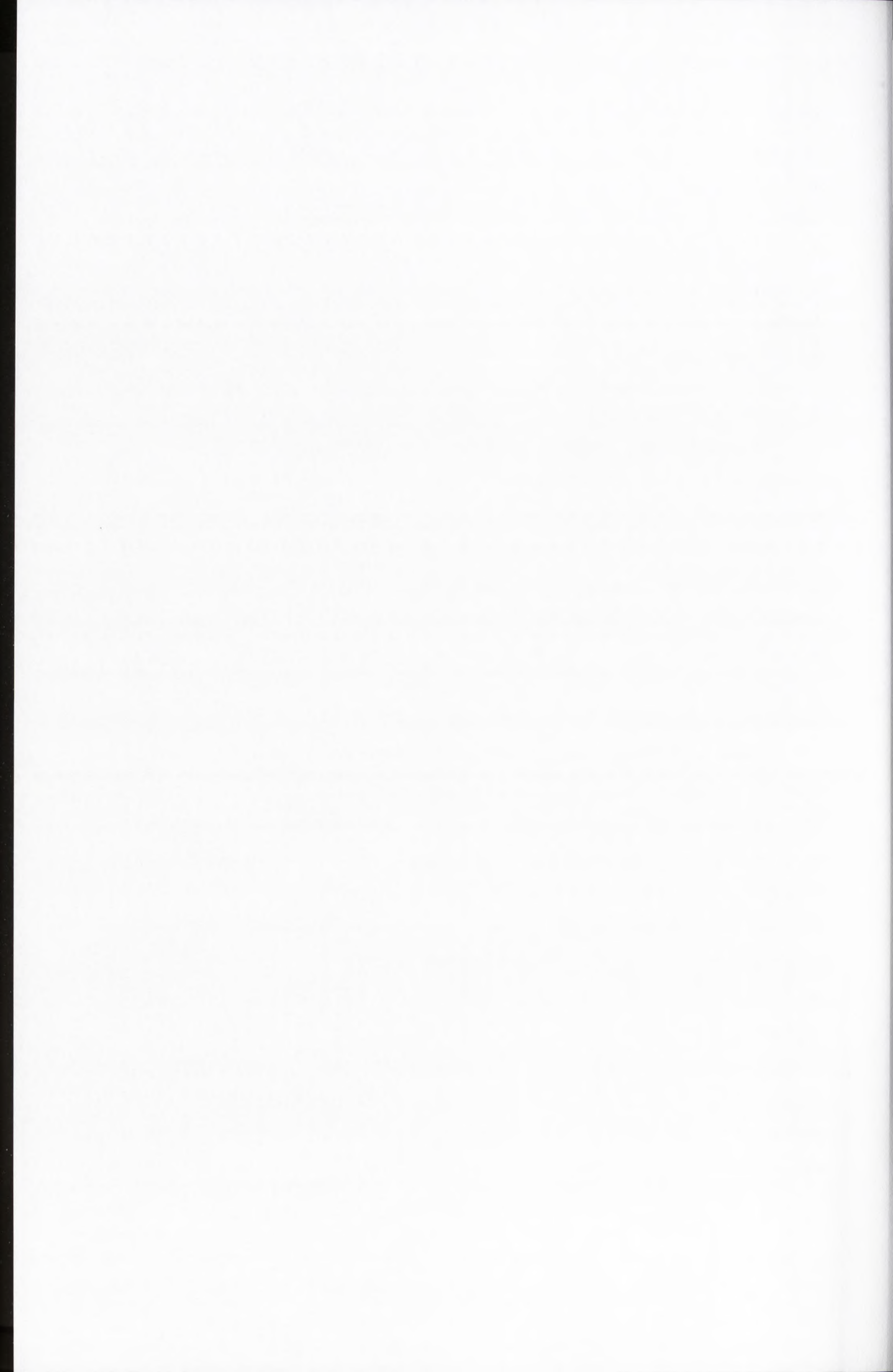


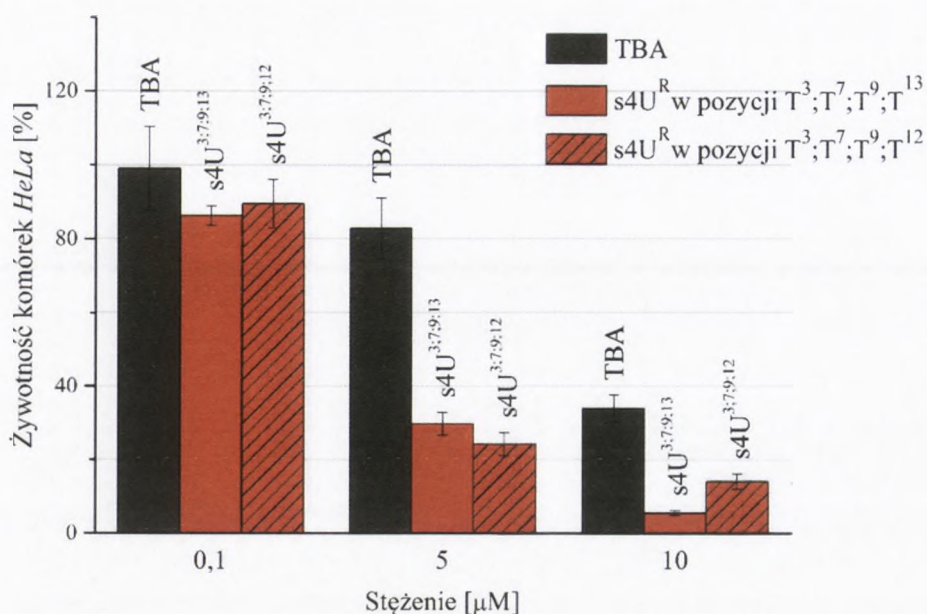
w wartości parametru EA przy stężeniu 0.165 μM (im wyższa wartość parametru EA tym niższa wartość K_d). Wyjątek stanowiły dwa warianty zawierające reszty G^U lub $s4U^U$ odpowiednio w pozycji T^7 i T^{12} (Tab. 10). W obu przypadkach, uzyskanych wartości K_d nie można było bezpośrednio powiązać z wynikami testu trombinowego. Powyższe dane obrazują jak bardzo skomplikowaną siecią zależności jest proces krzepnięcia krwi. Znajomość wartości stałej dysocjacji nie jest warunkiem dostatecznym do jednoznacznego określenia efektu antykoagulacyjnego wywieranego przez badany wariant TBA.

6. Badanie właściwości antyproliferacyjnych wybranych wariantów TBA

W ostatnim czasie pojawiło się wiele doniesień literaturowych informujących o znacznym potencjale antyproliferacyjnym sekwencji oligonukleotydowych bogatych w reszty guanozynowe. Wymienione cząsteczki przyjmują strukturę G-kwadrupleksu i są zdolne do specyficznego rozpoznawania białek zaangażowanych w cykl komórkowy, co może stanowić potencjalną przyczynę obserwowanej inhibicji wzrostu komórek [171, 172]. Grupa badawcza pod kierunkiem L. Mayol dowiodła, że wprowadzenie łącznika dibenzylowego w określone pozycje TBA powoduje zmniejszenie właściwości antykoagulacyjnych tego aptameru przy jednoczesnym zwiększeniu jego potencjału antyproliferacyjnego [133].

Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia literaturowe postanowiono zbadać zdolności inhibicji wzrostu komórek raka szyjki macicy (*HeLa*) przez wybrane warianty TBA z zastosowaniem testu aktywności metabolicznej komórek (test MTT). Metoda ta pozwala ocenić żywotność komórek na podstawie stopnia redukcji rozpuszczalnej w wodzie, żółtej soli tetrazolowej (MTT) w nierozpuszczalny, ciemnoniebieski formazan. Ilość zredukowanego MTT jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli. Wyboru oligonukleotydów z całkowitej puli wariantów TBA dokonano na podstawie analizy przesiewowego testu MTT wykonanego w dwóch stężeniach aptamerów (0.1 i 5.0 μM) w Zakładzie Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych. Szczegółowe badania właściwości antyproliferacyjnych przeprowadzono z zastosowaniem dwóch wariantów TBA zawierających wielokrotne podstawienie resztami $s4U^R$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 , T^{12} lub T^{13} oraz niemodyfikowanego TBA (w stężeniu 0.1, 5.0 i 10.0 μM).





Rysunek 32. Wykres poziomy żywotności komórek *HeLa* w obecności niemodyfikowanego TBA oraz modyfikowanych wariantów TBA.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że w przypadku aptameru posiadającego reszty s4U^R w pozycji T³, T⁷, T⁹, T¹² następuje zahamowanie wzrostu komórek *HeLa* o ok. 11% przy stężeniu oligomeru równym 0,1 µM. Efekt ten ulega stopniowemu nasileniu wraz ze zwiększaniem ilości omawianego wariantu TBA w hodowli komórkowej, przyjmując wartość ok. 85% w 10,0 µM próbce (Rys. 32, Tab. 11). Podobną tendencję zaobserwowano również dla aptameru zawierającego modyfikację resztą s4U^R w pozycji T³, T⁷, T⁹, T¹³. W tym jednak przypadku efekt inhibicyjny przy stężeniu oligomeru równym 10,0 µM wynosił ok. 95% (Rys. 32, Tab. 11). Dane uzyskane dla niemodyfikowanego TBA pozwoliły stwierdzić, że w stężeniu 5,0 µM odznaczał się około 3 krotnie słabszymi właściwościami antyproliferacyjnymi w porównaniu do dwóch wspomnianych wcześniej wariantów (Rys. 32, Tab. 11). W stężeniu 10,0 µM niemodyfikowany TBA powodował spadek żywotności komórek *HeLa* do ok. 34% (Rys. 32, Tab. 11). Uzyskane wyniki świadczą o możliwości zmiany właściwości TBA z antykoagulacyjnych na antyproliferacyjne nie tylko poprzez wprowadzenie łącznika dibenzylowego [133], ale również dzięki modyfikacji reszty cukrowej i zasadowej nukleozydu.

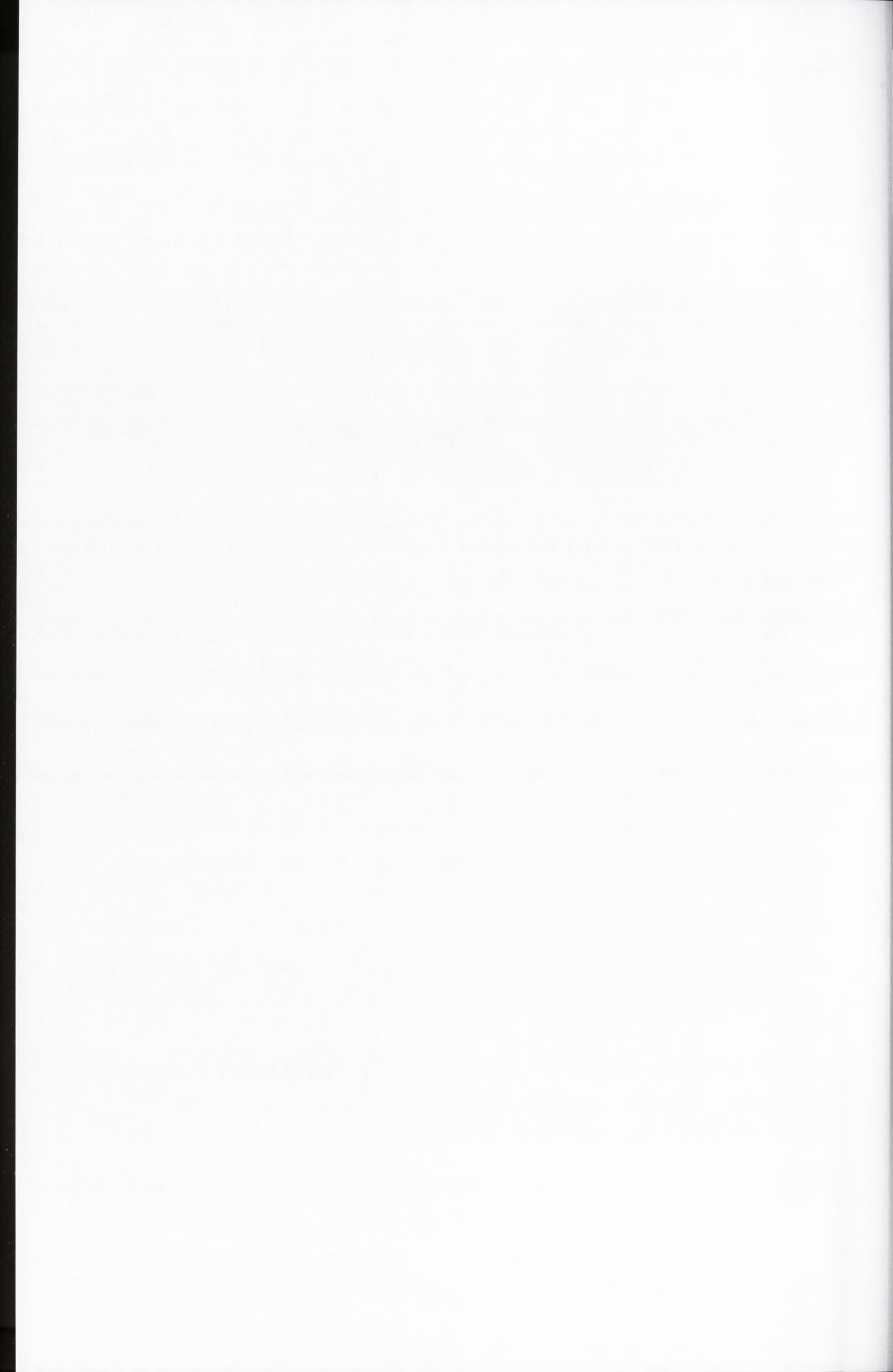


Tabela 11. Zależność efektu antyproliferacyjnego od stężenia oligomeru.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	Stężenia [μM]		
		0.10	5.0	10.0
Żywotność komórek <i>HeLa</i> [%]				
	GGTTGGTGTGGTTGG	99.00	82.78	33.89
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGs4U ^R TGG	89.42	24.28	14.10
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R GG	86.29	29.74	5.49

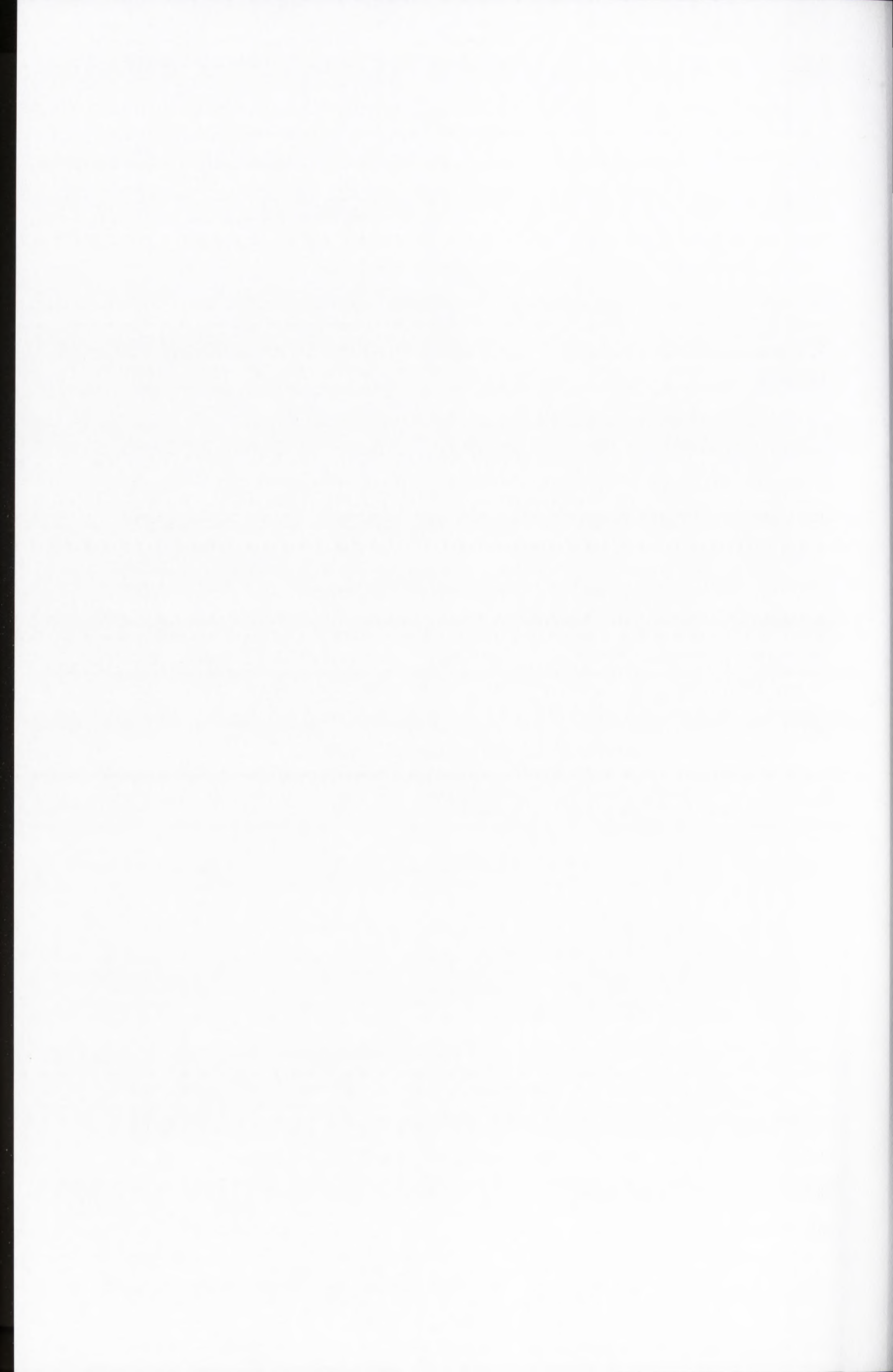
7. Badanie stabilności biologicznej wybranych wariantów TBA w osoczu krwi ludzkiej

Szybka eliminacja aptamerów z krwioobiegu oraz podatność na cięcie osoczwymi nukleazami stanowią główne czynniki ograniczające działanie aptamerów w ludzkim organizmie [173]. Określenie stopnia degradacji oligonukleotydów w osoczu krwi ludzkiej jest możliwe poprzez wyznaczenie ich okresu półtrwania ($T_{1/2}$), czyli czasu, po którym ilość badanej substancji ulegnie zmniejszeniu o połowę. Naukowcy dowiedli, że wprowadzenie modyfikowanych reszt nukleotydowych do łańcucha aptameru wpływa niekiedy korzystnie na wartość parametru $T_{1/2}$. Grupa badawcza pod kierunkiem S. Maiti udowodniła, że G-kwadrupleksy zawierające reszty nukleotydowe w serii UNA odznaczają się wydłużonym okresem półtrwania w osoczu krwi ludzkiej [174].

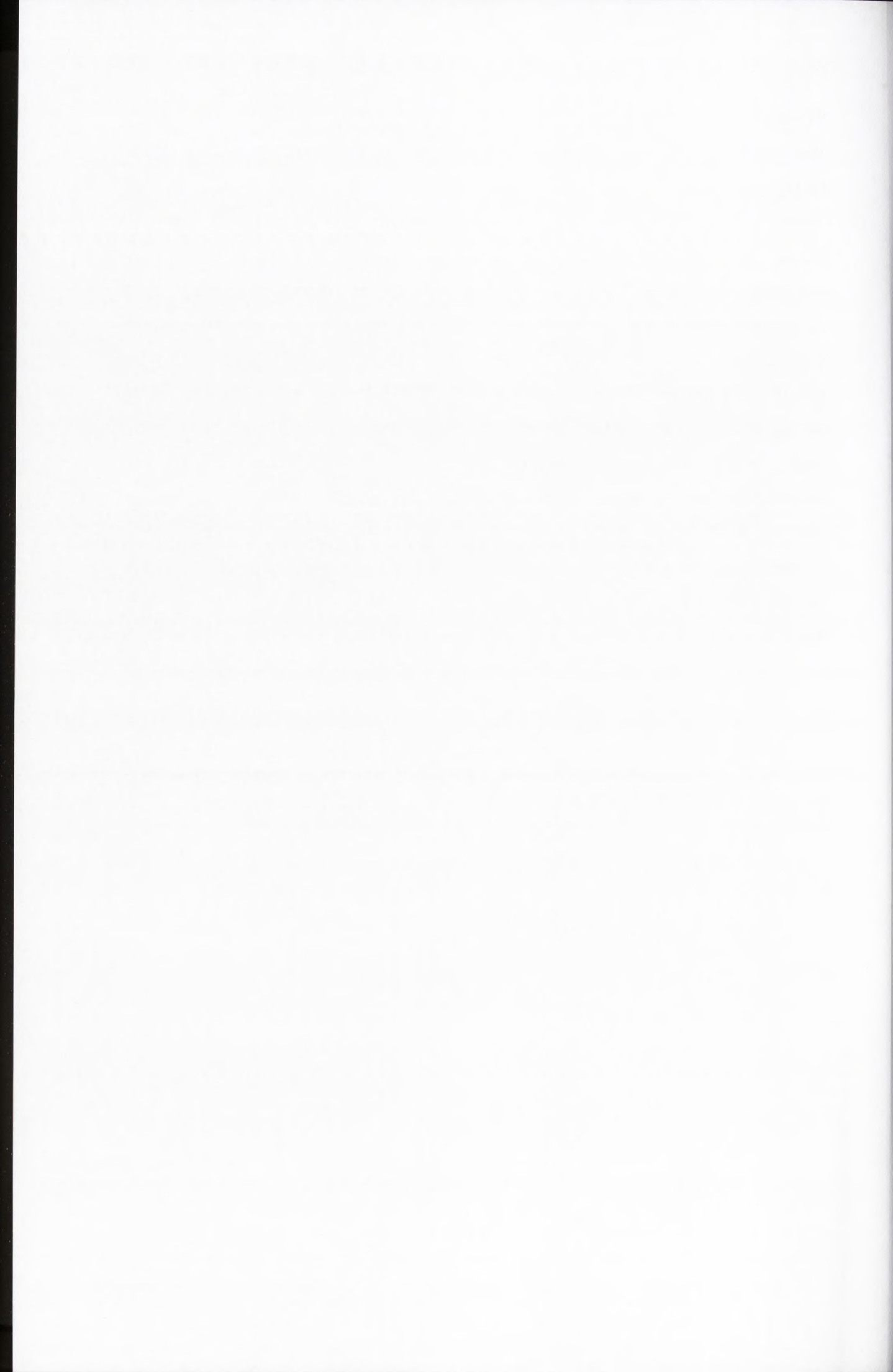
Tabela 11. Wartości stabilności biologicznej wybranych wariantów TBA w osoczu krwi ludzkiej.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja 5'-3'	$T_{1/2}$ [min]
	GGTTGGTGTGGTTGG	59.3
T ⁷	GGTTGGA ^U GTGGTTGG	78.9
T ⁷	GGTTGGC ^U GTGGTTGG	89.2
T ⁷	GGTTGGG ^U GTGGTTGG	89.2
T ⁷	GGTTGGs4U ^U GTGGTTGG	66.9
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGs4U ^R TGG	-
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R GG	-

Pomiary parametru $T_{1/2}$ przeprowadzono na wyodrębnionej grupie cząsteczek odznaczających się najlepszymi właściwościami antykoagulacyjnymi lub antyproliferacyjnymi (Tab. 11) poprzez inkubację tych oligonukleotydów w osoczu krwi ludzkiej w temperaturze 37°C. Najdłuższym okresem półtrwania odznaczały się warianty zawierające reszty C^U lub G^U w pozycji T⁷ aptameru (w obu przypadkach



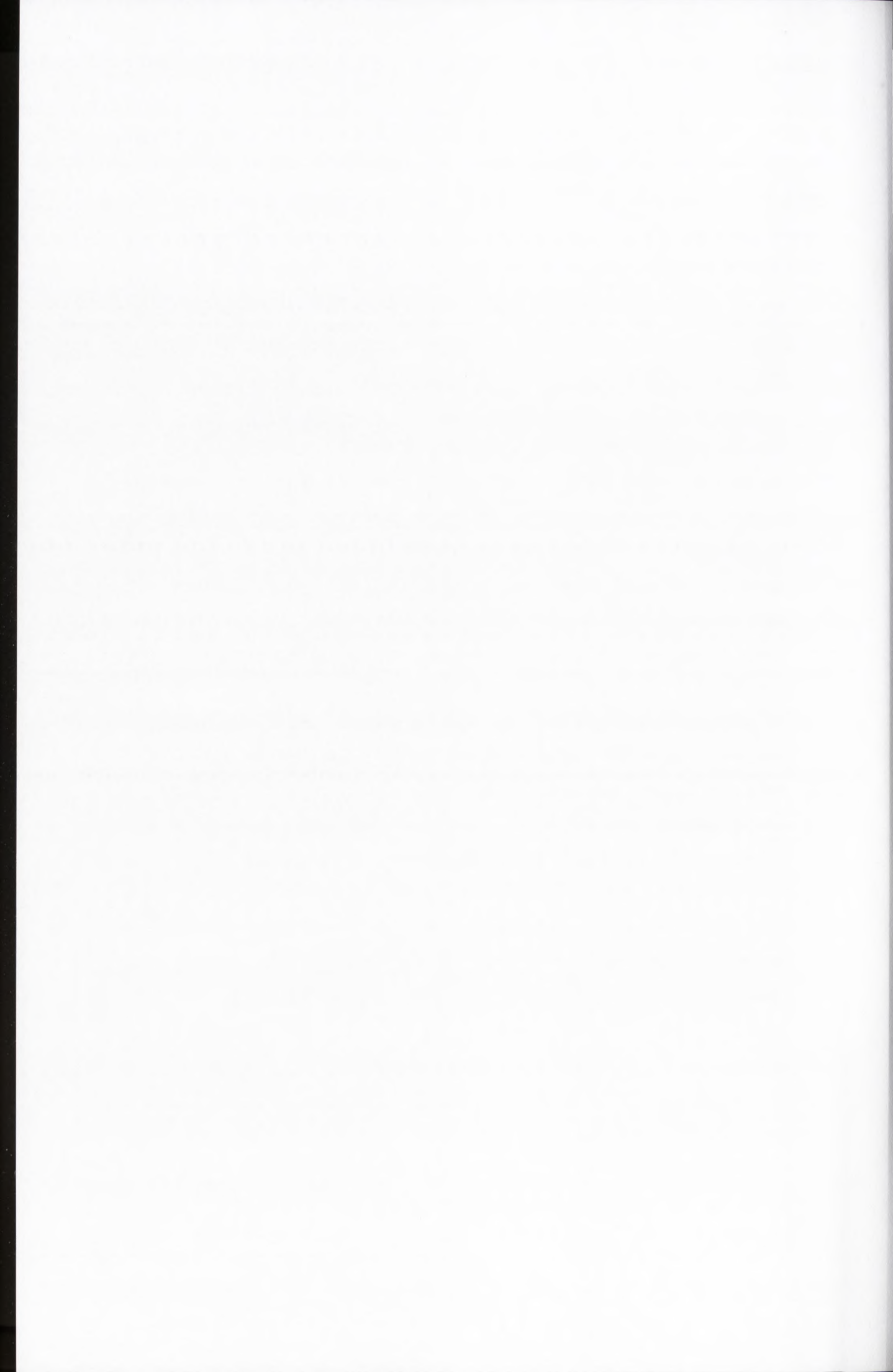
$T_{1/2}$ przyjmował wartość równą 89.2 minuty, Tab. 11, Załącznik 3 – plik RE1). Wprowadzenie w to samo miejsce reszty A^U również powodowało poprawę stabilności biologicznej badanej cząsteczki względem niemodyfikowanego TBA (Tab. 11, Załącznik 3 – plik RE1), jednak $T_{1/2}$ w tym przypadku przyjmował niższą wartość, równą 78.9 minut. Najmniejszą zmianę odporności na degradację osoczymi nukleazami zaobserwowano dla wariantu TBA zawierającego reszty $s4U^U$ w pozycji T^7 ($T_{1/2}$ przyjmował wartość 66.9 minuty, Tab. 11, Załącznik 3 – plik RE1). Co ciekawe, wyznaczenie wartości parametru $T_{1/2}$ aptamerów posiadających wielokrotne podstawienie resztami $s4U^R$ w pozycjach T^3 , T^7 , T^9 , T^{12} lub T^{13} okazało się niemożliwe ze względu na występowanie dodatkowych produktów widocznych na żelu w postaci wolno migrujących prążków (Załącznik 3 – plik RE2). W literaturze opisano zwiększanie powinowactwa oligonukleotydów do białek poprzez wprowadzenie tiolowej modyfikacji reszty nukleozydowej lub wiązania 5'-3' fosfodiesterowego w niektóre pozycje tych cząsteczek [122, 175, 176]. W związku z powyższym widoczne na żelu dodatkowe prążki mogą odpowiadać kompleksowi wariantów TBA z białkami osocza.



