

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu

Marta Szabat

**Badania termodynamiczne, strukturalne
i biologiczne niekanonicznych form DNA
i RNA**

Praca doktorska została wykonana
w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej
Kwasów Nukleinowych

Promotor:
Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

POZNAŃ 2017

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi
za powierzenie mi tematu pracy doktorskiej,
za wszelką pomoc, cierpliwość,
cenne wskazówki i wyrozumiałość
przy realizacji i redagowaniu niniejszej pracy.*

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować **Mojemu Mężowi Tomkowi i Moim Rodzicom**,
dzięki którym miałam możliwość zdobywać cenną wiedzę
i rozwijać swoje zainteresowania,
którzy stale mnie mobilizowali i wspierali.*

*Serdecznie dziękuje Koleżankom –
Annie Pasternak i Jolancie Lisowiec-Wąchnickiej
za niezliczone dyskusje i okazaną pomoc,
oraz wsparcie przy realizacji niniejszej pracy.*

*Szczególnie dziękuje Kolegom –
Tomaszowi Czapikowi i Michałowi Gładyszowi
za wspaniałą atmosferę naukową (i nie tylko),
za niezliczone dyskusje i pomoc,
oraz wsparcie w chwilach zwątpienia.*

*Serdecznie dziękuje Koleżankom z Zakładu Biologii i
Chemii Kwasów Nukleinowych, Zakładu Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych,
oraz Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA za wszelką pomoc i miłą atmosferę pracy.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	10
I. CEL PRACY.....	12
II. STRESZCZENIE	16
III. ABSTRACT.....	20
IV. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	23
1. Wstęp.....	23
2. Oligonukleotydy DNA i RNA jako skuteczne narzędzia molekularne	24
3. Strategia oparta na antysensowych oligonukleotydach (ASO)	25
4. Strategia oparta na katalitycznych kwasach nukleinowych (rybozymach i deoksyrybozymach).....	28
5. Strategia oparta na aptamerach	30
6. Strategia oparta na zjawisku interferencji RNA.....	33
7. Strategia oparta na systemie CRISPR-Cas	37
8. Strategia antygenowa w oparciu o struktury trójniciowe	40
8.1 Struktury trójniciowe DNA (H-DNA) oraz ich występowanie	41
8.2 Charakterystyka struktur trójniciowych DNA i RNA.....	44
8.3 Modyfikacje chemiczne wpływające na stabilność struktur trójniciowych DNA i RNA	47
8.4 Przykłady zastosowania struktur trójniciowych DNA i RNA.....	58
9. Równoległe dupлекsy DNA i RNA	61
9.1 Charakterystyka równoległych dupлексов DNA i RNA oraz ich występowanie ...	62
9.2 Modyfikacje chemiczne wpływające na stabilność struktur równoległych dupлексов DNA i RNA.....	66
9.3 Przykłady zastosowania struktur równoległych dupлексов DNA i RNA.....	70
V. WYNIKI I DYSKUSJA.....	73
1. Struktury trójniciowe RNA.....	73
1.1 Warianty trypleksów RNA.....	73
1.2 Badania trwałości termodynamicznej wariantów trypleksów RNA	76
1.2.1 Wpływ modyfikacji chemicznych LNA i 2-thiouracydyny na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA	78
1.2.2 Wpływ zmiany enancjomeru D-rybozy na L-rybozę na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA	84
1.3 Badanie zmian strukturalnych wariantów trypleksów RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego	87
1.4 Badanie zdolności wiązania się oligorybonukleotydów TFO do spinki RHP.....	89
1.5 Badanie stałej dysocjacji wybranych wariantów trypleksów RNA	94

1.6	Badanie wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na ekspresję genu <i>GFP</i> w linii komórkowej HeLa.....	98
1.6.1	Ocena ilościowa wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na ekspresję genu <i>GFP</i>	100
1.6.2	Ocena ilościowa wpływu trypleksu typu RNA/PNA na ekspresję genu <i>GFP</i>	103
2.	Równoległe duplekisy DNA i RNA.....	106
2.1	Równoległe duplekisy DNA i RNA.....	106
2.2	Badania trwałości termodynamicznej wariantów dupleksów DNA i RNA.....	108
2.2.1	Trwałość termodynamiczna dupleksów typu DNA.....	113
2.2.2	Trwałość termodynamiczna dupleksów typu RNA.....	117
2.2.3	Trwałość termodynamiczna dupleksów typu 2'-O-MeRNA.....	122
2.2.4	Trwałość termodynamiczna heterochiralnych dupleksów RNA.....	126
2.3	Badanie zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego.....	131
2.4	Badanie zmian strukturalnych heterochiralnych dupleksów RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego.....	134
2.5	Badanie charakteru wiązań wodorowych heterochiralnych dupleksów RNA metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.....	136
2.6	Badanie zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA metodą spektroskopii fluorescencyjnej.....	141
2.7	Badanie zmian strukturalnych dupleksów DNA i RNA w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa metodą spektroskopii fluorescencyjnej.....	149
VI.	PODSUMOWANIE.....	153
VII.	MATERIAŁY I METODY.....	156
1.	Materiały.....	156
1.1	Odczynniki.....	156
1.2	Enzymy.....	157
1.3	Plazmid.....	157
1.4	Linia komórkowa.....	157
1.5	Gotowe zestawy do badań.....	157
1.6	Szczepy bakteryjne.....	157
1.7	Wzorce długości kwasów nukleinowych.....	157
1.8	Roztwory i bufony.....	158
1.9	Żele.....	161
1.10	Pożywki.....	161
1.11	Oligonukleotydy.....	163
1.12	Aparatura stosowana podczas prowadzenia badań.....	166
1.13	Programy stosowane podczas prowadzenia badań.....	166
1.14	Akcesoria dodatkowe.....	167
2.	Metody.....	167

2.1	Synteza chemiczna oligonukleotydów	167
2.2	Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów i oligonukleotydów zawierających nukleotydy w serii LNA lub 5(6)-FAM na końcu 5' oraz oligonukleotydów w serii 2'-O-MeRNA	168
2.3	Odblokowanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów oraz oligorybonukleotydów zawierających nukleotydy w serii LNA lub 5(6)-FAM na końcu 5'	169
2.4	Odblokowanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów zawierających reszty 2-tiourydyny	170
2.5	Odblokowanie oligonukleotydów zawierających aminolinker na końcu 5'	172
2.6	Znakowanie oligonukleotydów zawierających aminolinker na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym TAMRA oraz ich oczyszczanie	173
2.7	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	174
2.8	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących	174
2.9	Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym	174
2.10	Pomiar trwałości termodynamicznej badanych oligonukleotydów z użyciem metody topnienia UV	175
2.11	Pomiar widm dichroizmu kołowego	175
2.12	Pomiar widm fluorescencyjnych	176
2.13	Pomiar widm magnetycznego rezonansu jądrowego (¹ H NMR)	176
2.14	Badanie zdolności wiązania się oligorybonukleotydów TFO do spinki RNA	177
2.15	Pomiar stałej dysocjacji oligomer TFO – spinka RNA	177
2.16	Konstrukcja insertów	178
2.17	Trawienie restrykcyjne	179
2.18	Ligacja	179
2.19	Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> DH5α	180
2.20	Izolacja plazmidów zawierających insert	180
2.21	Rozmrażanie komórek HeLa	181
2.22	Hodowla komórek HeLa	181
2.23	Pasaż komórek HeLa na płytkę 24 dołkową	181
2.24	Transfekcja komórek HeLa	182
2.25	Mrożenie komórek HeLa	182
2.26	Izolacja ekstraktów cytoplazmatycznych z komórek HeLa	183
2.27	Izolacja całkowitego RNA z komórek HeLa	183
2.28	Analiza ilościowa poziomu ekspresji genu <i>GFP</i> w oparciu o reakcje qPCR	184
VIII.	BIBLIOGRAFIA	186
IX.	ZAŁĄCZNIKI	203

WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ASO	antysensowe oligonukleotydy (ang. <i>antisense oligonucleotides</i>)
CD	dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i>)
CRISPR-Cas	system obrony organizmów prokariotycznych przed obcymi elementami genetycznymi (ang. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated</i>)
EMSA	test opóźnionej migracji w żelu (ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
5(6)-FAM	5(6)-karboksylfluoresceina (ang. <i>5(6)-carboxyfluorescein</i>)
FRET	Försterowskie/fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (ang. <i>Förster/fluorescence resonance energy transfer</i>)
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescence protein</i>)
¹ H NMR	jednowymiarowe protonowe widmo magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>proton nuclear magnetic resonance spectrum</i>)
LNA	kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (ang. <i>locked nucleic acids</i>)
MES	kwas 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfonowy (ang. <i>2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid</i>)
miRNA	małe niekodujące RNA(ang. <i>microRNA</i>)
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotriazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu (sól tetrazolowa)
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PNA	peptydowe kwasy nukleinowe (ang. <i>peptide nucleic acids</i>)
ppm	części na milion (ang. <i>parts per milion</i>)
qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. <i>quantitativepolymerase chain reaction</i>)
RISC	kompleks rybonukleoproteinowy biorący udział w wyciszaniu ekspresji (ang. <i>RNA induced silencing complex</i>)
RNAi	interferencja RNA (ang. <i>RNA interference</i>)
rpm	obroty na minutę (ang. <i>rotations per minute</i>)
rtPCR	łańcuchowa reakcja polimeryzacji w czasie rzeczywistym (ang. <i>real time polymerase chain reaction</i>)
SELEX	selekcja <i>in vitro</i> (ang. <i>systematic evolution of ligands by expotential enrichment</i>)

WYKAZ SKRÓTÓW

shRNA	krótkie RNA w kształcie spinki do włosów (ang. <i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	krótkie interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
TAMRA	6-karboksytetrametylorodamina (ang. <i>6-carboxytetramethylrhodamine</i>)
TFO	oligonukleotyd tworzący trypleks (ang. <i>triplex forming oligonucleotide</i>)
tRNA	transportujący RNA (ang. <i>transport RNA</i>)

I. CEL PRACY

Dominującą dwuniciową formą struktury kwasów nukleinowych jest prawoskrętna helisa. W określonych warunkach dwuniciowy DNA i RNA może przybierać niekanoniczne formy, zarówno prawoskrętne (np. A-DNA), jak i lewoskrętne (Z-DNA czy Z-RNA). Poza tym, w RNA fragmenty dwuniciowe są krótkie i rozdzielone przez różnego typu motywy strukturalne, takie jak: spinka do włosów, symetryczne i niesymetryczne wybrzuszenia jedno- lub dwustronne, pętle wewnętrzne. Wykazano także, że w warunkach *in vivo* DNA i RNA mogą występować w postaci struktur wyższego rzędu. Naturalnie występujące rejony homopurynowo-homopirymidynowe mogą przyjmować strukturę trójniciową (H-DNA). Wiadomo, że takie sekwencje są często zlokalizowane w regionach promotorowych oraz kodujących w genomach organizmów eukariotycznych. W związku z tym, trypleksy mogą pełnić ważne funkcje biologiczne w komórce, na przykład uczestniczą w hamowaniu replikacji, czy w regulacji ekspresji genów. Dupleksy o równoległej orientacji nici również należą do niekanonicznych form kwasów nukleinowych, które mogą występować naturalnie w różnych genomach. Struktury te powstają przez oddziaływania dwóch nici: homopurynowej i homopirymidynowej, a ich stabilność jest determinowana głównie przez rodzaj sekwencji, warunki pH oraz obecność modyfikacji chemicznych. Wiadomo, że zróżnicowanie strukturalne kwasów nukleinowych odgrywa istotną rolę zarówno w ich metabolizmie, jak i regulacji ekspresji genów. W tym kontekście poznanie struktury DNA i RNA oraz zrozumienie ich udziału w procesach komórkowych wydaje się mieć kluczowe znaczenie. W dalszej perspektywie daje to możliwość rozwoju nowych strategii terapeutycznych i diagnostycznych, a także zrozumienia podłoża molekularnego wielu chorób genetycznych. Zdobyta wiedza dotycząca mechanizmów powstawania takich schorzeń umożliwi zaprojektowanie leków, które pozwolą zapobiec ich rozwojowi. Mając na uwadze powyższe informacje, w pracy doktorskiej podjęto badania niekanonicznych form DNA i RNA, tj. struktur trójniciowych (trypleksów) i dupleksów o równoległej orientacji nici (5'-3'/5'-3').

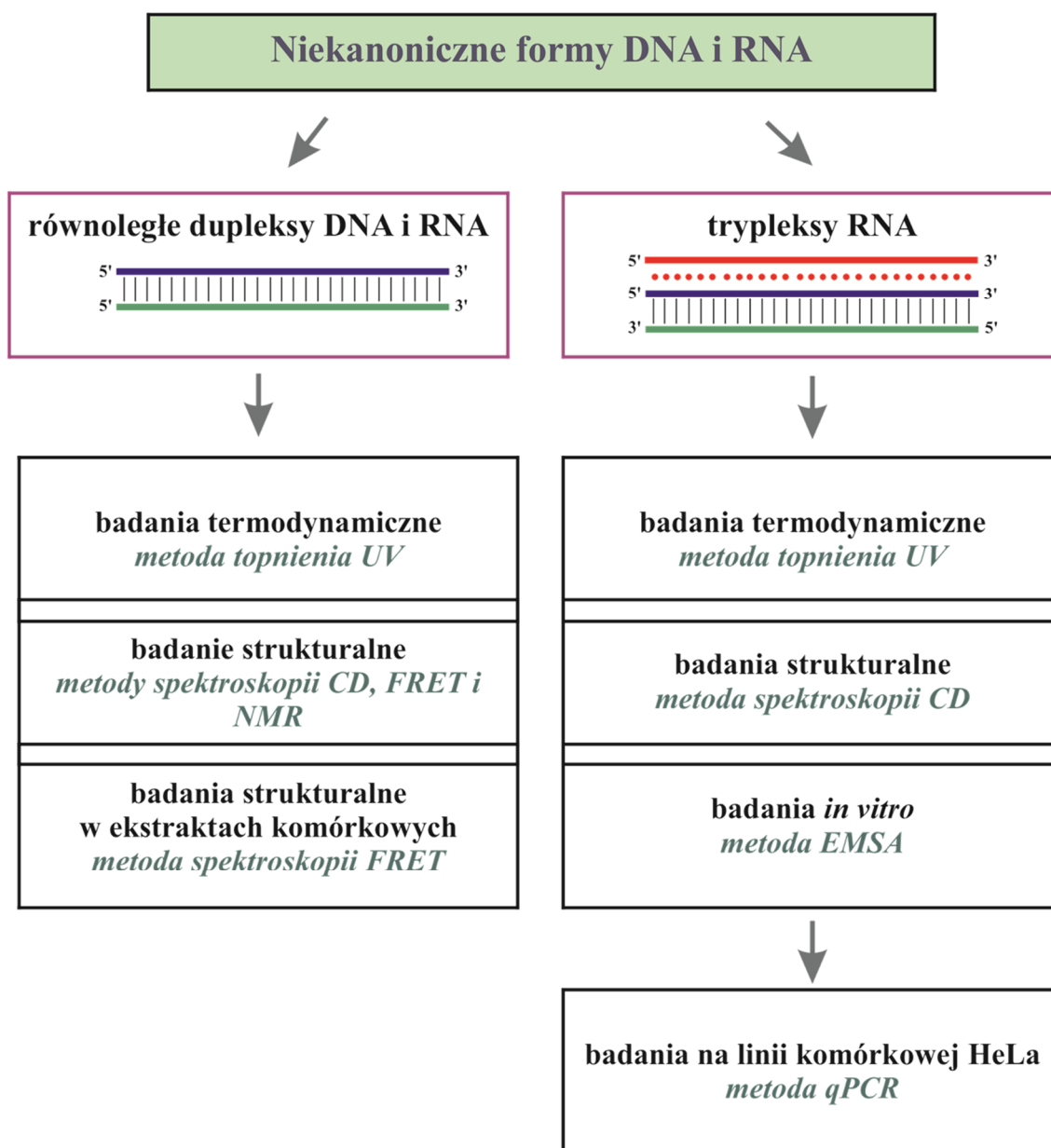
Głównym celem niniejszej pracy były badania termodynamiczne, strukturalne oraz badania *in vitro* trypleksów RNA i równoległych dupleksów DNA i RNA, a także badania trypleksów RNA z wykorzystaniem linii komórkowej.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przebiegały dwutorowo, tzn. równolegle prowadzono badania trypleksów RNA oraz niekanonicznych równoległych dupleksów DNA i RNA (Rys. 1). W związku z powyższym, wyznaczono cele szczegółowe pracy doktorskiej, które obejmowały:

- określenie wpływu modyfikacji chemicznych 2'-O-MeRNA, LNA i 2-tiourydyny oraz L-rybonukleotydów na stabilność termodynamiczną oraz zmiany topologii strukturalnej homo- i heterodupleksów DNA i RNA,
- określenie wpływu wielokrotnego podstawienia resztami LNA i 2-tiourydyny oraz L-rybonukleotydów na stabilność termodynamiczną, zmiany strukturalne, zdolność oddziaływania oraz wartość stałej dysocjacji trypleksów RNA,
- określenie wpływu obecności innych biomolekuł znajdujących się w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa na powstawanie homo- i heterodupleksów DNA i RNA,
- określenie wpływu trypleksów RNA na ekspresję genu *GFP* w linii komórkowej HeLa.

W pierwszym etapie pracy doktorskiej określono parametry termodynamiczne zarówno trypleksów RNA zawierających wielokrotne podstawienia resztami typu LNA i 2-tiourydyny oraz reszty L-rybonukleotydów, jak również dupleksów w serii DNA, RNA i 2'-O-MeRNA posiadających pochodne typu LNA i 2-tiourydynę oraz reszty L-rybonukleotydów.

W dalszej części badań przeprowadzono analizę strukturalną, aby prześledzić zmiany topologii wszystkich badanych cząsteczek. W tym celu wykorzystano trzy metody spektroskopowe: dichroizm kołowy (CD), Försterowskie/fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (FRET) i spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Dwie ostatnie metody były pomocne w określeniu typu oddziaływań występujących w strukturach homo- i heterodupleksów DNA i RNA oraz heterochiralnych dupleksów.



Rysunek 1. Schemat badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Kolejnym zadaniem było przeprowadzenie eksperymentów biologicznych, w celu określenia zdolności do oddziaływania oligonukleotydów tworzących trypleksy (TFO) ze spinką RNA oraz wyznaczenie stałych wiązania TFO-spinka RNA.

Na podstawie otrzymanych danych termodynamicznych i strukturalnych, a także wyników badań biologicznych w ostatnim etapie realizacji pracy doktorskiej sprawdzono, czy wybrane warianty trypleksów RNA mogą wpływać na regulację ekspresji reporterowego genu *GFP* w linii komórkowej HeLa.

W rozprawie doktorskiej wykazano, że powstawanie niekanonicznych form DNA i RNA jest możliwe w określonych warunkach, a ich stabilność termodynamiczną i

biologiczną determinują czynniki, takie jak: rodzaj sekwencji (homopurynowa lub homopirymidynowa), obecność modyfikacji chemicznych, obecność innych cząsteczek, a także warunki pH.

Połączenie chemii syntetycznej, termodynamicznej analizy topnienia UV, dichroizmu kołowego, spektroskopii fluorescencyjnej oraz metod hodowli komórkowej pozwoliło uzyskać globalny obraz formowania się niekanonicznych struktur DNA i RNA, tj. trypleksów RNA oraz równoległych dupleksów DNA i RNA.

II. STRESZCZENIE

W DNA występują głównie dwuniciowe fragmenty helikalne, a prawoskrętna forma B-DNA jest najczęściej spotykaną formą strukturalną. W przypadku RNA, odcinki dwuniciowe są zwykle krótkie (zawierają 5-8 par zasad) i występują w nich różnego typu motywy strukturalne, takie jak: spinka do włosów, symetryczne i niesymetryczne wybrzuszenia jedno- lub dwustronne, pętle wewnętrzne, niesparowane końce. Polimorfizm strukturalny kwasów nukleinowych sprawia, że mogą one przybierać różnorodne formy w zależności od kontekstu sekwencyjnego, warunków środowiska, obecności innych cząsteczek i/lub modyfikacji chemicznych. Przykładami niekanonicznych form DNA i RNA są dupleksy o równoległej orientacji nici, struktury trójniciowe nazywane trypleksami czy struktury czteroniciowe zwane kwadrupleksami.

Tworzenie struktury trypleksu w warunkach *in vivo* zostało dobrze udokumentowane i jest determinowane występowaniem odpowiednio długich ciągów nici homopurynowo-homopirymidynowych. Powstawanie takich form jest wynikiem zmian konformacyjnych zachodzących w duplesie, w wyniku, których możliwe jest przyłączenie trzeciej nici oligonukleotydowej w bruzdzie większej helisy. Łańcuch RNA lub DNA zdolny do specyficznego wiązania się z podwójną helisą jest określany mianem oligonukleotydu tworzącego trypleks (TFO). Wykazano, że wymuszenie tworzenia tych niekanonicznych form poprzez wprowadzenie do komórki syntetycznych oligonukleotydów TFO, komplementarnych do docelowej sekwencji może znaleźć zastosowanie w biologii molekularnej, jak również w diagnostyce lub terapii.

Potwierdzono również występowanie w warunkach naturalnych dupleksów DNA i RNA o równoległej polarności nici ($5'-3'/5'-3'$). Zaobserwowano, że równoległe odcinki kwasów nukleinowych występują w określonych regionach chromosomów oraz zidentyfikowano je w genomach różnych organizmów. Stwierdzono, że równoległe dupleksy mogą odgrywać kluczową rolę w różnorodnych procesach biologicznych wewnątrz komórki, na przykład regulacji ekspresji genów. Ponadto, takie struktury charakteryzują się specyficznymi właściwościami w porównaniu z kanonicznymi dupleksami, m.in.: odmiennym systemem hybrydyzacji (specyficznym dla sekwencji), dużą wrażliwością na zmiany środowiska, a także zwiększoną odpornością na degradację enzymatyczną w środowisku komórkowym. Dlatego stanowią one

interesujący obiekt badawczy z uwagi na ich potencjalne zastosowanie w biologii molekularnej, biomedycynie i terapii oligonukleotydowej. Obecna wiedza o właściwościach strukturalnych kwasów nukleinowych stanowi podstawę do projektowania i opracowywania strategii opartych na oligonukleotydach.

W rozprawie doktorskiej przedstawiono badania dotyczące powstawania niekanonicznych form kwasów nukleinowych oraz ich stabilności. Ponieważ badania realizowane w trakcie doktoratu przebiegały dwutorowo, postanowiono podzielić je na dwie główne części pod względem przedmiotu badawczego i stosowanej metodologii, a mianowicie dotyczące: trypleksów RNA oraz równoległych dupleksów DNA i RNA. Niektóre z metod wykorzystane w badaniach obu struktur były takie same, to znaczy, w obu przypadkach parametry termodynamiczne wyznaczono metodą topnienia UV a analizę strukturalną wykonano za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Dodatkowo, w badaniach strukturalnych równoległych dupleksów DNA i RNA wykorzystano technikę spektroskopii fluorescencyjnej (zjawisko FRET) oraz spektroskopię NMR. Natomiast, badania biologiczne dotyczące trypleksów RNA zrealizowano przy zastosowaniu testu opóźnionej migracji w żelu (EMSA) oraz z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa i metody ilościowego PCR (qPCR).

W pierwszym etapie pracy doktorskiej zaprojektowano oraz przygotowano niemodyfikowane i modyfikowane oligonukleotydy służące, jako modelowe cząsteczki do zaplanowanych badań. Następnie, w badaniach temperatur topnienia wyznaczono parametry termodynamiczne trypleksów RNA zawierających wielokrotne podstawienia resztami LNA i 2-tiourydyny, a także wariantów z resztami L-rybonukleotydów. Równoległe, w eksperymentach topnienia UV określono również wpływ podstawienia resztami LNA, 2-tiourydyny i 2'-O-MeRNA oraz L-enancjomeru RNA na stabilność termodynamiczną dupleksów DNA i RNA. Przeprowadzone badania dostarczyły szczegółowych informacji na temat wpływu różnych modyfikacji chemicznych na trwałość termodynamiczną trypleksów RNA oraz dupleksów DNA i RNA. Stwierdzono, że wprowadzenie reszt LNA, 2'-O-MeRNA i 2-tiourydyny korzystnie wpływa na stabilność badanych struktur, podczas gdy obecność reszty L-rybozy powoduje efekt destabilizacyjny.

Kolejnym zadaniem było wykonanie widm CD w celu określenia zmian strukturalnych badanych trypleksów RNA oraz dupleksów DNA i RNA. Dodatkowo, pomiary fluorescencyjne dostarczyły informacji o polarności nici badanych dupleksów DNA i RNA. Na tej podstawie wykazano, że równoległe dupleksy w serii DNA, RNA i

2'-O-MeRNA tworzą się w zależności od warunków środowiska. Innymi słowy, struktury dwuniciowe o orientacji nici 5'-3'/5'-3' są preferowaną formą w warunkach kwasowych, podczas gdy w obojętnym pH nie wszystkie warianty dupleksów mają równoległą polarność nici. Natomiast, analiza NMR umożliwiła określenie wpływu zastąpienia naturalnej reszty rybozy jej L-enancjomerem na strukturę heterochiralnych dupleksów. Wykazano, że dwa oligonukleotydy zawierające reszty rybozy będące lustrzanymi odbiciami (L- i D-enancjomery) mogą ze sobą oddziaływać i tworzyć strukturę dupleksu.

W dalszej części niniejszej pracy wykonano badania zdolności oddziaływania oligomerów TFO ze spinką RNA, w celu oceny wpływu modyfikacji chemicznych i warunków pH na stabilność badanych trypleksów RNA. Informacje uzyskane na tym etapie pozwoliły wyłonić najlepsze trypleksy, odznaczające się dużą trwałością w warunkach obojętnego pH, które następnie wykorzystano do wyznaczenia stałej wiązania TFO-spinka RNA za pomocą techniki EMSA.

Dane otrzymane w badaniach termodynamicznych, strukturalnych i biologicznych trypleksów RNA wykorzystano do zaprojektowania i przeprowadzenia eksperymentów na linii komórkowej HeLa. Dodatkowo, w eksperymentach komórkowych wykorzystano warianty trypleksów zawierające analogi PNA, o których wiadomo, że są odporne na degradację przez enzymy wewnątrzkomórkowe. Ocena ilościowa wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na poziom ekspresji reporterowego genu *GFP* w linii komórkowej HeLa była wykonana przy użyciu techniki qPCR. Badania te stanowiły ostatni etap realizacji pracy doktorskiej. Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane na tym etapie pokazano, że wybrane warianty trypleksów w różnym stopniu mogą regulować ekspresję genu *GFP*. Wszystkie badane warianty powodowały obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP* względem kontroli, jednakże nie znaleziono prostej korelacji pomiędzy liczbą podstawień typu LNA i 2-tiourydyny a poziomem regulacji ekspresji genu *GFP*.

Szczegółowa analiza danych termodynamicznych i strukturalnych pozwoliła stwierdzić, że wprowadzenie reszt LNA, 2'-O-MeRNA i 2-tiourydyny oraz L-rybozy miało duży wpływ na trwałość termodynamiczną oraz strukturę zarówno badanych dupleksów DNA i RNA, jak również trypleksów RNA. Wykazano, że obecność wymienionych modyfikacji wpływa na modulację stabilności biologicznej trypleksów RNA oraz na specyficzność oddziaływania oligomerów TFO ze spinką RNA. Co ciekawe, wykazano, że oligonukleotydy zawierające resztę L-rybonukleotydową mogą

tworzyć struktury dwuniciowe oraz trójniciowe, jednak ich stabilność jest obniżona w porównaniu z ich naturalnymi odpowiednikami. W pracy pokazano również, że biomolekuły obecne w ekstrakcie komórkowym nie mają dużego wpływu na powstawanie równoległych dupleksów DNA i RNA. Ponadto, przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa pozwoliły stwierdzić, że wybrane warianty trypleksów RNA mogą wpływać na regulację ekspresji określonego genu.

III. ABSTRACT

DNA exists as a double helical structure, called B helix, which is the most common structure. In native RNA, double-stranded helical regions are short (on average 5–7 base pairs long) and RNA contains many different structural motifs, such as: hairpins, symmetrical and asymmetrical single or double nucleotide bulges, internal loops. The polymorphic nature of nucleic acids allows to adopt a variety of structures depending on the sequences, the local environment, the presence of molecules or chemical modifications. For examples, DNA and RNA can form parallel-stranded duplexes, triple helical structures (triplexes) or four-stranded structures (quadruplexes).

The formation of triplexes *in vivo* has been well documented and is determined by the presence of long homopurine-homopyrimidine tracts. The formation of these structures is the result of conformational changes in duplex, that allow to the binding of a third strand within the major groove of the helix. RNA or DNA molecule that is able to specific binding to double helix is called triplex forming oligonucleotide (TFO). It has been shown that the formation of these noncanonical forms by introducing of the synthetic TFO oligonucleotides into the cell, may have application in molecular biology, diagnostics or therapy.

The occurrence of DNA and RNA duplexes with parallel-strands orientation (5'-3'/5'-3') in nature has been confirmed. It has been observed that parallel stretches of nucleic acids are present in specific regions of chromosomes and have been found in different genomes. Parallel duplexes may play a key role in the various biological processes within the cell, such as: the regulation of gene expression. Furthermore, these structures have certain advantages over the canonical duplexes, including: the unique hybridization in a sequence specific manner, the high sensitivity to environmental changes, and the increased resistance to degradation in the cellular environment. Therefore, they are an interesting tools because of their potential applications in molecular biology, biomedicine and oligonucleotide therapy. The current knowledge of the structural properties of nucleic acids is the basis for design and development of oligonucleotide-based strategies.

Described herein research was focused on the formation of the noncanonical structures of nucleic acids and their stability. The research of this thesis were conducted and divided into two main parts depending on the research subject and methodology,

i.e. RNA triplexes and parallel-stranded DNA and RNA duplexes. Thermodynamic parameters of triplexes and duplexes were determined by UV melting and the structural analysis was performed by circular dichroism spectroscopy. In addition, the structural studies of parallel-stranded DNA and RNA duplexes were performed by fluorescence spectroscopy (FRET) and NMR spectroscopy. Besides, the biological properties of RNA triplexes were determined by EMSA method and by HeLa cell lines experiments and qPCR technique.

In the first stage of the project, unmodified and modified oligonucleotides were designed and synthesized. Next, the thermodynamic studies of RNA triplexes containing multiple incorporation of LNA and 2-thiouridine residues or L-ribonucleotide residues were conducted using UV/VIS melting method. At the same time, the influence of LNA, 2-thiouridine and 2'-O-MeRNA or L-ribonucleotide residues on thermodynamic stability of DNA and RNA duplexes, was determined. Thermodynamic studies confirmed the influence of various chemical modifications on thermodynamic stability of RNA triplexes as well as of DNA and RNA duplexes. It has been found that the introduction of LNA, 2'-O-MeRNA and 2-thiouridine residues increased the stability of these structures, while the presence of the L-ribose residue resulted in destabilization.

In the next stage of the thesis, the conformational changes in the structural topology of RNA triplexes as well as DNA and RNA duplexes were monitored by CD spectroscopy. In addition, the fluorescence measurements that allowed for determination of the polarity of strands of DNA and RNA duplexes were conducted. It has been confirmed that the formation of parallel-stranded duplexes in DNA, RNA and 2'-O-MeRNA series depends on pH conditions. The duplexes with 5'-3'/ 5'-3' strands orientation formed under acidic conditions, while under neutral conditions not all of duplexes had parallel strands polarity. Moreover, NMR spectroscopy allowed determination of the influence of L-ribonucleoside on the structure of heterochiral duplexes. It has been shown that two oligonucleotides containing L- and D-enantiomers of ribose can interact and form heterochiral duplex.

In the next stage of the thesis, the binding affinity of TFO variants to the RNA hairpin, which allowed determination of the influence of chemical modifications and pH conditions on stability of RNA triplexes, were performed. The EMSA experiments enabled to obtain the information about the stability of triplexes under neutral

conditions. The triplexes variants characterized by the highest stability under neutral conditions, were chosen for determination of dissociation constant by EMSA method.

Data obtained in thermodynamic, structural and biological studies of RNA triplexes were used to design and perform experiments on HeLa cell lines. In this part of the research RNA triplexes containing PNA analog were also used. The quantitative analysis of the effect of selected RNA triplexes on the expression of the *GFP* reporter gene in HeLa cell lines, was performed using the qPCR technique. The results revealed the different effects of RNA triplexes on the expression of *GFP* gene. All tested triplexes resulted in a decrease in *GFP* gene expression relative to the control probe, but no simple correlation was found between the number of LNA and 2-thiouridine substitutions and deregulation of *GFP* gene expression.

Detailed analysis of thermodynamic and structural data revealed that the incorporation of LNA, 2'-O-MeRNA and 2-thiouridine residues or L-ribonucleotide had a strong influence on thermodynamic stability and structure of both DNA and RNA duplexes as well as RNA triplexes. It has been shown that the presence of these modifications affected the modulation of biological stability of RNA triplexes and the specificity of TFO-RNA hairpin interactions. Interestingly, oligonucleotides containing L-ribonucleotide residues formed double-stranded and triple-stranded structures, but their stability was reduced compared to their natural counterparts. The results also showed that the molecules present in cellular extracts had no significant influence on the formation of parallel-stranded DNA and RNA duplexes. In addition, the data from HeLa cell lines experiments revealed that RNA triplexes can be used to regulate gene expression.

IV. CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Wstęp

Informacja genetyczna jest zakodowana w kwasie deoksyrybonukleinowym (DNA). W genomie człowieka znajduje się około 30 000 genów. Gdy gen ulega ekspresji, informacja zawarta w sekwencji nukleotydowej DNA zostaje przepisana w procesie transkrypcji na około 85 000 różnych cząsteczek matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA). Następnie sekwencja nukleotydów w mRNA jest tłumaczona (w procesie określanym mianem translacji) z udziałem rybosomów i szeregu innych cząsteczek na odpowiednią sekwencję aminokwasów budujących białko. Podczas ekspresji genów możliwe jest występowanie błędów podczas przepisywania, które powodują m.in. zaburzenia procesu transkrypcji. W następstwie może dochodzić do powstania niewłaściwego transkryptu lub nieprawidłowej jego ilości. W efekcie tych zmian zostaje zahamowana biosynteza białka, powstaje niefunkcjonalne białko, albo jego poziom w komórce zostaje obniżony lub podwyższony. Takie nieprawidłowości są jedną z przyczyn poważnych chorób o podłożu genetycznym. Dlatego kontrola oraz możliwość regulacji ekspresji genów na etapie transkrypcji lub translacji pozwala na rozwój nowych strategii terapeutycznych oraz projektowanie skutecznych leków nowej generacji.

W ostatnim czasie zainteresowanie nauki ochroną zdrowia człowieka wyraźnie wzrosło. Chęć poprawy jakości życia człowieka wiąże się z leczeniem powszechnie występujących schorzeń. Profilaktyka zdrowotna wiąże się m.in. z koniecznością poszukiwania nowych, skutecznych leków. Tradycyjne farmaceutyki zwykle oddziałują bezpośrednio z białkiem powodującym określone zaburzenie. Natomiast leki nowej generacji, oparte o narzędzia oligonukleotydowe, są projektowane tak, aby oddziaływać z mRNA lub genem kodującym zmutowane białko. Ogólnie, rozwój biologii molekularnej umożliwił poznawanie nowych znaczników (np. mutacji) takich schorzeń, lepsze zrozumienie procesów odpowiadających za ich powstawanie, a także tworzenie nowych metod leczenia. Na pewno poznanie sekwencji genomów bakteryjnych, wirusowych, a przede wszystkim człowieka (HGP, ang. *Human Genome Project*) [1] zaowocowało powstaniem nieocenionego źródła informacji dla nauk biologicznych i medycznych. Przykładowo, poznanie uszkodzeń genów determinujących powstawanie

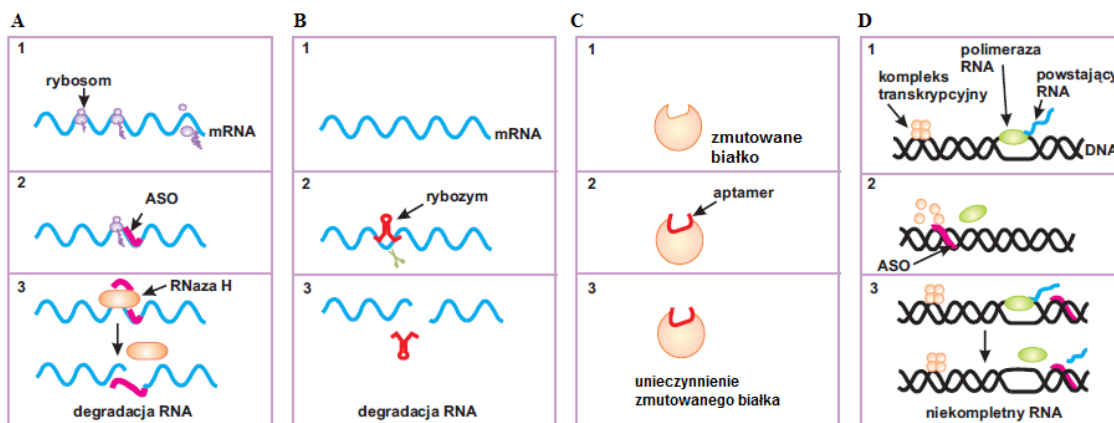
chorób pozwala na rozwijanie i opracowywanie nowatorskich technik leczniczych, na przykład terapii genowej. W projektowaniu leków opartych na kwasach nukleinowych wykorzystuje się znajomość sekwencji DNA bez potrzeby długotrwałych analiz struktury docelowego białka, co jest konieczne w tradycyjnych metodach leczenia. Obecnie stosowane techniki biologii molekularnej otwierają drogę do usuwania nieprawidłowych pod względem genetycznym komórek, zwiększania puli zdrowych komórek lub blokowania ekspresji zmutowanego genu.

2. Oligonukleotydy DNA i RNA jako skuteczne narzędzia molekularne

Zastosowanie oligonukleotydów, jako potencjalnych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych oparte jest na zrozumieniu mechanizmów biologicznych, przede wszystkim: transkrypcji, translacji, potranslacyjnej modyfikacji białek oraz blokowania funkcji tych biomolekuł. W ostatnich kilkunastu latach dokonał się znaczny postęp w kierunku zwiększenia, w warunkach *in vivo*, trwałości terapeutyków opartych na kwasach nukleinowych. Modyfikacje naturalnie występujących katalitycznych RNA, poszukiwania nowych RNA i DNA o pożądanych właściwościach oraz opracowywanie nowych systemów ułatwiających wprowadzenie oligonukleotydów do komórki budzi duże zainteresowanie ośrodków badawczych na całym świecie. Dlatego można oczekiwać, że w najbliższym czasie syntetyczne oligonukleotydy staną się skutecznymi narzędziami wykorzystywanymi w diagnostyce oraz terapii.

Ogólnie można wyróżnić następujące podejścia oparte na kwasach nukleinowych w zależności od wybranej koncepcji badawczej czy terapeutycznej:

- strategia oparta na antysensowych oligonukleotydach (ASO, Rys. 2A),
- strategia oparta na rybozymach (Rys. 2B),
- strategia oparta na aptamerach (Rys. 2C),
- strategia oparta na zjawisku interferencji RNA (RNAi),
- strategia w oparciu o system CRISPR-Cas,
- strategia antygenowa (Rys. 2D).



Rysunek 2. Schemat wybranych strategii opartych na kwasach nukleinowych: antysensowej (A), rybozymowej (B), aptamerowej (C) i antygenowej (D) (zmodyfikowane, [2]).

3. Strategia oparta na antysensowych oligonukleotydach (ASO)

Pierwsze dane dotyczące zastosowania egzogenego fragmentu jednoniciowego DNA komplementarnego do sekwencji mRNA pochodzą z 1977 [3]. Kuff i współpracownicy zaobserwowali zahamowanie transkrypcji i syntezy białka przez przyłączenie komplementarnej cząsteczki DNA do mRNA. Powstały dupleks (hybryda) DNA/mRNA nie jest rozpoznawany przez maszynę komórkową i nie ulega translacji. Dupleks DNA/mRNA może również aktywować działanie enzymu rybonukleazy H (RNazy H), która przecina mRNA i dochodzi do jego degradacji, a w konsekwencji proces biosyntezy białka jest niemożliwy [3]. W roku 1978 Zamecnik i Stephenson opisali wyniki swoich badań, w których sprawdzili wpływ 13 nukleotydowych fragmentów DNA na namnażanie wirusa mięsaka Rousa [4]. Do hodowli kurzych fibroblastów zainfekowanych wirusem mięsaka Rousa dodawali syntetyczny DNA komplementarny do RNA wirusa. Badacze zaobserwowali zahamowanie powstawania nowych cząsteczek wirusa i transformacji nowotworowej komórek kurzych. Dane opisane powyżej to pierwsze opublikowane przykłady świadczące o możliwości wykorzystania syntetycznych oligonukleotydów o specyficznej sekwencji do zahamowania biosyntezy białek.

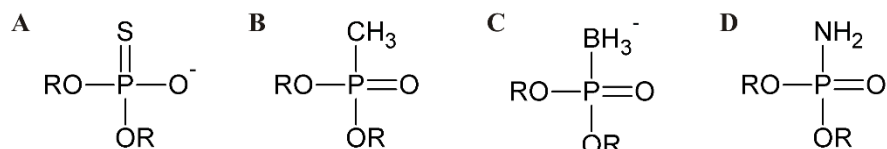
Antysensowe konstrukty oligonukleotydowe stanowią krótkie (12-30-merowe), jednoniciowe kwasy nukleinowe, które wiążą się do RNA lub DNA przez parowanie zasad wg modelu Watsona-Cricka [5]. Syntetyczne oligonukleotydy są projektowane tak, aby oddziaływały z sekwencją docelową w sposób specyficzny sekwencyjnie. ASO oddziałuje z sekwencją sensowej na zasadzie komplementarności, stąd przyjęto

określenie „antysensowe oligonukleotydy”. Wiązanie ASO do docelowego fragmentu RNA lub DNA może powodować zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji. Te cząsteczki zasadniczo mogą działać w dwojaki sposób. Po pierwsze, w wyniku przyłączenia antysensowego oligonukleotydu powstaje dupleks DNA/RNA. Heterodupleks jest rozpoznawany przez endogenny enzym RNazę H, który hydrolizuje cząsteczkę RNA w obrębie dupleksu. W ten sposób biosynteza białka zostaje zablokowana przez degradację jego matrycy. Po drugie, związany ASO stanowi zawadę steryczną dla rybosomu, utrudniając jego przyłączenie lub przesuwanie wzdłuż mRNA, co skutkuje obniżeniem wydajności translacji. ASO mogą być również stosowane w regulacji procesu składania genów oraz do zmian poliadenylacji [5].

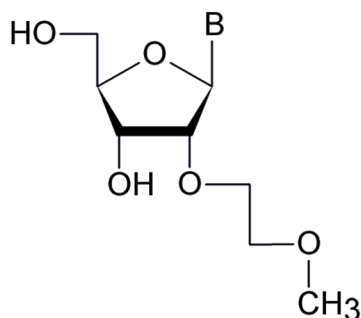
Antysensowe oligonukleotydy powinny charakteryzować się następującymi cechami:

- łatwo przenikać przez błonę komórkową tak, aby dotrzeć do docelowych fragmentów RNA lub DNA,
- wysoką specyficznością wiązania się do docelowego RNA lub DNA, aby zminimalizować niespecyficzne oddziaływania z innymi fragmentami RNA lub DNA,
- stabilnością i odpornością na działanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów nukleolitycznych.

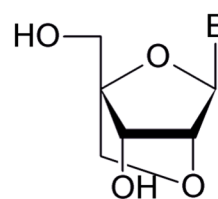
Efektywność działania antysensowych oligonukleotydów determinowana jest przez wiele czynników, spośród których, jednym z najistotniejszych jest stabilność w środowisku komórkowym. W celu zwiększenia stabilności i odporności ASO na hydrolizę enzymatyczną, a tym samym polepszenia ich właściwości biologicznych, stosuje się optymalną długość ASO (15-20 nukleotydów) oraz różne rodzaje modyfikacji chemicznych. Przykładowo, modyfikacje w obrębie wiązania internukleotydowego, w których niewiążący atom tlenu zostaje zastąpiony atomem siarki (tiofosforany, PS, Rys. 3A) [6], grupą metylową (metylofosforany, Rys. 3B) [7], borowodorową BH_3 (boranofosforany, BP, Rys. 3C) [8], czy aminową (amidofosforany, Rys. 3D) [9]. Innymi przykładami chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów o zwiększonej stabilności enzymatycznej są pochodne 2'-metoksyetylowe (Rys. 4) [10] oraz analogi nukleozydowe, na przykład kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (LNA, Rys. 4), w których modyfikacji podlega pierścień cukrowy [11].



Rysunek 3. Wzory strukturalne: tryfosforanu (A), metylofosfonianu (B), boranofosforanu (C) i amidofosforanu (D).



2'-O-metoksyetyloribonukleozyd



nukleozyd o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (LNA)

Rysunek 4. Wzory strukturalne modyfikowanych nukleozydów.

Oprócz stabilności biologicznej antysensowych oligonukleotydów w warunkach *in vivo*, ważnym czynnikiem determinującym efektywność ich działania jest również wnikiwanie do wnętrza komórki. Dla ułatwienia transportu ASO przez błony komórkowe opracowano kilka metod, m.in. połączenie oligonukleotydów z dodatnio naładowanymi cząsteczkami, na przykład: polilizyną [12] lub awidyną [13] oraz modyfikowanie ASO związkami o charakterze lipofilowym, na przykład cholesterolem. Strategia antysensowych oligonukleotydów jest trudna w zastosowaniu, ponieważ szereg czynników warunkuje jej powodzenie. Jednak wiele modyfikacji chemicznych umożliwiło zmianę właściwości tych cząsteczek, co pozwala przypuszczać, że medyczne wykorzystanie ASO będzie coraz powszechniejsze. Obecnie testowane możliwości zastosowania terapii opartej na ASO dotyczą głównie onkologii, chorób neurologicznych, angioplastyki naczyń wieńcowych oraz leczenia niektórych chorób wirusowych i pasożytniczych [15].

4. Strategia oparta na katalitycznych kwasach nukleinowych (rybozymach i deoksyrybozymach)

W latach 80-tych XX wieku odkryto, że kwasy nukleinowe oprócz przenoszenia informacji genetycznej, podobnie jak enzymy, mogą pełnić funkcje katalityczne [16]. Podczas badań procesu składania RNA (ang. *splicing*) mających na celu wykrycie enzymu katalizującego wycinanie intronów u orzęska *Tetrahymena thermophila*, Cech zaobserwował, że proces ten zachodzi również pod nieobecność białek. Ta obserwacja stanowiła dowód na to, że samo RNA w określonych warunkach może wykazywać właściwości enzymatyczne. W tym samym czasie podobne wnioski wyciągnął Altman w trakcie badań nad dojrzewaniem tRNA w rybosomach [17]. Częsteczki RNA o właściwościach katalitycznych nazwano rybozymami, a w 1989 roku obaj naukowcy zostali uhonorowani za swoją pracę Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Odkrycie rybozymów stanowiło przełom w badaniach mechanizmu katalizy enzymatycznej i doprowadziło do zidentyfikowania katalitycznych RNA u wielu organizmów. Ponadto, Breaker i Joyce odkryli, że w specyficznych warunkach również cząsteczka DNA może być enzymem [18].

Kwasy nukleinowe o aktywności katalitycznej można podzielić na dwie podstawowe grupy. Do pierwszej zalicza się katalityczne RNA (rybozomy) zdolne do enzymatycznego rozcinania zdefiniowanych RNA, występujące w systemach naturalnych. Natomiast druga grupa obejmuje katalityczne DNA nazywane deoksyrybozymami lub DNAzymami, otrzymywane na drodze selekcji *in vitro* (SELEX) [19]. Proces SELEX polega na wybiórczej selekcji i amplifikacji kwasów nukleinowych o pożądanym właściwościach z przygotowanej puli krótkich losowych sekwencji DNA lub RNA. W metodzie SELEX można wyróżnić trzy główne etapy: i) przygotowanie pełnej biblioteki sekwencji RNA lub DNA (biblioteki kombinatorycznej), ii) selekcja oligonukleotydów o określonych właściwościach, iii) powielenie wyselekcjonowanych cząsteczek metodami biologii molekularnej [20].

Rybozomy można podzielić na kilka klas ze względu na rodzaj produktów katalizowanej przez nie reakcji oraz strukturę cząsteczki. W ramach tego podziału wyróżnić można introny grupy I i II, rybozomy typu „głowy młotka” (ang. *hammerhead*), rybozomy typu „spinki” (ang. *hairpin*), rybonukleazę P (RNaza P), rybozomy wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV, ang. *hepatitis delta virus*), rybozomy typu *Varkud Satellite* (VS) oraz spliceosomy i makrokompleksy rybonukleoproteinowe. Inna klasyfikacja rybozymów opiera się na wielkości

cząsteczek. Istnieją rybozomy małe o niezbyt skomplikowanej budowie oraz rybozomy duże, składające się z licznych pętli i części helikalnych.

DNAzomy zdolne są do katalizowania różnorodnych reakcji chemicznych. Większość znanych obecnie DNAzymów katalizuje reakcje rozcinania docelowych cząsteczek RNA przez hydrolizę/transestyfikację oraz reakcję ligacji dwóch fragmentów DNA lub RNA [21]. Jednak, znane są także DNAzomy mające zdolność modyfikacji reszt aminokwasowych w peptydach, wykazujące aktywność enzymów fosfatazy i kinazy. Ponadto, występują takie deoksyrybozomy, które prowadzą do utworzenia wiązania pomiędzy dwoma atomami węgla (reakcja Dielsa-Aldera). Interesującym przykładem aktywności katalitycznej DNA jest zdolność do naprawy (rozdzielenia) dimerów pirymidynowych powstających wskutek ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe. Poza tym, niektóre DNAzomy wykazują zdolność do autokatalizy, w reakcji autofosforylacji, autoadenylacji z wytworzeniem wiązania 5'-5' trifosforanowego oraz autodepurynacji [21]. Warto zaznaczyć, że DNAzomy odznaczają się większą stabilnością w środowisku komórkowym w porównaniu z rybozymami, także cechują się wysoką efektywnością, a ich synteza jest szybka i tania.

Efektywność działania aktywnych katalitycznie RNA i DNA zależy od wielu czynników. Przy projektowaniu są przede wszystkim brane pod uwagę zdolność cząsteczki docelowej do wiązania komplementarnych oligonukleotydów oraz region rozpoznawany przez rybozym lub DNAzym. Istotne jest, aby ten rejon charakteryzował się dużą zachowawczością sekwencji [19]. Kolejnym ważnym czynnikiem jest sposób dostarczenia katalitycznego RNA lub DNA do komórki oraz jego połączenie z docelową cząsteczką RNA. Rybozomy mogą być wprowadzone do komórki w sposób bezpośredni lub mogą być dostarczone w formie odpowiednio przygotowanego wektora ekspresyjnego, który w komórce ulega transkrypcji. Bezpośrednie wprowadzenie rybozomu do komórki wymaga obecności nośnika, najczęściej są to kationowe lipidy i liposomy, które tworzą kompleksy z RNA i wnikają na drodze endocytozy do wnętrza komórki. Następnie dochodzi do uwolnienia cząsteczki rybozomu z pęcherzyka endosomalnego [22]. Aby prawidłowo zaprojektować rybozomy lub deoksyrybozomy należy również pamiętać o zachowaniu sekwencji występującej preferencyjnie w obrębie miejsca cięcia, na przykład dla rybozomu typu *hammerhead* jest to 5'-NUH-3', gdzie N oznacza dowolny nukleotyd, natomiast H oznacza każdy nukleotyd z wyjątkiem G [23], dla rybozomu typu *hairpin* jest to 5'-GUC-3' [24]. Stabilność rybozymów i DNAzymów w obecności nukleaz komórkowych jest także bardzo

istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność katalityczną tych cząsteczek. Zwiększenie ich trwałości umożliwi wydłużenie czasu działania, a w konsekwencji pozwala na zmniejszenie ilości rybozemu wprowadzanego do komórki. Zastosowanie modyfikacji chemicznych, podobnie jak w przypadku antysensowych oligonukleotydów, pozwala na poprawę stabilności rybozymów i DNazymów. Przykładami wykorzystywanych modyfikacji są m.in.: podstawienie w pozycji 2'-hydroksylowej rybozy grupą metylową, aminową lub fluorem oraz wprowadzenie tymidyny tworzącej wiązania 3'-3' na końcu 3' cząsteczki rybozemu [25].

Spektrum zastosowań katalitycznych kwasów nukleinowych jest bardzo szerokie, począwszy od biologii molekularnej i biotechnologii, skończywszy na medycynie. Rybozomy i DNazy stanowią przede wszystkim alternatywę dla białek, zwłaszcza w przypadku, kiedy niemożliwa jest kataliza z użyciem enzymu białkowego. W terapii przeciwwirusowej największe znaczenie mają warianty rybozymów występujące w naturze, które przecinają docelową cząsteczkę RNA, przez co obniżają ekspresję genów wirusowych białek lub hamują namnażanie się wirusa [26, 27].

Kolejną gałęzią zastosowań dla katalitycznych DNA jest diagnostyka, w której mogą być z powodzeniem stosowane, jako czujniki (sensory) jonów metali, związków chemicznych lub innych biomolekuł [28, 29]. Największą grupę takich cząsteczek stanowią te, które używane są do detekcji jonów metali. Ciekawym przykładem jest DNazym-sensor wykrywający radioaktywne jony uranu [30]. W oparciu o podobną strategię zostały też zaprojektowane czujniki do detekcji jonów ołowiu, miedzi, rtęci, srebra, potasu oraz adenozyno-5'-trifosforanu (ATP, ang. *adenosine-5'-triphosphate*) [31, 32]. Technologia oparta na zastosowaniu deoksyrybozymów ma również potencjał, jako strategia służąca do modyfikacji lub degradacji docelowych cząsteczek DNA lub RNA związanych, na przykład ze zmutowanym genem.

5. Strategia oparta na aptamerach

Odkrycie i rozwój strategii opartej na aptamerach to początek lat 90-tych ubiegłego wieku. Dwie niezależne grupy badawcze, Golda [33] i Szostaka [34] wykazały, że te krótkie kwasy nukleinowe mają zdolność przestrzennego dopasowania się do różnych cząsteczek oraz łączenia się z nimi przez niekowalencyjne wiązania. Określenie aptamer pochodzi od łacińskiego słowa „*aptus*”, co oznacza „pasować, dopasowany”. Z definicji aptamery to jednoniciowe oligonukleotydy DNA i RNA, otrzymywane na

drodze selekcji *in vitro* (metoda SELEX) odznaczające się wysokim powinowactwem i specyficnością wiązania ze ściśle określonymi biomolekułami [35].

W oddziaływaniach kwasów nukleinowych między sobą, główną rolę odgrywają wysoce specyficzne oddziaływania między zasadami nukleinowymi (poprzez tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływania warstwowe). Natomiast oddziaływania pomiędzy DNA lub RNA i białkami opierają się na zasadzie klucza i zamka, czyli oddziaływaniach pomiędzy odpowiednio dopasowanymi elementami strukturalnymi białka i określoną sekwencją kwasu nukleinowego [35].

W tworzenie i stabilizację struktur przestrzennych aptamerów zaangażowane są różne rodzaje oddziaływań: wiązania wodorowe, oddziaływania warstwowe, oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne. Sprawiają one, że aptamery mogą specyficznie wiązać się z cząsteczkami o zróżnicowanej strukturze i budowie chemicznej. Powszechnie wykorzystuje się aptamery wykazujące wysoką specyficzność względem cząsteczek o dużej masie cząsteczkowej, w tym kwasów nukleinowych, białek lub cukrów [35, 36] a także względem związków niskocząsteczkowych, takich jak: jony metali [37], nukleotydy [38], aminokwasy [39] czy antybiotyki [40].

Aptamery mogą również pełnić rolę ligandów wiążących różne czynniki wytwarzane przez patogeny [41] oraz oddziaływać z RNA lub DNA wirusowymi [42], bakteryjnymi [43] czy drożdżowymi [44]. Uniwersalność aptamerów uwydatnia fakt, iż można otrzymać aptamery zdolne do rozróżnienia dwóch izoform strukturalnych białka [45] oraz takie, które rozpoznają różnice w konformacji tego samego białka [46].

Stabilność, powinowactwo do cząsteczki docelowej oraz możliwość detekcji aptamerów dostępnymi metodami analitycznymi to istotne czynniki determinujące skuteczność działania cząsteczek aptamerowych [35]. W celu optymalnego projektowania aptamerów, oprócz naturalnych kwasów nukleinowych, wykorzystuje się także ich chemicznie modyfikowane pochodne, jak również peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). Do najczęściej stosowanych modyfikacji należą: podstawienia grupy 2'-hydroksylowej rybozy grupą metylową [47], aminową czy fluorem [48], wprowadzenie tymidyny tworzącej wiązania 3'-3' na końcu 3' cząsteczki [49], dodanie do końca 3' biotyny [50], dodanie do końca 5' cholesterolu [51], kwasów tłuszczowych czy polikationów [52]. Ciekawą alternatywą dla powyższych modyfikacji chemicznych jest tworzenie „aptamerów lustrzanych”, tj. DNA lub RNA zawierających enancjomery L-DNA lub L-RNA. Aptamery zbudowane z nukleotydów zawierających L-rybozę są komercyjnie nazywane Spiegelmerami (z niem. *spiegel* oznacza „lustro”). Takie

cząsteczki odznaczają się odpornością na działanie enzymów komórkowych, ponieważ nukleazy nie potrafią rozpoznać i hydrolizować enancjomerów zawierających L-cukier [53]. Natomiast, aby rozwiązać problem wielkości aptameru niektóre grupy badaczy (Jäschke i wsp. oraz Boomer i wsp.) wykorzystały nietoksyczny glikol polietylenowy (PEG, ang. *polyethylene glycol*) przyłączony do końców aptameru [54, 55].

Cząsteczki aptamerów mogą również pełnić rolę inhibitorów białek, które uczestniczą w rozpoznawaniu i oddziaływaniu z kwasami nukleinowymi (np. polimeraz wirusowych), jak i białek, które w warunkach naturalnych w ogóle nie oddziałują z RNA lub DNA. Podstawową funkcją, którą przypisuje się aptamerom jest rola ligandów wiążących inne molekuly, począwszy od małych nieorganicznych cząsteczek a skończywszy na organizmach jednokomórkowych. Swoistość rozpoznawania różnych klas molekuł pozwala na to, że aptamery mogą także konkurować z przeciwciałami o miano uniwersalnych receptorów i być powszechnie stosowane, jako narzędzia molekularne w metodach diagnostycznych [56]. Ponadto, pojawienie się nowych technologii, różnorodność i duża dowolność docelowych sekwencji dla aptamerów stwarza szereg możliwości aplikacyjnych dla tej grupy cząsteczek.

Po pierwsze, aptamery są powszechnie stosowane w projektowaniu biosensorów działających zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [57]. Mogą być wykorzystane do oznaczenia obecności różnych czynników wytwarzanych przez patogeny, na przykład kolorymetrycznego oznaczenia pasożytów *Plasmodium vivax* i *Plasmodium falciparum*, które powodują malarię [41, 58]. Można je również użyć do oznaczenia zanieczyszczenia środowiska, na przykład jonami metali ciężkich (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+}) czy substancjami toksycznymi (pestycydy, mykotoksyny) [59]. Ponadto, sprzężanie aptamerów z cząsteczkami o właściwościach terapeutycznych, takimi jak: leki, nośniki leków, fotouczulacze, siRNA pozwala na diagnozowanie, monitorowanie dystrybucji takich preparatów na poziomie komórkowym oraz terapię wielu ciężkich schorzeń, w tym nowotworów. Kompleks aptameru z lekiem umożliwia bezpośrednie dostarczenie substancji aktywnej do określonej komórki, eliminując w znacznym stopniu działanie nieswoiste leku [49].

Wraz z opracowaniem lepszych metod modyfikacji aptamerów, mają one szansę stać się jednym z ważnych systemów dostarczanie leków o dużej swoistości oraz skutecznym narzędziem w walce z nowotworami. Liczne badania związane z transportem leków poświęcono dostarczaniu chemioterapeutyków, na przykład doksorubicyny [60]. Znalazło to zastosowanie w badaniach nad komórkami raka

wątroby, stercza, czy komórek ostrej białaczki limfoblastycznej [61]. Ponadto, bardzo interesującym rozwiązaniem jest połączenie aptameru z nanocząsteczką będącą półprzewodnikiem nazywaną kropką kwantową (QD, ang. *quantum dot*). Taka zmodyfikowana cząsteczka może być wykorzystana jednocześnie, jako nośnik dostarczający różne czynniki oraz barwnik fluorescencyjny [62, 63]. Liczne publikacje na temat aptamerów wskazują na ich uniwersalność, a najnowsze doniesienia ujawniają możliwości zastosowania tych oligonukleotydów w leczeniu nowotworów [64-66]. Pomimo, iż zostały opisane po raz pierwszy w latach 90-tych XX wieku, leki projektowane w oparciu o nie są dopiero sukcesywnie wprowadzane [67].

6. Strategia w oparciu o zjawisko interferencji RNA

Pierwsze obserwacje nieznanego mechanizmu regulacji ekspresji genów w organizmach roślin, nazwanego potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*) [68, 69] oraz u grzybów, nazywanego tłumieniem genów (ang. *quelling*) [70], poczyniono na początku lat 90-tych XX wieku. Aby polepszyć cechy użytkowe roślin wprowadzano do ich genomów dodatkową kopię istniejącego już wcześniej genu tzw. genu endogennego. Jednak, zamiast wydajniejszej syntezy białka obserwowano zwykle wyciszenie obu genów [68]. To zjawisko udało się wyjaśnić kilka lat później, podczas badań zmierzających do selektywnego wyciszenia genów w modelowym organizmie, nicieniu *Caenorhabditis elegans* [71]. Kolejne badania pokazały, że zjawisko potranskrypcyjnego wyciszenia genów stanowi tylko część niezwykle złożonego mechanizmu regulacji ekspresji genów, w którym kluczową rolę pełnią małe cząsteczki RNA (ang. *small RNA*). Przełomem w badaniach nad wyciszaniem genów w komórkach ssaczy było wykorzystanie syntetycznych krótkich interferujących cząsteczek RNA (siRNA) [72].

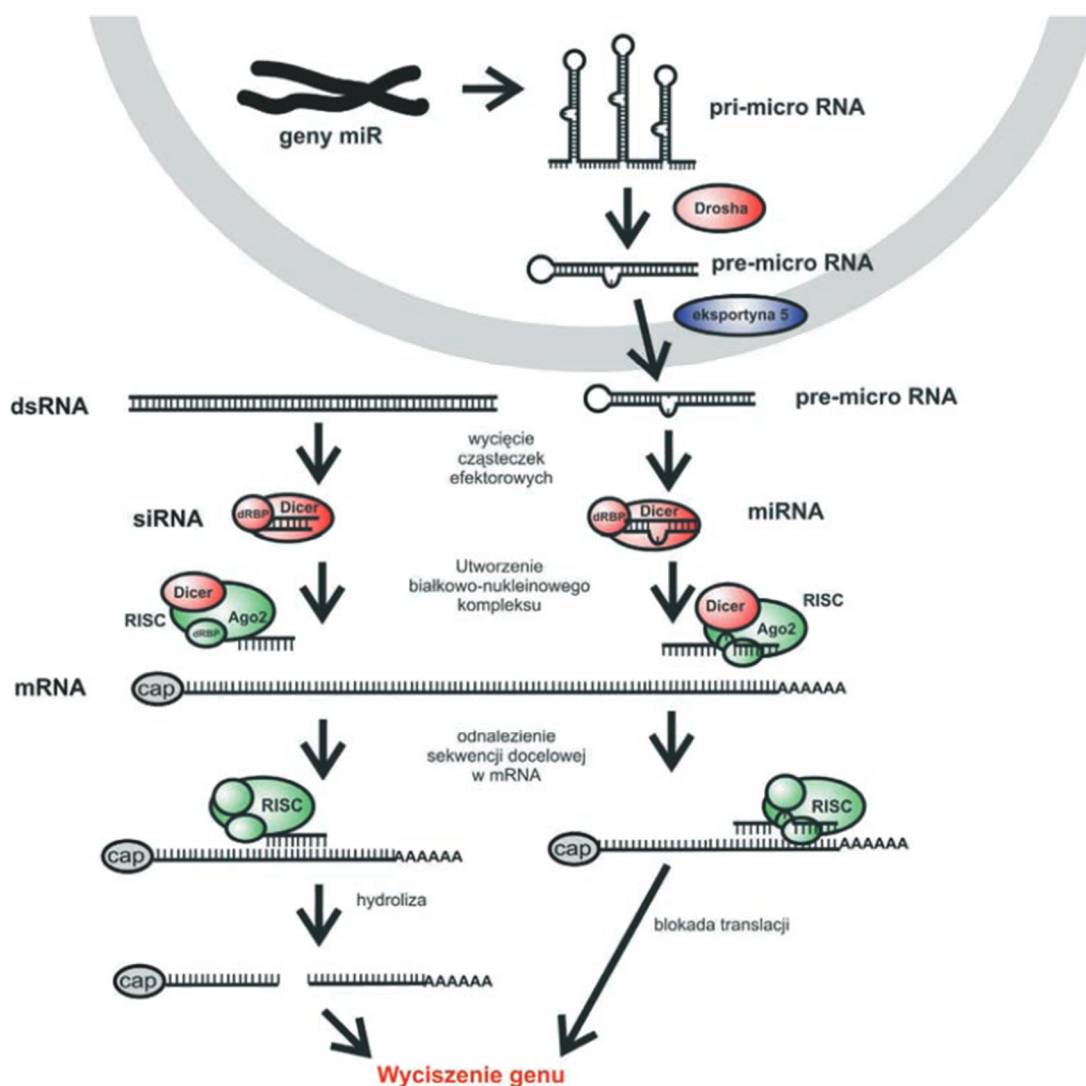
Termin interferencja RNA (RNAi) został po raz pierwszy użyty przez badaczy Firea i Mello do opisu wyciszenia genów, wywołanego przez podanie długich, dwuniciowych cząsteczek RNA do organizmu nicienia *C. elegans* [73]. W 2006 roku obaj badacze za swoje przełomowe badania zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny. Kolejnym ważnym odkryciem w zakresie zjawiska RNAi było zidentyfikowanie cząsteczek efektorowych, tzw. krótkich interferujących RNA (siRNA) w ekstraktach z komórek owadów [72, 74]. Odkrycie dokonane przez grupę badaczy pod kierunkiem Tuschla otworzyło drogę do wyciszenia genów w komórkach ssaków z

zastosowaniem syntetycznych siRNA [75]. Dalsze badania nad procesem interferencji RNA pozwoliły poznać inne regulatorowe cząsteczki RNA zdolne do kontroli poziomu ekspresji wielu genów, tzw. mikroRNA (miRNA). Mechanizm działania mikroRNA ma szereg wspólnych elementów ze zjawiskiem interferencji RNA [76].

