

mgr Natalia Bartyś

Optymalizacja potencjału oligonukleotydów antysensowych w regulacji alternatywnego splicingu w nowotworowych liniach komórkowych

Alternatywny splicing to proces, któremu podlega 95% ludzkich genów. Umożliwia on produkcję więcej niż jednego białka z jednego genu. Proces ten zachodzi dzięki złożonemu kompleksowi białek, który umożliwia wycięcie niekodujących fragmentów i połączenie razem sekwencji kodujących daną izoformę. Alternatywny splicing jest kontrolowany przez białka (czynniki splicingowe), które rozpoznają specyficzne sekwencje w pre-mRNA i wpływają na identyfikację odpowiednich miejsc cięcia. Do czynników regulujących alternatywny splicing zaliczamy: białka, sekwencje w pre-mRNA, strukturę drugorzędową pre-mRNA oraz szybkość procesu transkrypcji. Wszelkie zmiany pojawiające się w elementach kontrolujących proces składania genów mogą doprowadzić do jego zaburzeń, w wyniku czego powstają transkrypty o zmienionej sekwencji nukleotydowej. Konsekwencją tego jest produkcja białek, które są nieaktywne, pełnią niepożądane funkcje lub ulegają szybkiej degradacji, co jest bezpośrednią przyczyną rozwoju chorób, takich jak nowotwory.

Wynikiem wieloletnich prac wielu grup badawczych jest opracowanie narzędzi molekularnych, których celem jest przywrócenie poprawnego wzorca składania genów. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe (ang. *bifunctional antisense oligonucleotides*, BASOs) składają się z dwóch funkcjonalnych części. Część antysensowa odpowiedzialna jest za przyłączenie oligonukleotydu do docelowej sekwencji pre-mRNA. Część regulatorowa zawiera sekwencję nukleotydów, która jest rozpoznawana przez czynniki splicingowe. Zastosowanie odpowiedniej sekwencji regulatorowej umożliwia ściągnięcie czynników splicingowych w pobliże regulowanej sekwencji pre-mRNA. Z kolei, oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing (ang. *splice switching oligonucleotides*, SSOs) komplementarnie hybrydują z sekwencjami regulatorowymi w pre-mRNA uniemożliwiając ich oddziaływanie z czynnikami splicingowymi.

W zaprezentowanej pracy podjęto próbę optymalizacji sekwencji i struktury BASOs, jak i sekwencji SSOs. Model badawczy stanowił gen *PKM*, w którym występują dwa wzajemnie wykluczające się eksony. Alternatywny splicing prowadzi do powstania dwóch transkryptów genu *PKM*: transkrypt PKM1 z eksonem 9 (bez eksonu 10) oraz transkrypt PKM2 z eksonem 10 (bez eksonu 9). Zwiększona produkcja izoformy PKM2 została zaobserwowana w wielu nowotworach. Udowodniono również zależność pomiędzy wysokim poziomem PKM2, a progresją nowotworu. Dlatego też głównym celem badań było zaprojektowanie i optymalizacja narzędzi molekularnych, które umożliwią efektywną regulację składania genu *PKM*.

Pierwszy etap eksperymentów dotyczył optymalizacji BASOs, podczas którego zaprojektowano sekwencję specyficzną oddziałującą z białkiem hnRNP A1, która została wykorzystana w części regulatorowej BASOs. Sekwencja ta została wybrana na podstawie danych literaturowych oraz oceny siły wiązania z rekombinowanym białkiem hnRNP A1, a także badań termodynamicznych. Następnie przeprowadzono eksperymenty w linii komórkowej HeLa, podczas których poddano optymalizacji miejsce hybrydyzacji BASOs w transkrypcie genu *PKM*. W kolejnym etapie ustalono liczbę powtórzeń sekwencji regulatorowej, które zapewniają największą efektywność BASOs. Wpływ BASOs na regulację alternatywnego splicingu został również sprawdzony w linii komórkowej SKOV-3. Z wykorzystaniem tej linii oceniono również, czy BASOs oddziałują na zdolność komórek SKOV-3 do migracji i inwazji.

W drugiej części badań podjęto próbę optymalizacji efektywności oligonukleotydu antysensowego zmieniającego splicing. Oligonukleotyd ten reguluje alternatywny splicing genu *PKM* poprzez hybrydyzację w eksonie 10. Według sugestii autorów, częściowy efekt regulacji może być zależny od oddziaływania oligonukleotydu z podobną sekwencją znajdującą się w intronie 9. Do sekwencji oligonukleotydu wprowadzono modyfikowane nukleotydy, które wpływają na jego preferencję do oddziaływania z sekwencją o pełnej komplementarności (ekson 10) oraz z sekwencją, która nie jest w pełni komplementarna (intron 9). Przeprowadzono eksperymenty termodynamiczne, w celu weryfikacji, w jaki sposób modyfikacje wpływają na stabilność tworzonych dupleksów oraz na dyskryminację niesparowań. W finalnym etapie, zaprojektowane oligonukleotydy transfekowano do linii komórkowej HeLa i oceniono wpływ modyfikacji na regulację alternatywnego splicingu genu *PKM*.

Wynikiem wykonanych eksperymentów jest optymalizacja efektywności dwóch typów narzędzi molekularnych regulujących alternatywny splicing genu *PKM*. Dowiedziono, że

BASOs wpływają nie tylko na regulację splicingu genu docelowego, ale również zmniejszają zdolność komórek nowotworowych do migracji oraz inwazji. Zaproponowano użycie modyfikowanych nukleotydów w sekwencji SSOs, które znacząco wpływają na preferencje oligonukleotydu do hybrydyzacji z docelowymi sekwencjami, co przekłada się na zmiany w efektywności regulowania procesu składania genu. Wykonane badania przyczynią się do rozwoju nowych oligonukleotydowych narzędzi terapeutycznych, które mogą zostać użyte w terapii chorób, których podłożem są zaburzenia alternatywnego splicingu.