VI. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu podstawienia wybranymi, modyfikowanymi resztami nukleotydowymi na stabilność termodynamiczną oraz właściwości biologiczne TBA. Uzyskane wyniki można podsumować w następujących punktach:

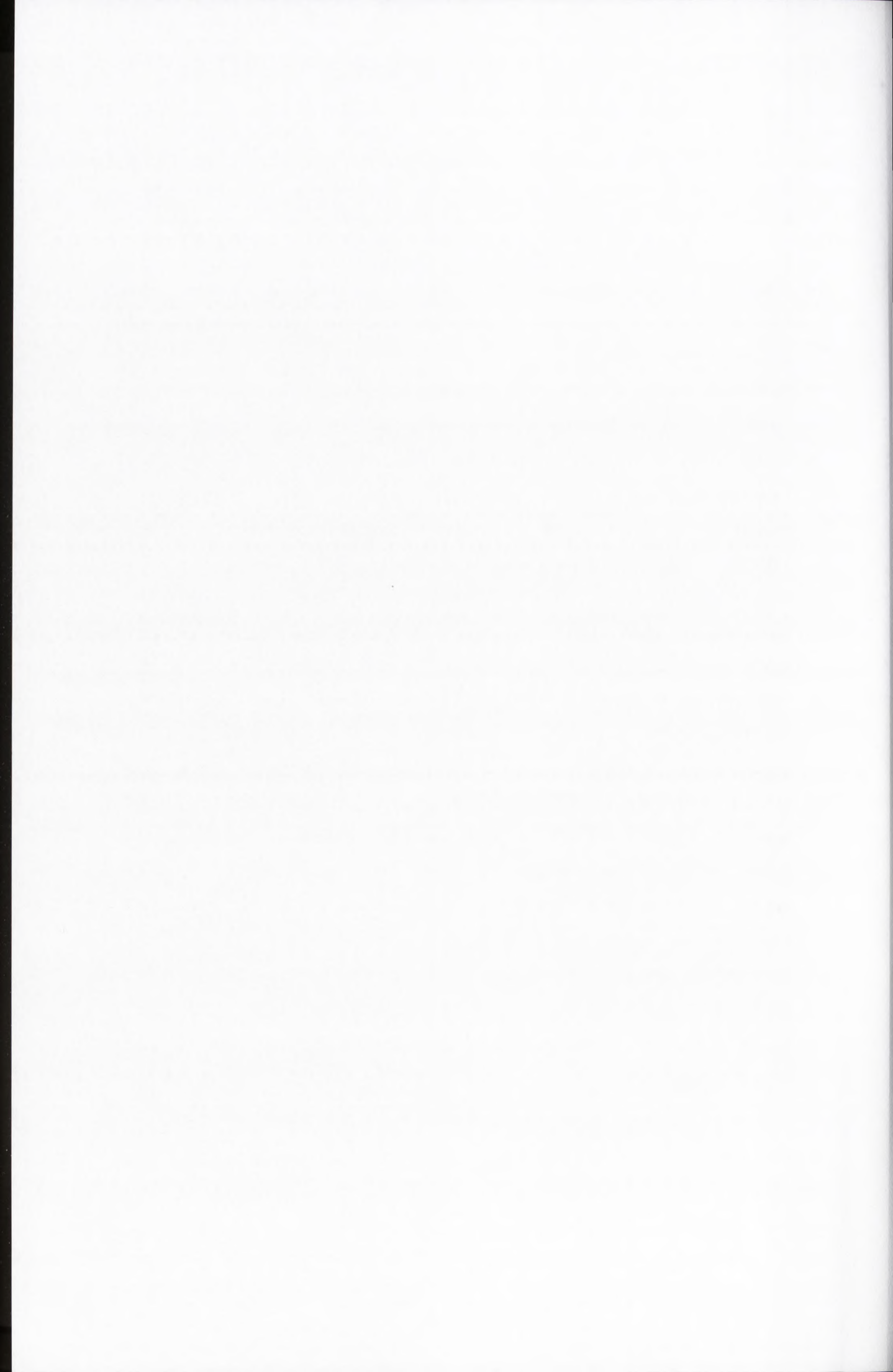
1. Wyniki przeprowadzonych badań termodynamicznych wykazały znaczący wpływ rodzaju modyfikacji na stabilność termodynamiczną analizowanych wariantów TBA. Najkorzystniejsze okazało się wprowadzenie reszt 4-tiourydyny w serii RNA lub UNA w pozycję 3, 7 oraz 12 aptameru oraz reszty adenozy, cytydyny oraz guanozyny w serii UNA w pozycję 7 cząsteczki. Obecność reszt 4-tiourydyny oraz izoguanozyny w serii RNA lub UNA w pozostałych badanych pozycjach aptameru powodowała wyraźne obniżenie trwałości termodynamicznej kwadrupleksu (wyjątek stanowiła reszta 4-tiourydyny w serii RNA umieszczona w pozycji 9). Wprowadzenie reszty 4-tiourydyny w serii RNA wywoływało silniejszy efekt stabilizacyjny w porównaniu do reszt 4-tiourydyny w serii UNA. Ponadto, efekty termodynamiczne spowodowane wprowadzeniem do TBA więcej niż jednej modyfikacji w serii RNA lub UNA miały charakter addytywny.
2. Na podstawie widm CD oraz TDS uzyskanych dla wariantów posiadających pojedyncze lub wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny w serii UNA lub RNA oraz resztami kanonicznych nukleotydów w serii UNA można stwierdzić, że wprowadzenie wymienionych modyfikacji nie wpływało na topologię fałdowania tych cząsteczek i w temperaturze 37°C zachowują one strukturę wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego G-kwadrupleksu. Natomiast widma CD i TDS wariantów posiadających pojedyncze lub wielokrotne podstawienia resztami izoguanozyny w serii UNA lub RNA oraz wariantów zawierających jednocześnie reszty 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii UNA lub RNA charakteryzowały się zmniejszeniem intensywności lub całkowitym zanikiem pasm charakterystycznych dla wewnątrzcząsteczkowego, antyrównoległego G-kwadrupleksu. Na tej podstawie można było wnioskować, że wprowadzenie powyższych modyfikacji wyraźnie zmniejsza ustrukturalizowanie G-kwadrupleksów lub uniemożliwia przyjęcie tej struktury.
3. Wyniki przeprowadzonego testu trombinowego pozwoliły stwierdzić, że większość badanych, modyfikowanych aptamerów wykazywało właściwości



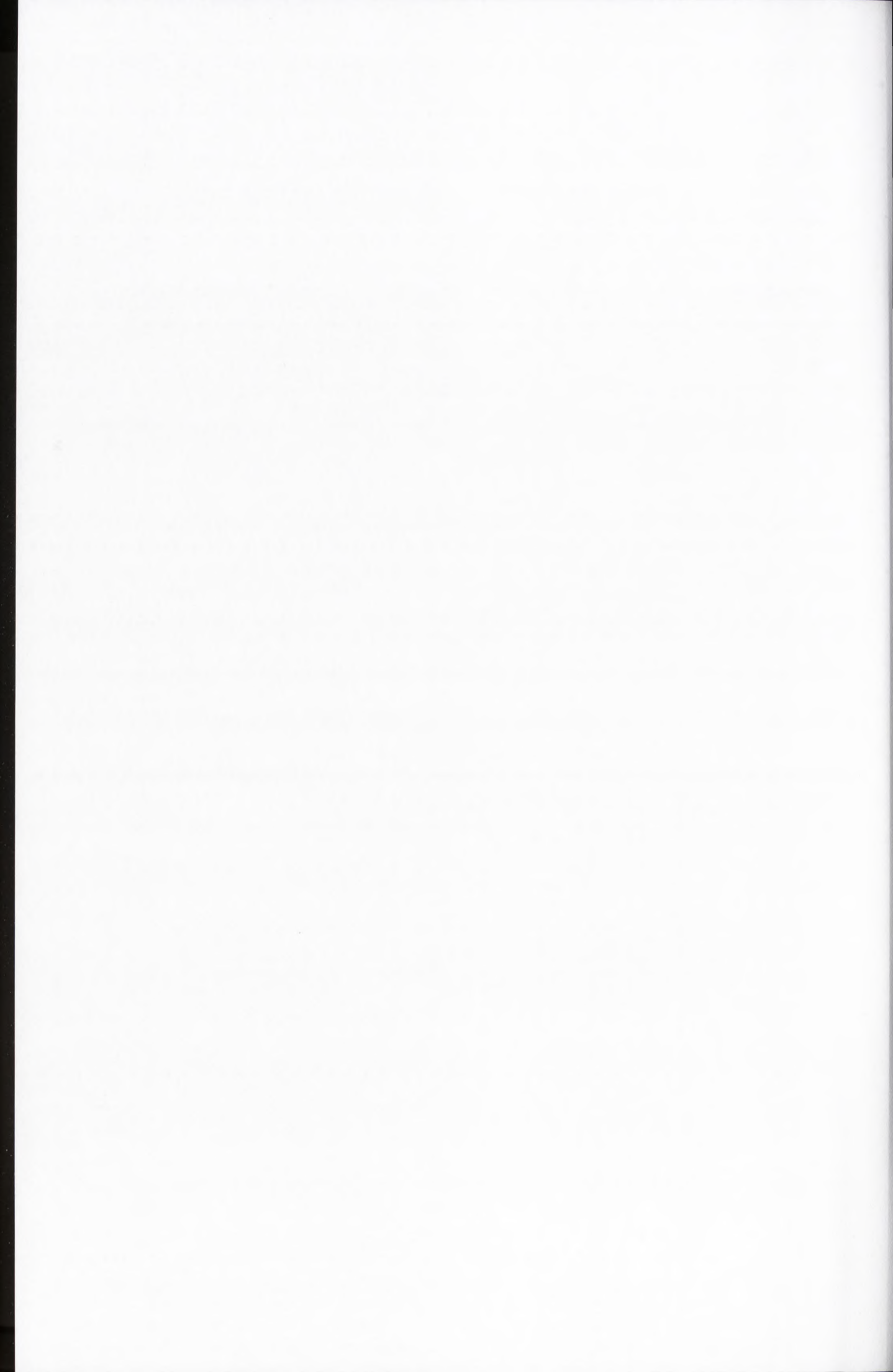
antykoagulacyjne. Obserwowany efekt jest zależny od stężenia wariantów TBA. Aptamery posiadające resztę adenozyiny lub cytydyny w serii UNA w pozycji 7 odznaczają się poprawionymi w stosunku do TBA zdolnościami inhibicji procesu krzepnięcia krwi. Oprócz tego wytypowano 2 inne oligonukleotydy, które również wykazywały relatywnie silne działanie antykoagulacyjne.

4. Wyniki testu amidolitycznego pozwoliły stwierdzić, że badane warianty TBA wywierają efekt antykoagulacyjny poprzez związanie się w miejscu zewnętrznym I cząsteczki trombiny.
5. Najbardziej korzystne wartości stałej dysocjacji uzyskano dla wariantów TBA zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA oraz 4-tiourydyny w serii UNA w pozycji T⁷ aptameru. Większą wartość stałej dysocjacji zaobserwowano w przypadku wariantów zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA lub 4-tiourydyny w serii UNA w pozycji T³, T⁹ i T¹² TBA. We wszystkich analizowanych przypadkach warianty zawierające w danej pozycji modyfikacje resztami s4U^U charakteryzowały się wyższymi wartościami parametru K_d w porównaniu do aptamerów posiadających w tym miejscu reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA.
6. Wprowadzenie w pozycję T⁷ TBA reszt kanonicznych nukleotydów w serii UNA lub 4-tiourydyny w serii UNA powodowało wydłużenie okresu półtrwania w osoczu krwi ludzkiej względem niemodyfikowanego aptameru. Najdłuższym okresem półtrwania odznaczały się warianty zawierające reszty C^U lub G^U w pozycji T⁷ aptameru. Wyznaczenie wartości parametru T_{1/2} aptamerów posiadających wielokrotne podstawienie resztami s4U^R w pozycjach T³, T⁷, T⁹, T¹² lub T¹³ okazało się niemożliwe ze względu na powstawanie wysoko migrujących produktów pośrednich reakcji.
7. Na podstawie analizy wyników testu aktywności metabolicznej komórek *HeLa* można stwierdzić, że warianty TBA zawierające reszty s4U^R w pozycjach T³, T⁷, T⁹, T¹² lub T¹³ aptameru odznaczają się znaczącymi właściwościami antyproliferacyjnymi.

Z punktu widzenia aktualnego stanu wiedzy nowatorski charakter niniejszego projektu stanowi określenie właściwości termodynamicznych, strukturalnych oraz biologicznych całkowicie nowych pochodnych TBA. Próba dokładnego poznania wpływu nowych, modyfikowanych reszt nukleotydowych na właściwości



termodynamiczne, strukturalne i biologiczne TBA umożliwiła sformułowanie pewnych założeń teoretycznych użytecznych w przyszłości przy projektowaniu nowych związków odznaczających się większą skutecznością działania antykoagulacyjnego i antyproliferacyjnego, co może stanowić olbrzymi wkład w poprawienie efektywności metod terapeutycznych. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na poznanie termodynamicznych oraz strukturalnych konsekwencji wprowadzenia całkowicie nowych modyfikacji typu UNA do G-kwadrupeksów oraz biologicznej charakterystyki nowych pochodnych TBA.



VII. MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1 Odczynniki

akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, kwas borowy, mocznik, octan sodu, oranż G, PBS 10x stężony, tri(hydroksymetylo)aminometan (Tris) – **BioShop[®]**

amoniak (30%), izopropanol – **CHEMPUR**

substrat S-2238[™] – **CHROMOGENIX**

chlorek potasu, chlorek sodu, sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na₂EDTA) – **Fluka**

bydłęca surowica płodowa (FBS), pożywka hodowlana RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej – **Gibco[®]**

dimetyloformamid, etanol, metanol, n-butanol, kwas solny – **POCh S. A.**

błękit bromofenolowy, bromek 3-(4,5-dimetylotriazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu, cyjanol ksylenowy, diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄), fluorowoderek trietyloamonowy (TEA·3HF), formamid, kakodylan sodu, ludzka surowica krwi, medium hodowlane RPMI 1640, nadsiarcezan amonu (APS), N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), roztwór antybiotyków 100x stężony (Antibiotic Antymycotic Solution), roztwór witamin 100x stężony (MEM Vitamin Solution), Tween 20, wodorofosforan sodu (Na₂HPO₄), wodorotlenek sodu (NaOH) – **Sigma-Aldrich[®]**

glikogen – **Thermo Fisher Scientific Inc.**

1.2 Gotowe zestawy do badań

Zestaw Dia-TT – **DIAGON[®]**

Biotin CAPture KIT – **GE Healthcare Life Science**

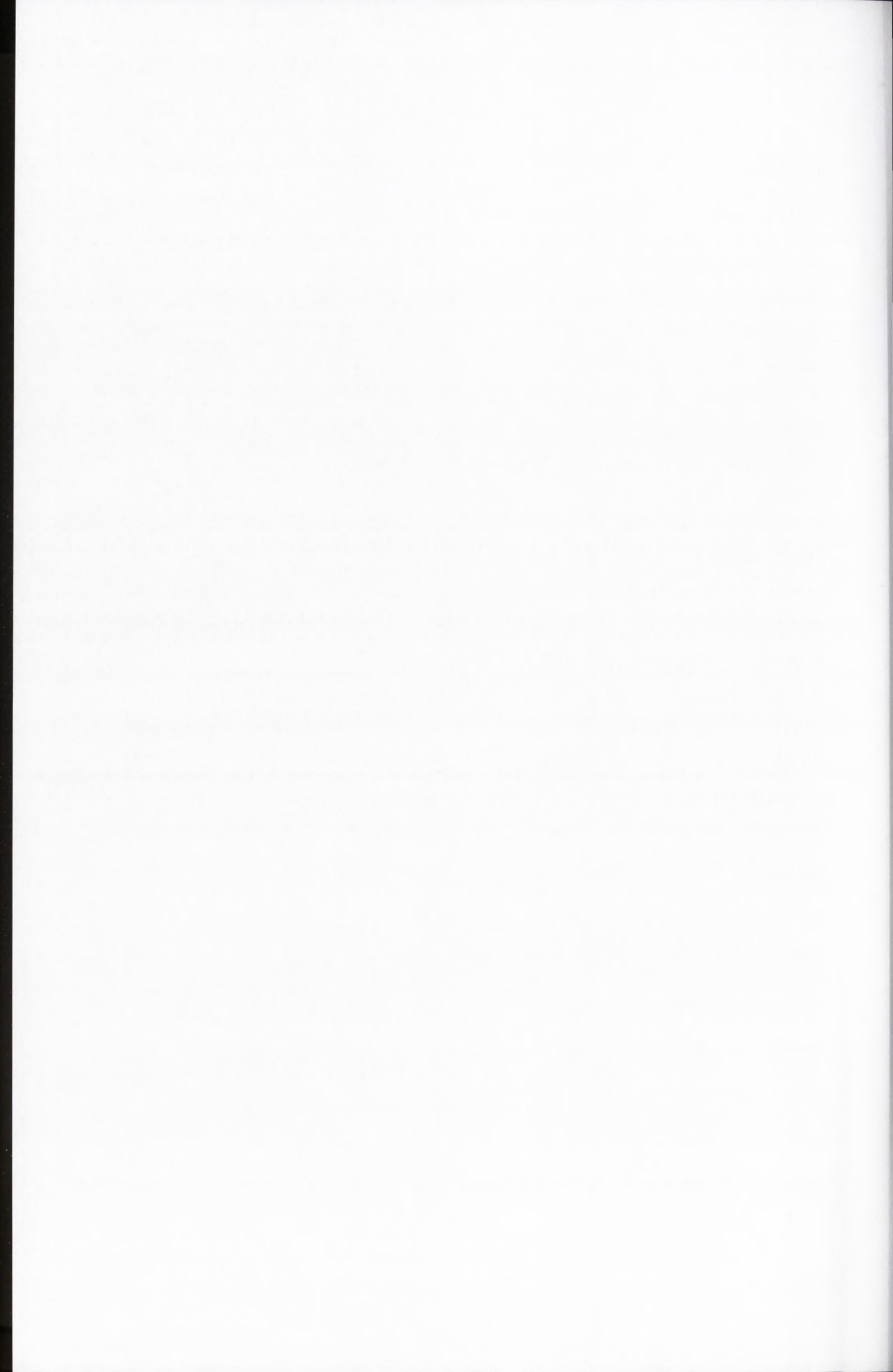
1.3 Izotopy promieniotwórcze

[γ -³²P] ATP 6000 Ci/mmol – **Hertman Analytic**

1.4 Enzymy

kinaza polinukleotydowa T4 – **EURx[®]**

trombina – **Haematologic Technologies, Inc.**



1.5 Linia komórkowa

linia komórkowa raka szyjki macicy (*HeLa*) – Sigma-Aldrich®

1.6 Oligonukleotydy

Tabela 9. Sekwencje oligonukleotydów.

Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5' - 3')	Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5' - 3')
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG	G ¹ , G ¹⁰	iG^U GTTGGTGT iG^U GTTGG
T ³	GG A^U TGGTGTGGTTGG	G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG^R GTTGGT iG^R T iG^R GTTGG
T ³	GG C^U TGGTGTGGTTGG	G ¹ , G ⁸ , G ¹⁰	iG^U GTTGGT iG^U T iG^U GTTGG
T ³	GG G^U TGGTGTGGTTGG	G ¹	iG^R GTTGGTGTGGTTGG
T ⁴	GGT A^U GGTGTGGTTGG	G ¹	iG^U GTTGGTGTGGTTGG
T ⁴	GGT C^U GGTGTGGTTGG	G ¹ , T ³	iG^RGs4U^R TGGTGTGGTTGG
T ⁴	GGT G^U GGTGTGGTTGG*	G ¹ , T ³	iG^UGs4U^U TGGTGTGGTTGG
T ⁷	GGTTGG A^U GTGGTTGG	G ¹ , T ⁷	iG^R GTTGGs 4U^R GTGGTTGG
T ⁷	GGTTGG C^U GTGGTTGG	G ¹ , T ⁷	iG^U GTTGGs 4U^U GTGGTTGG
T ⁷	GGTTGG G^U GTGGTTGG	G ¹ , T ⁹	iG^R GTTGGTGs 4U^R GGTTGG
T ⁸	GGTTGGT A^U TGGTTGG	G ¹ , T ⁹	iG^U GTTGGTGs 4U^U GGTTGG
T ⁸	GGTTGGT C^U TGGTTGG	G ¹ , T ¹²	iG^R GTTGGTGTGGs 4U^R TGG
T ⁸	GGTTGGT U^U TGGTTGG	G ¹ , T ¹²	iG^U GTTGGTGTGGs 4U^U TGG
T ⁹	GGTTGGT A^U GGTTGG	G ¹ , T ¹³	iG^R GTTGGTGTGGT 4U^R GG
T ⁹	GGTTGGT C^U GGTTGG	G ¹ , T ¹³	iG^U GTTGGTGTGGT 4U^U GG
T ⁹	GGTTGGT G^U GGTTGG	G ⁸	GGTTGGT iG^R TGGTTGG
T ¹²	GGTTGGTGTGG A^U TGG	G ⁸	GGTTGGT iG^U TGGTTGG
T ¹²	GGTTGGTGTGG C^U TGG	T ³ , G ⁸	GGs 4U^R TGGT iG^R TGGTTGG
T ¹²	GGTTGGTGTGG G^U TGG	T ³ , G ⁸	GGs 4U^U TGGT iG^U TGGTTGG
T ¹³	GGTTGGTGTGGT A^U GG	T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs 4U^R iG^R TGGTTGG
T ¹³	GGTTGGTGTGGT C^U GG	T ⁷ , G ⁸	GGTTGGs 4U^U iG^U TGGTTGG
T ¹³	GGTTGGTGTGGT G^U GG	G ⁸ , T ⁹	GGTTGGT iG^Rs4U^R GGTTGG
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GG U^U TGG U^U G U^U GGT U^U GG	G ⁸ , T ⁹	GGTTGGT iG^Us4U^U GGTTGG
T ⁴	GGT G^U GGTGTGGTTGG	G ⁸ , T ¹²	GGTTGGT iG^R TGGs 4U^R TGG
T ³	GGs 4U^R TGGTGTGGTTGG	G ⁸ , T ¹²	GGTTGGT iG^U TGGs 4U^U TGG
T ³	GGs 4U^U TGGTGTGGTTGG	G ⁸ , T ¹³	GGTTGGT iG^R TGGT 4U^R GG
T ⁴	GGT s4U^U GGTGTGGTTGG	G ¹⁰	GGTTGGTGT iG^R GTTGG
T ⁷	GGTTGGs 4U^R GTGGTTGG	G ¹⁰	GGTTGGTGT iG^U GTTGG
T ⁷	GGTTGGs 4U^U GTGGTTGG	T ³ , G ¹⁰	GGs 4U^R TGGTGT iG^R GTTGG
T ⁸	GGTTGGT s4U^R TGGTTGG	T ³ , G ¹⁰	GGs 4U^U TGGTGT iG^U GTTGG
T ⁸	GGTTGGT s4U^U TGGTTGG	T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs 4U^R RGT iG^R GTTGG

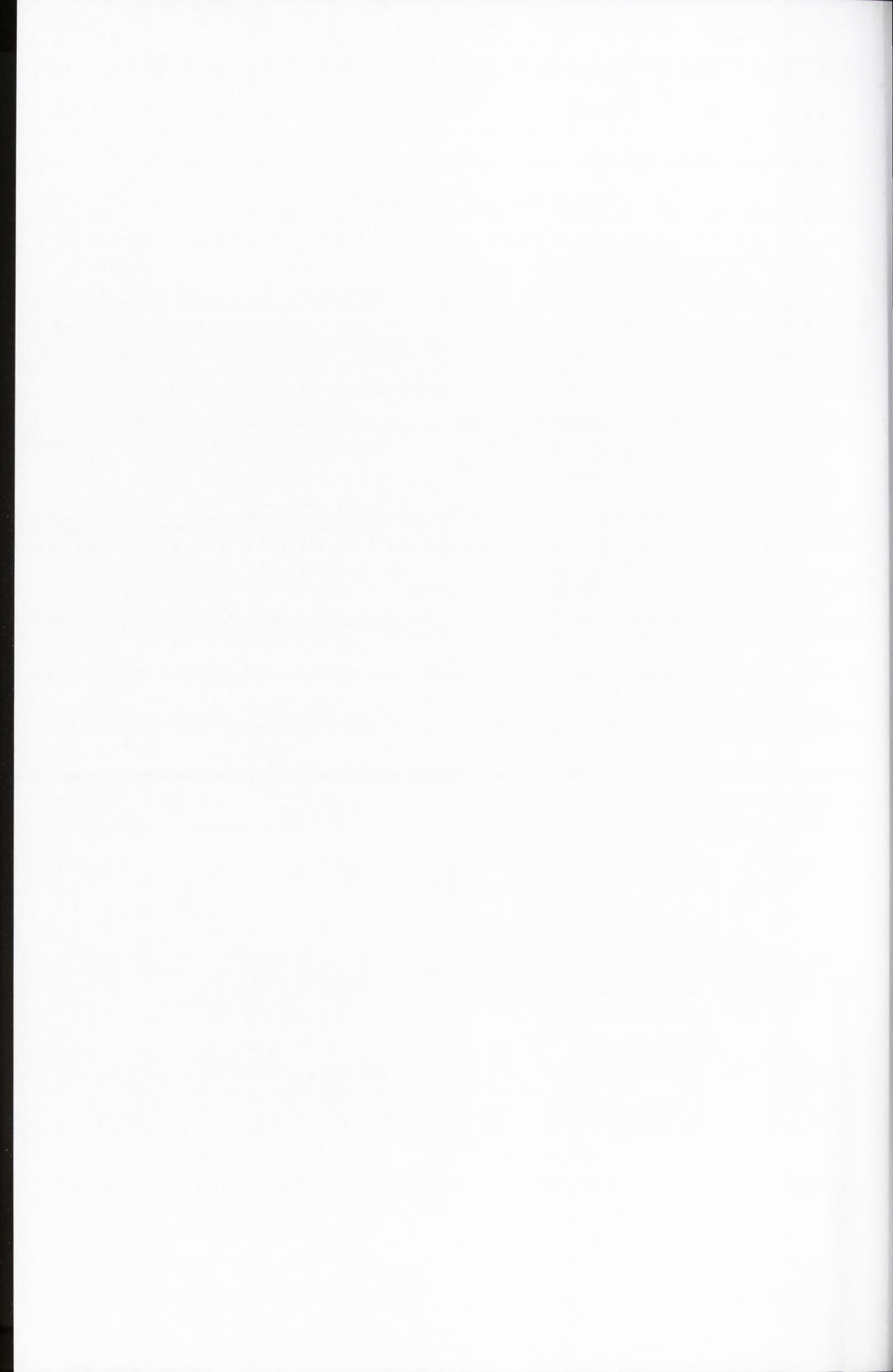


Tabela 9 (cd.). Sekwencje oligonukleotydów.

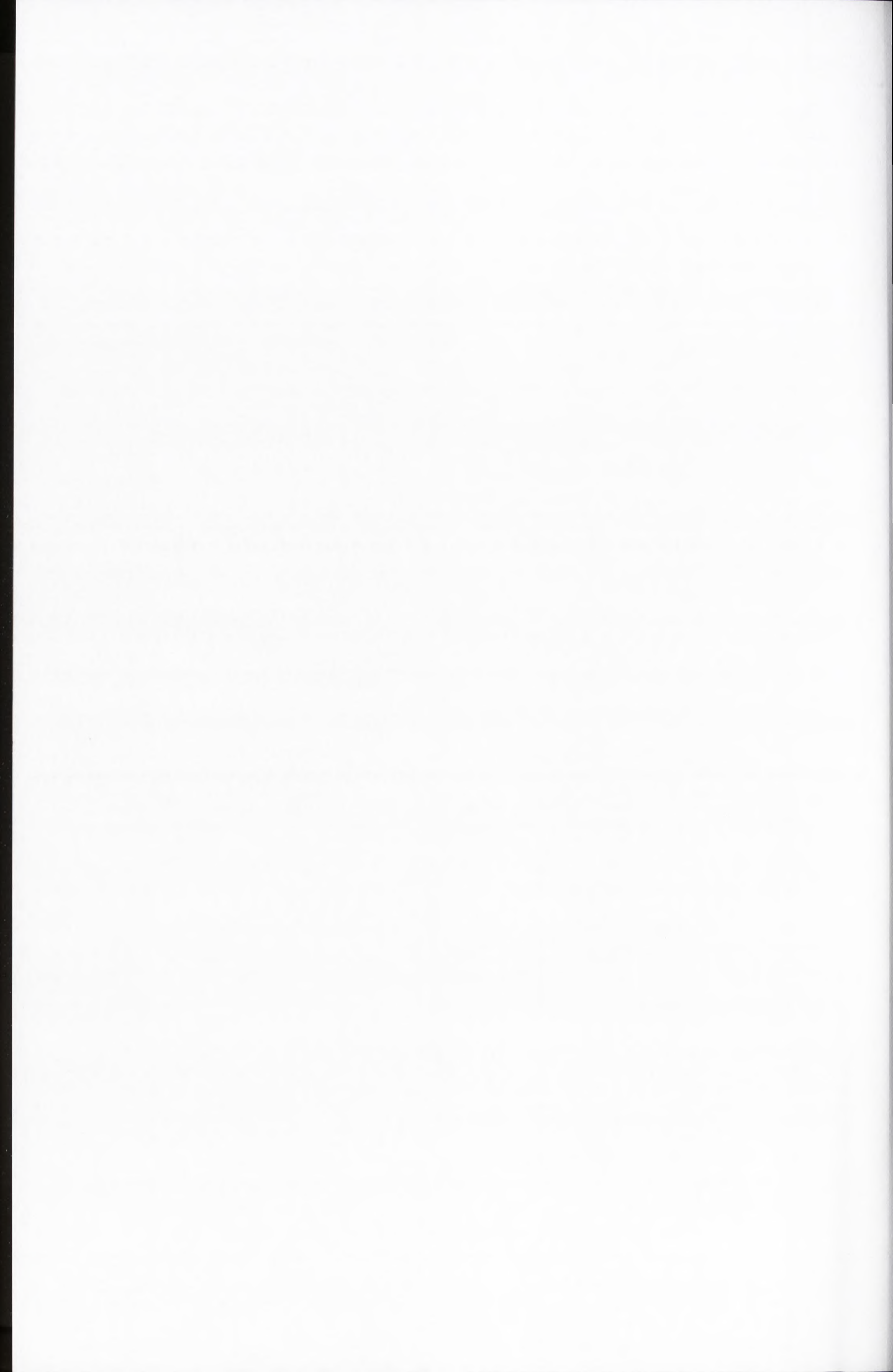
Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5' - 3')	Miejsce modyfikacji	Sekwencja (5' - 3')
T ⁹	GGTTGGTGs4U ^R GGTTGG	T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^U GtiG ^U GTTGG
T ⁹	GGTTGGTGs4U ^U GGTTGG	T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGs4U ^R iG ^R GTTGG
T ¹²	GGTTGGTGTGGs4U ^R TGG	T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGs4U ^U iG ^U GTTGG
T ¹²	GGTTGGTGTGGs4U ^U TGG	G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGTGTiG ^R Gs4U ^R TGG
T ¹³	GGTTGGTGTGGTs4U ^R RGG	G ¹⁰ , T ¹²	GGTTGGTGTiG ^U Gs4U ^U TGG
T ¹³	GGTTGGTGTGGTs4U ^U GG	G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTGTiG ^R Gts4U ^R RGG
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGs4U ^R TGG	G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTiGTiG ^U Gts4U ^U GG
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹²	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGs4U ^U TGG	G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^R Gs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R RGG
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R GGTs4U ^R RGG	G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG
T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG	T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R iG ^R s4U ^R GGTs4U ^R RGG
G ¹	iG ^R GTTGGTGTGGTTGG	T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U GGTs4U ^U GG
G ¹	iG ^U GTTGGTGTGGTTGG	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^R TGGs4U ^R Gs4U ^R iG ^R Gts4U ^R RGG
G ⁸	GGTTGGTiG ^R TGGTTGG	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U iG ^U Gts4U ^U GG
G ⁸	GGTTGGTiG ^U TGGTTGG	G ¹ , T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	iG ^R Gs4U ^R TGGs4U ^R iG ^R s4U ^R iG ^R Gts4U ^R RGG
G ¹⁰	GGTTGGTGTiG ^R GTTGG	G ¹ , T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U iG ^U Gts4U ^U GG
G ¹⁰	GGTTGGTGTiG ^U GTTGG	T ⁷ , G ¹⁰	GGTTGGs4U ^U GtiG ^U GTTGG
G ¹ , G ⁸	iG ^R GTTGGTiG ^R TGGTTGG	T ⁹ , G ¹⁰	GGTTGGTGs4U ^U iG ^U GTTGG
G ¹ , G ⁸	iG ^U GTTGGTiG ^U TGGTTGG	G ¹⁰ , T ¹³	GGTTGGTiGTiG ^U Gts4U ^U GG
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGTiG ^R TiG ^R GTTGG	G ¹ , T ³ , T ⁷ , T ⁹ , T ¹³	iG ^U Gs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U GGTs4U ^U GG
G ⁸ , G ¹⁰	GGTTGGTiG ^U TiG ^U GTTGG	T ³ , T ⁷ , G ⁸ , T ⁹ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U iG ^U s4U ^U GGTs4U ^U GG
G ¹ , G ¹⁰	iG ^R GTTGGTGTiG ^R GTTGG	T ³ , T ⁷ , T ⁹ , G ¹⁰ , T ¹³	GGs4U ^U TGGs4U ^U Gs4U ^U iG ^U Gts4U ^U GG

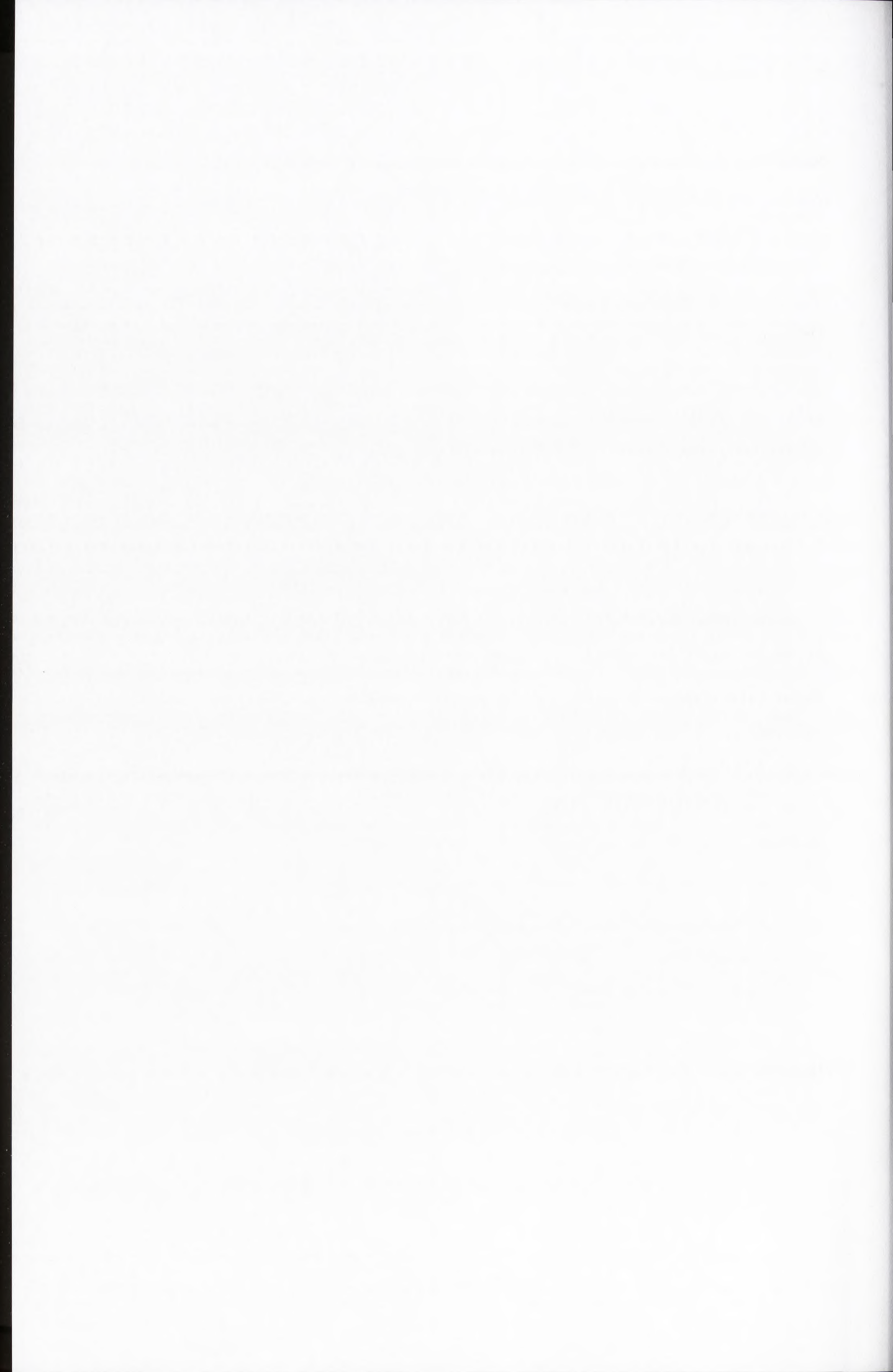
1.7 Akcesoria dodatkowe

Ilustra NAP-25 columns – **GE Healthcare Life Sciences**

naczynia hodowlane oraz sterylne końcówki do automatycznych pipet stosowane do hodowli komórkowej – **NEST SCIENTIFIC**

Sensor Chip SA – **GE Healthcare Life Sciences**





Bufor do testu amidolitycznego

0.1 M Tris; pH 8.2
150 NaCl
5 mM KCl
0.1% BSA

Bufor do pomiaru stałej dysocjacji aptamer – trombina

138 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1.76 mM KH₂PO₄
0.05% Tween-20

Bufor do fałdowania aptamerów w badaniach na liniach komórkowych

100 mM KCl
1x PBS

10x MTT

0.1% w/v MTT

1.9 Pożywki do badań na liniach komórkowych**Pożywka hodowlana *HeLa* I**

medium hodowlane RPMI 1640
10% FBS
1x roztwór witamin
1x roztwór antybiotyków

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C.

Pożywka hodowlana *HeLa* II (używana po odmrażaniu komórek *HeLa*)

medium hodowlane RPMI 1640
30% FBS
1x roztwór witamin
1x roztwór antybiotyków

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C.



Pożywka hodowlana *HeLa* III (bez dodatku antybiotyków, stosowana do testu antyproliferacyjnego)

medium hodowlane RPMI 1640

10% FBS

1x roztwór witamin

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C.

Pożywka hodowlana *HeLa* IV (stosowana do testu antyproliferacyjnego)

medium hodowlane RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej

1x roztwór MTT

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C.

1.10 Aparatura

automatyczny licznik komórek Automated Cell Counter TC20 Biorad

blok grzejny iso-block™ Benchmark

cieplarka Memmert

koagulometr K-3002 Optic

komputerowy skaner materiałów znakowanych radioizotopowo FLA-5100 FujiFilm

licznik scyntylacyjny płytkowy MicroBeta²™ 2450 Microplate Counter Perkin Elmer

próżniowy koncentrator stołowy CentriVap Labconco

spektrofotometr Biacore™ X100 GE Healthcare Life Science

spektrofotometr UV-VIS Beckman DU-640 z termoprogramatorem

spektrofotometr UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem

spektrofotometr UV-VIS JASCO 815

spektrometr masowy MALDI-TOF Bruker Autoflex

spektrofotometr xMark™ Biorad

syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation

termowyrząsarka Comfort Eppendorf

wirówka MiniSpin® Eppendorf

wirówka 5430R Eppendorf

zasilacz EV233 Consort

1.11 Programy

Biacore X100 Evaluation Software

MeltWin 3.5



Mutli Gauge V3.0

OriginPro 8

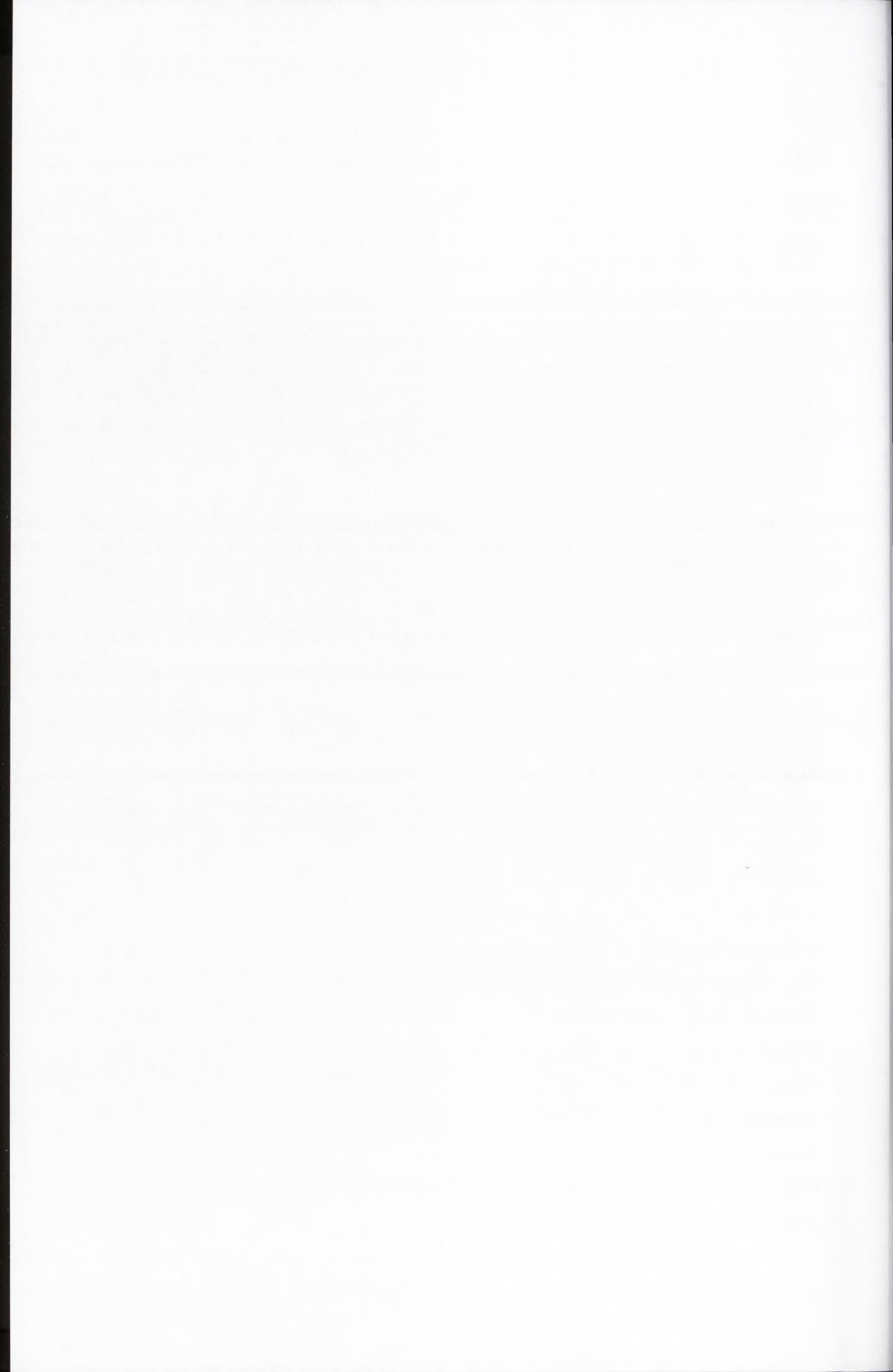
2. Metody

2.1 Synteza chemiczna oligonukleotydów

Syntezę oligonukleotydów wykonano metodą amidofosforynową na podłożu stałym przy użyciu syntetyzera BioAutomation Corporation MerMade 12. Do syntezy wykorzystano handlowo dostępne amidofosforyny DNA, UNA, 4-tiourydynę i izoguanozynę w serii RNA oraz biotyę (ChemGenes). Amidofosforyny 4-tiourydyna oraz izoguanozyna w serii UNA zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Kwasów Nukleinowych, IChB PAN.