Regulacja ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym może odbywać się przez kodowane w genomie mikroRNA lub z udziałem dwuniciowych, krótkich interferujących RNA (siRNA). Oba typy krótkich RNA funkcjonują, jako cząsteczki efektorowe i rozpoznają docelową, komplementarną sekwencję w mRNA. Pomimo, że mechanizm działania tych cząsteczek jest podobny, istnieją pewne różnice między nimi. MikroRNA są najliczniejszą grupą endogennych cząsteczek regulatorowych o długości ok. 20 nukleotydów, które powstają z dwuniciowych prekursorów noszących nazwę pre-mikroRNA (pre-miRNA) w wyniku ich obróbki. Są one obecne w komórkach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich oraz wykazują komplementarność do regionów niepodlegających translacji (3' UTR, ang. *3' untranslated region*) w mRNA [77]. Tymczasem, siRNA powstają z długich, dwuniciowych cząsteczek, które pojawiają się w komórce, jako efekt replikacji wirusowego RNA, transkrypcji ruchomych elementów genetycznych - retrotranspozonów, nieprawidłowej transkrypcji transgenów [78]. Mogą być pochodzenia egzogenne z wirusowego RNA lub endogenne transkrybowane ze specyficznych fragmentów retrotranspozonów. siRNA są złożone z dwóch komplementarnych nici: sensownej i antysensownej. Nić antysensowna jest komplementarna do odpowiedniego fragmentu docelowego mRNA. Tylko jedna z nici odpowiada za aktywność cząsteczki siRNA, która degraduje mRNA lub może blokować translację [78].

Ogólny mechanizm interferencji RNA wywołany przez siRNA i miRNA jest podobny i zachodzi kilku etapowo (Rys. 5). Centralnym procesem RNAi jest degradacja mRNA, komplementarnego do wnikażącej do komórki obcej cząsteczki dwuniciowego RNA. W przypadku siRNA, rozpoczęcie procesu dojrzewania cząsteczki następuje przez hydrolizę długiego, dwuniciowego RNA, w której uczestniczy enzym z rodziny RNaz III – rybonukleaza Dicer. Powstają 21-23 nukleotydowe dupleksy siRNA rozpoznawane przez kompleks rybonukleoproteinowy (RISC). Następnie obecna w kompleksie RISC helikaza rozplata dupleks siRNA i jedna z nici (tzw. nić wiodąca) zostaje włączona do kompleksu białkowego. Kolejny enzym z RISC – endorybonukleaza wykorzystuje tę nić do odnalezienia, na zasadzie komplementarności, sekwencji docelowego mRNA. W końcowym etapie dochodzi do

katalitycznej hydrolizy wiązania internukleotydu w rozpoznanej cząsteczce mRNA. Taka cząsteczka na obu przeciętych końcach nie ma ochrony i jest szybko degradowana przez nukleazy komórkowe [79].



Rysunek 5. Schemat mechanizmu interferencji RNA [80].

Specyficzność mechanizmu interferencji RNA jest determinowana dokładnym sparowaniem antysensownej nici siRNA z komplementarną sekwencją docelowego mRNA. Jeśli natomiast związana w kompleksie białkowym RISC nić nie jest w pełni komplementarna do określonego mRNA, zahamowanie ekspresji genu następuje na drodze miRNA [81]. W wyniku transkrypcji genu odpowiedniego miRNA powstaje pierwotny transkrypt pri-miRNA przyjmujący strukturę spinki do włosów (shRNA).

Następnie dochodzi do obróbki pri-miRNA i powstaje w ten sposób produkt pre-miRNA. W kolejnym etapie prekursorowa cząsteczka pre-miRNA ulega dalszej obróbce przez enzym Dicer, w wyniku, której powstają dwuniciowe miRNA. Dojrzałe miRNA zostają włączone do kompleksu RISC. Następuje związanie powstałego kompleksu z docelowym mRNA i zablokowanie procesu biosyntezy białka na zasadzie zawady przestrzennej [81, 82].

Szereg możliwych zastosowań zjawiska RNAi sprawia, że istnieje potrzeba ciągłego polepszania właściwości dupleksów siRNA lub shRNA. Wprowadzanie chemicznych modyfikacji do nici syntetycznych RNA stwarza możliwości zwiększenia ich stabilności w obecności nukleaz komórkowych, wydłużenia czasu półtrwania w organizmie, polepszenia specyficzności i aktywności tych cząsteczek, a także obniżenia odpowiedzi immunologicznej [83]. Szczególnie istotne z punktu widzenia badań *in vivo* są dwie pierwsze cechy, gdzie ograniczony czas trwania efektu wyciszenia jest jedną z podstawowych przeszkód w terapeutycznym zastosowaniu strategii RNAi. Ponadto, wykorzystanie zjawiska RNAi w leczeniu wielu chorób wymaga efektywnego dostarczania siRNA do docelowych komórek i tkanek. W doświadczeniach *in vivo* bądź testach klinicznych siRNA mogą być podawane miejscowo (np. do oka lub nosa) lub systemowo (dożylnie lub podskórnice) [83]. Innym częstym sposobem jest użycie siRNA połączonego ze specjalnymi nośnikami, takimi jak kationowe polimery i liposomy [84, 85].

Obecnie badania oparte o zjawisko RNAi stanowią niezwykle dynamicznie rozwijającą się dziedzinę. siRNA są powszechnie stosowanym narzędziem w wielu badaniach *in vitro* oraz *in vivo* w zakresie biologii i medycyny na całym świecie [86]. Wiele firm biotechnologicznych specjalizuje się w projektowaniu i wytwarzaniu syntetycznych siRNA, które można użyć do badań w obszarze genomiki funkcjonalnej, do m.in.: poznawania mechanizmów sygnalizacji komórkowej, apoptozy, różnicowania komórek, śledzenia szlaków metabolicznych [87-89]. Ponadto, stanowią potencjalne narzędzie do wyciszenia genów związanych z patogenezą chorób u ludzi i zwierząt. Uniwersalność siRNA polega na tym, że z jednej strony mogą być używane, jako sekwencyjnie specyficzne inhibitory ekspresji określonych genów w celach terapeutycznych, a z drugiej strony, jako narzędzia do identyfikacji i badania funkcji genów, których wyciszenie prowadzi do cofnięcia lub zahamowania choroby [90, 91]. Coraz większa liczba badań klinicznych opartych na RNAi sugeruje, że strategia ta

może stanowić przełom współczesnej medycyny w aspekcie diagnostycznym i terapeutycznym.

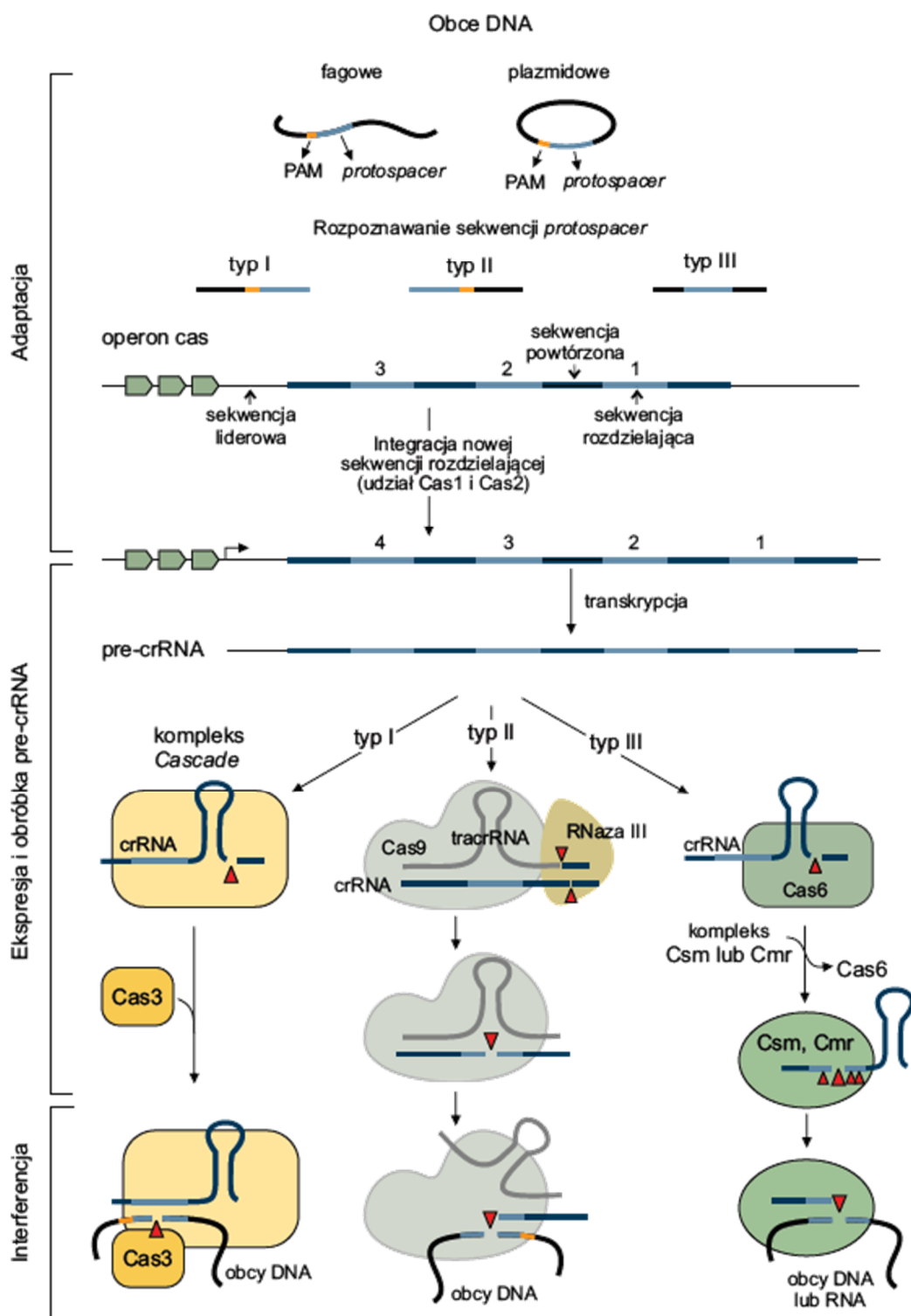
7. Strategia w oparciu o system CRISPR-Cas

W ostatnim czasie w centrum zainteresowania wielu ośrodków naukowych znalazły się modyfikacje genomów z wykorzystaniem enzymów hydrolizujących wiązanie fosfodiesterowe. Możliwość precyzyjnych zmian fragmentów DNA na drodze ukierunkowanej mutagenezy sekwencyjno-specyficznej stanowi ważne osiągnięcie dla rozwoju biologii molekularnej czy biotechnologii. Rewolucją okazały się precyzyjne modyfikacje genomów z zastosowaniem tzw. programowanych nukleaz, do których zalicza się system CRISPR-Cas [92]. Ogólnie zmiany w genomie z użyciem takich enzymów opierają się na katalizowaniu powstawania dwuniciowych pęknięć w helikalnym DNA w ściśle określonym miejscu. Te precyzyjne modyfikacje nazywane są mianem edycji genomu (ang. *genome editing*). Początkowo do edycji genomu komórek ssaków wykorzystywano endonukleazy, określane, jako samonaprowadzające endonukleazy lub meganukleazy. Przykładami są enzymy: I-SceI występujący w mitochondriach u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [93] oraz I-CreI obecny w chloroplastach zielenicy *Chlamydomonas reinwardtii* [94]. Jednak dużym ograniczeniem projektowania i stosowania wymienionych białek był brak ścisłego powiązania między ich sekwencją aminokwasową a swoistością rozpoznawania docelowej sekwencji DNA. Dlatego podejmowano próby stworzenia nowych enzymów, m.in. udało się wykorzystać nukleazy zawierające domenę palca cynkowego (ZNF, ang. *zinc finger nuclease*). Enzym ZNF jest białkiem fuzyjnym złożonym z dwóch domen (wiążącej DNA oraz nukleazowej, posiadającej enzym restrykcyjny typu IIS) i aktywnym tylko w postaci dimeru. Niestety przygotowanie białka ZNF jest czasochłonne i wymaga dużych nakładów finansowych, ponadto enzym ten odznacza się dużą cytotoksycznością [95]. Ostatnio do edycji genomu wykorzystano nukleazy podobne do białek ZNF, w których domena palca cynkowego została zastąpiona domenami wiążącymi DNA z białek bakterii z rodzaju *Xanthomonas*. Enzymy te należą do czynników transkrypcyjnych aktywujących proces syntezy RNA (TALE, ang. *transcription activator-like effectors*). W białku TALE domena wiążąca DNA jest złożona z powtórzonych sekwencji aminokwasowych, z których każda rozpoznaje pojedynczą parę zasad w DNA. Dzięki temu nukleazy TALE odznaczają się dużą

precyzją i skutecznością działania oraz są powszechnie wykorzystywane do edycji genomu komórek eukariotycznych [96].

Do generowania zmian w genomach stosuje się również system CRISPR-Cas, który stanowi alternatywę dla opisanych enzymów. Ten system jest dość powszechnym rodzajem mechanizmu odpornościowego bakterii i archeonów przeciwko obcym plazmidom lub cząsteczkom wirusowym. W przeciwieństwie do meganukleaz oraz nukleaz ZNF i TALE, w systemie CRISPR-Cas za rozpoznawanie docelowych sekwencji DNA odpowiada komplementarny, krótki RNA [97]. Jednostki systemu CRISPR-Cas zostały po raz pierwszy scharakteryzowane trzydzieści lat temu, a w genomowym *locus* CRISPR jest kodowana endonukleaza Cas9. Jest to monomeryczne białko tworzące kompleks z dwoma małymi RNA, w tym CRISPR RNA (crRNA) i transaktywującym crRNA (tracrRNA). Obie jednostki RNA pozwalają na rozpoznanie i przecięcie docelowej sekwencji w obcym DNA plazmidowym czy DNA wirusowym. Można wyróżnić trzy główne typy systemów CRISPR-Cas, tj. I, II i III oraz wiele podtypów w zależności od organizacji, a także mechanizmu działania [98].

Mechanizm działanie systemu CRISPR-Cas przebiega w kilku etapach (Rys. 6). Pierwszy etap to adaptacja, po infekcji komórki obcym plazmidem lub cząsteczką wirusową, krótki fragment DNA plazmidowego lub wirusowego jest włączany do sekwencji CRISPR na końcu liderowym *locus* w genomie gospodarza. Odcinek ten jest nazywany sekwencją rozdzielającą oraz jest otoczony przez identyczne fragmenty o długości kilkudziesięciu nukleotydów, będące powtórzeniami prostymi. Następnie dochodzi do powstania pierwotnego transkryptu (pre-crRNA), który zawiera wszystkie sekwencje rozdzielające i powtórzenia proste (etap ekspresji). W systemach CRISPR-Cas typu I i III pre-crRNA jest hydrolizowane przez endonukleazy w rejonie powtórzeń prostych i wówczas powstają dojrzałe crRNA. Dodatkowo, w systemie typu III crRNA są przecinane w odstępach sześciu nukleotydów i tworzą pulę dojrzałych crRNA o różnej długości. W przypadku systemu typu II pre-crRNA ulegają hybrydyzacji z sekwencjami tracrRNA, a następnie powstały dupleks jest rozcinany przez bakteryjną RNazę III w obecności enzymu Cas9. W wyniku tego procesu tworzą się dojrzałe crRNA. W ostatnim etapie dochodzi do degradacji obcego DNA (i/lub RNA w systemie typu III) dzięki aktywności kompleksu rybonukleoproteinowego crRNA z Cas w przypadku systemu typu I i III lub pojedynczej nukleazy (system typu II) [99].



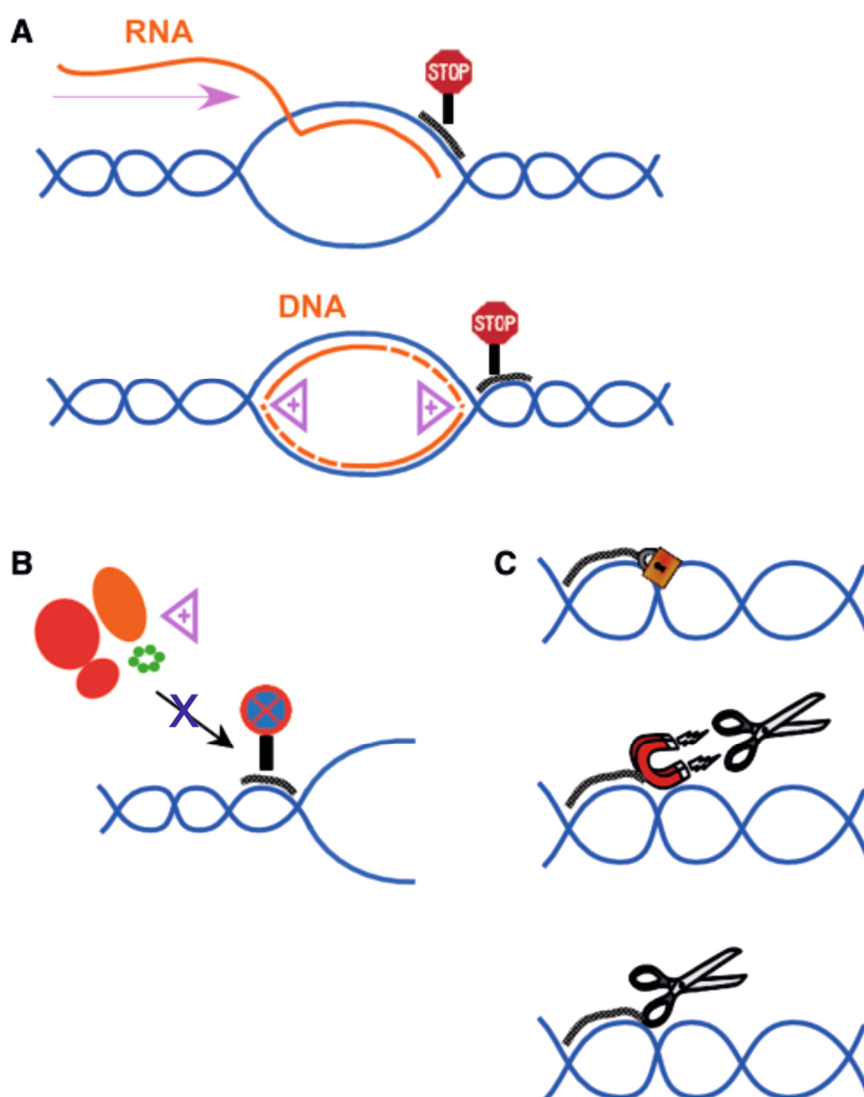
Rysunek 6. Schemat mechanizmu CRISPR-Cas [100].

Wprowadzanie precyzyjnych modyfikacji fragmentów DNA w genomach eukariotycznych ma istotne znaczenie w poznawaniu i zrozumieniu funkcji konkretnych genów lub innych elementów genetycznych. Ponadto, możliwość edycji genomów stanowi ważne osiągnięcie dla badań z zakresu biologii roślin, biotechnologii,

diagnostyki, a także medycyny. Zastosowanie ukierunkowanej sekwencyjno-specyficznej modyfikacji DNA zostało opisane, m.in.: do indukowania mutagenezy u kukurydzy [101], do usunięcia transgenicznych sekwencji u rzodkiewnika [102], jak również w transgenezie wielokrotnej u bawełny [103]. Wykorzystanie strategii opartej na edycji genomów może, zatem stanowić skuteczne narzędzie do regulacji ekspresji określonych genów lub usuwaniu niepożądanych elementów genetycznych. Ponadto, system CRISPR-Cas może być wykorzystany w celu projektowania oraz tworzenie komórkowych i zwierzęcych modeli wielu chorób, na przykład nowotworowych [104]. Wprowadzenie trwałych zmian w genomie może być również użyte do modyfikacji genetycznych zwierząt lub linii komórkowych, a także do wizualizacji określonych miejsc w genomie żywych komórek. Co więcej, duże nadzieje wiąże się z rozwojem i wykorzystaniem programowanych enzymów nukleolitycznych w diagnostyce oraz medycynie, m.in. do szybkiego rozpoznawania i zwalczanie infekcji wirusowych oraz walki z chorobami o podłożu genetycznym [99].

8. Strategia antygenowa w oparciu o struktury trójniciowe

Terapia antygenowa nakierowana jest na naprawę defektów genetycznych (mutacji) powstałych w genomie, zmianę aktywności (wyciszenie lub wzmocnienie) tych genów, których produkty białkowe są szkodliwe dla organizmu i stanowią przyczynę choroby, bądź też całkowite zahamowanie ich ekspresji [105]. W związku z powyższym, nastąpił dynamiczny rozwój technologii opartych na kwasach nukleinowych wykorzystywanych w diagnostyce i terapii. Obok wcześniej opisanych strategii (*Podrozdziały 1-7*) możliwe jest również wykorzystanie oligonukleotydów oddziałujących z dwuniciowym DNA lub RNA i tworzących trwałe kompleksy - struktury trójniciowe, tzw. trypleksy. W takiej formie DNA lub RNA może blokować, na przykład proces transkrypcji. Na Rysunku 7 zaprezentowano przykłady wykorzystania trypleksów, jako narzędzi do blokowania transkrypcji i replikacji.



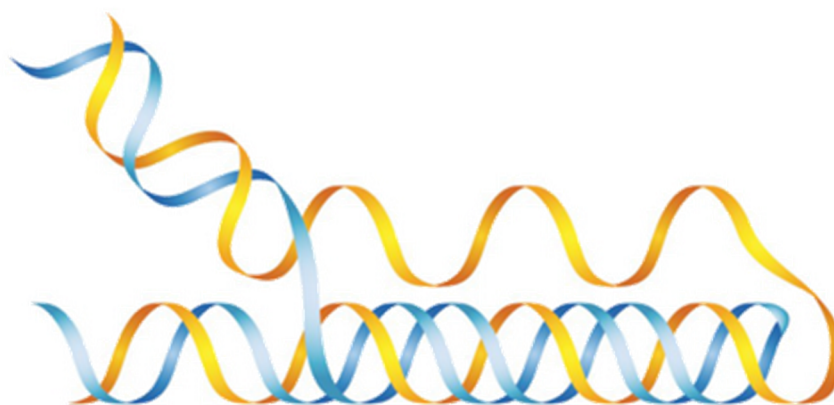
Rysunek 7. Przykłady wykorzystania trypleksów do blokowania procesu transkrypcji lub replikacji przez: tworzenie zawady przestrzennej (A), wiązanie się z docelową sekwencją (B) oraz dostarczanie czynników modyfikujących, sieciujących lub przecinających docelową sekwencję (C) [105].

8.1 Struktury trójniciowe DNA (H-DNA) oraz ich występowanie

Powstanie struktury trójniciowej kwasu nukleinowego po raz pierwszy zaobserwowano w 1957 roku [106]. W swoich badaniach Felsenfeld i współpracownicy wykazali, że oligonukleotyd zbudowany z reszt urydyny (poliU) specyficznie oddziałuje z dupleksem złożonym z nici poliurydynowej (poliU) i poliadenozynowej (poliA). W wyniku tego oddziaływania tworzy się stabilna struktura trypleksu. Chociaż znaczenie tego odkrycia było niejasne w tym czasie, zapoczątkowało rozwój dyscypliny, w której trypleksy DNA były badane pod kątem potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Następne lata przyniosły ogromny postęp pozwalający na

charakterystykę i optymalizację tworzenia struktur trypleksowych, o czym świadczą liczne doniesienia literaturowe [107-111]. Występowanie w warunkach *in vivo* DNA lub RNA w postaci struktur wieloniciowych i wyjaśnienie funkcji biologicznych tych form są nadal przedmiotem intensywnych badań.

Badania dotyczące struktur trójniciowych prowadził Frank-Kamenetskii wraz z zespołem w latach osiemdziesiątych [112, 113]. Grupa badaczy udowodniła powstawanie niekanonicznych form DNA w wyniku oddziaływania homopuryno-, homopirymidynowych powtórzeń lustrzanych w plazmidach za pomocą techniki dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Stwierdzono, że fragmenty bogate w reszty purynowe i pirymidynowe w zależności od warunków pH mogą przyjmować strukturę różniącą się od wcześniej poznanych - kanonicznej formy B-DNA czy lewoskrętnej Z-DNA. Autorzy wskazali także na znaczenie takich struktur dla aktywności nukleazy S1 [112, 113]. Struktury określane jako H-DNA powstają, gdy jedna część sekwencji lustrzanej (dupleksu) dysocjuje na pojedyncze łańcuchy purynowy i pirymidynowy, a następnie łańcuch homopirymidynowy ponownie przyłącza się do pozostałej połowy dupleksu i w bruzdzie większej tworzy się trypleks równoległy (Rys. 8). Pozostała część pojedynczej nici homopurynowej jest odpowiedzialna za podatność cząsteczki na działanie nukleazy S1. Istnieje również sytuacja, kiedy nić homopurynowa asocjuje ponownie z połową dupleksu tworząc trypleks antyrównoległy, określane jako *H-DNA [114]. Powstawanie tego typu trypleksu jest preferowane w obecności kationów dwuwartościowych.



Rysunek 8. Schemat struktury wewnętrzcząsteczkowego trypleksu H-DNA (zmodyfikowane, [115]).

Występowanie form H-DNA w żywych organizmach zostało potwierdzone m.in. w badaniach genu promotorowego *hsp26* u muszki owocowej (*D. melanogaster*), w których wykazano znaczenie traktu purynowo-pirymidynowego $(CT)_n \cdot (GA)_n$ dla prawidłowego tworzenia struktury chromatyny oraz aktywacji genu [114]. Identyfikacja białek zdolnych do łączenia się z fragmentami trypleksu stanowi kolejny dowód występowania tych struktur *in vivo* [116, 117]. Ważne w tym kontekście wydaje się wyjaśnienie roli trypleksów w regulowaniu procesu transkrypcji. Liczne prace wskazują na aktywność tych struktur, jako czynników *trans* m.in. w komórkach mysich [118-120]. Zaobserwowano występowanie sekwencji zawierających reszty guanozyny przed genami, działających, jako aktywatory oraz preferencyjne tworzenie przez nie formy H-DNA i blokowanie transkrypcji w układzie *trans* [118]. Z doniesień literaturowych wynika, że struktury trójniciowe mogą się tworzyć również przejściowo w procesie homologicznej rekombinacji [119, 120]. Wprowadzenie sekwencji poli(dG) i poli(dC) pomiędzy dwa powtórzenia powodowało homologiczną rekombinację prawdopodobnie w wyniku powstania formy *H-DNA i następującego potem ponownego połączenia rozdzielonych sekwencji. Pojedyncza nić pochodząca z utworzonej struktury *H-DNA może działać, jako łańcuch inwazyjny w homologicznej rekombinacji [119, 121].

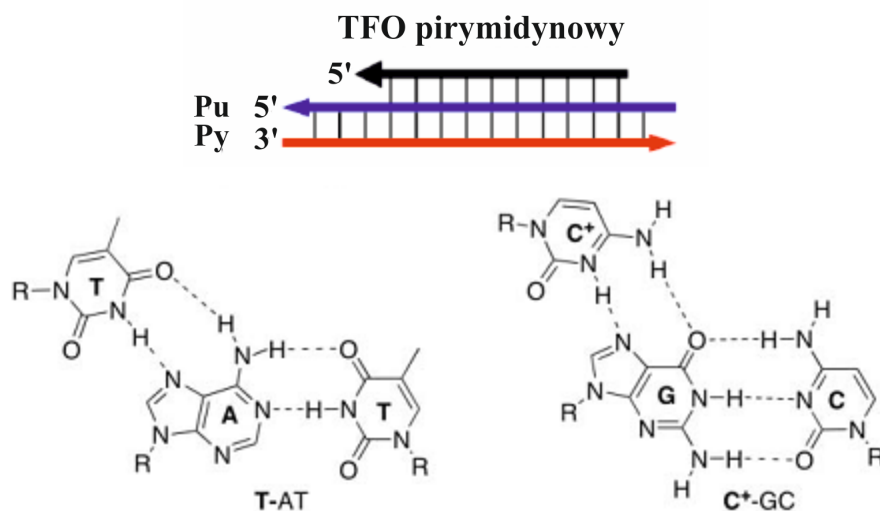
Naturalnie występujące sekwencje typu powtórzeń lustrzanych przyjmujące strukturę H-DNA bardzo często są spotykane w genomach ssaków, m.in. w ludzkim genomie. Wiadomo, że znacząca część sekwencji pirymidynowo-purynowych w genomach organizmów eukariotycznych jest zlokalizowana w regionach promotorowych i kodujących (eksonach) [122]. Przykładami takich miejsc, zdolnych potencjalnie do tworzenia struktur trypleksów są rejony 5' genów globulin β i γ , genu *c-myc* oraz genu receptora interleukiny 2. Regiony występowania traktów pirymidynowo-purynowych wskazują na ważną funkcję trypleksów w regulowaniu ekspresji genów powiązanych z chorobami [123, 124]. Ponadto, jak wynika z pracy Browna i Foxa z 1998 roku, struktury trójniciowe odgrywają znaczącą rolę w organizowaniu się chromosomów [125]. Stwierdzono, że ciągi purynowo-pirymidynowe mogą tworzyć pętle DNA, bądź pętle cykliczne lub w kształcie litery Ω , będące prawdopodobnie rezultatem tworzenia trypleksu [126].

8.2 Charakterystyka struktur trójniciowych DNA i RNA

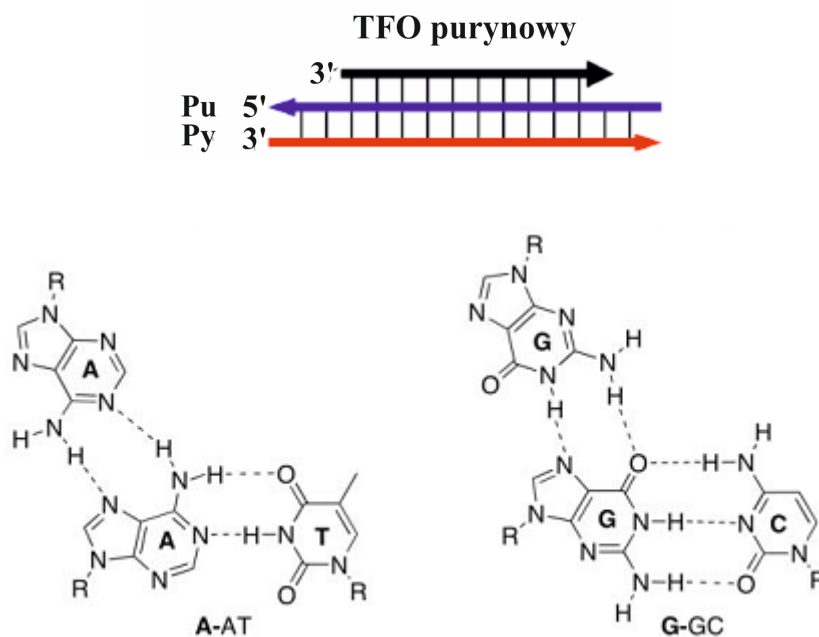
Trypleksy DNA są to struktury wyższego rzędu, które powstają przez wzajemne oddziaływania łańcuchów DNA. Mogą być w nie zaangażowane zarówno kolejne nici kwasu nukleinowego lub inne fragmenty tego samego DNA o określonej sekwencji lub też syntetyczne oligonukleotydy nazywane oligonukleotydami formującymi trypleks (TFO). Zasadniczo tworzenie trypleksów jest efektem zmian konformacyjnych zachodzących w podwójnej helisie, w wyniku, których dupleks jest w stanie zasocjować trzeci łańcuch w bruzdzie większej dupleksu [127]. W strukturze trypleksu ułożenie dwóch antyrównoległych nici połączonych wiązaniami według modelu Watsona-Cricka jest zbliżone do formy B-DNA. Podstawową różnicą jest odchylenie od osi i większe rozwinięcie helisy spowodowane zawadą przestrzenną wynikającą z asocjacji trzeciej nici. Tworzenie trypleksu w warunkach *in vivo* nie jest uwarunkowane obecnością specyficznych białek, ale istnieniem komplementarnych dwuniciowych traktów polipurynowo-polipirymidynowych [127].

Ogólnie struktury trypleksowe można podzielić na dwie kategorie w zależności od sekwencji TFO oraz ich orientacji względem docelowego miejsca wiązania w dwuniciowym DNA (Rys. 9). W motywie pirymidynowym, TFO składające się z reszt cytozyny i tyminy lub uracylu, przyłącza się do nici dupleksu bogatej w reszty purynowe, podczas gdy w motywie purynowym, TFO zawierające reszty adeniny i guaniny wiąże się do rejonów pirymidynowych w dwuniciowym DNA lub RNA [128]. Trypleks równoległy powstaje, gdy trzecia nić (pirymidynowa) ułożona jest w stosunku do nici dupleksu w sposób równoległy, tzn. jej koniec 3' oddziałuje z końcem 3' fragmentu dwuniciowego DNA (Rys. 9). Jest on stabilizowany przez wiązania wodorowe typu Hoogsteena (ang. *Hoogsteen hydrogen bonds*), a do jego utworzenia wymagana jest protonowanie azotu N³ reszty cytozyny w nici TFO, która zachodzi w środowisku kwasowym. Natomiast trypleks antyrównoległy tworzy się, gdy trzecia nić (purynowa) układa się antyrównoległe do nici dupleksu, czyli jej koniec 3' oddziałuje z końcem 5' podwójnej helisy przez wiązania wodorowe typu odwrotnych wiązań Hoogsteena (ang. *reverse Hoogsteen hydrogen bonds*) (Rys. 9) [128].

Trypleks równoległy



Trypleks antyrównoległy



Rysunek 9. Podział trypleksów ze względu na sekwencję i orientację TFO oraz schematy wiązań wodorowych występujących w trypleksach (zmodyfikowane, [129]).

Do powstania trwałego trypleksu jest wymagana pełna komplementarność zasad we wszystkich trzech niciach, a pojedyncze niesparowanie powoduje znaczącą destabilizację struktury [130]. W przypadku trypleksu antyrównoległego, kanoniczne motywy, tzn. G:GC, A:AT i T:AT są znacznie bardziej stabilne niż niekanoniczne. Poza

tym, oddziaływania motywów G:GC, A:AT i T:AT są specyficzne, a oligonukleotydy zawierające G, A lub T wykazują zdolność specyficznego rozpoznawania miejsc docelowych w duplesie stabilizowanym wiązaniami wodorowymi według modelu Watsona-Cricka. Stwierdzono również, że adenina może tworzyć tryplet z parą GC, natomiast tymina z parą CG. Jedynie para TA nie tworzy z innymi zasadami stabilnej struktury trypleksu, co z jednej strony stanowi duże ograniczenie powstawania trypleksów antyrównoległych. Z drugiej strony możliwość oddziaływania tyminy z parami AT i CG oraz adeniny z parami AT i GC powoduje obniżenie specyficzności tworzenia trypleksów antyrównoległych [130]. Dla trypleksu równoległego wykazano, że najbardziej trwałe struktury powstają w oparciu o motywy kanoniczne, tj. T:AT oraz C⁺:GC, gdzie C⁺ oznacza protonowaną resztę cytozyny. Tymina ma zdolność rozpoznawania pary AT i tworzenia trwałego trypleksu. Podobnie zachowuje się adenina, chociaż motyw A:AT jest mniej stabilny. W przypadku pary GC jest ona najlepiej rozpoznawana przez protonowaną cytozynę, jednak w zmienionych warunkach mogą także powstać mniej trwałe struktury, tj. A:TC, T:GC lub G:GC. Ponadto, wykazano, że guanina tworzy bardzo stabilne trypleksy z parą TA, ale w warunkach niskiego pH motyw C:TA jest najtrwalszy. Poza tym, istnieje możliwość rozpoznawania pary CG przez tyminę lub guaninę, jednak powstałe struktury nie są stabilne. Można zatem stwierdzić, że wszystkie cztery pary zasad mogą potencjalnie tworzyć trypleksy, w tym m.in.: T:AT, T:GC, C⁺:GC, C⁺:CG. Warto jednak podkreślić, że możliwość powstawania wielu wariantów trypleksów wiąże się z utratą ich specyficzności [131].

Trypleksy RNA, podobnie jak w przypadku DNA można podzielić na dwa rodzaje. Pierwszy rodzaj to struktury powstające w wyniku przyłączenie trzeciej nici (TFO) do bruzdy większej duplesu, natomiast drugi to trypleksy utworzone przez oddziaływania TFO z bruzdą mniejszą. Trypleksy pierwszej grupy zawierające motyw typu U:AU są stabilizowane przez wiązania wodorowe typu Hoogsteena oraz obecność jonów dwuwartościowych Mg²⁺. W ich strukturze łańcuch pirymidynowy (poliU) ułożony jest w sposób równoległy względem nici purynowej (poliA) duplesu, tworząc trypleks równoległy, nazywany również trypleksem o motywie pirymidynowym. Naturalnie występujące formy trójniciowego RNA z motywem typu U:AU po raz pierwszy były zaobserwowane w strukturze pseudowęzła ludzkiej telomerazy RNA [132, 133]. Jest to pseudowęzeł typu spinki (H-type, ang. *hairpin type*) zawierający dwa trzony oraz dwie pętle. W jego obrębie jest możliwe tworzenie trypleksu złożonego z motywów typu

U:AU, C⁺:GC lub U:GC dzięki oddziaływaniom między trzonem a jedną z pętli. Wykazano, że struktura trypleksu jest wysoce zachowawcza, a jej występowanie nie ogranicza się tylko do komórek człowieka, ale również innych kręgowców, a także drożdży czy orzęsków, co z kolei wskazuje na ważną rolę, jaką może ona pełnić w komórce [134, 135]. W kontekście funkcji biologicznych trypleks RNA typu pirymidynowego może wpływać na aktywność telomerazy, mieć znaczenie dla działania ryboprzełączników w regionach niekodujących mRNA [136, 137] oraz wpływać na zmianę ramki odczytu w regionach kodujących mRNA [138]. Drugi rodzaj struktur trójniciowych RNA to trypleksy antyrównoległe (purynowe) określane również z angielskiego jako motywy *A-minor* (ang. *A-minor motif triplex*), których występowanie potwierdzono w obrębie dużych RNA włączając: introny grupy I [139] i II [140], ryboprzełączniki [141], rybosomalne RNA [142, 143] oraz w kompleksach RNA-białko, w tym mRNA-tRNA-rybosom [144]. W tworzenie struktury trypleksu typu *A-minor motif* zaangażowane są oddziaływania trzeciorzędowe typu zasada-zasada i zasada-szkielet fosfocukrowy pomiędzy krawędziami rybozy, Watsona-Cricka adeniny i bruzdą mniejszą dupleksu RNA [144]. Chociaż trypleksy purynowe są zazwyczaj mało stabilne, to odznaczają się dużą elastycznością strukturalną, która objawia się tym, że wszystkie trzy krawędzie w łańcuchu purynowym mogą wchodzić w interakcje z bruzdą mniejszą dwuniciowego RNA. Przykładowo, w motywach trypleksowych typu *twisted A-minor motif* możliwa jest rotacja reszty adenozyiny wzdłuż bruzdy mniejszej dupleksu w taki sposób, że w oddziaływaniach trzeciorzędowych są zaangażowane trzy krawędzie: Hoogsteena, Watsona-Cricka i cukrowa reszty adenozyiny [136].

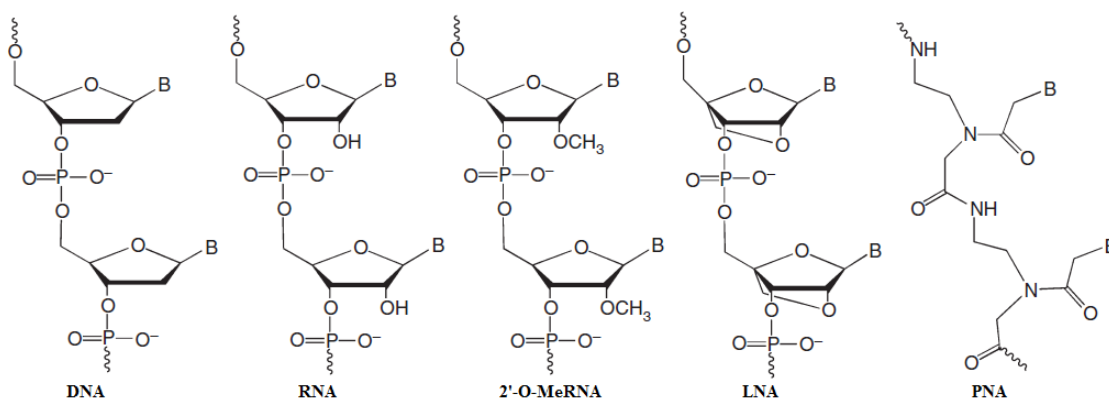
8.3 Modyfikacje chemiczne wpływające na stabilność struktur trójniciowych DNA i RNA

Tworzenie struktur trójniciowych DNA oraz RNA jest limitowane wieloma czynnikami, m.in.: warunkami pH, występowaniem ciągów homopurynowych i homopirymidynowych, długością takich łańcuchów oraz obecnością jonów dwuwartościowych [145]. Niska stabilność trypleksów w warunkach fizjologicznych jest częściowo spowodowana odpychaniem się ładunków między trzema ujemnie naładowanymi łańcuchami kwasu nukleinowego. W związku z tym, do stabilizacji struktur trypleksowych wymagane są wysokie stężenia jonów dwuwartościowych (np.

Mg²⁺, Zn²⁺) lub obecność poliamin (spermina, spermidyna, putrescyna), które neutralizują ujemny ładunek grup fosforanowych [145]. Przykładowo, w badaniach prowadzonych przez zespół Millera udowodniono, że struktura trypleksu w warunkach *in vitro* jest stabilna przy stężeniu jonów magnezu w zakresie 5-10 mM, podczas gdy w warunkach *in vivo* stężenie Mg²⁺ jest prawdopodobnie niższe od 1 mM [146]. Ponadto, konieczność protonowania reszt cytozyny w nici TFO trypleksu równoległego powoduje, że powstawanie takich struktur jest ściśle zależne od pH. W związku z tym, występowanie tego rodzaju trypleksów w warunkach obojętnego pH jest ograniczone. Wykazano, że zastąpienie reszt cytozyny trzeciego łańcucha naturalnie występującą 5-metylocytozyną znacząco zwiększało stabilność utworzonego trypleksu [147].

Intensywne badania dowodzą, że reguły tworzenia trypleksów DNA nie zawsze mogą być stosowane dla trypleksów RNA. Przede wszystkim, dlatego, że oligonukleotydy TFO łatwiej i znacznie silniej wiążą się do dwuniciowych cząsteczek DNA niż RNA [148, 149]. Tę obserwację potwierdzają, na przykład badania termodynamiczne, w których wykazano formowanie się trypleksu między TFO w serii DNA oraz 2'-O-MeRNA i dupleksem DNA, natomiast te same nici TFO nie tworzyły struktury trójniciowej z dupleksem RNA [150].

Szereg czynników determinujących powstawanie struktur trypleksowych DNA i RNA oraz wpływających na ich stabilność i aktywność biologiczną przyczynił się do rozwoju różnych metod modyfikacji chemicznej oligonukleotydów TFO. Ponadto, liczne przykłady zastosowania tych niekanonicznych struktur sprawiają, że istnieje konieczność ciągłego poszukiwania nowych sposobów polepszania właściwości fizykochemicznych i biologicznych TFO. Ogólnie, modyfikacje chemiczne można podzielić na trzy kategorie ze względu na część cząsteczki oligonukleotydu, której one dotyczą. Są to modyfikacje chemiczne w obrębie zasad heterocyklicznych, pierścienia cukrowego oraz wiązania fosfodiesterowego. Przykłady wybranych modyfikacji chemicznych przedstawiono na Rysunku 10.



Rysunek 10. Przykłady wybranych, syntetycznych analogów kwasów nukleinowych w porównaniu z naturalnymi DNA i RNA.

Dobrze poznaną modyfikacją nukleozasady jest reszta 5-metylocytozyny (mC), która wprowadzona do nici TFO zwiększa stabilność trypleksu w pH obojętnym. Już w latach osiemdziesiątych wykazano, że metylacja reszt cytozyny wpływa korzystnie na trwałość struktury trypleksu DNA w pH powyżej 6.0 [151]. Innymi przykładami analogów wpływającymi na trwałość trypleksów są reszty 2'-deoksyurydyny (dU) i 5-propynylo-2'-deoksyurydyny (pU). Podstawienie tymidyny pochodnymi dU i pU zwiększa powinowactwo oligonukleotydu TFO do dupleksu oraz ma korzystniejszy wpływ na stabilność tych struktur w porównaniu z resztą mC [152, 153]. Ponadto, dwie grupy badawcze z Wielkiej Brytanii (zespół Foxa i zespół Williamsa) wykorzystały inne modyfikacje chemiczne reszt tyminy i cytozyny w badaniach termodynamicznych i strukturalnych trypleksów [154-157]. Po pierwsze, pokazano, że pochodne tyminy z podstawnikiem alkilowym w pozycji C5 (U^P) oraz z podstawnikiem etoksylovym lub grupą aminową w pozycji 2' pierścienia cukrowego (EA-T) w znacznym stopniu zwiększają trwałość utworzonego trypleksu. Po drugie, stwierdzono, że na efekt stabilizujący analogów U^P , EA-T nie wpływa stężenie soli, natomiast jest on zależny od warunków pH [155]. Poza tym, trypleksy utworzone przez oligonukleotydy TFO zawierające modyfikacje chemiczne zarówno typu bis-amino-U (BAU), jak i 3-metylo-2-aminopirimidyna (^{Me}P) charakteryzowały się dużą stabilnością termodynamiczną [157]. Wprowadzenie obu pochodnych do nici TFO sprzyjało powstawaniu stabilnej struktury w warunkach fizjologicznego pH. Ciekawa obserwacja dotyczyła zależności między powinowactwem TFO do dupleksu a liczbą podstawień BAU i ^{Me}P oraz ich rozmieszczeniem w łańcuchu oligonukleotydu. TFO zawierające równomiernie

rozmieszczone analogi BAU i ^{MeP} wiązały się znacznie lepiej do podwójnej helisy niż te, w których były one zgrupowane [157].

Kolejnym rodzajem modyfikacji chemicznych nukleozydów pirymidynowych jest zastąpienie atomu tlenu O2 w tymidynie, cytydynie i urydynie, a także atomu tlenu O4 w tymidynie i urydynie innymi atomami lub grupami funkcyjnymi. Przykładowo, substytucja atomu O2 urydyny atomem siarki prowadzi do powstania pochodnej 2-tiourydyny (2-tioU). Z doniesień literaturowych wiadomo, że wprowadzenie 2-tioU do oligonukleotydu TFO powoduje wzrost stabilności termodynamicznej trypleksów zarówno RNA, jak i DNA [150, 158]. Efekt stabilizujący 2-tiourydyny może wynikać ze wzmocnienia różnych oddziaływań, m.in.: oddziaływań van der Waalsa, oddziaływań warstwowych zasad i wiązań wodorowych. Zaobserwowano, że podstawienie analogu 2-tioU odznaczającego się mniejszą elektrofilowością może przesuwać stałą dysocjacji (pK_a) donora wiązania wodorowego od wartości powyżej 7.0 w kierunku wartości bliskiej 7.0, a w konsekwencji zwiększać siłę tego wiązania [159]. Ponadto, zmniejszenie bariery energetycznej związanej z procesem dehydratacji i poprawa oddziaływań van der Waalsa między atomem siarki a atomem wodoru (H8) adeniny również przyczynia się do wzrostu powinowactwa nici TFO [160]. Atom siarki jest bardziej polaryzowalny, dlatego może powodować wzrost oddziaływań warstwowych. Poza tym, pochodna 2-tioU wymusza konformację pierścienia cukrowego *C3'-endo*, typową dla formy A-RNA. Zmiana konformacji zachodzi również na przyległych resztach nukleotydowych od strony 3' modyfikacji, co powoduje usztywnienie całej struktury i wzrost jej stabilności [150].

8-Aminopurynorybozydy stanowią kolejną grupę analogów nukleozasad korzystnie wpływających na stabilność trypleksów. Intensywne badania tych pochodnych były prowadzone przez zespół Orozco, który określił wpływ wprowadzenie do TFO 8-aminoadeniny i 8-aminoguaniny na trwałość termodynamiczną struktur trójniciowych DNA przez wykorzystanie technik spektroskopowych oraz metod dynamiki molekularnej [161, 162]. Wykazał, że podstawienie atomu azotu w pozycji 8 puryny grupą aminową zwiększa stabilność trypleksu. Innym przykładem analogów nukleozydów jest 2'-deoksy-6-tioguanozyna, która podobnie jak wcześniej opisane pochodne zwiększa trwałość utworzonego trypleksu [163]. W celu polepszenia właściwości oligonukleotydów TFO oprócz wymienionych modyfikacji chemicznych, z powodzeniem stosuje się również inne podejścia. W jednej ze strategii są wykorzystywane związki zdolne do interkalacji między oba końce nici (koniec 3' i

koniec 5') lub wewnątrz cząsteczki TFO. Przykładami heterocyklicznych związków o takich właściwościach są akrydyna [164] i pochodne karbazolu [165]. Poliaminy (np. spermina) zazwyczaj przyłącza się do końców oligonukleotydu TFO, w wyniku, czego powstają koniugaty. Zastosowanie takich koniugatów umożliwia tworzenie się stabilnych trypleksów, które mogą zawierać niesparowane zasady lub powstawać przy braku jonów Mg^{2+} [166]. Ponadto, wykazano, że psoralen może również wpływać na tworzenie się trypleksów, ponieważ związany z TFO zwiększa powinowactwo oligonukleotydu do dupleksu [167].

Drugie podejście skupia się na rozwijaniu nowych metod modyfikacji nukleozasad, tak by mogły one oddziaływać ze swoimi sąsiadami jednej lub drugiej nici dupleksu. Taka strategia znajduje potencjalne zastosowanie, gdy dwa krótkie fragmenty homopurynowe występują w obu łańcuchach dwuniciowego DNA lub RNA. W ten sposób zmodyfikowany TFO może przyjmować dwie orientacje (równoległą lub antyrównoległą) względem podwójnej helisy. To podejście zostało wykorzystane w badaniach m.in. przez grupy Hélène [168] oraz Browna [169]. Poza tym, dobrym narzędziem w tej strategii mogą być także kowalencyjnie połączone oligonukleotydy TFO służące do rozpoznawania i wiązania określonych sekwencji DNA lub RNA [170].

Wiadomo, że konformacja *C3'-endo* reszty rybozy, typowa dla formy A-RNA jest preferowana podczas tworzenia trypleksów, ze względu na korzystny efekt entropowy [105]. W związku z tym, poszukiwanie i synteza analogów nukleozydów, które utrzymują lub wymuszają przyjęcie takiej konformacji rybozy stało się celem intensywnych badań wielu grup badawczych [127, 171, 172]. Obok szeregu analogów zasad heterocyklicznych opracowano także wiele modyfikacji chemicznych pierścienia cukrowego. Wykazanie, że TFO w serii RNA tworzy bardziej stabilne trypleksy niż TFO w serii DNA, przyczyniło się do rozwoju przede wszystkim metod syntezy chemicznej pochodnych rybozy [168]. Najczęściej spotykaną jest metylacja grupy 2'-hydroksylowej. Oligonukleotydy zawierające 2'-O-MeRNA są odporne na degradację przez nukleazy, dzięki czemu mogą zwiększać stabilność trypleksów w środowisku komórkowym. Wyniki licznych badań potwierdzają, że modyfikacja 2'-O-MeRNA jest powszechnie stosowana, jednak w różny sposób wpływa na stabilność struktur trójniciowych [173-175]. Wykazano, że wprowadzenie reszty 2'-O-MeRNA zwiększa stabilność trypleksów DNA, natomiast w przypadku trypleksów RNA ma efekt destabilizujący. Poza tym, zauważono zależność między liczbą podstawień typu 2'-O-MeRNA a trwałością termodynamiczną struktur trójniciowych RNA i DNA. Trypleks

RNA zawierający trzy reszty 2'-O-MeRNA odznaczał się mniejszą stabilnością termodynamiczną niż jego niemodyfikowany odpowiednik. Tymczasem w przypadku trypleksów DNA był zaobserwowany odwrotny efekt, tj. stabilizujący. Ponadto, podstawienie wszystkich reszt nukleotydowych w TFO modyfikacją 2'-O-MeRNA nie pozwalało na tworzenie się trypleksu RNA [150]. Innym przykładem modyfikacji reszty cukrowej jest pochodna 2'-aminoetyloribozy (2'-O-AE, ang. *2'-aminoethylribose*). Badania Blommers i wsp. wykazały, że wprowadzenie analogu 2'-O-AE do oligonukleotydu TFO korzystnie wpływało na tworzenie stabilnego trypleksu, dzięki utrzymaniu konformacji *C3'-endo* reszty cukrowej i wniesieniu dodatniego ładunku pochodzącego od grupy aminowej [176].

Wśród modyfikacji chemicznych pierścienia cukrowego na szczególną uwagę zasługują również analogi LNA. Monomer LNA został po raz pierwszy zsyntetyzowany niezależnie przez grupy Imanishiego [177] oraz Wengela [178]. W tym samym roku duńska firma biotechnologiczna Exiqon A/S otrzymała wyłączne prawa do technologii LNA zabezpieczone patentem [179]. Pod względem chemicznym analog LNA posiada pomiędzy atomami O2' i C4' pierścienia rybozy dodatkowy mostek metylenowy. Dzięki kowalencyjnemu zablokowaniu fragmentu cukrowego zostaje zachowana konformacja *C3'-endo*, co sprzyja korzystnym zmianom w entropii bądź entalpii podczas tworzenia się trypleksów [180]. Z doniesień literaturowych wynika, że już pojedyncza modyfikacja LNA wpływa na zwiększenie trwałości termodynamicznej tworzonych trypleksów RNA i DNA [150]. Przykładowo, wykorzystując spektroskopię NMR potwierdzono tworzenie się w pH 8.0 stabilnego trypleksu między dwuniciowym DNA a oligonukleotydem TFO zawierającym modyfikację LNA [181]. W odniesieniu do analogów LNA, ustalono także addytywność efektów stabilizacyjnych, które wynikały z wprowadzenia więcej niż jednej reszty LNA [150, 182]. Jednak, nic TFO zbudowana wyłącznie z nukleotydów LNA nie wykazywała powinowactwa do dupleksu i nie tworzyła z nim struktury trójniciowej [180]. Ciekawym podejściem było zastosowanie analogów LNA zawierających grupę aminową w pozycji 2' rybozy (2'-amino-LNA) oraz funkcjonalizację grupami pirenową lub acetylową [183]. W badaniach termodynamicznych wymienionych pochodnych wykazano, że wprowadzenie modyfikacji 2'-amino-LNA ma korzystny wpływ na stabilność trypleksów DNA, a funkcjonalizacja grupą acetylową dodatkowo zwiększa ten efekt. Natomiast, wykorzystanie podstawnika pirenowego skutkowało obniżeniem trwałości trypleksu [183].

Zespół Imanishiego rozwinął także metodę syntezy innych analogów nukleozydowych, a mianowicie kwasów nukleinowych z mostkiem etylenowym (ENA, ang. *2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids*) [184]. Modyfikacje ENA, podobnie jak reszty LNA, pozwalają na usztywnienie pierścienia cukrowego w konformacji *C3'-endo*. Wykazano, że wprowadzenie tego typu pochodnych nukleozydów do oligonukleotydu TFO sprzyja powstawaniu stabilnych trypleksów w warunkach fizjologicznego pH. W przeciwieństwie do modyfikacji LNA, całkowite zastąpienie reszt nukleotydom w TFO analogami ENA pozwala na tworzenie struktur trypleksowych. Dodatkową zaletą analogów ENA jest ich odporność na degradację przez nukleazy komórkowe [184]. Zarówno modyfikacja LNA, jak i ENA są przykładami większej rodziny analogów nukleozydowych, tzw. bicyklicznych kwasów nukleinowych (BNA, ang. *bicyclic nucleic acids*). Grupa pochodnych BNA obejmuje nukleozydy bicykliczne, w których część cukrowa zawiera mostek łączący dwa atomy pierścienia furanozowego, tworząc przez to bicykliczny układ pierścieniowy [185].

Oprócz modyfikacji LNA należy wymienić pochodne nukleozydowe określane, jako kwasy nukleinowe o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (UNA, ang. *unlocked nucleic acids*) [186]. Stanowią one nową klasę modyfikacji pierścienia cukrowego, w którym usunięto wiązanie pomiędzy atomem węgla C2' i C3'. Zmiana struktury rybozy powoduje wzrost elastyczności cząsteczki, co z kolei może wpływać na stabilność modyfikowanych oligonukleotydów. Badania stabilności termodynamicznej dupleksów DNA i RNA pokazały, że reszta UNA jest czynnikiem zdecydowanie destabilizującym [186-188]. Wykazano również, że obecność modyfikacji UNA wpływa na aktywność siRNA w sposób zależny od miejsca podstawienia [189]. W kontekście stabilności struktury trypleksu, badania termodynamiczne i biologiczne pokazały, że modyfikacji UNA obniża ich stabilność [190]. Jednak, włączenie reszt typu UNA w pewne pozycje dwuniciowego DNA okazało się korzystne energetycznie lub nie miało wpływu na stabilność struktury. Najbardziej stabilny wariant trypleksu z modyfikacjami UNA tworzył się zarówno w kwasowym pH, jak i obojętnym pH [190].

Morfolinowe pochodne kwasów nukleinowych stanowią kolejną grupę związków o pożądanych właściwościach stabilizujących struktury trypleksów [191]. Zostały one wprowadzone już pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku [192]. Są to związki, w których pięciocząłowy pierścień cukrowy został zastąpiony sześciocząłowym pierścieniem morfolinowym. Poza tym, wiązanie fosfodiesterowe niosące ujemny

ładunek podstawiono niejonowym wiązaniem amidofosforanowym. Zmiany strukturalne tych analogów mają pewne korzystne cechy, m.in.: wykazują wysokie powinowactwo do komplementarnych sekwencji, są stabilne w systemach biologicznych, bardzo dobrze rozpuszczają się w roztworach wodnych, nie oddziałują z białkami, brak ładunku umożliwia wydajny transport do komórki [193]. Liczne prace eksperymentalne dowodzą, że pochodne morfolinowe mogą być z powodzeniem stosowane do poprawy powinowactwa modyfikowanych TFO do dupletu DNA i zwiększenia stabilności trypleksów [191, 194, 195]. Analizy termodynamiczne i strukturalne wykazały, że morfolinowe TFO wiąże dwuniciowy DNA z wysokim powinowactwem i tworzy stabilną strukturę trypleksu [191]. Reszty morfolinowe obecne w oligonukleotydzie TFO zwiększały stałą wiązania tworzącej się struktury trypleksu, a tym samym powodowały znaczny wzrost stabilności termicznej. Dodatkowo pokazano, że dzięki wprowadzeniu pochodnych morfolinowych do nici TFO powstają stabilne trypleksy w warunkach obojętnego pH i wysokiego stężenia jonów magnezu, a także przy ich braku, podczas gdy struktury z niemodyfikowanymi TFO nie tworzą się [191]. W związku z powyższym, pochodne morfolinowe mogą być powszechnie stosowane w projektowaniu oligonukleotydów TFO.

Obecność ujemnie naładowanych reszt fosforanowych powodujących, odpychanie się łańcuchów dupletu DNA lub RNA ma niekorzystny wpływ na ich hybrydyzację w warunkach fizjologicznych. Stąd uważa się, że usunięcie ujemnego ładunku przyczyni się do wzrostu trwałości takiego dupletu. W celu zmiany właściwości elektrostatycznych oligonukleotydów, zwiększenie ich odporności na działanie nukleaz oraz polepszenia wydajności transportu do komórki rozwinięto różne metody modyfikacji chemicznych szkieletu fosforanowego [105]. Modyfikacja wiązania internukleotydowego zwykle polega na zastąpieniu niewiążącego atomu tlenu przez inne atomy (np. siarki) lub grupy chemiczne, w tym borowodorową BH_3 (boranofosforany), metylową (metylofosfoniany) oraz aminową (amidofosforany).

Tiofosforanowe analogi oligonukleotydów (PS, ang. *phosphorothioate oligonucleotides*) są obecnie ważnym i często stosowanym narzędziem w badaniach strukturalnych i biologicznych kwasów nukleinowych, w tym trypleksów [9]. Podstawienie niewiążącego atomu tlenu przez atom siarki w pochodnych tiofosforanowych w znacznym stopniu podnosi stabilność oligonukleotydu i chroni przed szybką degradacją w środowisku wewnątrzkomórkowym [196]. Jednak, w przypadku struktur trypleksowych doniesienia literaturowe wskazują, że pochodne

tiofosforanowe nie wpływają korzystnie na stabilność trypleksów [197, 198]. Jednakże, według badań Lacoste i wsp. wykorzystanie analogów PS połączonych kowalencyjnie z resztami akrydyny pozwoliło na powstanie stabilnego trypleksu [198].

Amidofosforany (PN, ang. *phosphoramidates*) są kolejną grupą modyfikowanych analogów oligonukleotydów, które zbadano m.in. pod kątem potencjalnego zastosowania w strategii wykorzystującej trypleksy [199, 200]. Metody syntezy chemicznej tych pochodnych były rozwijane już w latach dziewięćdziesiątych m.in. przez zespoły Gryaznova [199] i Orgela [201]. Analogi PN można zasadniczo podzielić na dwa rodzaje: N3'→P5' amidofosforany, w których każdy z wiążących atomów tlenu w pozycji 3' zastąpiono grupą –NH oraz P3'→N5' amidofosforany, gdzie podstawiono każdy z wiążących atomów tlenu w pozycji 5'. Pochodne PN, podobnie jak naturalne oligonukleotydy występują w formie zjonizowanej i w obojętnym pH obdarzone są ładunkiem ujemnym [202]. Wpływ obecności analogów amidofosforanowych w nici TFO na stabilność trypleksów został określony m.in. w badaniach Daglea i Weeksa [203] oraz Escude i wsp. [168]. Obie grupy wykazały, że zastąpienie wiązania internukleotydowego w TFO pochodnymi amidofosforanowymi może mieć korzystny wpływ na tworzenie struktur trójniciowych DNA. Ponadto, w badaniach *in vitro* Escude i wsp. zaobserwowali, że oligonukleotydy TFO zawierające analogi PN wiążą się specyficznie do dwuniciowego DNA i hamują proces transkrypcji [168]. Dodatkowo, według badań Daglea i Weeksa wprowadzenie grupy (N-alkilo)-amidofosforanowej obdarzonej ładunkiem dodatnim do łańcucha TFO powoduje znaczny wzrost stabilności termicznej trypleksu [203]. Liczne przykłady prac eksperymentalnych, w których stosowano analogi PN świadczą o tym, że stanowią one dobrą alternatywę dla naturalnych oligonukleotydów [204-206].

PNA są nową klasą analogów kwasów nukleinowych posiadającą ciekawe i nietypowe właściwości chemiczne. Łatwa synteza chemiczna, odporność na działanie nukleaz, stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury zainspirowały wielu badaczy do wykorzystania PNA zarówno w biologii molekularnej, jak i w celach terapeutycznych. Technologia PNA była opracowana i rozwijana przez Nielsena w laboratorium Buchardta [207, 208]. W strukturze PNA szkielet fosfocukrowy został zastąpiony poliamidem, w którym poszczególne jednostki są połączone ze sobą wiązaniami peptydowymi. Szkielet PNA składa się z powtarzających się podjednostek *N*-(2-aminoetylo)-glicyny, a wszystkie wiązania peptydowe między nimi różnią się od tych występujących między aminokwasami w łańcuchu białek. Skutkiem tych różnic

strukturalnych jest większa stabilność i odporność PNA na działanie nukleaz komórkowych. Cząsteczki PNA, podobnie jak kwasy nukleinowe zawierają zasady azotowe: purynowe (adenina, guanina) i pirymidynowe (tymina, cytozyna) połączone ze szkieletem za pomocą mostków metyleno-karbonylowych. Pod względem chemicznym analogi PNA bardziej przypominają peptydy niż kwasy nukleinowe. Na podstawie ich budowy można uważać, że są hybrydami, które łączą cechy kwasów nukleinowych i białek. Podstawową różnicą pomiędzy PNA a DNA i RNA jest brak ładunku ujemnego w szkielecie cząsteczki. Dzięki temu nie następuje odpychanie elektrostatyczne podczas tworzenia się dupleksów zarówno typu PNA/PNA, jak również PNA/DNA i PNA/RNA. Brak tych oddziaływań sprawia, że analogi PNA silniej wiążą się z kwasami nukleinowymi, a powstałe dupleksy są bardziej stabilne termodynamicznie. Kolejną ważną właściwością analogów PNA jest ich elastyczność, która pozwala na znaczne wydłużenie cząsteczki i konformacyjną adaptację podczas wiązania się z DNA czy RNA [209].

Analogi PNA o określonej sekwencji wykazują zdolność wiązania się z komplementarnymi DNA lub RNA i tworzenia par zasad typu Watsona-Cricka, przez co mogą blokować lub obniżać ekspresję odpowiednich genów. Mogą również tworzyć struktury trójniciowe przyłączając się do podwójnej helisy DNA. Tworzenie się takiego kompleksu jest związane z lokalną dysocjacją wiązań między obiema niemi dupleksu DNA, a następnie przyłączeniu komplementarnego łańcucha PNA do jednej lub dwóch nici DNA. Struktura trypleksu jest stabilizowana przez parowanie zasad typu Watsona-Cricka oraz oddziaływanie typu Hoogsteena [210, 211]. Trypleksy typu PNA/dsDNA oraz dsPNA/DNA stabilizowane wiązaniami wodorowymi typu Hoogsteena powstają głównie z udziałem oligomerów homopirymidynowych lub zawierających znaczną przewagę pirymidyn nad purynami. W strukturze typu dsPNA/DNA oligomer PNA zawiera wiele reszt cytozyny, a stabilność tego kompleksu rośnie proporcjonalnie do długości łańcucha PNA. Z kolei oligomery PNA zbudowane głównie z zasad purynowych oddziałują z dwuniciowym DNA poprzez parowanie według modelu Watsona-Cricka [212]. W wykorzystaniu analogów PNA są również pewne ograniczenia, m.in. mniejsza rozpuszczalność w roztworach wodnych w porównaniu z DNA czy RNA, spowodowana hydrofobowym charakterem PNA [109]. Często, aby poprawić tę właściwość do jednego z końców oligomeru PNA przyłącza się dodatkowo naładowane aminokwasy, na przykład lizynę [207]. Istotną trudność sprawia także słaba przenikalność przez błony komórkowe, co utrudnia ich zastosowanie w terapii. Z tego

względu wiele badań skupia się na otrzymywaniu specyficznych nośników, które będą transportowały PNA do wnętrza komórki [213].