2.2 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty kanonicznych nukleotydów w serii UNA oraz reszty izoguanozyny w serii UNA

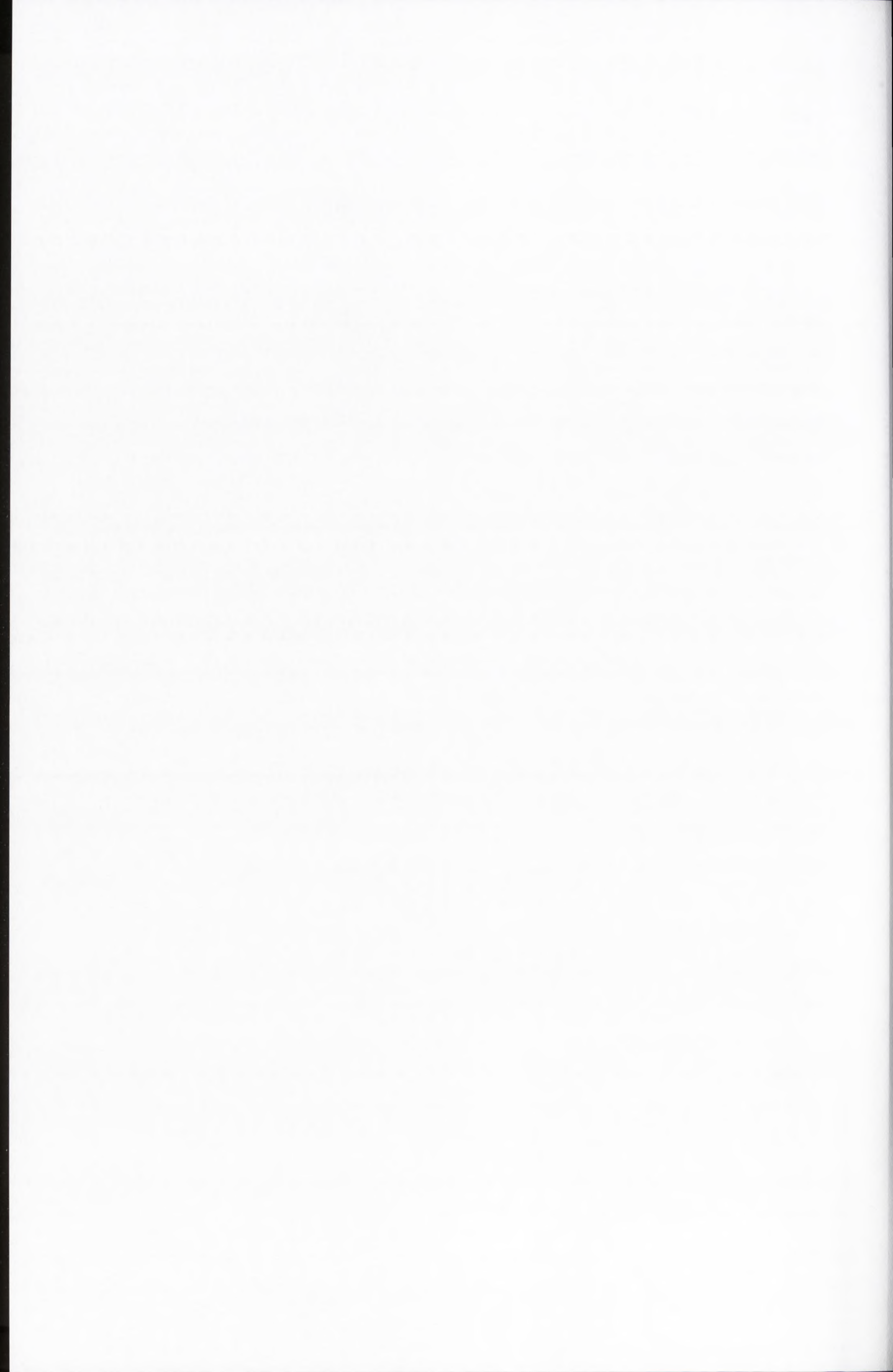
Do podłoża zawierającego związane oligonukleotydy dodano 1.5 ml 30% amoniaku, następnie przeprowadzono 16 godziną inkubację w temperaturze 55°C. Po tym czasie próbki schłodzono w temperaturze -20°C. Supernatant przeniesiono do oddzielnej probówki, a pozostałe podłoże dwukrotnie przemyto 0.5 ml wody. Frakcję zawierającą amoniak połączono z wodą i odparowano do sucha. Osad rozpuszczono w 0.4 ml wody, dodano 0.2 ml 8 M mocznika z barwnikiem orange G. Mieszaninę inkubowano 6 minut w temperaturze 95°C, a następnie schłodzono 1 minutę na lodzie. W celu zebrania mieszaniny ze ścianek probówki, próbki wirowano 15 sekund przy 13 400 rpm. Całość oczyszczono metodą rozdzielania elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Pozycję oczyszczanych kwasów nukleinowych w żelu określono przy użyciu światła UV o długości fali 260 nm. Prążki reprezentujące pożądaną długości kwasy nukleinowe wycięto. Oligonukleotydy wymyto z żelu 0.3 M octanem sodu wytrząsając przez 4 godziny przy 750 rpm w temperaturze 4°C (czynność powtórzono 3-krotnie). Supernatant zebrano i strącono 2.5 objętościami 100% etanolu w temperaturze -20°C przez noc. Mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i odsolono za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody. Masę molową oczyszczonych kwasów



nukleinowych określono za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF, natomiast ich stężenie zmierzono używając spektrofotometru Beckman DU-640.

2.3 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty izoguanozyny w serii RNA

Do podłoża zawierającego związane oligonukleotydy dodano 0.5 ml 100% etanolu oraz 1.5 ml 30% amoniaku, następnie przeprowadzono 16 godziną inkubację w temperaturze 55°C. Po tym czasie próbki schłodzono w temperaturze -20°C. Supernatant przeniesiono do oddzielnej probówki, a pozostałe podłoże dwukrotnie przemyto 0.5 ml wody. Frakcję zawierającą amoniak i etanol połączono z wodą, następnie powstałą mieszaninę odparowano do sucha. Osad rozpuszczono w 0.03 ml dimetyloformamidu (DMF) i 0.27 ml fluorowodoru trietyloamonowego (TEA·3HF), inkubowano 2 godziny w temperaturze 55°C. Następnie dodano 4 ml n-butanolu i strącano 2 godziny w temperaturze -20°C. Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i przeprowadzono odsalanie prób za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody oraz 0.2 ml 8 M mocznika z barwnikiem orange G. Mieszaninę inkubowano 6 minut w 95°C, a następnie schłodzono 1 minutę na lodzie. W celu zebrania mieszaniny ze ścianek probówki, próbki wirowano 15 sekund przy 13 400 rpm. Całość oczyszczono metodą rozdzielania elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Pozycję oczyszczanych kwasów nukleinowych w żelu określono przy użyciu światła UV o długości fali 260 nm. Prążki reprezentujące pożądaną długości kwasy nukleinowe wycięto. Oligonukleotydy wymyto z żelu 0.3 M octanem sodu wytrząsając przez 4 godziny przy 750 rpm w 4°C (czynność powtórzono 3-krotnie). Supernatant zebrano i strącono 2.5 objętościami 100% etanolu w -20°C przez noc. Mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i ponownie odsolono za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody. Masę molową oczyszczonych kwasów nukleinowych określono za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF, natomiast ich stężenie zmierzono używając spektrofotometru Beckman DU-640.

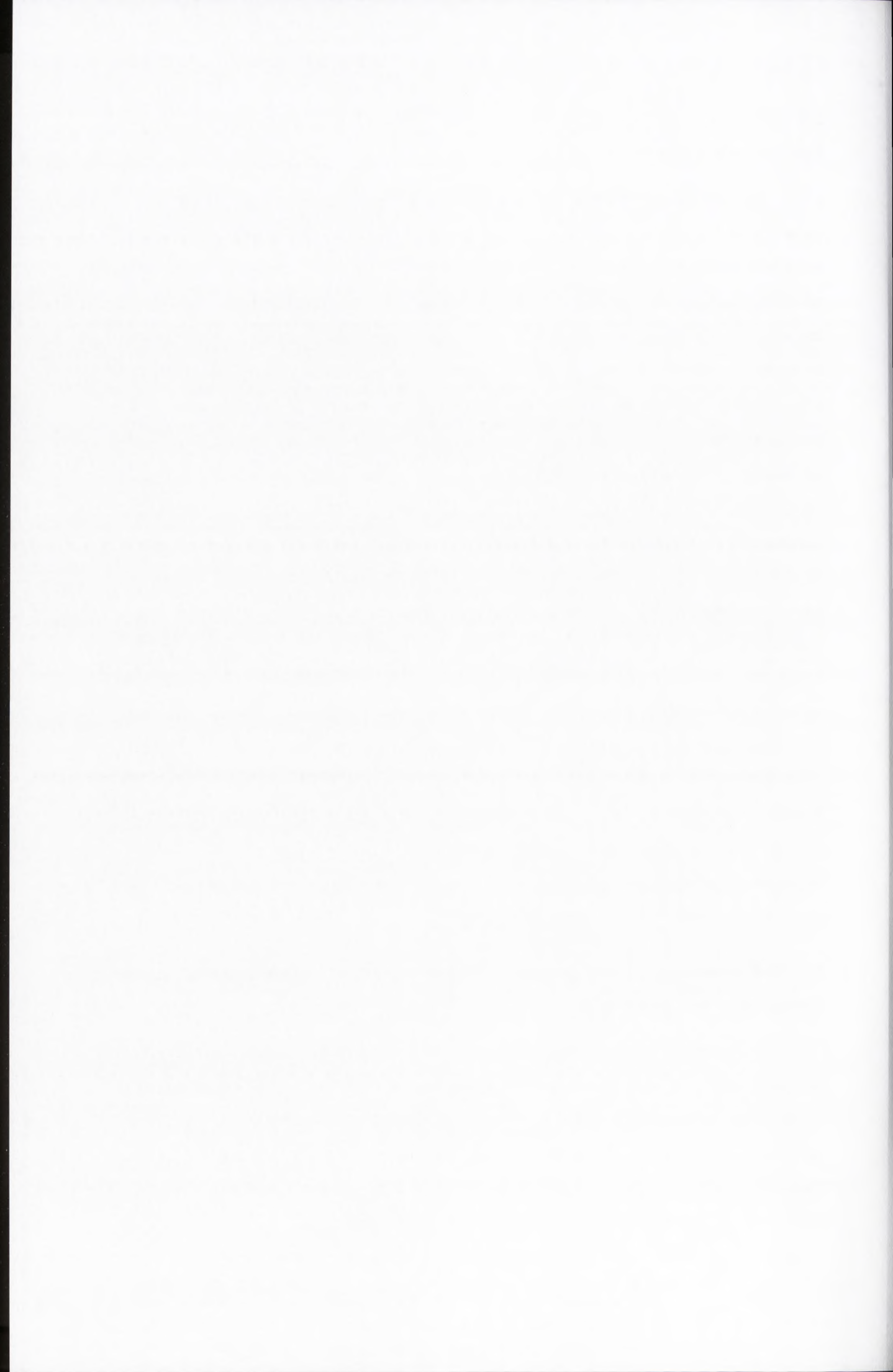


2.4 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii UNA

Do podłoża zawierającego związane oligonukleotydy dodano 1 ml 100% metanolu i 1 ml 30% amoniaku, następnie przeprowadzono 24 godziną inkubację w temperaturze pokojowej. Po tym czasie supernatant przeniesiono do oddzielnej probówki, a pozostałe podłoże dwukrotnie przemyto 0.5 ml wody. Frakcję zawierającą amoniak i metanol połączono z wodą, następnie powstałą mieszaninę odparowano do sucha. Osad rozpuszczono w 0.4 ml wody, dodano 0.2 ml 8 M mocznika z barwnikiem orange G. Mieszaninę inkubowano 6 minut w temperaturze 95°C, a następnie schłodzono 1 minutę na lodzie. W celu zebrania mieszaniny ze ścianek probówki, próbki wirowano 15 sekund przy 13 400 rpm. Całość oczyszczono metodą rozdzielu elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Pozycję oczyszczanych kwasów nukleinowych w żelu określono przy użyciu światła UV o długości fali 260 nm. Prążki reprezentujące pożądanej długości kwasy nukleinowe wycięto. Oligonukleotydy wymyto z żelu 0.3 M octanem sodu wytrząsając przez 4 godziny przy 750 rpm w temperaturze 4°C (czynność powtórzono 3-krtonie). Supernatant zebrano i strącono 2.5 objętościami 100% etanolu w temperaturze -20°C przez noc. Mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i odsolono za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody. Masę molową oczyszczonych kwasów nukleinowych określono za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF, natomiast ich stężenie zmierzono używając spektrofotometru Beckman DU-640.

2.5 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów zawierających reszty 4-tiourydyny w serii RNA

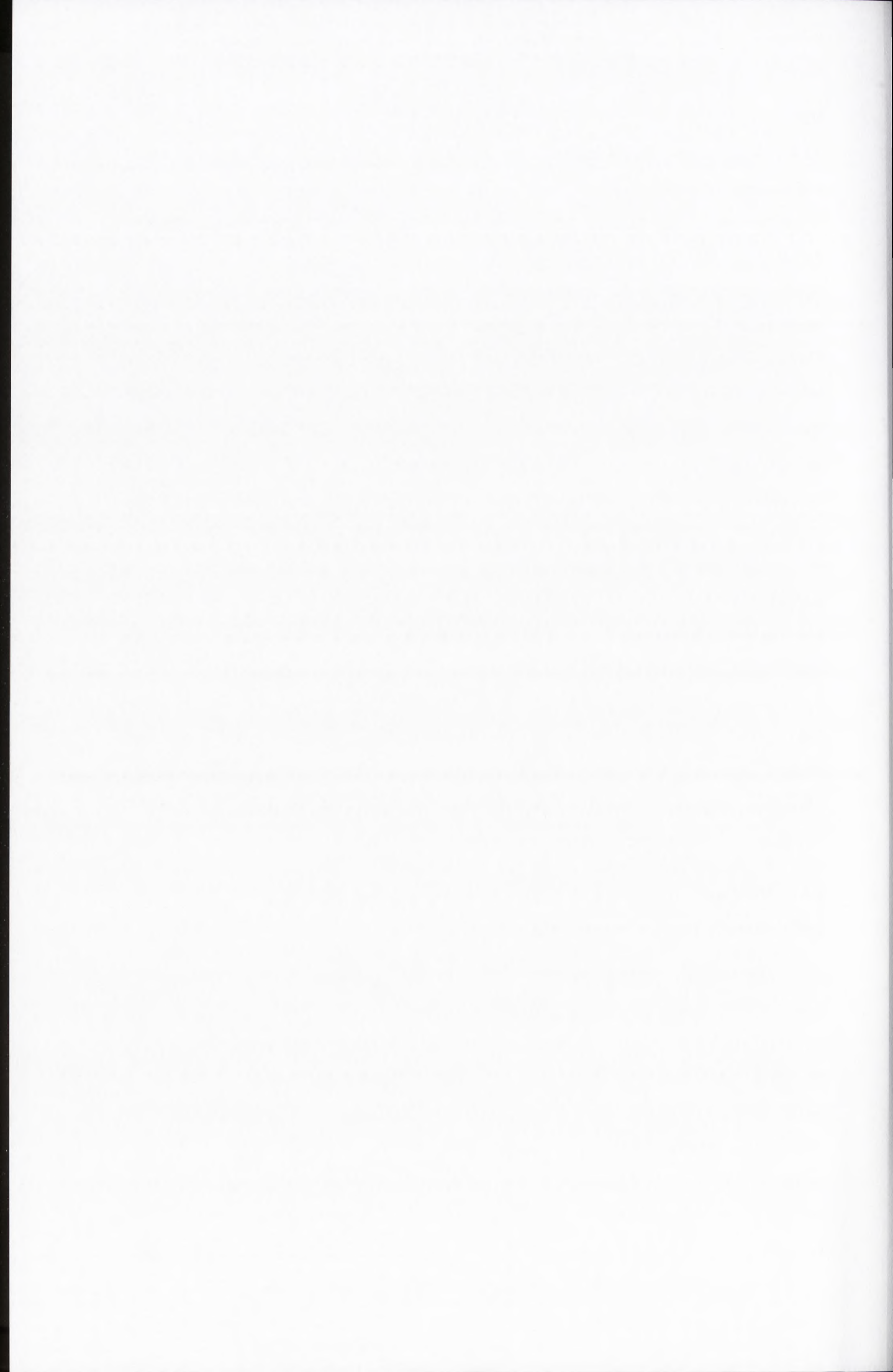
Do podłoża zawierającego związane oligonukleotydy dodano 1 ml 100% metanolu oraz 1 ml 30% amoniaku, następnie przeprowadzono 24 godziną inkubację w temperaturze pokojowej. Po tym czasie supernatant przeniesiono do oddzielnej probówki, a pozostałe podłoże dwukrotnie przemyto 0.5 ml wody. Frakcję zawierającą amoniak i metanol połączono z wodą, następnie powstałą mieszaninę odparowano do sucha. Osad rozpuszczono w 0.03 ml dimetyloformamidu (DMF) i 0.27 ml



fluorowodoru trietyloamonowego (TEA·3HF), inkubowano 2 godziny w temperaturze 55°C. Następnie dodano 4 ml n-butanolu i strącano 2 godziny w temperaturze -20°C. Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i przeprowadzono odsalanie prób za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody oraz 0.2 ml 8 M mocznika z barwnikiem orange G. Mieszaninę inkubowano 6 minut w temperaturze 95°C, a następnie schłodzono 1 minutę na lodzie. W celu zebrania mieszaniny ze ścianek próbki, próbki wirowano 15 sekund przy 13 400 rpm. Całość oczyszczono metodą rozdzału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Pozycję oczyszczanych kwasów nukleinowych w żelu określono przy użyciu światła UV o długości fali 260 nm. Prążki reprezentujące pożądaną długości kwasy nukleinowe wycięto. Oligonukleotydy wymyto z żelu 0.3 M octanem sodu wytrząsając przez 4 godziny przy 750 rpm w temperaturze 4°C (czynność powtórzono 3-krtonie). Supernatant zebrano i strącono 2.5 objętościami 100% etanolu w -20°C przez noc. Mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C. Osad wysuszono do sucha, rozpuszczono w 0.5 ml wody i ponownie odsolono za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Frakcje zawierające oligonukleotydy odparowano do sucha, a następnie dodano do nich 0.4 ml wody. Masę molową oczyszczonych kwasów nukleinowych określono za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF, natomiast ich stężenie zmierzono używając spektrofotometru Beckman DU-640.

2.6 Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Do oczyszczenia oligonukleotydów syntetyzowanych chemicznie wykorzystano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Stosowano żel poliakrylamidowy o grubości 1mm i usieciowieniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu) z 8 M mocznikiem. Żel wylewano pomiędzy szklane płyty o rozmiarze 42 x 33 cm oraz 39.5 x 33 cm. Jako bufor elektroforetyczny zastosowano 1x TBE. Elektroforezę prowadzono przy mocy 40-55 W. Każdy rozdział elektroforetyczny poprzedzono 15-30 minutową preelektroforezą. Próbki przed nałożeniem na żel rozcieńczano w stosunku 1:2 v/v buforem obciążającym i inkubowano 6 minut w temperaturze 95°C, a następnie chłodzono 1 minutę na lodzie.



2.7 Pomiar trwałości termodynamicznej badanych oligonukleotydów z zastosowaniem metody topnienia UV

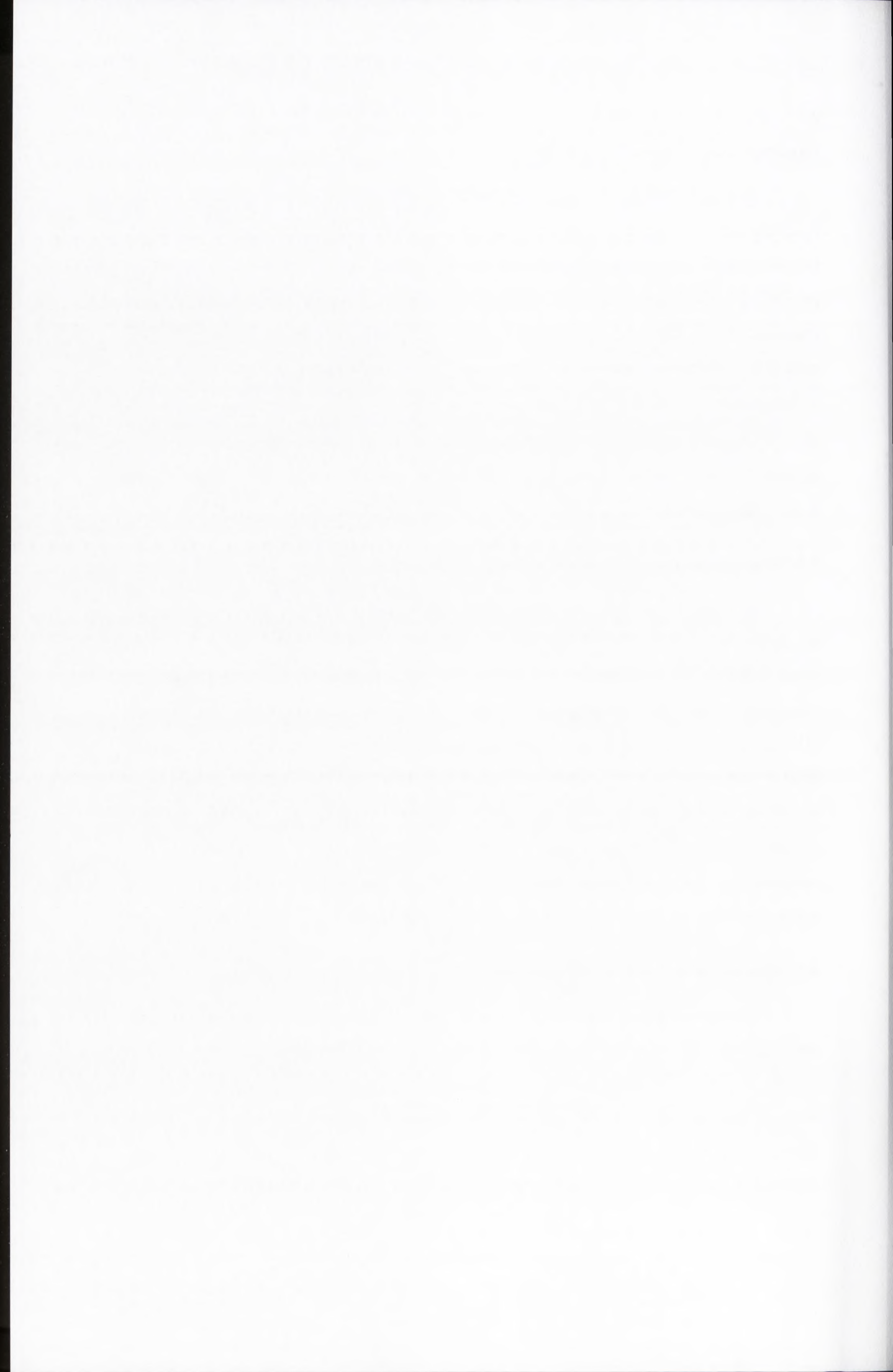
Badania trwałości termodynamicznej oligonukleotydów przeprowadzono z zastosowaniem spektrofotometru UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem. Dla każdego oligomeru wykonano pomiar w 9 różnych stężeniach, w zakresie od 10^{-4} do 10^{-6} M. Odpowiednie ilości oligonukleotydu odparowano do sucha, następnie rozpuszczono w buforze do topnień. Próbkę podgrzewano przez 5 minut w 95°C , następnie stopniowo chłodzono przez noc do temperatury pokojowej. Pomiar wykonywano w świetle UV przy długości fali 295 nm w zakresie temperatury od 90°C do 4°C z szybkością zmiany temperatury równą $0.2^{\circ}\text{C}/\text{minutę}$. Wartość absorbancji próbek była sczytywana co 0.5 minuty. Uzyskane wyniki poddawano dalszej analizie w programie MeltWin 3.5.

2.8 Wykonanie różnicowych widm temperaturowych

Pomiary widm TDS badanych wariantów TBA były wykonywane w buforze do topnień w stężeniu 10^{-7} M. Próbkę oligonukleotydu przed pomiarami podgrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C , po czym stopniowo schłodzono do temperatury pokojowej przez noc. Eksperymenty prowadzono z zastosowaniem spektrofotometru UV/VIS JASCO V-650 w temperaturze 4°C oraz 90°C w zakresie 220-335 nm przy drodze optycznej 0.5 cm, szybkości pomiaru 1000 nm/min i interwale 1 pt/min. Uzyskane wyniki poddawano dalszej analizie w programie OriginPro 8. Dane eksperymentalne otrzymane dla danego oligonukleotydu w temperaturze 90°C odejmowano od wyników uzyskanych dla pomiarów w temperaturze 4°C , normalizowano względem najwyższej wartości absorbancji i rysowano wykres.

2.9 Wykonanie widm dichroizmu kołowego

Pomiary widm CD badanych wariantów TBA prowadzono z zastosowaniem spektrofotometru JASCO 815. Eksperymenty były wykonywane w temperaturze 37°C w zakresie 205-320 nm przy drodze optycznej 0.5 cm oraz szybkości pomiaru 100 nm/min. Przygotowano 3 μM roztwory oligonukleotydów w 1 ml buforu do topnień. Następnie próbki podgrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C , po czym stopniowo schłodzono do temperatury pokojowej przez noc. Wyniki trzech pomiarów widm CD



dla każdego oligonukleotydu zostały uśrednione i poddane dalszej analizie w programie OriginPro 8.

2.10 Pomiar właściwości antykoagulacyjnych badanych oligonukleotydów

Badania właściwości antykoagulacyjnych oligonukleotydów przeprowadzono z zastosowaniem koagulometru K-3002 Optic oraz komercyjnego kitu Dia-TT (DIAGON[®]). Przygotowano 0.33 μM roztwory oligonukleotydów w 100 μl odczynnika Dia-TT. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C, następnie umieszczono w komorze pomiarowej aparatu i dodano 100 μl ubogopłytkowego osocza krwi (końcowe stężenie oligonukleotydu 0.165 μM), co było równoznaczne z rozpoczęciem pomiaru.

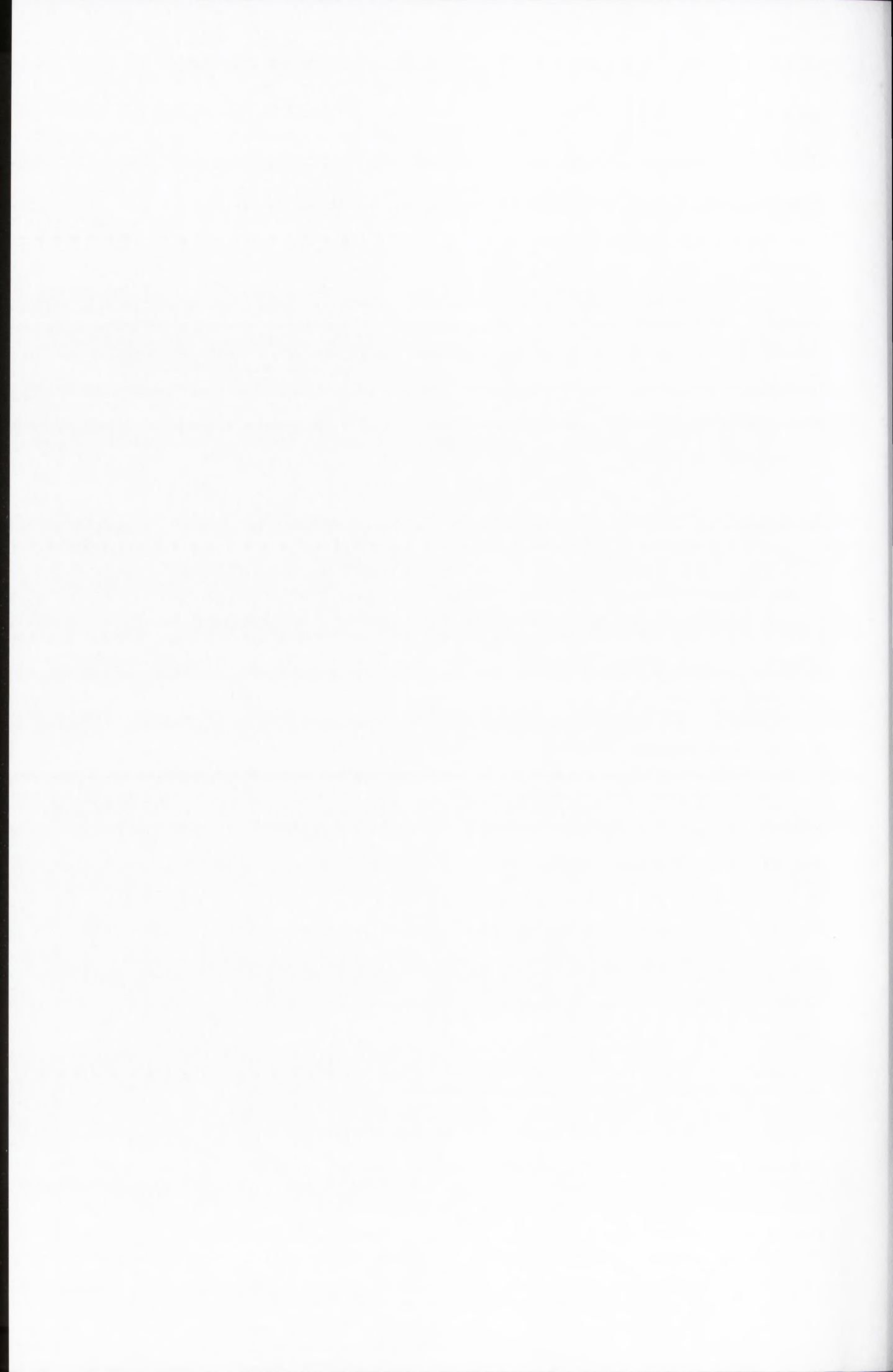
Ponadto, dla wariantów TBA odznaczających się najlepszymi właściwościami antykoagulacyjnymi wykonano pomiary w 7 różnych stężeniach: 0.0825, 0.165, 0.330, 0.495, 0.660, 0.825 oraz 1 μM . Przygotowano roztwory oligonukleotydów o odpowiednich stężeniach w 100 μl odczynnika Dia-TT. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C, następnie umieszczono w komorze pomiarowej aparatu i dodano 100 μl ubogopłytkowego osocza krwi, co było równoznaczne z rozpoczęciem pomiaru.

2.11 Test amidolityczny

Używając testu amidolitycznego określono zdolność hydrolizy chromogennego substratu S-2238[™] (CHROMOGENIX) przez trombinę w obecności wybranych aptmerów TBA. W tym celu przygotowano 148.5 μl 1 μM roztworów aptamerów TBA w buforze do testu amidolitycznego z dodatkiem trombiny o stężeniu końcowym 0.4 U/ml. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Następnie dodano 50 μl 2 mM substratu S-2238[™]. Ilość powstałego produktu zmierzono za pomocą spektrofotometru xMark[™]. Dalszą analizę wyników wykonano z zastosowaniem pakietu Microsoft Office 2013.

2.12 Pomiar stałej dysocjacji aptamer – trombina

Pomiar stałej dysocjacji aptamer – trombina wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru Biacore[™] X100 (GE Healthcare Life Science), roztworu trombiny (Haematologic Technologies, Inc.) oraz komercyjnych zestawów odczynników Biotin CAPture KIT i Sensor Chip SA firmy GE Healthcare Life Science. Przygotowano 1 μM



roztwory biotynylowanych aptmerów w buforze do pomiaru stałej dysocjacji. Próbkę inkubowano 6 minut w temperaturze 95°C, następnie stopniowo schłodzono do temperatury pokojowej przez noc. Oligonukleotydy immobilizowano na powierzchni chipu Sensor Chip SA z wykorzystaniem oddziaływania streptawidyna-biotyna. Prędkość przepływu wynosiła 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Niezwiązane oligonukleotydy odmywano z powierzchni chipu za pomocą 50 mM wodnego roztworu NaOH. Następnie na powierzchnię chipu wprowadzano seryjne rozcieńczenia trombiny w zakresie od 12.5 do 200 nM. Po każdym zakończonym cyklu reakcji układ regenerowano poprzez przemycie 50 mM wodnym roztworem NaOH. Analizę ilościową uzyskanych danych eksperymentalnych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania Biacore X100 Evaluation Software.

2.13 Znakowanie końca 5' oligonukleotydów izotopem ^{32}P

Reakcję wykonano w celu uzyskania radioizotopowo cząsteczek TBA, wykorzystywanych do pomiarów stabilności biologicznej w osoczu krwi ludzkiej. Mieszanina reakcyjna zawierała: 200 pmoli wariantu TBA, 1 μl [γ - ^{32}P] ATP o aktywności 6000 Ci/mmol, 1 μl bufor PNK T4 (EURx[®]), 1.5 μl kinazy polinukleotydowej T4 (EURx[®]) oraz wodę do 10 μl . Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C. Po tym czasie do mieszaniny dodano 10 μl 8M mocznika z barwnikiem i inkubowano przez 6 minut w temperaturze 95°C, następnie 1 minutę na lodzie. W celu zebrania mieszaniny ze ścianek probówki, próbki wirowano 15 sekund przy 13 400 rpm. Całość oczyszczono metodą rozdzielania elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Oligonukleotydy wymyło z żelu 0.3 M octanem sodu wytrząsając przez 4 godziny przy 750 rpm w temperaturze 4°C (czynność powtórzono 3-krotnie). Supernatant zebrano i strącono 2.5 objętościami 100% etanolu z dodatkiem glikogenu w temperaturze -20°C przez noc. Następnie, mieszaninę wirowano 30 minut przy 14000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, osad wysuszono i rozpuszczono w 10 μl wody. Stężenie próbki określono za pomocą licznika scyntylicyjnego MicroBeta²_{TM} 2450.

2.14 Pomiar stabilności biologicznej oligonukleotydów w osoczu krwi ludzkiej

Mieszanina reakcyjna zawierała 1×10^6 cpm 5'-znakowanego oligonukleotydu rozpuszczonego w 1x PBS z dodatkiem 100 mM KCl. Próbkę inkubowano 6 minut w 95°C, następnie stopniowo chłodzono do temperatury pokojowej przez noc.



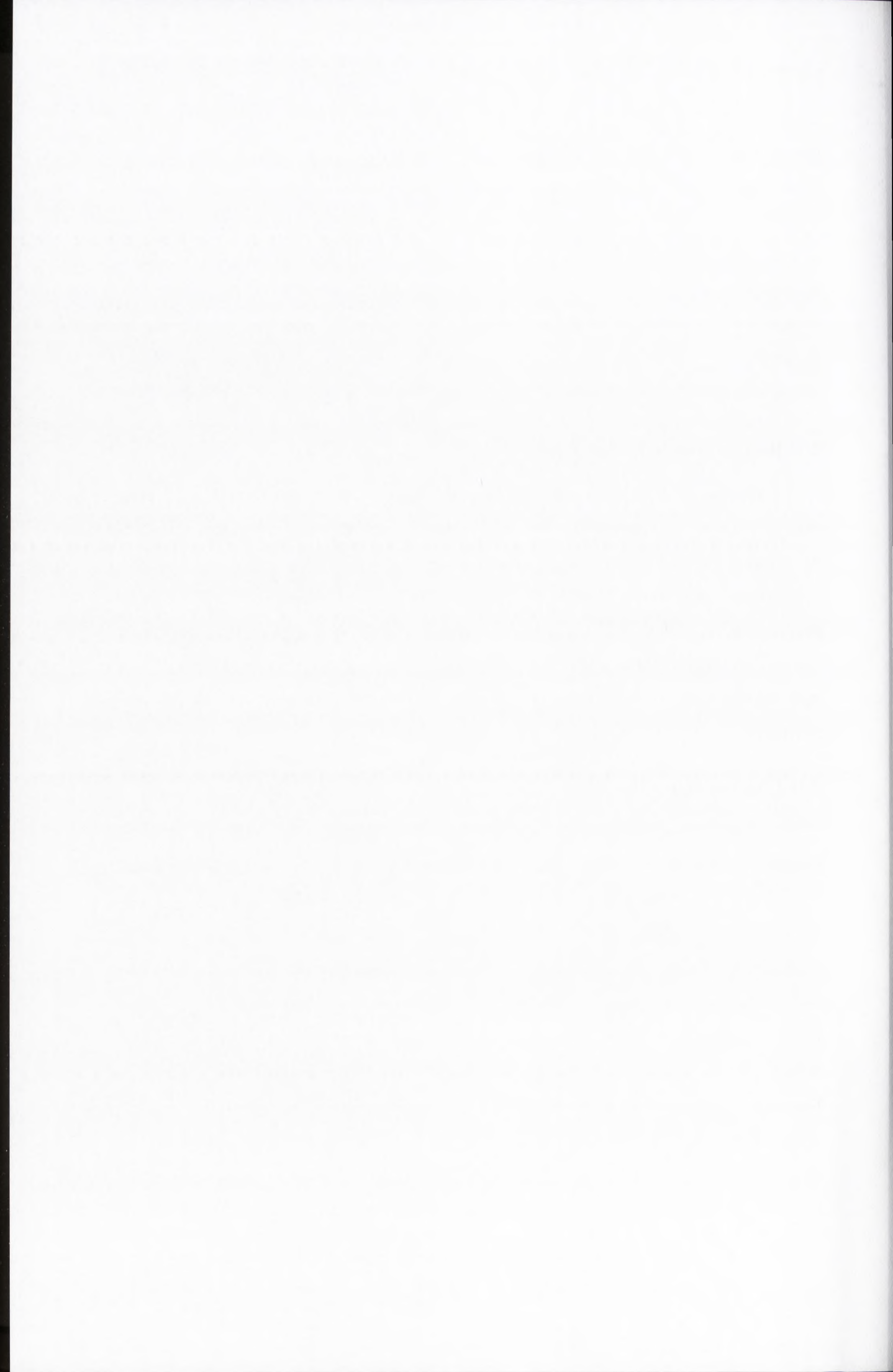
Do mieszaniny dodano 200 μ l osocza krwi ludzkiej (Sigma-Aldrich®). Reakcję prowadzono w 37°C. Pobierano frakcje o objętości 5 μ l co 0, 10, 20, 40, 60, 120, 180 minut oraz po 24 godzinach. Reakcje zatrzymano na suchym lodzie poprzez dodanie 5 μ l 80% formamidu z 50 mM EDTA i barwnikami. Mieszaniny reakcyjne oczyszczono metodą rozdzału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Elektroforezę prowadzono przy mocy 20 W przez 3 godziny. Obraz wizualizowano za pomocą ekranów odwzorowujących i komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo FLA-5100. Analizę ilościową przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania MultiGauge V3.0 (FujiFilm).

2.15 Rozmrażanie komórek *HeLa*

Zamrożone komórki *HeLa* odmrażano w wodzie o temperaturze 37°C i całość przeniesiono do 15 ml probówki. Następnie dodano 5 ml pożywki hodowlanej *HeLa* II po odmrażaniu. Całość wirowano przez 5 minut przy 1000 rpm. Następnie usunięto supernatant, osad rozpuszczono w 10 ml pożywki hodowlanej *HeLa* II. Całość przeniesiono do butelki hodowlanej o pojemności 75 cm³. Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji wykonywano pasaż do nowej butelki. Wszystkie prace z komórkami *HeLa* były wykonywane w sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem powietrza.

2.16 Hodowla komórek *HeLa*

Linia komórkowa *HeLa* hodowana była w pożywce hodowlanej *HeLa* I. Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%. Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90% wykonano pasaż komórek do nowej butelki, gdzie zredukowano liczbę komórek 10 razy. Pasaż wykonano poprzez usunięcie pożywki hodowlanej *HeLa* I z butelki, komórki przemyto sterylnym buforem PBS z 50 mM EDTA. Następnie dodano 1 ml trypsyny (1x) i całość inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej *HeLa* I. Komórki w pożywce hodowlanej *HeLa* I przeniesiono do 15 ml probówki, rozbito o ścianki energicznie pipetując. Następnie 1/10 objętości zawiesiny przeniesiono do nowej butelki hodowlanej o pojemności 75 cm³ i dodano pożywkę hodowlaną *HeLa* I do 10 ml. Dalszą hodowlę prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%.



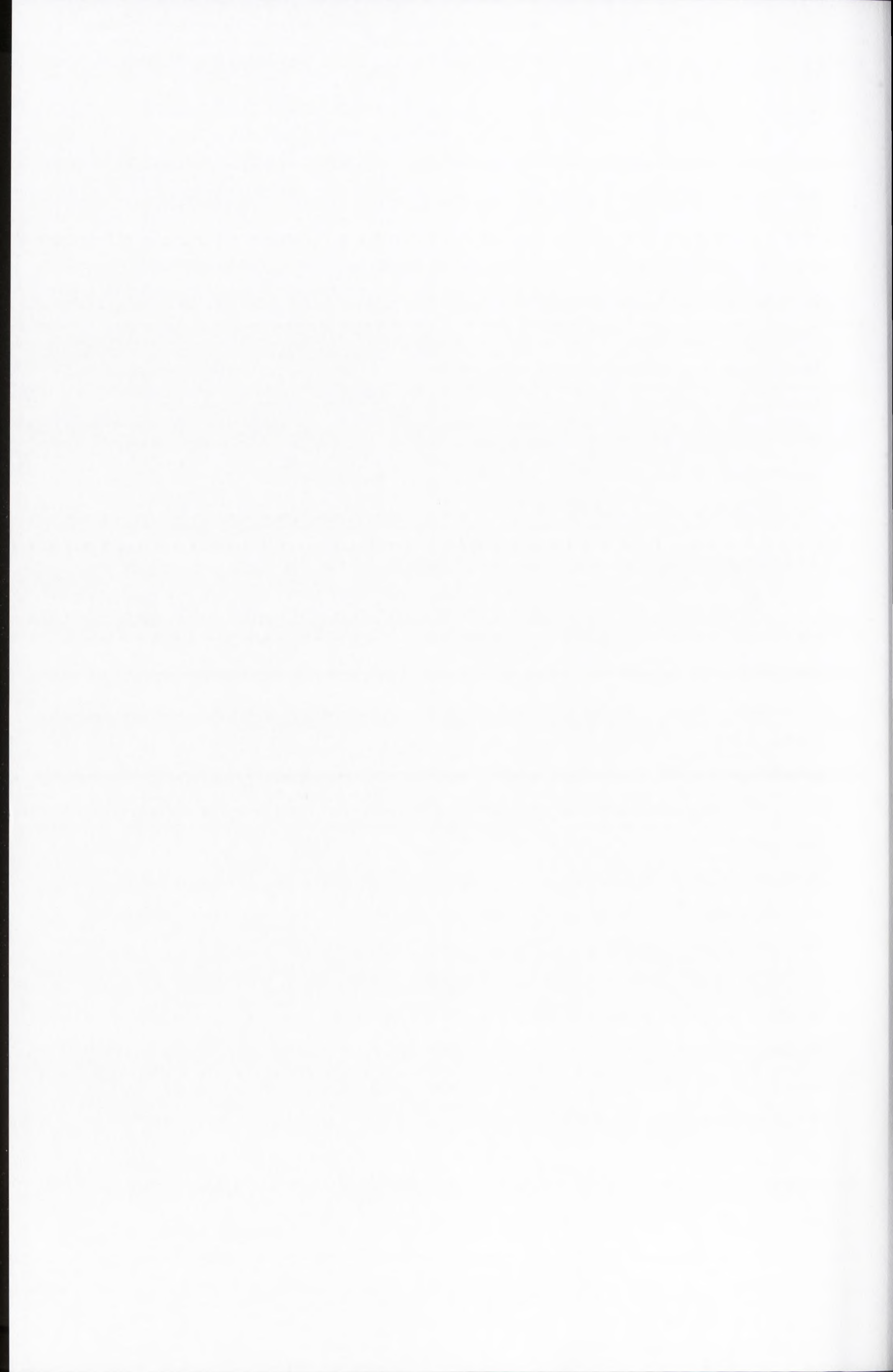
2.17 Pasaż komórek *HeLa* na płytkę 96-dołkową

Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90% usunięto pożywkę z butelki, komórki przemyto sterylnym buforem PBS z 50 mM EDTA. Następnie dodano 1 ml trypsyny i przeprowadzono inkubację w 37°C przez 2 minuty. Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej *HeLa* III. Komórki w pożywce przeniesiono do 15 ml probówek i wirowano 2 minuty przy 1000 rpm, supernatant usunięto. Osad komórkowy zawieszano w 5 ml pożywce hodowlanej *HeLa* III. Komórki policzono przy pomocy automatycznego licznika komórek. Przygotowano roztwór wyjściowy o stężeniu 2500 komórek/ml. Mieszaninę przeniesiono na płytkę 96-dołkową (po 100 μ l na dołek). Płytkę hodowlaną umieszczano na 24 godziny w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%.

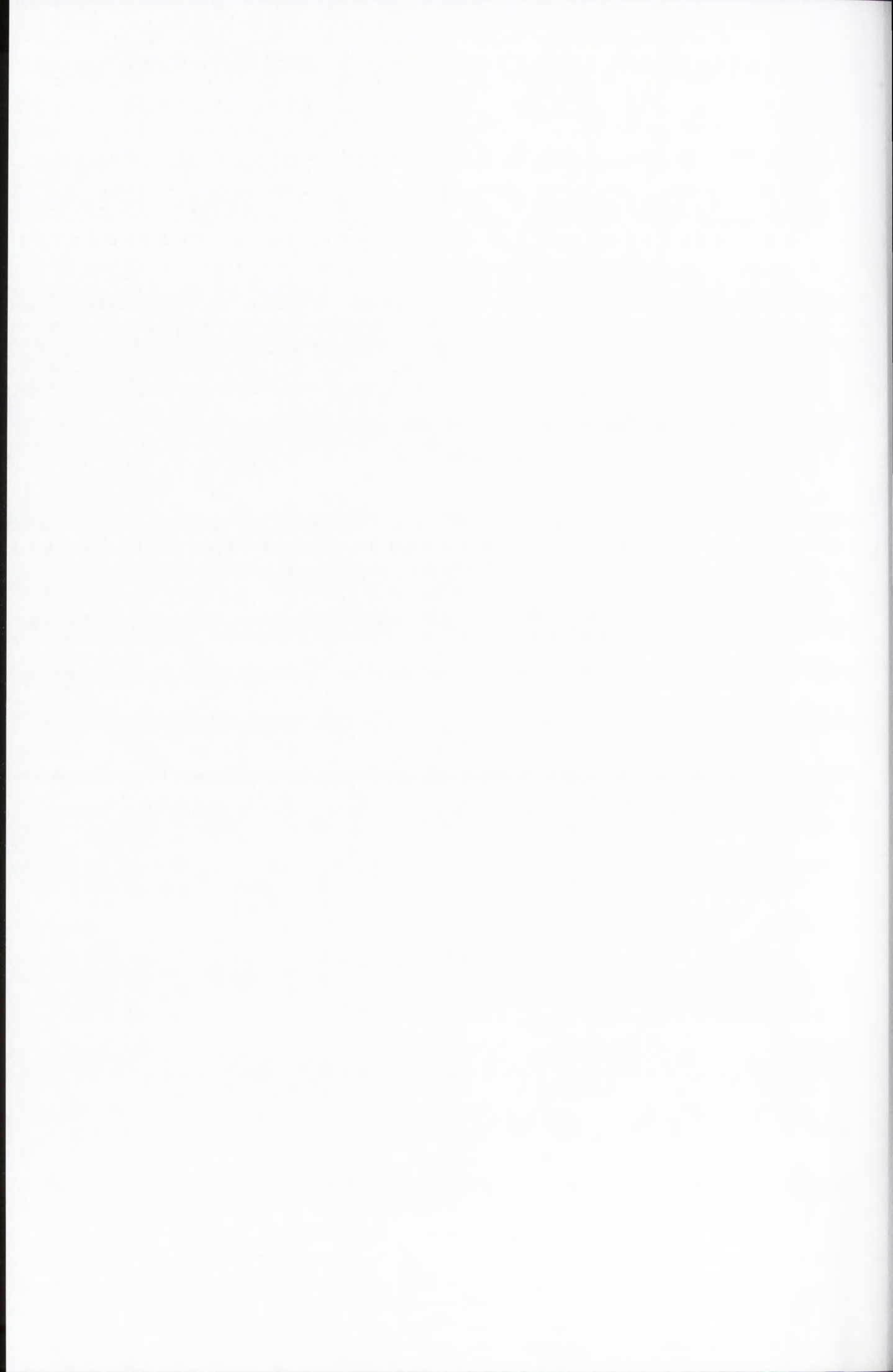
2.18 Pomiar właściwości antyproliferacyjnych oligonukleotydów

Do pomiaru właściwości antyproliferacyjnych wybranych aptamerów TBA użyto testu opartego na aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Jest to enzym mitochondrialny, obecny w żywych komórkach, który przekształca rozpuszczalną sól tetrazolową, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy, w formę zredukowaną (nierozpuszczalny formazan, wytrącający się w postaci kryształów). Ilość powstałego produktu zmierzono za pomocą spektrofotometru xMark™.

W pierwszej kolejności przygotowano mieszaniny wyjściowe badanych aptamerów o stężeniu: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μ M w buforze do fałdowania aptamerów. Całość inkubowano przez 6 minut w 95°C, następnie stopniowo schłodzono do temperatury pokojowej przez noc. Na wykonanej dzień wcześniej płytce 96-dołkowej przygotowano po 3 dołki dla każdego stężenia badanego aptameru (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μ M) według schematu: 20 μ l mieszaniny wyjściowej badanego aptameru o odpowiednim stężeniu oraz 80 μ l pożywki hodowlanej *HeLa* III. Przygotowywano również dołki kontrolne, do których dodano 100 μ l pożywki hodowlanej *HeLa* III. Płytkę 96-dołkową inkubowano przez 7 dni w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%. Po tym czasie, pożywkę hodowlaną *HeLa* III usunięto i dodano pożywkę hodowlaną *HeLa* IV. Przeprowadzono 2-godziną inkubację w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%. Następnie pożywkę

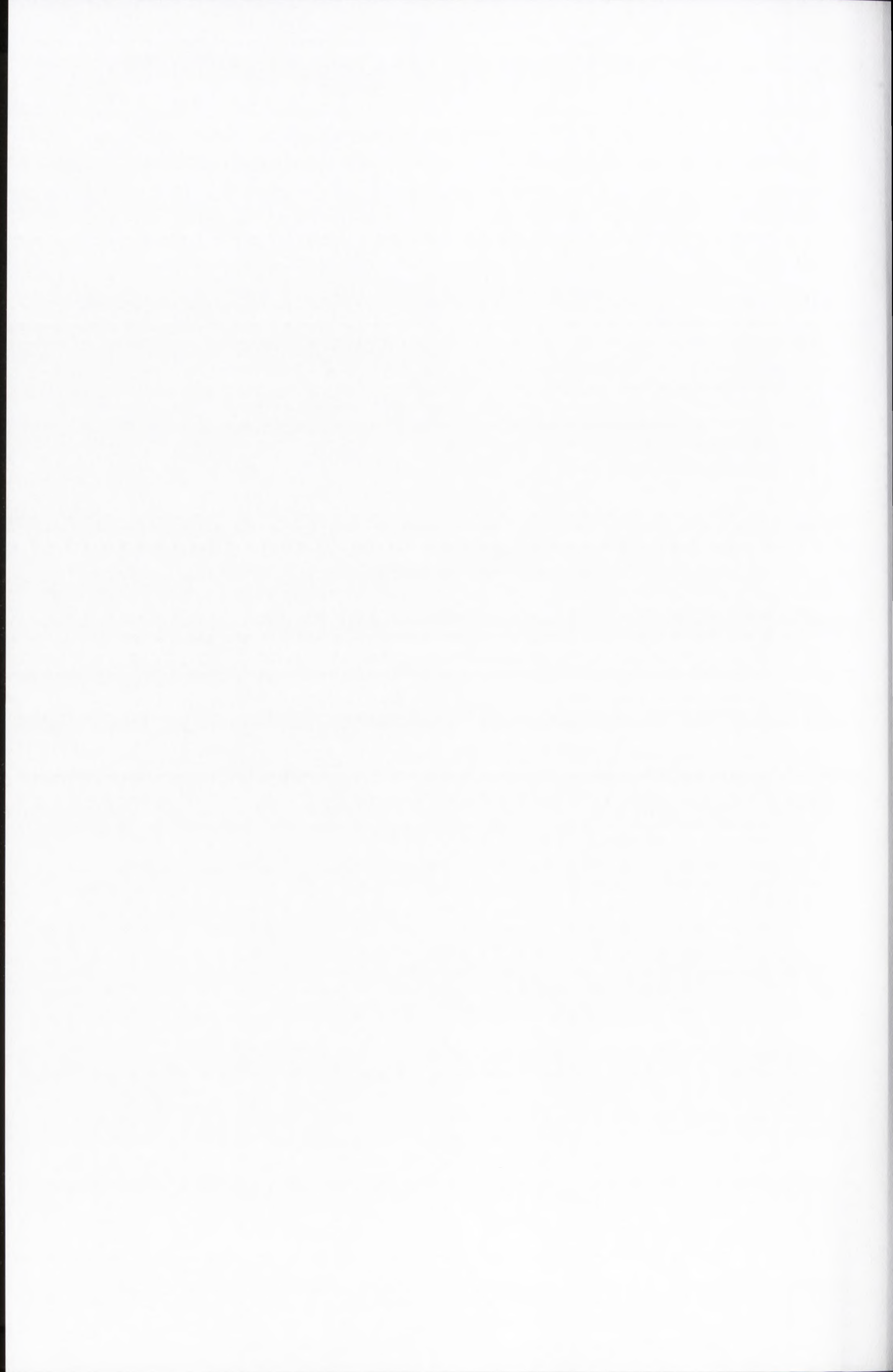


hodowlaną *HeLa* IV usunięto i zastąpiono 100 μ l 70% izopropanolu z 40 mM HCl. Płytkę wytrząsano przez 30 minut przy prędkości 80 rpm w temperaturze pokojowej. Ilość powstałego produktu zmierzono za pomocą spektrofotometru xMark™. Dalszą analizę wyników wykonano z zastosowaniem pakietu Microsoft Office 2013.