Pomimo, że analogi PNA posiadają pewne ograniczenia, z wielu doniesień literaturowych wynika, że są powszechnie wykorzystywane w badaniach strukturalnych i biologicznych trypleksów DNA i RNA [158, 211, 214]. Pierwotnie cząsteczki PNA były zaprojektowane do poprawy powinowactwa do dupleksów DNA i tworzenia trypleksów typu PNA/dsDNA. Jednak okazało się, że oddziaływanie PNA często prowadziło do powstania termodynamicznie korzystniejszego kompleksu złożonego z dwóch nici PNA i jednej nici DNA (PNA/DNA/PNA) [210, 215]. Dupleks PNA powodując rozplecenie się helisy DNA, wiązał się z komplementarnym fragmentem dwuniciowego DNA tworząc pary zasad Watsona-Cricka, kosztem drugiej nici DNA. Następnie, z nowo powstałym dupleksem PNA/DNA oddziaływał drugi łańcuch PNA, tworząc strukturę trójniciową. Fragment DNA, który został wypchnięty z helisy tworzył obok trypleksu, tzw. pętlę P. Powstanie takiego trypleksu niesie ze sobą ciekawe konsekwencje biologiczne, ponieważ trypleks jest bardzo stabilny, a pętla P ma wpływ na ważne procesy biologiczne, w tym transkrypcję, replikację DNA i naprawę zmutowanych genów. Struktura ta może inicjować transkrypcję lub uczestniczyć w powielaniu DNA, a dzięki temu może być wykorzystana do badań genetycznych [216]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że trypleksy utworzone przez PNA i DNA w miejscach transkrypcji hamują ten proces zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Powstanie struktury trypleksu w miejscu promotorowym ogranicza dostęp polimerazy RNA, natomiast poza promotorem może powodować przedwczesne odłączenie enzymu i zakończenie transkrypcji mRNA [217]. Analogi PNA mogą być również użyte do hamowania replikacji DNA lub odwrotnej transkrypcji poprzez przyłączenie się do matrycy DNA lub RNA i utworzenie stabilnego trypleksu, który przerywa te procesy [218]. Ponadto, potwierdzono, że utworzenie trypleksu przy udziale oligomerów PNA blokuje proces transkrypcji onkogenu *c-myc* w modelu zwierzęcym. W konsekwencji dochodziło do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych [219].

W przeciwieństwie do opisanych trypleksów PNA/dsDNA, podczas formowania się trypleksów PNA/dsRNA nie dochodzi do inwazji nici PNA i zastąpienia jednej z nici dupleksu RNA [220]. To znaczy powstaje tylko jedna forma trypleksu, tj. PNA/dsRNA. To sprawia, że PNA specyficznie wiążą się z dwuniciowym RNA, dzięki czemu wykazują duży potencjał w podejściu nakierowanym na struktury dupleksów

RNA [220]. Trypleks pirymidynowy PNA/dsRNA powstaje przez oddziaływania pomiędzy oligomerem PNA i dupleksem RNA. Łańcuch PNA jest ułożony równolegle względem jednej z nici dupletu RNA, tzn. jego koniec aminowy leży przy końcu 5' nici purynowej dsRNA. Na podstawie badań termodynamicznych i strukturalnych zaobserwowano, że struktury trójniciowe typu PNA/dsRNA są znacznie bardziej stabilne niż trypleksy PNA/dsDNA [214]. Efekt ten prawdopodobnie wynika z odpowiedniej geometrii cząsteczki RNA oraz korzystnych oddziaływań szkieletu RNA z nicią PNA [214, 220, 221]. Dzięki takim właściwościom analogi PNA stanowią atrakcyjne narzędzia molekularne nakierowane na docelowe cząsteczki dsRNA. TFO w postaci analogu PNA mogą być obiecującymi ligandami wykorzystywanymi, na przykład do ograniczenia oddziaływań trzeciorzędowych RNA i RNA-białko. Przykładowo, zaprojektowano TFO typu PNA zdolne do wiązania się z regionem dwuniciowym wirusowego RNA i blokowania oddziaływań między kinazą zależną od RNA (PKR, ang. *RNA-dependent kinase*) a RNA [222]. TFO z modyfikacjami PNA może, zatem posłużyć do studiowania sygnalizacji białka PKR lub też hamowania oddziaływań RNA-PKR.

8.4 Przykłady zastosowania struktur trójniciowych DNA i RNA

Szeroki zakres aktywności biologicznych trypleksów DNA i RNA sprawia, że stanowią one bardzo interesujące obiekty badawcze. Te niekanoniczne formy mogą bowiem uczestniczyć w regulacji ekspresji genów [118], hamować replikację [223, 224], a także być źródłem genetycznej niestabilności prowadzącej do chorób człowieka [122, 225]. Wymienione funkcje biologiczne, jakie przypisuje się trypleksom, pozwalają na wykorzystanie tych struktur, jako narzędzi molekularnych w biotechnologii, biologii molekularnej i diagnostyce medycznej oraz jako potencjalne uzupełnienie narzędzi badawczych w celach terapeutycznych.

Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają, że oligonukleotydy TFO są z powodzeniem wykorzystywane w biologii molekularnej oraz biochemii. Przede wszystkim, jako koniugaty mogą być stosowane w badaniach molekularnych mechanizmów oddziaływań białek i enzymów z kwasami nukleinowymi, miejscowo-specyficznego znakowania DNA lub RNA, rozpoznawania i określania topologii DNA czy RNA, a także, jako czynniki sieciujące (ang. *cross-linking agents*) [105]. Matteucci i wsp. opracowali podejście, w którym kamptotecyna - inhibitor topoizomazy I został

połączony z cząsteczką TFO w celu ograniczenia aktywności enzymu [226]. Utworzenie struktury trypleksu spowodowało, że miejsce w dwuniciowym DNA stało się niedostępne dla topoizomerazy I, co z kolei uniemożliwiło rozplecenie podwójnej helisy. W innych badaniach wykorzystano koniugat daunomycyny (stosowanej w terapii przeciwnowotworowej) z TFO w celu dostarczenia leku do określonego miejsca w komórce [227]. W eksperymentach *in vitro* wykazano, że koniugat daunomycyna-TFO znacznie silniej wiązał się z docelowym miejscem w cząsteczce RNA wirusa HIV-1 w porównaniu do samego oligonukleotydu TFO.

W kontekście badania oddziaływań typu białko-DNA, strategia trypleksu może pomóc w zrozumieniu mechanizmów molekularnych, jak zostało to szczegółowo opisane m.in. dla inhibitorów topoizomerazy I oraz ich oddziaływań z DNA i enzymem [228]. Reddy i wsp. w swoich doświadczeniach wykorzystali kompleks TFO z psoralenem, jako czynnik sieciujący DNA w celu zbadania mechanizmu naprawy DNA przez wycięcie nukleotydu (NER, ang. *nucleotide excision repair*), w tym poznania białek, które są zaangażowane w ten proces [228]. Odkrycie, że trzecia nić może współzawodniczyć z białkami o miejsca oddziaływania z kwasami nukleinowymi skłoniło badaczy do wykorzystania TFO w celu rozpoznawania takich miejsc [229]. Jednym z przykładów jest identyfikacja miejsc wiązania i hydrolizy dla enzymu topoizomerazy II [230]. Ponadto, zastosowanie TFO do znakowania docelowych kwasów nukleinowych również stanowi interesujące podejście, a wykorzystanie kompleksów TFO z barwnikami fluorescencyjnymi lub z innymi związkami, na przykład biotyną zostało udokumentowane w wielu pracach [231-233]. Zdolność specyficznego wiązania się TFO do fragmentów kwasów nukleinowych o określonej sekwencji sprawia, że mogą być również wykorzystane, jako narzędzia do rozpoznawania i oczyszczania DNA czy RNA. W tej sytuacji dużą zaletą trypleksów pirymidynowych jest ich podatność na zmiany warunków pH. W latach dziewięćdziesiątych Smith i wsp. opracowali prostą i szybką metodę oczyszczania plazmidowego DNA z lizatów komórek bakteryjnych [234]. W tym celu zaprojektowali oligonukleotydy połączone z biotyną zdolne do tworzenia struktury trypleksu z dwuniciowym DNA. Analogiczne podejście okazało się również skuteczne do oczyszczania DNA, co potwierdzają liczne badania [234, 235]. Przykładowo, grupa Smitha wykorzystwała strategię trypleksu do oczyszczania DNA pochodzącego z bakteriofaga lambda [235]. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne TFO oraz łatwy sposób modyfikacji chemicznej powodują, że oligonukleotydy te są wykorzystywane w

badaniach *in vitro* i *in vivo* związanych ze zmianami struktury i funkcji genów. Wiadomo, że struktura trypleksu może uczestniczyć w regulacji ekspresji genów, ukierunkowanej mutagenezie, naprawie uszkodzeń DNA oraz homologicznej rekombinacji, także wpływać na oddziaływania kwasów nukleinowych z białkami [111]. Można, zatem stwierdzić, że trypleksy są uniwersalnym narzędziem służącym do badania sekwencyjnie-specyficznych zmian w DNA lub RNA [111, 206, 236]. Istnieje wiele prac opisujących hamowanie procesu transkrypcji w wyniku utworzenia się trypleksu. Jednym z przykładów zastosowania TFO w regulacji transkrypcji są badania *in vitro*, w których wykazano zahamowanie tego procesu przez oddziaływanie TFO z czynnikami transkrypcyjnymi [237]. W innej pracy wykazano hamowanie transkrypcji na etapie elongacji poprzez wiązanie się TFO do określonych miejsc transkrybowanego genu [238].

Warto również zwrócić uwagę na potencjał oligonukleotydów TFO w celach diagnostycznych czy terapeutycznych. W 2003 roku Shen i wsp. potwierdzili efekt antygenowy i antyproliferacyjny TFO w ludzkich komórkach nowotworowych płuc [239]. W swoich badaniach udowodnili, że TFO nakierowane na gen kodujący surwiwinę hamuje namnażanie się komórek nowotworowych i indukuje wprowadzenie ich na drogę apoptozy [239]. W innej publikacji zademonstrowano TFO, jako potencjalne narzędzie do badania funkcji promotora genu *PMP22*, określenia roli białek *PMP22* w rozwoju choroby Charcota, Mariego i Tootha typu 1A (*CMT1A*, ang. *Charcot-Marie-Tooth disease type 1A*), a także projektowania leków w oparciu o struktury trójniciowe [240]. Ponadto, strategia trypleksu została wykorzystana do zablokowania produktu protoonkogenu *MET* (ang. *mesenchymal epithelial transition factor*), co z kolei prowadziło do śmierci komórek i zatrzymania rozwoju guza w wątrobie [241]. Na podstawie tych badań należy przypuszczać, że oligonukleotydy TFO tworzące struktury trypleksowe mogą okazać się dobrym narzędziem w leczeniu nowotworów związanych z nadekspresją genu *MET*.

9. Równoległe duplekisy DNA i RNA

Wiadomo, że kwasy nukleinowe są strukturami dynamicznymi i podlegają różnorodnym przemianom topologicznym w komórce. Elastyczność i zdolność do zmian strukturalnych DNA i RNA odgrywają kluczową rolę dla ich funkcji biologicznych oraz zależą od wielu czynników, takich jak: sekwencja, obecność jonów metali lub innych cząsteczek, oddziaływania z innymi biomolekułami, a także pH czy siła jonowa roztworu [242]. DNA występuje głównie w formie podwójnej helisy (B-DNA), podczas gdy fragmenty dwuniciowe w RNA są krótkie i tworzą różne motywy strukturalne, takie jak: typu spinki do włosów, pętle wewnętrzne, jedno- lub dwustronne wybrzuszenia, niesparowania [243]. W przypadku kanonicznych form B-DNA i A-RNA wszystkie nukleozasady przyjmują konformację *anti*. Natomiast, w strukturze Z-DNA reszty nukleotydów purynowych przyjmują konformację *syn*, a reszty nukleotydów pirymidynowych konformację *anti*. Ponadto, w niektórych katalitycznych RNA również mogą występować wiązania glikozydowe w konformacji *syn*. Z doniesień literaturowych wynika, że reszty nukleotydowe posiadające taki typ wiązań glikozydowych są powszechne w miejscach aktywnych centrum katalitycznego i mogą uczestniczyć w oddziaływaniach trzeciorzędowych [244]. Obserwacje te sugerują, że niektóre kwasy nukleinowe mogą przyjmować struktury, które różnią się od kanonicznych form B-DNA i A-RNA.

Ogólnie helikalne cząsteczki kwasów nukleinowych składają się z dwóch nici ułożonych w orientacji antyrównoległej ($5'-3'/3'-5'$) z parowaniem zasad typu Watsona-Cricka. Jednakże DNA oraz RNA mogą tworzyć nietypowe struktury, takie jak równoległe duplekisy ($5'-3'/5'-3'$) (Rys. 11). Te niekanoniczne formy są znane od wielu lat i często występują w genomach ssaków i innych organizmów [245]. Niektóre helikalne formy kwasów nukleinowych o równoległej orientacji nici mogą być elementem dla bardziej złożonych struktur. Obecność komplementarnych sekwencji DNA lub RNA o równoległej orientacji występujących w strukturze trypleksów, kwadrupeksów, jak również typu *i-motif* została dobrze scharakteryzowana w literaturze [127, 246, 247].

Dupleks antyrównoległy



pH 7.0



Dupleks równoległy



pH 5.0

Rysunek 11. Schemat tworzenia się antyrównoległego i równoległego dupleksu DNA.

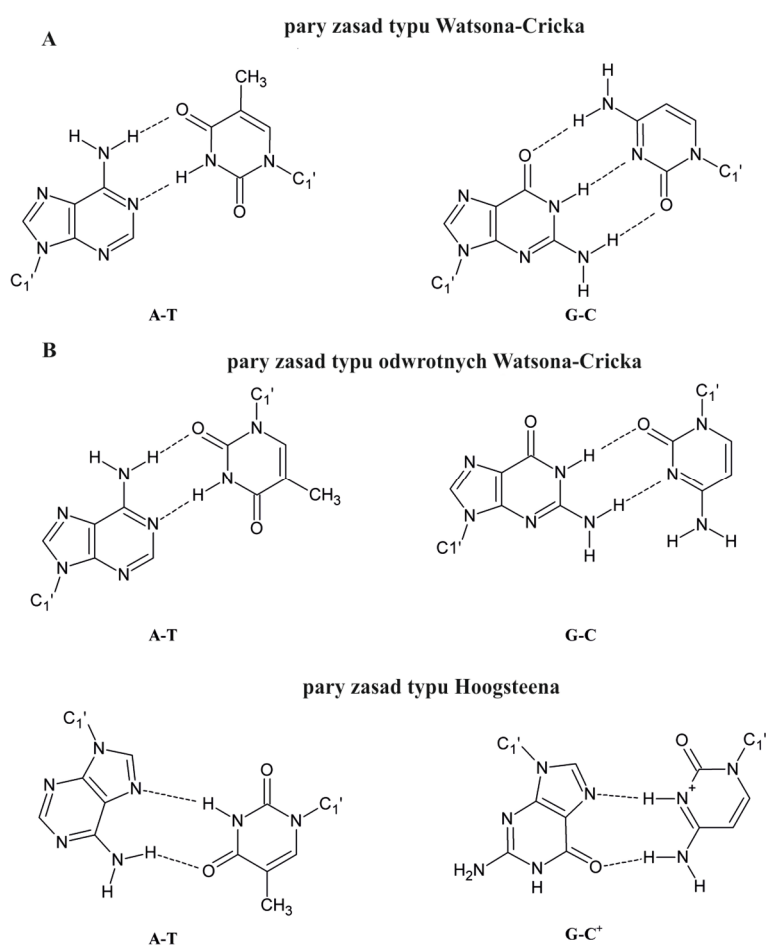
9.1 Charakterystyka równoległych dupleksów DNA i RNA oraz ich występowanie

Już w latach sześćdziesiątych Rich i wsp. opracowali po raz pierwszy model struktury złożonej z dwóch nici zawierających reszty adenozyne [248]. Badacze potwierdzili tworzenie się podwójnej helisy poli(A) z równoległą orientacją nici w warunkach niskiego pH. Na podstawie badań krystalograficznych zaproponowali model składający się z dwóch równoległe ułożonych nici z parowaniem reszt A-A typu Hoogsteena [248]. Następnie, w oparciu o powyższy model struktury helisy poli(A), Pattabiraman pokazał, że powstanie równoległego dupleksu typu poli(dA)/poli(T) jest tak samo korzystne termodynamicznie, jak tworzenie jego antyrównoległego odpowiednika [249].

W 2009 roku grupa Krishnana przeprowadziła kompleksowe badania polimeru deoksyadenozyne (dA₁₅) i scharakteryzowała jego dwie formy powstające w zależności od zmiany pH [250]. Naukowcy wykazali, że forma dwuniciowa o równoległej orientacji łańcuchów poli(dA) tworzy się w środowisku kwasowym i niskim stężeniu soli, podczas gdy w warunkach obojętnego pH powstaje forma jednoniciowa. Wkrótce potem Safaee i wsp. rozwiązali strukturę krystalograficzną poli(A) w obecności jonów amonowych w pH 7.0 [251]. Udowodnili powstanie struktury równoległego dupleksu, w której reszty adenozyne były ułożone symetrycznie naprzeciw siebie. Ostatnio, grupa Maquatza demonstrowała również strukturę równoległego dupleksu złożonego z poli(A) w warunkach niskiego pH [252]. Autorzy wykazali, że do powstania takiej struktury konieczne jest protonowanie atomu N1 reszt adenozyne. Specyficzne oddziaływania występują pomiędzy protonowaną i nieprotonowaną resztą adenozyne.

Struktury helikalne kwasów nukleinowych są stabilizowane przez wiązania wodorowe między resztami nukleotydowymi, oddziaływania warstwowe, hydratację, a także modyfikacje chemiczne. W kanonicznych formach DNA i RNA występują

parowanie zasad według modelu Watsona-Cricka, jak również wewnątrz- i/lub międzycząsteczkowe oddziaływania warstwowe. Natomiast tworzenie struktur równoległych dupleksów jest determinowane warunkami pH [253]. W obojętnym pH te niekanoniczne formy powstają przez parowanie zasad typu odwrotnych Watsona-Cricka A-T, G-C, (inaczej nazywane parami Donohue) [254] lub przez parowanie zasad A-T typu Hoogsteena. Natomiast w środowisku lekko kwasowym, reszta cytozyny wymaga protonowania atomu azotu N3, a oddziałując z resztą guanozyny tworzy parę G-C⁺ typu Hoogsteena [253]. Wiązania wodorowe występujące pomiędzy zasadami azotowymi w antyrównoległym i równoległym dupleksie zostały zaprezentowane na Rysunku 12.



Rysunek 12. Schemat par zasad występujących w antyrównoległym (A) i równoległym (B) dupleksie.

Cząsteczka równoległego dupleksu DNA jest elastyczna i wykazuje zdolność do zmian strukturalnych w zależności od kontekstu sekwencyjnego, warunków pH czy obecności innych cząsteczek, na przykład białek [255]. Z doniesień literaturowych wynika, że duża zawartość par zasad G-C oraz warunki niskiego pH sprzyjają tworzeniu

się niekanonicznych dwu- lub trójniciowych form DNA zawierających równoległą orientację nici. Natomiast sekwencje bogate w reszty adenozyiny i tyminy w warunkach obojętnego pH przyjmują strukturę stabilizowaną odwrotnymi wiązaniami wodorowymi [256]. Badanie powstawania równoległych dupleksów DNA było zapoczątkowane m.in. przez Pattabiramana, który w swoich doświadczeniach wykorzystał spektroskopię Ramana oraz metodę chemicznej metylacji [249]. Następnie grupy badawcze Taillandiera oraz Wanga potwierdziły tworzenie się tych niekanonicznych form za pomocą spektroskopii w podczerwieni [257], a także spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego [258]. W kolejnej pracy opisano badania tych struktur z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej oraz spektroskopii CD. Na podstawie uzyskanych wyników, udowodniono, że cząsteczki zawierające pary dA-dT i dG-dC mogą przyjmować dwie formy, mniej trwałą strukturę stabilizowaną odwrotnymi wiązaniami wodorowymi oraz bardziej preferowaną formę stabilizowaną oddziaływaniami typu Hoogsteena [259].

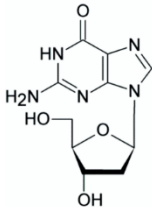
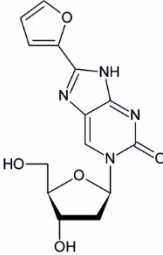
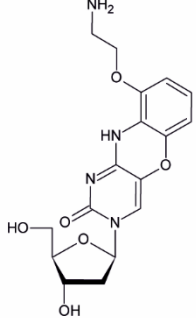
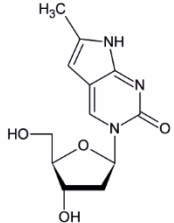
W naturze istnieją przykłady równoległych regionów purynowo-pirymidynowych, które mogą pełnić ważne funkcje biologiczne w komórce [255]. Na Rysunku 13 zaprezentowano przykłady takich regionów z genomów różnych organizmów. Tchurikov i wsp. zidentyfikowali jeden z przykładów takich regionów w genomie *Drosophila melanogaster* [260]. Opisałi oni rejon równoległy występujący pomiędzy krótką sekwencją retroelementu SINE (SINE, ang. *short interspersed nuclear element*) a sekwencją na końcu 5' genu dehydrogenazy alkoholowej. Oba rejony są komplementarne na długości 32 nukleotydów i ułożone względem siebie w orientacji równoległej. W 2000 roku ta sama grupa scharakteryzowała kolejny przykład naturalnie występującego regionu równoległego, tym razem w genomie *Escherichia coli* [261]. Równoległe ułożone odcinki znaleziono we fragmencie mRNA transkrybowanego z genu *lon*. Produktem tego genu jest enzym - proteaza zależna od ATP, który pełni ważną rolę w selektywnej degradacji nieprawidłowych białek oraz kontroli poziomu białek regulatorowych w komórce. Badacze potwierdzili tworzenie się równoległego dwuniciowego RNA *in vitro* oraz wykazali specyficzne wyciszenie genów u *E. coli* spowodowane powstaniem tej struktury. Innym przykładem sekwencji mogących tworzyć struktury helikalne o równoległej orientacji nici jest trakt polipirymidynowy w regionie mRNA genu *iap* [262]. Region ten występuje w genomie bakterii *Listeria innocua* sam gen *iap* koduje duże białko zewnątrzkomórkowe p60 niezbędne do podziału komórek bakteryjnych. Wykorzystując sekwencje komplementarne do

9.2 Modyfikacje chemiczne wpływające na stabilność struktur równoległych dupleksów DNA i RNA

Ze względu na fakt, że helikalne struktury DNA i RNA z równoległą orientacją nici (5'-3'/5'-3') mogą stanowić obiecujące narzędzie w genetyce molekularnej, naukowcy wykazują duże zainteresowanie poprawą ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych [263, 265, 266]. W wyniku tego opracowano różne rodzaje modyfikacji chemicznej oligonukleotydów i poszukuje się nowych. Grupa analogów nukleotydów zwiększających stabilność struktur równoległych dupleksów obejmuje, m.in.: 8-amino-2'-deoksyadenozynę i 8-amino-2'-deoksyguanozynę [259], 5-metylo-2'-deoksyizocytozynę [258], 2'-O-MeRNA [263] i LNA [175, 263, 266]. W Tabeli 1 przedstawiono podsumowanie wpływu wybranych modyfikacji chemicznych na powstawanie antyrównoległych i równoległych dupleksów DNA i RNA.

Do określenia wpływu pochodnych 8-aminopurynowych na stabilność równoległych dupleksów zastosowano metody dynamiki molekularnej oraz spektroskopie NMR i CD [267]. Wyniki uzyskane z obliczeń teoretycznych i technik eksperymentalnych wykazały silną stabilizację tych struktur wywołaną obecnością pochodnych aminowych w oligomerze. Co więcej, wprowadzenie takich reszt pozwoliło na powstanie równoległych dupleksów nawet w warunkach obojętnego pH [259, 267]. Podobnie, izoguanozyna oraz izocytydyna mogą korzystnie wpływać na formowanie się równoległych dupleksów. Przeprowadzone badania termodynamiczne i strukturalne pokazały, że oligonukleotydy zawierające te analogi tworzą stabilne dwuniciowe struktury o równoległej orientacji nici [258]. Na podstawie widm NMR stwierdzono, że obie nici oddziałują ze sobą przez parowanie zasad typu odwrotnych Watsona-Cricka, a powstała struktura różniła się od kanonicznej formy B-DNA

Tabela 1. Wpływ wybranych modyfikacji chemicznych na powstawanie antyrównoległych i równoległych dupleksów DNA i RNA.

Typ modyfikacji	Dupleksy DNA		Dupleksy RNA		Doniesienie literaturowe
	antyrównoległe	równoległe	antyrównoległe	równoległe	
2'-O-MeRNA	↑	↑	↑	↑	Guga i wsp. (2007), Szabat i wsp. (2015)
LNA	↑	↑	↑	↑	Guga i wsp. (2007), Bhattacharyya i wsp. (2011), Szabat i wsp. (2015)
8-aminopuryna	×	↑	×	×	Garcia i wsp. (1999)
izoguanozyna (iG)	×	↑	×	×	Yang i wsp. (1998)
izocytozyna (iC)	×	↑	×	×	
fluorowane pochodne	↑	↑	↑	↓	Ingale i wsp. (2015)
7-deaza-2'-deoksygwanozyna (A)	↑	↑	×	×	Ingale i wsp. (2016)
cytozyna z grupami imidazolowymi (B)	↑	↑	×	×	Jana i wsp. (2013)
tiofosforany posiadające konfigurację R_p	↑	↑	↑	↑	Maciaszek i wsp. (2015)
G-clamp (C), pirolo-dC (D)	↑ 0	↑ 0	×	×	Ming i wsp. (2012)
L-(deoksy)ryboza	×	↓	×	↓	Szabat i wsp. (2016)
koniugat PNA z porfiryną*	×	↑	×	×	Accetta i wsp. (2015)
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>A</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>B</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>C</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>D</p>  </div> </div>					
Oznaczenia: ↑ - efekt stabilizacyjny; ↓ - efekt destabilizacyjny; × - brak danych; 0 – brak efektu; * - dupleks PNA/PNA.					

Wpływ modyfikacji 2'-O-MeRNA i LNA na tworzenie się oraz stabilność termodynamiczną równoległych dupleksów został dobrze udokumentowany [263, 265, 266]. Przykładowo, Szabat i wsp. wykorzystali powyższe analogi w badaniach termodynamicznych i strukturalnych równoległych dupleksów DNA i RNA [263]. Badacze potwierdzili efekt stabilizacyjny reszt typu 2'-O-MeRNA i LNA obecnych w jednej lub obu nici dupleksów DNA i RNA. Wykazali również, że tak modyfikowane oligomery tworzą stabilne równoległe dupleksy w warunkach obojętnego pH. Ponadto, grupy badawcze Sugimoto i Gugi także wykorzystywały analogi LNA w celu poprawy właściwości termodynamicznych równoległych dupleksów [175, 266]. Interesująca praca Maciaszek i wsp. opisuje wykorzystanie reszt typu LNA, 2'-O-MeRNA oraz pochodnych tiofosforanowych w badaniach termodynamicznych i biologicznych dupleksów DNA i RNA [175]. Udowodniono, że nie homopurynowa zawierająca tiofosforany posiadające konfigurację R_p na wszystkich grupach fosforanowych mogła specyficznie oddziaływać z nicią homopirymidynową i w konsekwencji tworzyć trwałe dwuniciowe struktury o równoległej orientacji. Wszystkie wymienione wcześniej doniesienia literaturowe mogą być użyteczne w racjonalnym projektowaniu skutecznych narzędzi oligonukleotydowych, które hybrydują z docelowymi sekwencjami w sposób równoległy (5'-3'/5'-3') lub wykorzystanych, jako przełączniki zależne od zmian warunków pH.

Intensywne badania dotyczące dupleksów DNA i RNA o równoległej orientacji nici były prowadzone przez grupę Seela [268-272]. Badacze zaprojektowali i zsyntetyzowali szereg analogów oligonukleotydów, które następnie posłużyły do badań termodynamicznych i strukturalnych powyższych struktur DNA i RNA. Przykładami użytych analogów były pochodna pirolo-deoksycytozyna (pirolo-dC) [273], 2'-deoksyizoguanozyna oraz 2'-deoksyizocytozyna [272]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zastosowanie takich modyfikacji pozwoliło na powstanie stabilnej struktury dupleksu zarówno antyrównoległego, jak i równoległego. Ponadto, ta sama grupa badawcza określiła wpływ oligonukleotydów połączonych resztami cukrowymi za pomocą łącznika propargilowego na trwałość równoległego dupleksu. Uzyskane wyniki pokazały, że modyfikowane oligonukleotydy przyjmowały strukturę równoległego dupleksu, a ich stabilność termiczna była zwiększona [268]. Co więcej, w kolejnych badaniach sprawdzono zmiany trwałości dupleksów typu DNA, RNA oraz DNA/RNA spowodowane wprowadzeniem reszt typu 2'-deoksy-2'-fluoroizoguanozyny i 2'-deoksyizocytozyny [271]. Analizując uzyskane dane wykazano, że oligonukleotydy

zawierające podstawnik fluorowy mogły tworzyć stabilne dupлексы DNA o orientacji nici 5'-3'/5'-3', podczas gdy mieszane dupлексы DNA/RNA były niestabilne [271]. Warto również wymienić inne badania grupy Seela, w których określono efekt pochodnej 7-deaza-2'-deoksyguanozyny oraz jej modyfikacji zawierających reszty fenyłowe lub fenylotriazolilowe do nici dupлексу DNA [272]. Na podstawie wyników, okazało się, że struktury zawierające reszty 7-deaza-2'-deoksyguanozyny są tak samo stabilne, jak ich niemodyfikowane odpowiedniki. Natomiast, w przypadku obecności 7-deaza-2'-deoksyguanozyny z resztami fenyłową lub fenylotriazolilową w łańcuchu dupлексу DNA zaobserwowano destabilizacyjny efekt (zarówno dla formy równoległej, jak i antyrównoległej). Jedynie dla dupлексов mieszanych DNA/RNA modyfikacje te nieznacznie poprawiały ich trwałość.

Ponadto, Jana i wsp. w celu poprawy trwałości kanonicznych i niekanonicznych dupлексов DNA zaproponowali bardzo ciekawe podejście wykorzystujące pary zasad stabilizowane jonami metalu [270]. Zaprojektowali oligonukleotydy zawierające reszty cytozyny z grupami imidazolowymi (ImidC) oraz testowali zmiany stabilności termodynamicznej wywołane obecnością tych pochodnych. Wykazali, że możliwe jest utworzenie stabilnej pary zasad między dwiema resztami ImidC, a obecność jonów srebra znacząco poprawia tę właściwość. W związku z tym, wprowadzenie takiej pary zasad zdecydowanie zwiększało temperaturę topnienia równoległego dupлексу. Co więcej, obecność jonów srebra, które były wiązane przez te niekanoniczne pary zasad dodatkowo przyczyniała się do wzrostu stabilności termicznej.

Innymi przykładami stosowanych modyfikacji w badaniach dotyczących stabilności i struktury równoległych dupлексов są koniugaty porfiryny i PNA. Grupa Corradiniego przedstawiła badania strukturalne z zastosowaniem takich koniugatów [274]. Potwierdzono, że wprowadzenie jednostek porfiryńowych wpływało na stabilność równoległego dupлексу PNA/PNA. Dodatkowo, wykazano, że zastosowanie pojedynczej reszty porfiryny nieznacznie zwiększało trwałość tych struktur, podczas gdy wprowadzenie dwóch ugrupowań porfiryńowych spowodowało znaczny wzrost temperatury topnienia. Ponadto, widma CD pokazały, że wykorzystanie takich modyfikacji nie przyczyniło się do zmian strukturalnych cząsteczki dupлексу.

Poza opisanymi modyfikacjami, w kilku pracach skupiono się na wykorzystaniu kwasów nukleinowych zawierających L-(deoksy)rybozę [275, 276]. Ze względu na fakt, że L-DNA i L-RNA wykazują dużą odporność na degradację przez wewnątrzkomórkowe enzymy, stanowią interesującą alternatywę dla ich naturalnych

odpowiedników. W 1992 roku Ashley zauważył, że łańcuch poli(A) silnie hybryduje z nicią L-dU₁₂ w obecności 5 mM MgCl₂ [275]. Zasugerował, że kwasy nukleinowe posiadające resztę L-rybozy mogą oddziaływać z naturalnymi DNA lub RNA i przyjmować podobną formę typu A o równoległej orientacji nici. Interesującą obserwacją było to, że L-RNA lub L-DNA wiązały się znacznie lepiej do naturalnego RNA niż DNA. Ponadto, łańcuchy poli(A) i L-dU₁₂ oraz poli(A) i D-dU₁₂ mogły tworzyć struktury trójniciowe.

Ostatnio, Szabat i wsp. również wykorzystali L-enancjomery w badaniach termodynamicznych i strukturalnych dupleksów DNA i RNA [276]. Stwierdzili, że homopurynowe i homopirymidynowe nici będące enancjomerami mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć strukturę dupleksu. Badacze zaobserwowali powstawanie heterochiralnych dupleksów (L-RNA/D-RNA), jednakże trwałość takich struktur była bardzo mała w porównaniu z homochiralnymi odpowiednikami. Co więcej, zauważono, że wprowadzenie modyfikacji LNA do nici dupleksu heterochiralnego skutkuje zwiększeniem stabilności termodynamicznej takich dupleksów. Na podstawie analizy NMR wykazano również, że te nietypowe struktury są stabilizowane przez niekanoniczne wiązania wodorowe.

9.3 Przykłady zastosowania struktur równoległych dupleksów DNA i RNA

Cząsteczki DNA i RNA zdolne do przyjmowania helikalnej struktury o orientacji nici 5'-3'/5'-3' oferują nowe możliwości w regulacji strukturalnych i biologicznych właściwości kwasów nukleinowych. Po pierwsze, oligonukleotydy homopirymidynowe oraz bogate w reszty purynowe mogą tworzyć stabilne i sekwencyjno-specyficzne struktury. Wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania takich oligonukleotydów są kluczowymi czynnikami decydującymi o skuteczności ich działania oraz możliwości potencjalnego zastosowania. W związku z tym, niektóre fragmenty DNA lub RNA mogą stanowić doskonałą podstawę do tworzenia struktur helikalnych (zawierających nici ułożone równoległe względem siebie). Takie niekanoniczne formy mogłyby posłużyć do opracowania strategii antygenowej (nakierowanej na DNA) lub antysensowej (nakierowanej na mRNA) [127, 236].

Elastyczność i zdolność do zmian strukturalnych równoległych dupleksów pozwala na formowanie się cząsteczek o różnej złożoności. W związku z powyższym, struktury równoległe mogą być również użyteczne w projektowaniu oligonukleotydów

stanowiących czynniki interkalujące lub koniugaty. Przykładowo, Jovin i wsp. opisali strukturę równoległego dupleksu DNA w kontekście jego oddziaływania ze związkami chemicznymi [277]. W badaniach zaobserwowano zmiany konformacyjne dupleksu po dodaniu trzech wybranych związków chemicznych (netropsyny, dystamycyny A i Hoechst 33258). Związki te powodowały dysocjację jednej z nici równoległego dupleksu, następnie formowanie się antyrównoległego dupleksu zawierającego niesparowanie. W konsekwencji umożliwiło to bardziej korzystne energetycznie oddziaływanie związku z dupleksem o orientacji nici 5'-3'/3'-5'.

Z doniesień literaturowych wiadomo, że oligomery zawierające reszty izoguanozyny i 5-metyloizocytozyny mogą tworzyć stabilne równoległe dupleksy [258]. Yang i wsp. zasugerowali, że bromek etydyny, daunorubicyna i nogalamycyna mogą wiązać się do modyfikowanego w ten sposób równoległego dupleksu na drodze interkalacji [258]. Molekularny mechanizm tego oddziaływania był podobny do tego występującego dla kanonicznej formy B-DNA. Opisane właściwości oligonukleotydów połączonych ze związkami interkalującymi, w tym antybiotykami mogą być pomocne w opracowywaniu narzędzi antysensowych, które w unikalny („równoległy”) sposób wiążą się z docelową sekwencją mRNA.

Ciekawym zastosowaniem dla dupleksów równoległych jest ich wykorzystanie, jako biosensorów opartych na fragmentach DNA lub RNA. Specyficzne właściwości kwasów nukleinowych, w przypadku równoległych dupleksów są to zmiany strukturalne zależne od pH, umożliwiają konstruowanie chemicznych sensorów [278]. W 2005 roku Ohmichi i wsp. zaprojektowali fluorescencyjnie znakowane oligonukleotydy DNA (biosensory) zdolne do tworzenia struktur dwuniciowych oraz przeprowadzili ich badania termodynamiczne i strukturalne [278]. Zaobserwowali tworzenie się określonych struktur w zależności od wartości pH. W środowisku niskiego pH tworzyły się równoległe dupleksy stabilizowane przez pary typu Hoogsteena, natomiast w obojętnym pH nastąpiło strukturalne przejście do formy antyrównoległego dupleksu z kanonicznymi parami Watsona-Cricka. Ponadto, wykorzystali zaprojektowany biosensor w badaniach fluorescencyjnych na linii komórkowej MCF-17. Wykazali, że cząsteczki biosensorów z powodzeniem mogą być użyte do monitorowania zmian pH zachodzących wewnątrz komórek [278]. Biorąc pod uwagę opisane badania można stwierdzić, że sensory chemiczne oparte na specyficznych właściwościach kwasów nukleinowych są obiecującym materiałem do opracowania nowych sond oligonukleotydowych. Takie konstrukty mogłyby służyć do

śledzenie odwracalnych reakcji w warunkach *in vitro*, jak również do badania procesów biologicznych w żywych komórkach.

W ostatnim czasie rozwój nanotechnologii skłonił naukowców do badania właściwości kwasów nukleinowych pod kątem wykorzystania w tej nowej dyscyplinie technologii oraz nauki. DNA oraz RNA są strukturami dynamicznymi i podlegającymi różnorodnym przemianom topologicznym, dlatego stanowią atrakcyjne polimery do konstrukcji nanomateriałów. Helikalne struktury DNA lub RNA o równoległej orientacji nici zwiększają różnorodność takich bloków wykorzystywanych w projektowaniu nanocząsteczek. Ich wrażliwość na zmiany warunków pH, temperatury, obecność jonów metali lub innych biomolekuł pozwala na opracowanie nanomateriałów reagujących na te czynniki. Yatsunyk i wsp. przedstawili szczegółowy opis wykorzystania niekanonicznych form DNA w nanotechnologii [279, 280]. Stwierdzili, że równoległe dupleksy mogą stanowić element budulcowy funkcjonalnych materiałów czy urządzeń w skali nano. Zalety tych struktur w stosunku do naturalnych dupleksów obejmują zwiększoną stabilność termiczną i wrażliwość na działanie bodźców chemicznych.

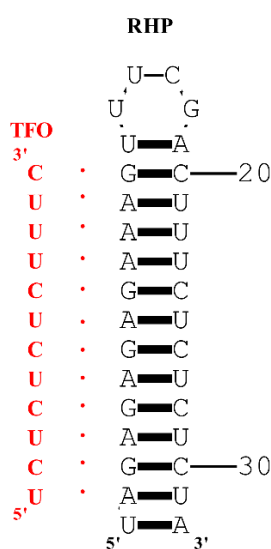
Chociaż natura „wybrała” formę dwuniciowego DNA zawierającego dwa antyrównoległe ułożone łańcuchy, istnieją przykłady odcinków równoległych i można je znaleźć w genomach różnych organizmów, co zostało wcześniej opisane [260-262]. Zwiększona odporność na degradację, odmienny sposób hybrydyzacji (specyficzny dla sekwencji) oraz wrażliwość na zmiany środowiskowe stanowią o przewadze tych cząsteczek nad naturalnymi DNA i RNA. W związku z tym niekanoniczne formy kwasów nukleinowych są w centrum zainteresowania wielu grup badawczych ze względu na ich zastosowanie w m.in.: biologii molekularnej, biotechnologii czy diagnostyce medycznej.

V. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Struktury trójniciowe RNA

1.1 Warianty trypleksów RNA

Wspólne prace badawcze prowadzone z zespołem Ganga Chena z Nanyang Technological University w Singapurze przyczyniły się do wyboru obiektu badawczego, jakim był trypleks RNA [150]. Trypleks jest utworzony przez dwa oligorybonukleotydy: jeden o długości 32 nukleotydów przyjmujący strukturę typu spinka do włosów i drugi o długości 12 nukleotydów, nazywane odpowiednio RHP i TFO (Rys. 14). Oligorybonukleotyd oznaczony jako Ctr stanowił kontrolną cząsteczkę, ponieważ nie wykazywał zdolności wiązania się do spinki RNA i tworzenia z nią struktury trójniciowej. W Tabeli 2 zostały zaprezentowane sekwencje oraz nazewnictwo niemodyfikowanych i modyfikowanych wariantów TFO oraz spinki RNA, które wykorzystano w badaniach termodynamicznych, strukturalnych i biologicznych realizowanych w ramach pracy doktorskiej. Natomiast na Rysunku 15 zaprezentowano wzory strukturalne niemodyfikowanego rybonukleozydu i modyfikowanych nukleozydów oraz enancjomerów rybozy, które były wprowadzone do oligonukleotydów podczas badań nad trypleksami RNA.



Rysunek 14. Schemat struktury modelowego trypleksu RNA.

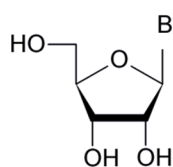
Tabela 2. Skład nukleotydowy badanych wariantów oligorybonukleotydów TFO i spinki RNA.

Nazwa	Sekwencja (5'-3')
RHP	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA
bRHP	U ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β A ^β G ^β U ^β U ^β U ^β C ^β G ^β A ^β C ^β U ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β A ^β
fRHP	5(6)-FAM-UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA
fbRHP	5(6)-FAM-U^βA^βG^βA^βG^βA^βG^βA^βG^βA^βA^βG^βU^βU^βU^βC^βG^βA^βC^βU^βU^βC^βU^βC^βU^βC^βU^βA^β
Ctr	AUCUGUCCACU
bTFO	U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β U ^β C ^β
TFOL1	UCUCUCU ^L CUUUC
TFOL2	UCUCU ^L CU ^L CUUUC
TFOL3	UCUCU ^L CU ^L CU ^L UUC
TFOL4	U ^L UCUCU ^L CU ^L CU ^L UUC
TFOS1	UCUCUCs ² UCUUC
TFOS2	UCUCs ² UCs ² UCUUC
TFOS3	UCUCs ² UCs ² UCs ² UUUC
TFO1	s ² UC ^L UCs ² UC ^L s ² UCs ² UUUC ^L
TFO2	s ² UC ^L UCs ² UCs ² UC ^L s ² UUs ² UC ^L
TFO3	s ² UCUC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² UUUC ^L
TFO4	s ² UC ^L UC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² Us ² Us ² UC ^L
fTFO1	5(6)-FAM-s²UC^LUCs²UC^Ls²UCs²UUUC^L
fTFO2	5(6)-FAM-s²UC^LUCs²UCs²UC^Ls²UUs²UC^L
fTFO3	5(6)-FAM-s²UCUC^Ls²UC^Ls²UC^Ls²UUUC^L
fTFO4	5(6)-FAM-s²UC^LUC^Ls²UC^Ls²UC^Ls²Us²Us²UC^L
TFON1	UC ^L UCs ² UCUCs ² UUUC ^L
TFON2	s ² UC ^L UCUCUCs ² UUs ² UC ^L
TFON3	s ² UCUC ^L UCUC ^L s ² UUUC ^L
TFON4	UC ^L UC ^L s ² UCUCUUUC ^L
fTFON1	5(6)-FAM-UC^LUCs²UCUCs²UUUC^L
fTFON2	5(6)-FAM-s²UC^LUCUCUCs²UUs²UC^L
fTFON3	5(6)-FAM-s²UCUC^LUCUC^Ls²UUUC^L
fTFON4	5(6)-FAM-UC^LUC^Ls²UCUCUUUC^L
TFOP	neomycyna - TLTLTTTL
TFOLM	U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L

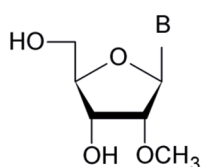
Oznaczenia: U^β, A^β, G^β, C^β – modyfikacje β-L-RNA, U^L, C^L – modyfikacje LNA, U^M – modyfikacja 2'-O-MeRNA, T – monomer tymidynowy w serii PNA; **L** – tiopseudoizocytozyna, **s²U** – 2-tiourydyna, 5(6)-FAM – 5(6)-karboksylfluoresceina.

Tabela 3. Modelowe warianty trypleksów RNA.

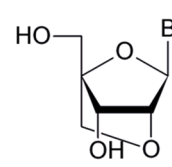
Nazwa trypleksu RNA	Skład trypleksu RNA
T1	TFO1 + RHP
T2	TFO2 + RHP
T3	TFO3 + RHP
T4	TFO4 + RHP
T5	TFON1 + RHP
T6	TFON2 + RHP
T7	TFON3 + RHP
T8	TFON4 + RHP
T9	bTFO + RHP
T10	TFO + bRHP
T11	bTFO + bRHP
T12	TFOP + RHP
T13	TFOL1+ RHP
T14	TFOL2+ RHP
T15	TFOL3+ RHP
T16	TFOL4+ RHP
T17	TFOS1 + RHP
T18	TFOS2 + RHP
T19	TFOS3 + RHP
T20	TFOLM+ RHP
T21	Ctr + RHP



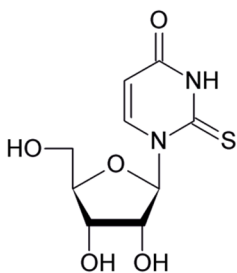
rybonukleozyd



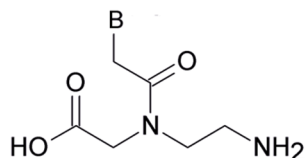
2'-O-metyloribonukleozyd



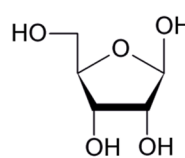
nukleozyd o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (LNA)



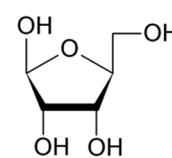
2-tiourydyna



monomer PNA



D-ryboza



L-ryboza

Rysunek 15. Wzory strukturalne nukleozydów i enancjomerów rybozy wykorzystywanych w badaniach trypleksów RNA.

1.2 Badania trwałości termodynamicznej wariantów trypleksów RNA

Dzięki obecności pierścieni heterocyklicznych, kwasy nukleinowe mają zdolność absorpcji promieniowania UV przy długości fali 260 nm. Taka cecha DNA i RNA umożliwia ich spektrofotometryczne wykrywanie oraz ilościowe oznaczanie. W związku z tym stabilność termodynamiczna badanych wariantów trypleksów RNA została określona przez wykorzystanie metody topnienia UV (ang. *UV melting*) przy użyciu spektrofotometru UV/Vis. Ta technika pozwala na zarejestrowanie zmiany absorbancji badanego roztworu kwasu nukleinowego, jako funkcji temperatury. Termiczna denaturacja helikalnego DNA lub RNA powoduje tzw. efekt hiperchromowy. Jest to wzrost absorbancji kwasu nukleinowego po przyjęciu struktury jednoniciowej i nieuporządkowanej, spowodowany zerwaniem wiązań wodorowych i zaburzenia oddziaływań warstwowych pomiędzy nukleozasadami. Na podstawie pomiarów zmian absorbancji można określić tzw. temperaturę topnienia (T_m) dla badanej próbki oraz obliczyć parametry termodynamiczne, takie jak, entropia (ΔS°), entalpia (ΔH°) i energia swobodna (ΔG°_{37}). Temperatura topnienia to temperatura, w której dochodzi do rozplecenia połowy cząsteczek kwasu nukleinowego, innymi słowy ustrukturalizowana forma badanego DNA lub RNA występuje w równowadze z formą jednoniciową [281]. Entropia (ΔS°) jest miarą stopnia nieuporządkowania układu (w tym przypadku struktury DNA lub RNA), na którą wpływają, m.in.: stopień hydratacji oraz usztywnienie łańcuchów w helisie DNA lub RNA. Natomiast zmiany entalpii (ΔH°) związane są z oddziaływaniami wodorowymi oraz oddziaływaniami warstwowymi występującymi w strukturach DNA lub RNA.

W przypadku struktur trójniciowych krzywa zależności absorbancji od temperatury, tzw. krzywa topnienia posiada dwa punkty przegięcia, co daje charakterystyczny profil topnienia (Rys. 16). W pierwszej fazie trypleks przekształca się do formy dwuniciowej, dochodzi do zaniku oddziaływań pomiędzy nicią TFO i dwuniciowym fragmentem (trzonem) spinki RNA, natomiast w drugim etapie struktura spinki RNA ulega rozpleceniu do formy jednoniciowej [282]. Chociaż metoda topnienia UV jest jedną z najczęściej stosowanych technik w badaniach stabilności termodynamicznej struktur DNA i RNA, w tym trypleksów, ma jednak pewne ograniczenia [283]. Podstawowym utrudnieniem w analizie danych termodynamicznych dla struktur trójniciowych jest obecność dwóch punktów przegięcia w profilu topnienia. Często takie przejścia

1.2.1 Wpływ modyfikacji chemicznych LNA i 2-tiourydyny na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA

Z puli wszystkich wariantów TFO w badaniach trwałości termodynamicznej wykorzystano łącznie 8 oligorybonukleotydów zawierających reszty urydyny w serii LNA (U^L), cytozyny w serii LNA (C^L) i 2-tiourydyny (2-tioU). Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że wprowadzenie modyfikacji LNA do nici TFO zwiększa stabilność termodynamiczną powstałych trypleksów [150, 180]. Wykazano, że już pojedyncze podstawienie reszty nukleotydowej pochodną LNA wpływa na zwiększenie trwałości trypleksów [150]. Dodatkowo, zaobserwowano wzrost efektów stabilizacyjnych, które wynikały z wprowadzenia więcej niż jednej reszty typu LNA [150, 182]. Torgioe i wsp., tłumaczyli, że modyfikacja LNA może zwiększać stabilność termodynamiczną trypleksów, ponieważ powoduje usztywnienie samego łańcucha TFO i dzięki temu oligomer ten mocniej wiąże się do dwuniciowego DNA [182]. Badania kinetyczne tej grupy naukowców potwierdziły, że obecność reszt typu LNA w TFO powoduje duży wzrost wartości stałej wiązania oligomeru TFO i spinki RNA, co przekłada się na trwałość trypleksu. Poza tym, dotychczas opublikowane dane Zhou i wsp., potwierdzają, że zastąpienie atomu tlenu O2 reszty urydyny atomem siarki powoduje wzrost stabilności trypleksów [150]. Efekt stabilizacyjny pochodnej 2-tiourydyny może wynikać, m.in. z wymuszenia preferowanej konformacji *C3'-endo* reszty cukrowej oraz zwiększenia oddziaływań warstwowych i oddziaływań van der Waalsa, co ułatwia tworzenie się trypleksu. W związku z powyższym podczas wykonywania pracy doktorskiej zaprojektowano oligorybonukleotydy TFO zawierające jednocześnie oba rodzaje modyfikowanych nukleotydów, a następnie poddano je badaniom termodynamicznym. Uzyskane wyniki stanowiły uzupełnienie danych literaturowych dotyczących wpływu analogów LNA oraz 2-tiourydyny na trwałość termodynamiczną trypleksów RNA. Ponadto, zakładano, że wprowadzenie reszt typu LNA i 2-tioU do nici TFO może przyczynić się do poprawy właściwości biologicznych badanych struktur, co miałyby istotne znaczenie na dalszym etapie badań.

Zaprojektowano i zsyntetyzowano osiem oligorybonukleotydów TFO zawierające w różnych pozycjach od 2 do 5 pochodnych LNA i od 1 do 6 reszt 2-tiourydyny (TFO1-TFO4 oraz TFON1-TFON4, Tab. 2, *Podrozdział 1.1 Warianty trypleksów RNA*). Ogólnie, na podstawie wartości parametru T_{m1} dla 8 wariantów modelowych trypleksów RNA można stwierdzić, że zamiana naturalnych reszt nukleotydowych na pochodne

typu LNA i 2-tioU przyczyniła się do wzrostu trwałości termicznej wszystkich badanych trypleksów w odniesieniu do niemodyfikowanego trypleksu Tn (Tab. 4).

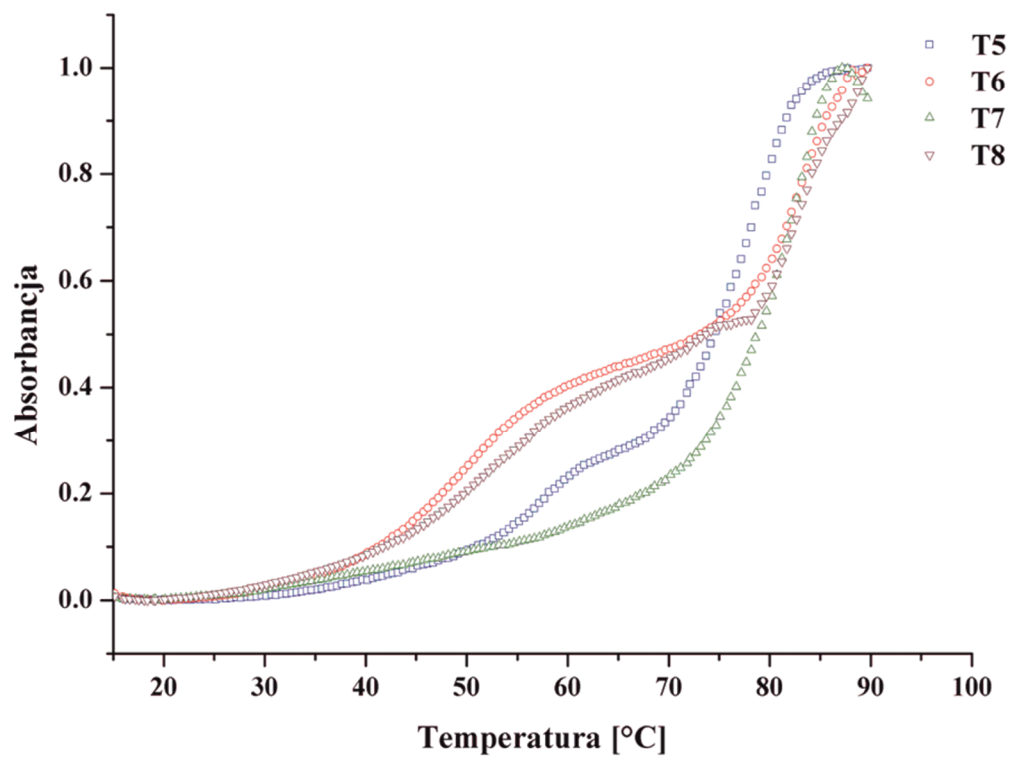
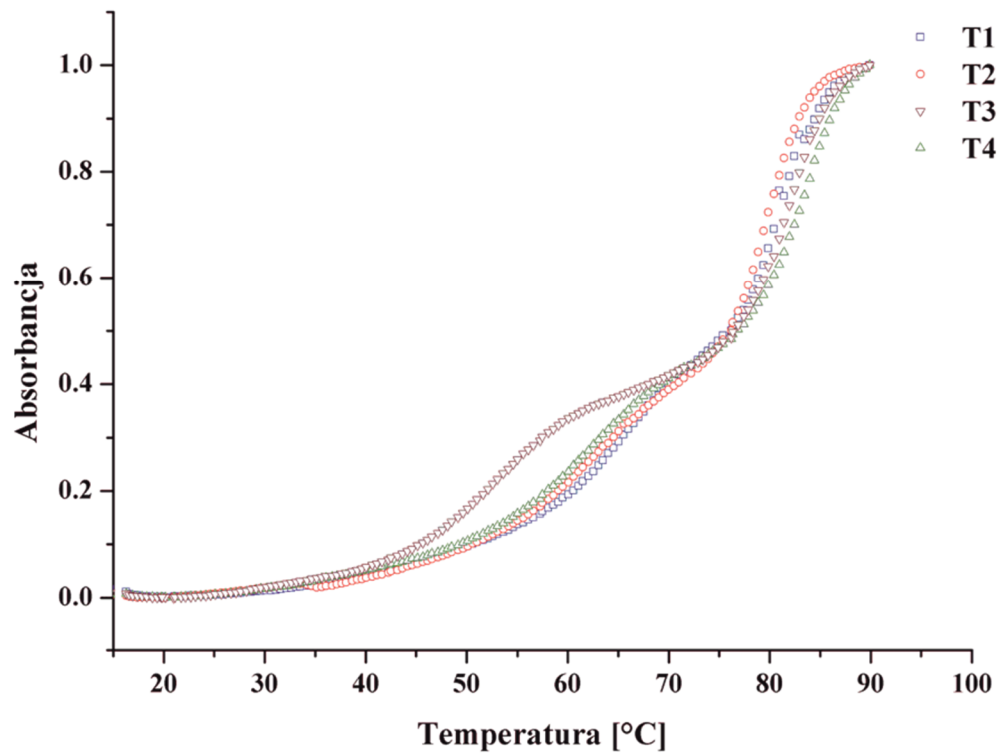
Otrzymane wyniki pozwoliły zaklasyfikować badane trypleksy RNA do dwóch grup. Pierwsza obejmowała warianty T1, T2 i T4, które charakteryzowały się wysokimi temperaturami topnienia T_{m1} , wynoszącymi odpowiednio: 68.0, 67.1 i 64.1°C (Tab. 4). Natomiast w drugiej znajdowały się warianty trypleksów T5, T6 i T8 odznaczające się nieco mniejszymi wartościami parametru T_{m1} wynoszącymi odpowiednio: 62.1, 53.2 i 56.0°C (Tab. 4). Dla trypleksu T7 wyznaczenie wartości T_{m1} okazało się niemożliwe ze względu na brak dwóch punktów przegięcia podczas topnienia (Rys. 17). Można przypuszczać, że trypleks T7 był tak trwały, że temperatura topnienia trypleksu pokrywała się z temperaturą topnienia spinki, dlatego zaobserwowano tylko jedno przejście w przebiegu krzywej topnienia. Istnieje również prawdopodobieństwo, że drugi punkt przegięcia charakterystyczny w topnieniu trypleksu znajdował się poza zakresem pomiarowym, dlatego wyznaczenie temperatury topnienia wariantu T7 było niemożliwe.

Co ciekawe, zaobserwowano, że wartość parametru T_{m1} była wyższa w przypadku trypleksów T1-T4 w porównaniu z trypleksami T5-T8 (Tab. 4). Wyjątek stanowił jeden trypleks T3, dla którego wartość temperatury topnienia była mniejsza (T_{m1} przyjmowała wartość 60.0°C, Tab. 4). Warianty T1-T4 posiadały więcej modyfikacji LNA i 2-tioU, przez co charakteryzowały się większą trwałością termiczną w porównaniu z wariantami T5-T8, które zawierały mniej podstawień typu LNA i 2-tioU. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje stwierdzono, że wielokrotne podstawienia resztami typu LNA i 2-tioU w oligomerze TFO przyczyniają się do wzrostu temperatury topnienia badanych trypleksów RNA.

Tabela 4. Temperatury topnienia trypleksów RNA (T_{m1}) i spinki (T_{m2}) zawierających reszty nukleotydowe LNA (C^L) oraz 2-tioU^a.

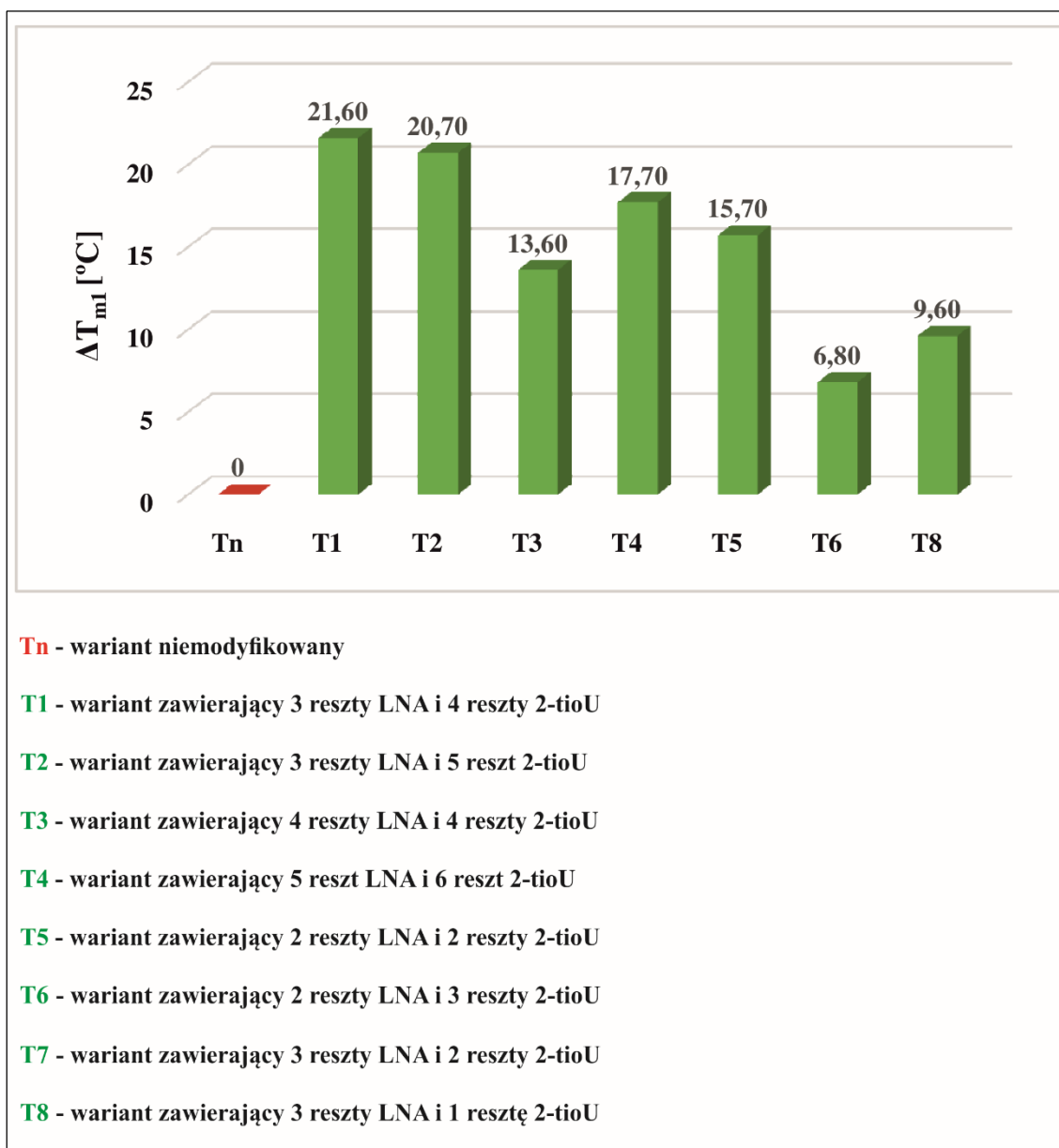
Nazwa trypleksu	Spinka (5'-3')	TFO (5'-3')	Temperatury topnienia		
			T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔT_m^b (°C)
Tn*	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	UCUCUCUCUUUC	46.4*	79.3*	0
T1	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UC^LUC\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}UC\underline{s^2}UUUC^L$	68.0	82.2	21.6
T2	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UC^LUC\underline{s^2}UC\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}UU\underline{s^2}UC^L$	67.1	82.5	20.7
T3	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UCUC^L\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}UUUC^L$	60.0	82.0	13.6
T4	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UC^LUC^L\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}UC^L\underline{s^2}U\underline{s^2}U\underline{s^2}UC^L$	64.1	81.2	17.7
T5	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$UC^LUC\underline{s^2}UCUC\underline{s^2}UUUC^L$	62.1	79.3	15.7
T6	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UC^LUCUCUC\underline{s^2}UU\underline{s^2}UC^L$	53.2	80.9	6.8
T7	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$\underline{s^2}UCUC^LUCUC^L\underline{s^2}UUUC^L$	n.d.	(75)	n.d.
T8	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA	$UC^LUC^L\underline{s^2}UCUCUUUC^L$	56.0	81.4	9.6

Oznaczenia: a – bufor: 100 mM NaCl, 20 mM MES, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0; b – obliczona na podstawie różnicy T_{m1} dla wariantów trypleksów RNA (T1-T8) i T_{m1} dla niemodyfikowanego trypleksu RNA (Tn); Tn* - niemodyfikowany trypleks RNA stanowiący kontrolę; n.d. – brak dwóch punktów przezięcia podczas topnienia.



Rysunek 17. Krzywe topnienia dla badanych trypleksów RNA zawierających modyfikacje 2-tioU oraz LNA.

Spośród wszystkich badanych trypleksów (z wyjątkiem T7, dla którego nie wyznaczono parametru T_{m1}) wariant T1 odznaczał się najwyższą temperaturą topnienia, której wartość wynosiła 68.0°C (Tab. 4). Natomiast, najniższą wartość parametru T_{m1} zanotowano dla wariantu trypleksu T6 zawierającego dwie reszty typu LNA i trzy reszty 2-tioU ($T_{m1} = 53.2^\circ\text{C}$, Tab. 4). Zmiany temperatur topnienia (ΔT_m) obliczone z różnicy wartości parametru T_{m1} modyfikowanych trypleksów (T1, T2 i T4 oraz T6 i T8) i wartości parametru T_{m1} niemodyfikowanego trypleksu (T_n) sugerują występowanie pewnej zależności między liczbą podstawień resztami LNA i 2-tioU a trwałością termiczną badanych struktur (Tab. 4 i Rys. 17). Jednak, korelacja ta była widoczna w sytuacji, gdy porównywano ze sobą wartości ΔT_m pomiędzy grupami trypleksów (zestawienie wartości ΔT_m wariantów T1, T2 i T4 z wartościami ΔT_m wariantów T6 i T8, Tab. 4 i Rys. 11). Natomiast, gdy porównano zmiany temperatur topnienia wariantów trypleksów w obrębie danej grupy, znalezienie bezpośredniej korelacji między ΔT_m a liczbą modyfikacji LNA i 2-tioU okazało się niemożliwe. Przykładowo, wariant T4 zawierający sześć 2-tioU i pięć reszt typu LNA odznaczał się mniejszą temperaturą topnienia ($T_{m1} = 64.1^\circ\text{C}$, Tab. 4) niż wariant T1, który miał cztery 2-tioU i trzy podstawienia typu LNA ($T_{m1} = 68.0^\circ\text{C}$, Tab. 4). Brak takiej zależności można tłumaczyć wpływem nie tylko liczby modyfikacji LNA i 2-tioU na stabilność termodynamiczną badanych trypleksów, ale również innymi czynnikami, na przykład położeniem modyfikacji w oligomerze lub występowaniem różnic w oddziaływaniu cząstkowych ładunków grup egzocyklicznych w sąsiadujących zasadach. Można także przypuszczać, że wielokrotne podstawienia typu LNA i 2-tioU w łańcuchu TFO mogą powodować za duże ustrukturalizowanie lub usztywnienie TFO. W konsekwencji dopasowanie nici TFO do trzonu spinki RNA jest utrudnione lub nawet niemożliwe.



Rysunek 18. Wykres zależności wartości temperatury topnienia trypleksów T1-T8 od liczby modyfikacji LNA i 2-tioU.