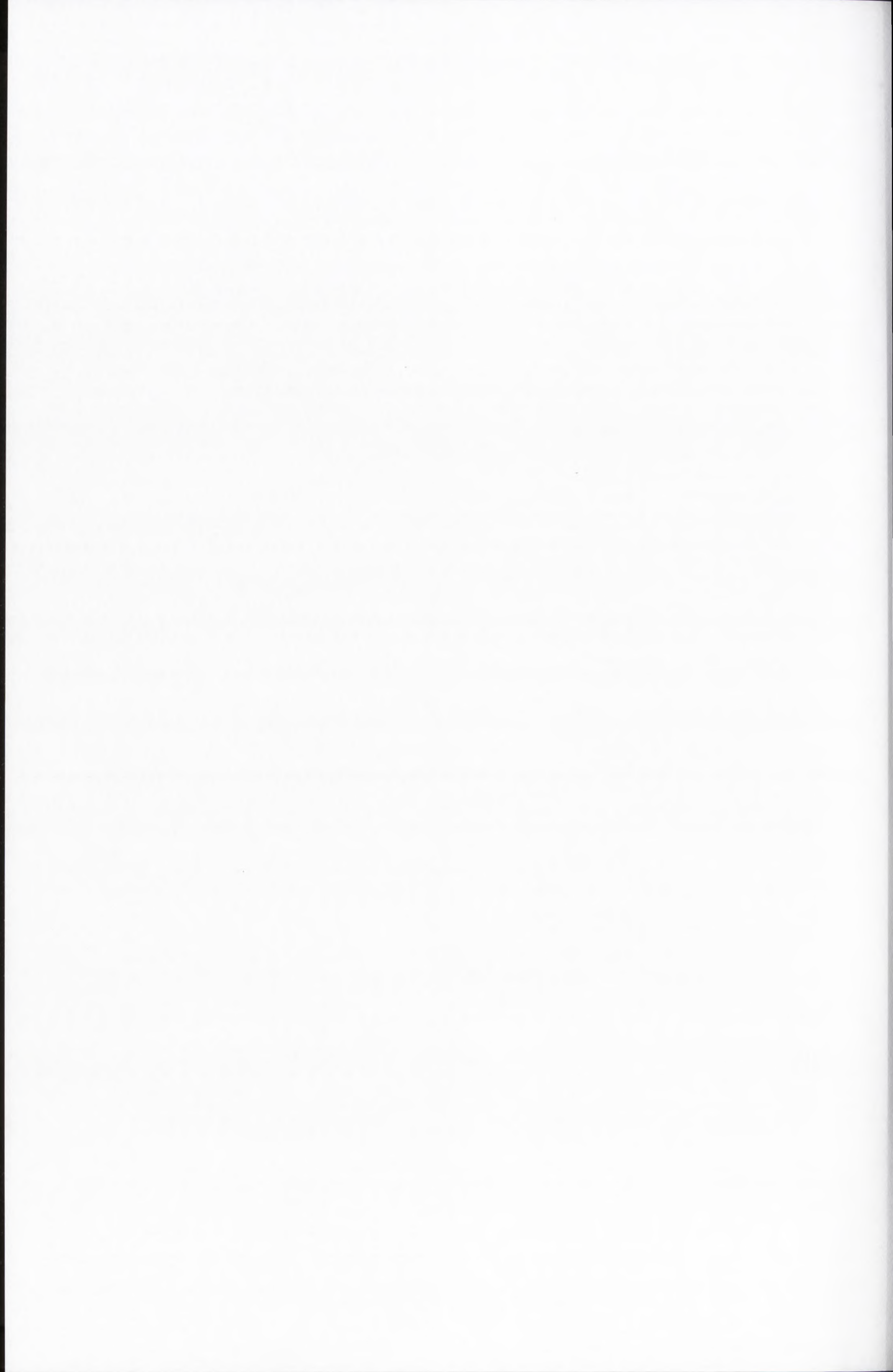


VIII. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ng R. (2008) History of drug discovery and development. W: Ng R. (red) *Drugs: From Discovery to Approval*, Second Edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 391-397.
- [2] Gabryelska M., Szymański M., Barciszewski J. (2009) DNA - cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. *Nauka*, 2, 111-134.
- [3] Ng R. (2008) Cells, nucleic acids, genes, and proteins. W: Ng R. (red.) *Drugs: From Discovery to Approval*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 398-410.
- [4] Watson J. D., Crick F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids, a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.
- [5] Kotkowiak W., Szabat M., Kierzek R. (2013) Struktura drugorzędowa RNA i metody jej określania. W: Koroniak H., Barciszewski J. (red.) *Na pograniczu chemii i biologii*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 243-280.
- [6] Zamecnik P. C., Stephenson M. L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 280-284.
- [7] Stephenson M. L., Zamecnik P. C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 285-288.
- [8] Zamecnik P. C., Goodchild J., Taguchi Y., Sarin P. S. (1986) Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 4143-4146.
- [9] Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Broder S. (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 7706-7710.
- [10] Huntington J. A. (2008) Structural Insights into the Life History of Thrombin. W: Tanaka K., Davie E. W. (red.) *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*, Springer Japan, Tokyo, 80-106.
- [11] Hoffman M., Monroe D. M. (2007) Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 21, 1-11.
- [12] Coughlin S. R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407, 258-264.
- [13] Martin F. A., Murphy R. P., Cummins P. M. (2013) Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, 1585-1597.
- [14] Horie S., Ishii H., Kazama M. (1990) Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. *Thromb Res*, 59, 895-904.
- [15] Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S. R., Hofsteenge J. (1989) The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J*, 8, 3467-3475.
- [16] Coppens M., Eikelboom J. W., Gustafsson D., Weitz J. I., Hirsh J. (2012) Translational success stories: development of direct thrombin inhibitors. *Circ Res*, 111, 920-929.
- [17] Crawley J. T., Zanardelli S., Chion C. K., Lane D. A. (2007) The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*, 5, 95-101.
- [18] Lancellotti S., De Cristofaro R. (2009) Nucleotide-derived thrombin inhibitors: a new tool for an old issue. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 7, 19-28.
- [19] Aleman M. M., Walton B. L., Byrnes J. R., Wolberg A. S. (2014) Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thromb Res*, 133, 38-40.
- [20] Weisel J. W., Litvinov R. I. (2013) Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 121, 1712-1719.



- [21] Esmon C. T., Mather T. (1998) Switching serine protease specificity. *Nat Struct Biol*, 5, 933-937.
- [22] Taylor F. B., Peer G. T., Lockhart M. S., Ferrell G., Esmon C. T. (2001) Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 97, 1685-1688.
- [23] Zhou S., Xiao W., Pan X., Zhu M., Yang Z., Zhang F., Zheng C. (2014) Thrombin promotes proliferation of human lung fibroblasts via protease activated receptor-1-dependent and NF-kappaB-independent pathways. *Cell Biol Int*, 38, 747-756.
- [24] Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., Ishihara H., Coughlin S. R. (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*, 103, 879-887.
- [25] Gieseler F., Ungefroren H., Settmacher U., Hollenberg M. D., Kaufmann R. (2013) Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal*, 11, 86.
- [26] Vidwan P., Pathak A., Sheth S., Huang J., Monroe D. M., Stouffer G. A. (2010) Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2587-2596.
- [27] Hanzelmann S., Wang J., Guney E., Tang Y., Zhang E., Axelsson A. S., Nenonen H., Salehi A. S., Wollheim C. B., Zetterberg E., Berntorp E., Costa I. G., Castelo R., Rosengren A. H. (2015) Thrombin stimulates insulin secretion via protease-activated receptor-3. *Islets*, 7, 1118195.
- [28] Venugopal A. (2014) Disseminated intravascular coagulation. *Indian J Anaesth*, 58, 603-608.
- [29] Asokanathan N., Lan R. S., Graham P. T., Bakker A. J., Tokanovic A., Stewart G. A. (2015) Activation of protease-activated receptors (PARs)-1 and -2 promotes alpha-smooth muscle actin expression and release of cytokines from human lung fibroblasts. *Physiol Rep*, 3.
- [30] Bazan-Socha S., Mastalerz L., Cybulska A., Zareba L., Kremers R., Zabczyk M., Pulka G., Iwaniec T., Hemker C., Undas A. (2016) Asthma is associated with enhanced thrombin formation and impaired fibrinolysis. *Clin Exp Allergy*, 46, 932-944.
- [31] Esumi N., Fan D., Fidler I. J. (1991) Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res*, 51, 4549-4556.
- [32] Even-Ram S., Uziely B., Cohen P., Grisar-Granovsky S., Maoz M., Ginzburg Y., Reich R., Vlodavsky I., Bar-Shavit R. (1998) Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med*, 4, 909-914.
- [33] Falanga A., Marchetti M., Vignoli A. (2013) Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost*, 11, 223-233.
- [34] Adams G. N., Rosenfeldt L., Frederick M., Miller W., Waltz D., Kombrinck K., McElhinney K. E., Flick M. J., Monia B. P., Revenko A. S., Palumbo J. S. (2015) Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Res*, 75, 4235-4243.
- [35] Wardrop D., Keeling D. (2008) The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*, 141, 757-763.
- [36] Franchini M., Liumbruno G. M., Bonfanti C., Lippi G. (2016) The evolution of anticoagulant therapy. *Blood Transfus*, 14, 175-184.
- [37] Li W., Johnson D. J., Esmon C. T., Huntington J. A. (2004) Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 857-862.
- [38] Franchini M., Liumbruno G. M., Bonfanti C., Lippi G. (2016) The evolution of anticoagulant therapy. *Blood Transfusion*, 14, 175-184.
- [39] Walker C. P., Royston D. (2002) Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies. *Br J Anaesth*, 88, 848-863.



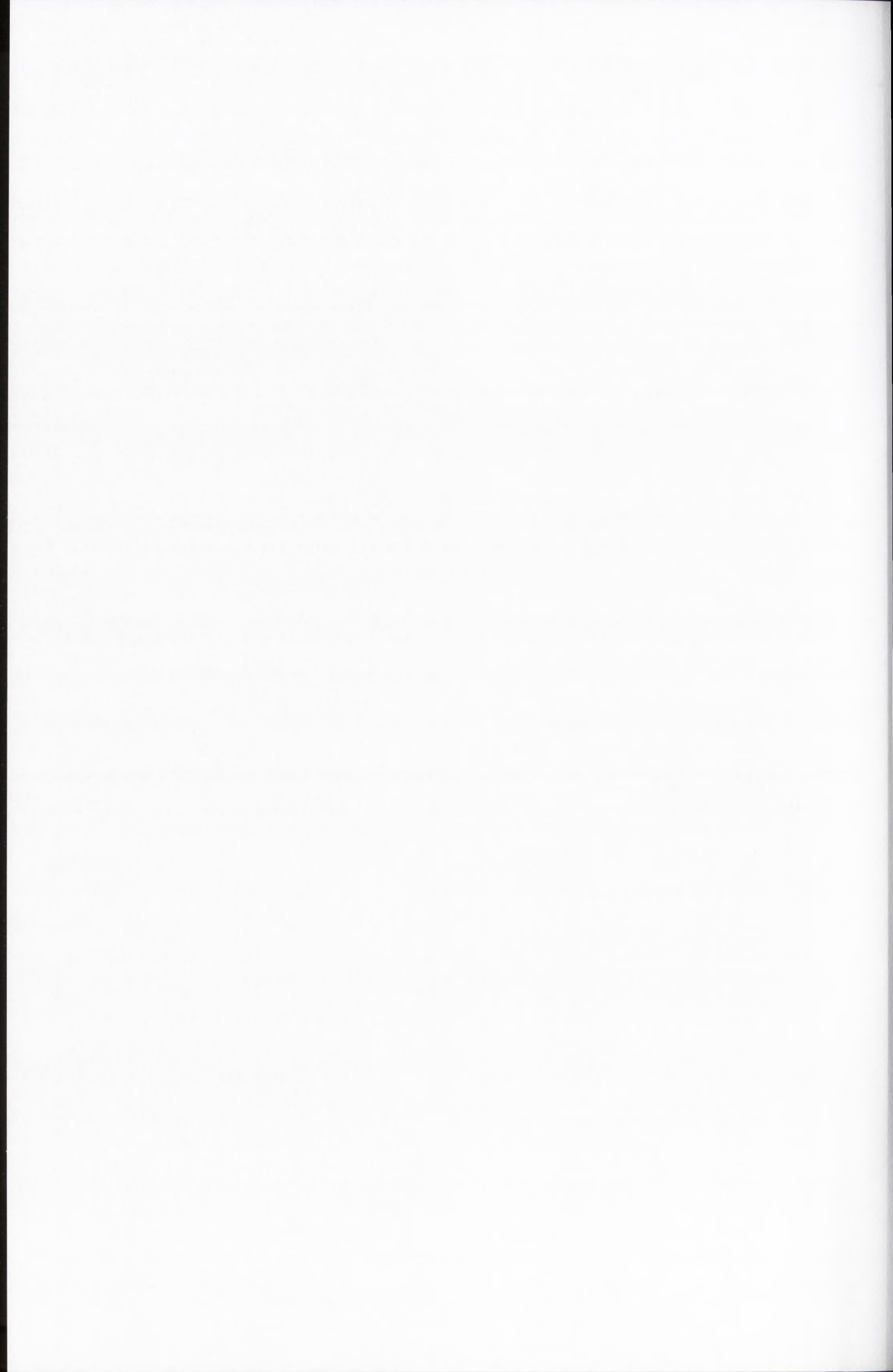
- [40] Fields W. S. (1991) The history of leeching and hirudin. *Haemostasis*, 21, 3-10.
- [41] Kikelj D. (2003) Peptidomimetic thrombin inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33, 487-491.
- [42] Haas S. (2004) Oral direct thrombin inhibition: an effective and novel approach for venous thromboembolism. *Drugs*, 64, 7-16.
- [43] Markwardt F. (1994) The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res*, 74, 1-23.
- [44] Weitz J. I., Hirsh J., Samama M. M. (2004) New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 126, 265-286.
- [45] Maraganore J. M., Chao B., Joseph M. L., Jablonski J., Ramachandran K. L. (1989) Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides. *J Biol Chem*, 264, 8692-8698.
- [46] Maraganore J. M., Bourdon P., Jablonski J., Ramachandran K. L., Fenton J. W. (1990) Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, 29, 7095-7101.
- [47] Bettelheim F. R. (1956) The clotting of fibrinogen. II. Fractionation of peptide material liberated. *Biochim Biophys Acta*, 19, 121-130.
- [48] Blomback B., Blomback M., Olsson P., Svendsen L., Aberg G. (1969) Synthetic peptides with anticoagulant and vasodilating activity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 107, 59-61.
- [49] Marsh H. C., Meinwald Y. C., Lee S., Scheraga H. A. (1982) Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. Direct evidence for the involvement of phenylalanine at position P9. *Biochemistry*, 21, 6167-6171.
- [50] Fitzgerald D., Murphy N. (1996) Argatroban: a synthetic thrombin inhibitor of low relative molecular mass. *Coron Artery Dis*, 7, 455-458.
- [51] Walenga J. M. (2002) An overview of the direct thrombin inhibitor argatroban. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 32, 9-14.
- [52] Gustafsson D., Antonsson T., Bylund R., Eriksson U., Gyzander E., Nilsson I., Elg M., Mattsson C., Deinum J., Pehrsson S., Karlsson O., Nilsson A., Sorensen H. (1998) Effects of melagatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, on thrombin and fibrinolytic enzymes. *Thromb Haemost*, 79, 110-118.
- [53] Gustafsson D., Nystrom J., Carlsson S., Bredberg U., Eriksson U., Gyzander E., Elg M., Antonsson T., Hoffmann K., Ungell A., Sorensen H., Nagard S., Abrahamsson A., Bylund R. (2001) The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res*, 101, 171-181.
- [54] Stangier J., Clemens A. (2009) Pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15, 9-16.
- [55] Gomi K., Zushi M., Honda G., Kawahara S., Matsuzaki O., Kanabayashi T., Yamamoto S., Maruyama I., Suzuki K. (1990) Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood*, 75, 1396-1399.
- [56] Nakashima M., Kanamaru M., Umemura K., Tsuruta K. (1998) Pharmacokinetics and safety of a novel recombinant soluble human thrombomodulin, ART-123, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*, 38, 40-44.
- [57] Takagi K., Tasaki T., Yamauchi T., Iwasaki H., Ueda T. (2011) Successful Administration of Recombinant Human Soluble Thrombomodulin alpha (Recomodulin) for Disseminated Intravascular Coagulation during Induction Chemotherapy in an Elderly Patient with Acute Monoblastic Leukemia Involving the t(9;11)(p22;q23) MLL/AF9 Translocation. *Case Rep Hematol*, 2011, 273070.
- [58] Saito H., Maruyama I., Shimazaki S., Yamamoto Y., Aikawa N., Ohno R., Hirayama A., Matsuda T., Asakura H., Nakashima M., Aoki N. (2007) Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost*, 5, 31-41.



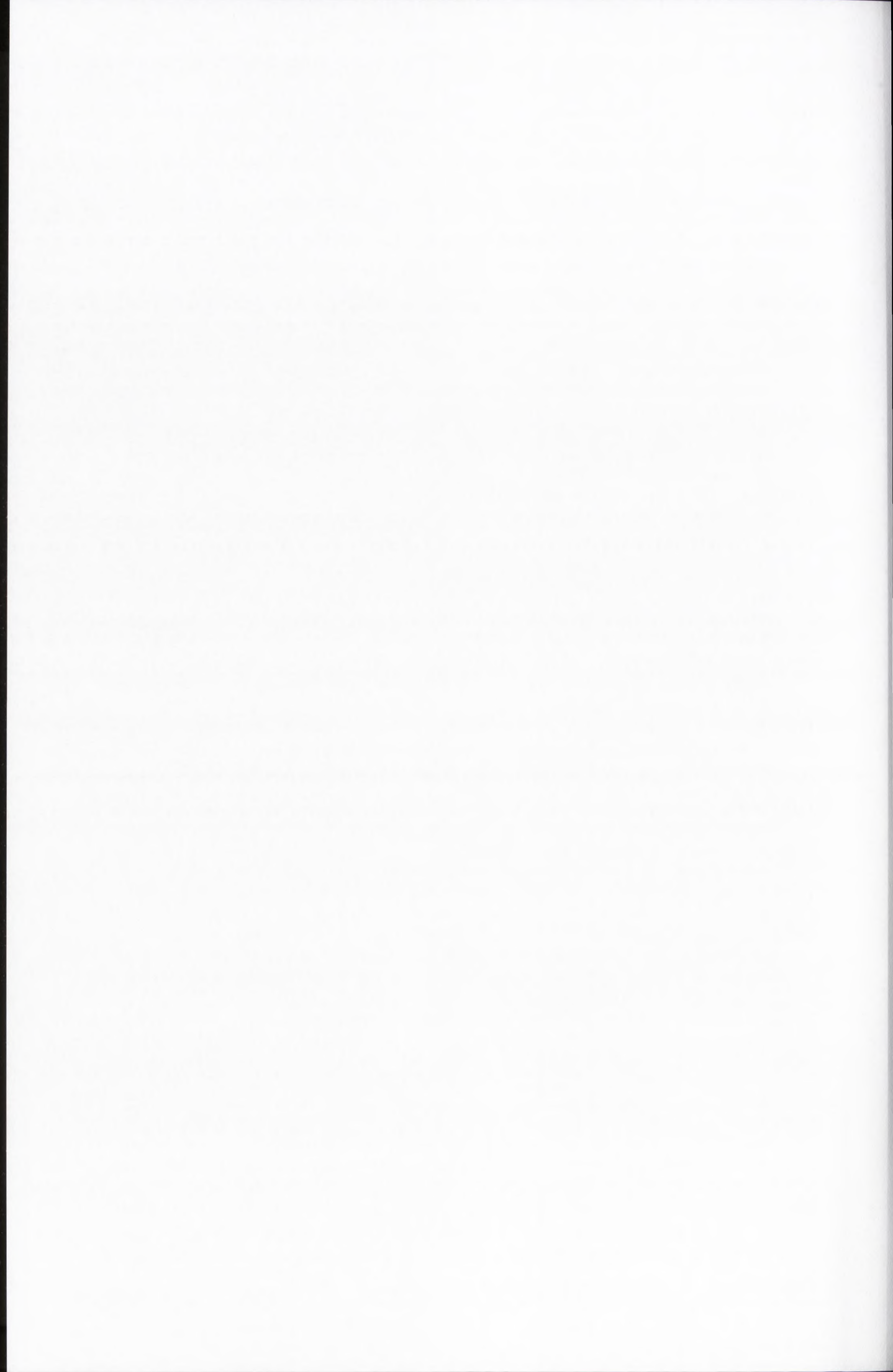
- [59] Tamura K., Saito H., Asakura H., Okamoto K., Tagawa J., Hayakawa T., Aoki N. (2015) Recombinant human soluble thrombomodulin (thrombomodulin alfa) to treat disseminated intravascular coagulation in solid tumors: results of a one-arm prospective trial. *Int J Clin Oncol*, 20, 821-828.
- [60] Woodruff R. S., Sullenger B. A. (2015) Modulation of the Coagulation Cascade Using Aptamers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35, 2083-2091.
- [61] Santosh B., Yadava P. K. (2014) Nucleic acid aptamers: research tools in disease diagnostics and therapeutics. *Biomed Res Int*, 2014, 540451.
- [62] Banerjee J., Nilsen-Hamilton M. (2013) Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research. *J Mol Med*, 91, 1333-1342.
- [63] Ni X., Castaneres M., Mukherjee A., Lupold S. E. (2011) Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem*, 18, 4206-4214.
- [64] Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. (2015) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*, 33, 1141-1161.
- [65] Pinheiro V. B., Holliger P. (2014) Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers. *Trends Biotechnol*, 32, 321-328.
- [66] Zhu H., Li J., Zhang X. B., Ye M., Tan W. (2015) Nucleic acid aptamer-mediated drug delivery for targeted cancer therapy. *ChemMedChem*, 10, 39-45.
- [67] Ellington A. D., Szostak J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822.
- [68] Tuerk C., Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510.
- [69] Tucker W. O., Shum K. T., Tanner J. A. (2012) G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: structure, function and application. *Curr Pharm Des*, 18, 2014-2026.
- [70] Ye M., Hu J., Peng M., Liu J., Liu J., Liu H., Zhao X., Tan W. (2012) Generating aptamers by cell-SELEX for applications in molecular medicine. *Int J Mol Sci*, 13, 3341-3353.
- [71] Bock L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas E. H., Toole J. J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355, 564-566.
- [72] Kretz C. A., Stafford A. R., Fredenburgh J. C., Weitz J. I. (2006) HD1, a thrombin-directed aptamer, binds exosite 1 on prothrombin with high affinity and inhibits its activation by prothrombinase. *J Biol Chem*, 281, 37477-37485.
- [73] Nagatoishi S., Tanaka Y., Tsumoto K. (2007) Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 352, 812-817.
- [74] Zavyalova E., Tagiltsev G., Reshetnikov R., Arutyunyan A., Kopylov A. (2016) Cation Coordination Alters the Conformation of a Thrombin-Binding G-Quadruplex DNA Aptamer That Affects Inhibition of Thrombin. *Nucleic Acid Ther*, 26, 299-308.
- [75] Buff M. C., Schafer F., Wulffen B., Muller J., Potzsch B., Heckel A., Mayer G. (2010) Dependence of aptamer activity on opposed terminal extensions: improvement of light-regulation efficiency. *Nucleic Acids Res*, 38, 2111-2118.
- [76] Tasset D. M., Kubik M. F., Steiner W. (1997) Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol*, 272, 688-698.
- [77] Trapaidze, A., Hérault, J. P., Herbert, J. M., Bancaud, A. and Gue, A. M. (2016) Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma. *Biosens Bioelectron*. 78, 58-66
- [78] Long S. B., Long M. B., White R. R., Sullenger B. A. (2008) Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA*, 14, 2504-2512.
- [79] White R., Rusconi C., Scardino E., Wolberg A., Lawson J., Hoffman M., Sullenger B. (2001) Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Mol Ther*, 4, 567-573.