Podsumowując, otrzymane wyniki dla ośmiu wariantów trypleksów RNA (T1-T8) mogą świadczyć o silnym stabilizacyjnym efekcie będącym rezultatem wielokrotnego podstawienia resztami LNA i 2-tioU. Dane te pozostają w zgodności z wcześniejszymi doniesieniami na temat korzystnego wpływu pochodnych LNA i 2-tioU na trwałość trypleksów RNA [150]. Zhou i wsp., pokazali, że modyfikacje zarówno w obrębie zasady azotowej, jak i pierścienia cukrowego stabilizują trypleksy RNA. Wykazali, że wprowadzenie pojedynczej modyfikacji LNA zwiększało temperaturę topnienia trypleksu średnio o ok. 9°C. Natomiast obecność jednej reszty 2-tiourydyny powodowała większy wzrost wynoszący średnio ok. 12°C [150]. Ponadto, szczegółowa

analiza danych otrzymanych w badaniach termodynamicznych w niniejszej pracy pozwoliła przypuszczać, że miejsce wprowadzenia modyfikacji chemicznych LNA i 2-tioU również może mieć wpływ na trwałość termiczną trypleksów RNA. W przypadku analogów LNA wszystkie reszty rybozy występują w konformacji *C3'-endo*, co sprzyja korzystnym zmianom w entalpii podczas tworzenia się struktury trypleksu z udziałem TFO zawierającego reszty LNA. W konsekwencji dochodzi do powstania trypleksu o zwiększonej stabilności. Natomiast obecność atomu siarki (modyfikacja 2-tiourydyna) może przyczynić się do zwiększenia specyficzności oddziaływania TFO ze spinką RNA przez, m.in.: wzrost oddziaływań warstwowych i oddziaływań van der Waalsa, a także zmniejszenie efektu dehydratacji [150]. Również 2-tioU sprzyja przyjmowaniu konformacji *C3'-endo* pierścienia cukrowego w łańcuchu TFO. W związku z tym, jednoczesne wprowadzenie obu modyfikacji do oligomeru TFO przyczyniało się do powstawania stabilnych trypleksów RNA.

1.2.2 Wpływ zmiany enancjomeru D-rybozy na L-rybozę na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA

Wiadomo, że naturalnie występujące DNA i RNA mogą być degradowane przez enzymy wewnątrzkomórkowe. Zatem ważne jest, aby zwiększyć ich stabilność enzymatyczną i poprawić powinowactwo do komplementarnych docelowych cząsteczek. W tym celu powszechnie wykorzystuje się różne modyfikacje chemiczne oligonukleotydów, jednak ostatnio ciekawą alternatywą okazały się kwasy nukleinowe zawierające nienaturalną formę cukru, tj. L-(deoksy)rybozę. Jest to enancjomeryczna forma w stosunku do pochodnych D-(deoksy)rybozy [285, 286]. Dotychczas opublikowane dane sugerują, że cząsteczki w serii β -L-RNA lub β -L-DNA są odporne na działanie nukleaz komórkowych, przez co mogą być wykorzystywane, jako narzędzia molekularne w badaniach biologicznych [287-289]. Ponadto, L-enancjomery mają zdolność tworzenia różnych motywów strukturalnych, w tym typu spinka do włosów, heterochiralne dupleksy, czy G-kwadrupleksy [290, 291]. Mając na uwadze powyższe informacje w pracy doktorskiej postanowiono wykorzystać oligorybonukleotydy w serii β -L-RNA i sprawdzić, czy mogą tworzyć struktury trójniciowe.

Pomiary temperatur topnienia zostały wykonane dla trzech wariantów trypleksów, w tym dwóch heterochiralnych, tj. T9 i T10 oraz jednego homochiralnego (T11)

utworzonego z TFO i RHP w serii β -L-RNA. Na podstawie temperatur topnienia można zauważyć, że dwa heterochiralne trypleksy T9 i T10 były bardzo niestabilne, a profil krzywej topnienia nie miał wyraźnego drugiego przejścia, związanego z dysocjacją trzeciej nici, tj. TFO (Tab. 5). W związku z tym wyznaczenie parametrów termodynamicznych dla trypleksów heterochiralnych było obciążone dużym błędem. Jednakże, otrzymane wyniki są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami Garbesi i wsp., który stwierdził, że L-enancjomer TFO nie tworzy struktury trypleksu z naturalnym dwuniciowym DNA [292]. Poza tym, wstępne wyniki z badania modelowania molekularnego wykazały, że trypleksy mogą powstawać, jeśli dwie nici pirymidynowe zawierają reszty rybozy o tej samej konfiguracji [275]. Natomiast, gdy obie nici pirymidynowe posiadają reszty rybozy o odmiennej konfiguracji występuje bardzo niekorzystny efekt energetyczny. W konsekwencji tworzenie się trypleksu heterochiralnego nie jest możliwe.

Przeprowadzone badania termodynamiczne dla wariantu trypleksu T11 stanowiły uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej struktur RNA zawierających L-rybozę. Uzyskane dane sugerują, że oligorybonukleotyd TFO i spinka RNA (RHP) w serii β -L-RNA mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć, podobnie jak D-enancjomery, strukturę trypleksu. Niespodziewanie, w oparciu o wartości energii swobodnej (ΔG°_{37}) naturalny trypleks odznaczał się większą stabilnością termodynamiczną w porównaniu z trypleksem w serii β -L-RNA ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1.71$ kcal/mol). Jednak w profilach topnienia heterochiralnych trypleksów T9-T11 nie obserwowano wyraźnych dwóch punktów przegięcia, co sugerowało duży efekt destabilizacyjny spowodowany zmianą D-rybozy na L-rybozę i w konsekwencji uniemożliwiło uzyskanie wiarygodnych parametrów termodynamicznych (Tab. 5). Dlatego w dalszej części pracy postanowiono wykonać dodatkowo eksperymenty z zastosowaniem techniki opóźnionej migracji w żelu (EMSA) dla kompleksów TFO z RHP w serii β -L-RNA.

Tabela 5. Parametry termodynamiczne tworzenia trypleksów RNA w serii β -L-RNA^a.

Nazwa trypleksu	Spinka/TFO (5'-3')	Średnie dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$			
		$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)
Tn	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA/ UCUCUCUCUUUC	(48.3±8.8)	(131.4±28.0)	(7.52±0.36)	(43.5)	(29.0±1.7)	(69.0±5.4)	(7.57±0.05)	(48.5)
T9	<i>UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA/</i> <i>UCUCUCUCUUUC</i>	48.8±3.5	137.1±12.0	6.27±0.21	35.4	60.8±20.7	177.0±68.7	5.86±1.00	33.6
T10	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA/ UCUCUCUCUUUC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T11	<i>UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA/</i> <i>UCUCUCUCUUUC</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

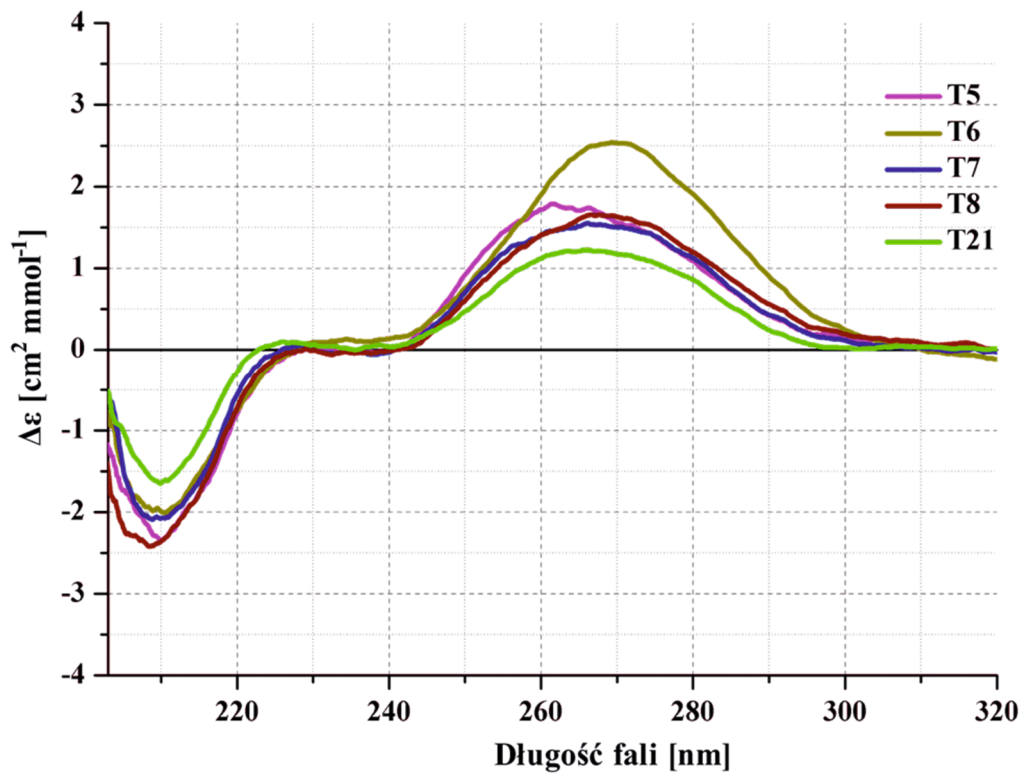
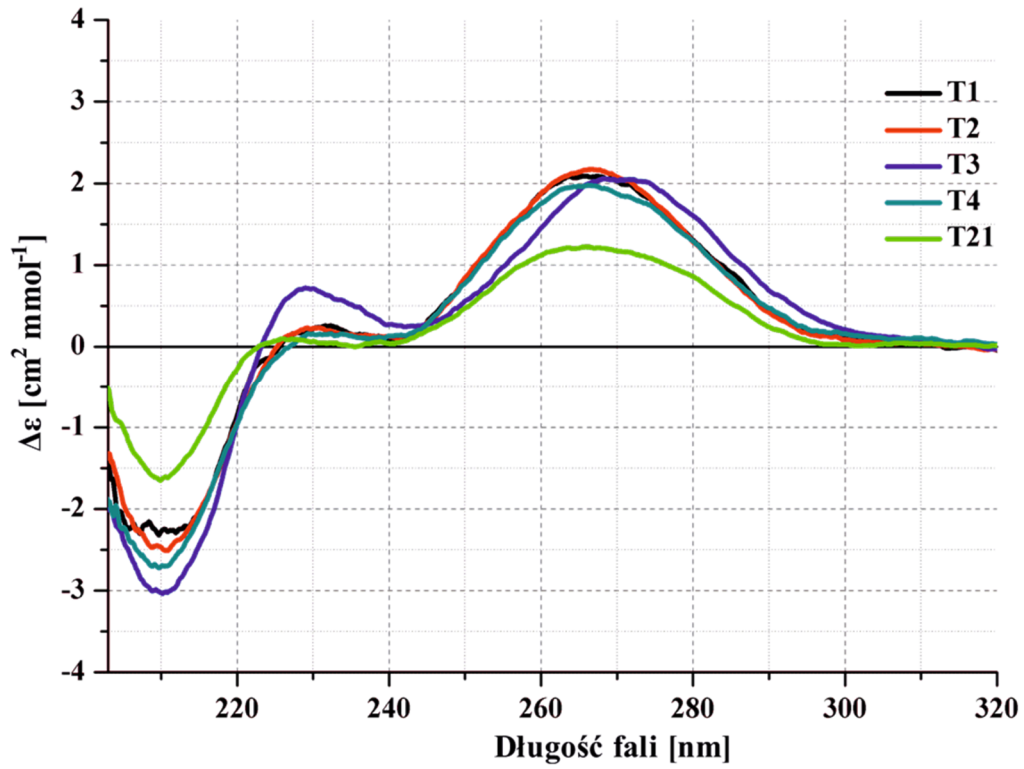
Oznaczenia: a – bufor: 100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 5.5; b – obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M; kursywa – β -L-RNA; T_m – oznacza temperaturę topnienia trypleksów RNA w serii β -L-RNA i odpowiada parametrowi T_{m1} dla trypleksów RNA T1-T8; wartości w nawiasie oznaczają parametry termodynamiczne niemodyfikowanego trypleksu Tn, parametr T_m dla tego trypleksu przyjmował odmienną wartość niż w przypadku topnienia UV wykonanego w buforze MES pH 7.0.

1.3 Badanie zmian strukturalnych wariantów trypleksów RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego

Badania właściwości strukturalnych wybranych wariantów trypleksów RNA przeprowadzono wykonując widma dichroizmu kołowego (CD). Spektroskopia CD dostarcza informacji na temat geometrii badanej cząsteczki i oddziaływań trzeciorzędowych. Technika ta umożliwia łatwe i szybkie określenie wpływu zmian warunków środowiska oraz wprowadzenia modyfikacji chemicznych na struktury tworzone przez oligonukleotydy [293]. Liczne publikacje potwierdzają, że spektroskopia dichroizmu kołowego jest powszechnie stosowana w badaniach strukturalnych trypleksów [294-296]. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia postanowiono wykorzystać spektroskopię CD w celu uzyskania dodatkowych informacji o sposobie fałdowania badanych trypleksów RNA.

Z danych literaturowych wynika, że widma CD dla struktur trójniciowych DNA i RNA charakteryzują się występowaniem silnego, ujemnego pasma w zakresie długości fali 210-220 nm [297, 298]. Na podstawie otrzymanych danych eksperymentalnych w niniejszej pracy doktorskiej, zaobserwowano, że wszystkie osiem wariantów T1-T8 przyjmuje strukturę równoległego trypleksu, o czym świadczył intensywny ujemny sygnał przy długości fali ok. 215 nm (Rys. 19), co jest zgodne z danymi opisanymi w innych badaniach [299].

Ponadto, widma CD dla wszystkich wariantów trypleksów RNA posiadały w swoim przebiegu dwa dodatnie pasma przy długości fali ok. 235 nm i 275 nm, które różniły się intensywnością (Rys. 19). Pierwszy pozytywny sygnał przy ok. 235 nm był bardzo słaby, natomiast drugi sygnał przy ok. 275 nm był silny. Co więcej, uzyskane widma CD pokazują, że zmiany strukturalne wywołane obecnością modyfikacji LNA i 2-tioU w oligomerze TFO nie są znaczące. Obserwowane różnice w intensywności sygnałów negatywnych (215 nm) i pozytywnych (235 i 275 nm) dla poszczególnych wariantów trypleksów RNA są umiarkowane.



Rysunek 19. Widma dichroizmu kołowego wybranych wariantów trypleksów RNA.

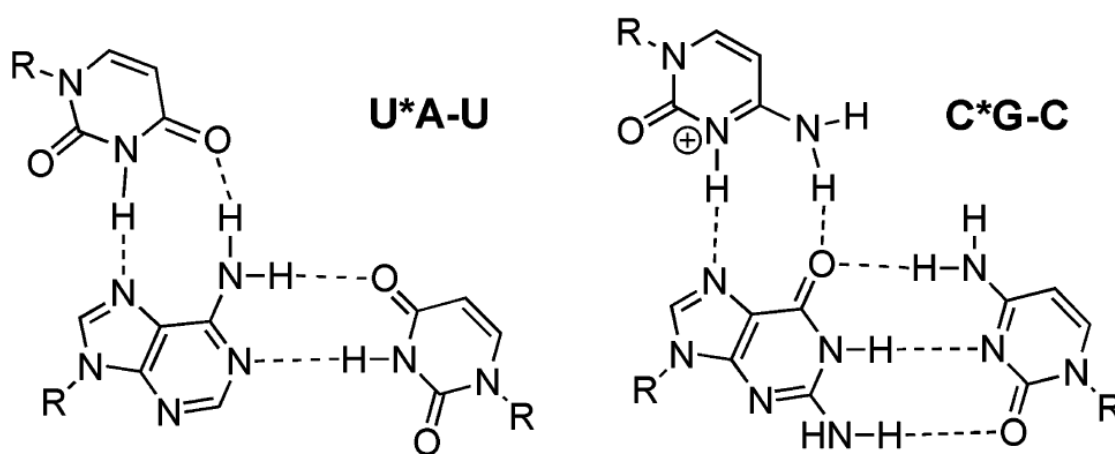
Jednakże w sytuacji, gdy porównywano intensywność negatywnego piku przy długości fali ok. 215 nm między wariantami trypleksów T1-T8 a wariantem T21 zauważono pewne różnice (Rys. 19). Zwiększone natężenie pasma przy długości fali ok. 215 nm dla badanych trypleksów RNA w odniesieniu do kontroli (trypleks T21) ujawniło wpływ pochodnych typu LNA i 2-tioU na strukturę trypleksu. Względna wartość sygnałów przy długości fali ok. 215 i 275 nm zmieniała się w pewnym zakresie dla wariantów trypleksów RNA z różną liczbą modyfikacji LNA i 2-tioU. Maksima dla obu tych sygnałów przesunęły się o około $3\text{-}5\text{ cm}^2\text{mmol}^{-1}$ (Rys. 19). Na tym etapie trudno było wyjaśnić nieznaczne różnice w uzyskanych widmach CD, ale stwierdzono, że warianty TFO z resztami typu LNA i 2-tioU tworzą podobną strukturę, mającą geometrię równoległego trypleksu. Widma CD w pewnym stopniu korelowały z wynikami topnienia UV, które również potwierdziły efekt stabilizacyjny wynikający z obecności tych modyfikacji w oligomerze TFO. Na podstawie przeprowadzonych badań z zastosowaniem spektroskopii CD ogólnie stwierdzono, że technika ta umożliwiła strukturalną charakterystykę oligorybonukleotydów w roztworze i stanowiła pewne uzupełnienie wiedzy na temat modyfikowanych cząsteczek TFO.

1.4 Badanie zdolności wiązania się oligorybonukleotydów TFO do spinki RHP

Głównymi metodami badania oddziaływań pomiędzy kwasami nukleinowymi *in vitro* są techniki oparte na uzyskaniu kompleksów cząsteczek DNA lub RNA oraz ich rozdziale elektroforetycznym. Taką metodą jest test opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA). Technika ta jest użytecznym narzędziem do ilościowej analizy struktury kwasów nukleinowych, w tym również trypleksów. Różnica w masie/ładunku pomiędzy formą dwuniciową i trójniciową DNA lub RNA prowadzi do opóźnienia migracji dupleksu zaangażowanego w tworzenie struktury trypleksu [300]. Zdolność oddziaływania różnych TFO z modelową spinką RNA zbadano w eksperymentach *in vitro* przeprowadzonych przy użyciu metody EMSA.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej zbadano zdolność 16 oligorybonukleotydów TFO do wiązania modelowej spinki RNA. Modelowy trypleks RNA wybrany do badań składał się z nici homopirymidynowej TFO, która wiązała się w orientacji równoległej z dwuniciowym fragmentem (trzonem) spinki RHP. Z doniesień literaturowych wiadomo, że specyficzne oddziaływania pirymidynowego TFO ze spinką wymagają protonowania reszt cytozyny, aby umożliwić tworzenie wiązań wodorowych typu Hoogsteena z resztą

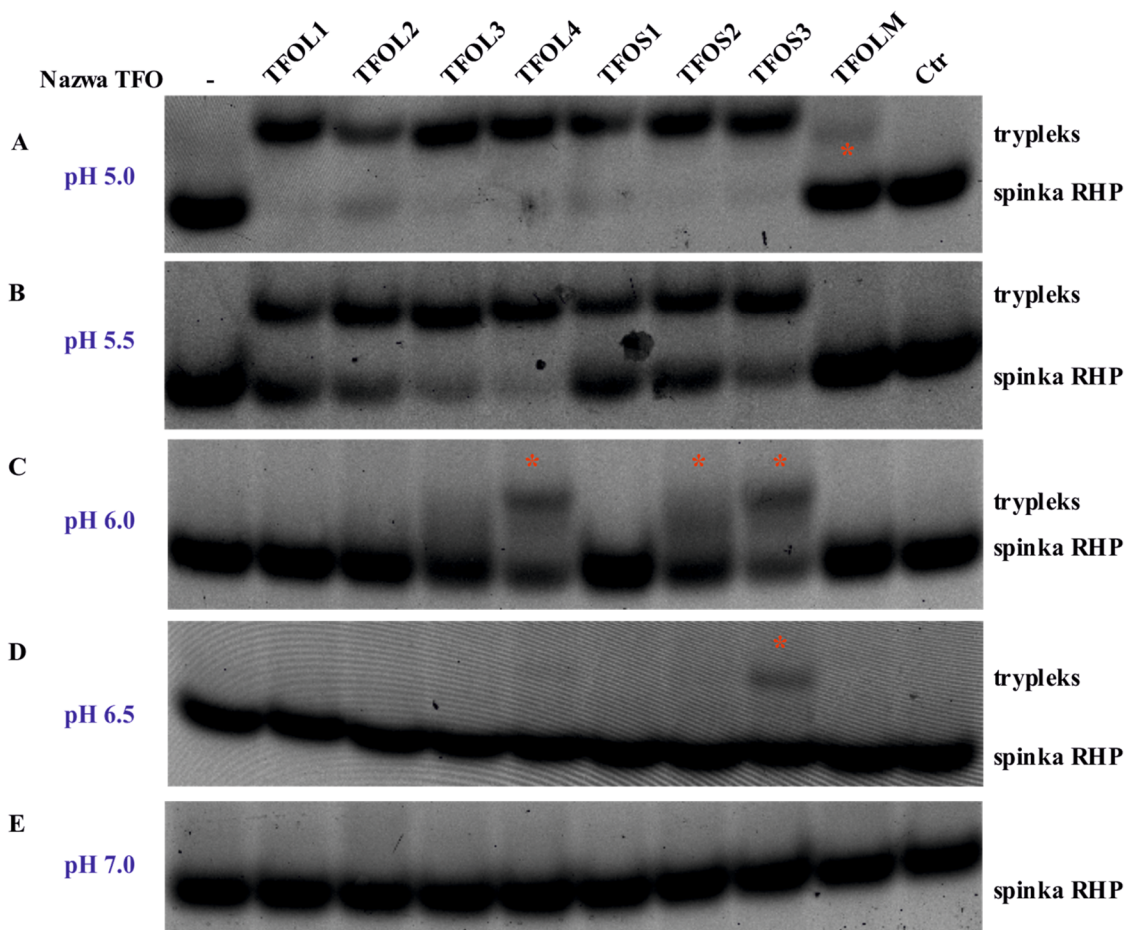
guaniny (Rys. 20) [131]. Zatem, powstawanie struktury trypleksu równoległego jest zależne od wartości pH. W związku z powyższym, sprawdzono zdolność oligorybonukleotydów TFO do oddziaływania ze spinką RNA (RHP) w zakresie pH od 5.0 do 7.0. W tym celu wykorzystano oligorybonukleotydy TFO i spinkę RHP, która była wyznakowana na końcu 5' barwnikiem 5(6)-FAM. Przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała spinkę RHP i oligomer TFO w stosunku równomolowym 1:1, każdy o stężeniu 5 μ M, rozpuszczone w buforze MES o wartościach pH: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 lub 7.0. Rozdział elektroforetyczny prowadzono na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w temperaturze pokojowej.



Rysunek 20. Schemat wiązań wodorowych typu Hoogsteena występujących w trypleksie [220].

Na podstawie wykonanych analiz EMSA wszystkie warianty trypleksów RNA można było zaklasyfikować do dwóch grup w zależności od wartości pH, w której powstawały. Pierwsza grupa obejmowała struktury utworzone przy współdziałaniu TFO zawierających podstawienia resztami LNA (TFOL1, TFOL2, TFOL3 i TFOL4) lub 2-tioU (TFOS1, TFOS2 i TFOS3), odpowiednio trypleksy: T13, T14, T15 i T16 oraz T17, T18 i T19. Do drugiej grupy zaliczono warianty trypleksów T1, T2, T3 i T4 oraz T5, T6, T7 i T8 posiadające w nici TFO wielokrotne podstawienia resztami typu LNA i 2-tioU (TFO1, TFO2, TFO3 i TFO4 oraz TFON1, TFON2, TFON3 i TFON4), które były zdolne do tworzenia się w warunkach obojętnego pH. Zaobserwowano, że większość przedstawicieli pierwszej grupy powstawała w warunkach niskiego pH (wartość równa 5.0 lub 5.5), co zostało zaprezentowane na zdjęciu żelu (Rys. 21A i B). Wraz ze wzrostem wartości pH nie obserwowano tworzenia się struktury trójniciowej, co potwierdzały widoczne prążki na żelu położone na jednej wysokości (Rys. 21D i E).

Wyjątek stanowiły trypleksy T16, T18 i T19 tworzące się w warunkach wyższego pH (wartość równa 6.0), (warianty TFOL4, TFOS2 i TFOS3 oznaczone czerwoną gwiazdką, Rys. 21C).

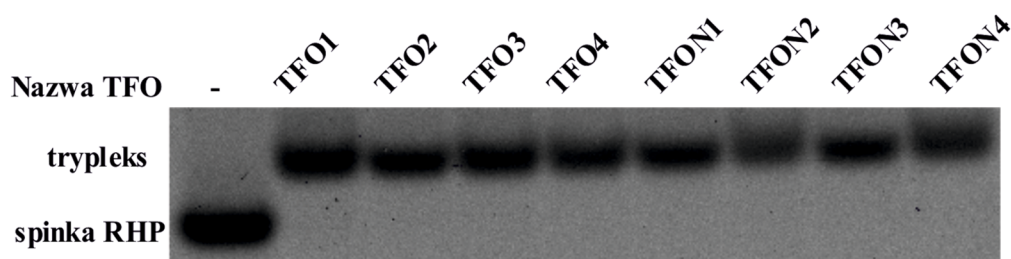


Rysunek 21. Test opóźnionej migracji w żelu (EMSA) dla wariantów trypleksów RNA w różnych warunkach.

Analizując otrzymane wyniki zauważono, że wprowadzenie trzech modyfikacji 2-tioU do nici TFO zdecydowanie zwiększało zdolność wiązania się TFOS3 do spinki RHP, dzięki czemu było możliwe utworzenie struktury trypleksu T19 w warunkach pH 6.5 (wariant TFOS3 oznaczony czerwoną gwiazdką, Rys. 21D). W tym przypadku dopiero wzrost pH do wartości powyżej 6.5 uniemożliwiał specyficzne oddziaływanie między TFOS3 i spinką RHP (Rys. 21E). Ciekawym przypadkiem był jeden wariant TFOLM wykazujący niewielkie powinowactwo do spinki RHP, nawet w warunkach pH 5.0 (wariant TFOLM oznaczony czerwoną gwiazdką, Rys. 21A). Warto zwrócić uwagę na fakt, że oligorybonukleotyd TFOLM, pomimo, iż posiadał podstawienia resztami typu LNA nie tworzył stabilnej struktury trypleksu. Ponadto, wprowadzenie

modyfikacji 2'-O-MeRNA do TFOLM miało niekorzystny wpływ na formowanie się struktury trójniciowej T20. Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że podstawienia resztami typu 2'-O-MeRNA powodowały silny efekt destabilizacyjny, co skutkowało obniżeniem powinowactwa TFOLM do spinki RHP. W konsekwencji formowanie się trypleksu T20 było niemożliwe nawet przy zastosowaniu wartości pH 5.0.

Porównując wyniki dla wariantów trypleksów T13-T20 otrzymane z eksperymentów EMSA z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych innej grupy badawczej [150], można zauważyć pewne korelacje. Po pierwsze, wprowadzenie modyfikacji LNA oraz 2-tiourydyny do nici TFO pozwoliło na powstawanie stabilnych trypleksów RNA. Świadczą o tym zarówno wyniki eksperymentalne uzyskane z testów EMSA wykonanych w ramach pracy doktorskiej, jak i opublikowane dane termodynamiczne dla wariantów trypleksów T13-T20 [150]. Po drugie, w rozprawie doktorskiej pokazano, że oligorybonukleotyd TFOLM posiadający podstawienia resztami 2'-O-MeRNA i LNA wykazywał niewielkie powinowactwo do spinki RHP, przez co powstanie trypleksu T20 było słabo widoczne, nawet w pH 5.0. Powyższe obserwacje również pozostają w zgodności z danymi literaturowymi, z których wynika, że analogi 2'-O-MeRNA powodują obniżenie trwałości termodynamicznej trypleksu RNA [150, 173]. Warianty TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4 należące do drugiej grupy, wykazywały zdolność do tworzenia struktury trypleksu (T1-T8) w warunkach obojętnego pH (Rys. 22), ponieważ posiadały wielokrotne podstawienia pochodnymi LNA i 2-tioU, które wpływały korzystnie na ich stabilność termodynamiczną.

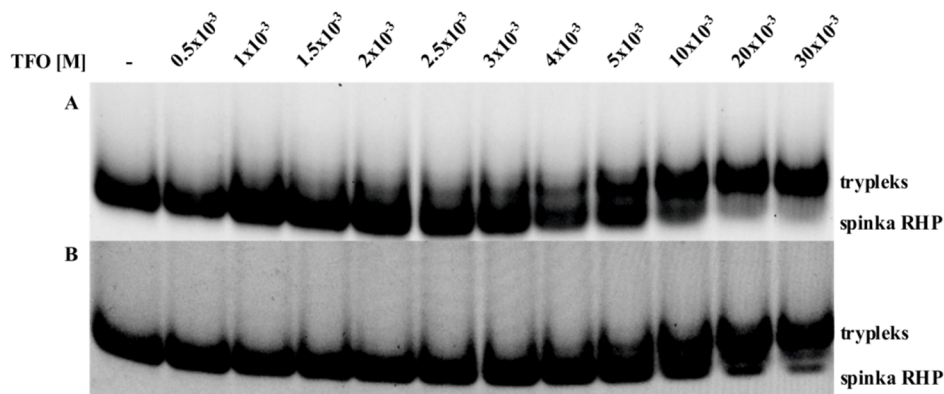


Rysunek 22. Test opóźnionej migracji w żelu (EMSA) dla wariantów trypleksów RNA w warunkach pH 7.0.

Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było sformułowanie stwierdzenia, że równoczesna obecność LNA i 2-tioU znacząco wpływa na zwiększenie powinowactwa TFO do spinki RNA, dzięki czemu struktura trypleksu może tworzyć się w pH 7.0.

Otrzymane wyniki eksperymentalne pozostają w zgodności z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych podczas pracy doktorskiej i pokazują ścisłą zależność pomiędzy stopniem ustrukturalizowania trypleksów T1-T8 a ich trwałością termiczną. Co więcej, podobne obserwacje zostały przedstawione w literaturze przez Zhou i wsp., Okamoto i wsp. oraz Brunet i wsp., w której opisano korzystny wpływ analogów LNA i pochodnych 2-tioU na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA [150, 301, 302].

Podczas wykonywania pracy doktorskiej, w badaniach termodynamicznych wykazano, że oligomer TFO w serii β -L-RNA (bTFO) ma zdolność wiązania się do spinki RHP w serii β -L-RNA i tworzenia z nią struktury trypleksu T11. Jednak, ze względu na brak wyraźnych dwóch punktów przegięcia (duże rozbieżności pomiędzy wartościami parametrów $-\Delta H$ i $-\Delta S$ uzyskanymi z dwóch metod obliczania tych parametrów) postanowiono sprawdzić zdolność oddziaływania wyżej wymienionych cząsteczek przy użyciu metody EMSA. Do eksperymentu EMSA wykorzystano oligomery znakowane fluorescencyjnie. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na Rysunku 23.



Rysunek 23. Test opóźnionej migracji w żelu (EMSA) dla wariantów trypleksów zawierających D-rybozę (A) i L-rybozę (B) w warunkach pH 5.0.

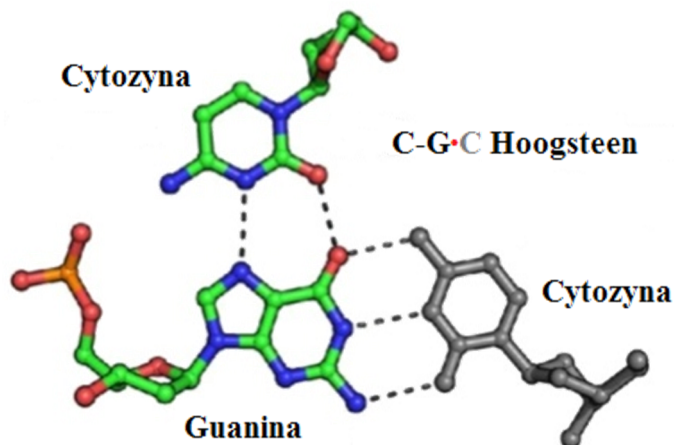
Obecność produktów widocznych na żelu w postaci wolno migrujących prążków świadczyła o powstaniu struktury trypleksu (T11) utworzonego przy współdziałaniu bTFO zawierającego L-rybozę (Rys. 23B). Jednak zaobserwowano, że powinowactwo oligomeru bTFO do spinki RHP w serii β -L-RNA jest mniejsze w porównaniu z naturalnym odpowiednikiem zawierającym D-rybozę. W przypadku trypleksu T11 był wymagany około 20-krotny nadmiar oligomeru TFO w stosunku do spinki RHP, aby powstała struktura trójniciowa (Rys. 23B), podczas gdy dla naturalnego wariantu już

przy ok. 4-krotnym nadmiarze TFO w stosunku do spinki RHP pojawił się drugi prążek wskazujący na tworzenie się trypleksu (Rys. 23A).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że oddziaływanie pomiędzy TFO i spinką RHP w serii β -L-RNA jest możliwe, podobnie jak w przypadku naturalnych oligorybonukleotydów. Jakkolwiek trudno wytłumaczyć, dlaczego tworzenie struktury trypleksu RNA zawierającego L-rybozę w warunkach *in vitro* wymagało większego nadmiaru oligomeru TFO w porównaniu z naturalnym odpowiednikiem. Można jednak zauważyć, że wyniki otrzymane metodą EMSA dla trypleksów w serii β -L-RNA korelują z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych. Pokazują one, że trwałość termiczna trypleksów utworzonych przez oligorybonukleotydy zawierające L-rybozę jest mniejsza w porównaniu z ich odpowiednikami posiadającymi D-rybozę.

1.5 Badanie stałej dysocjacji wybranych wariantów trypleksów RNA

W pracy doktorskiej wykorzystano model trypleksu równoległego (Rys. 15, *Podrozdział 1.1 Warianty trypleksów RNA*). Liczne badania wykazały, że podczas formowania się tego rodzaju trypleksu dochodzi do protonowania reszt cytozyny [107, 130, 131]. Warto podkreślić, że zmiany wartości pH mogą bezpośrednio wpływać na poziom protonowania reszt cytozyny. Z tego powodu ograniczenie wpływu pH oraz zwiększenie trwałości trypleksów równoległych jest pożądane w strategii wykorzystującej trypleksy. W związku z tym, ważne jest zastosowanie takich warunków eksperymentalnych, aby możliwe było tworzenie wiązań wodorowych typu Hoogsteena pomiędzy atomem azotu N3 reszty cytozyny a atomem azotu N7 reszty guaniny (Rys. 24).

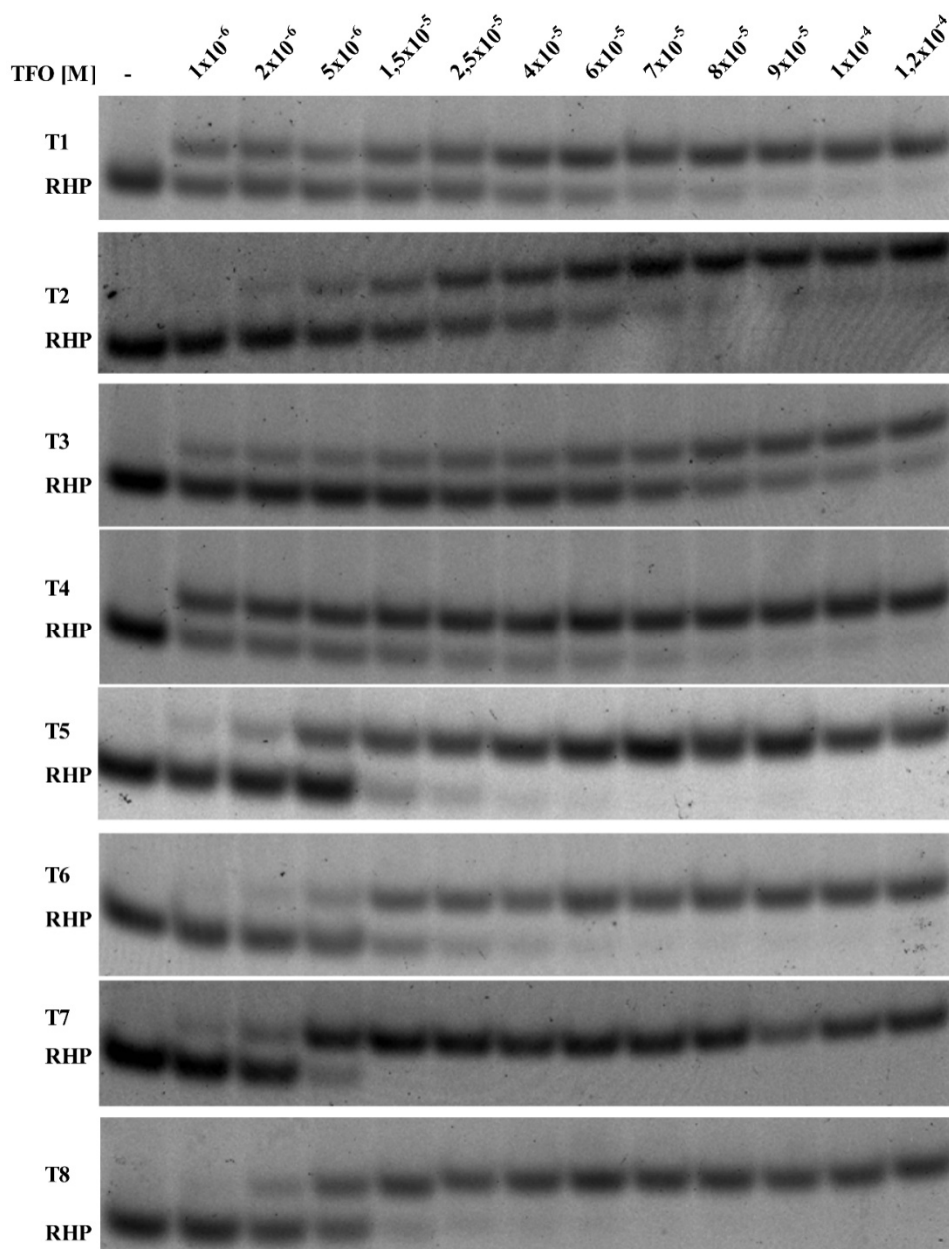


Rysunek 24. Schemat wiązań wodorowych typu Hoogsteena między resztami guaniny i cytozyny występujących w trypleksie (zmodyfikowane, [303]).

Wiadomo również, że stabilność trypleksów równoległych można poprawić poprzez wprowadzenie różnego typu modyfikacji chemicznych do nici TFO [127, 150]. Z opublikowanych prac wynika, że wykorzystanie analogów RNA lub DNA w badaniach trypleksów pozwala na otrzymanie stabilnych struktur w warunkach fizjologicznego pH [105, 150, 211]. Ponieważ warianty trypleksów RNA (T13-T20) nie powstawały w warunkach obojętnego pH, co zostało potwierdzone w badaniach oddziaływania TFO i spinki RHP metodą EMSA (Rys. 21E, *Podrozdział 1.4 Badanie zdolności wiązania się oligorybonukleotydów TFO do spinki RHP*), a także odznaczały się małymi wartościami parametru T_m dla pH z zakresu wartości od 6.0 do 7.0 [150], do określenia stałej dysocjacji wybrano osiem trypleksów RNA, tj. T1-T8. Struktury T1-T8 charakteryzowały się dużą trwałością termiczną oraz mogły tworzyć się w warunkach obojętnego pH.

Specyficzność oddziaływania dwóch cząsteczek, które tworzą kompleks można weryfikować różnymi metodami eksperymentalnymi, natomiast siłę tego procesu opisuje się za pomocą parametru określanego mianem stałej dysocjacji (K_d). W związku z tym, znajomość parametru K_d kompleksów kwasów nukleinowych wydaje się być istotna w kontekście badania stabilności trypleksów RNA. W niniejszej pracy doktorskiej wartości parametru K_d zostały wyznaczone na podstawie wykonanych badań *in vitro* na żelach poliakrylamidowych, a do analizy wyników wykorzystano wzory opisane w pracy Shindo i wsp., w której określono stałą dysocjacji dla trypleksów DNA [304].

W pierwszym etapie przeprowadzono testy EMSA w buforze MES o pH 7.0, dla których uzyskane wyniki zaprezentowano na Rysunku 25. Następnie, w celu określenia wartości stałej dysocjacji wykonano analizę danych przy użyciu dwóch programów Multi Gauge V3.0 i Origin Pro 8. Wartości parametru K_d zostały obliczone w oparciu o stężenie TFO (TFO1-TFO4 oraz TFON1-TFON4), przy którym połowa cząsteczek oligomeru znajdujących się w roztworze była zaangażowana w oddziaływanie ze spinką RNA (RHP) [305]. Zestawienie wartości stałej dysocjacji dla badanych wariantów trypleksów RNA (T1-T8) zostało zaprezentowane w Tabeli 6.



Rysunek 25. Test opóźnionej migracji w żelu (EMSA) dla wariantów trypleksów RNA w warunkach pH 7.0.

Tabela 6. Wartości stałej dysocjacji dla wybranych wariantów trypleksów RNA.

Nazwa trypleksu	Sekwencja TFO (5'-3')	Stała dysocjacji [μ M]
T1	$s^2UC^LUCs^2UC^Ls^2UCs^2UUUC^L$	3.01
T2	$s^2UC^LUCs^2UCs^2UC^Ls^2UUs^2UC^L$	3.56
T3	$s^2UCUC^Ls^2UC^Ls^2UC^Ls^2UUUC^L$	4.75
T4	$s^2UC^LUC^Ls^2UC^Ls^2UC^Ls^2Us^2Us^2UC^L$	2.47
T5	$UC^LUCs^2UCUCs^2UUUC^L$	9.54
T6	$s^2UC^LUCUCUCs^2UUs^2UC^L$	7.60
T7	$s^2UCUC^LUCUC^Ls^2UUUC^L$	3.94
T8	$UC^LUC^Ls^2UCUCUUUC^L$	5.20

Oznaczenia: C^L – modyfikacja LNA; s²U – 2-tiourydyna.

Uzyskane wartości parametru K_d mogą być wykorzystane, jako kryterium podziału wariantów trypleksów T1-T8 na dwie grupy, podobnie jak w przypadku ich analizy termodynamicznej i badania zdolności oddziaływania TFO i spinki RHP. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było stwierdzenie, że warianty trypleksów T1-T4 zawierające wielokrotne podstawienia typu LNA i 2-tioU odznaczały się korzystniejszymi wartościami parametru K_d w porównaniu z wariantami trypleksów T5-T8, które zawierały mniejszą liczbę reszt typu LNA i 2-tioU. Parametr K_d przyjmował wartości: 3.01, 3.56, 2.47 oraz 9.54, 7.60, 5.20 μ M odpowiednio dla trypleksów T1, T2, T4 oraz T5, T6, T7 (Tab. 6). Wyjątek stanowił wariant T3 zawierający więcej podstawień typu LNA i 2-tioU, dla którego odnotowano mniej korzystną wartość stałej dysocjacji (K_d wynosiła 4.75 μ M, Tab. 6) w odniesieniu do K_d określonego dla wariantu T7 (K_d wynosiła 3.94 μ M, Tab. 6). Spośród badanych trypleksów RNA najbardziej korzystną wartość parametru K_d uzyskano dla wariantu trypleksu T4, który zawierał sześć reszt 2-tioU i pięć reszt typu LNA, (K_d wynosiła 2.47 μ M, Tab. 6), natomiast najniższą K_d równą 9.54 μ M charakteryzował się wariant T5 mający dwa podstawienia typu LNA i dwie reszty 2-tioU. Osłabienie oddziaływania TFO ze spinką RHP zaobserwowano także w przypadku trypleksów, które zawierały mniejszą liczbę pochodnych typu LNA i 2-tioU, (parametr K_d przyjmował wartości 7.60 oraz 5.20 μ M odpowiednio dla T6 oraz T8, Tab. 6). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w tej części badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej, możliwe było sformułowanie kilku ogólnych wniosków. Po pierwsze, wprowadzenie modyfikacji chemicznych LNA i 2-tioU do nici TFO korzystnie wpływa na oddziaływanie takiego oligomeru ze spinką

RHP. Po drugie, zauważono różnice w powinowactwie modyfikowanych wariantów TFO do tworzenia trypleksów z cząsteczką RHP w zależności od liczby i pozycji modyfikacji LNA i 2-tioU. Korzystne wartości stałej dysocjacji trypleksów T1, T2 i T4 w pewnym stopniu korelują z ich stabilnością termiczną, ponieważ te warianty odznaczały się największymi wartościami temperatury topnienia. Natomiast, w przypadku trypleksów T3, T5, T6 i T8 parametr K_d przyjmował mniej korzystne wartości, a trwałość termiczna tych trypleksów była również mniejsza. Po trzecie, obecność pochodnych LNA i 2-tioU w różnym stopniu wpływała na oddziaływanie oligorybonukleotydów TFO i RHP. Uzyskane wyniki zgadzają się, zatem z obserwacjami poczynionymi w badaniach termodynamicznych trypleksów T1-T8. Podsumowując, można stwierdzić, że znajomość wartości stałej dysocjacji dla różnych wariantów trypleksów RNA może być przydatna w projektowaniu takich cząsteczek i wykorzystaniu w badaniach biologicznych, ponieważ oddziaływania pomiędzy RNA lub DNA mają istotne znaczenie dla procesów zachodzących w komórce.

1.6 Badanie wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na ekspresję genu *GFP* w linii komórkowej HeLa

Odkąd udowodniono, że trypleksy DNA i RNA mogą występować w komórce i uczestniczyć w wielu procesach biologicznych liczne grupy badawcze są zainteresowane strategią opartą na strukturach trójniciowych, a najnowsze prace wskazują na duży potencjał cząsteczek TFO w zastosowaniach terapeutycznych i diagnostycznych [219, 241, 306-308]. W związku z powyższym, w niniejszej pracy postanowiono zbadać efekt wywoływany przez warianty trypleksów RNA w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej. Ze względu na prostą metodę hodowli i względnie szybki wzrost w badaniach użyto nowotworową linię komórkową HeLa, wyprowadzoną z komórek raka szyjki macicy [309]. W celu sprawdzenia wpływu modelowych trypleksów RNA na ekspresję genu *GFP* w linii komórkowej HeLa zastosowano technikę ilościowego PCR (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*), inaczej nazywaną PCR w czasie rzeczywistym. Technika qPCR jest bardzo uniwersalna i czuła oraz pozwala na ilościowe śledzenie reakcji amplifikacji określonego fragmentu DNA w czasie, w którym rzeczywiście zachodzi. W tej metodzie powielana jest badana sekwencja w próbce przy użyciu dwóch specyficznych starterów, a następnie ilość dsDNA jest monitorowana przez zastosowanie

fluorescencyjnego barwnika, na przykład SYBR Green. Poziom fluorescencji emitowany przez użyte barwniki lub sondy molekularne jest proporcjonalny do ilości powielanego produktu, a tym samym do ilości matrycy. Liczba kopii badanego fragmentu kwasu nukleinowego jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji. Na podstawie analizy ilościowej produktów możliwa jest ocena ekspresji badanego genu. Z doniesień literaturowych wynika, że technika qPCR może być użyta do badania zmian ekspresji genów pod wpływem działania cząsteczek TFO [310]. W związku z tym, w niniejszej pracy metoda qPCR w połączeniu z rozdziałem produktów na żelu agarozowym z bromkiem etydyny posłużyła do oceny ilościowej transkryptów powstałych w komórkach HeLa po zastosowaniu wybranych wariantów TFO (TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4 oraz TFOP).

W badaniach biologicznych na linii komórkowej HeLa wykorzystano wektor ekspresyjny zawierający gen reporterowy białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescence protein*). Docelowa sekwencja (spinka RHP) została wklonowana bezpośrednio przed sekwencją genu *GFP*, co pozwoliło na monitorowanie zmian poziomu fluorescencji będących efektem powstania struktury trypleksu z udziałem oligomerów TFO (TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4 oraz TFOP). W przypadku, gdy zastosowany wariant TFO wiązał się specyficznie do docelowej sekwencji (spinka RHP) proces transkrypcji był zahamowany, a w konsekwencji nie dochodziło do ekspresji białka zielonej fluorescencji. Poziom ekspresji genu *GFP* był oznaczony w reakcji qPCR.

Podczas realizacji tej części badań wykonano również test aktywności metabolicznej komórek (test MTT). W tej metodzie ocenia się 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. Przeprowadzenie testu MTT pozwoliło wykluczyć efekt cytotoksyczny badanych wariantów TFO w linii komórkowej HeLa.

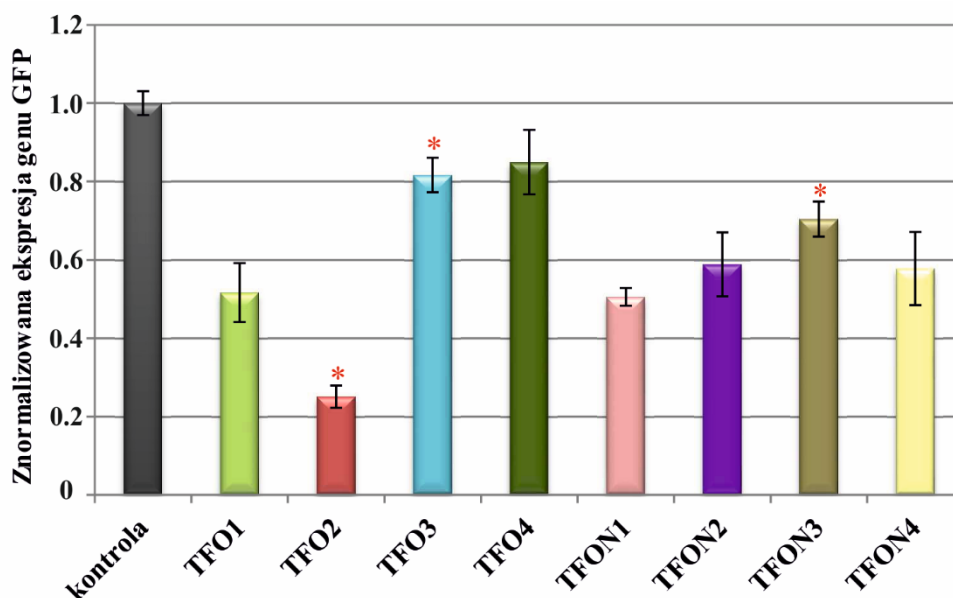
1.6.1 Ocena ilościowa wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na ekspresję genu *GFP*

Wiadomo, że podatność naturalnych kwasów nukleinowych na degradację nukleazami komórkowymi stanowi główne ograniczenie w ich zastosowaniu, zarówno w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. W związku z powyższym zdecydowano, że do badań na linii komórkowej HeLa zostaną wykorzystane wybrane warianty trypleksów RNA, tj. T1-T4 i T5-T8 oraz T21 (wariant stanowiący kontrolę) utworzone przy współdziałaniu oligomerów: TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4 oraz Ctr. Wyboru oligorybonukleotydów z całkowitej puli wariantów TFO dokonano na podstawie analizy zdolności oddziaływania TFO i spinki RHP, wykonanej w warunkach obojętnego pH (podobne występują wewnątrz komórki). Wybrane trypleksy RNA (T1-T8) charakteryzowały się najlepszymi właściwościami termodynamicznymi i biologicznymi w porównaniu z pozostałymi trypleksami T13-T20 oraz T11.

W pierwszym etapie tych badań przygotowano odpowiedni konstrukt zawierający docelową sekwencję (spinka RHP) i wklonowano go do plazmidu pZsGreen-N1. Obecność sekwencji spinki RHP została potwierdzona przez sekwencjonowanie. Tak przygotowany konstrukt wykorzystano do transfekcji linii komórkowej HeLa metodą lipofekcji. Badane warianty TFO (TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4) były wprowadzane do komórek HeLa (100 000 komórek na dołek w płytce 24 dołkowej) razem z plazmidem pZsGreen-N1 zawierającym sekwencję spinki RHP. Oligomery TFO wprowadzano do komórek w jednym stężeniu równym 3 μ M, natomiast ilość użytego plazmidu pZsGreen-N1 wynosiła 1 μ g na dołek w płytce 24 dołkowej. Po upływie 24 godzin od transfekcji izolowano całkowite RNA, a jego jakość sprawdzano na 1.5% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji i otrzymano cDNA, które posłużyło, jako matryca w reakcji qPCR. W ostatnim etapie wykonano analizę danych uzyskanych w reakcjach qPCR za pomocą programu Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było stwierdzenie, że wszystkie warianty TFO (TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4) w różnym stopniu wpływają na ekspresję genu *GFP* (Rys. 26, Tab. 7). Jednakże, w każdym zaobserwowanym przypadku badane oligomery TFO powodowały obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP* względem kontroli (komórki HeLa traktowane były oligomerem Ctr, który nie wiązał się do spinki RHP i nie tworzył z nią struktury trypleksu). Trzy warianty TFO (TFO2, TFO3 oraz TFON3, oznaczone czerwoną gwiazdką, Rys. 26, Tab. 7) wykazywały

bezpośredni istotny wpływ na poziom ekspresji genu *GFP* (wartość $p < 0.05$), podczas gdy w przypadku pozostałych pięciu wariantów TFO (TFO1, TFO4, TFON1, TFON2 i TFON4, Rys. 26, Tab. 7) efekt wyciszenia nie był istotny statystycznie (wartość $p > 0.05$).



Kontrola - komórki HeLa traktowane oligomerem Ctr (AUCUGUCCACU), który nie wiązał się do spinki RHP

TFO1 - $\underline{s^2UC^lUCs^2UC^l s^2UCs^2UUUC^l}$

TFO2 - $\underline{s^2UC^lUCs^2UCs^2UC^l s^2UUs^2UC^l}$

TFO3 - $\underline{s^2UCUC^l s^2UC^l s^2UC^l s^2UUUC^l}$

TFO4 - $\underline{s^2UC^lUC^l s^2UC^l s^2UC^l s^2Us^2Us^2UC^l}$

TFON1 - $\underline{UC^lUCs^2UCUCs^2UUUC^l}$

TFON2 - $\underline{s^2UC^lUCUCUCs^2UUs^2UC^l}$

TFON3 - $\underline{s^2UCUC^lUCUC^l s^2UUUC^l}$

TFON4 - $\underline{UC^lUC^l s^2UCUCUUUC^l}$

Rysunek 26. Wpływ ośmiu wariantów TFO na poziom ekspresji genu *GFP* w linii komórkowej HeLa.

Analiza wpływu poszczególnych wariantów TFO na regulację ekspresji genu *GFP* pokazała, że najlepiej działającym oligomerem był TFO2. Wariant ten powodował obniżenie ekspresji genu *GFP* o 75% (Tab. 7). Najslabszy efekt wyciszenia był odnotowany dla wariantu TFO4, dla którego ΔP_{eg} przyjmowała wartość 15% (Tab. 7).

W przypadku wariantów TFO1, TFO3, TFON1, TFON2, TFON3 oraz TFON4 zmiany poziomu ekspresji genu *GFP* (ΔP_{eg}) wynosiły odpowiednio: 48%, 18%, 49%, 41%, 30% oraz 42% (Tab. 7).

Tabela 7. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *GFP* powodowanych 8 wariantami TFO.

Wariant TFO	Poziom ekspresji genu <i>GFP</i> (P_{eg}) [%]	Zmiana poziomu ekspresji genu <i>GFP</i> (ΔP_{eg}) [%]
Ctr (kontrola)	100±0.33	0
TFO1	52.18±0.17	-47.82±0.16
TFO2*	25.30±0.23	-74.70±0.10
TFO3*	82.24±0.34	-17.76±0.01
TFO4	85.10±0.18	-14.90±0.15
TFON1	51.32±0.22	-48.68±0.11
TFON2	59.09±0.28	-40.91±0.15
TFON3*	70.14±0.14	-29.83±0.19
TFON4	58.19±0.29	-41.81±0.04

Oznaczenia: * - zmiany istotne statystycznie ($p < 0.05$); znak „-”, wskazuje na obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP* względem kontroli (wariant Ctr).

Na podstawie uzyskanych danych z eksperymentów na linii komórkowej HeLa nie znaleziono korelacji pomiędzy wartościami parametru ΔP_{eg} i liczbą lub/i umiejscowieniem modyfikacji LNA i 2-tioU w oligomerach TFO. W związku z tym, niemożliwe było potwierdzenie hipotezy, że warianty TFO zawierające więcej podstawień resztami typu LNA i 2-tiourydyny, tj. TFO1-TFO4 mogłyby powodować większy efekt wyciszenia ekspresji genu *GFP* niż warianty TFO posiadające mniej modyfikacji, tj. TFON1-TFON4. W tym kontekście ciekawym przypadkiem okazał się wariant TFO4, który pomimo, iż zawierał aż sześć modyfikacji LNA i pięć reszt 2-tioU odznaczał się najslabszym efektem wyciszenia (ΔP_{eg} przyjmowała wartość 14.90%, Tab. 7). W sytuacji, gdy porównywano temperatury topnienia poszczególnych wariantów trypleksów (T1-T8) utworzonych przy współdziałaniu TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4 (parametr T_{m1} , Tab. 4, *Podrozdział 1.2.1 Wpływ modyfikacji chemicznych LNA i 2-tiourydyny na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA*) ze zmianami poziomu ekspresji genu *GFP* (parametr ΔP_{eg} , Tab. 7), które one powodowały, zauważono, że tylko jeden trypleks T2 odznaczał się wysoką wartością T_{m1} równą 67.1°C oraz dużym efektem wyciszenia wynoszącym 74.70% (TFO2, Tab. 7). Pozostałe warianty trypleksów charakteryzowały się temperaturami topnienia od 53.2°C do 68°C (Tab. 4, *Podrozdział 1.2.1 Wpływ modyfikacji chemicznych LNA i 2-tiourydyny na stabilność termodynamiczną trypleksów RNA*) oraz w różnym stopniu wpływały na regulację

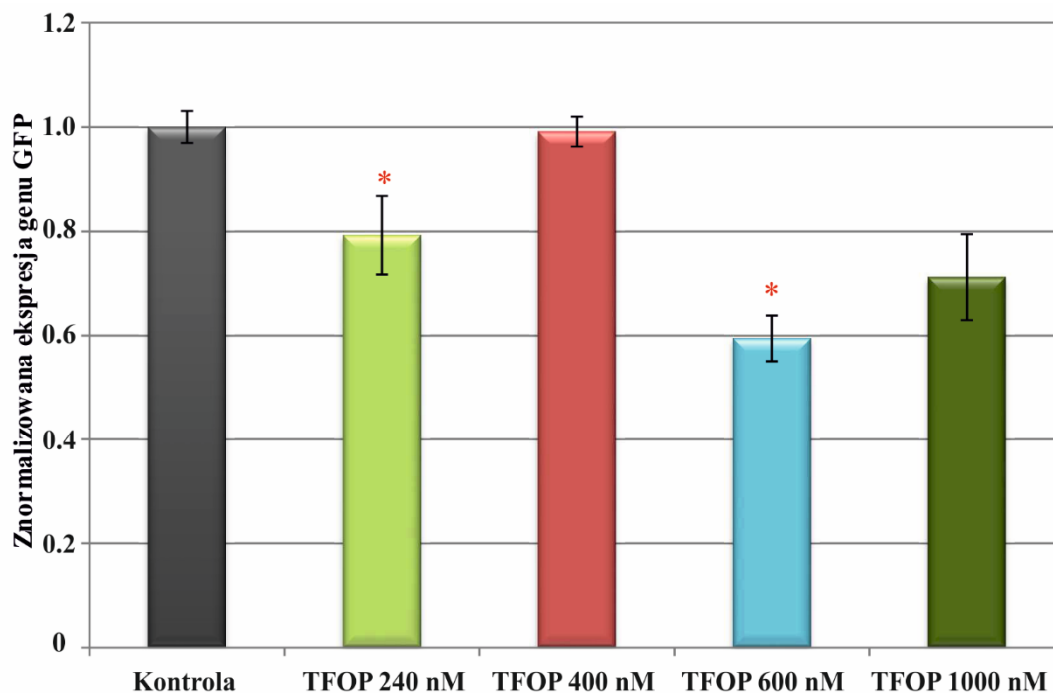
ekspresji genu *GFP* (TFO1, TFO3 i TFO4 oraz TFON1-TFON4, Rys. 26, Tab. 7). Biorąc pod uwagę te obserwacje można przypuszczać, że wprowadzenie wielokrotnych podstawień typu LNA i 2-tioU do łańcucha TFO nie miało znaczącego wpływu na efekt wywoływany przez taki oligomer w linii komórkowej HeLa. Jednakże, można przypuszczać, że duża ilość reszt typu LNA i 2-tioU może wpływać na ustrukturalizowanie TFO i w związku z tym, jego dopasowanie do trzonu spinki i tworzenie trypleksu jest utrudnione. Jednak, opierając się na wynikach badania zdolności oddziaływania wariantów TFO (TFO1-TFO4 i TFON1-TFON4) ze spinką RHP, a także zgodnie z informacjami zawartymi w literaturze zauważono, że wykorzystanie naturalnych wariantów TFO ma wiele ograniczeń [174, 238]. Natomiast, wykazano, że modyfikowane chemicznie TFO stanowią dobre narzędzie w badaniach biologicznych, ze względu na zwiększoną stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury oraz odporność na działanie nukleaz komórkowych [204, 238].

1.6.2 Ocena ilościowa wpływu trypleksu typu RNA/PNA na ekspresję genu *GFP*

Z najnowszych badań prowadzonych przez grupę Chena wiadomo, że analogi PNA są bardzo dobrym narzędziem w strategii trypleksowej [311]. W kontekście badania trypleksów RNA wykazano, że zastąpienie naturalnych kwasów nukleinowych analogami PNA zdecydowanie zwiększa trwałość termodynamiczną powstałych struktur [158, 211, 311]. Co więcej, pożądane właściwości biologiczne cząsteczek PNA, tj. odporność na działanie enzymów wewnątrzkomórkowych oraz duża stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury stanowią o ich dużym potencjale terapeutycznym [214]. Biorąc pod uwagę powyższe informacje w ramach pracy doktorskiej podjęto próbę wykorzystania analogów PNA w badaniach biologicznych na linii komórkowej HeLa. Oligomer TFO w serii PNA (TFOP) zawierający neomycynę został przygotowany przez grupę Chena z Nanyang Technological University w Singapurze.

Konstrukty dla wariantu TFO w serii PNA (TFOP) tworzącego ze spinką RHP trypleks typu RNA/PNA (T12) przygotowano analogicznie do opisanych trypleksów T1-T8 (*Podrozdział 1.6.1 Ocena ilościowa wpływu wybranych wariantów trypleksów RNA na ekspresję genu GFP*). Neomycyna obecna w oligomerze TFOP umożliwiała łatwe przenikanie takiej cząsteczki przez błonę komórkową, dlatego w tym przypadku nie było konieczne stosowanie odczynnika do lipofekcji podczas transfekcji komórek HeLa. W badaniach wpływu struktury trypleksu T12 na poziom ekspresji genu *GFP*

zostały użyte cztery stężenia wariantu TFOP (240, 400, 600 oraz 1000 nM). Kontrolę stanowiły komórki HeLa traktowane oligomerem Ctr, który nie wiązał się do spinki RHP i nie tworzył z nią struktury trypleksu. Otrzymane wyniki zaprezentowano poniżej na Rysunku 27 oraz w Tabeli 8.



Kontrola - komórki HeLa traktowane oligomerem Ctr (AUCUGUCCACU), który nie wiązał się do spinki RHP

TFOP - neomycyna-TLTLTTTL

Rysunek 27. Wpływ wariantu TFO w serii PNA (TFOP) na poziom ekspresji genu *GFP* w linii komórkowej HeLa w zależności od stężenia oligomeru.

Tabela 8. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *GFP* powodowanych wariantem TFO w serii PNA (TFOP) w zależności od stężenia oligomeru.

Wariant TFO	Stężenie wariantu TFOP [nM]	Poziom ekspresji genu <i>GFP</i> (P_{eg}) [%]	Zmiana poziomu ekspresji genu <i>GFP</i> (ΔP_{eg}) [%]
Ctr (kontrola)	240	100±0.22	0
TFOP*	240	79.19±0.28	-20.81±0.06
TFOP	400	99.04±0.31	-0.96±0.11
TFOP*	600	59.23±0.15	-40.77±0.07
TFOP	1000	71.27±0.39	-28.73±0.17

Oznaczenia: * - zmiany istotne statystycznie ($p < 0.05$); znak „-”, wskazuje na obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP*.

Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych, zaobserwowano wyciszenie ekspresji genu *GFP* dla trzech zastosowanych stężeń oligomeru TFOP (240, 600 i 1000 nM, Rys. 27), spowodowane powstaniem struktury trypleksu T12. Interesującym był fakt, że poziom ekspresji genu *GFP* nie obniżał się proporcjonalnie do wzrostu stężenia cząsteczki TFOP (Tab. 8). Jedynie w przypadku dwóch zastosowanych stężeń wariantu TFOP, tj. 240 i 600 nM można było zauważyć taką korelację (Rys. 27). Co więcej, otrzymane dane dla tych stężeń oligomeru TFOP wykazywały istotność statystyczną ($p < 0.05$, oznaczone czerwoną gwiazdką, Rys. 27), w przeciwieństwie do dwóch pozostałych stężeń, tj. 400 i 1000 nM.

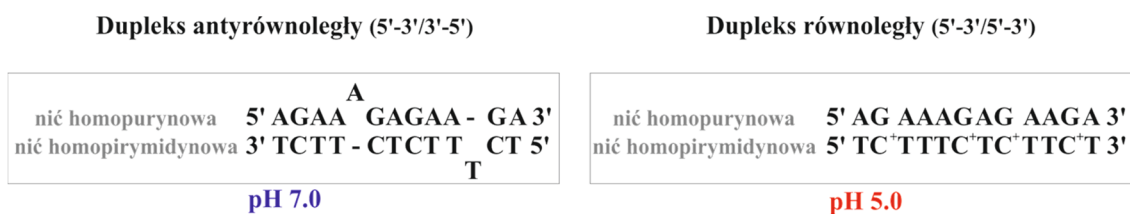
Analiza wpływu wariantu TFOP na ekspresję genu *GFP* pokazała, że najlepiej oddziałującym był oligomer TFOP w stężeniu równym 600 nM (wartość parametru ΔP_{eg} wynosiła -40.77%, Tab. 8). Nieco słabszy efekt wyciszenia ekspresji genu *GFP* przez wariant TFOP dawało zastosowanie stężenia równego 1000 nM, wówczas ΔP_{eg} przyjmowała wartość równą -28.73% (Tab. 8). Natomiast, spośród czterech analizowanych stężeń oligomeru TFOP, najmniej skuteczne okazało się wykorzystanie wariantu TFOP w stężeniu wynoszącym 400 nM (Rys. 27). W tym przypadku obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP* było najmniejsze i parametr ΔP_{eg} przyjmował wartość równą -0.96 % (Tab. 8).

Wykorzystanie wariantu TFO w serii PNA (TFOP) w eksperymentach na linii komórkowej HeLa oraz analiza wpływu takiego oligomeru na poziom ekspresji genu *GFP* pozwoliły na sformułowanie wniosku, że analogii PNA mogą stanowić dobre narzędzie w strategii wykorzystującej trypleksy. Potencjał cząsteczek TFO zawierających pochodne typu PNA został również wykazany w badaniach biologicznych innych grup naukowców [214, 306]. Muse i wsp. wykazali, że zastosowanie analogów PNA pozwala na utworzenie stabilnej struktury trypleksu pomiędzy TFO w serii PNA i spinką RNA. Zaobserwowali również, że modyfikowane TFO może być wprowadzone z dużą wydajnością do komórek HEK293 [214]. Można, zatem stwierdzić, że badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej stanowią uzupełnienie dotychczasowej wiedzy o właściwości biologicznych TFO w serii PNA. Wykonane w ramach niniejszej pracy badania sugerują, że analogi PNA stanowią alternatywę dla modyfikowanych oligonukleotydów i mogą być z powodzeniem stosowane w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowych.

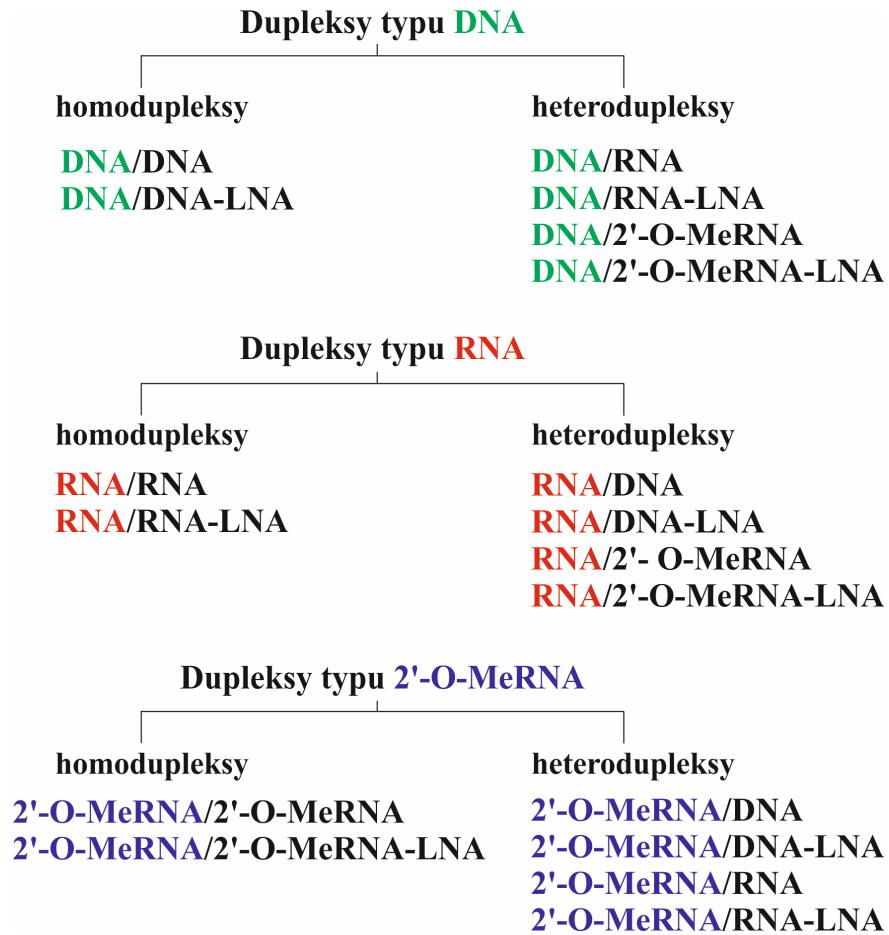
2. Równoległe dupлексы DNA i RNA

2.1 Równoległe dupлексы DNA i RNA

Opublikowana praca grupy badawczej Sugimoto, dotycząca wpływu modyfikowanych oligonukleotydów na stabilność termodynamiczną i strukturę niekanonicznych form DNA, była w pewnym stopniu inspiracją do badań wykonanych w ramach tej części pracy doktorskiej. Bhattacharyya i wsp. wykorzystali niemodyfikowane i modyfikowane resztami LNA oligomery, aby sprawdzić powstawanie i trwałość dupлексов DNA o równoległej orientacji nici [266]. W oparciu o te badania, w niniejszej pracy doktorskiej zaprojektowano i zsyntetyzowano serię niemodyfikowanych i modyfikowanych oligomerów DNA i RNA. Poszerzono, zatem badania o dupлексы RNA, 2'-O-MeRNA oraz zawierające reszty LNA. Na Rysunku 28 zaprezentowano schemat modelowego dupлексу, który zależnie od warunków pH tworzył formę o równoległej (pH 5.0) lub antyrównoległej (pH 7.0) orientacji nici. Tabela 9 przedstawia charakterystykę badanych wariantów dupлексов DNA i RNA. W celu uproszczenia nazewnictwa w niniejszej pracy doktorskiej wszystkie badane dupлексы zostały podzielone na 3 grupy ze względu na rodzaj reszt nukleotydowych składających się na nić homopurynową (Rys. 29, Tab. 9). Struktury utworzone przez oddziaływanie dwóch nici tego samego typu, tj. DNA lub RNA lub 2'-O-MeRNA określono jako homodupлексы. Przykładowy zapis takiego dupлексу to DNA/DNA lub RNA/RNA (Rys. 29). Natomiast struktury powstałe w wyniku wiązania się dwóch nici różnego typu, na przykład DNA i RNA lub RNA i 2'-O-MeRNA nazywano heterodupлексами. Przykładami takich struktur wykorzystanych w pracy doktorskiej są dupлекс DNA/RNA oraz dupлекс RNA/2'-O-MeRNA (Rys. 29).



Rysunek 28. Schemat modelowego dupлексу DNA.



Rysunek 29. Schemat obrazujący warianty badanych dupleksów.

Tabela 9. Skład nukleotydowy wariantów dupleksów DNA i RNA.

Sekwencja (5'-3')	Nazwa	Grupa
AGAAAGAGAAGA TCTTCTCTTCT	D1	dupleksy typu DNA
AGAAAGAGAAGA TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D2	
AGAAAGAGAAGA UCUUUCUCUUCU	D3	
AGAAAGAGAAGA UC ^L UUUC ^L UCUUC ^L U	D4	
AGAAAGAGAAGA U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M	D5	
AGAAAGAGAAGA U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^M U ^M U ^M C ^L U ^M	D6	
AGAAAGAGAAGA TCTTCTCTTCT	D7	dupleksy typu RNA
AGAAAGAGAAGA TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D8	
AGAAAGAGAAGA UCUUUCUCUUCU	D9	
AGAAAGAGAAGA UC ^L UUUC ^L UCUUC ^L U	D10	
AGAAAGAGAAGA U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M	D11	
AGAAAGAGAAGA U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^M U ^M U ^M C ^L U ^M	D12	
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M TCTTCTCTTCT	D13	dupleksy typu 2'-O-MeRNA
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D14	
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UCUUUCUCUUCU	D15	
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UC ^L UUUC ^L UCUUC ^L U	D16	
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M	D17	
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^M U ^M U ^M C ^L U ^M	D18	
Oznaczenia: U ^M , C ^M , A ^M i G ^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C ^L – modyfikacja LNA; kursywa – RNA.		

2.2 Badania trwałości termodynamicznej wariantów dupleksów DNA i RNA

W niniejszej pracy parametry termodynamiczne wariantów dupleksów DNA i RNA zostały wyznaczone za pomocą metody topnienia UV. Podobnie, jak w przypadku badań trwałości termodynamicznej trypleksów do pomiarów temperatur topnienia dupleksów użyto spektrofotometru UV/Vis. Parametry termodynamiczne obliczono za pomocą programu Melt Win 3.5, przy użyciu dwóch metod: i) dopasowania krzywych

topnienia dziewięciu stężeń badanego dupleksu (regresja nieliniowa) oraz ii) zależności wartości parametru T_m od stężenia badanej cząsteczki (T_m^{-1} od $\log C_T$).

Z danych literaturowych wynika, że głównym czynnikiem determinującym powstawanie równoległych dupleksów jest wartość parametru pH oraz rodzaj oligonukleotydu [266]. Zmiana wartości pH powoduje protonację cytydyny i przemianę topologiczną dupleksu, to znaczy forma równoległa tworzy się w warunkach pH 5.0, a wzrost wartości pH do 7.0 sprzyja formowaniu się struktury o antyrównoległej orientacji nici [266]. W związku z powyższym, badania termodynamiczne wariantów dupleksów DNA i RNA realizowane w ramach doktoratu, zostały wykonane z użyciem buforu Robinson-Britton (RB) o wartościach pH 5.0 i pH 7.0 [312]. Do analizy trwałości termodynamicznej wykorzystano dziewięć oligonukleotydów o długości 12 nukleotydów tworzących łącznie 18 wariantów dupleksów (Tab. 9, *Podrozdział 2.1 Równoległe dupleksy DNA i RNA*). Z wcześniejszych doniesień wiadomo, że oligonukleotydy homopurynowy (5'-AGAAAGAGAAGA) i homopirymidynowy (5'-TCTTTCTCTTCT) hybrydują ze sobą i przyjmują formę niekanonicznego dupleksu DNA [266]. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, zdecydowano się na rozszerzenie badań o analizę wpływu nie tylko oligomerów w serii RNA i 2'-O-MeRNA, ale również takich, które zawierają reszty typu LNA, na formowanie się i stabilność termodynamiczną dupleksów. W eksperymentach topnienia UV użyto niemodyfikowane oligomery DNA i RNA oraz oligomery zawierające podstawienia LNA lub/i 2'-O-MeRNA.

Wyznaczone parametry termodynamiczne dla wszystkich wariantów dupleksów zostały przedstawione w Tabeli 10. Analiza termodynamiczna pokazała, że wszystkie oligonukleotydy tworzą strukturę dupleksu, o czym świadczy fakt, że temperatury topnienia rosną liniowo wraz ze wzrostem stężenia oligonukleotydu. Taka zależność występuje w przypadku topnienia struktur dwucząsteczkowych, jakimi są dupleksy, w przeciwieństwie do topnienia form jednocząsteczkowych (spinki), dla których wartości parametru T_m dla różnych ich stężeń są takie same. Ponadto, w oparciu o analizę krzywych topnienia i uzyskane parametry termodynamiczne dla obu wartości pH wykazano, że topnienia większości badanych dupleksów przebiegały wg modelu dwustanowego. Wyjątek stanowiły heterodupleksy DNA (D3-D6) charakteryzujące się niedwustanowym profilem topnienia. Co więcej, z otrzymanych danych eksperymentalnych wynika, że wprowadzenie reszt 2'-O-MeRNA lub/i trzech reszt LNA do jednej z nici dupleksu korzystnie wpływało na stabilność termodynamiczną

wariantów dupleksów DNA i RNA, powodując zmiany wartości energii swobodnej ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) w zakresie od -1.82 do -4.10 kcal/mol w obu wartościach pH (Tab. 10). Tylko w przypadku homodupleksu D2 obecność modyfikacji LNA wywoływała nieznaczny efekt destabilizujący równy 0.56 kcal/mol w pH 7.0 (Tab. 10).

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 10. Parametry termodynamiczne wariantów dupleksów DNA i RNA^a.

Nazwa dupleksu	Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 5.0					Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 7.0					$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 5.0) - $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 7.0) (kcal/mol)
	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	
D1	48.2±1.0 (99.5±12.7)	135.3±3.2 (304.7±40.3)	6.25±0.03 (5.02±0.05)	35.2 (32.4)	0	51.4±3.9 (55.4±6.9)	150.6±13.2 (164.2±23.2)	4.67±0.17 (4.45±0.32)	26.1 (25.8)	0	-1.58±0.17
D2	43.0±0.7 (90.2±7.7)	112.5±2.3 (263.2±23.7)	8.07±0.01 (8.61±0.48)	48.5 (44.3)	-1.82	59.5±13.8 (57.1±7.9)	178.7±46.4 (170.4±26.5)	4.11±0.85 (4.22±0.42)	24.9 (24.9)	0.56	-3.96±0.85
D3	51.5±1.1 (120.4±12.5)	144.1±3.5 (368.4±38.4)	6.77±0.01 (6.10±0.73)	38.5 (35.9)	0	46.3±4.1 (77.0±5.7)	138.9±14.5 (246.3±18.8)	3.27±0.38 (0.59±0.23)	16.6 (14.8)	0	-3.50±0.38
D4	62.9±2.2 (119.9±4.7)	172.4±6.8 (350.2±14.3)	9.42±0.07 (11.30±0.58)	51.9 (49.8)	-2.65	44.6±1.9 (79.7±6.8)	126.9±6.5 (245.7±21.4)	5.26±0.11 (3.49±0.19)	28.4 (25.6)	-1.99	-4.16±0.13
D5	50.9±1.0 (103.6±10.4)	139.5±3.4 (308.7±31.1)	7.70±0.01 (7.87±0.84)	44.1 (41.1)	0	42.4±9.3 (44.8±20.2)	125.8±32.6 (133.5±71.1)	3.42±0.99 (3.43±1.88)	15.8 (16.9)	0	-4.28±0.99
D6	62.7±1.7 (93.6±8.1)	168.9±5.3 (264.0±24.6)	10.35±0.08 (11.78±0.61)	57.1 (55.4)	-2.65	43.0±2.7 (67.9±6.1)	120.0±9.2 (193.0±20.0)	5.81±0.12 (5.00±0.26)	31.9 (29.8)	-2.39	-4.54±0.14
D7	64.4±2.6 (68.6±5.5)	186.9±8.7 (200.5±17.8)	6.44±0.06 (6.39±0.08)	36.6 (36.4)	0	71.9±1.2 (71.4±1.9)	208.9±3.8 (207.3±6.1)	7.12±0.01 (7.14±0.04)	39.6 (39.7)	0	0.68±0.06
D8	75.5±3.6 (74.1±2.0)	213.7±11.6 (209.5±6.6)	9.18±0.08 (9.16±0.11)	48.3 (48.4)	-2.74	82.8±4.6 (85.1±1.5)	234.9±14.2 (242.2±5.0)	9.94±0.06 (10.02±0.16)	50.3 (50.3)	-2.82	0.76±0.10
D9	61.6±2.0 (81.9±9.5)	174.2±6.6 (240.1±30.4)	7.58±0.03 (7.47±0.17)	42.4 (40.6)	0	74.1±1.2 (73.6±2.8)	213.0±4.0 (211.4±8.8)	7.99±0.01 (8.00±0.05)	43.2 (43.3)	0	0.41±0.03
D10	76.3±4.0 (73.2±6.9)	215.0±12.7 (205.4±21.3)	9.64±0.13 (9.56±0.33)	50.2 (50.4)	-2.06	80.0±1.4 (84.1±2.9)	224.0±4.4 (236.7±9.1)	10.51±0.06 (10.67±0.11)	53.2 (53.1)	-2.52	0.87±0.14
D11	63.5±1.1 (68.0±3.8)	176.7±3.6 (192.1±12.0)	8.33±0.01 (8.40±0.10)	46.1 (45.8)	0	68.9±0.7 (70.6±5.1)	193.7±2.4 (198.8±16.0)	8.86±0.01 (8.93±0.10)	47.8 (47.9)	0	0.53±0.01
D12	81.2±10.2 (85.6±6.9)	224.9±31.4 (238.4±21.5)	11.46±0.58 (11.69±0.46)	57.0 (56.9)	-3.13	79.3±7.2 (83.0±12.7)	218.0±22.0 (229.0±38.4)	11.70±0.39 (11.96±0.84)	58.6 (58.7)	-2.84	0.24±0.70
D13	60.1±1.6 (67.5±3.4)	172.8±5.3 (197.2±11.1)	6.50±0.03 (6.37±0.09)	36.9 (36.2)	0	68.2±2.4 (68.1±2.7)	197.8±7.9 (197.6±8.8)	6.81±0.04 (6.80±0.06)	38.3 (38.2)	0	0.31±0.03
D14	86.6±8.5 (73.4±2.8)	247.2±26.7 (205.9±8.9)	9.92±0.28 (9.55±0.20)	49.6 (50.3)	-3.42	71.0±1.8 (73.5±3.8)	198.1±5.6 (206.0±11.9)	9.52±0.05 (9.59±0.13)	50.7 (50.5)	-2.71	-0.40±0.28
D15	66.2±2.3 (70.8±2.8)	188.9±7.4 (203.7±8.7)	7.60±0.02 (7.63±0.07)	42.1 (41.9)	0	69.7±2.4 (70.1±4.0)	196.0±7.8 (200.4±13.0)	7.91±0.02 (7.96±0.11)	43.4 (43.4)	0	0.31±0.02

Tabela 10 (cd). Parametry termodynamiczne wariantów dupleksów DNA i RNA^a.

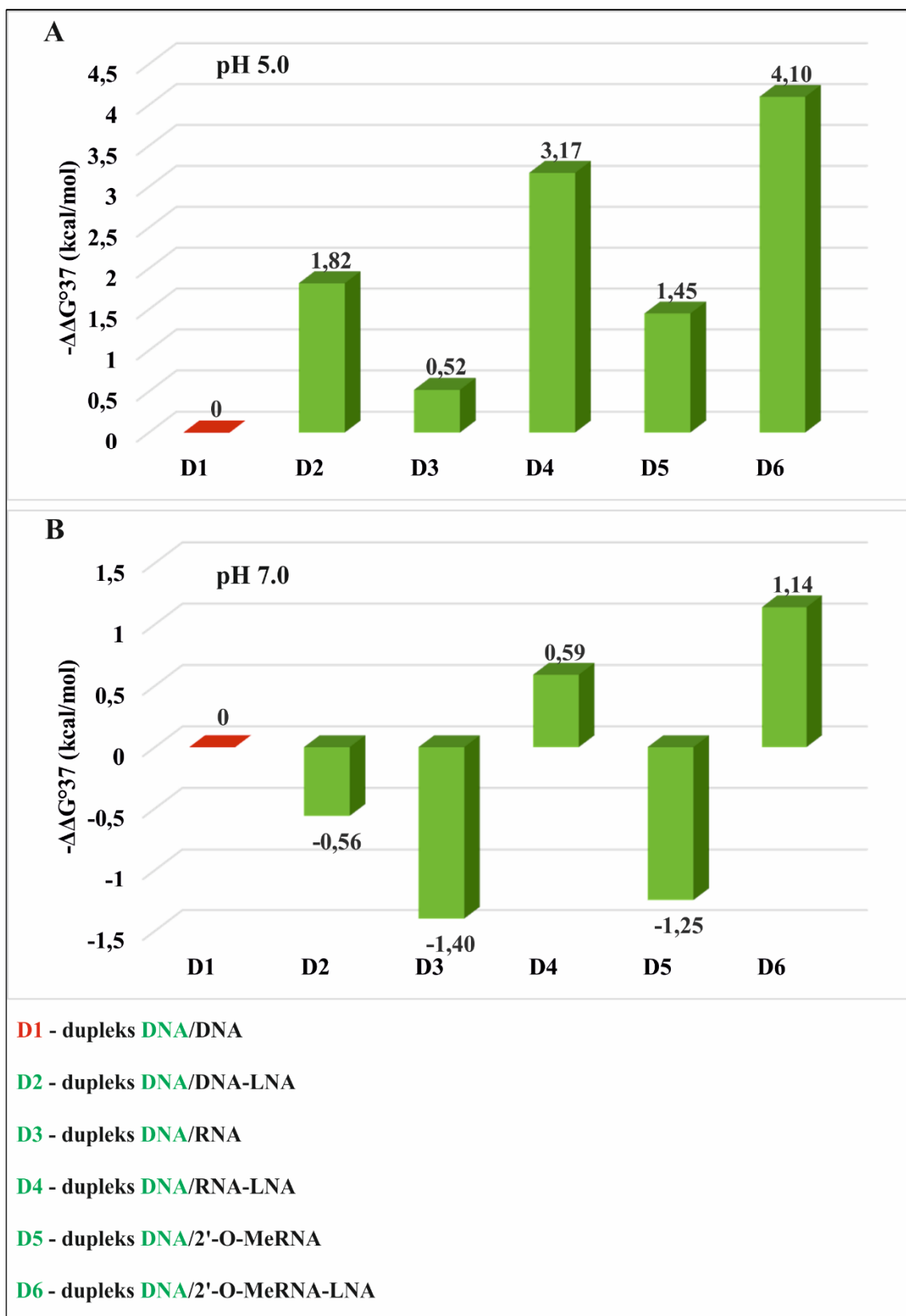
Nazwa dupleksu	Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 5.0					Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 7.0					$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 5.0) - $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 7.0) (kcal/mol)
	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	
D16	65.2±2.8 (85.1±9.8)	177.7±8.6 (239.4±29.6)	10.06±0.11 (10.90±0.63)	54.8 (53.8)	-2.46	80.1±0.3 (79.6±7.8)	223.3±1.0 (221.7±24.0)	10.82±0.01 (10.86±0.39)	54.6 (54.9)	-2.91	0.76±0.11
D17	80.0±7.0 (72.6±2.7)	234.7±22.8 (210.5±8.9)	7.24±0.18 (7.36±0.13)	39.8 (40.6)	0	63.7±2.4 (67.8±3.2)	175.9±7.5 (188.9±10.0)	9.15±0.05 (9.24±0.14)	50.3 (49.9)	0	1.91±0.19
D18	68.4±10.0 (72.6±2.0)	184.6±30.4 (197.5±5.9)	11.11±0.64 (11.37±0.18)	59.3 (59.1)	-3.87	85.7±22.0 (708.2±1.9)	234.0±67.4 (212.8±5.8)	12.54±1.22 (12.20±0.08)	60.4 (61.2)	-3.39	1.43±1.38

Oznaczenia: a – bufor: 40 mM kwas borowy, 40 mM kwas fosforowy, 40 mM kwas octowy, 100 mM NaCl, pH 5.0 i pH 7.0; b – obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M. Wartości w nawiasach to parametry wyznaczone na podstawie średniego dopasowania krzywych topnień, natomiast wartości znajdujące się powyżej wyznaczono z zależności T_m^{-1} od $\log C_T$; U^M, C^M, A^M i G^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C^L – modyfikacja LNA; kursywa – RNA

2.2.1 Trwałość termodynamiczna dupleksów typu DNA

Na podstawie badań termodynamicznych dla dupleksów typu DNA (D1-D6) stwierdzono, że struktury te odznaczają się większą stabilnością termodynamiczną w warunkach kwasowego pH w porównaniu z trwałością tych samych dupleksów w warunkach obojętnego pH (Rys. 30, Tab. 11). Uzyskane wyniki dobrze korelują z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi (Guga i wsp., Bhattacharyya i wsp.), w których potwierdzono wpływ zmian wartości pH na powstawanie i trwałość dupleksów DNA i RNA [265, 266].

Tak jak się spodziewano, analiza parametrów termodynamicznych wariantów D1-D6 wykazała znaczące różnice w ich stabilności. Czynniki, które determinowały zmiany trwałości termodynamicznej dupleksów typu DNA były warunki pH, rodzaj oligonukleotydów tworzących te struktury, a także obecność pochodnych typu LNA i 2'-O-MeRNA. Na podstawie wyników zaobserwowano zróżnicowane zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) pomiędzy homodupleksem D1, a heterodupleksami D3, D4, D5 i D6 zarówno w warunkach niskiego, jak i wysokiego pH wynoszące odpowiednio: -0.52, -3.17, -1.45 i -4.10 kcal/mol (pH 5.0, Rys. 30A) oraz 1.40, -0.59, 1.25 i -1.14 kcal/mol (pH 7.0, Rys. 30B). W sytuacji, gdy porównano zmiany energii swobodnej pomiędzy pH 5.0 i pH 7.0 zauważono wyraźną destabilizację wszystkich wariantów dupleksów spowodowaną wzrostem pH. Powyższe wyniki wskazują na to, że równoległe dupleksy powstające w niskim pH są znacznie bardziej preferowaną strukturą niż ich antyrównoległe odpowiedniki, które zawierają wewnętrzne niesparowania i tworzą się w obojętnym pH. Uzyskane dane eksperymentalne dobrze korelują z aktualnymi doniesieniami literaturowymi [175, 266]. Bhattacharyya i wsp. potwierdzili w badaniach strukturalnych, że równoległy dupleks DNA powstaje w buforze o pH 5.0, podczas gdy tworzenie dupleksu o antyrównoległej orientacji nici możliwe jest w warunkach obojętnego pH. Wykazali również, że obecność reszt typu LNA wpływa korzystnie na stabilność termodynamiczną równoległych dupleksów [266]. Natomiast, grupa Gugi potwierdziła, że wprowadzenie modyfikacji LNA do oligomeru w serii 2'-O-MeRNA znacznie zwiększa trwałość termodynamiczną powstałego dupleksu [175].



Rysunek 30. Różnica stabilności termodynamicznej pomiędzy dupleksem D1 a wariantami dupleksów D2-D6 w zależności od pH (A – pH 5.0, B – pH 7.0).

Największe zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) zaobserwowano w warunkach kwasowych dla wariantów D2, D4 oraz D6 zawierających trzy reszty LNA w nici homopirymidynowej (zmiana energii swobodnej przyjmowała wartości odpowiednio: -1.82, -3.17 oraz -4.10 kcal/mol, Rys. 30A). Modyfikacja LNA przyczyniała się do wzrostu trwałości termodynamicznej homo- i heterodupleksów DNA niezależnie od warunków pH. Wyjątek stanowił dupleks D2 powodujący obniżenie stabilności termodynamicznej w stosunku do niemodyfikowanego wariantu D1 w obojętnym pH ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartość 0.56 kcal/mol, Rys. 30B, Tab. 11). Interesującym spostrzeżeniem był fakt, że pochodne typu LNA specyficznie stabilizowały niekanoniczne formy dupleksów, a ich efekt energetyczny był korzystniejszy w porównaniu z antyrównoległymi dupleksami (Rys. 30, Tab. 11). Otrzymane wyniki znalazły potwierdzenie w pracach innych grup badawczych [266, 313]. W badaniach Vestera i Wengela wykazano, że oligonukleotydy w serii LNA mogą specyficznie wiązać się z komplementarnym DNA lub RNA i tworzyć stabilne dupleksy [313]. Analiza strukturalna potwierdziła, że efekt ten związany jest z wymuszeniem konformacji *C3'-endo*, bardziej preferowanej i charakterystycznej dla formy A-RNA.

Wiadomo, że w trakcie powstawania dupleksu dochodzi do tworzenia się wiązań wodorowych i oddziaływań warstwowych, co korzystnie wpływa na entalpię tego procesu. Jednak proces taki jest niekorzystny entropowo, w związku z tym suma entalpii procesu hybrydyzacji i entropii decyduje o utworzeniu się dupleksu [314]. Usztywnienie pierścienia cukrowego w konformacji *C3'-endo* przez mostek metylenowy prowadzi do tworzenia się korzystnych zmian w entalpii podczas tworzenia się dupleksów [263]. Na podstawie wyników otrzymanych w pracy doktorskiej zaobserwowano, że obecność modyfikacji LNA powoduje wzrost stabilności termodynamicznej dupleksów DNA. Jakkolwiek, nie jest możliwe stwierdzenie, że efekt stabilizacyjny reszt typu LNA może wynikać ze wzrostu entalpii procesu tworzenia dupleksu, który kompensuje niekorzystny efekt zmian entropii.

Tabela 11. Parametry termodynamiczne wariantów dupleksów typu DNA^a.

Nazwa dupleksu	Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 5.0					Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 7.0					$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 5.0) - $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 7.0) (kcal/mol)
	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	
D1	48.2±1.0 (99.5±12.7)	135.3±3.2 (304.7±40.3)	6.25±0.03 (5.02±0.05)	35.2 (32.4)	0	51.4±3.9 (55.4±6.9)	150.6±13.2 (164.2±23.2)	4.67±0.17 (4.45±0.32)	26.1 (25.8)	0	-1.58±0.17
D2	43.0±0.7 (90.2±7.7)	112.5±2.3 (263.2±23.7)	8.07±0.01 (8.61±0.48)	48.5 (44.3)	-1.82	59.5±13.8 (57.1±7.9)	178.7±46.4 (170.4±26.5)	4.11±0.85 (4.22±0.42)	24.9 (24.9)	0.56	-3.96±0.85
D3	51.5±1.1 (120.4±12.5)	144.1±3.5 (368.4±38.4)	6.77±0.01 (6.10±0.73)	38.5 (35.9)	-0.52	46.3±4.1 (77.0±5.7)	138.9±14.5 (246.3±18.8)	3.27±0.38 (0.59±0.23)	16.6 (14.8)	1.40	-3.50±0.38
D4	62.9±2.2 (119.9±4.7)	172.4±6.8 (350.2±14.3)	9.42±0.07 (11.30±0.58)	51.9 (49.8)	-3.17	44.6±1.9 (79.7±6.8)	126.9±6.5 (245.7±21.4)	5.26±0.11 (3.49±0.19)	28.4 (25.6)	-0.59	-4.16±0.13
D5	50.9±1.0 (103.6±10.4)	139.5±3.4 (308.7±31.1)	7.70±0.01 (7.87±0.84)	44.1 (41.1)	-1.45	42.4±9.3 (44.8±20.2)	125.8±32.6 (133.5±71.1)	3.42±0.99 (3.43±1.88)	15.8 (16.9)	1.25	-4.28±0.99
D6	62.7±1.7 (93.6±8.1)	168.9±5.3 (264.0±24.6)	10.35±0.08 (11.78±0.61)	57.1 (55.4)	-4.10	43.0±2.7 (67.9±6.1)	120.0±9.2 (193.0±20.0)	5.81±0.12 (5.00±0.26)	31.9 (29.8)	-1.14	-4.54±0.14

Oznaczenia: a – bufor: 40 mM kwas borowy, 40 mM kwas fosforowy, 40 mM kwas octowy, 100 mM NaCl, pH 5.0 i pH 7.0; b – obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M. Wartości w nawiasach to parametry wyznaczone na podstawie średniego dopasowania krzywych topnień, natomiast wartości znajdujące się powyżej wyznaczono z zależności T_m^{-1} od $\log C_T$; U^M, C^M, A^M i G^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C^L – modyfikacja LNA; kursywa – RNA.

Porównując trwałość termodynamiczną wariantów dupleksów z resztami typu 2'-O-MeRNA (D5, D6) i D3 i D4 stwierdzono, że wprowadzenie podstawników 2'-O-metylowych w nieznacznym stopniu stabilizowało powstałe struktury w warunkach kwasowych (Rys. 30A), podczas gdy w obojętnym pH zaobserwowano efekt destabilizacyjny dla wariantu D5 (Rys. 30B). Zmiana energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) dla wariantu D5 przyjmowała wartość -1.45 kcal/mol w niskim pH (Rys. 30A) oraz 1.25 kcal/mol w wysokim pH (Rys. 30B) w odniesieniu do dupleksu D1. Uzyskane dane eksperymentalne pozostają w zgodności z wcześniej opublikowanymi badaniami Kierzek i wsp. dotyczącymi wpływu modyfikacji 2'-O-MeRNA na stabilność dupleksów DNA i RNA [315, 316]. Co więcej, wariant D6 składający się z nici homopurynowej w serii DNA i nici homopirymidynowej w serii 2'-O-MeRNA z trzema modyfikacjami LNA odznaczał się najkorzystniejszą wartością parametru $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ w odniesieniu do dupleksu D1 w obu warunkach pH. Parametr $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ dla dupleksu D6 w kwasowym pH przyjmował wartość -4.10 kcal/mol (Rys. 31A), natomiast w obojętnym pH, $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1.14$ kcal/mol (Rys. 30B). Na podstawie tych wyników stwierdzono, że efekty stabilizacyjne są większe, gdy do oligomeru wprowadzono jednocześnie dwa rodzaje modyfikowanych nukleozydów (LNA i 2'-O-MeRNA).

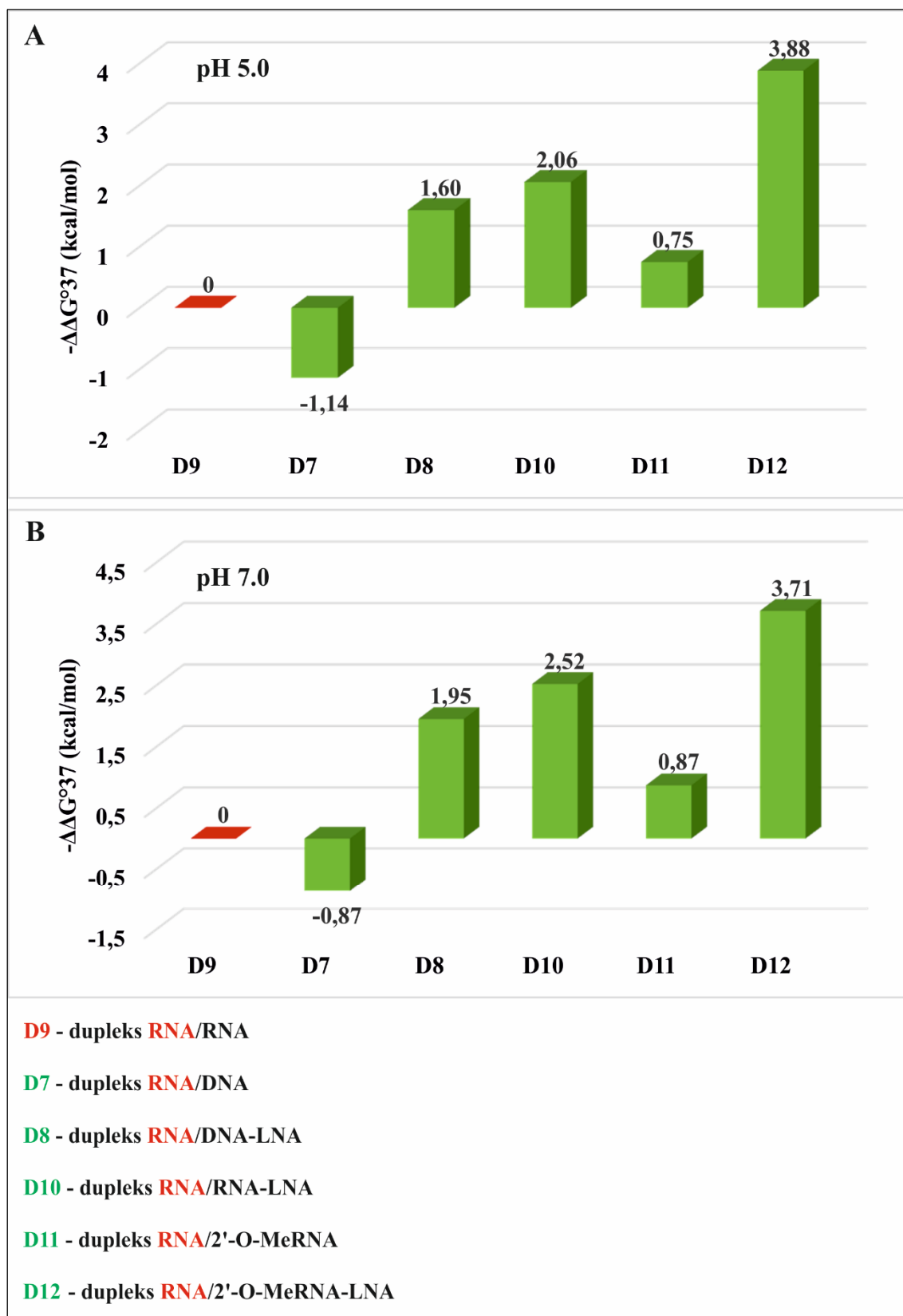
Podsumowując, określone parametry termodynamiczne dupleksów typu DNA pokazują, że czynnikami determinującymi powstawanie i trwałość dupleksów są: warunki pH, rodzaj oligonukleotydów oraz modyfikacje chemiczne wprowadzone do nici pirymidynowej dupleksu. Zaobserwowano, że dupleksy zawierające naturalne nici w serii DNA lub RNA, odznaczają się mniejszą stabilnością termodynamiczną w porównaniu z dupleksami, które posiadały nic pirymidynową w serii 2'-O-MeRNA lub z modyfikacją LNA. Ponadto, w warunkach kwasowych powstawały termodynamicznie trwalsze dupleksy niż w warunkach obojętnych.

2.2.2 Trwałość termodynamiczna dupleksów typu RNA

Badania termodynamiczne homo- i heterodupleksów RNA ujawniły, że zmiany warunków pH mają nieznaczný wpływ na ich powstawanie i stabilność termodynamiczną (Rys. 31, Tab. 12). Ponieważ zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) dupleksów typu RNA pomiędzy kwasowym i obojętnym pH są niewielkie można przypuszczać, że tworzenie się zarówno równoległego (pH 5.0), jak i antyrównoległego (pH 7.0) dupleksu jest tak samo korzystne energetycznie. Ponadto, na podstawie

otrzymanych wyników możliwe było sformułowanie stwierdzenia, że wprowadzenie modyfikacji LNA oraz reszt 2'-O-MeRNA przyczyniło się do zwiększenia trwałości termodynamicznej dupleksów typu RNA (w obu wartościach pH) w porównaniu do niemodyfikowanego wariantu D9 (Rys. 31). Dodatkowo, warto zwrócić uwagę na zwiększenie efektów stabilizacyjnych spowodowane jednoczesnym podstawieniem naturalnych reszt nukleotydowych modyfikowanymi analogami (wariant D12, Rys. 31, Tab. 12).

Największy efekt destabilizacyjny zaobserwowano w przypadku wariantu D7, dla którego parametr $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosił odpowiednio 1.14 kcal/mol w kwasowym pH (Rys. 31A) oraz 0.87 kcal/mol w obojętnym pH (Rys. 31B). Ten niekorzystny efekt był spowodowany obecnością w duplesie nici homopirymidynowej w serii DNA. Wyniki te pokazują, że oddziaływanie dwóch nici zawierających resztę cukrową o odmiennej konformacji wpływa na ogólną destabilizację duplesu D7. Co ciekawe, większe obniżenie stabilności termodynamicznej zaobserwowano dla tego wariantu w niskim pH ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1.14$ kcal/mol, Rys. 31A), co wskazuje na mniejszą siłę wiązań wodorowych, które występują w przypadku równoległego duplesu. Wykazano, że dane otrzymane w eksperymentach topnienia UV pozostają w zgodności z doniesieniami literaturowymi [314, 317]. Lesnik i Freier na podstawie przeprowadzonych badań termodynamicznych i strukturalnych potwierdzili, że ważnym czynnikiem wpływającym na stabilność duplesów DNA i RNA jest rodzaj oligonukleotydów [317]. Wykazali, że duplesy mieszane (RNA/DNA) zawierające w nici pirymidynowej 70-80% reszt deoksyrybonukleotydów charakteryzowały się większą trwałością względem duplesów zawierających nić pirymidynową w serii RNA. Zmiana rodzaju i liczby reszt nukleotydowych w obu niciach duplesu bezpośrednio wpływała na jego stabilność termodynamiczną. Ponadto, analiza strukturalna Lesnik i Ferier pokazała, że konformacja duplesów RNA/DNA lub DNA/RNA zmieniała się w zależności od składu nukleotydowego nici tworzących duples i przekłada się na trwałość termodynamiczną takich duplesów [317].



Rysunek 31. Różnica stabilności termodynamicznej pomiędzy dupleksem D9 a wariantami dupleksów D7-D8 i D10-D12 w zależności od pH (A – pH 5.0, B – pH 7.0).

Tabela 12. Parametry termodynamiczne wariantów dupleksów typu RNA^a.

Nazwa dupleksu	Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 5.0					Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 7.0					$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 5.0) - $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 7.0) (kcal/mol)
	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	
D9	61.6±2.0 (81.9±9.5)	174.2±6.6 (240.1±30.4)	7.58±0.03 (7.47±0.17)	42.4 (40.6)	0	74.1±1.2 (73.6±2.8)	213.0±4.0 (211.4±8.8)	7.99±0.01 (8.00±0.05)	43.2 (43.3)	0	0.41±0.03
D7	64.4±2.6 (68.6±5.5)	186.9±8.7 (200.5±17.8)	6.44±0.06 (6.39±0.08)	36.6 (36.4)	1.14	71.9±1.2 (71.4±1.9)	208.9±3.8 (207.3±6.1)	7.12±0.01 (7.14±0.04)	39.6 (39.7)	0.87	0.68±0.06
D8	75.5±3.6 (74.1±2.0)	213.7±11.6 (209.5±6.6)	9.18±0.08 (9.16±0.11)	48.3 (48.4)	-1.60	82.8±4.6 (85.1±1.5)	234.9±14.2 (242.2±5.0)	9.94±0.06 (10.02±0.16)	50.3 (50.3)	-1.95	0.76±0.10
D10	76.3±4.0 (73.2±6.9)	215.0±12.7 (205.4±21.3)	9.64±0.13 (9.56±0.33)	50.2 (50.4)	-2.06	80.0±1.4 (84.1±2.9)	224.0±4.4 (236.7±9.1)	10.51±0.06 (10.67±0.11)	53.2 (53.1)	-2.52	0.87±0.14
D11	63.5±1.1 (68.0±3.8)	176.7±3.6 (192.1±12.0)	8.33±0.01 (8.40±0.10)	46.1 (45.8)	-0.75	68.9±0.7 (70.6±5.1)	193.7±2.4 (198.8±16.0)	8.86±0.01 (8.93±0.10)	47.8 (47.9)	-0.87	0.53±0.01
D12	81.2±10.2 (85.6±6.9)	224.9±31.4 (238.4±21.5)	11.46±0.58 (11.69±0.46)	57.0 (56.9)	-3.88	79.3±7.2 (83.0±12.7)	218.0±22.0 (229.0±38.4)	11.70±0.39 (11.96±0.84)	58.6 (58.7)	-3.71	0.24±0.70

Oznaczenia: a – bufor: 40 mM kwas borowy, 40 mM kwas fosforowy, 40 mM kwas octowy, 100 mM NaCl, pH 5.0 i pH 7.0; b – obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M. Wartości w nawiasach to parametry wyznaczone na podstawie średniego dopasowania krzywych topnień, natomiast wartości znajdujące się powyżej wyznaczono z zależności T_m^{-1} od $\log C_T$; U^M, C^M, A^M i G^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C^L – modyfikacja LNA; kursywa – RNA.

W pracy doktorskiej zaobserwowano duży wzrost stabilności termodynamicznej dla następujących wariantów dupleksów: D8, D10 oraz D12, dla których zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) przyjmowały wartości odpowiednio: -1.60, -2.06 oraz -3.88 kcal/mol w niskim pH (Rys. 31A, Tab. 12) i -1.95, -2.52 oraz -3.71 kcal/mol w obojętnym pH (Rys. 31B, Tab. 12). Termodynamiczne zmiany dotyczące powyższych wariantów dupleksów pokazują, że ich stabilność zwiększa się na skutek wprowadzenie modyfikacji LNA i 2'-O-MeRNA, co zostało już wcześniej opisane. Z termodynamicznego punktu widzenia ciekawym przypadkiem jest wariant D12 wyróżniający się najwyższymi wartościami parametru $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ zarówno w kwasowym pH (-3.88 kcal/mol, Rys. 31A), jak również w obojętnym pH (-3.71 kcal/mol, Rys. 31B). Wzrost efektów stabilizacyjnych spowodowanych obecnością reszt typu LNA i 2'-O-MeRNA w dupleksie D12 dobrze koreluje z opublikowanymi wynikami badań [315, 316]. Kierzek i wsp. wykazali, że siła wiązań wodorowych pomiędzy resztami nukleotydowymi w serii LNA jest taka sama, jak występujących pomiędzy pochodnymi 2'-O-metylowanymi [316]. Natomiast, oddziaływania warstwowe w przypadku analogów typu LNA są bardziej korzystne energetycznie w porównaniu z ich odpowiednikami w serii RNA i 2'-O-MeRNA. W związku z tym, jednoczesne wprowadzenie obu analogów do nici dupleksu przekładało się na jego trwałość termodynamiczną.

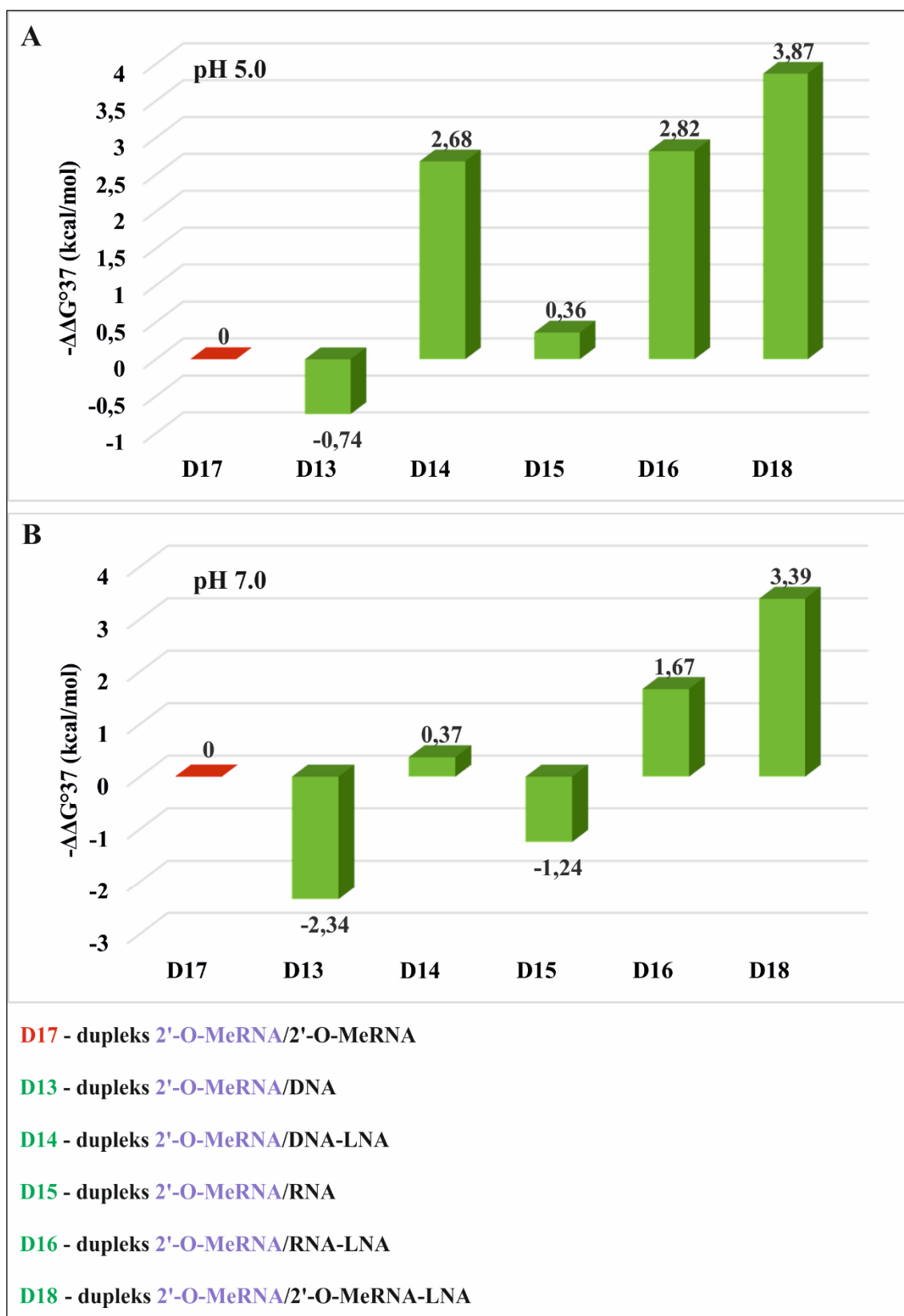
Heterodupleks RNA/2'-O-MeRNA (D11) wydaje się być interesującym przypadkiem w kontekście zmian trwałości termodynamicznej wynikających z wprowadzenia modyfikowanych reszt nukleotydowych. Gdy porównano zmiany energii swobodnej wariantu D11 zawierającego nic homopirymidynową w pełni modyfikowaną resztami 2'-O-MeRNA i niemodyfikowanego wariantu D9 zauważono niewielkie różnice w stabilności termodynamicznej w obu warunkach pH (Rys. 31, Tab. 12). Efekt stabilizacyjny dupleksu D11 był nieznaczny względem dupleksu D9, a parametr $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmował wartości -0.75 kcal/mol (pH 5.0, Rys. 31A) oraz -0.87 kcal/mol (pH 7.0, Rys. 31B). W przypadku wariantu D12, gdy wprowadzono dodatkowo trzy reszty LNA do 2'-O-metylowanego oligomeru sytuacja zdecydowanie zmieniała się, a odnotowany wzrost stabilności był około 4.5-5 razy większy w porównaniu z heterodupleksem RNA/2'-O-MeRNA (D11). Co więcej, na podstawie parametrów termodynamicznych i analizy zmian stabilności dupleksów typu RNA zaobserwowano, że zastosowanie analogów LNA jest bardziej korzystne niż wprowadzenie reszt 2'-O-MeRNA. Wariant D10 zawierający trzy podstawienia typu LNA charakteryzował się większą trwałością

termodynamiczną względem dupleksu D9 ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartości odpowiednio: -2.06 kcal/mol dla pH 5.0 oraz -2.52 kcal/mol dla pH 7.0, Tab. 12). Natomiast heterodupleks D11, który posiadał tylko reszty U^M , C^M , A^M i G^M odznaczał się nieznacznie większą wartością energii swobodnej w stosunku do dupleksu D9 ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartości odpowiednio: -0.75 kcal/mol dla pH 5.0 oraz -0.87 kcal/mol dla pH 7.0, Tab. 12). Przedstawione wyniki pokazują, że obecność dodatkowego mostka metylenowego pomiędzy atomami O2' i C4' pierścienia rybozy korzystniej wpływa na trwałość termodynamiczną dupleksów w porównaniu z modyfikacją 2'-O-MeRNA. Efekt stabilizacyjny spowodowany wprowadzeniem reszt 2'-O-MeRNA do oligonukleotydu był mniejszy niż ten, wywołany podstawieniem LNA.

Podsumowując, podobnie jak w przypadku dupleksów typu DNA, także powstawanie i stabilność termodynamiczna homo- i heterodupleksów RNA zależą od rodzaju oligonukleotydu oraz obecności modyfikowanych reszt nukleotydowych. Zaobserwowano, że wartość pH ma zdecydowanie mniejszy wpływ na tworzenie się i trwałość dupleksów typu RNA. W obu warunkach pH badane dupleksy typu RNA charakteryzowały się podobną trwałością termodynamiczną. Wprowadzenie modyfikacji LNA i 2'-O-MeRNA do nici pirymidynowej powodowało zmiany wartości parametrów termodynamicznych, a obecność nici pirymidynowej w serii DNA miała efekt destabilizacyjny na dupleksy typu RNA.

2.2.3 Trwałość termodynamiczna dupleksów typu 2'-O-MeRNA

Analizując parametry termodynamiczne dla dupleksów typu 2'-O-MeRNA uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy zaobserwowano, że warianty D13-D18 charakteryzują się dużymi zmianami stabilności termodynamicznej w zależności od warunków pH (Rys. 32, Tab. 13). Ponadto, wprowadzenie modyfikacji LNA i 2'-O-MeRNA powodowało wzrost efektu stabilizacyjnego dla badanych wariantów. Rodzaj nici homopirymidynowej (DNA, RNA lub 2'-O-MeRNA) również miał istotny wpływ na formowanie się powyższych dupleksów oraz ich stabilność termodynamiczną.



Rysunek 32. Różnica stabilności termodynamicznej pomiędzy dupleksem D17 a wariantami dupleksów D13-D16 i D18 w zależności od pH (A – pH 5.0, B – pH 7.0).

Tabela 13. Parametry termodynamiczne wariantów dupleksów typu 2'-O-MeRNA^a.

Nazwa dupleksu	Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 5.0					Wykres zależności T_m^{-1} od $\log C_T$ (średnie dopasowanie krzywych topnień) pH 7.0					$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 5.0) - $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (pH 7.0) (kcal/mol)
	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	$-\Delta S^{\circ}$ (eu)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_m^b (°C)	$\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	
D17	80.0±7.0 (72.6±2.7)	234.7±22.8 (210.5±8.9)	7.24±0.18 (7.36±0.13)	39.8 (40.6)	0	63.7±2.4 (67.8±3.2)	175.9±7.5 (188.9±10.0)	9.15±0.05 (9.24±0.14)	50.3 (49.9)	0	1.91±0.19
D13	60.1±1.6 (67.5±3.4)	172.8±5.3 (197.2±11.1)	6.50±0.03 (6.37±0.09)	36.9 (36.2)	0.74	68.2±2.4 (68.1±2.7)	197.8±7.9 (197.6±8.8)	6.81±0.04 (6.80±0.06)	38.3 (38.2)	2.34	0.31±0.03
D14	86.6±8.5 (73.4±2.8)	247.2±26.7 (205.9±8.9)	9.92±0.28 (9.55±0.20)	49.6 (50.3)	-2.68	71.0±1.8 (73.5±3.8)	198.1±5.6 (206.0±11.9)	9.52±0.05 (9.59±0.13)	50.7 (50.5)	-0.37	-0.40±0.28
D15	66.2±2.3 (70.8±2.8)	188.9±7.4 (203.7±8.7)	7.60±0.02 (7.63±0.07)	42.1 (41.9)	-0.36	69.7±2.4 (70.1±4.0)	196.0±7.8 (200.4±13.0)	7.91±0.02 (7.96±0.11)	43.4 (43.4)	1.24	0.31±0.02
D16	65.2±2.8 (85.1±9.8)	177.7±8.6 (239.4±29.6)	10.06±0.11 (10.90±0.63)	54.8 (53.8)	-2.82	80.1±0.3 (79.6±7.8)	223.3±1.0 (221.7±24.0)	10.82±0.01 (10.86±0.39)	54.6 (54.9)	-1.67	0.76±0.11
D18	68.4±10.0 (72.6±2.0)	184.6±30.4 (197.5±5.9)	11.11±0.64 (11.37±0.18)	59.3 (59.1)	-3.87	85.7±22.0 (708.2±1.9)	234.0±67.4 (212.8±5.8)	12.54±1.22 (12.20±0.08)	60.4 (61.2)	-3.39	1.43±1.38

Oznaczenia: a – bufor: 40 mM kwas borowy, 40 mM kwas fosforowy, 40 mM kwas octowy, 100 mM NaCl, pH 5.0 i pH 7.0; b – obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M. Wartości w nawiasach to parametry wyznaczone na podstawie średniego dopasowania krzywych topnień, natomiast wartości znajdujące się powyżej wyznaczono z zależności T_m^{-1} od $\log C_T$; U^M, C^M, A^M i G^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C^L – modyfikacja LNA; kursywa – RNA.

Na podstawie zmian energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) stwierdzono, że nić homopirymidynowa w serii DNA powodowała małą destabilizację dupleksu (D13) w kwasowym pH ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartość 0.74 kcal/mol, Rys. 32A, Tab. 13), natomiast w warunkach obojętnego pH efekt destabilizacyjny był około 3 razy większy ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartość 2.34 kcal/mol, Rys. 32B). W podobny sposób zachowywał się wariant D15 odznaczający się obniżeniem stabilności termodynamicznej względem dupleksu D17 w obojętnym pH ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartość 1.24 kcal/mol, Rys. 32B, Tab. 13).

Co ciekawe, w warunkach niskiego pH zmiana energii swobodnej w przypadku wariantu D15 była korzystna i wynosiła -0.36 kcal/mol (Rys. 32A). Uzyskane dane mogą świadczyć o tym, że struktura równoległego dupleksu preferowana w środowisku kwasowym jest bardziej stabilna niż struktura antyrównoległego dupleksu z dwoma wewnętrznymi niesparowaniami, która powstaje w warunkach obojętnego pH. Jednakże należy zaznaczyć, że to stwierdzenie odnosi się tylko do heterodupleksu 2'-O-MeRNA/RNA-LNA. Natomiast, w przypadku heterodupleksu 2'-O-MeRNA/DNA nie znajduje ono potwierdzenia w otrzymanych danych termodynamicznych. W związku z powyższym stwierdzono, że obecność nici homopirymidynowej typu DNA wywierała bardziej niekorzystny wpływ na proces hybrydyzacji w porównaniu z tą nicią w serii RNA. Efekt ten mógł wynikać z faktu, że reszty pirymidynowe w serii DNA utrudniały odpowiednie ułożenie nici względem siebie i przyjęcie preferowanej konformacji *C3'-endo* typowej dla RNA i 2'-O-MeRNA. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w opublikowanej pracy Lesnik i Freier, z której wynika, że stabilność termodynamiczna homodupleksów DNA lub RNA oraz heterodupleksów DNA/RNA jest ściśle powiązana z rodzajem i liczbą reszt nukleotydowych, a także ze zmianami konformacyjnymi zachodzącymi w dupleksie [317].

Porównywalne zmiany efektów termodynamicznych wywołanych wprowadzeniem reszt typu LNA zaobserwowano dla dwóch wariantów dupleksów, tj. D14 i D16 w warunkach niskiego pH, wartości parametru $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosiły odpowiednio: -2.68 i -2.82 kcal/mol (Rys. 32A, Tab. 13). Odmienna sytuacja miała miejsce w przypadku tych dupleksów w warunkach obojętnego pH, ponieważ zmiany energii swobodnej różniły się i przyjmowały wartości równe -0.37 kcal/mol (D14) i -1.67 kcal/mol (D16) (Rys. 32B, Tab. 13). Na tej podstawie ponownie potwierdzono, że trwałość badanych cząsteczek wynikająca ze zmian w topologii cząsteczki zależy w dużej mierze od warunków pH.

Usztywnienie pierścienia rybozy w konformacji *C3'-endo* powodowało korzystne efekt energetyczny zarówno w środowisku kwasowym, jak i obojętnym, co znajduje odzwierciedlenie w różnicy zmian energii swobodnej dupleksów D14, D16 i D18 (Rys. 32). Wprowadzenie modyfikacji LNA przyczyniało się do wzrostu stabilności termodynamicznej wymienionych dupleksów typu 2'-O-MeRNA. Zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) wynosiły odpowiednio: -2.68, -2.82 i -3.87 kcal/mol (pH 5.0, Rys. 32A) oraz -0.37, -1.67 i -3.39 kcal/mol (pH 7.0, Rys. 32B). Największy wzrost trwałości termodynamicznej zanotowano dla homodupleksu 2'-O-MeRNA/2'-O-MeRNA zawierającego trzy reszty LNA, dla którego parametr $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ w kwasowym i obojętnym pH przyjmował odpowiednio wartości -3.87 kcal/mol (D18, Rys. 32A) i -3.39 kcal/mol (D18, Rys. 32B). Najmniejszy efekt stabilizacyjny dla dupleksów z trzema podstawieniami typu LNA zauważono w przypadku wariantu D14 w obojętnym pH ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ przyjmowała wartość -0.37 kcal/mol, Rys. 32B). Ponadto, na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano, że wprowadzenie pochodnych typu LNA do nici homopirymidynowej w serii 2'-O-MeRNA skutkowało największym wzrostem stabilności dupleksu (D18, Rys. 32). Powyższe wyniki pozostają więc w zgodzie z danymi uzyskanymi dla dupleksów typu DNA i RNA oraz potwierdzają wzrost efektów termodynamicznych modyfikacji LNA i 2'-O-MeRNA badanych wariantów D13-D18.

Podsumowując, możliwe było sformułowanie wniosku, że na tworzenie i trwałość termodynamiczną dupleksów typu 2'-O-MeRNA wpływają zarówno warunki pH, rodzaj oligonukleotydu, jak i obecność analogów LNA. Otrzymane wyniki pokazują, że stabilność termodynamiczna dupleksów typu 2'-O-MeRNA jest większa w warunkach kwasowego pH, a wprowadzenie pochodnych typu LNA do nici homopirymidynowej dupleksu zwiększa efekt stabilizacyjny.

2.2.4 Trwałość termodynamiczna heterochiralnych dupleksów RNA

Naturalnie występujące DNA i RNA są szybko degradowane przez nukleazy komórkowe. Zatem ważne jest, aby zwiększyć ich stabilność biologiczną oraz poprawić ich powinowactwo do wiązania komplementarnych sekwencji. Ostatnio opublikowano kilka prac, które koncentrowały się na kwasach nukleinowych zawierających nienaturalną L-(deoksy)rybozę [289, 318, 319]. L-DNA i L-RNA są cząsteczkami, w których D-(deoksy)ryboza, występująca naturalnie w przyrodzie w organizmach żywych, jest zastąpiona L-enancjomerem i może tworzyć, po hybrydyzacji, lewoskrętną

podwójną helisę. L-oligonukleotydy nie są rozpoznawane przez enzymy składające się z L-aminokwasów [286]. Wykazują one, więc wyjątkową odporność na degradację biologiczną, dzięki czemu można je wykorzystać, jako użyteczne narzędzia biologii molekularnej, a także w celach terapeutycznych [320, 321].

Ważną przesłanką literaturową, która skłoniła do wykorzystania oligomerów w serii β -L-RNA do badań termodynamicznych realizowanych w trakcie doktoratu, była praca Ashleya [275]. Autor zasugerował, że kwasy nukleinowe posiadające resztę L-rybozy mogą oddziaływać z naturalnymi DNA lub RNA i przyjmować podobną formę typu A o równoległej orientacji nici. Ciekawą obserwacją było to, że L-RNA lub L-DNA wiązały się mocniej do naturalnego RNA niż DNA. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, podjęto próbę analizy termodynamicznej dupleksów RNA składających się z dwóch nici będących swoimi lustrzanymi odbiciami (enancjomery).

W rozprawie doktorskiej badane warianty dupleksów w serii β -L-RNA złożone z dwóch oligorybonukleotydów zawierających enancjomery reszty rybozy nazywano heterochiralnymi (np. L-RNA/D-RNA). Natomiast dupleksy RNA, które posiadały dwie nici o tej samej chiralności określano homochiralnymi dupleksami (D-RNA/D-RNA).

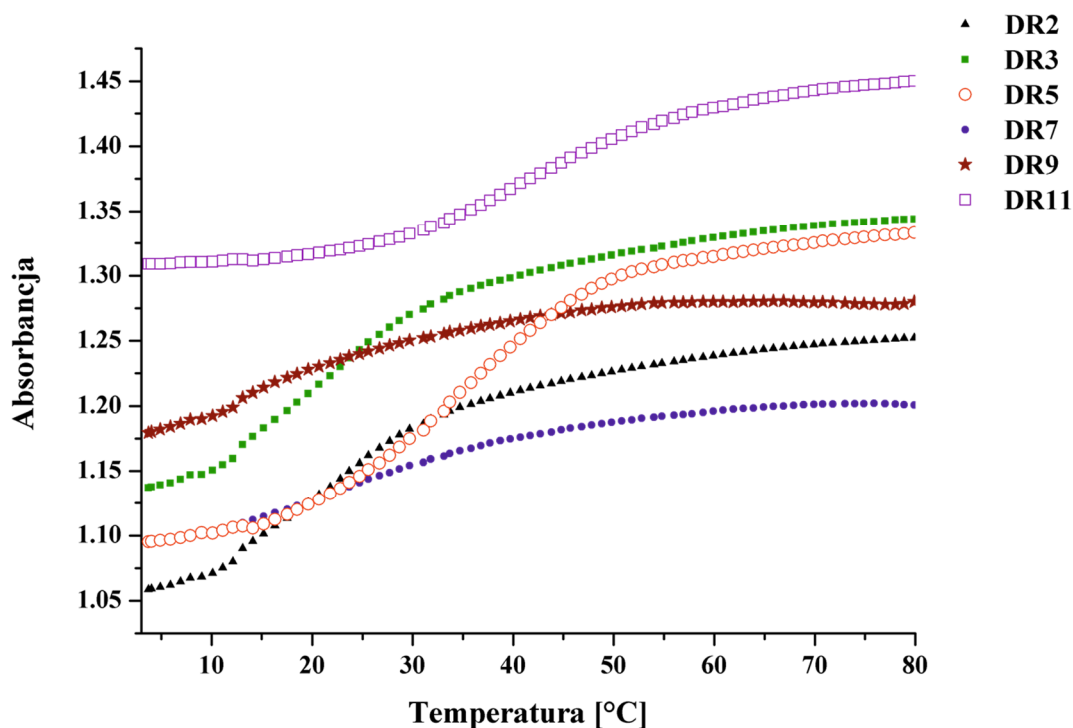
W celu ilościowego określenia efektu spowodowanego zmianą chiralności oligonukleotydu na stabilność termodynamiczną heterochiralnych dupleksów RNA posłużono się metodą topnienia UV. W eksperymentach wykorzystano osiem oligorybonukleotydów o długości 12 nukleotydów, w tym cztery zawierające tylko D-RNA oraz L-RNA oraz cztery z modyfikowanymi nukleozydami 2'-O-MeRNA lub LNA lub 2'-O-MeRNA i LNA. Wszystkie oligomery tworzyły jedenaście wariantów homo- i heterochiralnych dupleksów RNA. Tabela 14 przedstawia stabilność termiczną badanych dupleksów RNA (DR1-DR11).

Tabela 14. Stabilność termiczna heterochiralnych dupleksów RNA^a.

Nazwa	Sekwencja (5'-3')		T _m ^b (°C)	ΔT _m ^b (°C)
DR1	AGAAAGAGAAGA	UCUUUCUCUUCU	50.0	0
DR2	<i>AGAAAGAGAAGA</i>	UCUUUCUCUUCU	15.9	-34.1
DR3	AGAAAGAGAAGA	<i>UCUUUCUCUUCU</i>	17.9	-32.1
DR4	AGAAAGAGAAGA	UC ^L UUUC ^L UCUUC ^L U	63.6	0
DR5	<i>AGAAAGAGAAGA</i>	UC ^L UUUC ^L UCUUC ^L U	41.5	-22.1
DR6	AGAAAGAGAAGA	U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M	57.6	0
DR7	<i>AGAAAGAGAAGA</i>	U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M	26.1	-31.5
DR8	A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M	UCUUUCUCUUCU	52.0	0
DR9	<i>A^MG^MA^MA^MA^MG^MA^MG^MA^MA^MG^MA^M</i>	<i>UCUUUCUCUUCU</i>	13.5	-38.5
DR10	AGAAAGAGAAGA	U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^M U ^M U ^M C ^L U ^M	68.7	0
DR11	<i>AGAAAGAGAAGA</i>	U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^M U ^M U ^M C ^L U ^M	47.7	-21

Oznaczenia: a - bufor: 100 mM NaCl, 20 mM kaskodylan sodu, 0.5 mM EDTA(Na)₂, pH 7.0; b –obliczone dla stężenia oligomeru 10⁻⁴ M; A^M, C^M, G^M, U^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; C^L – modyfikacja LNA, kursywa – beta-L-oligomery.

Na podstawie uzyskanych danych termodynamicznych dupleksów stwierdzono, że odznaczały się one małą kooperatywnością, innymi słowy oddziaływanie oligonukleotydów zawierających enancjomery reszty rybozy było bardzo słabe, co w konsekwencji utrudniało tworzenie się struktury dwuniciowej. Krzywe topnienia UV pokazują również, że warianty heterochiralnych dupleksów charakteryzowały się niskim poziomem hiperchromizmu w porównaniu z naturalnymi odpowiednikami (D-RNA) (Rys. 33). W rezultacie uzyskanie wiarygodnych parametrów termodynamicznych było utrudnione, dlatego postanowiono skupić się tylko na zmianach temperatur topnienia ustalonych dla jedenastu dupleksów RNA (Tab. 14).



Rysunek 33. Krzywe topnienia dla heterochiralnych dupleksów RNA, 2'-O-MeRNA i 2'-O-MeRNA-LNA.

Wyniki uzyskane z analizy termodynamicznej heterochiralnych dupleksów wykonanej w ramach doktoratu pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi, w których wykazano znaczne obniżenie stabilności heterochiralnych struktur względem ich naturalnych odpowiedników [275, 322, 323]. Z badań termodynamicznych Uraty i wsp. wynika, że obecność reszt L-nukleotydów powoduje znaczną destabilizację dupleksów DNA/DNA, DNA/RNA i RNA/RNA, co potwierdzały uzyskane wartości temperatury topnienia tych dupleksów [323]. Wprowadzenie L-enancjomeru do oligonukleotydu RNA skutkowało większym obniżeniem temperatury topnienia niż w przypadku oligonukleotydu DNA zawierającego L-nukleotydy. Ponadto, analiza strukturalna grupy Uraty pokazała, że heterochiralne dupleksy DNA/RNA różnią się od homochiralnych dupleksów DNA/RNA, które zwykle przyjmują formę podobną do A-RNA.