- [80] Jeter M. L., Ly L. V., Fortenberry Y. M., Whinna H. C., White R. R., Rusconi C. P., Sullenger B. A., Church, F. C. (2004) RNA aptamer to thrombin binds anion-binding exosite-2 and alters protease inhibition by heparin-binding serpins. *FEBS Lett*, 568, 10-14.
- [81] Bompiani K. M., Monroe D. M., Church F. C., Sullenger B. A. (2012) A high affinity, antidote-controllable prothrombin and thrombin-binding RNA aptamer inhibits thrombin generation and thrombin activity. *J Thromb Haemost*, 10, 870-880.
- [82] Rando R. F., Ojwang J., Elbaggari A., Reyes G. R., Tinder R., McGrath M. S., Hogan M. E. (1995) Suppression of human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro by oligonucleotides which form intramolecular tetrads. *J Biol Chem*, 270, 1754-1760.
- [83] Ng E. W., Shima D. T., Calias P., Cunningham E. T., Guyer D. R., Adamis A. P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 123-132.
- [84] Tok J. B., Fischer N. O. (2008) Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chem Commun*, 1883-1885.
- [85] Bruno J. G., Kiel, J. L. (2002) Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods. *Biotechniques*, 32, 178-180.
- [86] Wan Y., Kim Y. T., Li N., Cho S. K., Bachoo R., Ellington A. D., Iqbal, S. M. (2010) Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology. *Cancer Res*, 70, 9371-9380.
- [87] Yu G., Li H., Yang S., Wen J., Niu J., Zu Y. (2016) ssDNA Aptamer Specifically Targets and Selectively Delivers Cytotoxic Drug Doxorubicin to HepG2 Cells. *PLoS ONE*, 11, e0147674.
- [88] Liu J., Wei T., Zhao J., Huang Y., Deng H., Kumar A., Wang C., Liang Z., Ma X., Liang X. J. (2016) Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials*, 91, 44-56.
- [89] Dhar S., Kolishetti N., Lippard S. J., Farokhzad O. C. (2011) Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 1850-1855.
- [90] Zhao N., Pei S. N., Qi J., Zeng Z., Iyer S. P., Lin P., Tung C. H., Zu Y. (2015) Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Biomaterials*, 67, 42-51.
- [91] Tan J., Yang N., Hu Z., Su J., Zhong J., Yang Y., Yu Y., Zhu J., Xue D., Huang Y., Lai Z., Huang Y., Lu X., Zhao Y. (2016) Aptamer-Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells. *Nanoscale Res Lett*, 11, 298.
- [92] Farokhzad O. C., Jon S., Khademhosseini A., Tran T. N., Lavan D. A., Langer R. (2004) Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64, 7668-7672.
- [93] Li W. X., Kaplan A. V., Grant G. W., Toole J. J., Leung L. L. (1994) A novel nucleotide-based thrombin inhibitor inhibits clot-bound thrombin and reduces arterial platelet thrombus formation. *Blood*, 83, 677-682.
- [94] Pica A., Russo K. I., Merlino A., Nagatoishi S., Sugimoto N., Sica F. (2013) Dissecting the contribution of thrombin exosite I in the recognition of thrombin binding aptamer. *FEBS J*, 280, 6581-6588.
- [95] Macaya R. F., Schultze P., Smith F. W., Roe J. A., Feigon J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3745-3749.
- [96] Schultze P., Macaya R. F., Feigon J. (1994) Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J Mol Biol*, 235, 1532-1547.
- [97] Kelly J. A., Feigon J., Yeates T. O. (1996) Reconciliation of the X-ray and NMR Structures of the Thrombin-Binding Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J Mol Biol*, 256, 417-422.



- [98] Zhao D., Dong X., Jiang N., Zhang D., Liu C. (2014) Selective recognition of parallel and anti-parallel thrombin-binding aptamer G-quadruplexes by different fluorescent dyes. *Nucleic Acids Res*, 42, 11612-11621.
- [99] Avino A., Fabrega C., Tintore M., Eritja R. (2012) Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: chemically modified derivatives and biomedical applications. *Curr Pharm Des*, 18, 2036-2047.
- [100] Wang K. Y., McCurdy S., Shea R. G., Swaminathan S., Bolton P. H. (1993) A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry*, 32, 1899-1904.
- [101] Padmanabhan K., Tulinsky A. (1996) An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 52, 272-282.
- [102] Wang K. Y., Krawczyk S. H., Bischofberger N., Swaminathan S., Bolton P. H. (1993) The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity. *Biochemistry*, 32, 11285-11292.
- [103] Coppola T., Varra M., Oliviero G., Galeone A., D'Isa G., Mayol L., Morelli E., Bucci M. R., Vellecco V., Cirino G., Borbone N. (2008) Synthesis, structural studies and biological properties of new TBA analogues containing an acyclic nucleotide. *Bioorg Med Chem*, 16, 8244-8253.
- [104] Borbone N., Bucci M., Oliviero G., Morelli E., Amato J., D'Atri V., D'Errico S., Vellecco V., Cirino G., Piccialli G., Fattorusso C., Varra M., Mayol L., Persico M., Scutto, M. (2012) Investigating the role of T7 and T12 residues on the biological properties of thrombin-binding aptamer: enhancement of anticoagulant activity by a single nucleobase modification. *J Med Chem*, 55, 10716-10728.
- [105] Padmanabhan K., Padmanabhan K. P., Ferrara J. D., Sadler J. E., Tulinsky A. (1993) The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem*, 268, 17651-17654.
- [106] Bouaziz S., Kettani A., Patel D. J. (1998) A K cation-induced conformational switch within a loop spanning segment of a DNA quadruplex containing G-G-G-C repeats. *J Mol Biol*, 282, 637-652.
- [107] Kettani A., Bouaziz S., Gorin A., Zhao H., Jones R. A., Patel D. J. (1998) Solution structure of a Na cation stabilized DNA quadruplex containing G.G.G.G and G.C.G.C tetrads formed by G-G-G-C repeats observed in adeno-associated viral DNA. *J Mol Biol*, 282, 619-636.
- [108] Marathias V. M., Bolton P. H. (1999) Determinants of DNA quadruplex structural type: sequence and potassium binding. *Biochemistry*, 38, 4355-4364.
- [109] Marathias V. M., Bolton, P. H. (2000) Structures of the potassium-saturated, 2:1, and intermediate, 1:1, forms of a quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res*, 28, 1969-1977.
- [110] Kankia B. I., Marky L. A. (2001) Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr(2+): stability, heat, and hydration. *J Am Chem Soc*, 123, 10799-10804.
- [111] Vairamani M., Gross M. L. (2003) G-quadruplex formation of thrombin-binding aptamer detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 125, 42-43.
- [112] Pagano B., Martino L., Randazzo A., Giancola C. (2008) Stability and binding properties of a modified thrombin binding aptamer. *Biophys J*, 94, 562-569.
- [113] Russo K. I., Merlino A., Giancola C., Randazzo A., Mazzarella L., Sica F. (2011) Thrombin-aptamer recognition: a revealed ambiguity. *Nucleic Acids Res*, 39, 7858-7867.
- [114] DeAnda A., Coutre S. E., Moon M. R., Vial C. M., Griffin L. C., Law V. S., Komeda M., Leung L. L., Miller D. C. Pilot study of the efficacy of a thrombin inhibitor for use during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 58, 344-350.
- [115] He G.-X., Krawczyk S. H., Swaminathan S., Shea R. G., Dougherty J. P., Terhorst T., Law V. S., Griffin L. C., Coutré S., Bischofberger N. (1998) N2- and C8-Substituted Oligodeoxynucleotides with Enhanced Thrombin Inhibitory Activity in Vitro and in Vivo. *J Med Chem*, 41, 2234-2242.
- [116] Goji S., Matsui J. (2011) Direct detection of thrombin binding to 8-bromodeoxyguanosine-modified aptamer: effects of modification on affinity and kinetics. *J Nucleic Acids*, 316079.



- [117] Lopez de la Osa J., Gonzalez C., Gargallo R., Rueda M., Cubero E., Orozco M., Avino A., Eritja R. (2006) Destabilization of quadruplex DNA by 8-aminoguanine. *ChemBioChem*, 7, 46-48.
- [118] Marathias V. M., Sawicki M. J., Bolton P. H. (1999) 6-Thioguanine alters the structure and stability of duplex DNA and inhibits quadruplex DNA formation. *Nucleic Acids Res*, 27, 2860-2867.
- [119] Nallagatla S. R., Heuberger B., Haque A., Switzer C. (2009) Combinatorial synthesis of thrombin-binding aptamers containing iso-guanine. *J Comb Chem*, 11, 364-369.
- [120] Tarkanyi I., Horvath A., Szatmari I., Eizert H., Vamosi G., Damjanovich S., Segal-Bendirdjian E., Aradi J. (2005) Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide. *FEBS Lett*, 579, 1411-1416.
- [121] Horvath A., Tokes S., Hartman T., Watson K., Turpin J. A., Buckheit R. W., Sebestyen Z., Szollosi J., Benko I., Bardos T. J., Dunn J. A., Fesus L., Toth F. D., Aradi J. (2005) Potent inhibition of HIV-1 entry by (s4dU)₃₅. *Virology*, 334, 214-223.
- [122] Mendelboun R. S., Horvath A., Aradi J., Bagoly Z., Fazakas F., Batta Z., Muszbek L., Harsfalvi J. (2008) 4-thio-deoxyuridylate-modified thrombin aptamer and its inhibitory effect on fibrin clot formation, platelet aggregation and thrombus growth on subendothelial matrix. *J Thromb Haemost*, 6, 1764-1771.
- [123] Virgilio A., Petraccone L., Scuotto M., Vellecco V., Bucci M., Mayol L., Varra M., Esposito V., Galeone A. (2014) 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine residues in the thrombin binding aptamer: investigating anticoagulant activity by making a tiny chemical modification. *ChemBioChem*, 15, 2427-2434.
- [124] Virgilio A., Petraccone L., Vellecco V., Bucci M., Varra M., Irace C., Santamaria R., Pepe A., Mayol L., Esposito V., Galeone A. (2015) Site-specific replacement of the thymine methyl group by fluorine in thrombin binding aptamer significantly improves structural stability and anticoagulant activity. *Nucleic Acids Res*, 43, 10602-10611.
- [125] Tang C. F., Shafer R. H. (2006) Engineering the quadruplex fold: nucleoside conformation determines both folding topology and molecularity in guanine quadruplexes. *J Am Chem Soc*, 128, 5966-5973.
- [126] Sacca B., Lacroix L., 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.
- [127] Virno A., Randazzo A., Giancola C., Bucci M., Cirino G., Mayol L. (2007) A novel thrombin binding aptamer containing a G-LNA residue. *Bioorg Med Chem*, 15, 5710-5718.
- [128] Bonifacio L., Church F. C., Jarstfer M. B. (2008) Effect of locked-nucleic acid on a biologically active G-quadruplex. A structure-activity relationship of the thrombin aptamer. *Int J Mol Sci*, 9, 422-433.
- [129] Saneyoshi H., Mazzini S., Avino A., Portella G., Gonzalez C., Orozco M., Marquez V. E., Eritja R. (2009) Conformationally rigid nucleoside probes help understand the role of sugar pucker and nucleobase orientation in the thrombin-binding aptamer. *Nucleic Acids Res*, 37, 5589-5601.
- [130] Peng C. G., Damha M. J. (2007) G-quadruplex induced stabilization by 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acids (2'F-ANA). *Nucleic Acids Res*, 35, 4977-4988.
- [131] Pasternak A., Hernandez F. J., Rasmussen L. M., Vester B., Wengel J. (2011) Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Res*, 39, 1155-1164.
- [132] Jensen T. B., Henriksen J. R., Rasmussen B. E., Rasmussen L. M., Andresen T. L., Wengel J., Pasternak A. (2011) Thermodynamic and biological evaluation of a thrombin binding aptamer modified with several unlocked nucleic acid (UNA) monomers and a 2'-C-piperazino-UNA monomer. *Bioorg Med Chem*, 19, 4739-4745.
- [133] Scuotto M., Riviuccio E., Varone A., Corda D., Bucci M., Vellecco V., Cirino G., Virgilio A., Esposito V., Galeone A., Borbone N., Varra M., Mayol L. (2015) Site



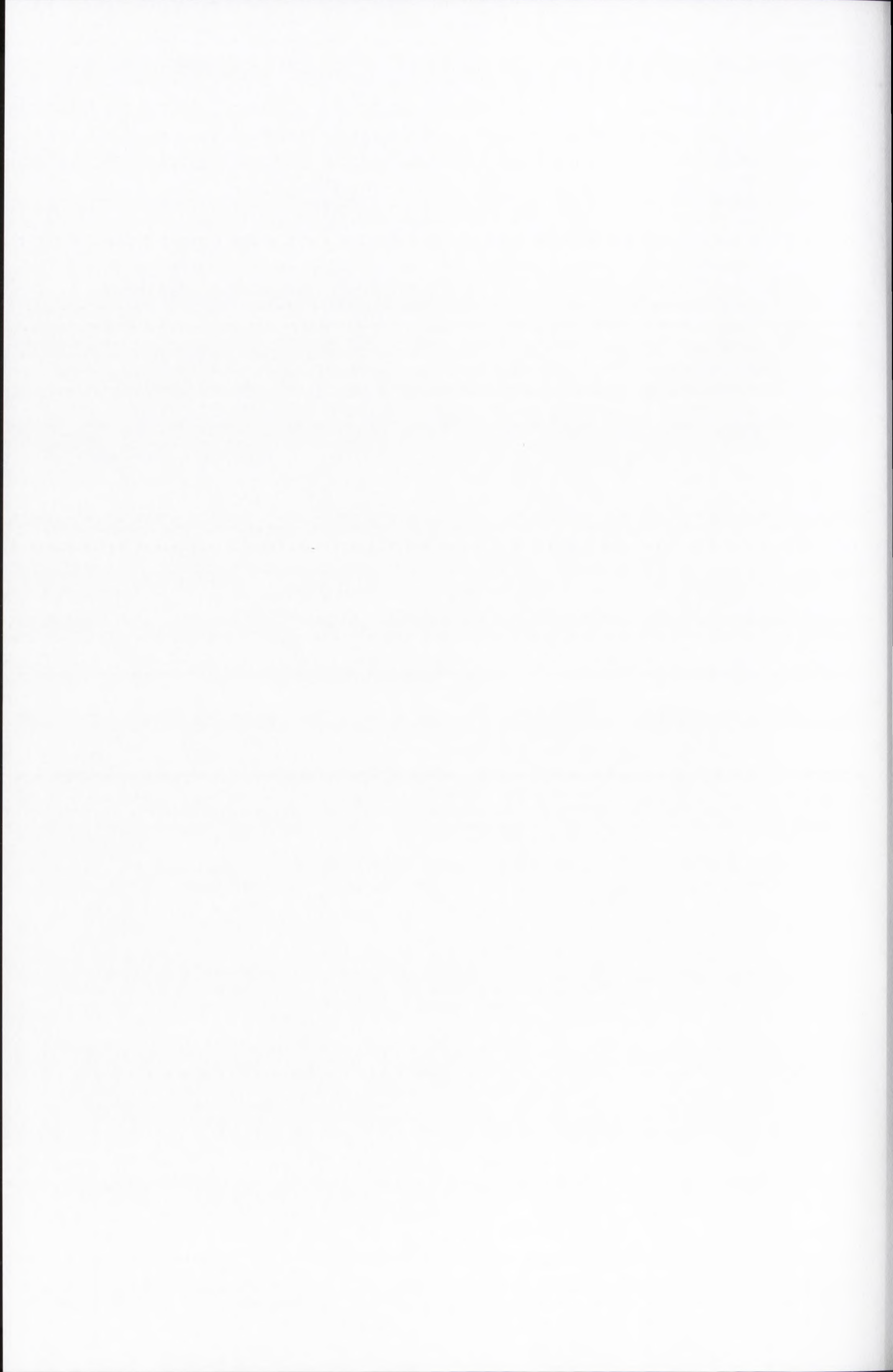
- specific replacements of a single loop nucleoside with a dibenzyl linker may switch the activity of TBA from anticoagulant to antiproliferative. *Nucleic Acids Res*, 43, 7702-7716.
- [134] He G. X., Williams J. P., Postich M. J., Swaminathan S., Shea R. G., Terhorst T., Law V. S., Mao C. T., Sueoka C., Coutre S., Bischofberger N. (1998) In vitro and in vivo activities of oligodeoxynucleotide-based thrombin inhibitors containing neutral formacetal linkages. *J Med Chem*, 41, 4224-4231.
- [135] Zhou X. G., Gray H. B. (1990) Mechanism of exonuclease action of BAL 31 nuclease. *Biochim Biophys Acta*, 1049, 83-91.
- [136] Rittié L., Perbal B. (2008) Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal*, 2, 25-45.
- [137] Martino L., Virno A., Randazzo A., Virgilio A., Esposito V., Giancola C., Bucci M., Cirino G., Mayol L. (2006) A new modified thrombin binding aptamer containing a 5'-5' inversion of polarity site. *Nucleic Acids Res*, 34, 6653-6662.
- [138] Esposito V., Scuotto M., Capuozzo A., Santamaria R., Varra M., Mayol L., Virgilio A., Galeone A. (2014) A straightforward modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to thrombin and nuclease resistance. *Org Biomol Chem*, 12, 8840-8843.
- [139] Ikebukuro K., Okumura Y., Sumikura K., Karube I. (2005) A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm. *Nucleic Acids Res*, 33, 108.
- [140] Dobrovolsky A. B., Titaeva E. V., Khaspekova S. G., Spiridonova V. A., Kopylov A. M., Mazurov A. V. (2009) Inhibition of Thrombin Activity with DNA-Aptamers. *Bull Exp Biol Med*, 148, 33.
- [141] Mazurov A. V., Titaeva E. V., Khaspekova S. G., Storojilova A. N., Spiridonova V. A., Kopylov A. M., Dobrovolsky A. B. (2011) Characteristics of a new DNA aptamer, direct inhibitor of thrombin. *Bull Exp Biol Med*, 150, 422-425.
- [142] Dolinnaya N. G., Yuminova A. V., Spiridonova V. A., Arutyunyan A. M., Kopylov A. M. (2012) Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer. *J Biomol Struct Dyn*, 30, 524-531.
- [143] Spiridonova V. A., Glinkina. K. A., Gainutdinov A. A., Arutyunyan A. M. (2014) Production of Thrombin Complexes with DNA Aptamers Containing G-Quadruplex and Different Duplexes. *J Nephrol Ther*, 4, 3-6.
- [144] Hasegawa H., Taira K., Sode K., Ikebukuro K. (2008) Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. *Sensors*, 8, 1090-1098.
- [145] Zavyalova E., Samoylenkova N., Revishchin A., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. (2014) Evaluation of Antithrombotic Activity of Thrombin DNA Aptamers by a Murine Thrombosis Model. *PLoS ONE*, 9, e107113.
- [146] Zavyalova E., Golovin A., Reshetnikov R., Mudrik N., Panteleyev D., Pavlova G., Kopylov A. (2011) Novel modular DNA aptamer for human thrombin with high anticoagulant activity. *Curr Med Chem*, 18, 3343-3350.
- [147] Savchik E. Y., Kalina T. B., Drozd N. N., Makarov V. A., Zav'yalova E. G., Lapsheva E. N., Mudrik N. N., Babij A. V., Pavlova G. V., Golovin A. V., Kopylov A. M. (2013) Aptamer RA36 inhibits of human, rabbit, and rat plasma coagulation activated with thrombin or snake venom coagulases. *Bull Exp Biol Med*, 156, 44-48.
- [148] Lee M., Walt D. R. (2000) A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem*, 282, 142-146.
- [149] Hamaguchi N., Ellington A., Stanton M. (2001) Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal Biochem*, 294, 126-131.
- [150] Na W., Liu X., Wang L., Su X. (2015) Label-free aptamer biosensor for selective detection of thrombin. *Anal Chim Acta*, 899, 85-90.
- [151] Basnar B., Elnathan R., Willner I. (2006) Following aptamer-thrombin binding by force measurements. *Anal Chem*, 78, 3638-3642.



- [152] Vasilescu A., Gaspar S., Mihai I., Tache A., Litescu S. C. (2013) Development of a label-free aptasensor for monitoring the self-association of lysozyme. *Analyst*, 138, 3530-3537.
- [153] Pagba C. V., Lane S. M., Cho H., Wachsmann-Hogiu S. (2010) Direct detection of aptamer-thrombin binding via surface-enhanced Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, 15, 047006.
- [154] Ocana C., del Valle M. (2016) Three different signal amplification strategies for the impedimetric sandwich detection of thrombin. *Anal Chim Acta*, 912, 117-124.
- [155] Wang Y., Yuan R., Chai Y., Yuan Y., Bai L. (2012) In situ enzymatic silver enhancement based on functionalized graphene oxide and layer-by-layer assembled gold nanoparticles for ultrasensitive detection of thrombin. *Biosens Bioelectron*, 38, 50-54.
- [156] Zhang J., Chai Y., Yuan R., Yuan Y., Bai L., Xie S. (2013) A highly sensitive electrochemical aptasensor for thrombin detection using functionalized mesoporous silica@multiwalled carbon nanotubes as signal tags and DNAzyme signal amplification. *Analyst*, 138, 6938-6945.
- [157] Li Y., Wang Q., Zhang Y., Deng D., He H., Luo L., Wang Z. (2016) A label-free electrochemical aptasensor based on graphene oxide/double-stranded DNA nanocomposite. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 145, 160-166.
- [158] Shangguan L., Zhu W., Xue Y., Liu S. (2015) Construction of photoelectrochemical thrombin aptasensor via assembling multilayer of graphene-CdS nanocomposites. *Biosens Bioelectron*, 64, 611-617.
- [159] Nagatoishi S., Nojima T., Galezowska E., Juskowiak B., Takenaka S. (2006) G quadruplex-based FRET probes with the thrombin-binding aptamer (TBA) sequence designed for the efficient fluorometric detection of the potassium ion. *ChemBioChem*, 7, 1730-1737.
- [160] Nagatoishi S., Nojima T., Juskowiak B., Takenaka S. (2005) A pyrene-labeled G-quadruplex oligonucleotide as a fluorescent probe for potassium ion detection in biological applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 5067-5070.
- [161] Gaddes E. R., Lee D., Gydush G., Wang Y., Dong C. (2015) Regulation of fibrin-mediated tumor cell adhesion to the endothelium using anti-thrombin aptamer. *Exp Cell Res*, 339, 417-426.
- [162] Mergny J. L., Lacroix L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 13, 515-537.
- [163] Rachwal P. A., Fox K. R. (2007) Quadruplex melting. *Methods*, 43, 291-301.
- [164] Lane A. N., Chaires J. B., Gray R. D., Trent J. O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res*, 36, 5482-5515.
- [165] Smirnov I., Shafer R. H. (2000) Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability. *Biochemistry*, 39, 1462-1468.
- [166] Zhao X., Liu B., Yan J., Yuan Y., An L., Guan Y. (2014) Structure variations of TBA G-quadruplex induced by 2'-O-methyl nucleotide in K⁺ and Ca²⁺ environments. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46, 837-850.
- [167] Martin S. R., Schilstra M. J. (2008) Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol*, 84, 263-293.
- [168] Burge S., Parkinson G. N., Hazel P., Todd A. K., Neidle S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*, 34, 5402-5415.
- [169] Mergny J. L., Li J., Lacroix L., Amrane S., Chaires J. B. (2005) Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res*, 33, e138.
- [170] Patching S. G. (2014) Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 43-55.
- [171] Bates P. J., Laber D. A., Miller D. M., Thomas S. D., Trent J. O. (2009) Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol*, 86, 151-164.



- [172] Choi E. W., Nayak L. V., Bates P. J. (2010) Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, 38, 1623-1635.
- [173] Varizhuk A. M., Tsvetkov V. B., Tatarinova O. N., Kaluzhny D. N., Florentiev V. L., Timofeev E. N., Shchyolkina A. K., Borisova O. F., Smirnov I. P., Grokhovsky S. L., Aseychev A. V., Pozmogova G. E. (2013) Synthesis, characterization and in vitro activity of thrombin-binding DNA aptamers with triazole internucleotide linkages. *Eur J Med Chem*, 67, 90-97.
- [174] Agarwal T., Kumar S., Maiti S. (2011) Unlocking G-quadruplex: Effect of unlocked nucleic acid on G-quadruplex stability. *Biochimie*, 93, 1694-1700.
- [175] Yang X., Fennewald S., Luxon B. A., Aronson J., Herzog N. K., Gorenstein D. G. (1999) Aptamers containing thymidine 3'-O-phosphorodithioates: Synthesis and binding to nuclear factor- κ B. *Bioorg Med Chem Lett*, 9, 3357-3362.
- [176] Zandarashvili L., Nguyen D., Anderson Kurtis M., White, Mark A., Gorenstein, David G. and Iwahara, J. (2015) Entropic Enhancement of Protein-DNA Affinity by Oxygen-to-Sulfur Substitution in DNA Phosphate. *Biophys J*, 109, 1026-1037.



ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Finansowanie



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Praca została zrealizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM nr 2015/19/N/NZ5/02246 - *“Antykoagulacyjne i antyproliferacyjne właściwości nowych analogów aptameru wiążącego trombinę”* (kierownik projektu: Weronika Kotkowiak).

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiedzy

Praca zrealizowana dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji KNOW.

Załącznik 2. Curriculum vitae

WYKSZTAŁCENIE

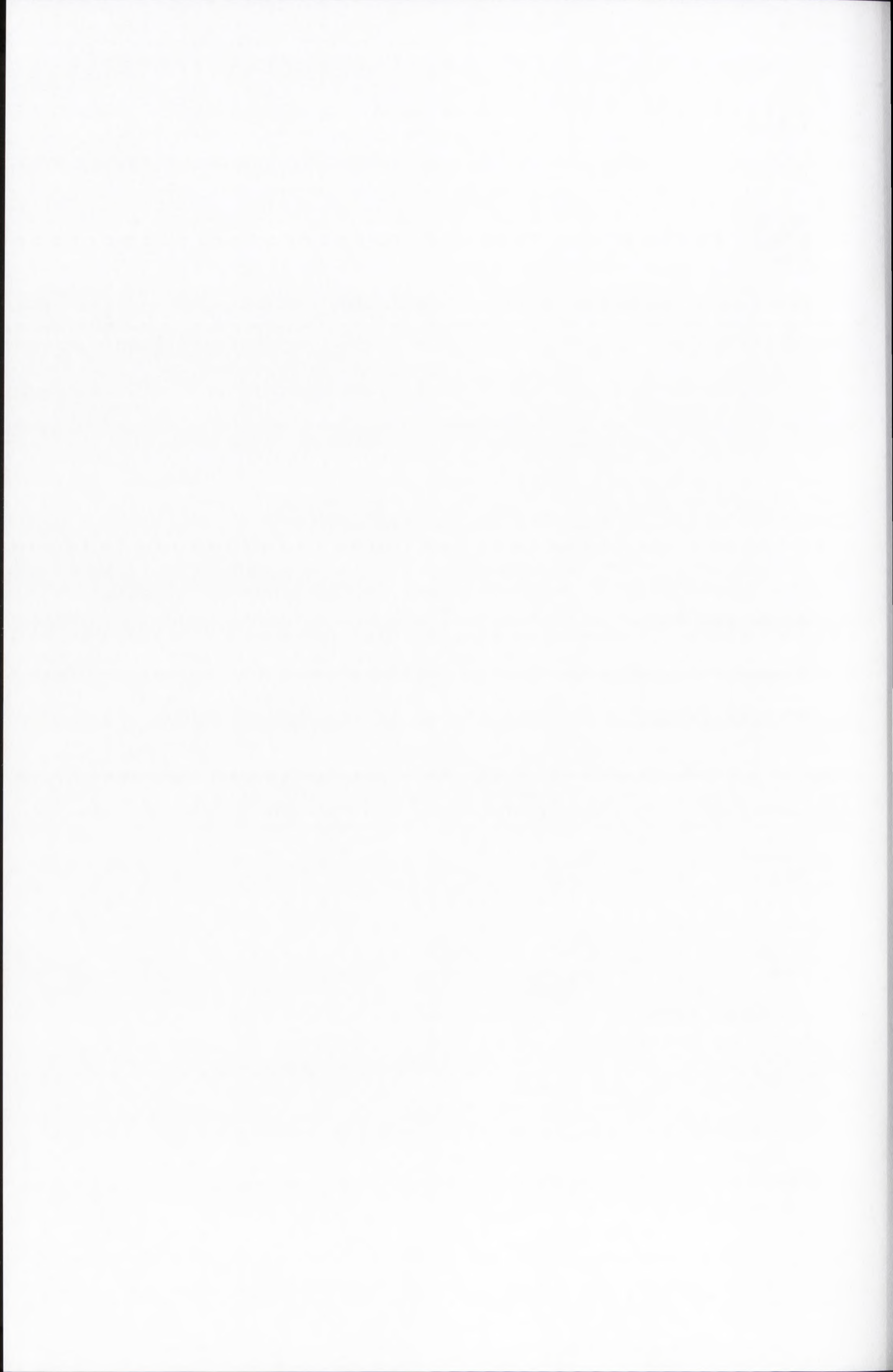
Jednostka: Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w
2011 – aktualnie Poznaniu
Zakład: Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych
Stanowisko: doktorant

Jednostka: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w
2006 – 2011 Poznaniu
Wydział: Wydział Lekarski II
Kierunek: Biotechnologia
Specjalność: Biotechnologia Medyczna
Tytuł: magister

DOŚWIADCZENIE

01.09.2011 – aktualnie Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych
Stanowisko: doktorant

01.09.2009–04.07.2011 Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Biologii RNA
Stanowisko: magistrant



STAŻE NAUKOWE

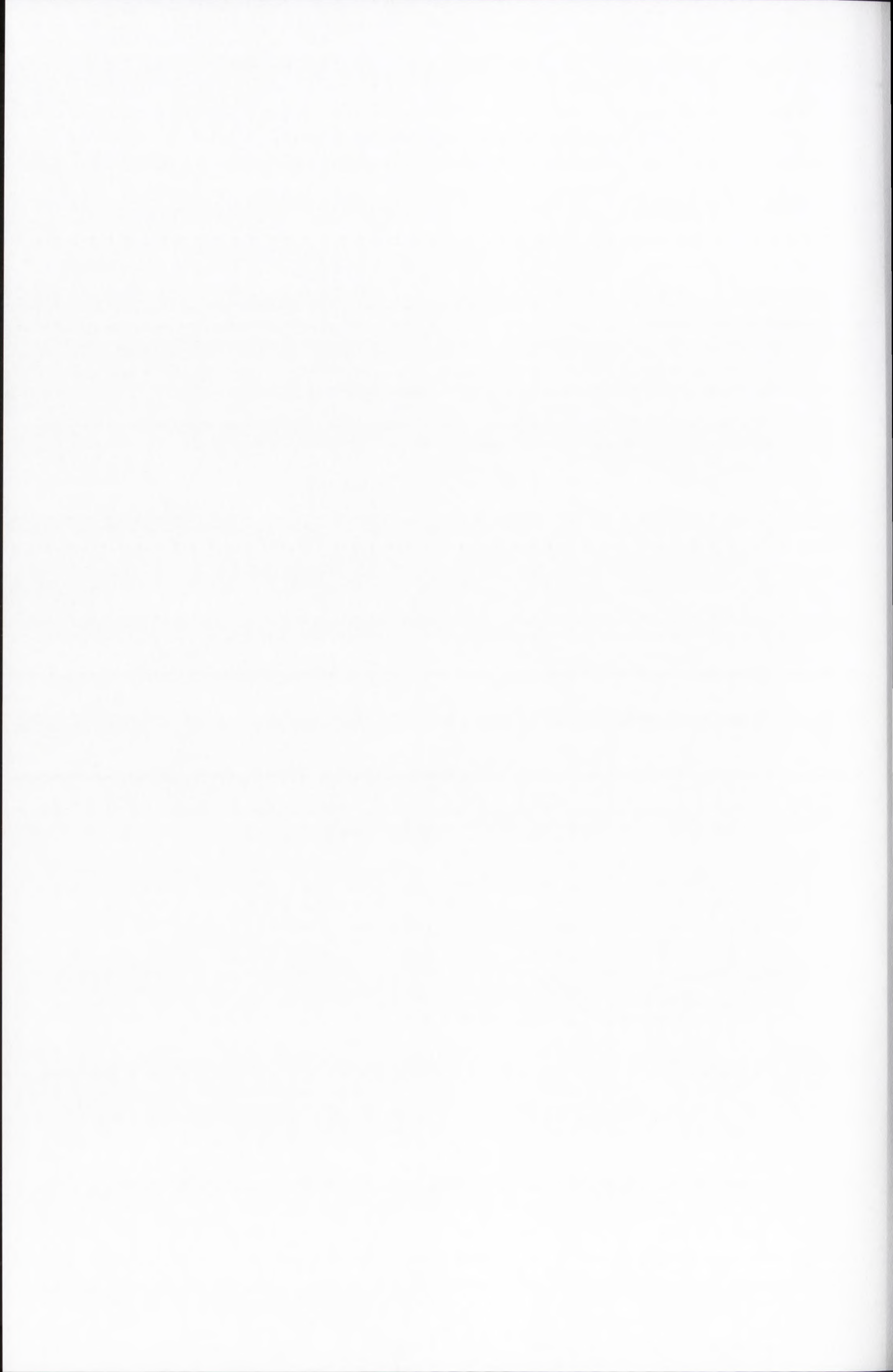
- 01.04.2016-31.05.2016 Dania, Odense, Uniwersytet Południowej Danii,
Wydział Fizyki, Chemii i Farmacji
- 14.04.2014-17.04.2014 Włochy, Triest, Międzynarodowe Centrum Inżynierii
Genetycznej i Biotechnologii,
międzynarodowe warsztaty naukowe "Workshop on RNA
Structure and Function"

GRANTY NAUKOWE

- "Nowe metody określania struktury drugorzędowej RNA, jako narzędzia badania aktywności biologicznej RNA" – projekt OPUS Narodowe Centrum Nauki (2011/03/B/NZ1/00576), **rola w projekcie: wykonawca.**
- "Modyfikowane pochodne chlorofili i ich hybrydowe koniugaty z RNA dla współczesnej fotomedycyny" – projekt PRELUDIUM Narodowe Centrum Nauki (2013/11/N/NZ7/00738), **rola w projekcie: wykonawca.**
- "Nowe 3,8-dipodstawione analogi nukleozydów purynowych o potencjalnym zastosowaniu w badaniach strukturalnych i aktywności biologicznej kwasów nukleinowych" – projekt SONATA Narodowe Centrum Nauki (2012/05/D/ST5/03599), **rola w projekcie: wykonawca.**
- "Termodynamiczne podstawy projektowania optymalnych funkcjonalnie, modyfikowanych siRNA oraz ich eksperymentalna weryfikacja" – projekt SONATA BIS 3 Narodowe Centrum Nauki (2013/10/E/NZ1/00741), **rola w projekcie: wykonawca.**
- "Zastosowanie 5'-trójfosforanów-2'-azydo-2'-deoksynukleozydów w badaniu struktury drugorzędowej RNA" – projekt badawczy służący rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2015 (Działalność statutowa - finansowanie MNiSW), **rola w projekcie: kierownik.**
- "Antykoagulacyjne i antyproliferacyjne właściwości nowych analogów aptameru wiążącego trombinę" – projekt PRELUDIUM Narodowe centrum Nauki (2015/19/N/NZ5/02246), **rola w projekcie: kierownik.**

PUBLIKACJE

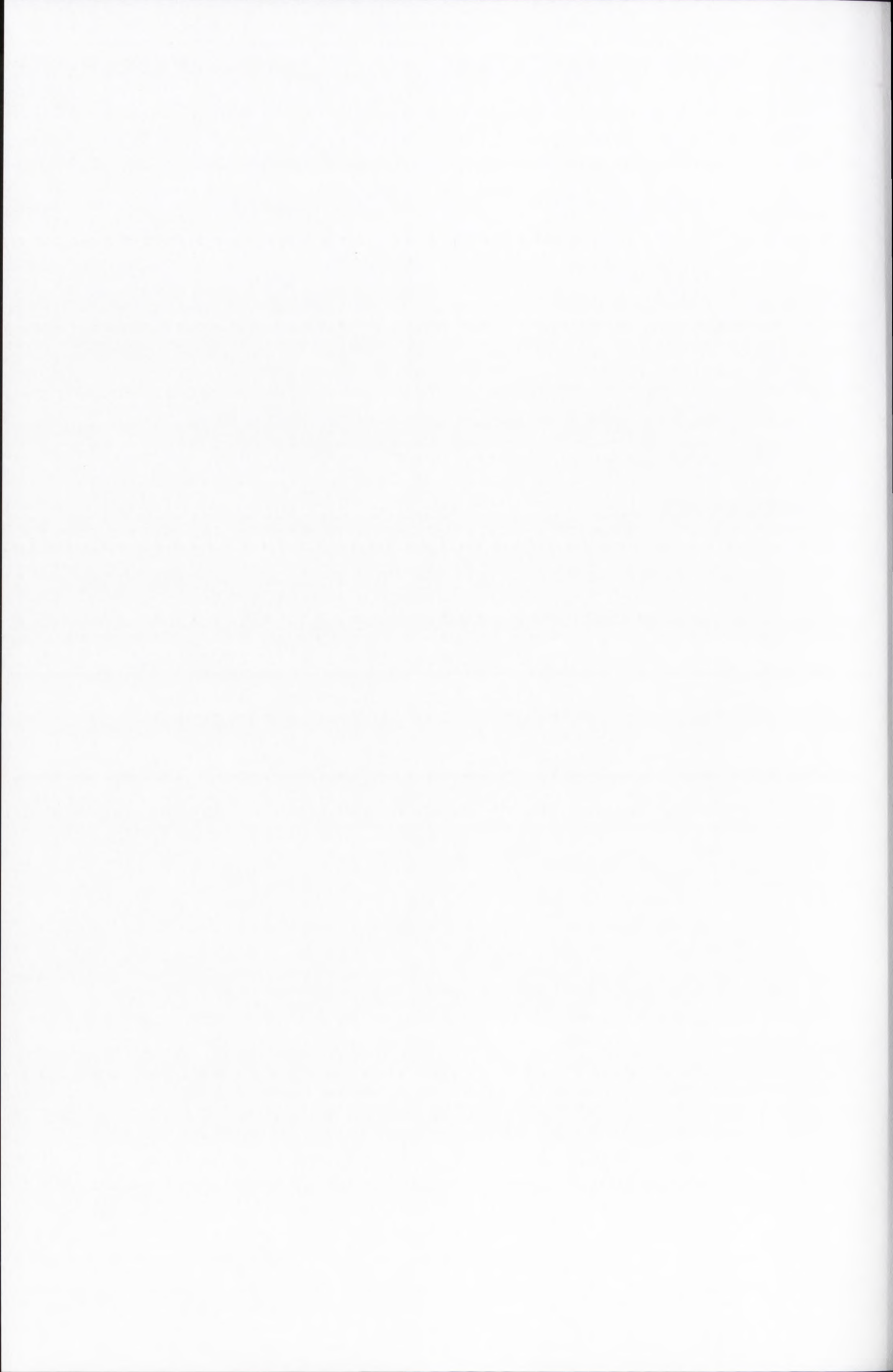
1. **Kawecka W.**, Kierzek R. (2013) New methods for the determination of RNA secondary structure – preliminary results, *Biotechnologia*, 94(1), 78.
2. **Kotkowiak W.**, Szabat M., Kierzek R. (2013) RNA secondary structure and methods for its determination, in: "Na pograniczu chemii i biologii", H. Koroniak, J. Barciszewski (red.), Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznan, 243-280.
3. **Kotkowiak W.**, Kotkowiak M., Kierzek R., Pasternak A. (2014) Unlocked nucleic acids: implications of increased conformational flexibility for RNA/DNA triplex formation. *Biochem J.*, 464(2), 203-11.



4. Gurda D., Handschuh L., **Kotkowiak W.**, Jakubowski H. (2015) Homocysteine and its metabolites induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids*, 47(7), 1319-39.
5. Baranowski D., **Kotkowiak W.**, Kierzek R., Pasternak A. (2015) Hybridization properties of RNA containing 8-methoxyguanosine and 8-benzyloxyguanosine. *PLoS One*, 10(9), e0137674.
6. **Kotkowiak W.**, Pasternak A., Kierzek R. (2016) Studies on Transcriptional Incorporation of 5'-N-Triphosphates of 5'-Amino-5'-Deoxyribonucleosides. *PLoS One*, 11(2), e0148282.
7. Szabat M., Gudanis D., **Kotkowiak W.**, Gdaniec Z., Kierzek R., Pasternak A. (2016) Thermodynamic features of structural motifs formed by β -L-RNA. *PLoS One*, 11(2), e0149478.

KONFERENCJE

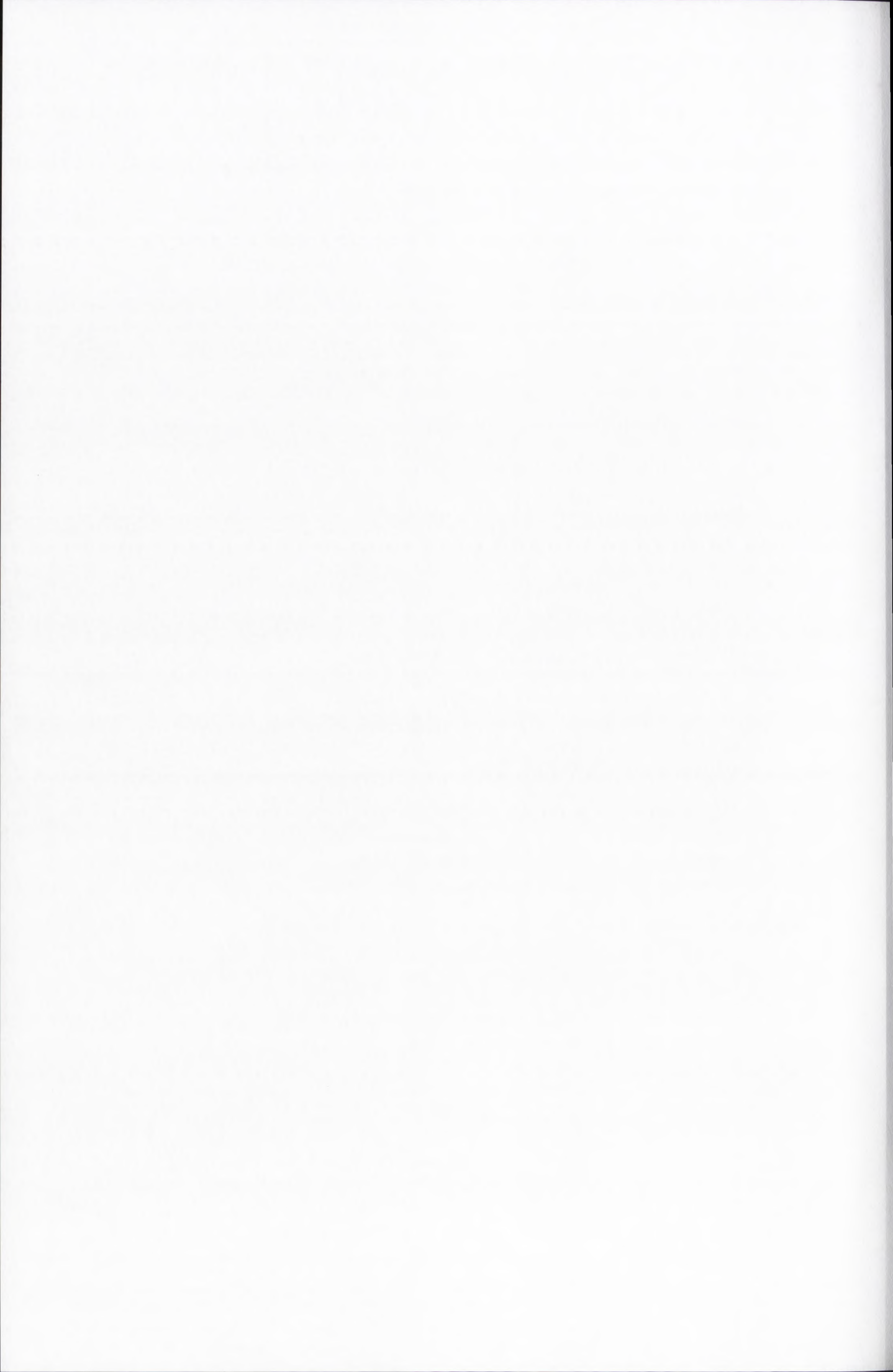
- "The determination of changes in gene expression induced by homocysteine thiolactone as a tool for searching for cardiovascular diseases biomarkers" Gurda D., Handschuh L., **Kawecka W.**, Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski H. II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, 05-09.09.2011, Kraków
- "Searching for cardiovascular diseases biomarkers by human transcriptome analysis" Gurda D., Handschuh L., **Kawecka W.**, Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski H. IV Kongres Biotechnologii i konferencja EUROBIOTECH 2011, 12-15.10.2011, Kraków
- "Molecular mechanism of cardiovascular diseases development on the basis of human transcriptome analysis" Gurda D., Handschuh L., **Kawecka W.**, Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski H. Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11-14.09.2012, Poznań
- "New methods for determining the secondary structure of RNA" **Kotkowiak W.**, Kierzek R. International Conference STRUCTURAL BIOLOGY OF PLANTS AND MICROBES, 15.05.2013, Poznań
- "New methods for determining the secondary structure of RNA" **Kotkowiak W.**, Kierzek R. Theoretical Course "RNA Structure and Function", 14-17.04.2014, Trieste
- "Unlocked nucleic acids – the implications of increased conformational flexibility for triplex formation" **Kotkowiak W.**, Kotkowiak M., Kierzek R., Pasternak A. XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Chemical Biology of Nucleic Acids, 24-28.08.2014, Poznań



- “*Unlocked nucleic acids – the implications of increased conformational flexibility for triplex formation*” **Kotkowiak W.**, Kotkowiak M., Kierzek R., Pasternak A. International Conference Multidisciplinary Approach to Structural Biology. From Macromolecules to Cells, 6-7.03.2015, Poznań
- “*Thermodynamic, structural and biological features of thrombin binding aptamer modified with novel UNA derivative*” **Kotkowiak W.**, Kierzek R., Pasternak A. 5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids, 26-28.05.2015, Talence
- “*Hybridization properties of RNA containing 8-methoxyguanosine and 8-benzyloxyguanosine*” Baranowski D., **Kotkowiak W.**, Kierzek R., Pasternak A. 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2015), 23-25.09.2015, Himeji
- “*Thermodynamic, structural and biological features of thrombin binding aptamer modified with RNA 4-thiouridine and novel UNA derivative*” **Kotkowiak W.**, Kierzek R., Pasternak A. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 11-14.10.2015, Leiden
- “*Zastosowanie 5'-trójfosforanów-2'-azydo-2'-deoksynukleozydów w badaniu struktury drugorzędowej RNA*” **Kotkowiak W.**, Zarębska Ż., Kierzek R. I. Wielkopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2015, 05.12.2015, Poznań
- “*A New Class of Hybrid Conjugates as Potential Agents for Photodynamic Therapy and Diagnosis of Cancer*” **Kotkowiak W.**, Kotkowiak M., Pasternak A., Dudkowiak A., Kierzek R. 7th International Conference on Drug Discovery and Therapy, 15-18.02.2016, Dubaj
- “*Thermodynamic, structural and biological features of thrombin binding aptamer modified with RNA 4-thiouridine and novel UNA derivative*” **Kotkowiak W.**, Kierzek R., Pasternak A. Zebranie Plenarne Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN, 07.04.2016, Poznań

NAGRODY

2016	Stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk za wybitne osiągnięcia
2016	Stypendium KNOW na odbycie krótkoterminowego stażu szkoleniowo-badawczego
2015	Stypendium KNOW na udział w krajowej lub zagranicznej konferencji naukowej
2014-2015	Stypendium naukowe dla najlepszych doktorantów, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu



2011	Wyróżnienie Dziekana Wydziału Lekarskiego II za bardzo dobre wyniki w nauce oraz najlepszą pracę magisterską, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
2009-2011	Stypendium naukowe, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Załącznik 3. Plyta CD

Pliki CD1 – CD7

Widma dichroizmu kołowego dla wariantów TBA zawierających pojedyncze oraz wielokrotne podstawienie resztami adenozyiny, cytydyny, guanozyiny i urydyny w serii UNA (plik CD1), resztami 4-tiourydyny w serii RNA (plik CD2) lub UNA (plik CD3), resztami izoguanozyny w serii RNA (plik CD4) lub UNA (plik CD5) oraz równoczesną substytucję resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii RNA (plik CD6) lub UNA (plik CD7). Pliki wygenerowane przy użyciu programu OriginPro 8.

Pliki TDS1 – TDS7

Różnicowe widma temperaturowe dla wariantów TBA zawierających pojedyncze oraz wielokrotne podstawienie resztami adenozyiny, cytydyny, guanozyiny i urydyny w serii UNA (plik TDS1), resztami 4-tiourydyny w serii RNA (plik TDS2) lub UNA (plik TDS3), resztami izoguanozyny w serii RNA (plik TDS4) lub UNA (plik TDS5) oraz równoczesną substytucję resztami 4-tiourydyny i izoguanozyny w serii RNA (plik TDS6) lub UNA (plik TDS7). Pliki wygenerowane przy użyciu programu OriginPro 8.

Pliki RE1 – RE2

Radiogramy rozdziałów elektroforetycznych wariantów zawierających pojedynczą substytucję resztami adenozyiny, cytydyny, guanozyiny i 4-tiourydyny w serii UNA (plik RE1) oraz wielokrotne podstawienie resztami 4-tiourydyny w serii RNA (plik RE 2) po inkubacji w osoczu krwi ludzkiej. Pliki wygenerowane przy użyciu programu Mutli Gauge V3.0.