Biorąc pod rozwagę uzyskane dane zaobserwowano, że zmiana chiralności jednej z nici dupleksu powoduje znaczny spadek jego trwałości termicznej (Tab. 14). Heterochiralne dupleksy DR2 i DR3 odznaczały się mniejszą stabilnością, a spadek ich temperatur topnienia wynosił odpowiednio 34°C i 32°C w odniesieniu do

homochiralnego dupleksu DR1 (Tab. 14). Co ciekawe, obecność trzech reszt LNA wewnątrz nici D-RNA zmniejszała w pewnym stopniu negatywny wpływ enancjomerycznego, komplementarnego oligonukleotydu L-RNA. Tak zmodyfikowany dupleks RNA (DR5) był destabilizowany „tylko” o 22°C w odniesieniu do dupleksu D-RNA zawierającego trzy podstawienia LNA (DR4, Tab. 14). Powyższe wyniki dobrze korelują z danymi termodynamicznymi określonymi dla homo- i heterodupleksów DNA i RNA w kontekście zmian stabilności wywołanych przez analogii LNA, a także pozostają w zgodności z danymi literaturowymi [324].

Ponadto, zbadano wpływ zmiany chiralności jednej nici w dupleksach typu 2'-O-MeRNA/RNA (DR7, DR9 i DR11, Tab. 14). Podobnie jak w przypadku dupleksów RNA, siła hybrydyzacji dwóch nici enancjomerycznych została wyraźnie zmniejszona w odniesieniu do homochiralnych odpowiedników (DR6, DR8 i DR10, Tab. 14). Temperatury topnienia wyznaczone dla wariantów DR7 (26.1°C) i DR9 (13.5°C) były zdecydowanie niższe w porównaniu z wartościami T_m dla wariantów DR6 i DR8, które wynosiły odpowiednio 57.6°C i 52.0°C (Tab. 14). Ponadto, tak jak się spodziewano, trzy reszty LNA wprowadzone do nici 2'-O-MeRNA zmniejszyły efekt destabilizacyjny powodowany przez obecność β -L-RNA w dupleksie heterochiralnym do 21°C (DR10 względem DR11, Tab. 14).

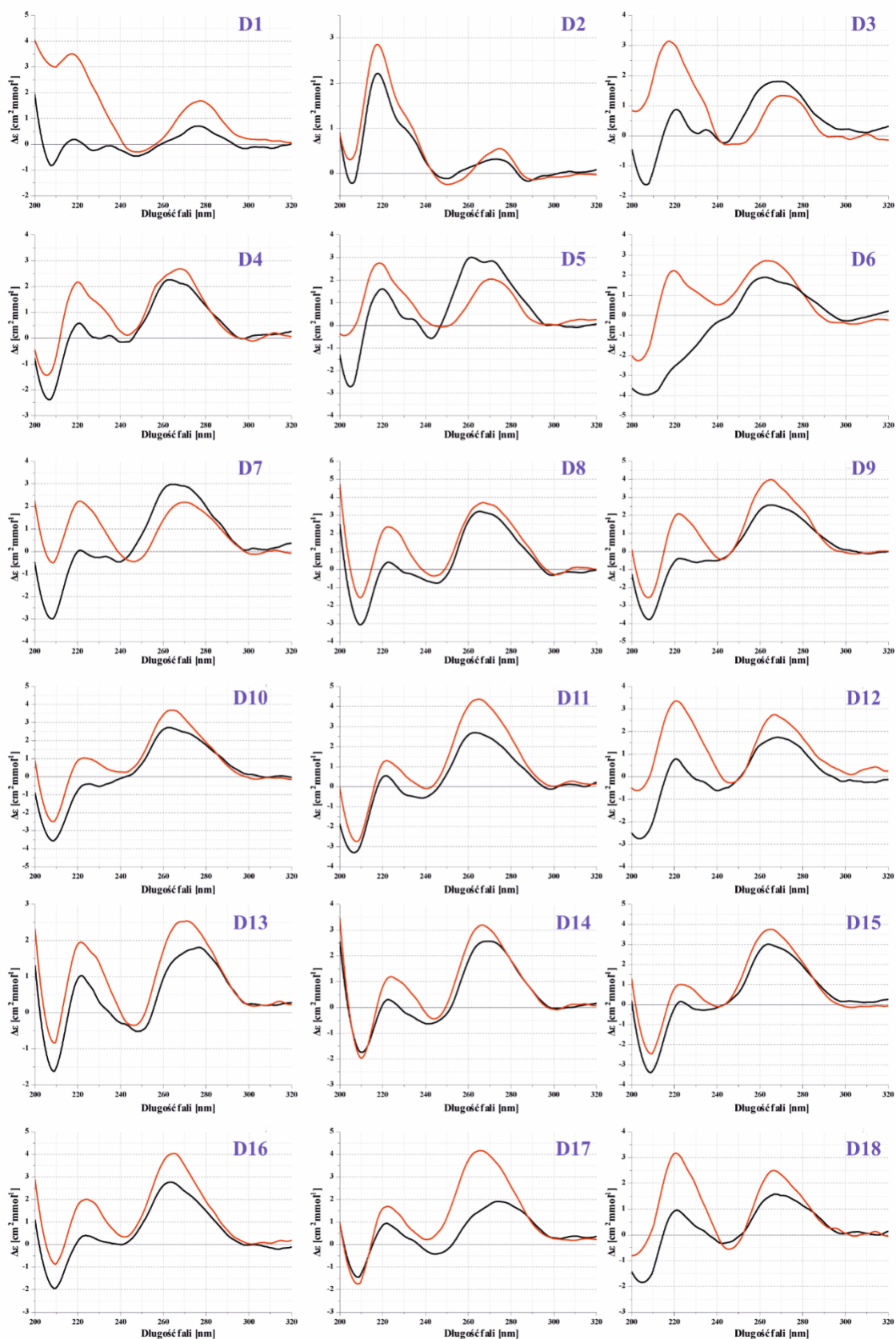
Na podstawie przeprowadzonej analizy termodynamicznej wykazano, że oddziaływanie pomiędzy enancjomerycznymi oligonukleotydami homopurynowym i homopirymidynowym jest możliwe, jakkolwiek stabilność termiczna powstałych struktur dwuniciowych jest bardzo mała. Wprowadzenie reszt LNA i 2'-O-MeRNA do jednej z nici dupleksu powodowało zwiększenie trwałości termicznej heterochiralnych dupleksów RNA. Można stwierdzić, że zastosowanie modyfikowanych oligomerów może poprawiać stabilność dupleksów utworzonych przez oddziaływania dwóch nici o odmiennej chiralności. Dane uzyskane w wyniku badań termodynamicznych stanowią zatem uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat dupleksów w serii β -L-RNA.

2.3 Badanie zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego

Z doniesień literaturowych wynika, że występowanie dodatniego szerokiego pasma w zakresie długości fali około 260-280 nm sugeruje utworzenie prawoskrętnej helisy przez dwa oddziałujące ze sobą oligonukleotydy [266]. Ponadto, w przypadku dupleksów DNA przejście z dodatniego do ujemnego pasma w zakresie długości fali 210-220 nm jest konsekwencją zmiany orientacji nici z równoległej na antyrównoległą [266]. Biorąc po uwagę powyższe obserwacje oraz fakt, że spektroskopia CD jest łatwą i szybką techniką określono topologię strukturalną wariantów dupleksów DNA i RNA. Pomiar widm CD (podobnie jak eksperymenty topnienia UV) zostały wykonane w buforach RB o wartościach pH równych 5.0 i 7.0. Do analizy uzyskanych danych wykorzystano program Origin Pro 8.0.

Zaobserwowano, że w przebiegu widm CD występuje dodatnie szerokie pasmo w zakresie długości fali 260-280 nm (Rys. 34). Obecność tego pasma zarejestrowano dla wszystkich badanych wariantów D1-D18, a jego amplituda nieznacznie zmieniała się w zależności od typu dupleksu. Dodatkowo, intensywność tego pasma była nieco większa dla badanych struktur w warunkach kwasowego pH w porównaniu z warunkami obojętnego pH. Wyjątek stanowiły trzy warianty, tj. D3, D5 i D7, dla których ta sytuacja była odwrotna (Rys. 34).

Tak jak się spodziewano, widmo CD wariantu D1, tj. dupleksu utworzonego z nici homopurynowej i homopirymidynowej w serii DNA charakteryzowało się zmianą pasma przy ok. 210 nm z dodatniego na ujemne wraz z obniżeniem wartości pH buforu z 7.0 na 5.0 (D1, Rys. 34). Sugeruje to, że powstały dupleks D1 miał równoległą orientację nici. Otrzymane wyniki pozostają w zgodności z doniesieniami literaturowymi Bhattacharyya i wsp., w których określono zmianę topologii dupleksów DNA [266]. W przypadku pozostałych dupleksów (D2-D18), takie odwrócenie pasma (ok. 210 nm) nie występowało. Co ciekawe, widma CD dla wariantów D2-D18 posiadały w swoim przebiegu dwa pasma w obszarze 200-220 nm, jedno dodatnie pasmo przy ok. 220 nm oraz jedno ujemne przy ok. 208 nm, z wyjątkiem dupleksu D3 (Rys. 34). Zaobserwowane zmiany intensywności tych pasm w różnym stopniu zależały od warunków pH, jednakże dla większości badanych dupleksów były one niewielkie.



Rysunek 34. Widma dichroizmu kołowego wariantów dupleksów DNA i RNA w pH 5.0 (czerwona linia) i pH 7.0 (czarna linia).

Ponadto, spośród osiemnastu zarejestrowanych widm CD homo- i heterodupleksów DNA i RNA, większość wariantów (D4, D6 oraz D7-D18) wykazywała ujemne pasmo w zakresie długości fali 210-220 nm w obu zastosowanych pH buforu. Z jednej strony otrzymane wyniki znacznie utrudniły ustalenie zmian konformacyjnych powyższych struktur, ponieważ nie obserwowano przejścia dla tego pasma z wartości dodatnich do wartości ujemnych przy zmianie warunków pH (tak, jak miało to miejsce w przypadku D1) (Rys. 34). W związku z tym, stwierdzono, że w badaniach strukturalnych (spektroskopia CD) heterodupleksów DNA/RNA i homodupleksów RNA niemożliwe było jednoznaczne potwierdzenie powstawania antyrównoległych lub równoległych dupleksów na podstawie zmian amplitudy pasma w zakresie długości fali 210-220 nm. Z drugiej strony, w oparciu o wyniki grupy badawczej Sugimoto możliwe było przypuszczenie, że obecność ujemnego pasma przy ok. 208 nm (D4, D6 oraz D7-D18, Rys. 34) sugeruje równoległą orientację nici wymienionych struktur utworzonych zarówno w warunkach kwasowych, jak i obojętnych [266, 325].

Na podstawie uzyskanych widm CD zauważono również, że wprowadzenie modyfikacji LNA do nici homopirymidynowej dupleksu w pewnym stopniu wpływało na strukturę dupleksów (D2, D4, D6, D8, D10, D12, D14, D16 i D18, Rys. 34). Usztywnienie fragmentu cukrowego prawdopodobnie ułatwiało zmianę orientacji nici w dupleksie, dzięki czemu możliwa była hybrydyzacja dwóch nici ułożonych w sposób równoległy (5'-3'/5'-3') względem siebie w obu warunkach pH. Zmiany konformacyjne badanych wariantów dupleksów w pewien sposób odzwierciedlają zmiany stabilności termodynamicznej tych struktur.

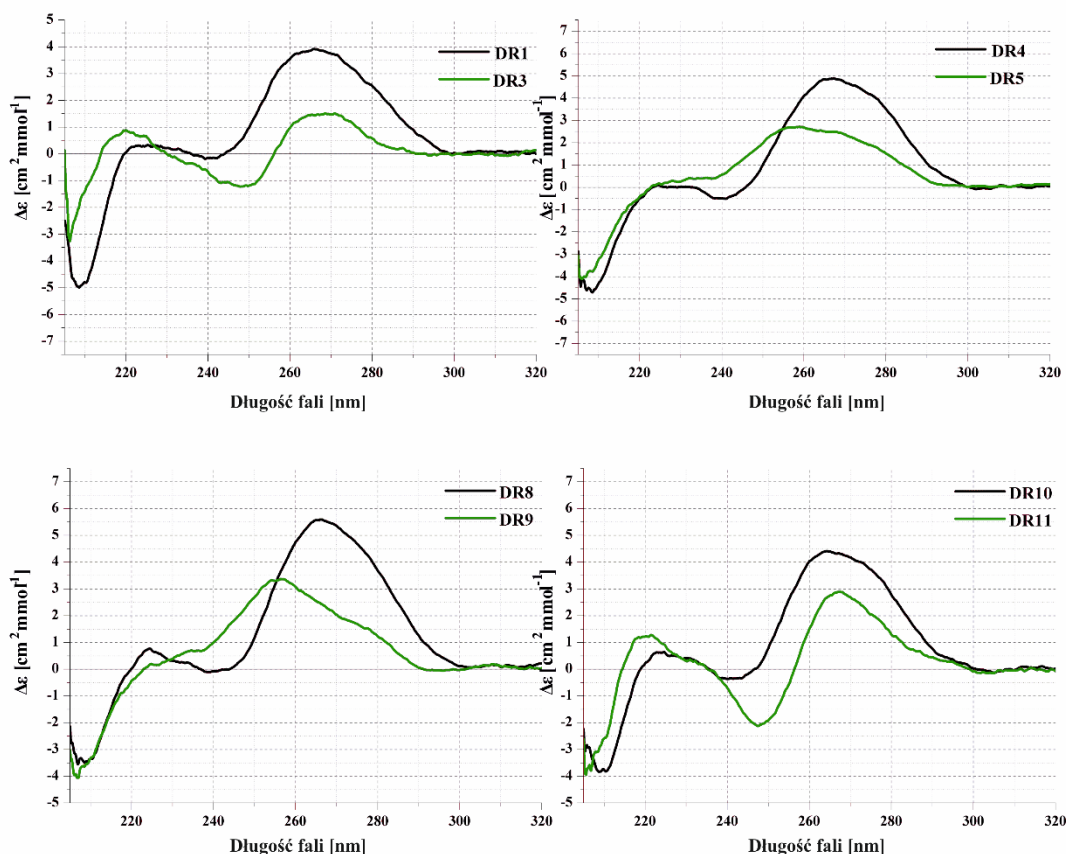
Wykazano, że większość widm CD dupleksów RNA wskazuje na tworzenie helisy typu A. Profil CD struktury A-RNA charakteryzuje się występowaniem szerokiego dodatniego pasma w zakresie długości fali od 240 do 280 nm, podczas gdy w przebiegu widm CD formy B-DNA występuje pasmo ujemne przy długości fali ok. 245 nm oraz dodatnie przy długości fali ok. 275 nm [326]. Natomiast, heterodupleksy DNA/RNA (D3-D8, D13 i D14) tworzą helisy, które odbiegają od kanonicznych struktur A-RNA i B-DNA. Prawdopodobnie jest to spowodowane powstaniem struktur pośrednich A i B helisy. W przebiegu widm CD dla powyższych wariantów występuje zmniejszenie intensywności pasma przy ok. 260 nm w buforze o pH równym 5.0 (z wyjątkiem D3) w porównaniu z obojętnym pH (Rys. 34). Podsumowując, na podstawie analizy strukturalnej CD można stwierdzić, że nici homopurynowa i homopirymidynowa w serii DNA, RNA i 2'-O-MeRNA mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć strukturę

dupleksu. Wykazano, że rodzaj oligonukleotydu, podobnie jak wartość pH, są ważnymi czynnikami determinującymi powstawanie dupleksu. Jakkolwiek, uzyskane widma CD dupleksów typu DNA, RNA i 2'-O-MeRNA pokazują, że możliwe jest przyjmowanie różnych konformacji przez te dupleksy, a mianowicie formy typu A-RNA, B-DNA lub formy pośredniej pomiędzy helisą A i B. Jakkolwiek trudno jest znaleźć podobne metodyczne analizy widm CD dla homo- i heterodupleksów DNA i RNA.

2.4 Badanie zmian strukturalnych heterochiralnych dupleksów RNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego

Metoda spektroskopii CD posłużyła również do sprawdzenia wpływu enancjomerycznej nici homopirymidynowej lub homopurynowej na strukturę heterochiralnych dupleksów RNA. W analizie strukturalnej wykorzystano osiem oligorybonukleotydów tworzących jedenaście wariantów dupleksów RNA (DR1-DR11), w tym cztery niemodyfikowane (dwa w serii D-RNA i dwa w serii L-RNA) oraz cztery w serii D-RNA, w tym z modyfikacjami 2'-O-MeRNA lub LNA, a także zawierające równoczesne podstawienia resztami 2'-O-MeRNA i LNA. Widma CD wybranych heterochiralnych dupleksów RNA zaprezentowano na Rysunku 35.

Ogólny profil krzywych CD wariantów heterochiralnych, tj. DR3, DR5, DR9 i DR11 był taki sam, jak w przypadku struktur homochiralnych, tj. DR1, DR4, DR8 i DR10 (Rys. 35). W przebiegu widm CD występowały dwa dodatnie pasma, jedno szerokie w zakresie długości fali 260-280 nm, drugie o małej amplitudzie przy długości ok. 225 nm oraz jedno ujemne pasmo przy długości fali ok. 210 nm (Rys. 35). Na podstawie danych literaturowych Urata i wsp. wiadomo, że widma CD dupleksów DNA i RNA zawierających reszty L-nukleotydów są podobne do ich naturalnych odpowiedników. Ponadto, w przypadku dupleksów heterochiralnych typu DNA/RNA na ogół preferowana jest forma B-DNA [323]. Co ciekawe, w badaniach grupy badawczej Browna potwierdzono, że naturalne hybrydy DNA/RNA przyjmują formę A-RNA [327]. Widma CD otrzymane w niniejszej pracy pokazują, że dupleksy powstałe w wyniku oddziaływania dwóch nici będących lustrzanymi odbiciami przyjmują strukturę podobną do formy A-RNA. Biorąc pod uwagę powyższe, można stwierdzić, że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej znajdują swoje odzwierciedlenie w dotychczasowej literaturze [327].



Rysunek 35. Widma dichroizmu kołowego heterochiralnych dupleksów RNA (linia czarna – dupleksy typu D-RNA/D-RNA, linia zielona – dupleksy typu D-RNA/L-RNA).

Na podstawie pomiarów CD zauważono również, że intensywność sygnałów CD była zawsze mniejsza dla heterochiralnych dupleksów RNA (DR3, DR5, DR9 i DR11) w odniesieniu do homchiralnych struktur DR1, DR4, DR8 i DR10 (Rys. 35). Powyższe wyniki dobrze korelują z danymi otrzymanymi w niniejszej pracy doktorskiej w badaniach termodynamicznych i pokazują zależność pomiędzy strukturą heterochiralnych dupleksów RNA, a ich stabilnością termodynamiczną.

Co więcej, zaobserwowano, że maksima i minima zarejestrowanych krzywych CD dupleksów typu D-RNA/L-RNA były zwykle przesunięte w kierunku dłuższych długości fali w odniesieniu do dupleksów typu D-RNA/D-RNA. Widmo CD dupletu DR3 charakteryzowało się dwoma umiarkowanymi dodatnimi pasmami przy ok. 220 nm i 275 nm oraz jednym ujemnym przy ok. 245 nm (Rys. 35). Natomiast profil krzywej CD naturalnego dupletu DR1 odznaczał się jednym dodatnim pasmem o dużej amplitudzie przy długości fali ok. 265 nm oraz dwoma ujemnymi pasmami przy ok. 210 nm i 240 nm odpowiednio o dużej i małej intensywności (Rys. 35). Taki przebieg widma CD sugerował, że wariant DR1 przyjmował formę A-RNA. Na

podstawie uzyskanych danych sformułowano wniosek, że w przypadku heterochiralnych struktur mogą występować inne lub/i dodatkowe oddziaływania, które różnią się od kanonicznych wiązań wodorowych występujących w modelu Watsona-Cricka. W konsekwencji mogą przyczyniać się one do zmian konformacyjnych badanych dupleksów, które zaobserwowano podczas analizy strukturalnej.

Nieoczekiwanie, wprowadzenie dwóch rodzajów modyfikacji (LNA lub/i 2'-O-MeRNA) do nici homopurynowej lub homopirymidynowej nie przyczyniło się do zmian konformacyjnych heterochiralnych dupleksów RNA. W profilu krzywych CD wariantów DR9 i DR11 nie zauważono znaczących zmian w porównaniu z niemodyfikowanymi wariantami DR8 i DR10 (Rys. 35). W obu przypadkach widma CD miały podobny przebieg, niewielkie zmiany dotyczyły intensywności oraz przesunięcia sygnałów przy długości fali ok. 245 nm i 260 nm. Powyższe nieznaczne różnice w profilu widm CD można tłumaczyć odmiennymi oddziaływaniami występującymi w heterochiralnych dupleksach RNA w porównaniu z homochiralnymi dupleksami. Ponadto, zmiany strukturalne heterochiralnych dupleksów przekładają się również na ich trwałość termodynamiczną.

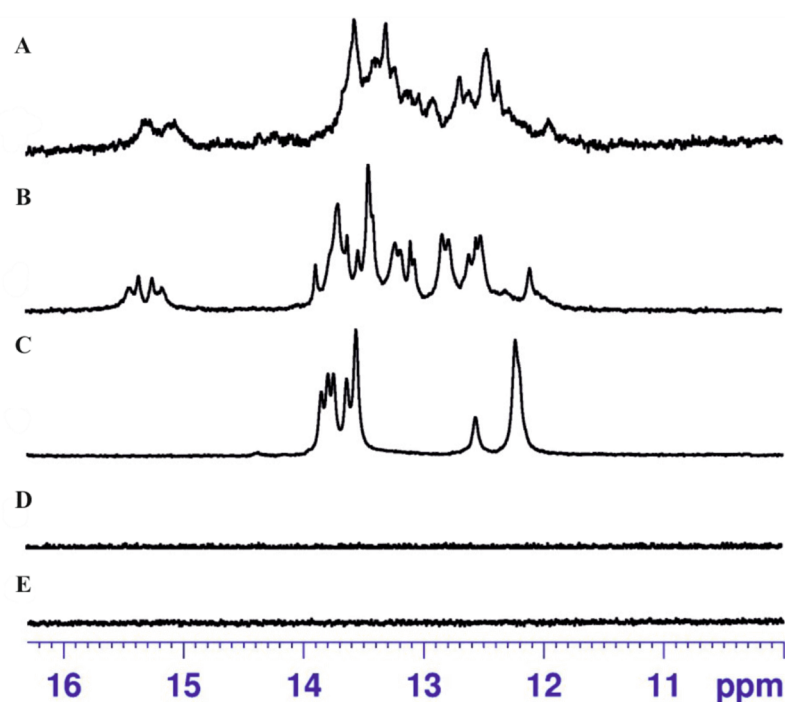
2.5 Badanie charakteru wiązań wodorowych heterochiralnych dupleksów RNA metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego

Wiązanie wodorowe jest jednym z najważniejszych oddziaływań, które determinuje powstawanie trwałych struktur RNA. Występują różne rodzaje wiązań wodorowych, różniące się siłą wiązania oraz charakterem kwasowo-zasadowym donora i akceptora. Ponieważ heterochiralne dupleksy RNA są niekanonicznymi strukturami postanowiono w ramach pracy doktorskiej określić charakter wiązań wodorowych takich struktur przy użyciu spektroskopii NMR.

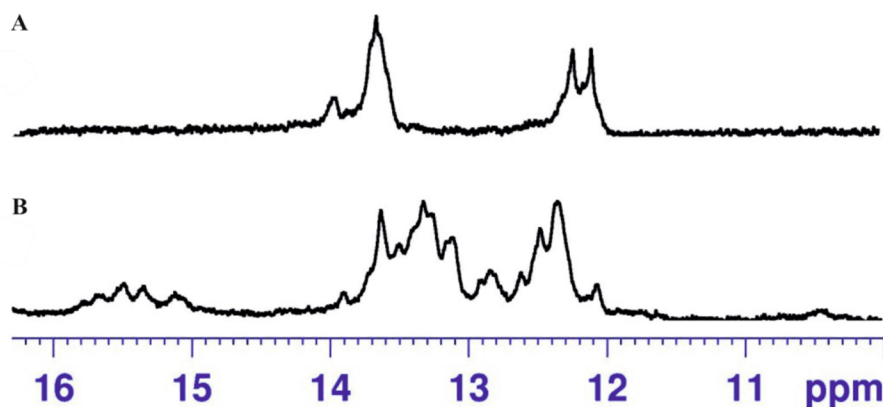
Spektroskopia NMR jest jedną z najbardziej uniwersalnych technik analitycznych wykorzystywanych w chemii, fizyce, biologii strukturalnej czy medycynie [328]. Dzięki temu, że umożliwia ona rejestrowanie lokalnych i globalnych zmian konformacyjnych i dynamicznych DNA i RNA, określenie geometrii par zasad, wykrywanie miejsc wiązania się ligandów, a także analizę przesunięć chemicznych poszczególnych protonów, znajduje szerokie zastosowanie w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Co więcej, spektroskopia NMR jest jedyną metodą spektralną pozwalającą określić przestrzenną strukturę z dokładnością na poziomie atomowym, dynamikę biomolekuł oraz ich kompleksy z białkami w roztworze.

Do oceny charakteru wiązań wodorowych wybranych heterochiralnych dupleksów RNA wykorzystano jedną z technik spektroskopii NMR polegającą na rejestrowaniu i analizie jednowymiarowych homojądrowych widm protonowych, tj. ^1H NMR. Analiza strukturalna widm ^1H NMR badanych dupleksów została wykonana w Pracowni Biomolekularnego NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Dla badania oddziaływania dwóch enancjomerycznych oligonukleotydów w strukturach heterochiralnych RNA wybrano widma protonowe ^1H NMR dla następujących wariantów dupleksów: DR1-DR5. Rysunki 36 i 37 przedstawiają regiony iminowe wykonanych widm ^1H NMR dla powyższych dupleksów RNA.



Rysunek 36. Region iminowy widm ^1H NMR heterochiralnych dupleksów DR2 (A) i DR3 (B), homochiralnego duplesu DR1 (C), nici homopirymidynowej w serii β -L-RNA (D) oraz nici homopurynowej w serii β -D-RNA (E). Widma ^1H NMR rejestrowano w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 v/v) w temperaturze 10°C przy szerokości spektralnej 16 ppm. Bufor do widm ^1H NMR zawierał 1 M NaCl, 5 mM bufor fosforanowy, pH 6.8 i 0.1 mM EDTA(Na)₂.



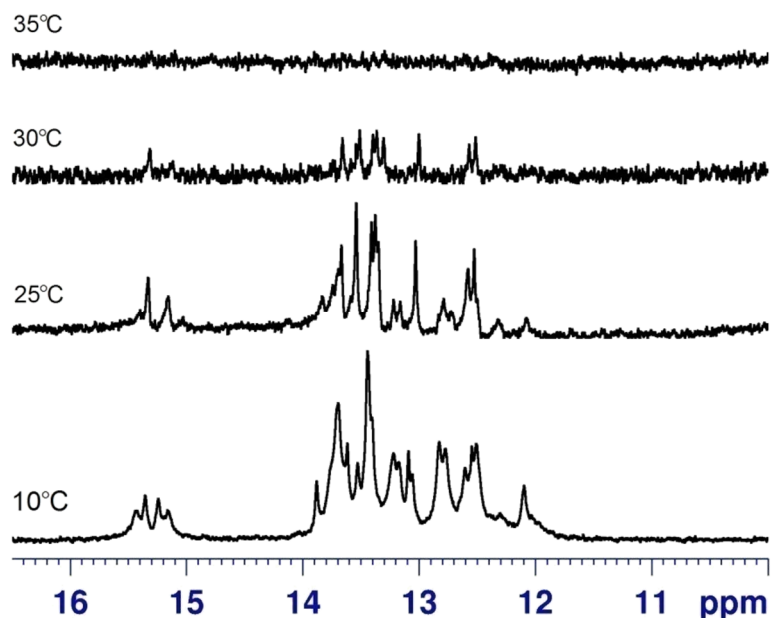
Rysunek 37. Region iminowy widm ^1H NMR homochiralnego dupleksu DR4 (A) i heterochiralnego dupleksu DR5 (B). Widma ^1H NMR rejestrowano w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 v/v) w temperaturze 10°C przy szerokości spektralnej 16 ppm. Bufor do widm ^1H NMR zawierał 1 M NaCl, 5 mM bufor fosforanowy, pH 6.8 i 0.1 mM EDTA(Na) $_2$.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że brak sygnałów iminowych w przebiegu zarejestrowanych widm ^1H NMR dla pojedynczych nici homopurynowej w serii β -D-RNA (Rys. 38E) i homopirymidynowej w serii β -L-RNA (Rys. 36D) świadczył o tym, że pojedyncze nici nie tworzą niespecyficznych struktur drugorzędowych w zastosowanych warunkach. W przypadku homochiralnych dupleksów DR1 (Rys. 36C) i DR4 (Rys. 37A) zaobserwowano pojawienie się sygnałów iminowych w zakresie 12-14 ppm charakterystycznych dla kanonicznych par zasad typu Watsona-Cricka. W związku z powyższym uzyskane regiony iminowe widm ^1H NMR wariantów DR1 i DR4 sugerują utworzenie się antyrównoległego dupleksu. Otrzymane wyniki pozostają w zgodności z doniesieniami literaturowymi [329]. Urata i wsp. przeprowadzili badania strukturalne NMR dupleksów DNA zawierających resztę L-guanozyny i na podstawie uzyskanych widm NMR stwierdzili powstawanie stabilnego dupleksu z parowanie zasad według modelu Watsona-Cricka.

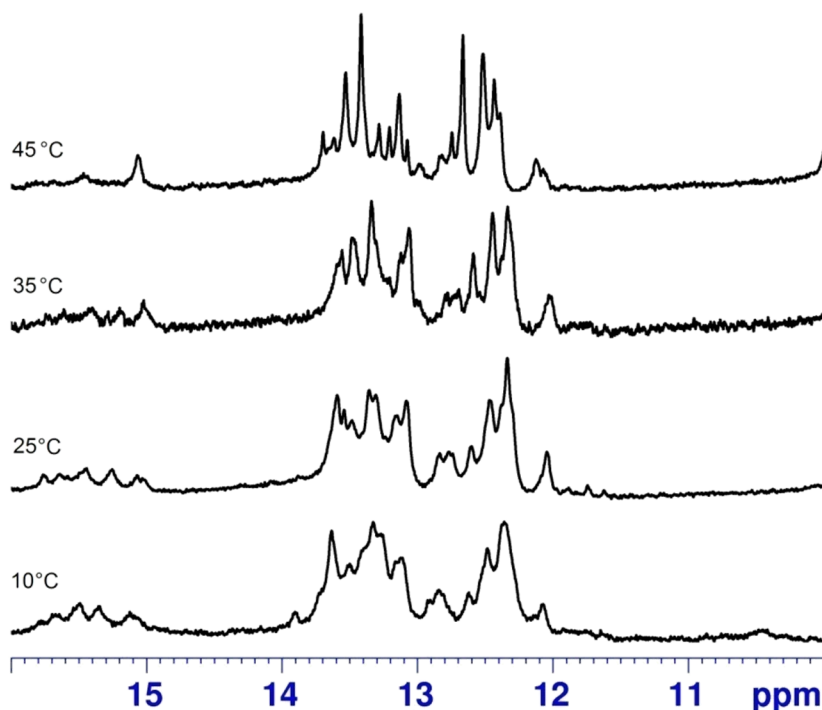
Ponadto, analiza strukturalna NMR pokazała, że w wyniku połączenia dwóch odmiennych enancjomerycznych nici również było możliwe powstanie struktury dupleksu. Widma iminowe ^1H NMR heterochiralnych dupleksów DR2 (Rys. 36A), DR3 (Rys. 36B) i DR5 (Rys. 37B) pokazują, że nici homopurynowa w serii β -D-RNA lub β -L-RNA oraz nici homopirymidynowa w serii β -L-RNA lub β -D-RNA z trzema podstawieniami typu LNA mogą specyficznie oddziaływać ze sobą i tworzyć strukturę dupleksu. Potwierdzeniem powyższego stwierdzenia jest obecność sygnałów iminowych w zakresie 12-14 ppm (Rys. 36A, B i Rys. 37B). Ponadto, pojawienie się sygnałów iminowych w widmach ^1H NMR o odmiennym natężeniu może

wskazywać na występowanie równowagi między różnymi formami strukturalnymi dupleksu. Interesującym spostrzeżeniem był fakt, że w przypadku heterochiralnych dupleksów RNA (DR2, DR3 i DR5) w przebiegu widm ^1H NMR zarejestrowano dodatkowe sygnały iminowe powyżej 15 ppm. Jak wiadomo z pracy grupy Nikolovej, obecność takich sygnałów jest charakterystyczna dla protonowanych reszt cytozyny [330]. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki oraz powyższe doniesienie literaturowe sformułowano wniosek, że w warunkach eksperymentów NMR (wartość pH buforu równa 6.8) było możliwe powstanie heterochiralnego dupleksu o równoległej orientacji nici. Jednakże, powiązanie uzyskanych danych z analizy strukturalnej NMR heterochiralnych wariantów (DR2, DR3 i DR5) z ich stabilnością termiczną pozwala przypuszczać, że w roztworze oprócz formy równoległej dupleksu znajdowała się inna forma konformacyjna badanych cząsteczek.

Dodatkowo, w ramach badań strukturalnych heterochiralnych dupleksów RNA wykonano widma ^1H NMR w zależności od temperatury dla dwóch wybranych wariantów DR2 i DR5. Na Rysunkach 38 i 39 zostały przedstawione widma ^1H NMR dupleksów DR2 i DR5 w zależności od temperatury.



Rysunek 38. Zależność regionu iminowego widma ^1H NMR heterochiralnego dupleksu DR2 od temperatury. Widma ^1H NMR rejestrowano w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 v/v) w zakresie temperatury od 10°C do 35°C przy szerokości spektralnej 16 ppm. Bufor do widm ^1H NMR zawierał 1 M NaCl, 5 mM bufor fosforanowy, pH 6.8 i 0.1 mM EDTA(Na)₂.



Rysunek 39. Zależność regionu iminowego widma ^1H NMR heterochiralnego dupleksu DR5 od temperatury. Widma ^1H NMR rejestrowano w mieszaninie $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 v/v) w zakresie temperatury od 10°C do 45°C przy szerokości spektralnej 16 ppm. Bufor do widm ^1H NMR zawierał 1 M NaCl, 5 mM bufor fosforanowy, pH 6.8 i 0.1 mM EDTA(Na)₂.

W oparciu o uzyskane dane zauważono odmienne zależności w obu przypadkach. Dla niemodyfikowanego wariantu DR2 zaobserwowano, że wraz ze wzrostem temperatury zanikają sygnały iminowe w widmie ^1H NMR (Rys. 38). Wzrost temperatury do 30°C powodował wyraźne zmiany intensywności sygnałów iminowych w zakresie 12-14 ppm oraz powyżej 15 ppm, natomiast przy temperaturze wynoszącej 35°C te sygnały całkowicie zaniknęły (Rys. 38). W przeciwieństwie do wariantu DR2, na widmie ^1H NMR dupleksu zawierającego trzy reszty LNA (DR5) były widoczne charakterystyczne sygnały iminowe we wszystkich z zastosowanych temperatur (Rys. 39). Nawet wzrost temperatury do 45°C nie powodował zaniku powyższych sygnałów. Tym samym, potwierdzono, że wprowadzenie modyfikacji LNA do nici dupleksu zwiększa jego trwałość termiczną. W wyniku analizy strukturalnej otrzymano wyniki, które bardzo dobrze korelują z danymi termodynamicznymi dla heterochiralnych dupleksów RNA.

Podsumowując, badania strukturalne z wykorzystaniem techniki ^1H NMR pozwoliły prześledzić powstawanie heterochiralnych dupleksów RNA w określonych warunkach temperatury i pH. Na podstawie zarejestrowanych widm ^1H NMR możliwe

było stwierdzenie, że dwa oligonukleotydy zarówno o tej samej, jak i odmiennej chiralności mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć odpowiednio homo- i heterochiralne dupleksy. Uzyskane wyniki pozwalają również na sformułowanie wniosku, że w warunkach eksperymentu NMR istnieje równowaga między różnymi formami konformacyjnymi dupleksu. Natomiast, w celu określenia charakteru wiązań wodorowych należałoby wykonać dodatkowe badania. Ponadto, otrzymane widma ^1H NMR heterochiralnych dupleksów RNA w zależności od temperatury, potwierdziły korzystny wpływ reszt typu LNA na tworzenie się i stabilność dupleksów RNA.

2.6 Badanie zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA metodą spektroskopii fluorescencyjnej

Badania właściwości termodynamicznych oraz analiza strukturalna z użyciem techniki CD dostarczyły ważnych informacji dotyczących stabilności termodynamicznej oraz zmian konformacyjnych wariantów dupleksów DNA i RNA. Jednakże, na podstawie uzyskanych danych z obu powyższych metod można było jedynie postulować o orientacji nici (równoległa lub antyrównoległa) badanych homo- i heterodupleksów DNA i RNA. W związku z tym, zdecydowano na wykorzystanie innej metody spektroskopowej, która umożliwiłaby określenie polarności nici powyższych dupleksów.

Spektroskopia fluorescencyjna jest powszechnie stosowaną metodą w badaniu dynamiki i mechanizmu działania różnych biomolekuł [331]. Technika FRET umożliwia badanie zachowania się pojedynczych cząsteczek takich, jak: DNA, RNA czy białka. Przykładowo, może być użyta do mierzenia odległości wewnątrz makrocząsteczek [332, 333]. Z doniesień literaturowych wiadomo również, że znajduje ona zastosowanie w analizie strukturalnej dupleksów [265]. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, w badaniach zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA posłużono się techniką FRET. W eksperymentach wykonano dwa rodzaje pomiarów, w tym pomiar stacjonarny intensywności fluorescencji oraz pomiar czasowo-rozdzielczy czasu życia fluorescencji (parametr τ_{DA} , Tab. 15) za pomocą spektrometru FluoTime 300 EasyTau (PicoQuant). W ramach pracy doktorskiej wykorzystano oba rodzaje pomiarów, ponieważ intensywność fluorescencji barwników zależy przede wszystkim od ich stężenia, natomiast czas życia fluorescencji jest względnie niezależny od tego parametru. Innymi słowy, pierwsza metoda była użyteczna do jakościowej analizy zjawiska FRET, a druga dostarczyła danych do

obliczenia efektywności zjawiska FRET (parametr E, Tab. 15) badanych wariantów dupleksów DNA i RNA. Analiza strukturalna badanych cząsteczek została wykonana w Zakładzie Fizyki Chemicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Analiza otrzymanych danych została przeprowadzona przy użyciu programów FluoFit Analysis (PicoQuant) i Origin Pro 8.0.

W celu potwierdzenia czy badany dupleks przyjmował formę antyrównoległą (5'-3'/3'-5') czy równoległą (5'-3'/5'-3') zaprojektowano oligomery kowalencyjnie połączone na końcu 5' z jednym z pary fluorochromów, tj. 5(6)-karboksylfluoresceiną [5(6)-FAM, ang. *5(6)-carboxyfluorescein*] lub 5-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA, ang. *5-carboxytetramethylrhodamine*). W przypadku badanych dupleksów nić homopurynowa była wyznakowana fluorochromem 5(6)-FAM, natomiast nić homopirymidynowa TAMRA. Jest to powszechnie używana para barwników fluorescencyjnych, w której rolę donora pełni cząsteczka 5(6)-FAM (wzbudzenie przy długości fali 494 nm i emisja przy długości fali 524 nm), natomiast rolę akceptora cząsteczka TAMRA (nazywana też wygaszaczem, wzbudzenie przy długości fali 565 nm i emisja przy długości fali 580 nm) [331].

Zjawisko FRET obserwuje się, gdy w odpowiedniej odległości znajdują się obok siebie dwa barwniki fluorescencyjne, między którymi istnieje możliwość przeniesienia (transferu) energii z jednego z nich nazywanego donorem na drugi określany mianem akceptora [331]. Zasięg takiego oddziaływania wynosi ok. 100 Å, a wydajność zjawiska FRET zależy od zakresu nakładania się widm absorpcji akceptora i emisji donora oraz odległości pomiędzy barwnikami. Odległość Förstera (parametr R_0) to odległość, dla której efektywność przenoszenia energii wynosi 50%. Parametr R_0 dla pary 5(6)-FAM-TAMRA przyjmuje wartość 54 ± 1 Å [333]. Odległości pomiędzy fluorochromami (parametr R) w modelowych dupleksach DNA i RNA obliczono na podstawie efektywności transferu energii (parametr E) według następującego równania:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}}$$

gdzie R – odległość pomiędzy donorem (5(6)-FAM) i akceptorem (TAMRA),

R_0 – odległość Förstera,

E – efektywność transferu energii z donora na akceptor.

Wartość parametru E określono według następującego równania:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

gdzie E – efektywność transferu energii,

τ_D – czas życia donora (5(6)-FAM),

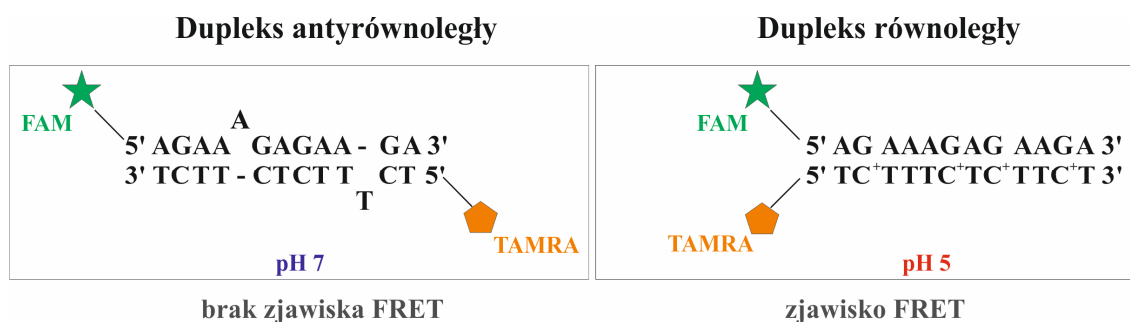
τ_{DA} – czas życia donora (5(6)-FAM) w obecności akceptora (TAMRA)

R – odległość pomiędzy donorem i akceptorem,

R_0 – odległość Förstera.

Ponieważ parametr E w dużym stopniu zależy od odległości pomiędzy barwnikami (parametr R), w niniejszej pracy przyjęto granicę wiarygodności otrzymanych wyników. Jeżeli wartość parametru R była dwa razy większa od wartości parametru R_0 ($R = 2R_0$), to efektywność transferu energii (parametr E) wynosiła 1.54%. Natomiast, jeśli wartość parametru R była równa połowie wartości parametru R_0 ($R = 0.5R_0$) wówczas parametr E przyjmuje wartość 98.5%. Oznacza to, że gdy wartość parametru R mieściła się w granicach $27 \text{ \AA} < R < 108 \text{ \AA}$ ($0.5R < R_0 < 2R$) wynik uznano za wiarygodny, natomiast w sytuacji, gdy wartość parametru znajdowała się w zakresie $27 \text{ \AA} > R > 108 \text{ \AA}$ ($0.5R > R_0 > 2R$) taki wynik był obarczony dużym błędem.

W niniejszej pracy doktorskiej w badaniu zjawiska FRET wariantów dupleksów DNA i RNA opierano się na założeniu, że równoległe ułożenie łańcuchów homopurynowych i homopirymidynowych względem siebie będzie sprzyjało przeniesieniu energii z cząsteczki donora na cząsteczkę akceptora. Natomiast, podczas tworzenia się dupleksów z antyrównoległą orientacją nici transfer energii będzie niemożliwy lub mało wydajny (Rysunek 40). W tym układzie przejście z formy równoległej do formy antyrównoległej dupleksu przy zmianie pH z wartości 5.0 na 7.0 będzie powodowało zmiany odległości między parą fluorochromów i w konsekwencji korelowało z efektywnością zjawiska FRET. Intensywność fluorescencji 5(6)-FAM powinna zmniejszać się, gdy powstaje równoległy dupleks, a wzrastać w sytuacji, gdy tworzy się antyrównoległy dupleks.



Rysunek 40. Schemat obrazujący zjawisko FRET w zależności od rodzaju duplesku i wartości pH.

Ogólnie, na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano występowania korelacji pomiędzy sekwencją/strukturą badanych wariantów duplesków DNA i RNA a efektywnością transferu energii, co zostało zaprezentowane na Rysunku 41 oraz opisane w Tabeli 15. Wszystkie badane warianty D1-D18 można było podzielić na dwie grupy pod względem efektywności przeniesienia energii (parametr E). Pierwsza grupa obejmowała dupleski D1, D5 i D7-D18 w kwasowym pH oraz dupleski D1-D4 i D8-D18 w obojętnym pH, dla których wartości parametru E mieściła się w ustalonych granicach wiarygodności ($27 \text{ \AA} < R < 108 \text{ \AA}$, Tab. 15). Do drugiej grupy zaliczono warianty D2-D4 i D6 w kwasowym pH oraz D5 i D6 w obojętnym pH, które charakteryzowały się wartościami parametru E wykraczającymi poza przyjęte granice wiarygodności ($27 \text{ \AA} > R > 108 \text{ \AA}$, Tab. 15). Zaobserwowano, że wyznaczone czasy życia fluorescencji (parametr τ_{DA}) dla duplesków zawierających homopurynową nić typu DNA (D1-D6) przyjmowały wartości wynoszące 2.4 ns lub 2.5 ns, które były takie same jak dla próby kontrolnej, tj. S1 (parametr τ_D przyjmował wartość 2.5 ns, Tab. 15) w warunkach niskiego pH. Podobna sytuacja występowała dla tych wariantów w warunkach obojętnego pH, gdzie wartości parametru τ_{DA} były jednakowe bądź nieznacznie mniejsze względem wartości parametru τ_D próby kontrolnej (Tab. 15). Wyniki te sugerują, że dupleski typu DNA (D1-D6) przyjmują antyrównoległą orientację nici w warunkach kwasowych i obojętnych.

Ponadto, zauważono, że zmiany intensywności fluorescencji dla D1-D6 były małe, szczególnie w warunkach obojętnego pH (Rys. 41A). Innymi słowy transfer energii z cząsteczki donora (nić znakowana 5(6)-FAM) na cząsteczkę akceptora (nić znakowana TAMRA) dla wariantów D1-D6 był mało wydajny. Zmiany intensywności fluorescencji zarejestrowane w pomiarach stacjonarnych dla powyższych homo- i heteroduplesków (Rys. 41A) bardzo dobrze korelują z obliczonymi wartościami parametru τ_{DA} (Tab. 15).

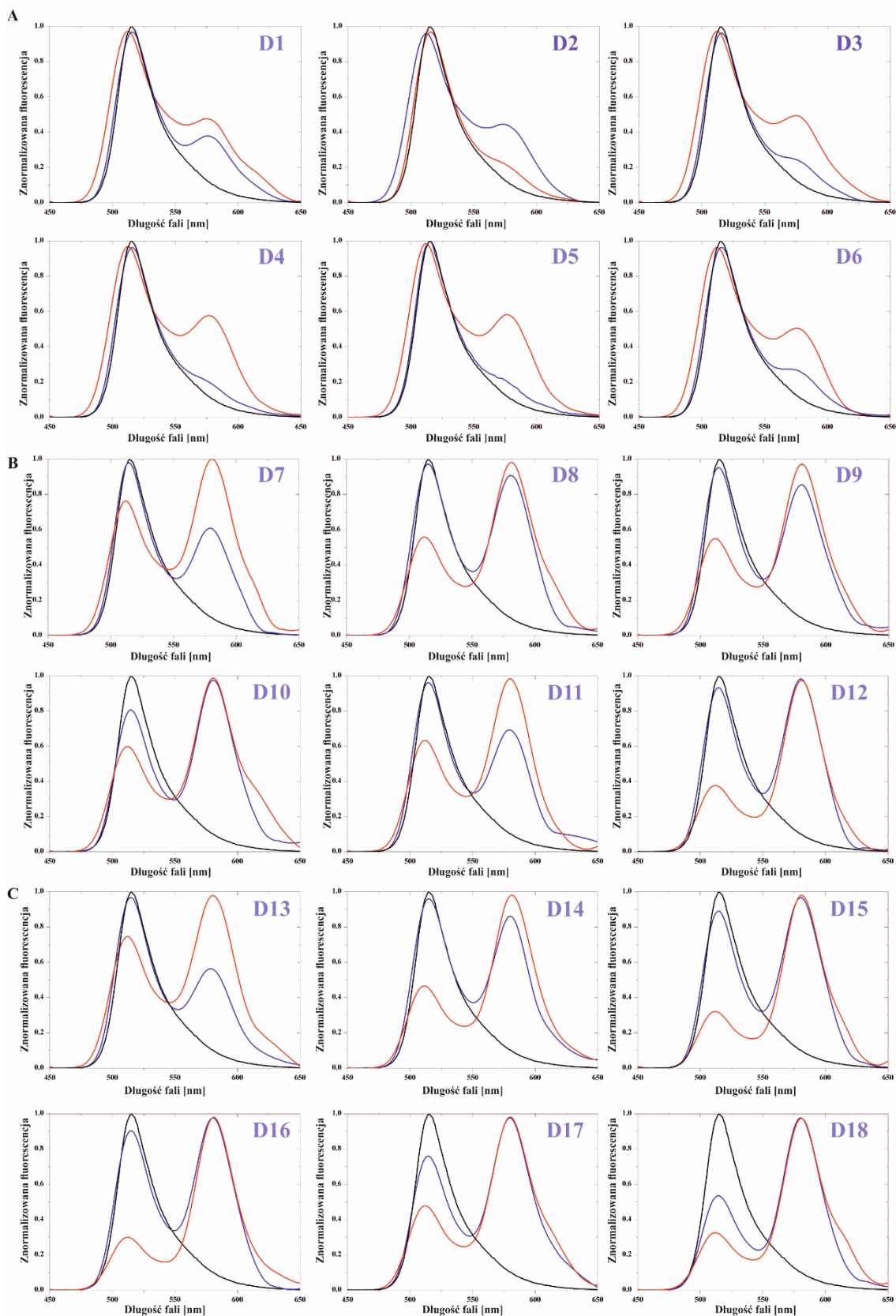
Co więcej, otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z danymi termodynamicznymi uzyskanymi w eksperymentach topnienia UV i pokazują ścisłą zależność pomiędzy strukturą badanych cząsteczek a ich stabilnością termodynamiczną. W związku z tym, na podstawie wyników uzyskanych metodą spektroskopii fluorescencyjnej jednoznacznie nie potwierdzono, że duplekisy D1-D6 przyjmują równoległą orientację nici. Mała wydajność transferu energii najprawdopodobniej wynikała z niskiej trwałości termodynamicznej tych dupleksów.

W przeciwieństwie do homo- i heterodupleksów typu DNA, warianty posiadające nie homopurynową w serii RNA odznaczały się krótszym czasem życia fluorescencji. To znaczy parametr τ_{DA} przyjmował wartości mniejsze niż wartość parametru τ_D próby kontrolnej S2 zarówno w kwasowym, jak i obojętnym pH (Tab. 15). Wartości parametru τ_{DA} dla dupleksów D7, D8, D9, D10, D11 i D12 w kwasowym pH wynosiły odpowiednio: 1.8, 1.4, 1.6, 1.2, 0.7 i 0.6 ns (Tab. 15). Natomiast w warunkach obojętnego pH ten sam parametr dla powyższych wariantów przyjmował wartości od 0.1 do 1.7 ns, które były mniejsze w porównaniu do wartości parametru τ_D równej 3.7 ns dla próby kontrolnej S2 (Tab. 15). Także zarejestrowane widma fluorescencyjne dla homo- i heterodupleksów RNA miały odmienny przebieg w porównaniu z wariantami D1-D6 (Rys. 41B). W oparciu o powyższe wyniki możliwe było sformułowanie wniosku, że badane duplekisy RNA (D7-D12) miały równoległą orientację nici w obu warunkach pH.

Parametry fluorescencyjne (Tab. 15) oraz zmiany intensywności fluorescencji (Rys. 41C) otrzymane dla homo- i heterodupleksów 2'-O-MeRNA (D13-D18) były podobne do tych występujących w przypadku wariantów D7-D12. Sugeruje to, że duplekisy typu RNA i 2'-O-MeRNA odznaczają się podobnymi właściwościami strukturalnymi, zarówno w warunkach kwasowych, jak i obojętnych. Ciekawą obserwacją było to, że obecność trzech reszt LNA w nici homopurynowej DNA lub RNA powodowała skrócenie czasu życia fluorescencji w kwasowym pH. Potwierdzeniem tego były mniejsze wartości parametru τ_{DA} wynoszące: 1.4 ns (D8), 1.2 ns (D10), 0.6 ns (D12), 1.0 (D14) i 0.5 ns (D16) w porównaniu z wariantami niezawierającymi modyfikacji LNA, odpowiednio: D7 (1.8 ns), D9 (1.6 ns), D11 (0.7 ns), D13 (1.3 ns) i D15 (0.9 ns) (Tab. 15). Podobną zależność zauważono dla powyższych wariantów również w warunkach obojętnego pH, a obserwowane zmiany powiązano z większą trwałością modyfikowanych dupleksów. Na tej podstawie potwierdzono tworzenie się

równoległych dupleksów dla wariantów D13-D18 oraz wykazano wpływ wprowadzonych reszt LNA na ich strukturę.

Podsumowując, stwierdzono, że oligonukleotydy o określonym kontekście sekwencyjnym mogą tworzyć struktury dwuniciowe DNA i RNA o równoległej orientacji nici. Na powstawanie dupleksów o polarności nici 5'-3'/5'-3' mają istotny wpływ następujące czynniki: wartość pH, skład nukleotydowy nici homopourynowej i homopirymidynowej, a także obecność modyfikacji chemicznych. Równoległy dupleks był strukturą preferowaną w warunkach kwasowych (pH 5.0), natomiast antyrównoległy dupleks z wewnętrznym niesparowaniem powstawał zwykle w obojętnym pH (pH 7.0). Z otrzymanych danych fluorescencyjnych wynika, że nici w dupleksach typu DNA ułożone były względem siebie w sposób antyrównoległy, podczas gdy dupleksy typu RNA i 2'-O-MeRNA posiadały równoległą orientację nici.



Rysunek 41. Widma fluorescencyjne dla dupleksów DNA (A), RNA (B) i 2'-O-MeRNA (C) w pH 5.0 (czerwona linia) i pH 7.0 (niebieska linia) oraz kontroli (nić homopurynowa znakowana 5(6)-FAM, czarna linia).

Tabela 15. Parametry wariantów dupleksów DNA i RNA uzyskane z pomiarów fluorescencyjnych.

Sekwencja (5'-3')	Nazwa dupleksu i kontroli	Pomiary fluorescencyjne ^{a,b}					
		pH 5.0			pH 7.0		
		Czas życia fluorescencji τ_{DA} (ns)	Efektywność FRET E (%)	Odległość R (Å)	Czas życia fluorescencji τ_{DA} (ns)	Efektywność FRET E (%)	Odległość R (Å)
AGAAAGAGAAGA	S1*	2.5 ^{AD}	0	R_0	3,8	0	R_0
AGAAAGAGAAGA TCITTCTTCT	D1	2.4	2	104	3.4	10	78
AGAAAGAGAAGA TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D2	2.5	0	>108	3.2	16	70
AGAAAGAGAAGA UCUUUCUCUUUCU	D3	2.5	0	>108	3.7	2	106
AGAAAGAGAAGA UC ^L UUUC ^L UCUUUC ^L U	D4	2.5	0	>108	3.7	2	106
AGAAAGAGAAGA UMCMUMUMCMUMCMUMCMUM	D5	2.4	2	103	3.8	0	>108
AGAAAGAGAAGA UMC ^L UMUMUMC ^L UMCMUMUMC ^L UM	D6	2.5	0	>108	3.8	0	>108
AGAAAGAGAAGA	S2*	2.4 ^{AD}	0	R_0	3.7	0	R_0
AGAAAGAGAAGA TCITTCTTCT	D7	1.8	26	64	1.7	55	52
AGAAAGAGAAGA TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D8	1.4	57	57	1.2	68	47
AGAAAGAGAAGA UCUUUCUCUUUCU	D9	1.6	66	48	0.4	89	38
AGAAAGAGAAGA UC ^L UUUC ^L UCUUUC ^L U	D10	1.2	50	54	0.1	96	32
AGAAAGAGAAGA UMCMUMUMCMUMCMUMCMUM	D11	0.7	71	46	1.2	68	47
AGAAAGAGAAGA UMC ^L UMUMUMC ^L UMCMUMUMC ^L UM	D12	0.6	77	44	0.4	89	38
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M	S3*	2.3 ^{AD}	0	R_0	3.6	0	R_0
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M TCITTCTTCT	D13	1.3	43	56	1.4	62	50
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M TC ^L TTTC ^L TCTTC ^L T	D14	1.0	54	52	0.9	74	45
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UCUUUCUCUUUCU	D15	0.9	58	51	0.7	81	42
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UC ^L UUUC ^L UCUUUC ^L U	D16	0.5	76	46	0.6	83	42
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UMCMUMUMCMUMCMUMCMUM	D17	0.6	75	45	0.3	92	36
A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M UMC ^L UMUMUMC ^L UMCMUMUMC ^L UM	D18	0.6	75	45	0.1	96	32

Oznaczenia: a – bufor: 40 mM kwas borowy, 40 mM kwas fosforowy, 40 mM kwas octowy i 100 mM NaCl, pH 5.0 i 7.0; b – test chi kwadrat $\chi^2 \leq 1.2$; τ_{AD} – czas życia fluorescencji donora w obecności akceptora; τ_D – czas życia fluorescencji donora (referencja); R_0 – odległość Förstera; R – odległość pomiędzy donorem i akceptorem; * – S1, S2 i S3 próby kontrolne odpowiednio dla dupleksów: D1-D6, D7-D12 i D13-D18, kursywa – RNA, A^M, G^M, U^M i C^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA, C^L – modyfikacja LNA.

2.7 Badanie zmian strukturalnych dupleksów DNA i RNA w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa metodą spektroskopii fluorescencyjnej

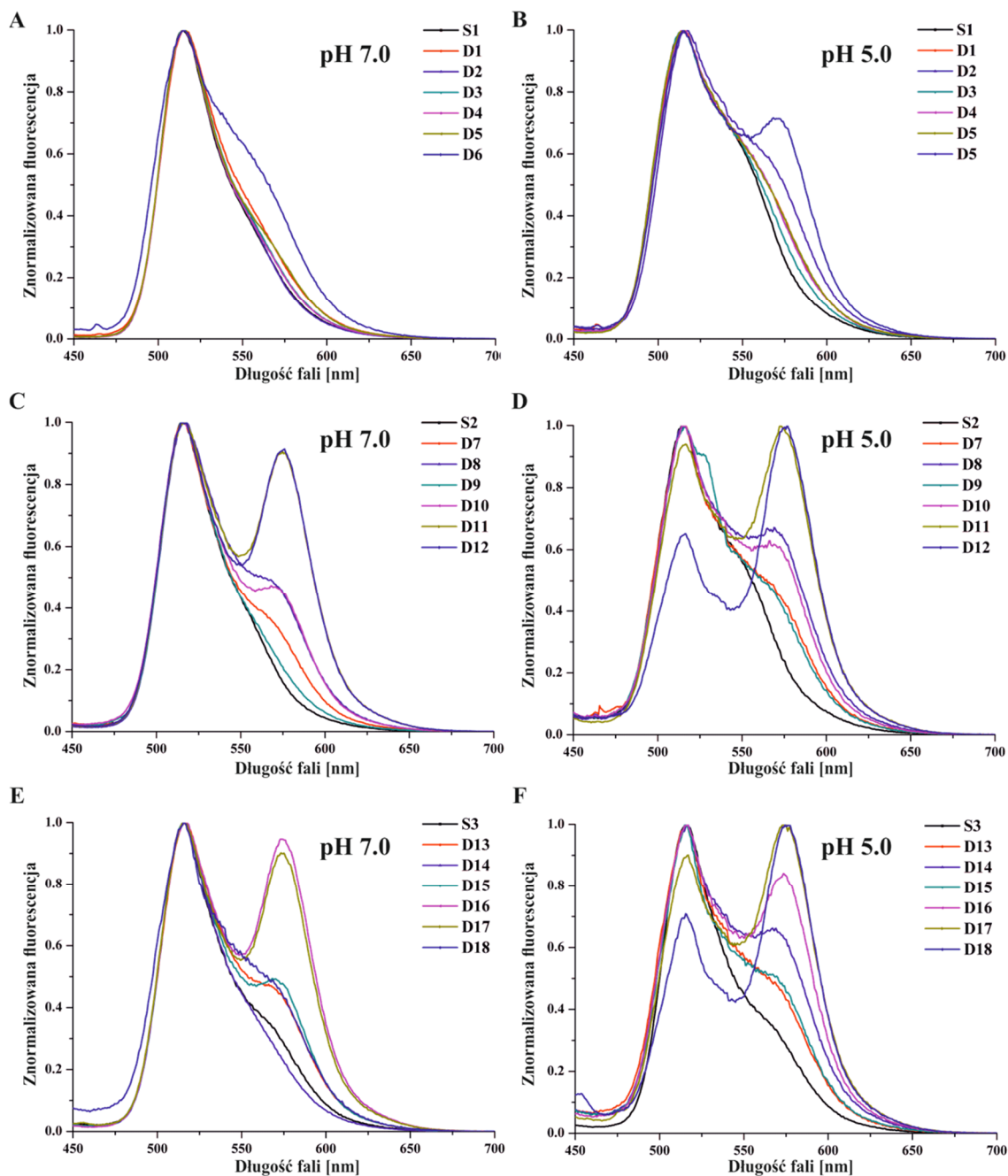
Biorąc pod uwagę liczne doniesienia literaturowe oraz wyniki własnych badań uzyskane podczas analizy termodynamicznej i strukturalnej udowodniono, że powstawanie niekanonicznych form dupleksów jest determinowane wieloma czynnikami. Rodzaj oligonukleotydów tworzących dupleks i wartość parametru pH bez wątpienia stanowią najważniejsze z nich. Na podstawie wyznaczonych parametrów termodynamicznych, zarejestrowanych widm dichroizmu kołowego, a także otrzymanych danych z pomiarów fluorescencyjnych zauważono, że liczna grupa badanych homo- i heterodupleksów o równoległej orientacji nici może tworzyć się w warunkach obojętnych. W związku z tym, postanowiono zbadać zachowanie się oligo(deoksy)rybonukleotydów homopurynowych i homopirymidynowych w warunkach zbliżonych do tych, które występują w komórce. Z danych literaturowych wynika, że technika FRET może być stosowana do badania struktury kwasów nukleinowych w ekstraktach komórkowych [334, 335]. W związku z tym, w niniejszej pracy wykorzystano również spektroskopię fluorescencyjną w analizie strukturalnej dupleksów DNA i RNA w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa.

W celu sprawdzenia i określenia wpływu warunków środowiskowych na specyficzność oddziaływania nici homopurynowej i homopirymidynowej wykorzystano osiemnaście wariantów dupleksów (D1-D18) oraz trzy oligonukleotydy kontrolne (S1, S2 i S3), analogicznie jak w analizie strukturalnej FRET (*Podrozdział 2.6 Badanie zmian strukturalnych wariantów dupleksów DNA i RNA metodą spektroskopii fluorescencyjnej*). W badaniu zmian strukturalnych homo- i heterodupleksów DNA i RNA wykorzystano ekstrakt cytoplazmatyczny pochodzący z komórek HeLa. Ekstrakt komórkowy był przygotowany wg procedury opisanej w *Rozdziale Materiały i Metody*, a następnie użyty w mieszaninie z buforem RB (pH 5.0 lub pH 7.0) w stosunku stechiometrycznym ekstrakt:bufor równym 9:1 (v/v). Rejestracja widm fluorescencyjnych w zakresie długości fali 450-700 nm została wykonana przez wzbudzenie badanych prób przy długości fali 440 nm za pomocą spektrometru JASCO. Analizę strukturalną przeprowadzono w Pracowni Chemii Bioanalitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Analiza otrzymanych danych została wykonana przy użyciu programu Origin Pro 8.0. Na Rysunku 42

zaprezentowano uzyskane wyniki badań homo- i heterodupleksów DNA i RNA oraz oligonukleotydów kontrolnych (S1-S3).

Zarejestrowane widma fluorescencyjne dla większości badanych wariantów charakteryzowały się w swoim przebiegu obecnością dwóch sygnałów, jednego przy długości fali ok. 524 nm (emisja 5(6)-FAM) oraz drugiego przy długości fali ok. 580 nm (emisja TAMRA) (Rys. 42B-E). Wyjątek stanowiły homo- i heterodupleksy typu DNA (D1-D6, w buforze RB pH 7.0, Rys. 42A), dla których widma fluorescencyjne posiadały tylko sygnał świadczący o emisji fluoresceiny (524 nm). Na tej podstawie stwierdzono, że przeniesienia energii z cząsteczki donora (5(6)-FAM) na cząsteczkę akceptora (TAMRA) nie było możliwe, ze względu na zbyt dużą odległość pomiędzy fluorochromami spowodowaną najprawdopodobniej antyrównoległym ułożeniem obu nici względem siebie. W oparciu o powyższe, sformułowano wniosek, że w warunkach, gdy zastosowano mieszaninę buforu RB o pH 7.0 z ekstraktem komórkowym powstawały antyrównoległe dupleksy D1-D6. W przypadku tych samych dupleksów, ale w innych warunkach eksperymentu (mieszanina: bufor RB o pH 5.0 z ekstraktem komórkowym) zauważono również, że nie dochodziło do transferu energii między fluorochromami lub efektywność tego procesu była bardzo mała (Rys. 42B). Może to świadczyć o tym, że w badanych warunkach tworzenie się struktury z polarnością nici 5'-3'/5'-3' było niemożliwe w przypadku wariantów D1-D6.

Przechodząc do analizy uzyskanych wyników dla homo- i heterodupleksów typu RNA i 2'-O-MeRNA zaobserwowano odmienną sytuację niż dla dupleksów typu DNA. W przebiegu zarejestrowanych widm fluorescencyjnych zwykle występowały dwa charakterystyczne sygnały różniące się intensywnością (Rys. 42C-E). W przypadku wariantów D7, D8, D9 i D10 (Rys. 42C) oraz D13-D15 i D18 (Rys. 42E) intensywność sygnału przy długości fali ok. 580 nm była bardzo mała, co wskazywało na mało wydajne przeniesienie energii z donora na akceptor w buforze RB o pH 7.0 z ekstraktem komórkowym. W oparciu o te wyniki możliwe było sformułowanie wniosku, że zastosowane warunki eksperymentalne mogły utrudniać tworzenie równoległych dupleksów. Co ciekawe, obniżenie wartości pH buforu RB do 5.0 pozwoliło na zwiększenie wydajności zjawiska FRET dla dupleksów typu RNA i 2'-O-MeRNA (Rys. 42D i F).



Rysunek 42. Widma fluorescencyjne dla wariantów dupleksów D1-D6 (A – pH 7.0; B – pH 5.0), D7-D12 (C – pH 7.0; D – pH 5.0) i D13-D18 (E – pH 7.0; F – pH 5.0) oraz kontroli S1, S2 i S3 w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa.

Badane warianty D7-D18 można było podzielić na dwie grupy pod względem zmian intensywności sygnałów fluorescencji przy długościach fali ok. 524 i 580 nm. Pierwsza grupa obejmowała dupleksy D7-D10 oraz D13-D15, których widma fluorescencyjne wskazywały na małe zmiany efektywności transferu energii. Natomiast, drugą grupę stanowiły dupleksy D11 i D12 oraz D16-D18, dla których zaobserwowano wyraźne zmiany intensywności fluorescencji w przebiegu zarejestrowanych widm. W

tym miejscu warto zwrócić uwagę, że warianty dupleksów (D11, D12 oraz D16-D18) odznaczające się największymi zmianami w przebiegu widm fluorescencyjnych posiadały modyfikacje 2'-O-MeRNA lub/i LNA. Natomiast obecność nici homopirymidynowej w serii DNA przyczyniała się do osłabienia oddziaływania w heterodupleksach typu RNA i 2'-O-MeRNA, o czym świadczą zarejestrowane widma fluorescencyjne. Powyższe wyniki pozostają, więc w zgodzie z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych i pokazują, że duża stabilność termodynamiczna struktur zawierających reszty typu 2'-O-MeRNA lub/i LNA umożliwia ich tworzenie się w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HeLa.

Interesującym spostrzeżeniem płynącym z badania zmian strukturalnych dupleksów D1-D18 w warunkach zbliżonych do komórkowych był również fakt, że obecność białek i innych biomolekuł znajdujących się w cytoplazmatycznym ekstrakcie w umiarkowanym stopniu wpływała na tworzenie się dupleksów. Porównując zmiany poziomu fluorescencji dla dupleksów D1-D18 przygotowanych w samym buforze RB i przygotowanych w buforze RB z ekstraktem komórkowym, zauważono pewne różnice. Intensywność sygnałów fluorescencyjnych przy długości fali ok. 580 nm dla badanych dupleksów DNA i RNA zwykle była większa w przypadku zastosowania samego buforu RB, w porównaniu z intensywnością fluorescencji dupleksów przygotowanych w mieszaninie buforu RB z ekstraktem cytoplazmatycznym z komórek HeLa. Powyższe obserwacje sugerują, że biomolekuły znajdujące się w ekstrakcie komórkowym mogą w pewnym stopniu wpływać na oddziaływanie dwóch oligonukleotydów tworzących dupleks. W konsekwencji formowanie się struktury dwuniciowej w takich warunkach może być nieznacznie utrudnione. Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane w eksperymentach FRET (z wykorzystaniem ekstraktów komórkowych) stwierdzono, że zarówno rodzaj oligonukleotydu, wartość pH, jak również obecność innych cząsteczek determinują powstawanie antyrównoległych i równoległych dupleksów DNA i RNA.

VI. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy doktorskiej była kompleksowa charakterystyka niekanonicznych form DNA i RNA, tj. trypleksów RNA oraz równoległych dupleksów DNA i RNA. Przeprowadzone badania można podzielić na dwie części: I – dotycząca wariantów trypleksów RNA i II – dotycząca równoległych dupleksów w serii DNA, RNA i 2'-O-MeRNA. Obie części badań były realizowane jednocześnie i przebiegały kilku etapowo obejmując: badania termodynamiczne, analizę strukturalną, badania *in vitro* oraz eksperymenty na linii komórkowej HeLa.

Wyniki dotyczące trypleksów RNA (część I) można podsumować w następujących punktach:

1. wykazano znaczący wpływ badanych modyfikacji na stabilność termodynamiczną modelowych trypleksów RNA. Wprowadzenie pochodnych LNA i 2-tiourydyny do oligomeru tworzącego trypleks (TFO) powodowało zdecydowane zwiększenie trwałości trypleksów RNA w porównaniu z niemodyfikowanym wariantem. Efekty termodynamiczne reszt LNA i 2-tiourydyny miały charakter stabilizacyjny, jednak nie zaobserwowano wyraźnej zależności między liczbą podstawień a stabilnością termodynamiczną. Ponadto, potwierdzono, że oligonukleotydy w serii β -L-RNA mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć strukturę trypleksu. Jednakże zmiana D-rybozy na L-rybozę powodowała duży efekt destabilizacyjny.
2. widma dichroizmu kołowego potwierdziły tworzenie się równoległego trypleksu RNA dla wszystkich analizowanych wariantów i nie wykazały znaczących zmian pomiędzy badanymi cząsteczkami.
3. na podstawie testów EMSA stwierdzono, że rodzaj modyfikacji oraz warunki pH wpływają na zdolność wiązania się oligomeru TFO do spinki RNA. Warianty trypleksów RNA zawierające pojedyncze lub wielokrotne podstawienia LNA lub 2-tiourydyny tworzyły się w warunkach kwasowego pH (pH 5.0), natomiast w warunkach obojętnego pH (pH 7.0) ich powstawanie było niemożliwe. W przypadku wariantów posiadających reszty LNA i 2-tiourydyny wykazano, że oligomery TFO mogą specyficznie oddziaływać ze spinką RNA i tworzyć struktury trypleksowe, nawet w warunkach obojętnego pH. Obecność wielokrotnych podstawień LNA i 2-tiourydyny przyczyniała się do zwiększenia powinowactwa TFO do spinki RNA.

4. wykazano, że warianty trypleksów RNA zawierające podstawienia LNA i 2-tiourydyny odznaczały się korzystniejszymi wartościami stałej dysocjacji w porównaniu z wariantami, które zawierały mniejszą liczbę reszt LNA i 2-tiourydyny. Najbardziej korzystną wartość parametru K_d zaobserwowano dla wariantu trypleksu posiadającego pięć reszt LNA i sześć reszt 2-tiourydyny. Wielokrotne podstawienia resztami LNA i 2-tiourydyny przyczyniły się do zwiększenia powinowactwa TFO do spinki RNA.
5. określono wpływ badanych trypleksów RNA na ekspresję genu *GFP* w linii komórkowej HeLa. Wykazano, że wszystkie analizowane warianty w różnym stopniu wpływają na ekspresję genu *GFP*. Jednak, w każdym przypadku zaobserwowano efekt wyciszenia, czyli obniżenie poziomu ekspresji genu *GFP* względem kontroli.

Wyniki dotyczące równoległych dupleksów DNA i RNA (część II) można podsumować w następujących punktach:

1. badania topnienia UV 18 wariantów dupleksów wykazały wpływ rodzaju oligonukleotydu (DNA, RNA) i modyfikacji chemicznych oraz warunków pH na stabilność termodynamiczną analizowanych cząsteczek. Zaobserwowano, że wprowadzenie modyfikacji LNA lub 2'-O-MeRNA lub obu równocześnie korzystnie wpływa na trwałość wszystkich dupleksów zarówno w warunkach kwasowego (pH 5.0), jak i obojętnego pH (pH 7.0). Stwierdzono również zwiększoną stabilność termodynamiczną badanych dupleksów w warunkach kwasowego pH. Ponadto, wykazano, że warianty zawierające nic homopurynową w serii DNA odznaczają się najmniejszą trwałością, natomiast w przypadku wariantów posiadających obie nici w serii RNA lub 2'-O-MeRNA zaobserwowano korzystny efekt termodynamiczny. Co więcej, potwierdzono powstawanie heterochiralnych dupleksów RNA, jednak ich trwałość była bardzo mała.
2. widma dichroizmu kołowego analizowanych dupleksów DNA i RNA potwierdziły tworzenie się struktury dupleksu i wykazały pewne różnice konformacyjne badanych cząsteczek. Zaobserwowano, że większość widm CD dupleksów RNA wskazuje na tworzenie helisy typu A. Natomiast, heterodupleksy DNA/RNA tworzą helisy, które odbiegają od kanonicznych struktur A-RNA i B-DNA. Natomiast w przypadku heterochiralnych dupleksów

RNA zauważono, że profile widm CD wykazywały indywidualne cechy charakterystyczne dla określonego dupleksu.

3. badania NMR potwierdziły powstawanie heterochiralnych dupleksów RNA o równoległej orientacji obu nici oligonukleotydowych.
4. pomiary fluorescencyjne potwierdziły tworzenie się dupleksów o równoległej orientacji nici w zależności od warunków pH. Wykazano, że widma fluorescencyjne dupleksów w serii DNA miały odmienny przebieg w odniesieniu do dupleksów w serii RNA i 2'-O-MeRNA. Ponadto, zaobserwowano, że zmiany intensywności fluorescencji badanych dupleksów były mniejsze w warunkach obojętnego pH i wykazano, że tworzenie się równoległych dupleksów było preferowane w warunkach kwasowego pH.
5. określono wpływ warunków środowiskowych na specyficzność oddziaływania nici homopurynowej i homopirymidynowej badanych dupleksów DNA i RNA. Wykazano, że obecność białek i innych biomolekuł znajdujących się w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa w umiarkowanym stopniu wpływała na tworzenie się dupleksów.

Podsumowując, połączenie różnych technik spektroskopowych, w tym: metody topnienia UV, CD, FRET i NMR oraz testu EMSA i eksperymentów biologicznych z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa pozwoliło na otrzymanie dokładnego obrazu niekanonicznych form kwasów nukleinowych. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej oraz uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat właściwości termodynamicznych, strukturalnych i biologicznych trypleksów RNA oraz równoległych dupleksów DNA i RNA. Szczegółowa analiza otrzymanych danych pozwoliła na sformułowanie ogólnego wniosku o wpływie rodzaju oligonukleotydu, modyfikacji chemicznych oraz czynników środowiskowych (pH, obecność białek lub innych cząsteczek) na powstawanie i trwałość niekanonicznych form DNA i RNA. Uzyskane wyniki mogą być pomocne w projektowaniu oligonukleotydów charakteryzujących się pożądanymi właściwościami termodynamicznymi i biologicznymi, a także w rozwijaniu strategii terapeutycznych z zastosowaniem niekanonicznych struktur kwasów nukleinowych.

VII. MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1 Odczynniki

Agar, akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, ekstrakt drożdżowy, mocznik, pepton – **Serva**

β -merkaptoetanol, błękit bromofenolowy, bromek etydyny, bromek 3-(4,5-dimetylotriazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu (MTT), chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1), cyjanol ksylenowy, D-glukoza, ditiotreitól (DTT), fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF), fluorowoderek trietyloamonowy (TEA·3HF), glicerol, kakodylan sodu, kanamycyna, kwas 2-[4-(2-hydroksyetyleno)-1piperazylo]-etanosulfonowy (HEPES), kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy (MES), N-laurylosarkozynian sodu, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), nadsiarczan amonu (APS), octan amonu, orange G, roztwór antybiotyków 100x stężony (Antibiotic Antymycotic Solution), roztwór trypsyna-EDTA 10x stężony, roztwór witamin 100x stężony (MEM Vitamin Solution), RPMI1640 medium, tiocyjanian amonu, tiocyjanian guanidyny, wodorotlenek sodu – **Sigma-Aldrich**

chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek sodu, dodecylosiarczan sodu (SDS), octan sodu, sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na₂EDTA), sulfotlenek dimetylu (DMSO), tri(hydroksymetylo)aminometan (Tris), wodorofosforan sodu – **Fluka**

agarozą, dietylopirowęglan (DEPC), EDTA roztwór 0.5 M sterylny, glicyna, kwas borowy, PBS 10x stężony, Triton-X -**Bioshop**

acetonitryl, etanol, metanol, n-propanol, n-butanol – **POCH**

amoniak 25%, kwas octowy, kwas solny, izopropanol – **Chempur**

trizol, Lipofectamine 2000 – **Invitrogen**

plądowa surowica bydlęca inaktywowana termicznie (FBS), OptiMEM, pożywka hodowlana RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej – **Gibco BRL**

amoniak 32% – **Merck**

Roti Aqua Phenol – **Carl Roth**

glikogen, roztwory 5'-trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dNTP) – **Thermo Scientific**

1.2 Enzymy

DNaza I – **Ambion**

Enzymy restrykcyjne EcoRI i PstI – **Promega**

Ligaza DNA T4 – **Thermo Scientific**

Polimeraza DNA Pfu Plus – **EURx**

RNazaA, trypsyna – **Sigma-Aldrich**

1.3 Plazmid

Plazmid pZsGreen-N1 – **Clontech**

1.4 Linia komórkowa

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

1.5 Gotowe zestawy do badań

Zestaw do oczyszczania DNA: PCR/DNA Clean-Up Purification Kit – **EURx**

Zestaw do transkrypcji *in vitro* T7-MEGAshortscript™ – **Ambion**

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA: Plasmid Midi Kit (25) – **QIAGEN**

Zestaw do odwrotnej transkrypcji: iScript™ cDNA Synthesis Kit – **BioRad**

Zestaw do reakcji ilościowego PCR: iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix – **BioRad**

1.6 Szczepy bakteryjne

Escherichia coli szczep DH5α – **Thermo Scientific**

1.7 Wzorce długości kwasów nukleinowych

Perfect Plus™ 50-500 bp DNA ladder, Perfect™ 100-1000 bp DNA ladder – **EURx**

1.8 Roztwory i bufor

Bufor TBE (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w żelu poliakrylamidowym i agarozowym, 10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy

10 mM Na₂EDTA; pH 8.3

Do rozdzielania elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym stosowano bufor 1x stężony, natomiast do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym stosowano bufor 0.5x stężony.

Bufor TAE (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, 10x stężony)

0.4 M Tris

0.4 M kwas octowy

10 mM Na₂EDTA; pH 8.3

Bufor obciążający (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w denaturującym żelu poliakrylamidowym, 2x stężony)

8 M mocznik

0.2% (w/v) błękit bromofenolowy

0.2% (w/v) cyjanol ksylenowy

0.2% (w/v) oranż G

Bufor obciążający (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, 10x stężony)

10 mM Tris-HCl, pH 7.0

35% (w/v) glicerol

0.2% (w/v) błękit bromofenolowy

0.2% (w/v) cyjanol ksylenowy

0.2% (w/v) oranż G

Bufor do topnienia UV i widm CD (używany dla trypleksów RNA)

100 mM KCl
20 mM kakodylan sodu
0.5 mM Na₂EDTA; pH 7.0

Bufor do topnienia UV, widm CD i widm FRET (bufor Robinson-Britton, używany dla dupleksów DNA i RNA)

40 mM kwas borowy
40 mM kwas fosforowy
40 mM kwas octowy
100 mM NaCl
0.2 mM Na₂EDTA; pH 5.0 i 7.0

Bufory do widm NMR (używane do pomiaru widm ¹H NMR dupleksów β-L-RNA)

Bufor I

150 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄
0.1 mM EDTA; pH 6.8

Bufor II

1 M NaCl
5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄
0.1 mM EDTA; pH 6.8

Bufory MES (używane do faldowania trypleksów RNA w testach EMSA)

100 mM NaCl
20 mM MES
0.5 mM Na₂EDTA; zakres pH od 5.0 do 7.0

Bufor A (używany do izolacji ekstraktów cytoplazmatycznych z komórek HeLa)

- 10 mM HEPES
- 10 mM KCl
- 0.1 mM Na₂EDTA
- 0.2 M PMSF
- 10% (v/v) Triton-X

PMSF, DTT i Triton-X dodawano bezpośrednio przed użyciem.

Bufor ALM1 (używany do lizy alkalicznej)

- 50 mM D-glukoza
- 10 mM Na₂EDTA
- 25 mM Tris-HCl, pH 8.0

Fenol wysycony octanem sodu (używany do izolacji całkowitego RNA)

- 50 % (v/v) uwodniony fenol
- 50 % (v/v) 100 mM octan sodu, pH 5.0

Mieszano w ciemnej butelce, przez 4 godziny w temperaturze 4°C, następnie usunięto fazę wodną do grubości ok. 0.5 cm. Dodano β-merkaptoetanolu do końcowego stężenia 20 % (v/v).

Trizol (używany do izolacji całkowitego RNA)

- 38 % (v/v) fenol wysycony 0.1 M octanem sodu
- 1 M tiocyjanian guanidyny
- 1 M tiocyjanian amonu
- 0.1 M octan sodu, pH 5.0
- 5 % (v/v) glicerol
- 5 mM EDTA
- 0.5 % (v/v) N-laurylosarkozynian sodu

EDTA i N-laurylosarkozynian sodu dodawano bezpośrednio przed użyciem.

1.9 Żele

Żele agarozowe

Roztwór agarozy 1% lub 1.5% w buforze 0.5x TBE podgrzewano w kuchence mikrofalowej, dodawano bromku etydyny do końcowego stężenia 7.5 µg/ml, wylewano do aparatu do elektroforezy, pozostawiano do zatężenia.

12% żel poliakrylamidowy (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w warunkach denaturujących)

12% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TBE

8 M mocznik

0.6% (w/v) APS

0.04% (v/v) TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

12% żel poliakrylamidowy (używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w warunkach niedenaturujących)

12% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TAE

0.6% (w/v) APS

0.04% (v/v) TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

1.10 Pożywki

Pożywka stała LB z kanamycyną

2.5 g pepton

1.25 g wyciąg drożdżowy

1.25 g NaCl

3.75 g agar

Dopełniano wodą do 250 ml i sterylizowano w autoklawie, po schłodzeniu do temperatury 55°C do otrzymanego roztworu dodawano roztworu kanamycyny do

stężenia końcowego 0.2 mg/ml. Pożywkę wylewano na płytki Petriego na stole z laminarnym przepływem powietrza.

Pożywka płynna LB

- 10 g pepton
- 5 g wyciąg drożdżowy
- 5 g NaCl

Dopełniano wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie.

Pożywka płynna LB z kanamycyną

Do płynnej pożywki LB dodawano roztworu kanamycyny do stężenia końcowego 0.2 mg/ml.

Roztwór wyjściowy kanamycyny: roztwór kanamycyny w wodzie 0.1 g/ml.

Pożywka hodowlana HeLa

- 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 (używana do mrożenia komórek)

- medium hodowlane RPMI 1640
- 50% FBS
- 10% DMSO

Pożywka hodowlana HeLa (używana po odmrażaniu komórek)

- 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 bez dodatku antybiotyków (używana do transfekcji komórek)

medium hodowlane RPMI 1640

10% FBS

1x roztwór witamin

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

Pożywka hodowlana HeLa (używana do testu aktywności metabolicznej komórek – test MTT)

medium hodowlane RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej

1x roztwór MTT

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

1.11 Oligonukleotydy

Oligodeoksyrybonukleotydy użyte jako startery w reakcjach PCR, jako startery w reakcjach sekwencjonowania oraz jako startery w reakcji qPCR

Nazwa	Długość	Sekwencja 5'-3'
StPra	48	TAGAGAGAGAAAGTTTCGACTTTCTCTCTCTACTGCAG ATATATAATA
StLew	68	TAGAGAGAGAAAGTCGAAACTTTCTCTCTCTACCCTAT AGTGAGTCGTATTAGAATTCATATATAATA
StFor	27	TAATACGACTCACTATAGGGTAGAGAG
StRev	22	TAGAGAGAGAAAGTCGAAACTT
StPz	14	GGGCGGTAGGCGTG
StAkt1	19	GCCAGCAGCCTCTGATCTG
StAkt2	21	CTGGTTCTTGCCAGCCTCTAG
StGfp1	22	GTACCACGAGTCCAAGTTCTAC
StGfp2	21	CCAGTTGTCGGTCATCTTCTT

Oligonukleotydy RNA

Nazwa	Długość	Sekwencja 5'-3'
RHP	32	UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA

MATERIALY I METODY

bRHP	32	U ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β A ^β A ^β G ^β U ^β U ^β U ^β C ^β G ^β A ^β C ^β U ^β U ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β A ^β
fRHP	32	5(6)-FAM- UAGAGAGAGAAAGUUUCGACUUUCUCUCUCUA
fbRHP	32	5(6)-FAM- U ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β A ^β A ^β G ^β U ^β U ^β U ^β C ^β G ^β A ^β C ^β U ^β U ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β A ^β
Ctr	12	AUCUGUCCACU
bTFO	12	U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β U ^β U ^β C ^β
TFOL1	12	UCUCUCU ^L CUUUC
TFOL2	12	UCUCU ^L CU ^L CUUUC
TFOL3	12	UCUCU ^L CU ^L CU ^L UUC
TFOL4	12	U ^L CUCU ^L CU ^L CU ^L UUC
TFOS1	12	UCUCUCs ² UCUUC
TFOS2	12	UCUCs ² UCs ² UCUUC
TFOS3	12	UCUCs ² UCs ² UCs ² UUUC
TFO1	12	s ² UC ^L UCs ² UC ^L s ² UCs ² UUUC ^L
TFO2	12	s ² UC ^L UCs ² UCs ² UC ^L s ² UUs ² UC ^L
TFO3	12	s ² UCUC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² UUUC ^L
TFO4	12	s ² UC ^L UC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² Us ² Us ² UC ^L
ftFO1	12	5(6)-FAM- s ² UC ^L UCs ² UC ^L s ² UCs ² UUUC ^L
ftFO2	12	5(6)-FAM- s ² UC ^L UCs ² UCs ² UC ^L s ² UUs ² UC ^L
ftFO3	12	5(6)-FAM- s ² UCUC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² UUUC ^L
ftFO4	12	5(6)-FAM- s ² UC ^L UC ^L s ² UC ^L s ² UC ^L s ² Us ² Us ² UC ^L
TFON1	12	UC ^L UCs ² UCUCs ² UUUC ^L
TFON2	12	s ² UC ^L UCUCUCs ² UUs ² UC ^L
TFON3	12	s ² UCUC ^L UCUC ^L s ² UUUC ^L
TFON4	12	UC ^L UC ^L s ² UCUCUUUC ^L
ftFON1	12	5(6)-FAM- UC ^L UCs ² UCUCs ² UUUC ^L

fTFON2	12	5(6)-FAM-s²UC^LUCUCUCs²UUs²UC^L
fTFON3	12	5(6)-FAM-s²UCUC^LUCUC^Ls²UUUC^L
fTFON4	12	5(6)-FAM-UC^LUC^Ls²UCUCUUUC^L
TFOP	12	neomycyna-TLTLTTTL
TFOLM	12	U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L
PuR	12	AGAAAGAGAAGA
fPuR	12	5(6)-FAM-AGAAAGAGAAGA
βPuR	12	A ^β G ^β A ^β A ^β A ^β G ^β A ^β G ^β A ^β A ^β G ^β A ^β
PyR	12	UCUUUCUCUUCU
βPyR	12	U ^β C ^β U ^β U ^β U ^β C ^β U ^β C ^β U ^β U ^β C ^β U ^β
tPyR	12	TAMRA-UCUUUCUCUUCU
PRL	12	UC ^L UUUC ^L UC ^L UUC ^L U
tPRL	12	TAMRA-UC^LUUUC^LUC^LUUC^LU
PuM	12	A ^M G ^M A ^M A ^M A ^M G ^M A ^M G ^M A ^M A ^M G ^M A ^M
fPuM	12	5(6)-FAM-A^MG^MA^MA^MA^MG^MA^MG^MA^MA^MG^MA^M
PyM	12	U ^M C ^M U ^M U ^M U ^M C ^M U ^M C ^M U ^M U ^M C ^M U ^M
tPyM	12	TAMRA-U^MC^MU^MU^MU^MC^MU^MC^MU^MU^MC^MU^M
PML	12	U ^M C ^L U ^M U ^M U ^M C ^L U ^M C ^L U ^M U ^M C ^L U ^M
tPML	12	TAMRA-U^MC^LU^MU^MU^MC^LU^MC^LU^MU^MC^LU^M

Oznaczenia: U^β, A^β, G^β, C^β – modyfikacje β-L-RNA; U^L, C^L – modyfikacje LNA; A^M, G^M, U^M i C^M – modyfikacje 2'-O-MeRNA; T – monomer tymidynowy w serii PNA; L – tiopseudoizocytosyna; s²U – 2-tiourydyna; **5(6)-FAM** – 5(6)-karboksyluoresceina; **TAMRA** – 5-karboksytetrametylodoramina.

Oligonukleotydy DNA

Nazwa	Długość	Sekwencja 5'-3'
PuD	12	AGAAAGAGAAGA
fPuD	12	5(6)-FAM-AGAAAGAGAAGA
PyD	12	TCTTTCTCTTCT
tPyD	12	TAMRA-TCTTTCTCTTCT

PDL	12	TC ^L TTTC ^L TC ^L TTC ^L T
tPDL	12	TAMRA -TC ^L TTTC ^L TC ^L TTC ^L T
Oznaczenia: C ^L – modyfikacja LNA; 5(6)-FAM – 5(6)-karboksylfluoresceina; TAMRA – 5-karboksytetrametylorodamina.		

1.12 Aparatura stosowana podczas prowadzenia badań

- automatyczny licznik komórek Automated Cell Counter TC20 Biorad
- blok grzejny Grant QBD2
- komputerowy skaner FLA-5100 (PhosphorImager) FujiFilm
- licznik scyntylicyjny płytkowy MicroBeta²™ 2450 Microplate Counter Perkin Elmer
- próżniowy koncentrator stołowy CentriVap Labconco
- spektrometr Bruker AVANCE III 700 MHz
- spektrofotometr UV-VIS Beckman DU-640 z termoprogramatorem
- spektrofotometr UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem
- spektrofotometr UV-VIS JASCO 815
- spektrometr FluoTime 300 EasyTau (PicoQuant)
- spektrometr masowy MALDI-TOF Bruker Autoflex
- spektrofotometr xMark™ Biorad
- syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation
- termocykler C1000 Bio-rad
- termocykler C-1000 Touch CFX96 Real-TimeSystem Bio-rad
- termowyrząsarka Comfort Eppendorf
- wirówka MiniSpin®Eppendorf
- wirówka 5430R Eppendorf
- zasilacz EV233 Consort

1.13 Programy stosowane podczas prowadzenia badań

- BioRad CFX Manager
- ChemSketch
- CorelDraw X7
- FluoFit Analysis (PicoQuant)

- MeltWin 3.5
- Mutli Gauge V3.0
- OriginPro 8.0
- Peak Scanner
- RNAstructure 5.6
- TopSpin 3.0 Bruker

1.14 Akcesoria dodatkowe

- kolumny Illustra NAP-25 columns – **GE Healthcare Life Sciences**
- kolumny zawierające silanizowane podłoże Sep-Pak (Sep-Pak cartridges) – **Waters**
- płytki silikażelowe 60 F₂₄₅ 0.25 mm (20 x 20 cm) – **Merck**
- naczynia hodowlane oraz sterylne końcówki do automatycznych pipet stosowane do hodowli linii komórkowej – **Greiner Bio-One**
- płytki 96 dołkowe do reakcji qPCR - **BioRad**
- parafilm, olej silikonowy – **Sigma-Aldrich**

2. Metody

2.1 Synteza chemiczna oligonukleotydów

Syntezę oligonukleotydów przeprowadzono metodą amidofosforynową na podłożu stałym za pomocą syntetyzera BioAutomation Corporation MerMade 12. Do syntezy wykorzystano handlowo dostępne amidofosforyny: DNA, RNA, 2'-O-metylo-RNA i 5(6)-FAM oraz aminolinker (ChemGenes). Amidofosforyny 2-tiourydyna oraz LNA zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Kwasów Nukleinowych IChB PAN.

2.2 Odblokowanie i oczyszczanie oligonukleotydów i oligonukleotydów zawierających nukleotydy w serii LNA lub 5(6)-FAM na końcu 5' oraz oligonukleotydów w serii 2'-O-MeRNA

Do podłoża zawierającego oligonukleotydy dodawano 1.5-3 ml 32% amoniaku. Następnie pozostawiono na 16 godzin w temperaturze 55°C. Po inkubacji próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie supernatant przenoszono do nowych probówek, a pozostałe podłoże przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody. Mieszaninę odparowywano do sucha, a otrzymany osad rozpuszczano w 0.2 ml lub 0.4 ml wody dla oligonukleotydów odpowiednio o długości do 15 nukleotydów (krótkie) lub o długości powyżej 15 nukleotydów (długie). Następnie oligonukleotydy krótkie oczyszczano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda (55/35/10 v/v/v). Natomiast oligonukleotydy długie oczyszczano poprzez rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm.

W przypadku oligonukleotydów krótkich, żel krzemionkowy z prążkami reprezentującymi kwasy nukleinowe o pożądanej długości zdrapywano z płytki i przenoszono do probówki. Silikażel zawierający kwasy nukleinowe przemywano trzykrotnie 3 ml wody, wirowano 2 minuty przy 1000 rpm i supernatant przenoszono do nowych probówek. Następnie połączone frakcje odparowywano do sucha. Osad rozpuszczano w 0.2 ml wody i przenoszono do probówek, dodatkowo probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 0.2 ml wody. Zebrane frakcje wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, a roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przemywano jeszcze 0.2 ml wody i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, następnie zbierano roztwór znad silikażelu i przenoszono go do probówek z wcześniej zebrany roztworem.

W przypadku oligonukleotydów długich, prążki zawierające kwasy nukleinowe o pożądanej długości wycinano z żelu, następnie eluowano z żelu 0.3 M octanem sodu przez 4-godzinne wytrząsanie przy 750 rpm w temperaturze 4°C (etap ten powtarzano trzykrotnie). Następnie supernatant zbierano, zalewano 2.5 objętościami 96% etanolu i strącano w temperaturze -20°C przez noc. Po inkubacji mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C, następnie osad oddzielono od supernatantu i wysuszono do sucha pod próżnią. Osad rozpuszczano w 0.5 ml wody.

Każdorazowo wykonano analizę masową związków za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF. Stężenie kwasów nukleinowych mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.3 Odblokowanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów oraz oligorybonukleotydów zawierających nukleotydy w serii LNA lub 5(6)-FAM na końcu 5'

Do podłoża zawierającego oligorybonukleotydy dodawano 1.5-3 ml 32% amoniaku oraz 0.5-1.5 ml 96% etanolu. Następnie pozostawiono na 16 godzin w temperaturze 55°C. Po inkubacji próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie supernatant przenoszono do nowych probówek, a pozostałe podłoże przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody. Mieszaninę odparowywano do sucha, a do otrzymanego osadu dodawano 30 μ l N,N'-dimetyloformamidu i 270 μ l fluorowodoru trietyloamoniowego. Inkubowano przez 2.5 godziny w temperaturze 55°C, co jakiś czas mieszając. Następnie do roztworu dodawano 4 ml n-butanolu i strącano 2 godziny w temperaturze -20°C. Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C, następnie supernatant oddzielano od osadu, a osad suszono do sucha pod próżnią. Oligorybonukleotydy o długości do 15 nukleotydów (krótkie) oraz o długości powyżej 15 nukleotydów (długie) odsalano przy użyciu kolumn odpowiednio Sep-Pak (Sep-Pak cartridges) oraz Sephadex G-25 (kolumny NAP-25).

W przypadku oligorybonukleotydów krótkich przed nałożeniem prób, kolumny Sep-Pak regenerowano przez przemywanie kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu, 10 ml 10 mM octanu amonu. Osad otrzymany po zwirowaniu rozpuszczano w 10 ml 10 mM octanu amonu i nakładano na przygotowaną kolumnę. Zebraną frakcję oznaczono, jako L, a kolumnę przemywano następnie 10 ml 10 mM octanu amonu. Drugą frakcję oznaczoną, jako W zebrano do nowej probówki. Następnie kolumnę przemywano 5 ml roztworu acetonitryl:woda (30%:70%, v/v), a trzecią frakcję oznaczoną jako C również zebrano do nowej probówki. Frakcję C, która zawierała oligorybonukleotydy odparowywano do sucha. Otrzymany osad rozpuszczano w 0.2 ml wody. Oligorybonukleotydy oczyszczano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda (55/35/10 v/v/v). Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm.

Silikażel z prążkami reprezentującymi kwasy nukleinowe o pożądanej długości zdrapywano z płytki i przenoszono do probówki. Silikażel zawierający kwasy nukleinowe przemywano trzykrotnie 3 ml wody, wirowano 2 minuty przy 1000 rpm i supernatant przenoszono do nowych probówek. Następnie połączone frakcje odparowywano do sucha. Osad rozpuszczano w 0.2 ml wody i przenoszono do probówek, dodatkowo probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 0.2 ml wody. Zebrane frakcje wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, a roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przemywano jeszcze 0.2 ml wody i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, następnie zbierano roztwór z nad silikażelu i przenoszono go do probówek z wcześniej zebrany roztworem.

W przypadku oligorybonukleotydów długich przed nałożeniem prób, kolumny NAP-25 przemywano 30 ml wody. Osad rozpuszczano w 1 ml wody i nakładano na przygotowaną kolumnę. Następnie zbierano 10 frakcji po 1.5 ml. Frakcje, które zawierały oligorybonukleotydy przenoszono do jednej probówki i odparowywano do sucha. Oligorybonukleotydy oczyszczano metodą rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm. Prążki zawierające kwasy nukleinowe o pożądanej długości wycinano z żelu, następnie eluowano z żelu 0.3 M octanem sodu przez 4-godzinne wytrząsanie przy 750 rpm w temperaturze 4°C (etap ten powtarzano trzykrotnie). Następnie supernatant zbierano, zalewano 2.5 objętościami 96% etanolu i strącano w temperaturze -20°C przez noc. Po inkubacji mieszaninę wirowano 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C, następnie osad oddzielono od supernatantu i wysuszono do sucha pod próżnią. Osad rozpuszczano w 0.5 ml wody.

Każdorazowo wykonano analizę masową związków za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF. Stężenie kwasów nukleinowych mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.4 Odblokowanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów zawierających reszty 2-tiourydyny

Do podłoża zawierającego oligorybonukleotydy dodawano 1.5 ml 32% amoniaku oraz 0.5 ml 96% etanolu. Następnie pozostawiono na 36 godzin w temperaturze pokojowej. Po inkubacji supernatant przenoszono do nowych probówek, a pozostałe

podłoże przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody. Mieszaninę odparowywano do sucha, a do otrzymanego osadu dodawano 30 μ l N,N'-dimetyloformamidu i 270 μ l fluorowodoru trietyloamoniowego. Inkubowano przez 2.5 godziny w temperaturze 55°C, co jakiś czas mieszając. Następnie do roztworu dodawano 4 ml n-butanolu i strącano 2 godziny w temperaturze -20°C. Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C, następnie supernatant oddzielano od osadu, a osad suszono do sucha pod próżnią. Oligorybonukleotydy odsalano przy użyciu kolumn Sep-Pak (Sep-Pak cartridges). Przed nałożeniem prób, kolumny Sep-Pak regenerowano przez przemywanie kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu, 10 ml 10 mM octanu amonu. Osad otrzymany po zwirowaniu rozpuszczano w 10 ml 10 mM octanu amonu i nakładano na przygotowaną kolumnę. Zebraną frakcję oznaczono, jako L, a kolumnę przemywano następnie 10 ml 10 mM octanu amonu. Drugą frakcję oznaczoną, jako W zebrano do nowej probówki. Następnie kolumnę przemywano 5 ml roztworu acetonitryl:woda (30%:70%, v/v) i trzecią frakcję oznaczoną jako C również zebrano do nowej probówki. Frakcję C, która zawierała oligorybonukleotydy odparowywano do sucha. Otrzymany osad rozpuszczano w 0.2 ml wody. Oligorybonukleotydy oczyszczano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda (55/35/10 v/v/v). Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm. Silikażel z prążkami reprezentującymi kwasy nukleinowe o pożądanej długości zdrapywano z płytki i przenoszono do probówki. Silikażel zawierający kwasy nukleinowe przemywano trzykrotnie 3 ml wody, wirowano 2 minuty przy 1000 rpm i supernatant przenoszono do nowych probówek. Następnie połączone frakcje odparowywano do sucha. Osad rozpuszczano w 0.2 ml wody i przenoszono do probówek, dodatkowo probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 0.2 ml wody. Zebrane frakcje wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, a roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przemywano jeszcze 0.2 ml wody i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, następnie zbierano roztwór nad silikażelu i przenoszono go do probówek z wcześniej zebrany roztworem.

Każdorazowo wykonano analizę masową związków za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF. Stężenie kwasów nukleinowych mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.5 Odblokowanie oligonukleotydów zawierających aminolinker na końcu 5'

W przypadku syntezy takich oligonukleotydów, grupę DMTr (grupę 4,4'-dimetoksytrytylową) pozostawiono na podłożu. Do podłoża zawierającego oligorybonukleotydy dodawano 1.5 ml 32% amoniaku oraz 0.5 ml 96% etanolu. Następnie pozostawiono na 16 godzin w temperaturze 55°C. Po inkubacji próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie supernatant przenoszono do nowych probówek, a pozostałe podłoże przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody. Mieszaninę odparowywano do sucha, a do otrzymanego osadu dodawano 30 µl N,N'-dimetyloformamidu i 270µl fluorowodoru trietyloamoniowego. Inkubowano przez 2.5 godziny w temperaturze 55°C, co jakiś czas mieszając. Następnie do roztworu dodawano 4 ml n-butanolu i strącano 2 godziny w temperaturze -20°C. Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C, następnie supernatant oddzielano od osadu, a osad suszono do sucha pod próżnią.

Do podłoża zawierającego oligodeoksyrybonukleotydy dodawano 1.5 ml 32% amoniaku. Następnie pozostawiono na 16 godzin w temperaturze 55°C. Po inkubacji próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie supernatant przenoszono do nowych probówek, a pozostałe podłoże przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody. Mieszaninę odparowywano do sucha pod próżnią.

Następnie do osadu dodawano 0.9 ml 80% kwasu octowego i inkubowano 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji odparowano kwas octowy, a osad przemywano dwukrotnie 0.5 ml wody w celu pozbycia się pozostałości kwasu octowego. Zebrany roztwór odparowano do sucha, a osad rozpuszczono w 0.2 ml wody. Do przygotowanego roztworu oligonukleotydów dodawano kroplami 1% nadchloran sodu w acetonie do czasu wytrącenia się osadu. Następnie całą zawartość próbówki małymi porcjami przenoszono do nowej próbówki zawierającej 10 ml 1% nadchloranu sodu w acetonie i umieszczonej nad mieszadłem magnetycznym. Mieszaninę wirowano przez 30 minut przy 7000 rpm w temperaturze 4°C. Zlewano roztwór z nad osadu, a osad przemywano dwukrotnie 3 ml schłodzonego acetonu. Następnie osad suszono do sucha pod próżnią. Osad rozpuszczano w 0.5 ml wody. Stężenie kwasów nukleinowych mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.6 Znakowanie oligonukleotydów zawierających aminolinker na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym TAMRA oraz ich oczyszczanie

Do znakowania barwnikiem fluorescencyjnym TAMRA wykorzystano 300 µg odblokowanych oligonukleotydów zawierających aminolinker na 5' końcu. Oligonukleotydy rozpuszczono w mieszaninie zawierającej 75 µl buforu do znakowania, 11 µl wody oraz 14 µl barwnika TAMRA (rozpuszczonego w bezwodnym DMSO). Roztwór wytrząsano przy 300 rpm w temperaturze 22°C przez noc. Po inkubacji do roztworu dodawano 100 µl wody, 10 µl 3 M octanu sodu oraz 350 µl 96% etanolu, a następnie strącano w temperaturze -20°C przez noc. Mieszaninę wirowano przez 30 minut przy 10 000 rpm w temperaturze 4°C, następnie supernatant oddzielano od osadu, a osad suszono do sucha pod próżnią. Otrzymany osad rozpuszczano w 0.2 ml wody. Krótkie znakowane oligonukleotydy oczyszczano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda (55/35/10 v/v/v). Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm. Silikażel z prążkami reprezentującymi kwasy nukleinowe o pożądanej długości zdrapywano z płytki i przenoszono do probówki. Silikażel zawierający kwasy nukleinowe przemywano trzykrotnie 3 ml wody, wirowano 2 minuty przy 1000 rpm i supernatant przenoszono do nowych probówek. Następnie połączone frakcje odparowywano do sucha. Osad rozpuszczano w 0.2 ml wody i przenoszono do probówek, dodatkowo probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 0.2 ml wody. Zebrane frakcje wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, a roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przemywano jeszcze 0.2 ml wody i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, następnie zbierano roztwór znad silikażelu i przenoszono go do probówek z wcześniej zebrany roztworem. Wszystkie powyżej opisane czynności wykonywano przy ograniczonym dostępie światła.

Każdorazowo wykonano analizę masową związków za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF. Stężenie kwasów nukleinowych mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

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

Oczyszczanie oligonukleotydów syntetyzowanych chemicznie wykonano z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Używano żelu poliakrylamidowego o grubości 1 mm 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. Do rozdziału stosowano bufor elektroforetyczny 1x TBE. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 35-40 W w temperaturze pokojowej. Przed każdym rozdzielaniem elektroforetycznym prowadzono 15-30 minutową preelektroforezę. Próbkę przed nałożeniem na żel rozcieńczano w stosunku 1:2 v/v buforem obciążającym i inkubowano 3 minuty w temperaturze 95°C, a następnie chłodzono 1 minutę na lodzie.

2.8 Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących wykorzystano do badania specyficzności oddziaływania oligomeru TFO i spinki RNA oraz do wyznaczenia stałej dysocjacji trypleksów RNA. Używano żelu poliakrylamidowego o grubości 1 mm i usieciowieniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu). Żel wylewano pomiędzy szklane płyty o rozmiarze 42 x 33 cm oraz 39.5 x 33 cm. Do rozdziału stosowano bufor elektroforetyczny 1x TAE. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 15-20 W przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Przed każdym rozdzielaniem elektroforetycznym prowadzono 15-30 minutową preelektroforezę. Do próbek dodawano buforu obciążającego i nakładano na żel. Po zakończeniu elektroforezy obraz na żelu wizualizowano używając komputerowego skanera materiałów znakowanych fluorescencyjnie (PhosphorImager, FLA-5100).

2.9 Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Produkty reakcji PCR poddawano analizie metodą elektroforezy w 1% lub 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (7.5 µg/ml) w warunkach natywnych. Do próbek dodawano bufor obciążający oraz nakładano na żel. Rozdział

elektroforetyczny prowadzono w buforze 0.5x TBE przy natężeniu 40-50 mA i napięciu 120-130 V. Po zakończeniu elektroforezy produkty wizualizowano w świetle UV.

Ponadto, rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym został również wykorzystany w celu sprawdzenia jakości całkowitego RNA wyizolowanego z komórek HeLa.

2.10 Pomiar trwałości termodynamicznej badanych oligonukleotydów z użyciem metody topnienia UV

Pomiary trwałości termodynamicznej oligonukleotydów wykonano przy użyciu spektrofotometru Beckam Du-640 lub UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem. Określone ilości oligonukleotydu odparowywano do sucha i rozpuszczano w buforze do topień. Przed pomiarem próbki podgrzewano przez 3 minuty w 95°C, a następnie powoli schładzano przez noc do temperatury pokojowej. Pomiary wykonywano dla każdego oligomeru w dziewięciu różnych stężeniach, w zakresie od 10⁻³ do 10⁻⁶ M w świetle UV przy długości fali 260 nm. Pomiary trwałości termodynamicznej prowadzono w zakresie temperatury od 4°C do 90°C z szybkością zmiany temperatury wynoszącą 0.5°C/minutę. Wartość absorbancji próbek była mierzona, co 0.5 minuty. Otrzymane wyniki poddawano dalszej analizie w programie MeltWin 3.5.

2.11 Pomiar widm dichroizmu kołowego

Pomiary widm dichroizmu kołowego badanych oligonukleotydów wykonano z zastosowaniem spektrofotometru JASCO 815. Określone ilości oligonukleotydów odparowywano do sucha i rozpuszczano w 1 ml tego samego buforu, którego używano do topień UV. Przed pomiarem próbki podgrzewano przez 3 minuty w 95°C, a następnie powoli schładzano przez noc do temperatury pokojowej. Pomiary widm CD przeprowadzono w temperaturze 10°C w zakresie długości fali 210-320 nm przy drodze optycznej 0.5 cm. Pomiary wykonywano trzykrotnie z szybkością pomiaru wynoszącą 50 nm/minutę. Otrzymane wyniki z trzech pomiarów widm CD dla każdego oligonukleotydu zostały uśrednione i poddane dalszej analizie w programie OriginPro 8.0.

2.12 Pomiar widm fluorescencyjnych

Pomiary widm fluorescencyjnych (stacjonarne oraz czasowo-rozdzielcze) badanych oligonukleotydów wykonano z zastosowaniem spektrometru FluoTime 300 EasyTau (PicoQuant). Przygotowano mieszaninę dwóch oligomerów znakowanego 5(6)-FAM na końcu 5' i znakowanego TAMRA na końcu 5' w stosunku równomolowym 1:1, każdy o stężeniu 4.4 μM . Następnie odparowywano do sucha i rozpuszczano w tym samym buforze, którego używano do topnienia UV. Przed pomiarem próbki podgrzewano przez 3 minuty w 95°C, a następnie powoli schładzano przez noc do temperatury pokojowej.

Pomiary stacjonarne widm fluorescencyjnych (intensywność fluorescencji) przeprowadzano w temperaturze 10°C w zakresie długości fali 450-650 nm z szerokością spektralną 1.5 nm. Uzyskane w wyniku pomiarów krzywe fluorescencji analizowano przy użyciu programów FluoFit Analysis (PicoQuant) i OriginPro 8.0.

Natomiast pomiary czasowo-rozdzielcze widm fluorescencyjnych (czas życia fluorescencji) wykonywano w temperaturze 10°C przy wzbudzeniu przy długości fali 440 nm. Pomiary te przeprowadzono wykorzystując metodę zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo (TCSPC, ang. *time correlated single photon counting*). Otrzymane dane z pomiarów analizowano przy użyciu programu FluoFit Analysis (PicoQuant).

Pomiary stacjonarne widm fluorescencyjnych dupleksów DNA i RNA w ekstraktach komórkowych wykonywano analogicznie jak opisano powyżej. Do przygotowanej mieszaniny dwóch oligomerów (każdy o stężeniu 4.4 μM) bezpośrednio przed pomiarem dodawano ekstrakt komórkowy. Stosunek molowy ekstrakt:oligomer wynosił 9:1.

2.13 Pomiar widm magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR)

Pomiary jednowymiarowych widm ^1H NMR wykonywano z zastosowaniem spektrometru Bruker AVANCE III 700 MHz przy użyciu głowicy kriogenicznej (ang. *Cryo Probe*) wyposażonej w cewki ^1H - ^{31}P / ^{13}C / ^{15}N /D. Kalibrację przesunięć chemicznych ^1H NMR wykonywano względem deuterowanego 2-(trimetylosililo)propionianu sodu (TSP). Określone ilości oligonukleotydów odparowywano do sucha i rozpuszczano w buforze do pomiarów widm NMR. Przed pomiarem próbki podgrzewano przez 5 minuty w 90°C, a następnie powoli schładzano

przez noc do temperatury pokojowej. Pomiary widm NMR przeprowadzono w mieszaninie H₂O/D₂O 9:1 (v/v) przy szerokości spektralnej 16 ppm z wykorzystaniem 3 mm cienkościennych rurek o końcowej objętości próbki 200 µl. Jednowymiarowe widma ¹H NMR rejestrowano w temperaturze 10°C, natomiast zależność widm ¹H NMR od temperatury wykonywano w dwóch zakresach temperatur: od 10° do 35°C oraz od 10°C do 45°C. Resztkowy sygnał wody usuwano za pomocą naświetlania małą mocą, metodą presaturacji. Otrzymane wyniki poddawano analizie w programie TopSpin 3.0 Bruker. Wszystkie pomiary widm NMR wykonano w Pracowni Biomolekularnego NMR IChB PAN.

2.14 Badanie zdolności wiązania się oligorybonukleotydów TFO do spinki RNA

Zdolność oddziaływania oligomeru TFO i spinki RNA określono z zastosowaniem rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała oligonukleotyd znakowany 5(6)-FAM na końcu 5' (spinka RNA) i oligomer TFO w stosunku równomolowym 1:1, każdy o stężeniu 5 µM rozpuszczone w 10 µl buforu MES o pH równym: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 lub 7.0. Mieszaninę podgrzewano przez 3 minuty w temperaturze 95°C, następnie powoli schładzano przez noc do temperatury pokojowej. Po inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 µl 35% glicerolu i наносono na żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy mocy prądu 15 W przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu elektroforezy obraz na żelu wizualizowano używając komputerowego skanera materiałów znakowanych fluorescencyjnie (PhosphorImager, FLA-5100).

2.15 Pomiar stałej dysocjacji oligomer TFO – spinka RNA

Wyznaczanie stałej dysocjacji oligomer TFO–spinka RNA wykonywano z zastosowaniem rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących oraz wizualizacji i analizy ilościowej otrzymanych obrazów na żelu.

Przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała 1 µM oligonukleotydu znakowanego 5(6)-FAM na końcu 5' (spinka RNA) oraz oligomer TFO o stężeniach z zakresu od 10⁻⁶ do 1.2x10⁻⁴ M rozpuszczone w 10 µl buforu MES o pH 7.0. Mieszaninę

podgrzewano przez 3 minuty w temperaturze 95°C, następnie powoli schładzano przez noc do temperatury pokojowej. Po inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 µl 35% glicerolu i nanoszono na żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy mocy prądu 15 W przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu elektroforezy obraz na żelu wizualizowano używając komputerowego skanera materiałów znakowanych fluorescencyjnie (PhosphorImager, FLA-5100). Analizę ilościową przeprowadzono z użyciem dwóch programów Multi Gauge V3.0 i OriginPro 8.0, określając procentowy udział spinki RNA i trypleksu (spinka RNA/TFO) w zależności od stężenia TFO. Uzyskane dane posłużyły do wyznaczenia stałej dysocjacji oligomer TFO – spinka RNA.

2.16 Konstrukcja insertów

W celu amplifikacji insertów – fragmentów zawierających sekwencję spinki RNA, promotor dla polimerazy T7 RNA i miejsca restrykcyjne dla EcoRI i PstI wykonano dwie reakcje PCR (reakcja PCR I i reakcja PCR II). Obie reakcje PCR wykonano z użyciem handlowo dostępnego enzymu polimerazy DNA Pfu Plus w objętości 50 µl. Mieszanina reakcyjna do reakcji PCR I zawierała 0.2 µg każdego ze starterów StPra i StLew, 5 µl mieszaniny czterech dNTP o stężeniu końcowym 2.5 µM, 10 µl buforu dostarczonego wraz z enzymem oraz 1 µl polimerazy DNA Pfu Plus. Przygotowaną mieszaninę reakcyjną wykorzystano do reakcji PCR I.

Warunki reakcji PCR I był następujące:

wstępna denaturacja	2 minuty 95°C
12 cykli obejmujących:	
denaturacja	1 minuta 95°C
przyłączanie starterów	30 sekund 55°C
synteza	2 minuty 72°C
synteza końcowa	7 minut 72°C

Produkty reakcji PCR I oczyszczano za pomocą handlowo dostępnego zestawu odczynników PCR/DNA Clean-Up Purification Kit. Oczyszczone DNA rozpuszczano w wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C.

Produkt reakcji PCR I posłużył następnie, jako matryca w reakcji PCR II. Mieszanina reakcji PCR II zawierała 1 µl matrycy, po 100 pmoli starterów StFor i StRev, 5 µl mieszaniny czterech dNTP o stężeniu końcowym 2.5 µM, 10 µl buforu

dostarczonego wraz z enzymem oraz 1 μ l polimerazy DNA Pfu Plus. Przygotowaną mieszaninę reakcyjną wykorzystano do reakcji PCR I.

Warunki reakcji PCR II był następujące:

wstępna denaturacja	2 minuty 95°C
30 cykli obejmujących:	
denaturacja	1 minuta 95°C
przyłączanie starterów	30 sekund 55°C
synteza	2 minuty 72°C
synteza końcowa	7 minut 72°C

Produkty reakcji PCR II oczyszczano za pomocą handlowo dostępnego zestawu odczynników PCR/DNA Clean-Up Purification Kit. Oczyszczone DNA rozpuszczano w wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA otrzymane w reakcjach PCR I i II analizowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.

2.17 Trawienie restrykcyjne

Produkt reakcji PCR II i plazmid pZsGreen-N1 poddano reakcji trawienia restrykcyjnego z wykorzystaniem handlowo dostępnych enzymów EcoRI i PstI. Reakcję trawienia przeprowadzono z użyciem jednego buforu dla obu enzymów w objętości 100 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 2 μ g produktu reakcji PCR II lub plazmidu pZsGreen-N1, po 5 μ l enzymów EcoRI i PstI i 10 μ l buforu dostarczonego wraz z enzymami. Mieszaninę inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°. Po inkubacji próby oczyszczano za pomocą handlowo dostępnego zestawu PCR/DNA Clean-Up Purification Kit. Oczyszczone DNA rozpuszczano w wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych badań. Produkt trawienia restrykcyjnego analizowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.

2.18 Ligacja

W reakcji ligacji wykorzystano produkty trawienia restrykcyjnego. Reakcję ligacji przeprowadzono z użyciem handlowo dostępnego enzymu ligazy DNA T4 w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała ligowany insert i plazmid pZsGreen-N1 w stosunku molowym 3:1, 1 μ l ligazy DNA T4, 10 μ l buforu dostarczonego wraz z

enzymem oraz wody do objętości 10 μ l. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 4°C przez noc.

2.19 Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α

Transformację komórek kompetentnych przeprowadzono za pomocą metody szoku termicznego. Zawiesinę komórek *E. coli* DH5 α w objętości 50 μ l rozmrażano przez 15 minut w lodzie. Następnie do zawiesiny komórkowej dodawano 5 μ l produktu reakcji ligacji i inkubowano przez 45 minut w lodzie. Po inkubacji mieszaninę ogrzewano przez 45 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na lód i inkubowano przez 2 minuty. Do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i otrzymaną mieszaninę wytrząsano przy 300 rpm przez 45 minut w temperaturze 37°C. Następnie 200-400 μ l mieszaniny wylewano i rozprowadzano bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB z dodatkiem kanamycyny. Inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C.

2.20 Izolacja plazmidów zawierających insert

Do izolacji plazmidów zawierających insert wykorzystano kolonie wyrosłe na szalkach po transformacji komórek *E. coli* DH5 α . Izolacja obejmowała kilka etapów. Na początku do 2 ml płynnej pożywki LB z kanamycyną dodawano pojedynczą kolonię bakteryjną i wytrząsano przy 300 rpm przez noc w temperaturze 37°C. Następnego dnia całość zawiesiny (2 ml) wirowano przez 1 minutę przy 10 000 rpm, zlewano supernatant, a osad rozpuszczano w 100 μ l buforu ALM1 do lizy alkalicznej i wytrząsano przy 1000 rpm przez 5 minut. Próby umieszczano na lodzie i dodawano do każdej po 200 μ l przygotowanego na świeżo roztworu 1% SDS i 0.2 M NaOH, całość delikatnie mieszano przez 5 minut. Następnie dodawano 150 μ l 7.5 M octanu amonu i inkubowano przez 20 minut na lodzie. Po inkubacji próby wirowano przy 11 000 przez 15 minut w temperaturze pokojowej, zbierano supernatant do nowych probówek. Do każdej próby dodawano 3 objętości zimnego 96% etanolu i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próby wirowano przy 11 000 rpm przez 15 minut, zlewano supernatant, a osad suszono. Otrzymany osad rozpuszczano w wodzie z dodatkiem RNazy A (stężenie końcowe 0.01 ng/ μ l). Obecność insertu w konstrukcji plazmidowym sprawdzano w reakcji trawienia enzymami EcoRI i PstI i rozdział

elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Próby zawierające insert analizowano w reakcji sekwencjonowania ze starterem StPz przeprowadzanych w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu.

2.21 Rozmrażanie komórek HeLa

Zamrożone komórki HeLa odmrażano w wodzie o temperaturze 37°C i całość przenoszono do butelki hodowlanej T-75 o pojemności 75 cm³. Następnie dodawano 10 ml pożywki hodowlanej do rozmrażania. Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji wykonywano pasaż do nowej butelki. Wszystkie prace z komórkami HeLa przeprowadzano w sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem powietrza.

2.22 Hodowla komórek HeLa

Linia komórkowa HeLa hodowana była w pożywce hodowlanej HeLa w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności 100%. Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90% przeprowadzano pasaż komórek do nowej butelki, gdzie redukowano liczbę komórek o 10 razy. Pasaż wykonywano usuwając pożywkę hodowlaną z butelki, następnie przemywając sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny (1x) i inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej. Zawiesiną komórek przenoszono do 15 ml probówki, komórki rozbijano energicznie pipetując i 1/10 objętości zawiesiny przenoszono do nowej butelki hodowlanej. Dodawano 9 ml pożywki hodowlanej i butelkę umieszczano w inkubatorze.

2.23 Pasaż komórek HeLa na płytkę 24 dołkową

Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90%, usuwano pożywkę z butelki, komórki przemywano sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny (1x) i inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej. Zawiesiną komórek przenoszono do 15 ml probówki i wirowano 3 minuty przy 1000 rpm, następnie

usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki zawieszano w 5 ml pożywki hodowlanej. Komórki liczone przy użyciu automatycznego licznika komórek i 100 000 komórek HeLa przenoszono do jednego dołka płytki 24 dołkowej, do każdego dołka dodawano 500 μ l pożywki hodowlanej. Płytkę hodowlaną umieszczano na 24 godziny w inkubatorze.

Pasaż komórek HeLa na płytkę 96 dołkową wykonywano analogicznie jak opisano powyżej. Ilość komórek HeLa pasażowanych do jednego dołka płytki 96 dołkowej wynosiła 5000 i do każdego dołka dodawano 100 μ l pożywki hodowlanej.

2.24 Transfekcja komórek HeLa

Transfekcję komórek HeLa przeprowadzano wykorzystując odczynnik transfekujący lipofektaminę 2000. Do transfekcji jednego dołka płytki 24 dołkowej przygotowywano trzy mieszaniny: (I) pierwsza zawierająca 2 μ l lipofektaminy z 50 μ l pożywki OptiMEM, (II) druga zawierająca 1 μ g plazmidu pZsGreen-N1 z 50 μ l pożywki OptiMEM oraz (III) trzecia zawierająca 1 μ g plazmidu pZsGreen-N1 i 3 μ M oligonukleotydu TFO z 50 μ l pożywki OptiMEM, które następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaniny I i II oraz I i III łączono razem i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Do transfekcji wykorzystywano przygotowaną dzień wcześniej płytkę 24 dołkową. Z płytki usuwano pożywkę hodowlaną, przemywano dołki sterylnym buforem PBS, a następnie do każdego dołka dodawano 400 μ l pożywki hodowlanej bez antybiotyku używanej do transfekcji oraz 100 μ l mieszaniny plazmidu pZsGreen-N1 z lipofektaminą lub mieszaniny plazmidu pZsGreen-N1 i oligonukleotydu TFO z lipofektaminą. Płytkę 24 dołkową umieszczano na 24 godziny w inkubatorze i wykonywano izolację całkowitego RNA z każdego dołka płytki hodowlanej.

2.25 Mrożenie komórek HeLa

Mrożenie (bankowanie) komórek HeLa przeprowadzano we wczesnym pasażu (2-3 pasaż). Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90%, usuwano pożywkę z butelki, komórki przemywano sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny (1x) i inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej. Zawiesiną komórek

przenoszono do 15 ml probówki i wirowano 3 minuty przy 1000 rpm, następnie usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki zawieszano w 10 ml pożywki hodowlanej do mrożenia. Następnie po 1 ml zawiesiny komórkowej przenoszono do krioprobówek i umieszczano w łaźni izopropanolowej i przechowywano przez 24-48 godzin w temperaturze -80°C . Po inkubacji zamrożone komórki przenoszono do dewarów z ciekłym azotem, gdzie przechowywano je do czasu ponownego użycia.

2.26 Izolacja ekstraktów cytoplazmatycznych z komórek HeLa

Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90%, usuwano pożywkę z butelki, komórki przemywano sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny (1x) i inkubowano przez 2 minuty w 37°C . Trypsynę inaktywowano przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej. Zawiesiną komórek przenoszono do 15 ml probówki i wirowano 3 minuty przy 1000 rpm, następnie usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki zawieszano w 5 ml pożywki hodowlanej. Komórki liczone przy użyciu automatycznego licznika komórek i 50 000 komórek HeLa przenoszono do oddzielnych probówek. Następnie wirowano 3 minuty przy 1000 rpm, zlewano supernatant, a osad komórkowy przenoszono na lód. Do osadu dodawano 900 μl buforu do izolacji ekstraktów komórkowych, inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano 3 minuty przy 11000 rpm w temperaturze 4°C . Supernatant (ekstrakt cytoplazmatyczny) przenoszono do nowych probówek, zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C .

2.27 Izolacja całkowitego RNA z komórek HeLa

Z płytki 24 dołkowej usuwano pożywkę hodowlaną i każdy dołek przemywano sterylnym buforem PBS. Następnie każdy dołek zalewano 500 μl Trizolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji całość przenoszono do probówek 1.5 ml, dodawano 100 μl chloroformu, mieszano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Potem wirowano przez 15 minut przy 11 000 rpm w temperaturze 4°C . Kolejno zbierano fazę wodną do nowych probówek i zalewano 250 μl izopropanolu, inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano przez 25 minut przy 11 000 rpm w temperaturze 4°C , zlewano supernatant. Osad przemywano 500 μl zimnego 75% etanolu, wirowano przez 10 minut przy 11 000 rpm w temperaturze 4°C ,

suszono. Wyizolowane RNA rozpuszczano w 30 μ l sterylnej wody i inkubowano 10 minut w 55°C, próby przechowywano w temperaturze -20°C. Każdorazowo jakość wyizolowanego RNA sprawdzano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym.

2.28 Analiza ilościowa poziomu ekspresji genu *GFP* w oparciu o reakcje qPCR

W pierwszym etapie analizy wykonywano reakcję DNazowania wyizolowanych próbek RNA. W tym celu do 500 ng RNA dodawano 1 μ l handlowo dostępnego buforu, 2 U DNazy I i wody do objętości 10 μ l. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie reakcję zatrzymywano przez dodanie 1 μ l 25 mM Na₂EDTA i inkubację 10 minut w 75°C.

W następnym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji, w której jako matrycę wykorzystywano całkowite RNA wyizolowane z komórek HeLa po reakcji DNazowania. Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonywano przy użyciu handlowo dostępnego zestawu odczynników iScript™ cDNA Synthesis Kit w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 100 ng RNA po reakcji DNazowania, 2 μ l iScript™ cDNA Synthesis Kit i wodę do objętości 10 μ l.

Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji były następujące:

inkubacja	5 minut 25°C
synteza	30 minut 42°C
denaturacja	5 minut 85°C

Otrzymane produkty w reakcji odwrotnej transkrypcji służyły, jako matryce w reakcji ilościowego PCR (qPCR).

Reakcję qPCR wykonywano przy użyciu handlowo dostępnego zestawu odczynników iTaq Universal SYBR Green Supermix w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 1 μ l cDNA (produktu reakcji odwrotnej transkrypcji), po 3 μ l każdego ze starterów StAkt1 i StAkt2 lub StGfp1 i StGfp2 (każdy o stężeniu 10 pmoli), 2 μ l iTaq Universal SYBR Green Supermix i wodę do objętości 10 μ l.

Warunki reakcji qPCR były następujące:

wstępna denaturacja	5 minut 95°C
40 cykli obejmujących:	
denaturacja	10 sekund 95°C

przyłączenie starterów

i wydłużanie 45 sekund 60°C

pomiar krzywych topnienia 0.5°C/min 60-90°C

Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu BioRad CFX Manager.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Sachidanandam, D. Weissman, S.C. Schmidt, J.M. Kakol, L.D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J.C. Mullikin, B.J. Mortimore, D.L. Willey, S.E. Hunt, C.G. Cole, P.C. Coggill, C.M. Rice, Z. Ning, J. Rogers, D.R. Bentley, P.Y. Kwok, E.R. Mardis, R.T. Yeh, B. Schultz, L. Cook, R. Davenport, M. Dante, L. Fulton, L. Hillier, R.H. Waterston, J.D. McPherson, B. Gilman, S. Schaffner, W.J. Van Etten, D. Reich, J. Higgins, M.J. Daly, B. Blumenstiel, J. Baldwin, N. Stange-Thomann, M.C. Zody, L. Linton, E.S. Lander, D. Altshuler, S.N.P.M.W.G. International, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature* 409 (2001) 928-933.
- [2] K. Bąkowska-Żywiecka, A. Tyczewska, T. Twardowski, Choroby cywilizacyjne – terapeutyczne zastosowania strategii antysensu, *Nauka* 1 (2008) 45-46.
- [3] B.M. Paterson, B.E. Roberts, E.L. Kuff, Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 4370-4374.
- [4] P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978) 280-284.
- [5] L. Vidal, S. Blagden, G. Attard, J. de Bono, Making sense of antisense, *Eur J Cancer* 41 (2005) 2812-2818.
- [6] Y. Maegawa, S. Mochizuki, N. Miyamoto, K. Sakurai, Gene silencing using a conjugate comprising Tat peptide and antisense oligonucleotide with phosphorothioate backbones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26 (2016) 1276-1278.
- [7] P.S. Miller, Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents, *Biotechnology* 9 (1991) 358-362.
- [8] V. Rait, B.R. Shaw, Boranophosphates support the RNase H cleavage of polyribonucleotides, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 9 (1999) 53-60.
- [9] M. Faria, D.G. Spiller, C. Dubertret, J.S. Nelson, M.R. White, D. Scherman, C. Hélène, C. Giovannangeli, Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo, *Nature Biotechnology* 19 (2001) 40-44.
- [10] L. Shen, J.A. Engelhardt, G. Hung, J. Yee, R. Kikkawa, J. Matson, B. Tayefeh, T. Machemer, P.C. Giclas, S.P. Henry, Effects of Repeated Complement Activation Associated with Chronic Treatment of Cynomolgus Monkeys with 2'-O-Methoxyethyl Modified Antisense Oligonucleotide, *Nucleic Acid Ther* 26 (2016) 236-249.
- [11] T. Yamamoto, S. Obika, M. Nakatani, H. Yasuhara, F. Wada, E. Shibata, M.A. Shibata, M. Harada-Shiba, Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma, *Eur J Pharmacol* 723 (2014) 353-359.
- [12] J.P. Leonetti, P. Machy, G. Degols, B. Lebleu, L. Leserman, Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2448-2451.
- [13] W.M. Pardridge, R.J. Boado, Enhanced cellular uptake of biotinylated antisense oligonucleotide or peptide mediated by avidin, a cationic protein, *FEBS Lett* 288 (1991) 30-32.
- [14] S. Wada, H. Yasuhara, F. Wada, M. Sawamura, R. Waki, T. Yamamoto, M. Harada-Shiba, S. Obika, Evaluation of the effects of chemically different linkers on hepatic accumulations, cell tropism and gene silencing ability of cholesterol-conjugated antisense oligonucleotides, *J Control Release* 226 (2016) 57-65.
- [15] K. Stec-Michalska, Strategia antysensowych oligonukleotydów – aktualny stan zaawansowania badań klinicznych w wybranych schorzeniach nowotworowych, *Współczesna Onkologia* 4 (2000) 279-284.

- [16] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, T.R. Cech, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*, *Cell* 31 (1982) 147-157.
- [17] S. Altman, Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA, *Biosci Rep* 10 (1990) 317-337.
- [18] R.R. Breaker, G.F. Joyce, A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chem Biol* 1 (1994) 223-229.
- [19] A. Peracchi, Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes, *Rev Med Virol* 14 (2004) 47-64.
- [20] T. Sampson, Aptamers and SELEX: the technology, *World Patent Information* 25 (2003) 123-129.
- [21] D.A. Baum, S.K. Silverman, Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo, *Cell Mol Life Sci* 65 (2008) 2156-2174.
- [22] I.M. Hafez, N. Maurer, P.R. Cullis, On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids, *Gene Ther* 8 (2001) 1188-1196.
- [23] M. Fukuda, K. Kurihara, Y. Tanaka, M. Deshimaru, A strategy for developing a hammerhead ribozyme for selective RNA cleavage depending on substitutional RNA editing, *RNA* 18 (2012) 1735-1744.
- [24] Y. Lian, M.B. De Young, A. Siwkowski, A. Hampel, J. Rappaport, The sCYMV1 hairpin ribozyme: targeting rules and cleavage of heterologous RNA, *Gene Ther* 6 (1999) 1114-1119.
- [25] J. Bartolomé, I. Castillo, V. Carreño, Ribozymes as antiviral agents, *Minerva Medica* 95 (2004) 11-24.
- [26] N. Sakamoto, C.H. Wu, G.Y. Wu, Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes, *J Clin Invest* 98 (1996) 2720-2728.
- [27] M.V. Levesque, D. Levesque, F.P. Briere, J.P. Perreault, Investigating a new generation of ribozymes in order to target HCV, *PLoS One* 5 (2010) e9627.
- [28] X.B. Zhang, R.M. Kong, Y. Lu, Metal ion sensors based on DNAzymes and related DNA molecules, *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 4 (2011) 105-128.
- [29] L. Freage, F. Wang, R. Orbach, I. Willner, Multiplexed analysis of genes and of metal ions using enzyme/DNAzyme amplification machineries, *Anal Chem* 86 (2014) 11326-11333.
- [30] J. Liu, A.K. Brown, X. Meng, D.M. Crokek, J.D. Istok, D.B. Watson, Y. Lu, A catalytic beacon sensor for uranium with parts-per-trillion sensitivity and millionfold selectivity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 2056-2061.
- [31] J. Liu, Y. Lu, A DNAzyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu²⁺ ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity, *J Am Chem Soc* 129 (2007) 9838-9839.
- [32] M. Hollenstein, C. Hipolito, C. Lam, D. Dietrich, D.M. Perrin, A highly selective DNAzyme sensor for mercuric ions, *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008) 4346-4350.
- [33] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249 (1990) 505-510.
- [34] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818-822.
- [35] W. James, Aptamers, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, pp. 4848-4871.
- [36] M.J. Lange, P.D.M. Nguyen, M.K. Callaway, M.C. Johnson, D.H. Burke, RNA-protein interactions govern antiviral specificity and encapsidation of broad spectrum anti-HIV reverse transcriptase aptamers, *Nucleic Acids Res* 45 (2017) 6087-6097.
- [37] J. Wrzesinski, J. Ciesiolka, Characterization of structure and metal ions specificity of Co²⁺-binding RNA aptamers, *Biochemistry* 44 (2005) 6257-6268.
- [38] P.L. Szazani, R. Larralde, J.W. Szostak, A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP, *J Am Chem Soc* 126 (2004) 8370-8371.

- [39] K. Harada, A.D. Frankel, Identification of two novel arginine binding DNAs, *EMBO J* 14 (1995) 5798-5811.
- [40] C. Berens, A. Thain, R. Schroeder, A tetracycline-binding RNA aptamer, *Bioorg Med Chem* 9 (2001) 2549-2556.
- [41] F.M. Zimbres, A. Tárnok, H. Ulrich, C. Wrenger, Aptamers: novel molecules as diagnostic markers in bacterial and viral infections?, *BioMed Research International* (2013).
- [42] Z. Tang, P. Parekh, P. Turner, R.W. Moyer, W. Tan, Generating aptamers for recognition of virus-infected cells, *Clin Chem* 55 (2009) 813-822.
- [43] C.L. Hamula, X.C. Le, X.F. Li, DNA aptamers binding to multiple prevalent M-types of *Streptococcus pyogenes*, *Anal Chem* 83 (2011) 3640-3647.
- [44] O. Kolesnikova, H. Kazakova, C. Comte, S. Steinberg, P. Kamenski, R.P. Martin, I. Tarassov, N. Entelis, Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria, *RNA* 16 (2010).
- [45] Y.H. Kim, H.J. Sung, S. Kim, E.O. Kim, J.W. Lee, J.Y. Moon, K. Choi, J.E. Jung, Y. Lee, S.S. Koh, S.G. Rhee, K. Heo, I.H. Kim, An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells, *Cancer Letters* 313 (2011) 76-83.
- [46] J.M. Carothers, J.W. Szostak, *The Aptamer Handbook: Functional oligonucleotides and their applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [47] P.E. Burmeister, S.D. Lewis, R.F. Silva, J.R. Preiss, L.R. Horwitz, P.S. Pendergrast, T.G. McCauley, J.C. Kurz, D.M. Epstein, C. Wilson, A.D. Keefe, Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF, *Chemical Biology* 12 (2005) 25-33.
- [48] N.C. Pagratis, C. Bell, Y.F. Chang, S. Jennings, T. Fitzwater, D. Jellinek, C. Dang, Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor, *Nat Biotechnol* 15 (1997) 68-73.
- [49] H.Y. Kong, J. Byun, *Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science*, *Biomol Ther (Seoul)* 21 (2013) 423-434.
- [50] H. Dougan, D.M. Lyster, C.V. Vo, A. Stafford, J.I. Weitz, J.B. Hobbs, Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood, *Nucl Med Biol* 27 (2000) 289-297.
- [51] C.H. Lee, S.H. Lee, J.H. Kim, Y.H. Noh, G.J. Noh, S.W. Lee, Pharmacokinetics of a Cholesterol-conjugated Aptamer Against the Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Protein, *Mol Ther Nucleic Acids* 4 (2015) e254.
- [52] S.V. Vinogradov, Y.G. Suzdaltseva, A.V. Kabanov, Block polycationic oligonucleotide derivative: synthesis and inhibition of herpes virus reproduction, *Bioconjug Chem* 7 (1996) 3-6.
- [53] S. Hoffmann, J. Hoos, S. Klussmann, S. Vonhoff, RNA aptamers and spiegelmers: synthesis, purification, and post-synthetic PEG conjugation, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 4* (2011) Unit 4 46 41-30.
- [54] A. Jaschke, J.P. Furste, E. Nordhoff, F. Hillenkamp, D. Cech, V.A. Erdmann, Synthesis and properties of oligodeoxyribonucleotide-polyethylene glycol conjugates, *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 4810-4817.
- [55] R.M. Boomer, S.D. Lewis, J.M. Healy, M. Kurz, C. Wilson, T.G. McCauley, Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues, *Oligonucleotides* 15 (2005) 183-195.
- [56] A. Odrzywolski, A. Waśko, Wykorzystanie aptamerów oligonukleotydowych w terapii nowotworów, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70 (2016) 400-409.
- [57] F. Pfeiffer, G. Mayer, Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules, *Front Chem* 4 (2016) 25.
- [58] W. Jeon, S. Lee, D.H. Manjunatha, C. Ban, A colorimetric aptasensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles, *Anal Biochem* 439 (2013) 11-16.
- [59] A. Sett, S. Das, U. Bora, Functional nucleic-acid-based sensors for environmental monitoring, *Appl Biochem Biotechnol* 174 (2014) 1073-1091.

- [60] J.R. Kanwar, K. Roy, R.K. Kanwar, Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46 (2011) 459-477.
- [61] Y.F. Huang, D. Shanguan, H. Liu, J.A. Phillips, X. Zhang, Y. Chen, W. Tan, Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells, *Chembiochem* 10 (2009) 862-868.
- [62] X.C. Chen, Y.L. Deng, Y. Lin, D.W. Pang, H. Qing, F. Qu, H.Y. Xie, Quantum dot-labeled aptamer nanoprobe specifically targeting glioma cells, *Nanotechnology* 19 (2008) 235105.
- [63] R. Savla, O. Taratula, O. Garbuzenko, T. Minko, Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer, *J Control Release* 153 (2011) 16-22.
- [64] Y. Zhang, Y. Chen, D. Han, I. Ocsoy, W. Tan, Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies, *Bioanalysis* 2 (2010) 907-918.
- [65] J.W. Lee, H.J. Kim, K. Heo, Therapeutic aptamers: developmental potential as anticancer drugs, *BMB Rep* 48 (2015) 234-237.
- [66] G. Zhou, G. Wilson, L. Hebbard, W. Duan, C. Liddle, J. George, L. Qiao, Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy, *Oncotarget* 7 (2016) 13446-13463.
- [67] P. Sundaram, H. Kurniawan, M.E. Byrne, J. Wower, Therapeutic RNA aptamers in clinical trials, *Eur J Pharm Sci* 48 (2013) 259-271.
- [68] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans, *Plant Cell* 2 (1990) 279-289.
- [69] A.R. van der Krol, L.A. Mur, P. de Lange, J.N. Mol, A.R. Stuitje, Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect, *Plant Mol Biol* 14 (1990) 457-466.
- [70] N. Romano, G. Macino, Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences, *Mol Microbiol* 6 (1992) 3343-3353.
- [71] G.J. Hannon, RNA interference, *Nature* 418 (2002) 244-251.
- [72] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411 (2001) 494-498.
- [73] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (1998) 806-811.
- [74] S.M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *EMBO J* 20 (2001) 6877-6888.
- [75] N.J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R.A. Morgan, Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 9742-9747.
- [76] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843-854.
- [77] S. Rane, D. Sayed, M. Abdellatif, MicroRNA with a MacroFunction, *Cell Cycle* 6 (2007) 1850-1855.
- [78] R.W. Carthew, E.J. Sontheimer, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell* 136 (2009) 642-655.
- [79] J. Martinez, A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann, T. Tuschl, Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi, *Cell* 110 (2002) 563-574.
- [80] K. Kubiak, B. Nawrot, RNAi w terapii, *Biotechnologia* 84 (2009) 132-151.
- [81] P.H. Olsen, V. Ambros, The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation, *Dev Biol* 216 (1999) 671-680.
- [82] Y. Zeng, B.R. Cullen, RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm, *RNA* 8 (2002) 855-860.

- [83] S. Akhtar, I.F. Benter, Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo, *J Clin Invest* 117 (2007) 3623-3632.
- [84] P. Józwiak, A. Lipińska, Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 64 (2010) 504-512.
- [85] B.L. Davidson, P.B. McCray, Jr., Current prospects for RNA interference-based therapies, *Nat Rev Genet* 12 (2011) 329-340.
- [86] Y. Dorsett, T. Tuschl, siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 318-329.
- [87] P.K. Kaiser, R.C. Symons, S.M. Shah, E.J. Quinlan, H. Tabandeh, D.V. Do, G. Reisen, J.A. Lockridge, B. Short, R. Guercioli, Q.D. Nguyen, I. Sirna-027 Study, RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027, *Am J Ophthalmol* 150 (2010) 33-39 e32.
- [88] M.L. Bobbin, J.C. Burnett, J.J. Rossi, RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection, *Genome Med* 7 (2015) 50.
- [89] S.L. Uprichard, The therapeutic potential of RNA interference, *FEBS Lett* 579 (2005) 5996-6007.
- [90] W. Guo, W. Chen, W. Yu, W. Huang, W. Deng, Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers, *Chin J Cancer* 32 (2013) 488-493.
- [91] S.W. Young, M. Stenzel, J.L. Yang, Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?, *Crit Rev Oncol Hematol* 98 (2016) 159-169.
- [92] D. Rath, L. Amlinger, A. Rath, M. Lundgren, The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications, *Biochimie* 117 (2015) 119-128.
- [93] M.S. Jurica, B.L. Stoddard, Homing endonucleases: structure, function and evolution, *Cell Mol Life Sci* 55 (1999) 1304-1326.
- [94] A.J. Thompson, X. Yuan, W. Kudlicki, D.L. Herrin, Cleavage and recognition pattern of a double-strand-specific endonuclease (I-creI) encoded by the chloroplast 23S rRNA intron of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gene* 119 (1992) 247-251.
- [95] J. Bitinaite, D.A. Wah, A.K. Aggarwal, I. Schildkraut, FokI dimerization is required for DNA cleavage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10570-10575.
- [96] A.J. Bogdanove, D.F. Voytas, TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting, *Science* 333 (2011) 1843-1846.
- [97] B. Wiedenheft, S.H. Sternberg, J.A. Doudna, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea, *Nature* 482 (2012) 331-338.
- [98] H. Richter, L. Randau, A. Plagens, Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications, *Int J Mol Sci* 14 (2013) 14518-14531.
- [99] L.A. Sega P, Wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz do modyfikacji genomów roślinnych, *Postępy Biologii Komórki* 41 (2014) 701-720.
- [100] B.J. Czarnek M, System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej, *Postępy Hig Med Dosw* 70 (2016) 901-916.
- [101] S.J. Gao H, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson M G, West A, Bidney D, Falco S C, Jantz D and Lyznik L A, Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease, *The Plant Journal* 61 (2010) 176-187.
- [102] M.S. Antunes, J.J. Smith, D. Jantz, J.I. Medford, Targeted DNA excision in Arabidopsis by a re-engineered homing endonuclease, *BMC Biotechnol* 12 (2012) 86.
- [103] V.C. D'Halluin K, Van Hulle J, Rosolowska J, Van Den Brande I, Pennewaert A, D'Hont K, Bossut M, Jantz D, Ruiters R and Broadhvest J, Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction, *Plant Biotechnology Journal* (2013) 1-9.
- [104] A. Castillo, Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer, *Colomb Med (Cali)* 47 (2016) 178-180.
- [105] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P.B. Arimondo, The triple helix: 50 years later, the outcome, *Nucleic Acids Res* 36 (2008) 5123-5138.
- [106] G. Felsenfeld, A. Rich, Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides, *Biochim Biophys Acta* 26 (1957) 457-468.

- [107] R.W. Roberts, D.M. Crothers, Specificity and stringency in DNA triplex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 9397-9401.
- [108] V.A. Malkov, V.N. Soyfer, M.D. Frank-Kamenetskii, Effect of intermolecular triplex formation on the yield of cyclobutane photodimers in DNA, *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 4889-4895.
- [109] M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, R.H. Berg, Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone, *Jouranal of American Chemical Society* 114 (1992) 1895-1897.
- [110] E. Brossalina, E. Pascolo, J.J. Toulme, The binding of an antisense oligonucleotide to a hairpin structure via triplex formation inhibits chemical and biological reactions, *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 5616-5622.
- [111] G. Devi, Y. Zhou, Z. Zhong, D.F. Toh, G. Chen, RNA triplexes: from structural principles to biological and biotech applications, *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6 (2015) 111-128.
- [112] V.I. Lyamichev, S.M. Mirkin, M.D. Frank-Kamenetskii, A pH-dependent structural transition in the homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA, *J Biomol Struct Dyn* 3 (1985) 327-338.
- [113] V.I. Lyamichev, S.M. Mirkin, M.D. Frank-Kamenetskii, Structures of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA, *J Biomol Struct Dyn* 3 (1986) 667-669.
- [114] Q. Lu, J.M. Teare, H. Granok, M.J. Swede, J. Xu, S.C. Elgin, The capacity to form H-DNA cannot substitute for GAGA factor binding to a (CT)_n*(GA)_n regulatory site, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 2483-2494.
- [115] G. Wang, K.M. Vasquez, Effects of Replication and Transcription on DNA Structure-Related Genetic Instability, *Genes (Basel)* 8 (2017).
- [116] J.C. Paillart, E. Skripkin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, R. Marquet, A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 5572-5577.
- [117] J. Christiansen, M. Kofod, F.C. Nielsen, A guanosine quadruplex and two stable hairpins flank a major cleavage site in insulin-like growth factor II mRNA, *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 5709-5716.
- [118] Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu, Altered gene expression correlates with DNA structure, *Genes Dev* 5 (1991) 2547-2554.
- [119] S.M. Rooney, P.D. Moore, Antiparallel, intramolecular triplex DNA stimulates homologous recombination in human cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 2141-2144.
- [120] V.B. Zhurkin, G. Raghunathan, N.B. Ulyanov, R.D. Camerini-Otero, R.L. Jernigan, A parallel DNA triplex as a model for the intermediate in homologous recombination, *J Mol Biol* 239 (1994) 181-200.
- [121] Y. Kohwi, Y. Panchenko, Transcription-dependent recombination induced by triple-helix formation, *Genes Dev* 7 (1993) 1766-1778.
- [122] G. Wang, K.M. Vasquez, Naturally occurring H-DNA-forming sequences are mutagenic in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 13448-13453.
- [123] R. Kolluri, T.A. Torrey, A.J. Kinniburgh, A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif, *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 111-116.
- [124] M.J. Ulrich, W.J. Gray, T.J. Ley, An intramolecular DNA triplex is disrupted by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin, *J Biol Chem* 267 (1992) 18649-18658.
- [125] P.M. Brown, K.R. Fox, Nucleosome core particles inhibit DNA triple helix formation, *Biochem J* 319 (Pt 2) (1996) 607-611.
- [126] K.J. Hampel, C. Ashley, J.S. Lee, Kilobase-range communication between polypurine.polypyrimidine tracts in linear plasmids mediated by triplex formation: a braided knot between two linear duplexes, *Biochemistry* 33 (1994) 5674-5681.
- [127] P.P. Chan, P.M. Glazer, Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy, *J Mol Med* 75 (1997) 267-282.

- [128] P.A. Beal, P.B. Dervan, Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation, *Science* 251 (1991) 1360-1363.
- [129] V. Malnuit, M. Duca, R. Benhida, Targeting DNA base pair mismatch with artificial nucleobases. Advances and perspectives in triple helix strategy, *Org Biomol Chem* 9 (2011) 326-336.
- [130] W.A. Greenberg, P.B. Dervan, Energetics of formation of sixteen triple helical complexes which vary at a single position within a purine motif, *Jouranal of American Chemical Society* 117 (1995) 1187-1193.
- [131] R.F. Macaya, D.E. Gilbert, S. Malek, J.S. Sinsheimer, J. Feigon, Structure and stability of X.G.C mismatches in the third strand of intramolecular triplexes, *Science* 254 (1991) 270-274.
- [132] C.A. Theimer, C.A. Blois, J. Feigon, Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function, *Mol Cell* 17 (2005) 671-682.
- [133] N.K. Kim, Q. Zhang, J. Zhou, C.A. Theimer, R.D. Peterson, J. Feigon, Solution structure and dynamics of the wild-type pseudoknot of human telomerase RNA, *J Mol Biol* 384 (2008) 1249-1261.
- [134] N.B. Ulyanov, K. Shefer, T.L. James, Y. Tzfati, Pseudoknot structures with conserved base triples in telomerase RNAs of ciliates, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 6150-6160.
- [135] K. Shefer, Y. Brown, V. Gorkovoy, T. Nussbaum, N.B. Ulyanov, Y. Tzfati, A triple helix within a pseudoknot is a conserved and essential element of telomerase RNA, *Mol Cell Biol* 27 (2007) 2130-2143.
- [136] S.D. Gilbert, R.P. Rambo, D. Van Tyne, R.T. Batey, Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine, *Nat Struct Mol Biol* 15 (2008) 177-182.
- [137] J.A. Liberman, M. Salim, J. Krucinska, J.E. Wedekind, Structure of a class II preQ1 riboswitch reveals ligand recognition by a new fold, *Nat Chem Biol* 9 (2013) 353-355.
- [138] G. Chen, K.Y. Chang, M.Y. Chou, C. Bustamante, I. Tinoco, Jr., Triplex structures in an RNA pseudoknot enhance mechanical stability and increase efficiency of -1 ribosomal frameshifting, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 12706-12711.
- [139] B.L. Golden, H. Kim, E. Chase, Crystal structure of a phage Twort group I ribozyme-product complex, *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005) 82-89.
- [140] N. Toor, K.S. Keating, S.D. Taylor, A.M. Pyle, Crystal structure of a self-spliced group II intron, *Science* 320 (2008) 77-82.
- [141] S.D. Appasamy, E.I. Ramlan, M. Firdaus-Raih, Comparative sequence and structure analysis reveals the conservation and diversity of nucleotide positions and their associated tertiary interactions in the riboswitches, *PLoS One* 8 (2013) e73984.
- [142] P. Nissen, J.A. Ippolito, N. Ban, P.B. Moore, T.A. Steitz, RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 4899-4903.
- [143] D.J. Klein, T.M. Schmeing, P.B. Moore, T.A. Steitz, The kink-turn: a new RNA secondary structure motif, *EMBO J* 20 (2001) 4214-4221.
- [144] A. Lescoute, E. Westhof, The A-minor motifs in the decoding recognition process, *Biochimie* 88 (2006) 993-999.
- [145] G.E. Plum, D.S. Pilch, S.F. Singleton, K.J. Breslauer, Nucleic acid hybridization: triplex stability and energetics, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24 (1995) 319-350.
- [146] S.W. Blume, J. Lebowitz, W. Zacharias, V. Guarcello, C.A. Mayfield, S.W. Ebbinghaus, P. Bates, D.E. Jones, Jr., J. Trent, N. Vigneswaran, D.M. Miller, The integral divalent cation within the intermolecular purine*purine. pyrimidine structure: a variable determinant of the potential for and characteristics of the triple helical association, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 695-702.
- [147] R.A. Cassidy, N. Puri, P.S. Miller, Effect of DNA target sequence on triplex formation by oligo-2'-deoxy- and 2'-O-methylribonucleotides, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 4099-4108.

- [148] R.W. Roberts, D.M. Crothers, Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition, *Science* 258 (1992) 1463-1466.
- [149] C. Escude, J.C. Francois, J.S. Sun, G. Ott, M. Sprinzl, T. Garestier, C. Helene, Stability of triple helices containing RNA and DNA strands: experimental and molecular modeling studies, *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 5547-5553.
- [150] Y. Zhou, E. Kierzek, Z.P. Loo, M. Antonio, Y.H. Yau, Y.W. Chuah, S. Geifman-Shochat, R. Kierzek, G. Chen, Recognition of RNA duplexes by chemically modified triplex-forming oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 41 (2013) 6664-6673.
- [151] J.S. Lee, M.L. Woodsworth, L.J. Latimer, A.R. Morgan, Poly(pyrimidine) . poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH, *Nucleic Acids Res* 12 (1984) 6603-6614.
- [152] B.C. Froehler, S. Wadwani, T. Terhorst, S.R. Gerrard, Oligodeoxynucleotides containing C-5 propyne analogs of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxycytidine, *Tetrahedron Letters* 33 (1992) 5307-5310.
- [153] M. Mills, P.B. Arimondo, L. Lacroix, T. Garestier, H. Klump, J.L. Mergny, Chemical modification of the third strand: differential effects on purine and pyrimidine triple helix formation, *Biochemistry* 41 (2002) 357-366.
- [154] J. Bijapur, M.D. Keppler, S. Bergqvist, T. Brown, K.R. Fox, 5-(1-propargylamino)-2'-deoxyuridine (UP): a novel thymidine analogue for generating DNA triplexes with increased stability, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 1802-1809.
- [155] M. Sollogoub, R.A. Darby, B. Cuenoud, T. Brown, K.R. Fox, Stable DNA triple helix formation using oligonucleotides containing 2'-aminoethoxy,5-propargylamino-U, *Biochemistry* 41 (2002) 7224-7231.
- [156] J.A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B.F. Taylor, E. Frary, N.H. Williams, D.M. Williams, Amino-functionalized DNA: the properties of C5-amino-alkyl substituted 2'-deoxyuridines and their application in DNA triplex formation, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 1362-1371.
- [157] D.A. Rusling, L. Le Strat, V.E. Powers, V.J. Broughton-Head, J. Booth, O. Lack, T. Brown, K.R. Fox, Combining nucleoside analogues to achieve recognition of oligopurine tracts by triplex-forming oligonucleotides at physiological pH, *FEBS Lett* 579 (2005) 6616-6620.
- [158] G. Devi, Z. Yuan, Y. Lu, Y. Zhao, G. Chen, Incorporation of thio-pseudoisocytosine into triplex-forming peptide nucleic acids for enhanced recognition of RNA duplexes, *Nucleic Acids Res* 42 (2014) 4008-4018.
- [159] P. Acharya, P. Cheruku, S. Chatterjee, S. Acharya, J. Chattopadhyaya, Measurement of nucleobase pKa values in model mononucleotides shows RNA-RNA duplexes to be more stable than DNA-DNA duplexes, *J Am Chem Soc* 126 (2004) 2862-2869.
- [160] N.A. Siegfried, R. Kierzek, P.C. Bevilacqua, Role of unsatisfied hydrogen bond acceptors in RNA energetics and specificity, *J Am Chem Soc* 132 (2010) 5342-5344.
- [161] A. Avino, E. Cubero, C. Gonzalez, R. Eritja, M. Orozco, Antiparallel triple helices. Structural characteristics and stabilization by 8-amino derivatives, *J Am Chem Soc* 125 (2003) 16127-16138.
- [162] A. Avino, M.G. Grimau, M. Alvira, R. Eritja, R. Gargallo, M. Orozco, C. Gonzalez, Triplex formation using oligonucleotide clamps carrying 8-aminopurines, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26 (2007) 979-983.
- [163] T.S. Rao, R.H. Durland, D.M. Seth, M.A. Myrick, V. Bodepudi, G.R. Revankar, Incorporation of 2'-deoxy-6-thioguanosine into G-rich oligodeoxyribonucleotides inhibits G-tetrad formation and facilitates triplex formation, *Biochemistry* 34 (1995) 765-772.
- [164] B.J. Zhou, E. Puga, J.S. Sun, T. Garestier, C. Helene, Stable triple helices formed by acridine-containing oligonucleotides with oligopurine tracts of DNA interrupted by one or two pyrimidines, *Jouranal of American Chemical Society* 117 (1995) 10425-10428.
- [165] J.F. Mouscadet, S. Carteau, H. Goulaouic, F. Subra, C. Auclair, Triplex-mediated inhibition of HIV DNA integration in vitro, *J Biol Chem* 269 (1994) 21635-21638.

- [166] K.G. Rajeev, V.R. Jadhav, K.N. Ganesh, Triplex formation at physiological pH: comparative studies on DNA triplexes containing 5-Me-dC tethered at N4 with spermine and tetraethyleneoxyamine, *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 4187-4193.
- [167] B.D. Perkins, T.G. Wensel, K.M. Vasquez, J.H. Wilson, Psoralen photo-cross-linking by triplex-forming oligonucleotides at multiple sites in the human rhodopsin gene, *Biochemistry* 38 (1999) 12850-12859.
- [168] C. Escude, C. Giovannangeli, J.S. Sun, D.H. Lloyd, J.K. Chen, S.M. Gryaznov, T. Garestier, C. Helene, Stable triple helices formed by oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates inhibit transcription elongation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 4365-4369.
- [169] Y. Wang, D.A. Rusling, V.E. Powers, O. Lack, S.D. Osborne, K.R. Fox, T. Brown, Stable recognition of TA interruptions by triplex forming oligonucleotides containing a novel nucleoside, *Biochemistry* 44 (2005) 5884-5892.
- [170] T. de Bizemont, J.S. Sun, T. Garestier, C. Helene, New junction models for alternate-strand triple-helix formation, *Chem Biol* 5 (1998) 755-762.
- [171] Y. Taniguchi, Y. Senko, K. Kodama, A. Nakamura, S. Sasaki, Design and evaluation of novel nucleoside analogs (WNA) for specific formation of non-natural type triplexes containing a TA or CG interrupting site, *Nucleic Acids Res Suppl* (2003) 113-114.
- [172] H. Torigoe, Y. Hari, S. Obika, T. Imanishi, Triplex formation involving 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) with 1-isoquinolone base analogue: efficient and selective recognition of C:G interruption, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22 (2003) 1571-1573.
- [173] S. Wang, E.T. Kool, Relative stabilities of triple helices composed of combinations of DNA, RNA and 2'-O-methyl-RNA backbones: chimeric circular oligonucleotides as probes, *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 1157-1164.
- [174] M.M. Seidman, N. Puri, A. Majumdar, B. Cuenoud, P.S. Miller, R. Alam, The development of bioactive triple helix-forming oligonucleotides, *Ann N Y Acad Sci* 1058 (2005) 119-127.
- [175] A. Maciaszek, A. Krakowiak, M. Janicka, A. Tomaszewska-Antczak, M. Sobczak, B. Mikolajczyk, P. Guga, LNA units present in the (2'-OMe)-RNA strand stabilize parallel duplexes (2'-OMe)-RNA/[All-R(P)-PS]-DNA and parallel triplexes (2'-OMe)-RNA/[All-R(P)-PS]-DNA/RNA. An improved tool for the inhibition of reverse transcription, *Org Biomol Chem* 13 (2015) 2375-2384.
- [176] M.J. Blommers, F. Natt, W. Jahnke, B. Cuenoud, Dual recognition of double-stranded DNA by 2'-aminoethoxy-modified oligonucleotides: the solution structure of an intramolecular triplex obtained by NMR spectroscopy, *Biochemistry* 37 (1998) 17714-17725.
- [177] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.I. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar pucker, *Tetrahedron Letters* 38 (1997) 8735-8738.
- [178] A.A. Koshkin, S.K. Singh, P. Nielsen, V.K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C.E. Olsen, J. Wengel, LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition, *Tetrahedron* 54 (1998) 3607-3630.
- [179] <http://www.google.com/patents/WO2003020739A2?cl=en>
- [180] B.W. Sun, B.R. Babu, M.D. Sorensen, K. Zakrzewska, J. Wengel, J.S. Sun, Sequence and pH effects of LNA-containing triple helix-forming oligonucleotides: physical chemistry, biochemistry, and modeling studies, *Biochemistry* 43 (2004) 4160-4169.
- [181] J.J. Sorensen, J.T. Nielsen, M. Petersen, Solution structure of a dsDNA:LNA triplex, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 6078-6085.
- [182] H. Torigoe, Y. Hari, M. Sekiguchi, S. Obika, T. Imanishi, 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid modification promotes pyrimidine motif triplex DNA formation at physiological pH: thermodynamic and kinetic studies, *J Biol Chem* 276 (2001) 2354-2360.

- [183] T. Hojland, B.R. Babu, T. Bryld, J. Wengel, Triplex-forming ability of modified oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26 (2007) 1411-1414.
- [184] M. Koizumi, K. Morita, M. Daigo, S. Tsutsumi, K. Abe, S. Obika, T. Imanishi, Triplex formation with 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 3267-3273.
- [185] S. Sasaki, H. Yamauchi, R. Takahasi, Y. Taniguchi, M. Maeda, New base analogs for the formation of non-natural triplexes, *Nucleic Acids Res Suppl* (2001) 23-24.
- [186] T.B. Jensen, N. Langkjaer, J. Wengel, Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (2008) 133-134.
- [187] N. Langkjaer, A. Pasternak, J. Wengel, UNA (unlocked nucleic acid): a flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability, *Bioorg Med Chem* 17 (2009) 5420-5425.
- [188] A. Pasternak, J. Wengel, Thermodynamics of RNA duplexes modified with unlocked nucleic acid nucleotides, *Nucleic Acids Res* 38 (2010) 6697-6706.
- [189] M.B. Laursen, M.M. Pakula, S. Gao, K. Fluiters, O.R. Mook, F. Baas, N. Langkjaer, S.L. Wengel, J. Wengel, J. Kjems, J.B. Bramsen, Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo, *Mol Biosyst* 6 (2010) 862-870.
- [190] W. Kotkowiak, M. Kotkowiak, R. Kierzek, A. Pasternak, Unlocked nucleic acids: implications of increased conformational flexibility for RNA/DNA triplex formation, *Biochem J* 464 (2014) 203-211.
- [191] L. Lacroix, P.B. Arimondo, M. Takasugi, C. Helene, J.L. Mergny, Pyrimidine morpholino oligonucleotides form a stable triple helix in the absence of magnesium ions, *Biochem Biophys Res Commun* 270 (2000) 363-369.
- [192] E.P. Stirchak, J.E. Summerton, D.D. Weller, Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages, *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 6129-6141.
- [193] J. Summerton, History and properties of morpholino antisense oligos, *Journal of Drug Discovery, Development and Delivery* 3 (2016) 1-7.
- [194] J. Basye, J.O. Trent, D. Gao, S.W. Ebbinghaus, Triplex formation by morpholino oligodeoxyribonucleotides in the HER-2/neu promoter requires the pyrimidine motif, *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 4873-4880.
- [195] H. Torigoe, K. Sasaki, T. Katayama, Thermodynamic and kinetic effects of morpholino modification on pyrimidine motif triplex nucleic acid formation under physiological condition, *J Biochem* 146 (2009) 173-183.
- [196] M. Sierant, Modyfikowane chemicznie duplekty siRNA, *Biotechnologia* 3 (2010) 146-172.
- [197] S.G. Kim, S. Tsukahara, S. Yokoyama, H. Takaku, The influence of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate pyrimidine strands on triplex formation, *FEBS Lett* 314 (1992) 29-32.
- [198] J. Lacoste, J.C. Francois, C. Helene, Triple helix formation with purine-rich phosphorothioate-containing oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative, *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 1991-1998.
- [199] S. Gryaznov, J.K. Chen, Oligodeoxyribonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates: synthesis and hybridization properties, *Journal of American Chemical Society* 116 (1994) 143-144.
- [200] T. Michel, F. Debart, F. Heitz, J.J. Vasseur, Highly stable DNA triplexes formed with cationic phosphoramidate pyrimidine alpha-oligonucleotides, *Chembiochem* 6 (2005) 1254-1262.
- [201] W.S. Zielinski, L.E. Orgel, Oligoaminonucleoside phosphoramidates. Oligomerization of dimers of 3'-amino-3'-deoxy-nucleotides (GC and CG) in aqueous solution, *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 1699-1715.

- [202] E. Radzikowska, Modyfikowane oligodeoksyrybonukleotydy zawierające w wiązaniu internukleotydowym w pozycji mostkowej atom azotu *Wiadomości Chemiczne* 67 (2013) 11-12.
- [203] J.M. Dagle, D.L. Weeks, Positively charged oligonucleotides overcome potassium-mediated inhibition of triplex DNA formation, *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 2143-2149.
- [204] J. Joseph, J.C. Kandala, D. Veerapanane, K.T. Weber, R.V. Guntaka, Antiparallel polypurine phosphorothioate oligonucleotides form stable triplexes with the rat alpha1(I) collagen gene promoter and inhibit transcription in cultured rat fibroblasts, *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 2182-2188.
- [205] S.M. Gryaznov, Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents, *Biochim Biophys Acta* 1489 (1999) 131-140.
- [206] M. Faria, C. Giovannangeli, Triplex-forming molecules: from concepts to applications, *J Gene Med* 3 (2001) 299-310.
- [207] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science* 254 (1991) 1497-1500.
- [208] P.E. Nielsen, M. Egholm, An introduction to peptide nucleic acid, *Curr Issues Mol Biol* 1 (1999) 89-104.
- [209] S. Karkare, D. Bhatnagar, Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino, *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (2006) 575-586.
- [210] M. Egholm, L. Christensen, K.L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P.E. Nielsen, Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA, *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 217-222.
- [211] D.K. Toh, G. Devi, K.M. Patil, Q. Qu, M. Maraswami, Y. Xiao, T.P. Loh, Y. Zhao, G. Chen, Incorporating a guanidine-modified cytosine base into triplex-forming PNAs for the recognition of a C-G pyrimidine-purine inversion site of an RNA duplex, *Nucleic Acids Res* 44 (2016) 9071-9082.
- [212] P. Wittung, P. Nielsen, B. Norden, Extended DNA-recognition repertoire of peptide nucleic acid (PNA): PNA-dsDNA triplex formed with cytosine-rich homopyrimidine PNA, *Biochemistry* 36 (1997) 7973-7979.
- [213] L. Good, S.K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson, P.E. Nielsen, Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates, *Nat Biotechnol* 19 (2001) 360-364.
- [214] O. Muse, T. Zenggeya, J. Mwaura, D. Hnedzko, D.W. McGee, C.T. Grewer, E. Rozners, Sequence selective recognition of double-stranded RNA at physiologically relevant conditions using PNA-peptide conjugates, *ACS Chem Biol* 8 (2013) 1683-1686.
- [215] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden, P.E. Nielsen, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* 365 (1993) 566-568.
- [216] D.A. Dean, Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies, *Adv Drug Deliv Rev* 44 (2000) 81-95.
- [217] P.E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand, *Gene* 149 (1994) 139-145.
- [218] M.J. Lutz, S.A. Benner, S. Hein, G. Breipohl, E. Uhlmann, Recognition of uncharged polyamide-linked nucleic acid analogs by DNA polymerases and reverse transcriptases, *Journal of American Chemical Society* 119 (1997) 3177-3178.
- [219] K.M. Vasquez, J.H. Wilson, Triplex directed modification of genes and gene activity, *Trends in Biochemical Sciences* 23 (1998) 4-9.
- [220] P. Gupta, T. Zenggeya, E. Rozners, Triple helical recognition of pyrimidine inversions in polypurine tracts of RNA by nucleobase-modified PNA, *Chemical Communication* 47 (2011) 11125-11127.
- [221] T. Zenggeya, P. Gupta, E. Rozners, Sequence selective recognition of double-stranded RNA using triple helix-forming peptide nucleic acids, *Methods Mol Biol* 1050 (2014) 83-94.

- [222] S.R. Nallagatla, R. Toroney, P.C. Bevilacqua, Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR, *Curr Opin Struct Biol* 21 (2011) 119-127.
- [223] S.E. Hile, K.A. Eckert, Positive correlation between DNA polymerase alpha-primase pausing and mutagenesis within polypyrimidine/polypurine microsatellite sequences, *J Mol Biol* 335 (2004) 745-759.
- [224] P.R. Hoyne, L.J. Maher, 3rd, Functional studies of potential intrastrand triplex elements in the *Escherichia coli* genome, *J Mol Biol* 318 (2002) 373-386.
- [225] G. Wang, S. Carbajal, J. Vijg, J. DiGiovanni, K.M. Vasquez, DNA structure-induced genomic instability in vivo, *J Natl Cancer Inst* 100 (2008) 1815-1817.
- [226] A.F. Faruqi, S.H. Krawczyk, M.D. Matteucci, P.M. Glazer, Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxanthine, *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 633-640.
- [227] G.M. Carbone, E. McGuffie, S. Napoli, C.E. Flanagan, C. Dembech, U. Negri, F. Arcamone, M.L. Capobianco, C.V. Catapano, DNA binding and antigene activity of a daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeting the P2 promoter of the human c-myc gene, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 2396-2410.
- [228] B.S. Thoma, M. Wakasugi, J. Christensen, M.C. Reddy, K.M. Vasquez, Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 2993-3001.
- [229] M. Musso, L.D. Nelson, M.W. Van Dyke, Characterization of purine-motif triplex DNA-binding proteins in HeLa extracts, *Biochemistry* 37 (1998) 3086-3095.
- [230] J.R. Spitzner, I.K. Chung, M.T. Muller, Determination of 5' and 3' DNA triplex interference boundaries reveals the core DNA binding sequence for topoisomerase II, *J Biol Chem* 270 (1995) 5932-5943.
- [231] D. Cherny, Imaging of Triplexes by Electron and Scanning Force Microscopy, in: C. Malvy, A. Harel-Bellan, L.L. Pritchard (Eds.), *Triple Helix Forming Oligonucleotides*, Springer US, New York, pp. 49-62.
- [232] S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, Fluorescent triplex-forming DNA oligonucleotides labeled with a thiazole orange dimer unit, *Artif DNA PNA XNA* 4 (2013) 19-27.
- [233] N. Hegarat, D. Novopashina, A.A. Fokina, A.S. Boutorine, A.G. Venyaminova, D. Praseuth, J.C. Francois, Monitoring DNA triplex formation using multicolor fluorescence and application to insulin-like growth factor I promoter downregulation, *FEBS J* 281 (2014) 1417-1431.
- [234] T. Schluep, C.L. Cooney, Purification of plasmids by triplex affinity interaction, *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 4524-4528.
- [235] T. Ito, C.L. Smith, C.R. Cantor, Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 495-498.
- [236] A. Jain, G. Wang, K.M. Vasquez, DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential, *Biochimie* 90 (2008) 1117-1130.
- [237] P.W. Hewett, E.L. Daft, C.A. Laughton, S. Ahmad, A. Ahmed, J.C. Murray, Selective inhibition of the human tie-1 promoter with triplex-forming oligonucleotides targeted to Ets binding sites, *Mol Med* 12 (2006) 8-16.
- [238] M. Faria, C.D. Wood, L. Perrouault, J.S. Nelson, A. Winter, M.R. White, C. Helene, C. Giovannangeli, Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 3862-3867.
- [239] C. Shen, A. Buck, B. Polat, A. Schmid-Kotsas, C. Matuschek, H.J. Gross, M. Bachem, S.N. Reske, Triplex-forming oligodeoxynucleotides targeting survivin inhibit proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells, *Cancer Gene Ther* 10 (2003) 403-410.
- [240] M. Hai, S.I. Bidichandani, M.E. Hogan, P.I. Patel, Competitive binding of triplex-forming oligonucleotides in the two alternate promoters of the PMP22 gene, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11 (2001) 233-246.

- [241] G. Singhal, M.Z. Akhter, D.F. Stern, S.D. Gupta, A. Ahuja, U. Sharma, N.R. Jagannathan, M.R. Rajeswari, DNA triplex-mediated inhibition of MET leads to cell death and tumor regression in hepatoma, *Cancer Gene Ther* 18 (2011) 520-530.
- [242] W. Seanger, Polymorphism of DNA versus structural conservatism of RNA: classification of A-, B-, and Z-type double helices, in: Springer-Verlag (Ed.), *Principles of nucleic acid structure*, NY, 1984, pp. 220-241.
- [243] D. Turner, Conformational changes, in: D.C. VA Bloomfield, I Tinoco (Ed.), *Nucleic acids - structures, properties and functions*, University Science Books, CA, 2000, pp. 259-334.
- [244] J.E. Sokoloski, S.A. Godfrey, S.E. Dombrowski, P.C. Bevilacqua, Prevalence of syn nucleobases in the active sites of functional RNAs, *RNA* 17 (2011) 1775-1787.
- [245] R.D. Wells, D.A. Collier, J.C. Hanvey, M. Shimizu, F. Wohlrab, The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine-oligopyrimidine sequences, *FASEB J* 2 (1988) 2939-2949.
- [246] C.D. Xiao, T. Ishizuka, X.Q. Zhu, Y. Li, H. Sugiyama, Y. Xu, Unusual Topological RNA Architecture with an Eight-Stranded Helical Fragment Containing A-, G-, and U-Tetrads, *J Am Chem Soc* 139 (2017) 2565-2568.
- [247] A.T. Phan, J.L. Leroy, Intramolecular i-Motif Structures of Telomeric DNA, *J Biomol Struct Dyn* 17 (2000) 245-251.
- [248] A. Rich, D.R. Davies, F.H. Crick, J.D. Watson, The molecular structure of polyadenylic acid, *J Mol Biol* 3 (1961) 71-86.
- [249] N. Pattabiraman, Can the double helix be parallel?, *Biopolymers* 25 (1986) 1603-1606.
- [250] S. Chakraborty, S. Sharma, P.K. Maiti, Y. Krishnan, The poly dA helix: a new structural motif for high performance DNA-based molecular switches, *Nucleic Acids Res* 37 (2009) 2810-2817.
- [251] N. Safaei, A.M. Noronha, D. Rodionov, G. Kozlov, C.J. Wilds, G.M. Sheldrick, K. Gehring, Structure of the parallel duplex of poly(A) RNA: evaluation of a 50 year-old prediction, *Angew Chem Int Ed* 52 (2013) 10370-10373.
- [252] M.L. Gleghorn, J. Zhao, D.H. Turner, L.E. Maquat, Crystal structure of a poly(rA) staggered zipper at acidic pH: evidence that adenine N1 protonation mediates parallel double helix formation, *Nucleic Acids Res* 44 (2016) 8417-8424.
- [253] G. Raghunathan, H.T. Miles, V. Sasisekharan, Parallel nucleic acid helices with Hoogsteen base pairing: symmetry and structure, *Biopolymers* 34 (1994) 1573-1581.
- [254] C. Otto, G.A. Thomas, K. Rippe, T.M. Jovin, W.L. Peticolas, The hydrogen-bonding structure in parallel-stranded duplex DNA is reverse Watson-Crick, *Biochemistry* 30 (1991) 3062-3069.
- [255] R. Veitia, C. Ottolenghi, Placing parallel stranded DNA in an evolutionary context, *J Theor Biol* 206 (2000) 317-322.
- [256] S.R. Bhaumik, K.V. Chary, G. Govil, K. Liu, H.T. Miles, A novel palindromic triple-stranded structure formed by homopyrimidine dodecamer d-CTTCTCCTCTTC and homopurine hexamer d-GAAGAG, *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 2981-2988.
- [257] S. Mohammadi, R. Klement, A.K. Shchyolkina, J. Liquier, T.M. Jovin, E. Taillandier, FTIR and UV spectroscopy of parallel-stranded DNAs with mixed A*T/G*C sequences and their A*T/I*C analogues, *Biochemistry* 37 (1998) 16529-16537.
- [258] X.L. Yang, H. Sugiyama, S. Ikeda, I. Saito, A.H. Wang, Structural studies of a stable parallel-stranded DNA duplex incorporating isoguanine:cytosine and isocytosine:guanine basepairs by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biophys J* 75 (1998) 1163-1171.
- [259] E. Cubero, A. Avino, B.G. de la Torre, M. Frieden, R. Eritja, F.J. Luque, C. Gonzalez, M. Orozco, Hoogsteen-based parallel-stranded duplexes of DNA. Effect of 8-aminopurine derivatives, *J Am Chem Soc* 124 (2002) 3133-3142.
- [260] N.A. Tchurikov, B.K. Chernov, Y.B. Golova, Y.D. Nechipurenko, Parallel DNA: generation of a duplex between two Drosophila sequences in vitro, *FEBS Lett* 257 (1989) 415-418.

- [261] N.A. Tchurikov, L.G. Chistyakova, G.B. Zavlgelesky, I.V. Manukhov, B.K. Chernov, Y.B. Golova, Gene-specific silencing by expression of parallel complementary RNA in *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 275 (2000) 26523-26529.
- [262] A. Nadal, A. Coll, A. Avino, T. Esteve, R. Eritja, M. Pla, Efficient sequence-specific purification of *Listeria innocua* mRNA species by triplex affinity capture with parallel tail-clamps, *ChemBioChem* 7 (2006) 1039-1047.
- [263] M. Szabat, T. Pedzinski, T. Czapik, E. Kierzek, R. Kierzek, Structural Aspects of the Antiparallel and Parallel Duplexes Formed by DNA, 2'-O-Methyl RNA and RNA Oligonucleotides, *PLoS One* 10 (2015).
- [264] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [265] P. Guga, M. Janicka, A. Maciaszek, B. Rebowska, G. Nowak, Hoogsteen-paired homopurine [RP-PS]-DNA and homopyrimidine RNA strands form a thermally stable parallel duplex, *Biophys J* 93 (2007) 3567-3574.
- [266] J. Bhattacharyya, S. Maiti, S. Muhuri, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Effect of locked nucleic acid modifications on the thermal stability of noncanonical DNA structure, *Biochemistry* 50 (2011) 7414-7425.
- [267] R.G. Garcia, E. Ferrer, M.J. Macias, R. Eritja, M. Orozco, Theoretical calculations, synthesis and base pairing properties of oligonucleotides containing 8-amino-2'-deoxyadenosine, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 1991-1998.
- [268] S.S. Pujari, F. Seela, Parallel stranded DNA stabilized with internal sugar cross-links: synthesis and click ligation of oligonucleotides containing 2'-propargylated isoguanosine, *J Org Chem* 78 (2013) 8545-8561.
- [269] H. Mei, S.A. Ingale, F. Seela, Imidazolo-dC metal-mediated base pairs: purine nucleosides capture two Ag(+) ions and form a duplex with the stability of a covalent DNA cross-link, *Chemistry* 20 (2014) 16248-16257.
- [270] S.K. Jana, X. Guo, H. Mei, F. Seela, Robust silver-mediated imidazolo-dC base pairs in metal DNA: dinuclear silver bridges with exceptional stability in double helices with parallel and antiparallel strand orientation, *Chem Commun* 51 (2015) 17301-17304.
- [271] S.A. Ingale, P. Leonard, Q.N. Tran, F. Seela, Duplex DNA and DNA-RNA hybrids with parallel strand orientation: 2'-deoxy-2'-fluoroisocytidine, 2'-deoxy-2'-fluoroisoguanosine, and canonical nucleosides with 2'-fluoro substituents cause unexpected changes on the double helix stability, *J Org Chem* 80 (2015) 3124-3138.
- [272] S.A. Ingale, F. Seela, 7-Deaza-2'-deoxyguanosine: Selective Nucleobase Halogenation, Positional Impact of Space-Occupying Substituents, and Stability of DNA with Parallel and Antiparallel Strand Orientation, *J Org Chem* 81 (2016) 8331-8342.
- [273] X. Ming, P. Ding, P. Leonard, S. Budow, F. Seela, Parallel-stranded DNA: enhancing duplex stability by the 'G-clamp' and a pyrrolo-dC derivative, *Org Biomol Chem* 10 (2012) 1861-1869.
- [274] A. Accetta, A.G. Petrovic, R. Marchelli, N. Berova, R. Corradini, Structural Studies on Porphyrin-PNA Conjugates in Parallel PNA:PNA Duplexes: Effect of Stacking Interactions on Helicity, *Chirality* 27 (2015) 864-874.
- [275] G. Ashley, Modeling, synthesis, and hybridization properties of (L)-ribonucleic acid, *J Am Chem Soc* 114 (1992) 9731-9736.
- [276] M. Szabat, D. Gudanis, W. Kotkowiak, Z. Gdaniec, R. Kierzek, A. Pasternak, Thermodynamic Features of Structural Motifs Formed by beta-L-RNA, *PLoS One* 11 (2016) e0149478.
- [277] H. Fritzsche, A. Akhebat, E. Taillandier, K. Rippe, T.M. Jovin, Structure and drug interactions of parallel-stranded DNA studied by infrared spectroscopy and fluorescence, *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 5085-5091.
- [278] T. Ohmichi, Y. Kawamoto, P. Wu, D. Miyoshi, H. Karimata, N. Sugimoto, DNA-based biosensor for monitoring pH in vitro and in living cells, *Biochemistry* 44 (2005) 7125-7130.
- [279] L.A. Yatsunyk, O. Pietrement, D. Albrecht, P.L. Tran, D. Renciuik, H. Sugiyama, J.M. Arbona, J.P. Aime, J.L. Mergny, Guided assembly of tetramolecular G-quadruplexes, *ACS Nano* 7 (2013) 5701-5710.

- [280] L.A. Yatsunyk, O. Mendoza, J.L. Mergny, "Nano-oddities": unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices, *Acc Chem Res* 47 (2014) 1836-1844.
- [281] A.S. Benight, P. Pancoska, R. Owczarzy, P.M. Vallone, J. Nesetril, P.V. Riccelli, Calculating sequence-dependent melting stability of duplex DNA oligomers and multiplex sequence analysis by graphs, *Methods Enzymol* 340 (2001) 165-192.
- [282] G.E. Plum, Y.W. Park, S.F. Singleton, P.B. Dervan, K.J. Breslauer, Thermodynamic characterization of the stability and the melting behavior of a DNA triplex: a spectroscopic and calorimetric study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 9436-9440.
- [283] D. Murphy, R. Eritja, G. Redmond, Monitoring denaturation behaviour and comparative stability of DNA triple helices using oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) e65.
- [284] E.M. Moody, J.T. Lecomte, P.C. Bevilacqua, Linkage between proton binding and folding in RNA: a thermodynamic framework and its experimental application for investigating pKa shifting, *RNA* 11 (2005) 157-172.
- [285] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V.A. Erdmann, J.P. Furste, Mirror-image RNA that binds D-adenosine, *Nat Biotechnol* 14 (1996) 1112-1115.
- [286] M. Vallazza, M. Perbandt, S. Klussmann, W. Rypniewski, H.M. Einspahr, V.A. Erdmann, C. Betzel, First look at RNA in L-configuration, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (2004) 1-7.
- [287] W.G. Purschke, F. Radtke, F. Kleinjung, S. Klussmann, A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 3027-3032.
- [288] E. Wyszko, M. Szymanski, H. Zeichhardt, F. Muller, J. Barciszewski, V.A. Erdmann, Spiegelzymes: sequence specific hydrolysis of L-RNA with mirror image hammerhead ribozymes and DNAzymes, *PLoS One* 8 (2013) e54741.
- [289] J.T. Sczepanski, G.F. Joyce, Binding of a structured D-RNA molecule by an L-RNA aptamer, *J Am Chem Soc* 135 (2013) 13290-13293.
- [290] L. Yuan, T. Tian, Y. Chen, Z. Zhang, X. Zhou, An L-DNA G-quadruplex: application for peroxidase DNAzyme, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 32 (2013) 589-598.
- [291] Y. Kim, C.J. Yang, W. Tan, Superior structure stability and selectivity of hairpin nucleic acid probes with an L-DNA stem, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 7279-7287.
- [292] A. Garbesi, M.L. Capobianco, F.P. Colonna, L. Tondelli, F. Arcamone, G. Manzini, C.W. Hilbers, J.M. Aelen, M.J. Blommers, L-DNAs as potential antimessenger oligonucleotides: a reassessment, *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 4159-4165.
- [293] T.R. Sosnick, Characterization of tertiary folding of RNA by circular dichroism and urea, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* Chapter 11 (2001) Unit 11 15.
- [294] J. Liquier, E. Taillandier, R. Klinck, E. Guittet, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, Spectroscopic studies of chimeric DNA-RNA and RNA 29-base intramolecular triple helices, *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 1722-1728.
- [295] G. Song, J. Ren, Recognition and regulation of unique nucleic acid structures by small molecules, *Chem Commun (Camb)* 46 (2010) 7283-7294.
- [296] E.R. Kandimalla, G. Venkataraman, V. Sasisekharan, S. Agrawal, Single-stranded DNA and RNA targeted triplex-formation: UV, CD and molecular modeling studies of foldback triplexes containing different RNA, 2'-OMe-RNA and DNA strand combinations, *J Biomol Struct Dyn* 14 (1997) 715-726.
- [297] N. Sugimoto, P. Wu, H. Hara, Y. Kawamoto, pH and cation effects on the properties of parallel pyrimidine motif DNA triplexes, *Biochemistry* 40 (2001) 9396-9405.
- [298] D.M. Gowers, K.R. Fox, Towards mixed sequence recognition by triple helix formation, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 1569-1577.
- [299] H.X. Jiang, Y. Cui, T. Zhao, H.W. Fu, D. Koirala, J.A. Punnoose, D.M. Kong, H. Mao, Divalent cations and molecular crowding buffers stabilize G-triplex at physiologically relevant temperatures, *Sci Rep* 5 (2015) 9255.
- [300] M.J. Ferber, L.J. Maher, 3rd, Quantitating oligonucleotide affinities for duplex DNA: footprinting vs electrophoretic mobility shift assays, *Anal Biochem* 244 (1997) 312-320.

- [301] I. Okamoto, K. Seio, M. Sekine, Triplex forming ability of oligonucleotides containing 2'-O-methyl-2-thiouridine or 2-thiothymidine, *Bioorg Med Chem Lett* 16 (2006) 3334-3336.
- [302] E. Brunet, P. Alberti, L. Perrouault, R. Babu, J. Wengel, C. Giovannangeli, Exploring cellular activity of locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides and defining its molecular basis, *J Biol Chem* 280 (2005) 20076-20085.
- [303] <https://vignette1.wikia.nocookie.net/advanced-humans/images/0/0c/Image3.jpeg/revision/latest?cb=20141028143016>
- [304] H. Shindo, H. Torigoe, A. Sarai, Thermodynamic and kinetic studies of DNA triplex formation of an oligohomopyrimidine and a matched duplex by filter binding assay, *Biochemistry* 32 (1993) 8963-8969.
- [305] W.M. Olivas, L.J. Maher, 3rd, Binding of DNA oligonucleotides to sequences in the promoter of the human bc1-2 gene, *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 1758-1764.
- [306] T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, N. Sugimoto, Nucleobase-Modified PNA Suppresses Translation by Forming a Triple Helix with a Hairpin Structure in mRNA In Vitro and in Cells, *Angew Chem Int Ed Engl* 55 (2016) 899-903.
- [307] M.R. Rajeswari, DNA triplex structures in neurodegenerative disorder, Friedreich's ataxia, *J Biosci* 37 (2012) 519-532.
- [308] S.W. Paugh, D.R. Coss, J. Bao, L.T. Lauder milk, C.R. Grace, A.M. Ferreira, M.B. Waddell, G. Ridout, D. Naeve, M. Leuze, P.F. LoCascio, J.C. Panetta, M.R. Wilkinson, C.H. Pui, C.W. Naeve, E.C. Uberbacher, E.J. Bonten, W.E. Evans, MicroRNAs Form Triplexes with Double Stranded DNA at Sequence-Specific Binding Sites; a Eukaryotic Mechanism via which microRNAs Could Directly Alter Gene Expression, *PLoS Comput Biol* 12 (2016) e1004744.
- [309] S.H. Hsu, B.Z. Schacter, N.L. Delaney, T.B. Miller, V.A. McKusick, R.H. Kennett, J.G. Bodmer, D. Young, W.F. Bodmer, Genetic characteristics of the HeLa cell, *Science* 191 (1976) 392-394.
- [310] R. Panakanti, A. Pratap, N. Yang, J.S. Jackson, R.I. Mahato, Triplex forming oligonucleotides against type alpha1(I) collagen attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation, *Biochem Pharmacol* 80 (2010) 1718-1726.
- [311] D. Hnedzko, S.K. Cheruiyot, E. Rozners, Using triple-helix-forming Peptide nucleic acids for sequence-selective recognition of double-stranded RNA, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 58 (2014) 4 60 61-23.
- [312] H.T.S. Britton, R.A. Robinson, Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal *Journal of Chemical Society* (1931) 1456-1462.
- [313] B. Vester, J. Wengel, LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA, *Biochemistry* 43 (2004) 13233-13241.
- [314] H. Kaur, J. Wengel, S. Maiti, Thermodynamics of DNA-RNA heteroduplex formation: effects of locked nucleic acid nucleotides incorporated into the DNA strand, *Biochemistry* 47 (2008) 1218-1227.
- [315] E. Kierzek, A. Ciesielska, K. Pasternak, D.H. Mathews, D.H. Turner, R. Kierzek, The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 5082-5093.
- [316] E. Kierzek, A. Pasternak, K. Pasternak, Z. Gdaniec, I. Yildirim, D.H. Turner, R. Kierzek, Contributions of stacking, preorganization, and hydrogen bonding to the thermodynamic stability of duplexes between RNA and 2'-O-methyl RNA with locked nucleic acids, *Biochemistry* 48 (2009) 4377-4387.
- [317] E.A. Lesnik, S.M. Freier, Relative thermodynamic stability of DNA, RNA, and DNA:RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure, *Biochemistry* 34 (1995) 10807-10815.
- [318] A. Vater, S. Sell, P. Kaczmarek, C. Maasch, K. Buchner, E. Pruszynska-Oszmalek, P. Kolodziejewski, W.G. Purschke, K.W. Nowak, M.Z. Strowski, S. Klussmann, A mixed mirror-image DNA/RNA aptamer inhibits glucagon and acutely improves glucose tolerance in models of type 1 and type 2 diabetes, *J Biol Chem* 288 (2013) 21136-21147.

- [319] S.A. Shelke, J.A. Piccirilli, Origins of life: RNA made in its own mirror image, *Nature* 515 (2014) 347-348.
- [320] S. Martinez-Montero, S. Fernandez, Y.S. Sanghvi, V. Gotor, M. Ferrero, Enzymatic parallel kinetic resolution of mixtures of D/L 2'-deoxy and ribonucleosides: an approach for the isolation of beta-L-nucleosides, *J Org Chem* 75 (2010) 6605-6613.
- [321] K.R. Kim, T. Lee, B.S. Kim, D.R. Ahn, Utilizing the bioorthogonal base-pairing system of L-DNA to design ideal DNA nanocarriers for enhanced delivery of nucleic acid cargos, *Chemical Science* (2014) 1533-1537.
- [322] H. Urata, M. Akagi, Sequence dependence of thermodynamic stability of heterochiral DNA, *Tetrahedron Letters* 37 (1996) 5551-5554.
- [323] H. Urata, H. Shimizu, H. Hiroaki, D. Kohda, M. Akagi, Characterization of DNA, RNA and DNA/RNA duplexes containing an L-nucleotide, *Nucleic Acids Res Suppl* (2001) 243-244.
- [324] N.K. Christensen, T. Bryld, M.D. Sorensen, K. Arar, J. Wengel, P. Nielsen, Parallel nucleic acid recognition by the LNA (locked nucleic acid) stereoisomers beta-L-LNA and alpha-D-LNA; studies in the mirror image world, *Chem Commun (Camb)* (2004) 282-283.
- [325] S. Nakano, Y. Uotani, Y. Anno, M. Fujii, N. Sugimoto, Conformational change of a nucleotide by a base-pair mimic nucleoside in the complementary DNA strand, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (2004) 259-260.
- [326] P.I. Pradeepkumar, E. Zamaratski, A. Földesi, J. Chattopadhyaya, Conformation-specific cleavage of antisense oligonucleotide-RNA duplexes by RNase H, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (2001) 402-408.
- [327] A.N. Lane, S. Ebel, T. Brown, NMR assignments and solution conformation of the DNA.RNA hybrid duplex d(GTGAAGCTT).r(AAGUUCAC), *Eur J Biochem* 215 (1993) 297-306.
- [328] B. Furtig, C. Richter, J. Wohnert, H. Schwalbe, NMR spectroscopy of RNA, *Chembiochem* 4 (2003) 936-962.
- [329] H. Urata, Y. Ueda, H. Suhara, E. Nishioka, M. Akagi, Spectroscopic characterization of heterochiral DNAs, *Nucleic Acids Symp Ser* (1993) 69-70.
- [330] E.N. Nikolova, G.B. Goh, C.L. Brooks, 3rd, H.M. Al-Hashimi, Characterizing the protonation state of cytosine in transient G.C Hoogsteen base pairs in duplex DNA, *J Am Chem Soc* 135 (2013) 6766-6769.
- [331] J.R. Lakowicz, Introduction to fluorescence, in: J.R. Lakowicz (Ed.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Baltimore, 2006, pp. 1-25.
- [332] V.V. Didenko, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications, *Biotechniques* 31 (2001) 1106-1116, 1118, 1120-1101.
- [333] S. Reither, A. Jeltsch, Specificity of DNA triple helix formation analyzed by a FRET assay, *BMC Biochem* 3 (2002) 27.
- [334] S.A. Uhler, D. Cai, Y. Man, C. Figge, N.G. Walter, RNA degradation in cell extracts: real-time monitoring by fluorescence resonance energy transfer, *J Am Chem Soc* 125 (2003) 14230-14231.
- [335] J. Wang, T. Li, X. Guo, Z. Lu, Exonuclease III protection assay with FRET probe for detecting DNA-binding proteins, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) e23.

IX. ZAAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Finansowanie



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Praca została zrealizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS NCN nr 2011/03/ST5/01098 – „*Nowe podejścia nakierowane na modulacje selektywności i aktywności funkcjonalnej antysensowych oligonukleotydów*” (kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard Kierzek).

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

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

Załącznik 2. Curriculum vitae

WYKSZTAŁCENIE

2012 – aktualnie	Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Zakład:	Zakład Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych
Stanowisko:	doktorant
2009-2012	Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział:	Wydział Biologii
Kierunek:	Ochrona środowiska
Specjalność:	Hydrobiologia i ochrona wód
Tytuł:	licencjat
2009-2011	Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział:	Wydział Biologii
Kierunek:	Biotechnologia
Tytuł:	magister
2006-2009	Uniwersytet Łódzki w Łodzi
Wydział:	Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Kierunek:	Biotechnologia
Tytuł:	licencjat

DOŚWIADCZENIE

- 01.10.2012 – aktualnie Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów
Nukleinowych
Stanowisko: doktorant
- 01.04.2012-31.08.2012 Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
Wydział Biologii, Zakład Hydrobiologii
Stanowisko: asystent kierownika projektu

STAŻE NAUKOWE

- 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 podejścia nakierowane na modulacje selektywności i aktywności funkcjonalnej antysensowych oligonukleotydów*” – projekt OPUS NCN (2011/03/ST5/01098), **rola w projekcie: wykonawca.**
- „*Strukturalnie zdefiniowane oligonukleotydy. Badania struktury oraz uwarunkowań strukturalnych oddziaływań i funkcji RNA*” – projekt MAESTRO NCN (2013/08/A/ST5/00295), **rola w projekcie: wykonawca.**
- “*Termodynamiczne podstawy projektowania optymalnych funkcjonalnie, modyfikowanych siRNA oraz ich eksperymentalna weryfikacja*” – projekt SONATA BIS 3NCN (2013/10/E/NZ1/00741), **rola w projekcie: wykonawca.**
- “*Podstawy termodynamiczne oraz charakterystyka oddziaływań motywów strukturalnych RNA o odwróconej konfiguracji*” – projekt badawczy służący rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2015 (Działalność statutowa - finansowanie MNiSW), **rola w projekcie: kierownik.**
- “*Niekanoniczne formy DNA i RNA oraz ich właściwości strukturalne i biologiczne*” – projekt badawczy służący rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2017 (Działalność statutowa - finansowanie MNiSW), **rola w projekcie: kierownik.**

PUBLIKACJE

1. Ludwików A., Cieśla A., Kasproicz-Maluński A., Mituła F., Tajdel M., Gałgański Ł., Ziółkowski P.A., Kubiak P., Małecka A., Piechalak A., **Szabat M.**, Górska A., Dąbrowski M., Ibragimow I., Sadowski J. (2014) Arabidopsis

protein phosphatase 2C ABI1 interacts with type I ACC synthases and is involved in the regulation of ozone-induced ethylene biosynthesis *Molecular Plant* 7(6): 960-76

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. **Szabat M.**, Pedzinski T., Czapik T., Kierzek E., Kierzek R. (2015) Structural aspects of the antiparallel and parallel duplexes formed by DNA, 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides *PlosOne* 10(11): 1-16
4. **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): 1-11
5. **Szabat M.**, Kierzek R. (2017) Parallel-stranded DNA and RNA duplexes: unusual structures found in genomes– their structural features and potential applications in molecular biology (zaakceptowano)

KONFERENCJE

- „*Triplexes and parallel duplexes – fundamentals, advances and potential applications*” **Szabat M.**, Kierzek R., Theoretical Course “RNA Structure and Function”, 14-17.04.2014, Trieste
- „*Thermodynamic and structural features of heterochiral RNA duplexes*” **Szabat M.**, Kierzek R., 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 11-14.10.2015, Leiden
- „*RNA homo- and heteroduplexes with parallel strand orientation - thermodynamics, structure and potential implication for antisense design*” **Szabat M.**, 16-18.09.2015, **Obrzycko**
- „*The antiparallel and parallel duplexes – thermodynamic and structural studies*” **Szabat M.**, Czapik T., Kierzek R., Konferencja SYMBIOZA, 22-24.04.2016, Warszawa

NAGRODY

- | | |
|-----------------------|---|
| 2015 | Stypendium KNOW na udział w krajowej lub zagranicznej konferencji naukowej |
| 2013-2014 i 2014-2015 | Stypendium naukowe dla najlepszych doktorantów, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu |