

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu



Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych

mgr Natalia Bartyś

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

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

dr hab. Anna Pasternak, prof. ICHB PAN

Promotor pomocniczy:

dr inż. Jolanta Lisowiec-Wąchnicka

Poznań 2022



Rzeczpospolita
Polska



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.





N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Badania zostały sfinansowane z grantu

Narodowego Centrum Nauki

SONATA: 2016/21/D/NZ5/01906

Kierownik grantu:

dr inż. Jolanta Lisowiec-Wąchnicka

Składam serdeczne podziękowania dr hab. Annie Pasternak oraz dr inż. Jolancie Lisowiec-Wąchnickiej za wsparcie, wiarę we mnie, a także nieustanną motywację, czego owocem jest powstanie niniejszej pracy.

Dziękuję za poświęcony czas i wszystkie naukowe dyskusje, konsultacje oraz sugestie, które mają dla mnie nieocenioną wartość.

Dziękuję mojej Mamie za możliwość rozwoju i kształcenia się, wiarę,
motywację oraz wieloletnie wsparcie.

Dziękuję dr Zofii Jahnz-Wechmann,
dr Weronice Kotkowiak oraz mgr Carolinie Roxo
z Zakładu Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych
za pomoc, wszystkie naukowe, a także te mniej
naukowe dyskusje oraz wspólnie spędzony czas.

Spis treści

I.	WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY ..	10
II.	STRESZCZENIE	11
III.	ABSTRACT	14
IV.	CEL PRACY	16
V.	CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	18
1.	Transfer informacji genetycznej.....	18
2.	Mechanizm splicingu	19
3.	Składanie spliceosomu w reakcji splicingu.....	20
4.	Alternatywny splicing	22
5.	Elementy regulujące splicing konstytutywny oraz alternatywny	23
5.1	Sekwencje regulatorowe	24
5.2	Białka regulujące splicing.....	24
5.2.1	Białko hnRNP A1	25
5.2.2	Regulacja alternatywnego splicingu przez białko hnRNP A1	25
5.3	Regulacja splicingu przez strukturę II-rzędową pre-mRNA.....	27
5.4	Wpływ transkrypcji na regulację splicingu.....	31
6.	Znaczenie alternatywnego splicingu w rozwoju chorób	31
7.	Kinaza pirogronianowa i jej izoenzymy.....	34
8.	Alternatywny splicing genu <i>PKM</i>	36
9.	PKM2 a nowotworzenie.....	37
10.	Próby regulacji alternatywnego splicingu genu <i>PKM</i>	39
11.	Oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing.....	39
12.	Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe.....	42
VI.	WYNIKI I DYSKUSJA	47
1.	Wybór sekwencji regulatorowej BASO	47
2.	Optymalizacja BASOs w linii komórkowej HeLa	55
2.1	Optymalizacja części antysensowej BASOs.....	55
2.2	Optymalizacja części regulatorowej BASO w linii komórkowej HeLa	58
2.2.1	Optymalizacja powtórzeń sekwencji 5' UAGGU 3'	58
2.2.2	Wpływ sekwencji A3 na regulację alternatywnego splicingu	60
2.2.3	Optymalizacja powtórzeń sekwencji 5' CAGGUAAGU 3'	63
2.2.4	Rozgałęzione BASOs	65
3.	Ocena efektywności BASOs w linii komórkowej SKOV-3.....	68
4.	Ocena wpływu BASOs na migrację oraz inwazję komórek SKOV-3	73

5.	Optymalizacja sekwencji oligonukleotydu antysensowego zmieniającego splicing (SSO)	79
5.1	Wpływ reszt LNA i UNA na stabilność termodynamiczną tworzonych dupleksów..	81
5.2	Wpływ reszt LNA oraz UNA na dyskryminację niesparowań ..	88
6.	Wpływ modyfikowanych SSOs na regulację alternatywnego splicingu genu <i>PKM</i>	90
VII.	PODSUMOWANIE	96
VIII.	MATERIAŁY I METODY	99
1.	Materiały	99
1.1	Startery do reakcji qPCR	99
1.2	Odczynniki	99
1.3	Gotowe zestawy do badań biochemicznych	100
1.4	Roztwory i bufony	100
1.5	Pożywki	102
1.6	Żele poliakrylamidowe	104
1.7	Aparatura	104
2.	Metody	105
2.1	Synteza i odblokowanie oligonukleotydów DNA (startery do reakcji qPCR)	105
2.2	Synteza i odblokowanie oligonukleotydów RNA.....	105
2.3	Odsalanie oligonukleotydów na kolumnach zawierających Sephadex G- 25	106
2.4	Odsalanie oligonukleotydów na kolumnach Sep-Pak.....	106
2.5	Oczyszczanie oligonukleotydów w żelu poliakrylamidowym.....	107
2.6	Elucja i strącanie oligonukleotydu po oczyszczeniu w żelu poliakrylamidowym....	107
2.7	Oczyszczanie oligonukleotydów metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)108	
2.8	Transformacja komórek kompetentnych BL21(DE3) codon-plus (RIL).....	108
2.9	Nadekspresja białka hnRNP A1 w systemie ekspresyjnym <i>E. Coli</i> BL21 (DE3) codon plus.....	109
2.10	Oczyszczanie białka hnRNPA1 na złożu niklowym.....	109
2.11	Dializa i zagęszczanie rekombinowanego białka hnRNP A1	110
2.12	Test przesiewowy oligonukleotydów wiążących białko hnRNP A1	110
2.13	Wyznaczenie wartości Kd dla oddziaływania oligonukleotydów z rekombinowanym białkiem hnRNP A1	110
2.14	Topnienia oligonukleotydów regulatorowych w świetle UV	111
2.15	Badania termodynamiczne dupleksów SSO	111
2.16	Hodowla i pasaż komórek HeLa.....	112
2.17	Transfekcja linii komórkowej HeLa	112
2.18	Hodowla i pasaż komórek SKOV-3	113
2.19	Transfekcja linii komórkowej SKOV-3.....	113
2.20	Izolacja RNA z linii komórkowych HeLa oraz SKOV-3	113
2.21	Usunięcie zanieczyszczeń DNA i odwrotna transkrypcja	114

2.22 Ocena poziomu ekspresji mRNA izoform PKM1 i PKM2 za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR)	114
2.23 Przygotowanie wkładek z membraną do testu oceny inwazji komórek SKOV-3 ..	115
2.24 Ocena zdolności komórek SKOV-3 do migracji oraz inwazji.....	115
2.25 Utrwalenie i wybarwienie komórek migrujących i inwazyjnych	116
2.26 Obserwacja komórek migrujących i inwazyjnych.....	116
IX. BIBLIOGRAFIA.....	117

I. WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY

ΔG°_{37}	energia swobodna
ASOs	oligonukleotydy antysensowe (ang. <i>antisense oligonucleotides</i>)
BASOs	dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe (ang. <i>bifunctional antisense oligonucleotides</i>)
bBASOs	rozgałęzione dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe (ang. <i>branched bifunctional antisense oligonucleotides</i>)
bNA	rozgałęzione kwasy nukleinowe (ang. <i>branched nucleic acid</i>)
EMSA	technika opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
ESEs	eksonowe wzmacniacze splicingu (ang. <i>exonic splicing enhancers</i>)
ESSs	eksonowe wyciszacze splicingu (ang. <i>exonic splicing silencers</i>)
G4	G-kwadrupeks
ISEs	intronowe wzmacniacze splicingu (ang. <i>intronic splicing enhancers</i>)
ISSs	intronowe wyciszacze splicingu (ang. <i>intronic splicing silencers</i>)
Kd	stała dysocjacji (ang. <i>dissociation constant</i>)
LNAs	kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (ang. <i>locked nucleic acids</i>)
MOE	grupa metoksyetylowa (ang. <i>methoxyethyl group</i>)
UNAs	acykliczne kwasy nukleinowe (ang. <i>unlocked nucleic acids</i>)
PKM	kinaza pirogronianowa M (ang. <i>pyruvate kinase M</i>)
RRM	domena rozpoznająca RNA (ang. <i>RNA recognition motif</i>)
rpm	obroty na minutę (ang. <i>rotations per minute</i>)
snRNP	małe jądrowe rybonukleoproteiny (ang. <i>small nuclear ribonucleoprotein</i>)
SRE	sekwencje regulatorowe (ang. <i>splicing regulatory elements</i>)
ss	miejsce cięcia (ang. <i>splice site</i>)
SSOs	oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing (ang. <i>splice switching oligonucleotides</i>)
T_M	temperatura topnienia (ang. <i>melting temperature</i>)
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)

II. STRESZCZENIE

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.

III. ABSTRACT

Alternative splicing is a process which allows for the production of more than one protein from one gene. It is known that 95% of human genes undergo alternative splicing. This process is based on removing noncoding sequences from pre-mRNA and joining together fragments that encode the specific isoform. Alternative splicing is strictly controlled by many regulatory factors, including splicing proteins, regulatory sequences in the pre-mRNA, pre-mRNA secondary structures and the transcription kinetics. Every change or dysregulation that appears in these regulatory factors can result in alterations of alternative splicing pattern. In consequence, the formed transcripts encode the proteins that are easily degraded, inactive or play aberrant functions being a direct cause of various diseases development, including cancers.

In recent years, two types of molecular tools that are able to redirect alternative splicing have been developed by many research groups. Bifunctional antisense oligonucleotides are composed of two functional parts. Antisense part is responsible for hybridization of oligonucleotide to the target pre-mRNA sequence, whereas regulatory fragment contains the nucleotide sequence that is recognized by splicing proteins in cells. Therefore, the main function of regulatory part is to recruit splicing proteins to the target pre-mRNA sequence. On the other hand, splice switching oligonucleotides (SSOs) are designed to hybridize with regulatory sequences in the pre-mRNA and block their interactions with splicing proteins.

In the presented studies the attempts were made to optimize the sequence and structure of BASOs as well as the sequence of SSOs. The model gene for the regulation of alternative splicing by oligonucleotides was the *PKM* gene, which contains two mutually exclusive exons, *i.e.* exon 9 (present in PKM1 transcript) and exon 10 (present in PKM2 transcript). The increased production of PKM2 has been found in many cancers. Additionally, the influence of PKM2 on cancer progression is well documented. Therefore, the molecular tools were designed to redirect alternative splicing of *PKM* gene.

In the first part of the studies, the optimization of BASOs sequence and structure was performed. The regulatory part has been designed based on literature data, binding affinity determination and thermodynamic studies. Next, the experiments in HeLa cell line have been carried out to select the optimal hybridization position in the *PKM* pre-

mRNA. Additionally, the efficiency of different number of repeats of regulatory binding motifs has been assessed. Finally, the regulatory properties of BASOs have been tested in SKOV-3 cell line. What is more, the influence of BASOs on SKOV-3 cells ability to migrate and invade was assessed.

The aim of the second part of the studies was to optimize the regulatory efficiency of splice switching oligonucleotide which interacts with sequence in exon 10 and influence on PKM alternative splicing pattern. The authors suggest that the effect is partially caused by simultaneous hybridization with the similar sequence in intron 9. In the presented studies, the modified nucleotides have been introduced into the oligonucleotide to modulate its preferences to hybridize with full complementary sequence (exon 10) and the sequence of intron 9 that forms mismatches with SSO. To assess the impact of modified nucleotide residues on duplex stability and mismatch discrimination, the thermodynamic studies have been performed. In the final step, the newly designed SSOs have been transfected to HeLa cell line and their regulatory effect on splicing was evaluated.

The main result of performed studies is the optimization of two different molecular tools that can be used to regulate alternative splicing of *PKM* gene. It has been proved that designed BASOs are able not only to redirect splicing of target gene but also to influence on migration and invasion properties of SKOV-3 cell line. Additionally, it has been presented that the two types of modified nucleotides significantly change the hybridization properties of SSOs what have strong impact on the *PKM* gene alternative splicing regulation. The presented results can contribute to development of new oligonucleotide based tools that can be used in the therapy of diseases that are caused by aberrant alternative splicing.

IV. CEL PRACY

Alternatywny splicing to proces, który umożliwia produkcję więcej niż jednego białka z jednego genu, przyczyniając się tym samym do zwiększenia różnorodności białek w organizmie. Niestety, wszelkie zaburzenia w procesie składania genów mogą prowadzić do powstania białek, które są nieaktywne, pełnią odmienną funkcję lub ulegają szybkiej degradacji. Dlatego też, zmiany wzorca alternatywnego splicingu prowadzą do rozwoju wielu ciężkich chorób, w tym chorób nowotworowych. Jest to przyczyną poszukiwania nowych narzędzi molekularnych, które mogą zostać użyte do przywrócenia poprawnego wzorca składania genów.

Celem niniejszej pracy była optymalizacja dwóch rodzajów oligonukleotydów, które mogą zostać wykorzystane do regulacji alternatywnego splicingu w komórkach nowotworowych. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe składają się z dwóch funkcjonalnych części: antysensowej oraz regulatorowej, które podczas projektowania należy poddać szczegółowej optymalizacji. W niniejszej pracy skupiono się przede wszystkim na optymalizacji części regulatorowej skierowanej na oddziaływanie z wyciszaczem splicingu - białkiem hnRNP A1. W tym celu, przeprowadzono szczegółowe poszukiwania najbardziej efektywnej sekwencji regulatorowej z wykorzystaniem rekombinowanego białka hnRNP A1. Następnie, wykonano eksperymenty na liniach komórkowych HeLa oraz SKOV-3, celem określenia, w jaki sposób BASOs wpływają na regulację alternatywnego splicingu genu *PKM*. Dodatkowo, oceniono czy obserwowane zmiany w składaniu genu *PKM* rzutują na właściwości inwazyjne komórek SKOV-3.

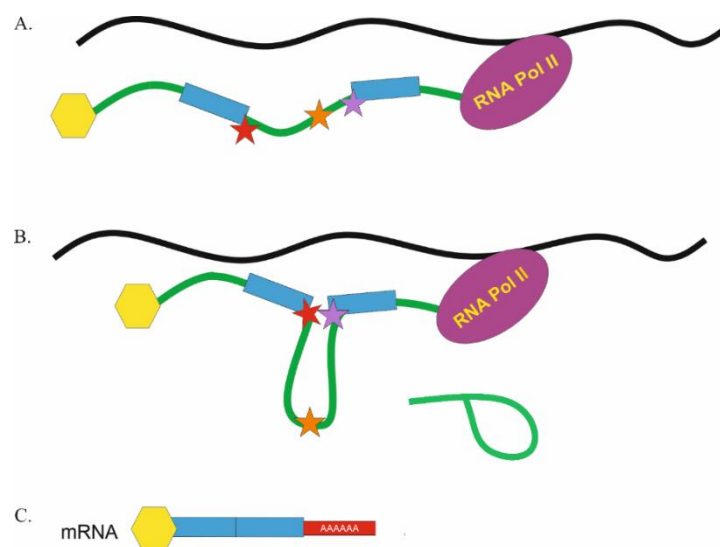
Kolejnym narzędziem molekularnym używanym do regulacji alternatywnego splicingu są oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing. W oparciu o opublikowaną wcześniej sekwencję oligonukleotydu zmieniającego splicing genu *PKM*, przeprowadzono optymalizację budowy chemicznej tego oligonukleotydu poprzez wprowadzenie modyfikowanych nukleotydów. W tym celu wykonano badania termodynamiczne, a następnie eksperymenty na linii komórkowej HeLa, które pozwoliły ocenić, w jaki sposób modyfikowane nukleotydy wpływają na efektywność regulacji splicingu przez SSO.

Przeprowadzone badania znacząco poszerzyły dostępne informacje o czynnikach wpływających na efektywność BASOs. Dostarczyły również wiadomości, w jaki sposób można wykorzystać modyfikowane nukleotydy dla poprawienia efektu regulatorowego SSO.

V. CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Transfer informacji genetycznej

Informacja genetyczna zapisana jest we wszystkich żywych organizmach w DNA. Według centralnego dogmatu biologii molekularnej, sformułowanego przez Francisca Crick'a, przepływ informacji genetycznej następuje od DNA poprzez RNA do białka. Te pierwotne założenia w kolejnych latach zostały uaktualnione o nowe możliwości przepływu informacji w komórce, takie jak chociażby odwrotna transkrypcja [1]. Przepisanie informacji genetycznej z DNA na RNA następuje w procesie transkrypcji. Tworzona podczas transkrypcji cząsteczka pre-mRNA ulega następnie dojrzewaniu, które obejmuje zabezpieczenie końca 5' czapką w postaci 7-metyloguanozyny (ang. *capping*), splicing, a także poliadenylację, czyli proces dodania szeregu reszt adenozyny na końcu 3' pre-mRNA (Rys. 1). Dojrzała cząsteczka mRNA jest następnie transportowana do cytoplazmy, gdzie w procesie translacji służy jako matryca do produkcji białka.



Rysunek 1. Najważniejsze procesy dojrzewania pre-mRNA. **A.** Polimeraza RNA przeprowadza transkrypcję. Koniec 5' zostaje zabezpieczony 7-metyloguanozyną (żółty sześciokąt). Miejsca splicingowe zostają rozpoznane przez elementy spliceosomu. **B.** Rozpoczęcie reakcji transestryfikacji. **C.** Wycięcie intronu i poliadenylacja na końcu 3'. Kolorowe gwiazdki reprezentują konserwatywne regiony niezbędne do przeprowadzenia reakcji transestryfikacji (czerwona gwiazdka – miejsce 5'ss, pomarańczowa gwiazdka – miejsce rozgałęzienia, fioletowa gwiazdka – miejsce 3'ss).

2. Mechanizm splicingu

Geny składają się z jednostek niekodujących, które nazywane są intronami oraz jednostek kodujących, czyli eksonów. Konstytutywny splicing polega na wycięciu intronów i połączeniu ze sobą kodujących eksonów, w wyniku czego powstaje cząsteczka mRNA, która po kolejnych etapach dojrzewania, może zostać użyta w procesie translacji. Poprawny mechanizm reakcji wycinania intronów jest zależny od konserwatywnych sekwencji obecnych w pre-mRNA, które określają, w którym miejscu ma nastąpić wycięcie intronów i połączenie eksonów (Rys. 2). Do tych sekwencji zaliczamy miejsce 5' splicingowe (ang. *5' splice site*, 5'ss) oraz miejsce 3' splicingowe (ang. *3' splice site*, 3'ss), które definiowane jest przez więcej niż jedną sekwencję konserwatywną.



Rysunek 2. Lokalizacja konserwatywnych sekwencji, które są niezbędne dla odpowiedniego wycinania niekodujących fragmentów RNA.

Miejsce 5' splicingowe (miejsce donorowe) znajduje się na końcu 5' intronu. Jako miejsce 5'ss definiuje się fragment ośmiu reszt nukleotydowych obejmujących połączenie eksonu i intronu (Rys. 2). U ssaków schematyczny zapis tego miejsca jest następujący: 5' YAG/GURAGU 3', gdzie Y to reszta nukleotydu pirymidynowego, R- reszta nukleotydu purynowego, a ukośnik odpowiada miejscu połączenia eksonu i intronu. Za rozpoznanie miejsca 5'ss odpowiedzialna jest rybonukleoproteina U1 (ang. *U1 small nuclear ribonucleoprotein*, U1 snRNP), która zawiera konserwatywną sekwencję RNA komplementarną do miejsca 5'ss.

Miejsce 3' splicingowe (miejsce akceptorowe) zlokalizowane jest na 3' końcu intronu. W przeciwieństwie do 5'ss, miejsce akceptorowe nie obejmuje tylko jednej sekwencji w cząsteczce pre-mRNA. W jego skład wchodzi trakt polipirymidynowy (ang. *polypyrimidine tract*, PPT), w którym występuje duża ilość reszt nukleotydów pirymidynowych. Granica końca 3' intronu i końca 5' eksonu obejmuje sekwencje NYAG/G, gdzie N to każda możliwa reszta nukleotydowa, a Y- reszta nukleotydu pirymidynowego. Dodatkowo do elementów RNA niezbędnych do poprawnego rozpoznania miejsca akceptorowego należy zaliczyć miejsce rozgałęzienia (ang. *branch point sequence*, BP) o sekwencji 5' YNYURAY 3', gdzie Y to reszta cytydyny

lub urydyny, a N – każda możliwa reszta nukleotydowa (Rys. 2). To właśnie z tą sekwencją w początkowym etapie tworzenia spliceosomu oddziałuje rybonukleoproteina U2 (U2 snRNP). Najważniejszym nukleotydem tej sekwencji jest reszta adenozy [2].

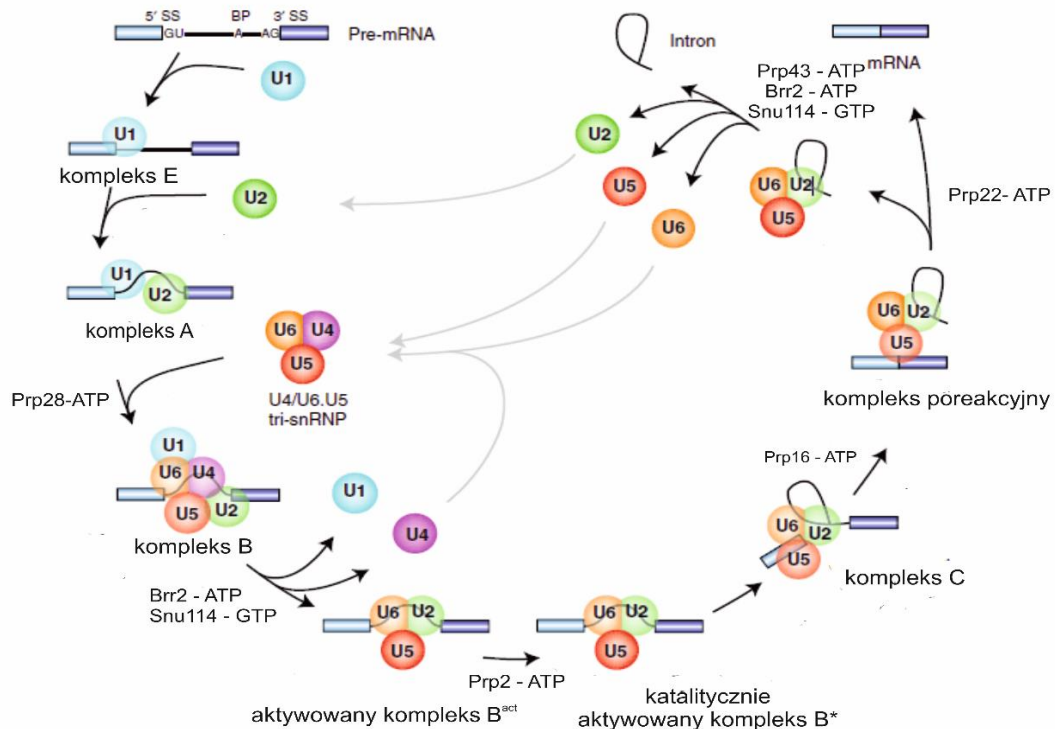
Pod względem chemicznym podczas splicingu dochodzi do dwóch reakcji transestryfikacji. Pierwsza reakcja rozpoczyna się od ataku nukleofilowego grupy 2'-hydroksylowej reszty adenozy w miejscu rozgałęzienia na centrum fosforowe miejsca 5'ss. W wyniku tego następuje rozerwanie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy ostatnią resztą nukleotydową eksonu na końcu 3', a 5' końcową resztą nukleotydową intronu, z jednoczesnym utworzeniem wiązania 2'-5' fosfodiesterowego pomiędzy resztą adenozy znajdującą się w miejscu rozgałęzienia, a resztą nukleotydową na końcu 5' intronu. Druga reakcja transestryfikacji rozpoczyna się od ataku nukleofilowego z uwolnionej grupy 3'-hydroksylowej eksonu na centrum fosforowe w miejscu 3'ss wycinanego intronu. Ostatecznie, w wyniku tych reakcji, dochodzi do utworzenia wiązania fosfodiesterowego pomiędzy dwoma eksonami, a intron w postaci struktury lassa, zostaje wycięty z pre-mRNA [3].

U ssaków introny są zazwyczaj znacznie dłuższe od eksonów, co jest jednym z czynników wpływających na poprawną identyfikację fragmentów kodujących. Teoria definicji eksonu mówi o tym, że czynniki białkowe zaangażowane w proces splicingu rozpoznają miejsce cięcia okalające krótkie eksony [4,5]

3. Składanie spliceosomu w reakcji splicingu

Proces splicingu katalizowany jest przez złożony kompleks rybonukleoprotein nazywany spliceosomem. Istotnym faktem jest to, że spliceosom musi być do każdej reakcji splicingu składany na nowo [6]. Najważniejszymi i najliczniejszymi składnikami spliceosomu są rybonukleoproteiny, które składają się z małego jądrowego RNA (ang. *small nuclear RNA*, snRNA) oraz z białek Sm. Pierwszym i najistotniejszym etapem składania pre-mRNA jest rozpoznawanie miejsc splicingowych. Za rozpoznanie miejsca donorowego odpowiedzialna jest rybonukleoproteina U1. Dochodzi tu do komplementarnego oddziaływania pomiędzy fragmentem RNA z cząsteczki U1 snRNP, a sekwencją miejsca splicingowego. Na wczesnym etapie składania spliceosomu elementy miejsca 3'ss są rozpoznawane przez białko SF1/BBP oraz U2AF. SF1/BBP wiąże się z miejscem rozgałęzienia. Czynnikiem U2AF składa się z dwóch podjednostek U2AF³⁵ oraz U2AF⁶⁵, które wiążą się odpowiednio z dwunukleotydowym

fragmentem AG w miejscu 3'ss oraz traktem polipirymidynowym. Tak utworzony kompleks nazywa się wczesnym kompleksem (kompleks E) (Rys. 3). Następnie, U2 snRNP hybryduje z miejscem rozgałęzienia, zastępując tym samym SF1/BBP. Kompleks E przekształca się w kompleks A (Rys. 3). Kolejno, do spliceosomu dołączają U4/U6 oraz U5 snRNPs tworząc kompleks B (Rys. 3). U1 snRNP jest odłączane od miejsca donorowego, a U6 snRNA paruje się z resztami nukleotydowymi intronu w tym miejscu, tworząc aktywny kompleks B (B^{act}) (Rys. 3). Dodatkowo U6 oddziałuje również z U2 snRNP, dzięki czemu dochodzi do przybliżenia do siebie miejsca 5'ss i BP. U6 snRNP pełni kluczową rolę w katalitycznej aktywności spliceosomu. Utworzony katalitycznie aktywowany kompleks B^* katalizuje pierwszą reakcję transestryfikacji, podczas której uwalniana jest grupa hydroksylowa 3' końcowej reszty nukleotydowej eksonu (Rys. 3). Kompleks elementów spliceosomu z produktem pierwszej reakcji transestryfikacji nazywa się kompleksem C. W następnej reakcji transestryfikacji, gotowe mRNA jest uwalniane, a elementy spliceosomu oddysocjują i mogą brać udział w kolejnych reakcjach składania (Rys. 3).



Rysunek 3. Etapy tworzenia kompleksu spliceosomu podczas reakcji składania genu (na podstawie - [7]).

Przeprowadzenie dwóch reakcji transestryfikacji, przy udziale tak dużego kompleksu białkowego wymaga dynamicznych rearanżacji oddziaływań RNA-RNA

oraz RNA-białko. Dlatego nieodłącznym elementem spliceosomu są helikazy o aktywności ATP-azy. Helikaza Prp28 usuwa U1 snRNP z miejsca 5'ss i umożliwia jednocześnie parowanie się z U6 snRNP. U6 snRNP, zanim połączy się z 5'ss, tworzy dupleks ze swoim stałym partnerem U4 snRNP, który może być określony jako antysensowy negatywny regulator. Rozdzielenie tego dupleksu katalizuje helikaza Brr2. Przekształcenie kompleksu B^{act} w kompleks katalitycznie aktywny B* odbywa się dzięki helikazie Prp2, w wyniku czego dochodzi do pierwszego etapu transestryfikacji. Druga reakcja transestryfikacji możliwa jest dzięki helikazie Prp16. Cząsteczka mRNA bez sekwencji niekodujących jest uwalniana z kompleksu poreakcyjnego w obecności helikazy Prp22. Ostatnim etapem, w który zaangażowane są helikazy (Prp34, Brr2, Snu114) jest uwolnienie U4, U5 i U6 RNP od wyciętego intronu [7].

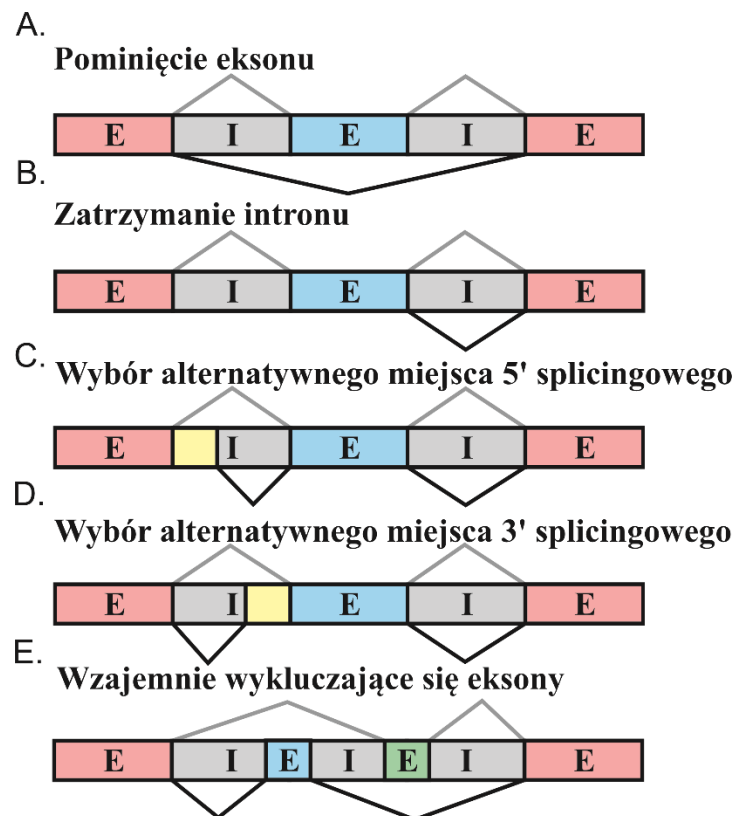
4. Alternatywny splicing

W organizmie człowieka zidentyfikowano około 19 000 genów [8]. Liczba ta nie jest wystarczająca, żeby pokryć zapotrzebowanie złożonego organizmu na ilość białek niezbędnych dla jego funkcjonowania. Jednym z procesów, które umożliwiają zwiększenie ilości oraz różnorodności białek jest alternatywny splicing. Proces ten umożliwia powstanie więcej niż jednego białka (izoformy) z jednego genu. Uważa się, że około 95% genów człowieka ulega alternatywnemu splicingowi [9]. Zmiany w sekwencji mRNA powstałe na skutek alternatywnego splicingu powodują, że produkowane białka mogą pełnić zupełnie inne, często przeciwstawne funkcje. Wyróżnia się kilka mechanizmów, jakimi alternatywny splicing prowadzi do produkcji różnych izoform z tego samego genu:

- ❖ **pominięcie jednego z eksonów** (Splicing jednego z kodujących eksonów zostaje zahamowany, przez co zostaje on pominięty i wycięty z pre-mRNA.) (Rys. 4 A),
- ❖ **zatrzymanie jednego z intronów** (Introny to sekwencje niekodujące, które podczas konstytutywnego splicingu zostają usunięte z mRNA, jednak w przypadku alternatywnego splicingu możliwe jest zatrzymanie intronu w dojrzałej cząsteczce mRNA.) (Rys. 4 B),
- ❖ **wybór alternatywnych miejsc 5' oraz 3' splicingowych** (W pre-mRNA występuje dużo potencjalnych miejsc splicingowych, które mogą być rozpoznane przez elementy spliceosomu. Alternatywne miejsca splicingowe są zazwyczaj

słabsze, a ich rozpoznanie stymulowane jest obecnością dodatkowych elementów regulatorowych.) (Rys. 4 C i D),

- ❖ **wzajemnie wykluczające się eksony** (W przypadku tego mechanizmu, w pre-mRNA występują eksony, które nie mogą ulegać splicingowi jednocześnie. Jeśli w pre-mRNA występują dwa wzajemnie wykluczające się eksony, wynikiem alternatywnego splicingu jest produkcja dwóch izoform, z których każda zawiera inny ekson.) (Rys. 4 E) [10].



Rysunek 4. Rodzaje alternatywnego splicingu.

5. Elementy regulujące splicing konstytutywny oraz alternatywny

Składanie genów kontrolowane jest przez szereg czynników regulatorowych, do których należą sekwencje regulatorowe w pre-mRNA, białka splicingowe, struktura II-rzędowa RNA oraz sposób prowadzenia transkrypcji przez polimerazę II. Każdy z wymienionych czynników zostanie szczegółowo omówiony poniżej.

5.1 Sekwencje regulatorowe

Pomimo, że w czasie reakcji splicingu, w miejscach cięcia występuje szereg konserwatywnych sekwencji RNA, to bardzo często do poprawnego rozpoznania miejsc splicingowych wymagane są dodatkowe sekwencje regulatorowe (ang. *splicing regulatory elements*, SREs). Wynika to z faktu, że w wielu miejscach splicingowych nie występuje pełna komplementarność z fragmentami RNA występującymi w rybonukleoproteinach, które są odpowiedzialne za ich rozpoznanie. Stopień komplementarności miejsca donorowego z U1 snRNA świadczy o jego sile. Im większa komplementarność, tym większe prawdopodobieństwo, że U1 snRNP rozpozna dane miejsce splicingowe. Dupleks RNA-RNA utworzony pomiędzy pre-mRNA, a U1 snRNA może mieć długość maksymalnie 11 par zasad. Nie wszystkie pozycje par zasad są tak samo istotne dla rozpoznania miejsca splicingowego. Najbardziej konserwatywne pozycje to dwie pierwsze reszty nukleotydowe intronu (+1G i +2U), następnie ostatnia reszta nukleotydowa eksonu (-1G) oraz reszta nukleotydowa w pozycji +5G intronu [11]. Funkcją sekwencji regulatorowych jest zatem wzmocnienie słabych miejsc splicingowych. SREs pełniące takie funkcje nazywamy wzmacniaczami splicingu. W pre-mRNA występują również sekwencje regulatorowe pełniące funkcje wyciszające splicing. SREs mogą być zlokalizowane zarówno w eksonach jak i w intronach, dlatego też można je podzielić na: eksonowe wzmacniacze splicingu (ang. *exonic splicing enhancers*, ESEs) i intronowe wzmacniacze splicingu (ang. *intronic splicing enhancers*, ISEs), eksonowe wyciszacze splicingu (ang. *exonic splicing silencers*, ESSs) i intronowe wyciszacze splicingu (ang. *intronic splicing silencers*, ISSs). Sekwencje te rozpoznawane są przez białka regulatorowe (czynniki splicingowe), które ze względu na pełnioną funkcję, również można określić wzmacniaczami splicingu lub wyciszaczami splicingu [10].

5.2 Białka regulujące splicing

Główną grupę białek, które są odpowiedzialne za wzmocnienie rozpoznawania miejsc splicingowych są białka z rodziny białek serynowo-argininowych (ang. *serine-arginine proteins*, SRs). Białka te składają się z domen o funkcji rozpoznającej RNA (ang. *RNA recognition motif*, RRM) oraz z domeny bogatej w serynę i argininę (ang. *SR domain*). Domeny RRM są odpowiedzialne za rozpoznanie docelowych specyficznych sekwencji w pre-mRNA. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem działania białek wzmacniających splicing jest oddziaływanie domeny SR białka

wzmacniającego połączonego z ESE (lub ISE) z innymi białkami zaangażowanymi w proces składania [12,13]. Uważa się, że w ten sposób białka SR wspomagają oddziaływanie U1 snRNP z miejscem 5'ss. Na aktywność domeny SR ma wpływ jej ufosforylowanie. Tylko domena SR z odpowiednią ilością grup fosforanowych może oddziaływać z domeną RRM U1 70K, które wchodzi w skład U1 snRNP [12]. Przedstawiono jednak również dowody na to, że domena SR najpierw oddziałuje bezpośrednio z pre-mRNA, a dokładnie z miejscem rozgałęzienia, promując w ten sposób składanie spliceosomu [13].

Wyciszenie splicingu danego eksonu wiąże się z aktywnością białek z rodziny hnRNP (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). Jednym z najważniejszych przedstawicieli tej rodziny jest białko hnRNP A1.

5.2.1 Białko hnRNP A1

hnRNP A1 należy do rodziny białek hnRNP, w skład której wchodzi około 20 różnych białek. Najważniejsze z nich są nazywane literami od A do U. Białko hnRNP A1 składa się z trzech funkcjonalnych domen. Dwie domeny rozpoznające RNA znajdują się na N-końcu białka. Domena bogata w glicynę (ang. *glycine-rich domain*) jest zlokalizowana na C-końcu białka i zawiera kolejną domenę wiążącą RNA (ang. *RGG box*) oraz sekwencję sygnałową M9, umożliwiającą transport białka hnRNP A1 do jądra komórkowego [14]. Domeny RRM są niezbędne dla pełnienia funkcji regulatora splicingu przez białko hnRNP A1. Udało się ustalić optymalne sekwencje RNA, które są specyficznym rozpoznawane przez każdą z domen [15]. Domena RRM1 rozpoznaje sekwencje 5' U/CAGG 3'. Natomiast, domena RRM2 specyficznym rozpoznaje sekwencje 5' YAGN 3', gdzie Y oznacza resztę nukleotydu pirymidynowego, a N – każdą możliwą resztę nukleotydową. Najnowsze badania strukturalne z użyciem fragmentu pre- mRNA genu *SMN1* udowadniają, że dwie domeny RRM jednej cząsteczki białka hnRNP A1 mogą jednocześnie wiązać się do dwóch sekwencji, w których występują dwa rejony dwunukleotydowe AG. W wyniku tego wiązania reszty nukleotydowe pomiędzy powyższymi dwunukleotydowymi rejonami zostają wypętlone [15].

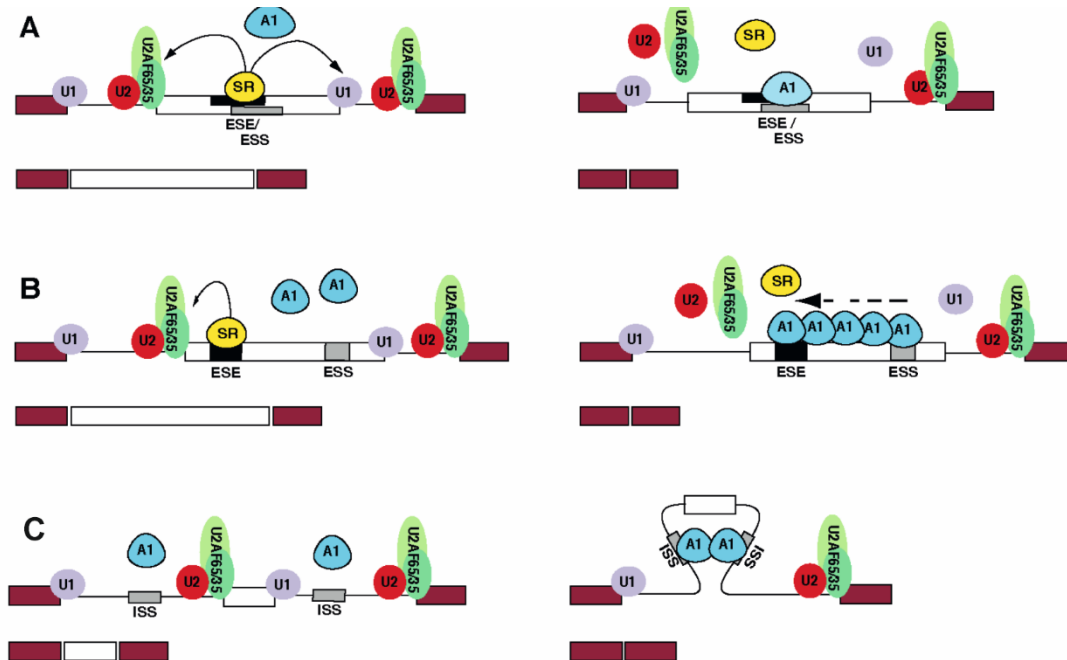
5.2.2 Regulacja alternatywnego splicingu przez białko hnRNP A1

Białko hnRNP A1 zaangażowane jest w wiele procesów komórkowych, takich jak transkrypcja, translacja, eksport mRNA, a także splicing [14]. Związanie hnRNP A1 z sekwencjami wyciszającymi obecnymi w eksonach lub intronach hamuje

rozpoznawanie miejsc splicingowych. Białko to funkcjonuje zatem jako wyciszacz splicingu. Zaproponowano różne mechanizmy, jakimi hnRNP A1 wpływa na proces składania genów. Jednym z podstawowych sposobów regulacji splicingu przez białko hnRNP A1 jest konkurowanie o miejsce wiązania z białkami wzmacniającymi splicing [14]. Bardzo często ESSs pokrywają się z ESEs, przez co zarówno białka wyciszające jak i wzmacniające mogą oddziaływać w tym samym miejscu (Rys. 5 A) [16,17]. Wpływ na to, które białko ostatecznie zwiąże się z sekwencją regulatorową, może mieć poziom ekspresji konkurujących ze sobą białek. Nadekspresja białka hnRNP A1 powoduje, że zwiąże się ono z sekwencjami, które przy zmniejszonym poziomie jego ekspresji, są związane z białkami wzmacniającymi splicing [18]. Przykładowo, podwyższony poziom białka hnRNP A1 przyczynia się do pominięcia eksonu 5 genu *IGF1*, podczas gdy nadekspresja białka SRSF1 powoduje odwrotny efekt [18]. W opisanym wyżej eksperymencie zastosowano konstrukt minigeny *IGF1* z wstawioną sekwencją 5' AGGA 3'. Sekwencja 5' GGA 3' jest rozpoznawana przez białko SRSF1, natomiast sekwencja 5' AGG 3' przez białko hnRNP A1 [18].

Kolejny mechanizm regulacji splicingu przez białko hnRNP A1 jest związany ze zdolnością tego białka do kooperatywnego wiązania sekwencji. Zaproponowano mechanizm, podczas którego, hnRNP A1 rozpoznaje specyficzną sekwencję wyciszającą, a następnie kolejne cząsteczki białka hnRNP A1 oddziałują ze sobą, wiążąc się kolejno z RNA w kierunku 3'-5' RNA (Rys. 5 B) [19]. Kooperatywne wiązanie białek powoduje usunięcie innych czynników splicingowych związanych z sekwencjami wzmacniającymi lub uniemożliwia im oddziaływanie z pre-mRNA. W ten sposób białko hnRNP A1 eliminuje czynniki, które mogłyby się przyczynić do wzmocnienia splicingu [19]. Następny proponowany mechanizm hamowania procesu składania genu dotyczy wypełniania danego fragmentu pre-mRNA poprzez oddziaływanie białka hnRNP A1 z sekwencjami okalającymi wypełniany fragment (Rys. 5 C) [14]. Ponownie dochodzi tu do wiązania się z sobą dwóch cząsteczek białka hnRNP A1 za pomocą domeny bogatej w glicynę. Tym razem jednak, oddziaływania te powodują wypełnienie fragmentu pre-mRNA z jednoczesnym zbliżeniem do siebie miejsca 5'ss eksonu poprzedzającego wypełniany fragment z miejscem 3'ss eksonu występującym po fragmencie tworzącym

pętlę. Ten mechanizm został zaproponowany dla regulacji alternatywnego splicingu eksonu 7B genu *hnRNP A1* [20].



Rysunek 5. Mechanizmy wyciszania splicingu przez białko hnRNP A1. **A.** Sekwencje regulatorowe rozpoznawane przez białka SR oraz hnRNP A1 nakładają się. **B.** Kooperatywne oddziaływanie białek hnRNP A1 usuwa inne czynniki splicingowe połączone z pre-mRNA. **C.** Dwa białka hnRNP A1 wiążą oddalone od siebie sekwencje wyciszające splicing, dzięki czemu dochodzi do wypełnienia wyciszanej sekwencji (na podstawie - [14]).

5.3 Regulacja splicingu przez strukturę II-rzędową pre-mRNA

Istotny wpływ na regulację splicingu ma również struktura II-rzędowa RNA. Cząsteczka pre-mRNA może tworzyć małe motywy strukturalne, takie jak spinki do włosów czy G-kwadrupeksy, jak również być uwikłana w oddziaływania dalekiego zasięgu. Wpływ motywów strukturalnych na regulację splicingu może być zarówno wzmacniający jak i wyciszający. Motywy strukturalne mogą być miejscem wiązania specyficznych białek regulatorowych, które wykazują powinowactwo do struktur II-rzędowych [21,22]. Z drugiej strony, zamaskowanie miejsc regulatorowych w strukturze II-rzędowej może uniemożliwić niektórym białkom oddziaływanie z ich docelową sekwencją [23].

Spinki do włosów to struktury, które zawierają trzon w postaci podwójnej helisy oraz jednoniciową pętlę. Utworzenie takiej struktury ma istotny wpływ na oddziaływanie białek splicingowych z ich sekwencjami docelowymi. Lokalizacja sekwencji regulatorowej w trzonie spinki może skutkować mniejszą dostępnością dla białek regulatorowych, oddziałujących z sekwencją jednoniciową, a zatem utratą funkcji elementu regulatorowego. Z drugiej strony pętla spinki zwiększa wyeksponowanie SRE, przez co oddziaływanie z białkami jest łatwiejsze [21,23]. Dodatkowo, utworzenie spinki ma znaczący wpływ na dostępność miejsc splicingowych dla rybonukleoprotein. Udowodniono, że alternatywne miejsca splicingowe bardzo często tworzą strukturę II-rzędową, co świadczy o tym, że struktura spinki do włosów jest jednym z czynników regulatorowych wpływających na wybór alternatywnych miejsc splicingowych [24].

Jednym z ważniejszych przykładów genów, w którego regulację alternatywnego splicingu jest zaangażowana struktura II-rzędowa pre-mRNA, jest gen *MAPT* [25]. Gen ten koduje białko tau. *MAPT* składa się z 16 eksonów, z których 8 może ulegać alternatywnemu splicingowi. Ekson 10 koduje jedną z czterech domen wiążących mikrotubule. Izoforma białka tau, która zawiera wszystkie cztery domeny nazywana jest 4R, natomiast izoforma bez jednej domeny, nazywana jest 3R (izoforma bez eksonu 10). W zdrowych komórkach stosunek tych izoform jest równy, a jego zaburzenie wiąże się z agregacją białka tau w komórkach neuronalnych [26]. Struktura spinki do włosów utworzona na granicy eksonu 10 z intronem 10 jest elementem regulatorowym, który zapewnia odpowiedni stosunek 4R/3R (Rys. 6 A). Zaburzenie splicingu eksonu 10 wytłumaczono mutacjami pojawiającymi się w obrębie intronu 11 [25]. Mutacje te mają wpływ na zmniejszenie stabilności termodynamicznej struktury spinki do włosów utworzonej na granicy E10/I10 (Rys. 6 A). Dodatkowo, niektóre mutacje zwiększają stopień komplementarności RNA z U1snRNP, co również wpływa na zmianę splicingu, a jednocześnie na zaburzenie równowagi 4R/3R. Przykład genu *MAPT* udowadnia ogromny wpływ nie tylko struktury spinki, ale również samych mutacji na proces alternatywnego splicingu.

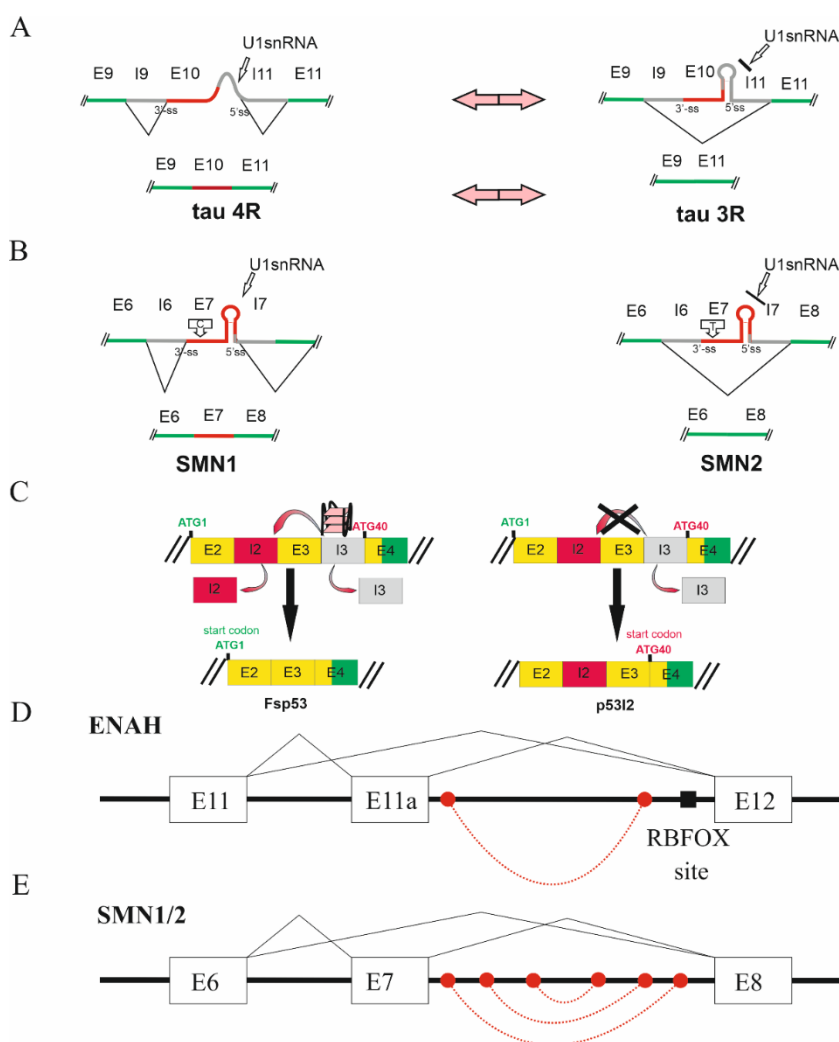
Wpływ spinki do włosów na alternatywny splicing został bardzo dobrze opisany również dla genów *SMN1* i *SMN2*. *SMN2* jest naturalną kopią genu *SMN1*. Oba geny kodują białko SMN, którego brak powoduje rozwój ciężkiej choroby neurodegeneracyjnej rdzeniowego zaniku mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA). U większości chorych z SMA gen *SMN1* ulega delecji [27]. Ekspresja genu *SMN2*

mogłaby dostarczyć białko SMN, jednak w tym genie pojawiają się mutacje, które prowadzą do pominięcia eksonu 7 w transkrypcie, co w rezultacie powoduje powstanie niefunkcjonalnego białka SMN [28]. Dlatego też podjęto starania, by poznać przyczyny wpływające na alternatywny splicing genu *SMN2*. Zidentyfikowano wiele czynników warunkujących taki wzorzec splicingu. Jednym z nich jest obecność struktury spinki do włosów, w której trzonie znajduje się miejsce 5'ss eksonu 7, co zdecydowanie zmniejsza użycie tego miejsca przez U1 snRNP podczas procesu składania powyższego genu (Rys. 6 B) [29].

Innymi motywami strukturalnymi, które mają istotny wpływ na proces składania genów są G-kwadrupleksy. Są to struktury czteroniciowe tworzone przez sekwencje bogate w guanozynę. G-kwadrupleksy mogą pełnić funkcję wyciszacza jak i wzmacniacza splicingu. Wiadomo, że G-kwadrupleksy są rozpoznawane przez szereg białek, w tym białek z rodziny hnRNP [30,31]. G-kwadrupleksy pełniące funkcje regulatorowe w alternatywnym splicingu zlokalizowano w genach takich jak: ludzka telomeraza o aktywności odwrotnej transkryptazy (ang. *human telomerase reverse transcriptase*, hTERT), gen kodujący białko p53 (*TP53*), gen kodujący marker powierzchniowy CD44 oraz gen *Bcl-X* [32–35]. W przypadku genu *TP53*, G-kwadrupleks zlokalizowano w intronie 3 (Rys 6 C) [33]. Jego obecność w powyższym miejscu jest niezbędna dla poprawnego wycięcia intronu 2 z pre-mRNA. Usunięcie intronu 2 jest z kolei konieczne dla powstania poprawnej izoformy białka p53, która może pełnić funkcję supresora nowotworowego. Intron 2 zawiera w swojej sekwencji kodon STOP, przez co jako miejsce rozpoczęcia translacji wykorzystywany jest kolejny kodon startowy ATG40 [36]. Efektem tego jest powstanie izoformy $\Delta 40p53$.

Oprócz motywów strukturalnych, w których tworzenie zaangażowana jest stosunkowo niewielka ilość reszt nukleotydowych, w RNA dochodzi również do oddziaływań dalekiego zasięgu, które mogą pojawiać się pomiędzy resztami nukleotydowymi oddalonymi od siebie nawet o tysiące nukleotydów [37]. W genie *ENAH* zlokalizowano oddziaływanie dalekiego zasięgu pomiędzy fragmentem eksonu 11a, a sekwencją regulatorową znajdującą się w dalekiej odległości, co skutkuje utworzeniem pętli o długości 1800 reszt nukleotydowych (Rys. 6 D) [38]. Oddziaływanie to jest niezbędne dla zachowania poprawnego wzorca splicingu, w którym ekson 11 zostaje zatrzymany w pre-mRNA. Wspomniana sekwencja regulatorowa jest miejscem wiązania dla białka Rbfox. Przykład ten pokazuje, że dzięki złożonej strukturze

drugorzędowej RNA, sekwencje regulatorowe nie muszą znajdować się w bliskiej odległości od miejsc splicingowych. Innym przykładem genu, w którego regulację splicingu zaangażowane są oddziaływania dalekiego zasięgu, jest wspomniany już gen *SMN2* [39]. Oddziaływania dalekiego zasięgu zaobserwowano w intronie 7. W obrębie tego intronu tworzą się trzy fragmenty helikalne o długości 7 lub 8 par zasad (Rys. 6 E). Pętle tworzone pomiędzy tymi regionami mają odpowiednio długość 20, 120 oraz 80 reszt nukleotydowych. Udowodniono, że utworzone struktury wpływają hamująco na rozpoznanie eksonu 7 w genie *SMN*, co jest kolejnym czynnikiem przyczyniającym się do wycięcia eksonu 7 z pre-mRNA genu *SMN2*.



Rysunek 6. Przykłady genów, w których regulację alternatywnego splicingu zaangażowana jest struktura II-rzędowej pre-mRNA. **A.** Wpływ struktury spinki do włosów na składanie genu *MAPT*. **B.** Wpływ struktury spinki do włosów na składanie genów *SMN1* i *SMN2*. **C.** Wpływ G-kwadupleksu na składanie genu *TP53*. **D.** Wpływ oddziaływań dalekiego zasięgu na składanie genu *ENAH*. **E.** Wpływ oddziaływań dalekiego zasięgu na składanie genów *SMN1* i *SMN2*. (na podstawie - [37]).

5.4 Wpływ transkrypcji na regulację splicingu

Proces składania genów może rozpocząć się jeszcze podczas transkrypcji, co ma istotny wpływ na przebieg tego procesu [40]. Udowodniono, że to jakie białka regulatorowe są rekrutowane do pre-mRNA może być zależne od promotora transkrypcji. Sugeruje to, że białka splicingowe mogą oddziaływać z polimerazą II, i w zależności od tego, jaki promotor zostanie użyty, odpowiednie białka wezmą udział w procesie składania genu [41]. Inne wytłumaczenie wpływu transkrypcji na proces splicingu wykorzystuje model kinetyczny [40]. Zakłada się, że szybkość reakcji katalizowanej przez polimerazę II ma wpływ na wybór miejsc splicingowych. Zatrzymanie polimerazy lub wolniejsze tempo reakcji umożliwia elementom spliceosomu rozpoznanie słabszych miejsc cięcia. Natomiast, szybkie tempo transkrypcji faworyzuje wybranie silnych miejsc splicingowych. Szybkość elongacji może mieć również znaczenie w rozpoznaniu wzmacniaczy lub wyciszaczy splicingu przez białka splicingowe [42].

6. Znaczenie alternatywnego splicingu w rozwoju chorób

Wyżej opisano czynniki regulacyjne, które wpływają na przebieg konstytutywnego oraz alternatywnego splicingu. Jest zatem wiele elementów, na których poprawność działania będą miały wpływ wszelkie zmiany na poziomie genetycznym, czyli mutacje. Mutacje mogą występować w obrębie miejsc splicingowych oraz w sekwencjach regulatorowych, przez co sekwencje te nie będą już rozpoznawane przez odpowiednie białka lub rybonukleoproteiny. Mutacje mogą mieć też istotny wpływ na formowanie się struktury II-rzędowej w pre-mRNA, co jak opisano wcześniej, wpływa na rozpoznawanie miejsc splicingowych oraz sekwencji regulatorowych. Mutacje mogą pojawić się również w genach kodujących elementy spliceosomu. Wszystkie te zdarzenia prowadzą do zmiany wzorca alternatywnego splicingu, w wyniku czego mogą powstać białka niefunkcjonalne lub białka o zmienionej funkcji. W tabeli 1 podano przykłady chorób spowodowanych mutacjami obecnymi w różnych elementach zaangażowanych w proces składania genów [43].

Ponadto, białka regulatorowe mogą ulegać nadekspresji, przez co dochodzi do zwiększonej ich aktywności i interakcji z sekwencjami regulatorowymi, z którymi nie oddziałują w prawidłowych warunkach. Podwyższony poziom białek regulujących splicing jest często spotykany w komórkach nowotworowych. Wiele badań skupia się

na analizie wpływu białka SRSF1 na nowotworzenie. Gen kodujący to białko jest protoonkogenem ulegającym amplifikacji między innymi w nowotworach piersi [44]. Nadekspresję białka SRSF1 zaobserwowano jednak również w wielu innych nowotworach, a jedną z przyczyn jego zwiększonej produkcji jest aktywność czynnika transkrypcyjnego MYC [45].

Opisano wpływ białka SRSF1 na alternatywny splicing genu białka Ron [46]. Jest to białko receptorowe odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów. Izoforma Δ Ron powstaje poprzez pominięcie eksonu 11, co ma kluczowy wpływ na jej aktywność. Proces ten jest regulowany właśnie przez białko SRSF1, które ulegając nadekspresji wiąże się do wzmacniacza splicingu obecnego w eksonie 12. Izoforma Δ Ron wpływa na zwiększoną inwazyjność komórek nowotworowych [46]. Kolejny gen, który jest związany z nowotworzeniem, a którego splicing jest regulowany przez białko SRSF1 to gen supresorowy *BIN1* [44]. Białko BIN1 jest supresorem białka c-MYC, jednak traci tą aktywność na skutek włączenia do mRNA podczas alternatywnego splicingu eksonu 12A. Udowodniono korelację pomiędzy poziomem ekspresji SRSF1 a powstawaniem izoformy BIN1 z eksonem 12A [44]. W tych samych badaniach potwierdzono wpływ białka SRSF1 na splicing genów *TEF-1*, *MNK2* i *S6K1* [44]. Innym przykładem czynnika splicingowego, który ulega nadekspresji w komórkach nowotworowych jest białko SRSF3 [47]. Jego podwyższony poziom zidentyfikowano między innymi w nowotworach jajnika, jelit, piersi, czy nerki. Wyciszenie ekspresji białka SRSF3 skutkuje apoptozą komórek nowotworowych jelita grubego [47]. Może to mieć związek z regulacją przez białko SRSF3 alternatywnego splicingu genu *HIPK2*, który koduje białko zaangażowane w inicjowanie apoptozy [47]. Zauważono, że wyciszenie ekspresji SRSF3 wpływa na pojawienie się izoformy $\Delta e8$, w której brakuje 81 reszt nukleotydowych eksonu 8 [47]. Co ciekawe, w komórkach wątroby zaobserwowano supresorowe działanie białka SRSF3 [48]. Białko hnRNP A1 reguluje z kolei alternatywny splicing genu *PKM*, zwiększając produkcję izoformy PKM2, która w różny sposób przyczynia się do progresji nowotworów [49]. Aspekt ten zostanie omówiony szczegółowo w kolejnej części pracy. Wysoki poziom ekspresji hnRNP A1 połączono też ze zwiększoną inwazyjnością komórek nowotworowych żołądka. Do tej pory jednak nie udowodniono, że ma to związek z regulacją alternatywnego splicingu [50]. Z kolei nadekspresja białka hnRNP A2/B1 została zaobserwowana w glejakach [51]. W tych komórkach białko hnRNP A2/B1 reguluje alternatywny splicing genu białka Ron

i podobnie jak SRSF1 przyczynia się do wyciszenia splicingu eksonu 11. Ponadto, hnRNP A2/B1 reguluje alternatywny splicing genu *INSR*, który koduje receptor insuliny [51]. Wycięcie eksonu 11 z transkryptu skutkuje powstaniem izoformy IR-A, która oprócz insuliny może również wiązać insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF-II). Izoforma ta ulega nadekspresji w wielu nowotworach [52]. Z drugiej strony, zbyt mała ekspresja niektórych białek splicingowych może mieć również patologiczny wpływ na fizjologię komórki. Przykładem może być białko FOX2, którego zaniżony poziom w porównaniu do tkanek prawidłowych zaobserwowano w nowotworach piersi oraz jajnika [53].

Jak opisano wyżej oraz jak przedstawiono w tabeli 1, zaburzenia alternatywnego oraz konstytutywnego splicingu mogą prowadzić do powstania wielu poważnych chorób. Jest to powód poszukiwania przez wiele grup badawczych możliwości terapeutycznych, które celują w przywrócenie poprawnego wzorca składania genów.

Tabela 1. Przykłady chorób związanych z mutacjami czynników zaangażowanych w proces składania genów [54].

Choroba	Nazwa genu	Zmiana	Wpływ na splicing
Zmiany w obrębie miejsc splicingowych			
Dystrofia mięśniowa obręczowo-kończynowa 1B (LGMD1B)	<i>LMNA</i>	Mutacja 5'ss	Retencja intronu 9 skutkująca degradacją RNA
Rodzinna lipodystrofia częściowa typu 2 (FPLD2)	<i>LMNA</i>	Mutacja 5'ss	Retencja intronu 8 skutkująca degradacją RNA
Kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM)	<i>LMNA</i>	Utworzenie alternatywnego 3'ss	Wydłużenie eksonu 4 o 9 dodatkowych reszt nukleotydowych
Zmiany w elementach regulatorowych			
Dystrofia mięśniowa Bekera (BMD)	<i>DMD</i>	Utworzenie ESS	Częściowe pominięcie eksonu 31
Ołębienie czołowo-skroniowe i parkinsonizm sprzężony z	<i>MAPT</i>	Mutacja ESS	Zwiększony splicing eksonu 10

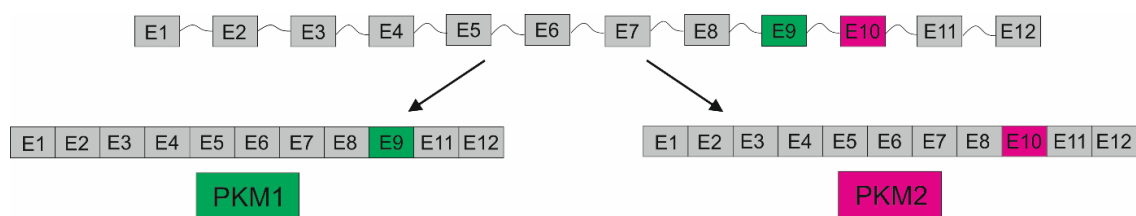
chromosomem 17 (FTDP-17)			
Zespół parkinsonizm - spastyczność sprzężony z chromosomem X (XPDS)	<i>ATP6AP2</i>	Utworzenie ESS	Zwiększony splicing eksonu 4
Mutacje elementów spliceosomu			
Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (adRP)	<i>PRPF6</i>	Zaburzona lokalizacja jądrowa	Zaburzone składanie spliceosomu
Zespoły mielodysplastyczne (MDS)	<i>U2AF1</i>	Zmieniona specyficzność rozpoznawania 3'ss	Zwiększone wykorzystanie alternatywnego 3'ss
Zmiany w genach czynników regulatorowych			
Kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM)	<i>RBM20</i>	Utrata funkcji Rbm20	Zaburzenia splicingu genu <i>TTN</i>
Dystrofia mięśniowa obrzęczo- kończynowa 1B (LGMD1B)	<i>HNRPDL</i>	Zaburzony transport białka HNRPDL do jądra	Zaburzony splicing genów regulowanych przez białka HNRPDL

7. Kinaza pirogronianowa i jej izoenzymy

Kinaza pirogronianowa (PK, EC 2.7.1.40) to enzym katalizujący defosforylację fosfoenolpirogronianu (ang. *phosphoenolpyruvate*, PEP) do pirogronianu z jednoczesnym wytworzeniem cząsteczki ATP. Zidentyfikowano dwa geny kodujące enzymy o właściwościach kinazy pirogronianowej (*PKLR*, *PKM*), które produkują cztery izoformy (PKL, PKR, PKM1, PKM2) różniące się od siebie powinowactwem do substratu, miejscem występowania oraz sposobem regulacji aktywności. W wyniku ekspresji genu *PKLR* pod kontrolą promotorów tkankowo-specyficznych powstają izoformy PKL oraz PKR. Izofорма PKL ulega ekspresji głównie w komórkach, w których dochodzi do glukoneogenezy (takich jak hepatocyty, komórki nerki, czy enterocyty). Natomiast, izofорма PKR występuje w erytrocytach [55].

Izoformy PKM1 i PKM2 powstają z genu *PKM*. Gen ten leży na ramieniu długim chromosomu 15. W jego skład wchodzi 12 eksonów oraz 11 intronów. Eksony kodują cztery domeny: A, B, C oraz małą N-końcową domenę [56]. W 1986 roku udowodniono, że powstanie dwóch izoform genu *PKM* jest efektem alternatywnego splicingu [57]. Wszystkie wymienione izoformy białka PK występują w formie tetrameru składającego się z czterech identycznych podjednostek. Wyjątek stanowi izoforma PKM2, która może występować zarówno w formie tetrameru, jak i dimeru. W przeciwieństwie do formy tetrameru, która ma silne powinowactwo do fosfoenolpirogonianu, forma dimeru charakteryzuje się słabą aktywnością kinazową, co wynika z niskiego powinowactwa do PEP [55].

Na skutek alternatywnego składania dwóch wykluczających się eksonów, powstaje izoforma PKM1 zawierająca ekson 9 (bez eksonu 10) oraz izoforma PKM2 z eksonem 10 (bez eksonu 9) (Rys 7). Oba eksony mają taką samą długość, jednak różnią się od siebie sekwencją 69 reszt nukleotydowych, które kodują aminokwasy wchodzące w skład domeny C. Domena ta odpowiedzialna jest za połączenie dwóch dimerów białka PKM oraz za stabilność utworzonego tetrameru [55,58]. Izoforma PKM1 ulega ekspresji w szczególności w takich komórkach, które wymagają dostarczania dużej ilości energii (komórki mięśniowe czy nerwowe). Charakteryzuje się ona silnym powinowactwem do fosfoenolpirogonianu. PKM2 z kolei ulega ekspresji w tych komórkach, które szybko proliferują [55]. Występowanie tego wariantu białka jest naturalne dla komórek embrionalnych i macierzystych. Jego fizjologiczna rola została również opisana dla komórek płuc, nerek czy trzustki [55]. W związku ze zdolnością komórek nowotworowych do szybkiej proliferacji, PKM2 jest główną kinazą pirogronianową produkowaną przez te komórki.

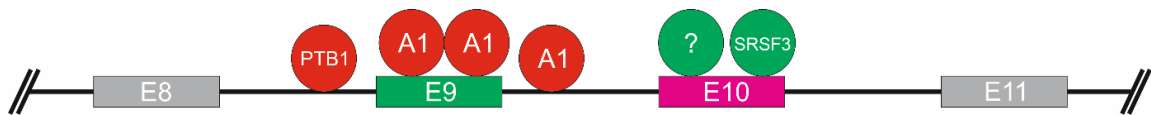


Rysunek 7. Struktura genu *PKM* oraz transkrypty powstające na skutek alternatywnego splicingu wzajemnie wykluczających się eksonów.

8. Alternatywny splicing genu *PKM*

Jak już wspomniano, w genie *PKM* występują dwa wzajemnie wykluczające się eksony: ekson 9, który wchodzi w skład izoformy PKM1 oraz ekson 10, występujący w izoformie PKM2 (Rys. 7). Zidentyfikowano wiele białek, które są zaangażowane w regulację alternatywnego splicingu genu *PKM* (Rys. 8). Pierwsze prace eksperymentalne dotyczące mechanizmów regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM* udowodniły, że za zahamowanie splicingu eksonu 9 odpowiedzialne są białka hnRNP A1, hnRNP A2 oraz PTB1 [49,59]. Obniżenie ekspresji tych białek wiąże się ze wzrostem poziomu izoformy PKM1, co sugeruje, że hnRNP A1, hnRNP A2 oraz PTB1 działają hamująco na splicingu eksonu 9 w genie *PKM*. David i współpracownicy przedstawili propozycje miejsc regulatorowych, które są rozpoznawane przez wyżej wymienione białka. W niedalekiej odległości od miejsca 5' ss eksonu 9 występuje sekwencja 5' UAGGGC 3', która odpowiada sekwencji zidentyfikowanej w procesie selekcji *in vitro* zwanym SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) jako tej o najsilniejszym powinowactwie do hnRNP A1. Sekwencja ta pełni zatem funkcję wyciszacza splicingu eksonu 9. Kolejnym białkiem, które ma kluczowy wpływ na reakcję splicingu jest białko wiążące trakt polipiryimidynowy (ang. *polypyrimidine tract binding protein*, PTB). Sekwencja rozpoznawana przez to białko (5' UCUUC 3') znajduje się w intronie 8. Pomijanie eksonu 9 w reakcji splicingu genu *PKM* wiąże się też z silną aktywnością dwóch sekwencji wyciszających zlokalizowanych w eksonie 9, które również oddziałują z hnRNP A1. Co więcej, białko hnRNP A1 może w sposób kooperatywny wiązać sekwencje hamujące, obecne w eksonie 9 oraz w intronie 9, co zwiększa potencjał wyciszający splicing eksonu 9 [60]. Wang i współpracownicy wywnioskowali, że to właśnie sekwencje wyciszające obecne w eksonie 9, a nie sekwencje intronowe, są w szczególności odpowiedzialne za zahamowanie splicingu eksonu 9. Dotychczasowe badania wykazały również, że wyciszenie eksonu 9 i aktywacja eksonu 10 są kontrolowane przez osobne sekwencje regulatorowe oraz różne białka splicingowe. Oznacza to, że oba te mechanizmy splicingu są od siebie niezależne, a w związku z tym, usunięcie jednego czynnika regulującego, może nie być wystarczające do przywrócenia poprawnego wzorca splicingu genu *PKM*. Aktywacja eksonu 10 jest zależna od silnej sekwencji wzmacniającej 5' AUCGUCC 3' zlokalizowanej w 3' końcowej części eksonu 10. Sekwencja ta jest rozpoznawana przez wzmacniający splicing białko SRSF3 [61]. Inna sekwencja regulatorowa została zidentyfikowana

w odległości +45 ÷ +52 od miejsca 3'ss eksonu 10. Nie zbadano jednak, jakie białko wzmacniające może być odpowiedzialne za jej aktywność [62]. Odkrycie tej sekwencji zostało dokonane poprzez zastosowanie oligonukleotydu antysensownego, który znacznie zmienił wzorzec splicingu genu *PKM*. Zatem bez przeprowadzenia odpowiednich eksperymentów, nie można wykluczyć, że efekt ten nie był spowodowany blokadą steryczną miejsca regulatorowego, a rozpleceniem struktury drugorzędowej istotnej dla procesu regulacji splicingu [62]. Opisane wyżej mechanizmy regulatorowe wskazują, że w regulację alternatywnego splicingu genu *PKM* zaangażowanych jest bardzo wiele czynników. Złożoność tego procesu stanowi z pewnością trudność przy opracowywaniu narzędzi molekularnych przywracających poprawny wzorzec splicingu genu *PKM*.



Rysunek 8. Schemat miejsc przyłączania się białek regulatorowych odpowiedzialnych za mechanizm alternatywnego splicingu genu *PKM*. Kolorem czerwonym oznaczono białka pełniące funkcje wyciszające splicing (PTB1, A1- hnRNPA1), a kolorem zielonym białka wzmacniające splicing (SRSF3, ? – nieznaną czynnik splicingowy).

9. PKM2 a nowotworzenie

Nadekspresja izoformy PKM2 została zidentyfikowana między innymi w nowotworach trzustki, piersi, prostaty czy jajnika [63–66]. Opublikowano już wiele dowodów potwierdzających wpływ izoformy PKM2 na rozwój i progresję nowotworów. Działanie izoformy PKM2 nie ogranicza się tylko do defosforylacji fosfoenolopirogronianu, gdyż PKM2 może ulegać również translokacji do jądra, gdzie pełni funkcję kinazy białkowej oraz kofaktora transkrypcji [67].

Podstawową cechą komórek nowotworowych jest zmiana metabolizmu komórkowego z oddychania tlenowego na beztlenowe [68]. Jedną z hipotez tłumaczących cel tej przemiany jest zwiększenie możliwości produkowania związków budulcowych dla proliferującej komórki. Białko PKM2 ze względu na fakt, że przeważnie występuje w formie mniej aktywnego dimeru, pełni kluczową rolę w tym procesie [56]. Jak wspomniano wyżej, białko PKM2 (tak samo jak PKM1) katalizuje przemianę fosfoenolopirogronianu w pirogronian. Niska aktywność dimeru PKM2, powoduje, że proces ten zachodzi z niską efektywnością, a skutkiem tego dochodzi

do nagromadzenia się produktów pośrednich glikolizy, które zamiast być przekształcane w kolejnych etapach glikolizy i cyklu Krebsa, trafiają do szlaków biosyntetycznych, które dostarczają niezbędnych składników dla szybko proliferujących komórek [69]. Nie tylko funkcja katalityczna PKM2 przyczynia się do zmiany metabolizmu komórki. PKM2 jako transkrypcyjny kofaktor oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1, który w wyniku tej interakcji włącza ekspresję genów transportera glukozy 1 (*SLC2A1*), dehydrogenazy mleczanowej (*LDHA*) oraz kinazy dehydrogenazy pirogronianowej 1 (*PDK1*) [70]. Wszystkie te białka są niezbędne dla przekształcenia metabolizmu komórkowego z fosforylacji oksydacyjnej w glikolizę.

W podobny sposób białko PKM2 jest zaangażowane w proces angiogenezy w guzie nowotworowym. Badania przeprowadzone na komórkach raka trzustki wykazały, że w stanie hipoksji, PKM2 ulega translokacji do jądra, gdzie oddziałuje z NF- κ B oraz HIF-1, przez co dochodzi do włączenia ekspresji białka VEGF-A, który jest niezbędny do tworzenia nowych naczyń krwionośnych [71].

Kolejną charakterystyczną cechą komórek nowotworowych jest ich zdolność do migracji oraz inwazji. Białko PKM2 bierze udział w kaskadzie przekazywania sygnałów, która prowadzi do nabycia przez komórki nowotworowe zdolności do inwazji [63,72]. W jednej z zaproponowanych ścieżek sygnałowych, PKM2 oddziałuje z kinazą ERK1/2, co prowadzi do fosforylacji c-Jun. W rezultacie, c-Jun oddziałuje z promotorem genu *COX-2*, zwiększając ekspresję białka COX-2, co ostatecznie zwiększa zdolności komórek nowotworowych do migracji oraz inwazji [63]. W innej ścieżce sygnałowej PKM2 działa jako kinaza białkowa i fosforyluje onkogen *c-Myc*, który następnie zwiększa produkcję białka surwiwiny. Ponownie, efektem tych oddziaływań jest zwiększona migracja komórek nowotworowych [72].

Wymienione wyżej przykłady funkcji białka PKM2 w komórkach nowotworowych sugerują, że białko to może być interesującym celem dla opracowywania nowych terapii przeciwnowotworowych. Ze względu na fakt, że izoforma PKM2 pojawia się w komórkach nowotworowych jako skutek zmian w regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*, podejmuje się próby przekierowania alternatywnego splicingu na zwiększoną produkcję izoformy PKM1.

10. Próby regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*

W 2012 roku zespół prof. Adriana Krainera opublikował pracę, w której przeprowadzono szczegółowe poszukiwania sekwencji regulatorowych odpowiedzialnych za regulację alternatywnego splicingu genu *PKM* [62]. W badaniach skupiono się wyłącznie na eksonie 10. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zidentyfikowano sekwencję regulatorową, która znajduje się w odległości +45 ÷ +59 od miejsca 3'ss eksonu 10. Zablokowanie tej sekwencji poprzez oddziaływanie z oligonukleotydem antysensowym znacząco zmieniło splicing genu *PKM* w linii komórkowej A172 (linia komórkowa ludzkiego glejaka). Zaobserwowano wzrost poziomu izoformy PKM1 z jednoczesnym spadkiem ilości izoformy PKM2. Obniżenie poziomu białka PKM2 przyczyniło się do zwiększonej apoptozy komórek nowotworowych. Analiza sekwencji genu *PKM* wykazała, że w intronie 9 znajduje się sekwencja homologiczna do sekwencji regulatorowej z eksonu 10 [62]. Podobieństwo tych sekwencji sugeruje, że synergicznie mogą one pełnić funkcje wzmacniające splicing eksonu 10. Hipoteza ta została potwierdzona poprzez usunięcie poszczególnych fragmentów regulatorowych w eksperymentach wykorzystujących minigeny *PKM*. Udowodniono, że regulacja alternatywnego splicingu jest przede wszystkim zależna od sekwencji w eksonie 10, jednak dodatkowy efekt regulatorowy pochodzi od sekwencji z intronu 9 [62].

11. Oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing

Oligonukleotydy antysensowe (ang. *antisense oligonucleotides*, ASOs) to krótkie fragmenty kwasów nukleinowych o długości 15-30 reszt nukleotydowych. ASOs oddziałują komplementarnie z docelową sekwencją RNA. Są one wykorzystywane do wyciszenia lub zmiany ekspresji genów. Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych jako narzędzi molekularnych do regulacji ekspresji genów zostało zaproponowane w latach 80-tych XX wieku [73]. Istnieją dwa mechanizmy działania ASOs:

- degradacja docelowego RNA spowodowana utworzeniem heterodupleksu DNA/RNA,
- blokada steryczna sekwencji RNA.

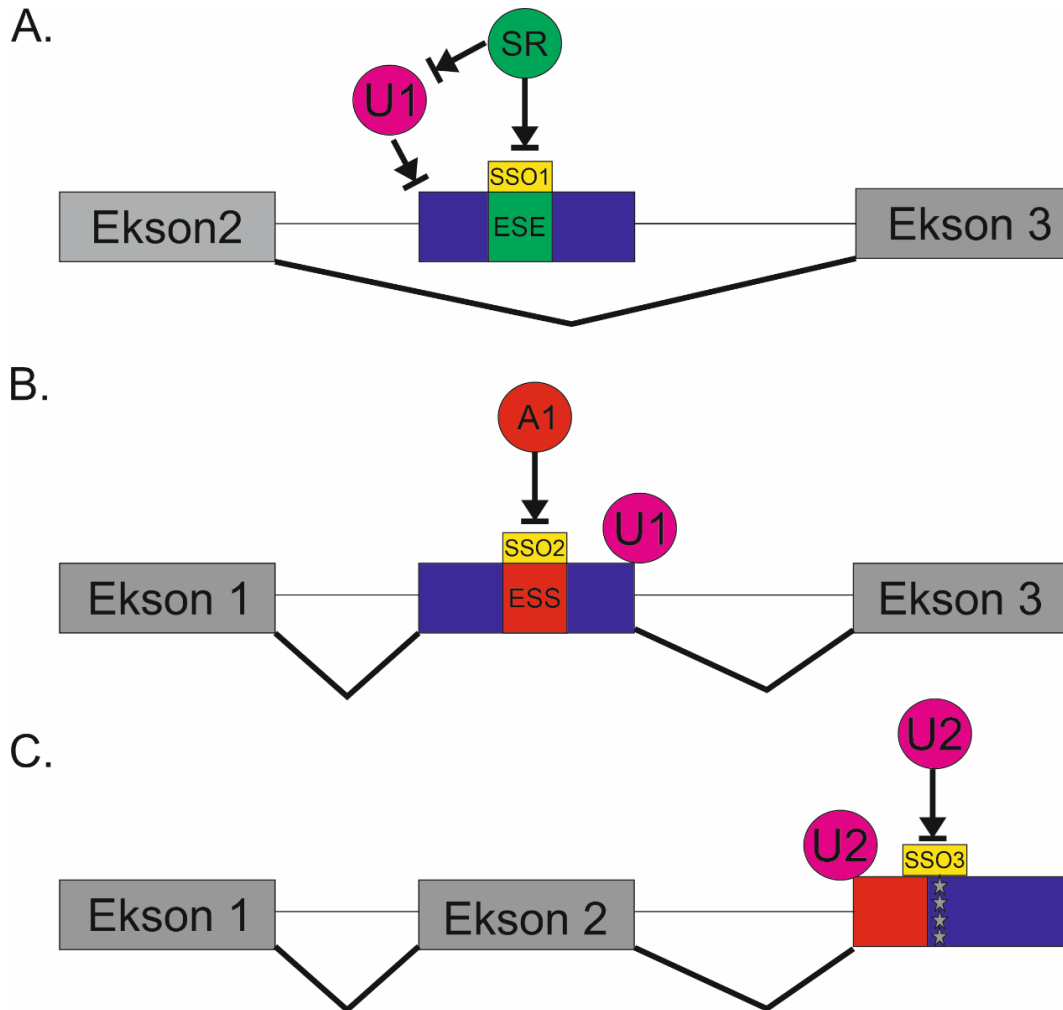
Degradacja RNA jest katalizowana przez enzym RNazę H, który rozpoznaje heterodupleks DNA/RNA i przecina nić RNA. Następnie uwolnione fragmenty RNA

są trawione przez inne komórkowe nukleazy [74]. Warunkiem koniecznym dla aktywacji RNazy H jest utworzenie heterodupleksu DNA/RNA. Dlatego też, większość ASOs projektowanych jest jako gapmery, co oznacza, że centralna część oligonukleotydu składa się z DNA, natomiast terminalne reszty nukleotydowe są modyfikowane, co zwiększa stabilność enzymatyczną oligonukleotydu oraz siłę wiązania z RNA [75].

W przypadku drugiego ze wspomnianych mechanizmów działania ASOs, w wyniku blokady sterycznej spowodowanej hybrydyzacją oligonukleotydu, nie dochodzi do degradacji RNA. ASOs hybrydują do docelowego RNA i blokują jego udział w różnych procesach komórkowych, takich jak translacja (blokowanie oddziaływania pre-mRNA z rybosomem) oraz splicing (blokowanie oddziaływania pre-mRNA z białkami) [75]. Odpowiednia budowa chemiczna oligonukleotydu sprawia, że nie jest on rozpoznawany przez nukleazy komórkowe, takie jak RNaza H. Modyfikacje są zazwyczaj wprowadzane w pozycję 2'OH reszty rybozy i mogą to być: grupa 2'-O- metylowa (2'OMe) lub grupa 2'-O-metoksyetylowa (2'MOE). Powszechnie używa się również kwasów nukleinowych o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (ang. *locked nucleic acids*, LNAs), w których występuje dodatkowy mostek metylenowy pomiędzy atomami węgla C4' i tlenu O2' reszty rybozy.

Poprzez blokadę steryczną działają oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing (ang. *splice switching oligonucleotides*, SSOs) [76]. SSOs projektuje się tak, by dzięki komplementarnemu oddziaływaniu z pre-mRNA, blokowały sekwencje, które są zaangażowane w proces alternatywnego splicingu (Rys. 9). Hybrydyzacja SSO do miejsca docelowego uniemożliwia wiązanie się do pre-mRNA białek oraz rybonukleoprotein, które są odpowiedzialne za przeprowadzenie oraz regulację alternatywnego splicingu. W ten sam sposób można inaktywować ukryte miejsca splicingowe, które powstały na skutek mutacji, a ich rozpoznanie powoduje zmianę wzorca splicingu danego genu (Rys. 9 C). Najczęściej jednak, SSOs są wykorzystywane do blokowania sekwencji wzmacniających lub wyciszających splicing. W konsekwencji, białka regulatorowe (czynniki splicingowe) nie są w stanie oddziaływać z docelowymi sekwencjami, a zatem nie mają wpływu na proces składania genu. Najważniejszym zatem etapem projektowania efektywnych SSOs jest znalezienie sekwencji regulatorowych, które są zaangażowane w regulację alternatywnego splicingu danego genu. Jeśli celem jest wyciszenie splicingu, to blokuje się sekwencję odpowiedzialną za wzmocnienie splicingu (Rys. 9 A). W celu zwiększenia rozpoznawania danego eksonu przez kompleks

rybonukleoprotein, blokuje się natomiast sekwencje, które wyciszają splicing (Rys. 9 B) [76].



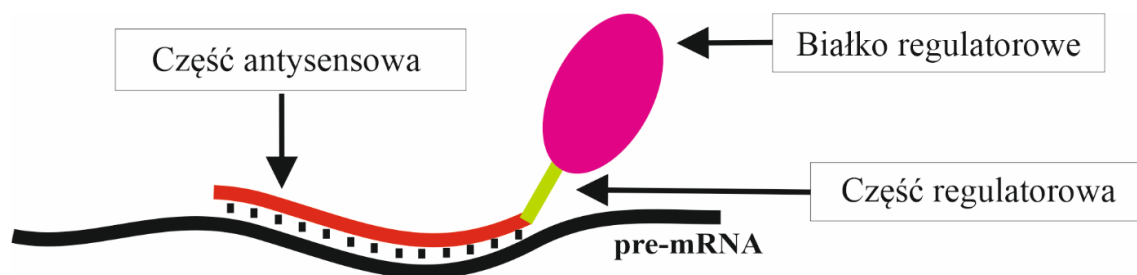
Rysunek 9. Zasada działania SSOs. **A.** SSO blokuje sekwencję wzmacniającą splicing. Nie jest możliwe oddziaływanie białka regulatorowego z sekwencją i stymulowanie rozpoznania miejsca 5'ss przez U1 snRNP **B.** SSO blokuje sekwencję wyciszającą splicing. Białko wyciszające nie może hamować rozpoznania miejsca splicingowego przez U1 snRNP **C.** SSO blokuje ukryte miejsce 3'ss splicingowe (oznaczone szarymi gwiazdkami). U2 snRNP oddziałuje z poprawnym miejscem 3'ss

Oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing z powodzeniem są stosowane w celach terapeutycznych. Do tej pory, na świecie dopuszczono do użytku co najmniej pięć SSOs, spośród których cztery (eteplirsen, golodirsen, vitolarsen, casimersen) przeznaczone są do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a [77–79]. Natomiast w Unii Europejskiej zarejestrowano dwa leki oparte na oligonukleotydach zmieniających splicing. Jest to nusinersen, oligonukleotyd stosowany w leczeniu wspomnianego już rdzeniowego zaniku mięśni oraz viltolarsen stosowany w leczeniu dystrofii mięśniowej

Duchenne'a [80]. Nusinersen oddziałuje z sekwencją wyciszającą splicing w eksonie 7 genu *SMN2*. Tym samym oligonukleotyd ten blokuje dostęp do tej sekwencji białku hnRNP A1. W konsekwencji, dochodzi do rozpoznania miejsc splicingowych eksonu 7 i włączenia go do mRNA, dzięki czemu powstaje funkcjonalne białko SMN. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a to ciężka choroba genetyczna spowodowana różnymi mutacjami w genie dystrofiny (*DMD*), które skutkują przesunięciem ramki odczytu, przez co dochodzi do wczesnego zatrzymania translacji. W wyniku tego produkowane jest niefunkcjonalne białko dystrofina [81]. Viltolarsen to oligonukleotyd, który hybryduje do eksonu 53 genu dystrofiny, powodując pominięcie tego eksonu i przywrócenie poprawnej ramki odczytu. Efektem tego jest powstanie krótszego, jednak funkcjonalnego białka [82].

12. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe

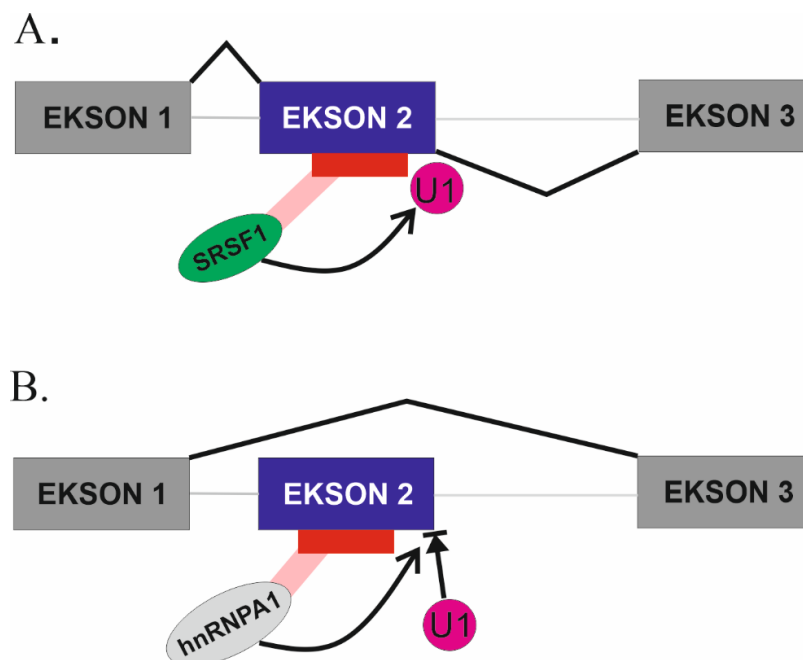
Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe (ang. *bifunctional antisense oligonucleotides*, BASOs) to stosunkowo nowy rodzaj oligonukleotydów antysensowych. Składają się one z dwóch funkcjonalnych części (Rys. 10). Sekwencja antysensowa odpowiedzialna jest za przyłączenie oligonukleotydu do docelowej sekwencji pre-mRNA. Druga część to sekwencja regulatorowa, która zawiera sekwencję reszt nukleotydowych rozpoznawaną przez białka regulujące splicing.



Rysunek 10. Budowa dwufunkcyjnego oligonukleotydu antysensowego (BASO).

Po wprowadzeniu BASOs do komórki, białka splicingowe rozpoznają specyficznie część regulatorową i dochodzi do oddziaływania pomiędzy czynnikiem splicingowym, a oligonukleotydem. Oligonukleotyd antysensowy hybryduje do odpowiedniej sekwencji pre-mRNA, dzięki czemu zgromadzone białka regulatorowe

mogą modulować procesy składania genu. Ze względu na fakt, że to właśnie białka odpowiedzialne są za ostateczny efekt regulacji, miejsce hybrydyzacji BASO zazwyczaj planowane jest tak, by znajdowało się w bliskiej odległości do miejsc splicingowych. Dzięki temu białka regulatorowe mogą wzmacniać lub hamować rozpoznawanie tych miejsc (Rys. 11 A i B). Niezaprzeczalną zaletą BASOs, w porównaniu do SSOs, jest brak konieczności poszukiwania miejsc regulatorowych które są kluczowe dla procesu regulacji splicingu danego genu, a mogą być rozmieszczone w znacznej odległości od docelowego miejsca splicingowego, zarówno w eksonie, jak i w intronach okalających ekson. W przypadku BASOs podczas projektowania sekwencji antysensowej można skupić się na fragmentach pre-mRNA w bliskiej odległości od miejsc splicingowych, których rozpoznawanie przez spliceosom chcemy regulować. Jednak, należy uwzględnić fakt, że regulacja alternatywnego splicingu jest zależna również od struktury II-rzędowej RNA, co oznacza, że bliskość miejsca hybrydyzacji w stosunku do miejsc splicingowych nie jest gwarantem udanej regulacji splicingu [37,83]. BASOs stanowią również narzędzie umożliwiające przywrócenie utraconych sygnałów regulatorowych na skutek mutacji. Jeśli mutacja pojawia się w elemencie regulatorowym, traci on właściwości regulacyjne. Zastosowanie BASOs z odpowiednią sekwencją regulatorową może przywrócić poprawne rozpoznanie miejsc cięcia.



Rysunek 11. Zasada działania BASOs. **A.** BASO z funkcją wzmacniającą rozpoznawanie miejsca splicingowego. **B.** BASO z funkcją wyciszającą rozpoznanie miejsca splicingowego.

Dodatkowym etapem przy projektowaniu BASOs jest wybór i optymalizacja części regulatorowej. W zależności od oczekiwanego efektu, część regulatorowa może być projektowana tak, by była rozpoznawana przez białko wzmacniające splicing (np. SRSF1) lub przez białko wyciszające splicing (np. hnRNP A1) (Rys. 11 A i B). Skordis i współpr. zaproponowali użycie BASOs do regulacji splicingu genu *SMN2*, w którym dochodzi do pominięcia eksonu 7, w wyniku czego powstaje niefunkcjonalne białko [84]. Ekson 7 ulega wycięciu między innymi ze względu na obecność wielu, silnych sekwencji wyciszających jego splicing [37]. Zastosowanie BASOs z częścią regulatorową rozpoznawaną przez białko SRSF1 (powtórzenia sekwencji 5' GGA 3') zwiększyło inkluzję eksonu 7 w mRNA, co udowodniło, że pojawienie się białek wzmacniających splicing w pobliżu eksonu 7 jest wystarczające dla zniwelowania hamującego wpływu wyciszających splicing sekwencji regulatorowych [84]. Część regulatorowa może być również wzmocnieniem działania oligonukleotydu antysensowego, który blokuje sterycznie sekwencję regulatorową obecną w pre-mRNA. Baughan i współpr. również zastosowali BASOs do regulacji splicingu genu *SMN2*. Część antysensowa została zaprojektowana, by blokować sekwencję wyciszającą znajdującą się w intronie 7 i by była połączona z częścią regulatorową rozpoznawaną przez białka wzmacniające splicing. Efekt regulacji splicingu eksonu 7 genu *SMN2* został zaobserwowany także po zastosowaniu ASO, jednak większa efektywność pojawiła się przy połączeniu ASO z częścią regulatorową [85]. Podjęto również próbę regulacji alternatywnego splicingu genu *RON*, który jest zaangażowany w proces nowotworzenia [86]. W komórkach nowotworowych obserwuje się zwiększoną ekspresję izoformy Δ Ron, w której nie występuje ekson 11. Izofорма ta zwiększa potencjał inwazyjny komórek nowotworowych. Dwufunkcyjny oligonukleotyd antysensowy hybrydujący do eksonu 11 skutecznie wzmocnił rozpoznawanie miejsc splicingowych tego eksonu i zwiększył ilość właściwego białka [86].

Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe mogą zostać również użyte do wyciszenia procesu splicingu. W tym samym roku, w którym Skordis i współpr. zaproponowali wzmocnienie rozpoznawania eksonu 7 genu *SMN2*, Villemare i współpr. użyli BASOs do regulacji alternatywnego splicingu genu *Bcl-X* [87]. Alternatywne składanie genu *Bcl-X* polega na wyborze jednego z dwóch alternatywnych 5'ss, co prowadzi do powstania dwóch izoform, z których jedna Bcl-X_L jest białkiem antyapoptotycznym, ulegającym nadekspresji w komórkach nowotworowych [88].

W części regulatorowej BASO zastosowano jednocześnie dwie sekwencje rozpoznawane przez białko hnRNP A1 5' UAGGGA 3' oraz 5' UAGGGU 3'. Oligonukleotyd zaprojektowano tak, by hybrydyzował powyżej miejsca 5'ss izoformy Bcl-X_L. Efektem hybrydyzacji była zmiana selekcji miejsca splicingowego z 5'ss Bcl-X_L na 5'ss Bcl-X_S [87]. Tym samym zmniejszyła się ekspresja antyapoptotycznego białka. Ten sam model badawczy ponownie użyto trzy lata później, w celu weryfikacji czy inne sekwencje regulatorowe, mogą zostać wykorzystane do regulacji alternatywnego splicingu [89]. Zaproponowano użycie w części regulatorowej sekwencji odpowiadającej miejscu 5'ss oraz miejscu rozgałęzienia, które występuje w genie β-globiny (5' AUAGGCACUGA 3'). Ponadto, w tych eksperymentach po raz pierwszy zastosowano oligonukleotydy rozgałęzione (ang. *branched nucleic acid*, bNA), które umożliwiają połączenie dwóch oligonukleotydów regulatorowych z jednym oligonukleotydem antysensowym [89]. W najnowszych badaniach nad BASOs wyciszającymi splicing ponownie zastosowano część regulatorową z dwiema sekwencjami rozpoznawanymi przez hnRNP A1 (5' UAGGGA 3', 5' UAGGGU 3') [83]. Pomimo, że większość badań z użyciem BASOs do modulacji splicingu genu *SMN2* skupiała się na wzmocnieniu rozpoznawania eksonu 7, zaproponowano również zastosowanie wyciszającego BASO, który hybrydyzował powyżej miejsca 5'ss eksonu 7. Celem było zmniejszenie rozpoznawania miejsca 3'ss eksonu 8, co wpłynęło na zwiększoną efektywność wyboru miejsca 3'ss eksonu 7 [90].

Spośród narzędzi terapeutycznych opartych o strategię antysensową, BASOs wydają się być najmniej przebadaną grupą. Może to wynikać z osiągnięcia spektakularnych sukcesów w terapiach dzięki zastosowaniu SSOs, co wstrzymało rozwój innych typów ASOs. Nie zmienia to jednak faktu, że SSOs nie są idealnym narzędziem terapeutycznym. Ich zastosowanie jest możliwe, tylko w przypadku znajomości lokalizacji sekwencji regulatorowych, które są kluczowe dla regulacji składania danego genu. Należy jednak uwzględnić, że sekwencje te mogą być oddalone od eksonu nawet o kilkaset reszt nukleotydowych, co utrudnia projektowanie SSOs. W porównaniu do SSOs, niezaprzeczalną zaletą BASOs jest to, że ich opracowywanie nie wymaga szczegółowego przeszukiwania sekwencji pre-mRNA w celu znalezienia specyficznych miejsc regulatorowych. W początkowym etapie można założyć, że wiedza o lokalizacji miejsc cięcia jest wystarczająca dla zaprojektowania części antysensowej. W przypadku BASOs wyzwaniem jest z pewnością wybranie odpowiedniej sekwencji

dla białka splicingowego w części regulatorowej. Rozwój badań nad projektowaniem oraz zastosowaniem BASOs jest szansą na uzyskanie potencjalnych, nowych narzędzi terapeutycznych, które mogą zostać użyte do leczenia między innymi nowotworów.

VI. WYNIKI I DYSKUSJA

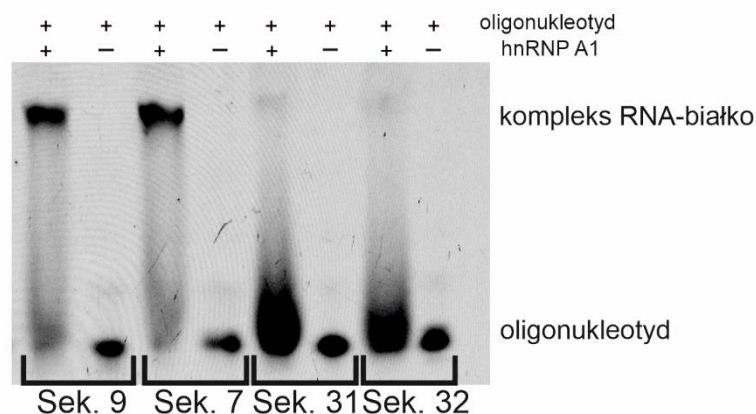
Celem przewodnim prowadzonych przeze mnie badań była optymalizacja narzędzi terapeutycznych, które mogą mieć zastosowanie w regulacji alternatywnego splicingu. W części literaturowej opisałam sposób działania oligonukleotydów zmieniających splicing oraz dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych. Oba te typy oligonukleotydów zostały przeze mnie wykorzystane w opisanych w niniejszej pracy badaniach, w celu regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*. Ze względu na obecność dwóch funkcjonalnych części w cząsteczkach BASOs, badania nad nimi dotyczyły optymalizacji zarówno części regulatorowej, jak i antysensowej. W przypadku SSOs doskonalono budowę chemiczną oligonukleotydu poprzez zastosowanie modyfikowanych reszt nukleotydowych.

1. Wybór sekwencji regulatorowej BASO

Na podstawie danych literaturowych można wywnioskować, że białko hnRNP A1 posiada zdolność do rozpoznawania szerokiej puli różnych sekwencji nukleotydowych. Rezultaty poszczególnych eksperymentów *in vitro*, których celem jest identyfikacja sekwencji optymalnych dla specyficznego oddziaływania z białkiem hnRNP A1, różnią się od siebie. Badania przeprowadzone metodą SELEX wyłoniły sekwencję 5' UAGGGA/U 3' jako najlepiej wiążaną przez hnRNP A1 [91]. Najnowsze badania wskazują sekwencję 5' YAGG 3' jako optymalną dla domeny RRM1 oraz 5' YAGN 3' dla domeny RRM2, gdzie Y to reszta pirymidynowa, a N to każda, możliwa reszta nukleotydowa [15]. Interesujące jest to, że sekwencje uznane za optymalne dla białka hnRNP A1 w eksperymentach *in vitro* różnią się od tych, które są identyfikowane w komórkowym pre-mRNA jako miejsca wiązania hnRNP A1. Spośród zidentyfikowanych sekwencji pre-mRNA wiązanych przez białko hnRNP A1 można znaleźć takie sekwencje jak: 5' CAGCAU 3' w genie *SMN*, 5' UGAAAG 3' w genie *SKA2*, czy 5' AUUUA 3' w 3'-końcowym regionie nieulegającym translacji (ang. *3' untranslated region*, 3'UTR) [92–94].

Dlatego też, istotnym etapem projektowania skutecznego BASO jest wybranie takiej sekwencji, która wykaże największy potencjał specyficznego oddziaływania z białkiem hnRNP A1. W celu znalezienia optymalnej sekwencji, która mogłaby być

użyta w części regulatorowej BASOs, został wykonany test przesiewowy różnych sekwencji RNA, które wybrano na podstawie danych literaturowych. Sekwencje, które zidentyfikowano za pomocą metod *in vitro* zazwyczaj zawierają pozycje reszt nukleotydowych, które są niezbędne dla wiązania z białkiem oraz takie, w których mogą występować różne reszty nukleotydowe. Dla takich sekwencji zsyntetyzowano różne ich warianty uwzględniając wszystkie możliwości. Wybrane sekwencje różnią się ilością reszt nukleotydowych. Najkrótszy użyty oligonukleotyd ma cztery reszty nukleotydowe, a najdłuższy dziewięć. Prawie wszystkie sekwencje zawierają fragment dinukleotydowy 5' AG 3', który według danych literaturowych jest kluczowy dla oddziaływania białka hnRNP A1 z RNA [15,95]. Łącznie zsyntetyzowano 41 sekwencji RNA, które zostały poddane inkubacji z rekombinowanym białkiem hnRNP A1 (Tab. 2). Rekombinowane białko zostało wyprodukowane w systemie ekspresyjnym *E. Coli* przy wykorzystaniu plazmidu z wklonowaną sekwencją białka hnRNP A1, który został otrzymany od profesora Frédéric Allain'a (Instytut Biochemii, ETH Zurych, Szwajcaria). Selekcja oligonukleotydów wiążących białko została wykonana za pomocą metody opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (ang. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). Podczas syntezy chemicznej do wszystkich oligonukleotydów dołączono resztę fluoresceiny na końcu 5', dzięki czemu możliwa była obserwacja migrujących w żelu cząsteczek RNA oraz kompleksów RNA z białkiem. Wszystkie oligonukleotydy użyto w stężeniu 500 nM, a ich wiązanie do hnRNP A1 zostało wykryte poprzez inkubację z 60 μ M stężeniem białka (Rys. 12).



Rysunek 12. Przykładowe zdjęcie żelu przedstawiające przesiewowy test oligonukleotydów. Sekwencje użytych oligonukleotydów zaprezentowano w tabeli 2.

Wykonane eksperymenty ujawniły 19 oligonukleotydów, które utworzyły kompleks z białkiem hnRNP A1 (Tab. 2). Na podstawie intensywności widocznych

prążków kompleksu wybrano 5 oligonukleotydów, które najlepiej wiązały się z białkiem: 5' CAGGUAAGU 3' (sekwencja A), 5' CAGGUGAGU 3' (sekwencja B), 5' UAGGA 3' (sekwencja C), 5' UAGGU 3' (sekwencja D). We wszystkich wybranych oligonukleotydach można zauważyć wspólny element w postaci fragmentu 5'AGG 3', który wchodzi również w skład sekwencji zaproponowanej przez Beusch i współpr. jako optymalnej dla domeny RRM1 [15]. Istotne jest również to, że oligonukleotydy A oraz B odpowiadają sekwencjom, które tworzą miejsce donorowe. Wykonane eksperymenty potwierdziły wcześniej opublikowane sugestie, że białko hnRNP A1 może wiązać 5'ss [91,96]

Tabela 2. Wynik testu przesiewowego 41 oligorybonukleotydów potencjalnie oddziałujących z białkiem hnRNP A1. Znakami plus oznaczono udział procentowy oligonukleotydu w tworzeniu kompleksu (++++ 100%-85%, +++ 84%-70%, ++ 69%-50%, + <50%; b.w.- brak wiązania).

Nazwa	Sekwencja 5'→3'	Ilość oligonukleotydu tworząca kompleks
Sek. 1 (Sek. A)	CAGGUAAGU	++++
Sek. 2 (Sek. B)	CAGGUGAGU	++++
Sek. 3 (Sek. C)	UAGGA	++++
Sek. 4 (Sek. D)	UAGGU	++++
Sek. 5	UAGG	++++
Sek. 6	AAGGUAAGU	+++
Sek. 7	UGUAGG	+++
Sek. 8	CGUAGG	++
Sek. 9	UAUAGG	++
Sek. 10	UGCAGG	++
Sek. 11	UUCAGG	++
Sek. 12	UAGA	++
Sek. 13	CACAGG	+
Sek. 14	CAUAGG	+
Sek. 15	CGCAGG	+
Sek. 16	GCUAGA	+
Sek. 17	UACAGG	+
Sek. 18	UUUAGA	+
Sek. 19	UUUAGG	+
Sek. 20	AAGGUGAU	b.w.
Sek. 21	CACAGA	b.w.
Sek. 22	CCCAGA	b.w.

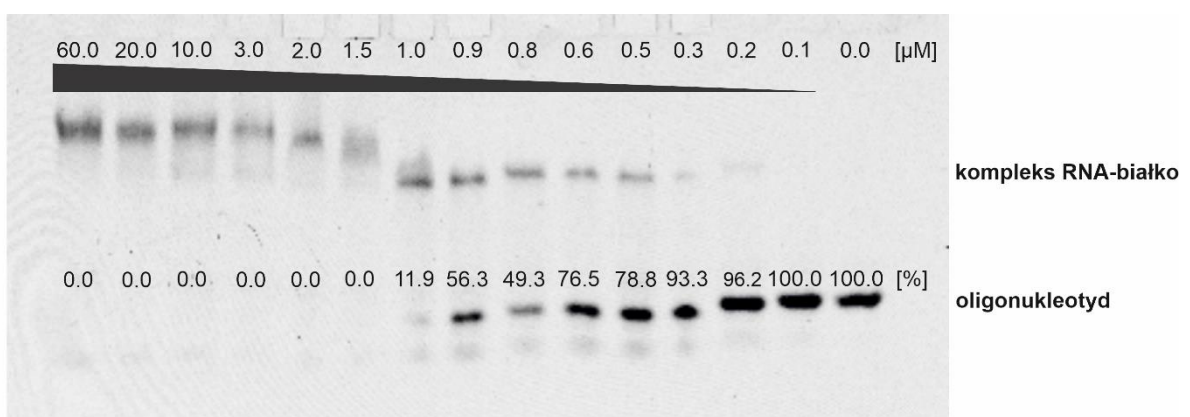
Sek. 23	CCCAGG	b.w.
Sek. 24	CCUAGA	b.w.
Sek. 25	CCUAGG	b.w.
Sek. 26	CGCAGA	b.w.
Sek. 27	CUCAGA	b.w.
Sek. 28	CUCAGG	b.w.
Sek. 29	CUUAGA	b.w.
Sek. 30	CUUAGG	b.w.
Sek. 31	CAUAGA	b.w.
Sek. 32	UACAGA	b.w.
Sek. 33	UAUAGA	b.w.
Sek. 34	UCCAGA	b.w.
Sek. 35	UCCAGG	b.w.
Sek. 36	UCUAGA	b.w.
Sek. 37	UCUAGG	b.w.
Sek. 38	UGCAGA	b.w.
Sek. 39	UGUAGA	b.w.
Sek. 40	UUCAGA	b.w.
Sek. 41	AUUUA	b.w.

W dwufunkcyjnych oligonukleotydach antysensowych zazwyczaj stosuje się więcej niż jedno powtórzenie danej sekwencji regulatorowej. Do tej pory w opublikowanych badaniach użyto maksymalnie trzech powtórzeń sekwencji regulatorowej [90]. Uwzględniając fakt, że długie oligonukleotydy mają tendencję do tworzenia struktur drugorzędowych, które wpływają na oddziaływanie RNA z białkiem, oceniono stałą wiązania pomiędzy oligonukleotydami zawierającymi powtórzenia sekwencji podstawowej, a białkiem hnRNP A1. W tym celu zsyntetyzowano oligonukleotydy z różną ilością powtórzeń sekwencji podstawowej. Sekwencje o długości 9 reszt nukleotydowych (A, B) zostały powtórzone dwa (A2, B2) oraz trzy razy (A3, B3). Sekwencję o długości 5 reszt nukleotydowych (C, D) powtórzono dwu- (C2, D2) oraz czterokrotnie (C4, D4) (Tab. 3).

Tabela 3. Lista oligorybonukleotydów zawierających powtórzenia sekwencji podstawowej.

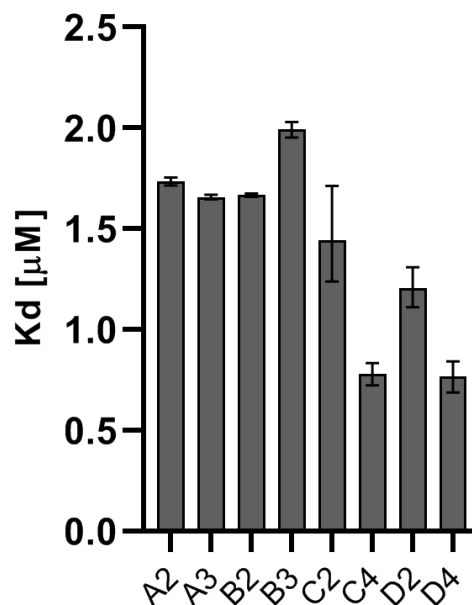
Nazwa	Sekwencja (5'→3')
A2	CAGGUAAGU CAGGUAAGU
A3	CAGGUAAGU CAGGUAAGU CAGGUAAGU
B2	CAGGUGAGU CAGGUGAGU
B3	CAGGUGAGU CAGGUGAGU CAGGUGAGU
C2	UAGGA UAGGA
C4	UAGGA UAGGA UAGGA UAGGA
D2	UAGGU UAGGU
D4	UAGGU UAGGU UAGGU UAGGU

Wartość stałej dysocjacji (ang. *dissociation constant*, Kd) została oznaczona metodą EMSA. W celu wyznaczenia wartości Kd przygotowano 14 rozcieńczeń białka hnRNP A1 (0,1 μ M-60 μ M), które inkubowano z oligonukleotydem o stężeniu 0,5 μ M. Następnie oceniono procentową ilość tworzonych kompleksów na podstawie intensywności prążków, które odpowiadają niezwiązanemu RNA oraz kompleksowi RNA-białko (Rys. 13). Intensywność prążków została określona za pomocą programu MultiGauge. Procentowy poziom oligonukleotydu tworzącego kompleks z białkiem został wyliczony dla każdego użytego stężenia białka. Następnie w programie GraphPad Prism 8.0 wyliczono wartość Kd z zastosowaniem modelu nieliniowej regresji i z uwzględnieniem współczynnika Hilla. Uzyskane wyniki wartości Kd przedstawiono na rysunku 14.



Rysunek 13. Przykładowe zdjęcie żelu, na podstawie którego oceniono stałą wiązania pomiędzy oligonukleotydem, a białkiem hnRNP A1. Wraz ze wzrostem stężenia białka, wzrasta ilość utworzonego kompleksu RNA-białko. Liczby powyżej dolnych prążków odpowiadają wartości procentowej oligonukleotydu, który nie został związany w kompleksie.

Wykonane eksperymenty wykazały, że w grupie A długość oligonukleotydów nie wpływa na siłę wiązania z białkiem (Rys. 14). Zarówno dwukrotnie jak i trzykrotnie powtórzona sekwencja ma podobną wartość stałej wiązania, która wynosi około 1,70 μM . W grupie B można zauważyć niewielką zmianę w sile wiązania, która spada wraz ze wzrostem ilości sekwencji podstawowych. Wartość stałej wiązania pomiędzy oligonukleotydem B2, a białkiem wynosi 1,76 μM , natomiast dla oligonukleotydu B3 - 1,99 μM (Rys. 14). Oligonukleotydy z grupy C oraz D wykazują największe powinowactwo do białka hnRNP A1. W tych grupach tendencja jest odwrotna niż w przypadku grupy B. Siła wiązania wzrasta wraz z ilością powtórzeń sekwencji podstawowych. W grupie C wartość K_d zmienia się z 1,44 μM dla dwukrotnie powtórzonej sekwencji na 0,76 μM dla czterech powtórzeń sekwencji C. Z kolei sekwencja D2 oddziałuje z białkiem hnRNP A1 z wartością stałej wiązania równą 1,20 μM , a sekwencja D4 z wartością stałej wiązania 0,77 μM (Rys. 14).



Rysunek 14. Wykres przedstawia wartość stałej wiązania (K_d) pomiędzy oligonukleotydami, a białkiem hnRNP A1.

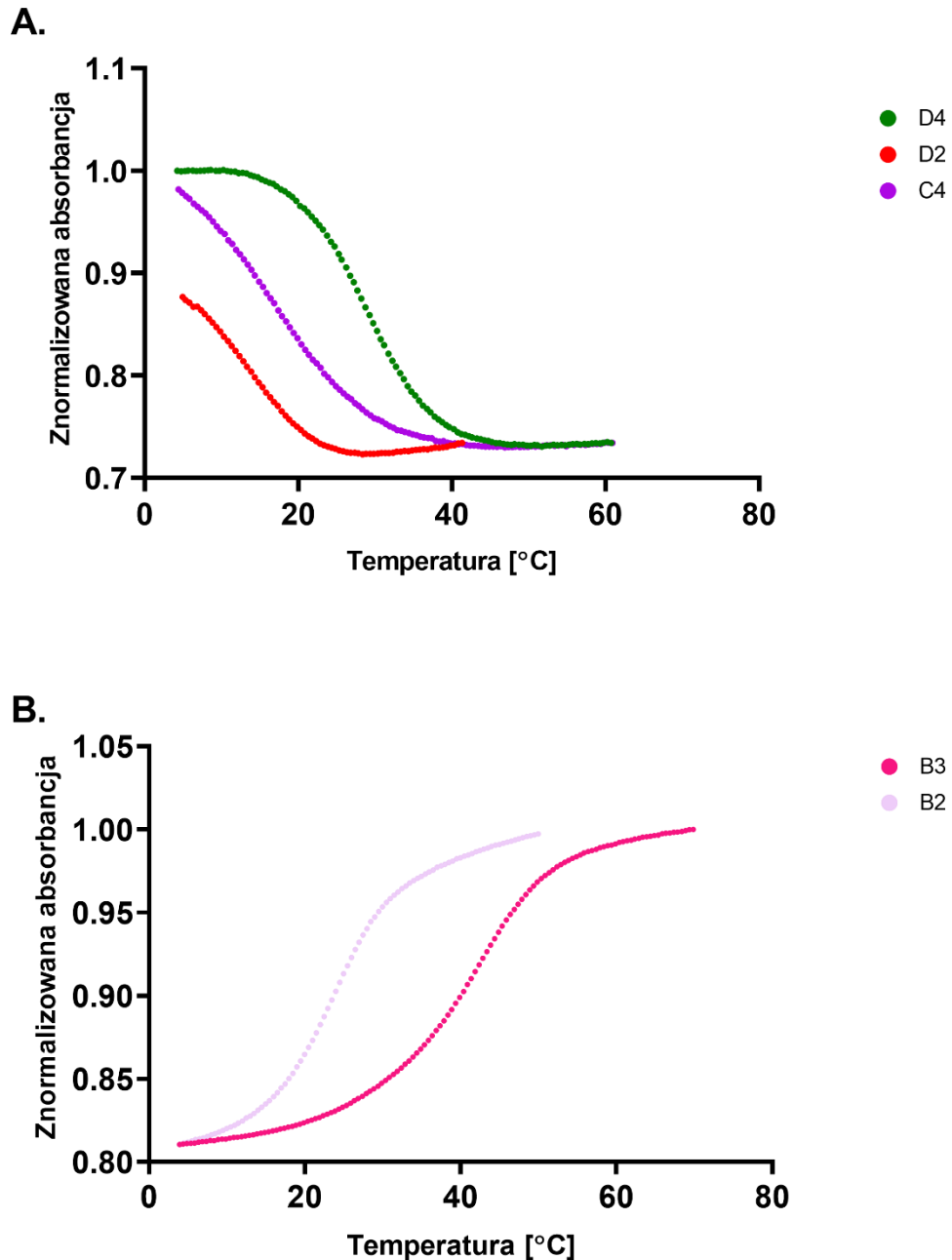
Można zauważyć, że oligonukleotydy C4 oraz D4 mają takie samo powinowactwo do białka hnRNP A1. Z drugiej strony występuje niewielka różnica w wartości K_d dla oligonukleotydów C2 oraz D2. Jak już wspomniano wcześniej, na siłę interakcji białka z RNA może mieć wpływ jego struktura drugorzędowa. W związku z tym przeprowadzono topnienia w świetle UV wszystkich długich oligonukleotydów,

w celu określenia, czy tworzenie struktury drugorzędowej ma wpływ na oddziaływanie oligonukleotydów z białkiem hnRNP A1. Eksperyment wykonano przy długości fali 260 nm oraz 295 nm, co pozwala na detekcję odpowiednio oddziaływań typu Watsona- Cricka oraz Hoogsteena.

Topnienia w świetle UV wykazały, że pięć spośród ośmiu oligonukleotydów tworzy struktury drugorzędowe. Oligonukleotydy B2 oraz B3 tworzą strukturę dupleksu lub spinki (Rys. 15 B). Natomiast, oligonukleotydy D2, C4, D4 tworzą G-kwadrupeksy (G4), za których stabilizację są odpowiedzialne oddziaływania typu Hoogsteen'a (Rys. 15 A). Pomimo małych różnic w wartościach K_d , przeprowadzone eksperymenty sugerują, że istnieje zależność pomiędzy obecnością struktury drugorzędowej, a siłą wiązania z białkiem. Struktura G-kwadrupeksu zwiększa siłę oddziaływań z białkiem, w porównaniu do jednoniciowych oligonukleotydów (ssC2 vs G4-D2). Co ciekawe, nie tylko sama struktura G-kwadrupeksu wpływa na siłę wiązania, ale też jego indywidualne cechy strukturalne. Oligonukleotydy C4 i D4 mają takie samo powinowactwo do białka, którego wartość K_d wynosi odpowiednio 0,76 i 0,77 μM . Sekwencje te mają tendencję do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych G-kwadrupeksów. Z kolei oligonukleotyd D2 o słabszej sile wiązania ($K_d=1,2 \mu\text{M}$) może tworzyć jedynie międzycząsteczkowy G- kwadrupeks. Wszystkie trzy oligonukleotydy tworzą G-kwadrupeksy z rdzeniem złożonym z dwóch G-tetrad, jednakże pomiędzy samymi strukturami mogą występować różnice w typie tworzonej trójnukleotydydowej pętli. Można zatem założyć, że zwiększona interakcja białka hnRNP A1 z RNA C4 i D4 wynika z wewnątrzcząsteczkowego charakteru G-kwadrupeksu lub z różnic w rodzaju pętli. Te wnioski są zgodne z opublikowanymi wcześniej badaniami, które udowodniły, że wiązanie hnRNP A1 jest zależne zarówno od sekwencji jak i struktury G-kwadrupeksu, przy czym hnRNP A1 ma większą tendencję do wiązania wewnątrzcząsteczkowych struktur [97]. Oligonukleotydy z grupy A nie tworzą żadnych struktur drugorzędowych, z kolei B2 i B3 tworzą struktury dwuniciowe. Na podstawie tych wyników, można wysnuć wniosek, że hnRNP A1 silniej oddziałuje z G-kwadrupeksami niż z motywami dwuniciowymi i jednoniciowymi RNA.

Najsilniejsze wiązanie pomiędzy RNA a białkiem zaobserwowano dla oligonukleotydów C4 oraz D4. Doniesienia literaturowe sugerują, że sekwencja 5' GGA 3' jest rozpoznawana przez białka wzmacniające splicing (np. SRSF1) [98,99]. W związku z tym, sekwencje zawierające ten motyw nie zostały użyte w badaniach

na liniach komórkowych, celem uniknięcia nieoczekiwanego efektu regulatorowego. Jako sekwencję rekrutującą białka splicingowe wybrano sekwencję D4. Została ona wykorzystana w części regulatorowej BASO w eksperymentach optymalizacji pozycji hybrydyzacji BASOs w pre-mRNA genu *PKM*.



Rysunek 15. Znormalizowane krzywe topnienia dla regulatorowych oligonukleotydów. **A.** Krzywe topnienia G-kwadrupleksów zarejestrowane przy długości fali 295 nm. **B.** Krzywe topnienia struktur dwuniciowych zarejestrowane przy długości fali 260 nm.

2. Optymalizacja BASOs w linii komórkowej HeLa

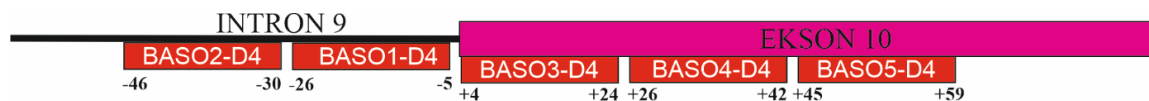
Gen *PKM* został przeze mnie zastosowany jako model do optymalizacji efektywności działania dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych w linii komórkowej HeLa. Wybór ten był motywowany przede wszystkim rodzajem alternatywnego splicingu, jakiemu podlega gen *PKM*. Do tej pory badania nad zastosowaniem BASOs do regulacji alternatywnego splicingu koncentrowały się głównie na wyciszeniu lub wzmocnieniu poszczególnych miejsc splicingowych. W swoich badaniach chciałam skupić się konkretnie na terapeutycznej regulacji splicingu wzajemnie wykluczających się eksonów. Ponadto, zarówno transkrypt genu *PKM*, jak i białko PKM występują w dużej ilości w komórkach nowotworowych, dzięki czemu ocena poziomu ekspresji poszczególnych izoform jest stosunkowo łatwa.

W wyborze tego modelu badawczego miał też znaczenie wpływ izoformy PKM2 na nowotworzenie, co zostało opisane w części literaturowej. Współczesne terapie przeciwnowotworowe skupiają się na konkretnych celach molekularnych, które są zaangażowane w patogenezę danej jednostki chorobowej. Zwiększa to efektywność oraz bezpieczeństwo stosowanej terapii. Przedstawiona przeze mnie w części literaturowej zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją izoformy PKM2, a nowotworzeniem udowadnia, że białko to jest dobrym celem terapeutycznym, a potencjalna terapia może polegać na regulacji alternatywnego składania jego transkryptu.

2.1 Optymalizacja części antysensowej BASOs

Początkowy etap optymalizacji BASOs zakładał analizę różnych pozycji hybrydyzacji w obrębie eksonu 10 genu *PKM*. Założeniem zaprojektowanych BASOs jest wyciszenie splicingu eksonu 10 i przekierowanie maszyny składania genów na ekson 9. Oczekiwanym rezultatem jest zwiększenie produkcji izoformy PKM1, obniżenie poziomu ekspresji izoformy PKM2 lub obserwacja obu tych zmian jednocześnie. Zazwyczaj BASOs są projektowane tak, by oddziaływały w pobliżu miejsc cięcia, dzięki czemu białka regulatorowe mogą wpływać na ich wykorzystanie. Wcześniejsze badania nad regulacją alternatywnego splicingu genu *PKM* wykazały, że miejsce 3'ss jest niezbędne dla definicji eksonu 10 [61]. Dlatego też, podczas projektowania BASOs podjęto próbę wyciszenia miejsca 3'ss. Dwa oligonukleotydy (BASO1-D4, BASO2-D4)

zaprojektowano komplementarnie do sekwencji intronu 9, które znajdują się w pobliżu granicy z eksonem 10 (Rys. 16, Tab. 4). Trzy następne oligonukleotydy (BASO3-D4, BASO4-D4, BASO5-D4) hybrydują do sekwencji w eksonie 10 powyżej jego miejsca 3'ss (Rys. 16, Tab. 4). Oligonukleotydy transfekowano do komórek HeLa w stężeniu 250 nM. Dla każdego z BASOs, zsyntetyzowano osobno również samą część antysensową (ASO1, ASO2, ASO3, ASO4, ASO5), w celu potwierdzenia czy ewentualny efekt regulacyjny jest spowodowany hybrydyzacją oligonukleotydu, czy aktywnością białek splicingowych połączonych z sekwencją regulatorową. Efektywność BASOs oceniono poprzez wyliczenie stosunku procentowego PKM2/PKM1, na podstawie danych ilościowych uzyskanych w reakcjach qPCR. W nietransfekowanych komórkach HeLa stosunek ten wyniósł 28.8. Pożądanym efektem jest zmniejszenie tej wartości.



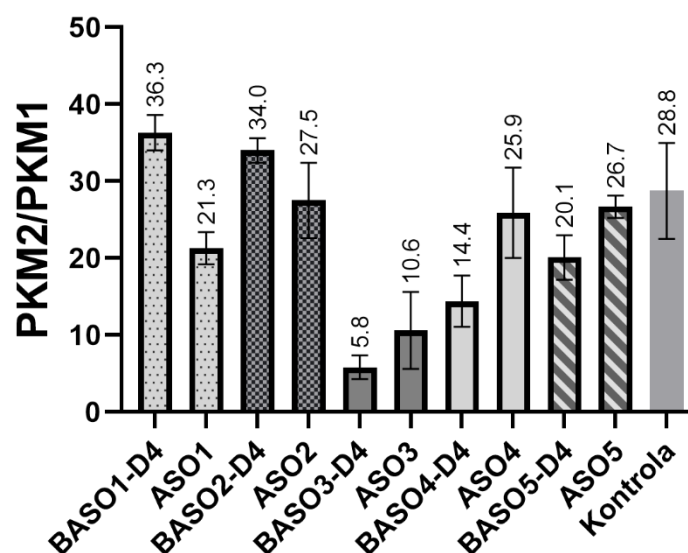
Rysunek 16. Pozycje hybrydyzacji BASOs w pre-mRNA genu *PKM*.

Tabela 4. Lista BASOs zaprojektowanych do optymalizacji miejsca hybrydyzacji części antysensowej w regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*. Wszystkie reszty nukleotydowe części antysensowej zawierają w pozycji 2' grupę metoksyłową (2'OMe). Część regulatorowa składa się z reszt rybonukleotydów.

Nazwa	Sekwencja BASO 5'→3'	Miejsce hybrydyzacji w pre-mRNA <i>PKM</i>
BASO1-D4	GAGAGGGGGACAGAGCU-(UAGGU) ₄	Intron 9, 3'ss -5 ÷ -26
BASO2-D4	GGGAGCAACAUCCGUCCAGAGG-(UAGGU) ₄	Intron 9, 3'ss -30 ÷ -46
BASO3-D4	GGCAGCCUCUGCCUCACGGG-(UAGGU) ₄	Ekson 10, 3'ss +4 ÷ +24
BASO4-D4	UAAUUGCAAGUGGUAGA-(UAGGU) ₄	Ekson 10, 3'ss +26 ÷ +42
BASO5-D4	CGGCGGAGUCCUCA-(UAGGU) ₄	Ekson 10, 3'ss +45 ÷ +59

Największą zmianę w stosunku procentowym izoform PKM2 oraz PKM1 zaobserwowano dla BASO3-D4, który hybryduje najbliżej miejsca 3'ss eksonu 10 (Rys. 17). Jednak silna regulacja alternatywnego splicingu nastąpiła również w przypadku oligonukleotydu antysensowego bez części regulatorowej (ASO3). Świadczy to o tym, że sama hybrydyzacja oligonukleotydu w pozycji +4 ÷ +24 eksonu 10 powoduje zmianę wzorca splicingu. ASO3 oddziałuje z pre-mRNA w bliskiej odległości do miejsca cięcia. Jest prawdopodobne, że ASO3 całkowicie blokuje oddziaływanie elementów spliceosomu z miejscem 3'ss, uniemożliwiając tym samym

definicję eksonu. Niższy stosunek PKM2/PKM1 dla BASO3-D4 sugeruje, że część regulatorowa przyczynia się do niewielkiego wzmocnienia efektu regulacyjnego. Pomimo, że BASO1-D4 hybrydyzuje w intronie 9 w podobnej odległości do 3'ss, co BASO3-D4 w eksonie 10, to regulacja składowania genu *PKM* jest znacznie słabsza. Co ciekawe, sama sekwencja antysensowa ma większy potencjał regulacyjny niż dwufunkcyjny oligonukleotyd. Oddalenie pozycji hybrydyzacji w stronę 5' od miejsca cięcia zmniejsza regulację alternatywnego splicingu, co można zauważyć dla ASO2. W przypadku BASO2-D4 również nie następuje wzmocnienie działania, dzięki zastosowaniu sekwencji regulatorowej dla białka hnRNP A1. Największa efektywność części regulatorowej w stosunku do ASO obserwowana jest dla BASO4-D4. Oligonukleotyd ten w zdecydowanie większym stopniu zmienia stosunek PKM2/PKM1 niż ASO4, który hybrydyzuje w tam samym miejscu. Sugeruje to, że zwiększona regulacja jest spowodowana rekrutacją białka hnRNP A1 w pobliżu miejsca 3'ss, co zmniejsza jego użycie. Oddalenie pozycji przyłączenia w kierunku 3' powoduje zmniejszenie regulacji zarówno dla BASO5-D4 jak i ASO5. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano miejsce hybrydyzacji oligonukleotydu (BASO4-D4), gdyż to dla tego BASO zaobserwowano największą efektywność w porównaniu z oligonukleotydem antysensowym. Wszystkie kolejne optymalizacje BASOs zostały wykonane z użyciem ASO4 hybrydującym w pozycji +26 ÷ +42 eksonu 10.



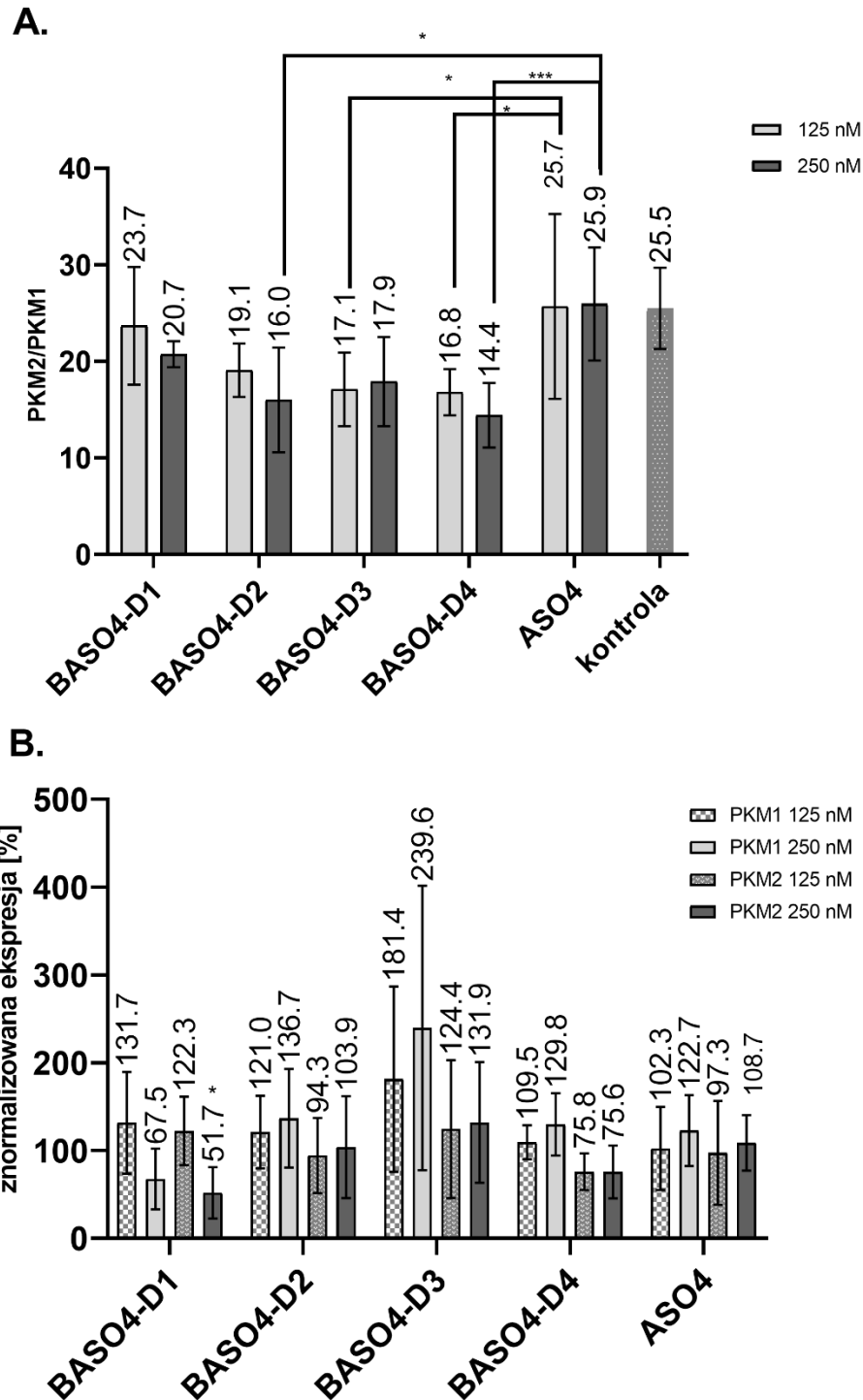
Rysunek 17. Wyniki optymalizacji części antysensowej BASOs. Stosunek poziomów izoform PKM2/PKM1 w zależności od różnych pozycji hybrydyzacji BASOs w pre-mRNA genu *PKM*.

2.2 Optymalizacja części regulatorowej BASO w linii komórkowej HeLa

2.2.1 Optymalizacja powtórzeń sekwencji 5' UAGGU 3'

W pierwszym etapie optymalizacji BASOs wykonano eksperymenty umożliwiające ocenę, jaka liczba powtórzeń sekwencji podstawowych jest najbardziej efektywna w regulacji alternatywnego splicingu. W tym celu zsyntetyzowano dodatkowe BASOs, które hybrydyzują w pozycji +26 ÷ +42 eksonu 10 i zawierają jedno (BASO4-D1), dwa (BASO4-D2) oraz trzy (BASO4-D3) powtórzenia sekwencji podstawowej D. Oligonukleotydy transfekowano do linii komórkowej HeLa w dwóch stężeniach 125 nM oraz 250 nM i inkubowano przez 48 godzin. Ponownie, wyniki przedstawiono w formie stosunku procentowego obydwu izoform. Dodatkowo, oceniono w jaki sposób zmienia się ilość obydwu izoform w porównaniu do poziomu ich ekspresji w komórkach nietransfekowanych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że termin „ekspresja izoform” używany w dalszej części rozprawy doktorskiej oznacza ilość mRNA, z którego dana izoforma białka jest tworzona i który powstał na skutek alternatywnego splicingu.

Transfekcja BASO z jednym powtórzeniem sekwencji D (BASO4-D1) nieznacznie obniżyła stosunek PKM2/PKM1 zarówno dla stężenia 125 nM jak i 250 nM. Zwiększenie ilości sekwencji regulatorowych do dwóch, spowodowało wzrost efektywności BASO. Niższe stężenie oligonukleotydu (125 nM) obniżyło stosunek PKM2/PKM1 do 19,1, a 250 nM stężenie do 16,0. Oligonukleotyd BASO3-D4 wykazuje podobny potencjał regulacji splicingu dla obydwu użytych stężeń. Obniżenie PKM2/PKM1 wynosiło odpowiednio 17,1 oraz 17,9 dla 125 nM i 250 nM stężenia BASO. Zmiana stosunku ilości izoform jest najbardziej znacząca dla BASO4-D4. W porównaniu do komórek nietransfekowanych, BASO4-D4 obniżył stosunek PKM2/PKM1 o 8,7 w stężeniu 125 nM oraz o 11,1 w stężeniu 250 nM (Rys. 18 A).



Rysunek 18. Wpływ różnej liczby powtórzeń sekwencji podstawowej D w BASOs na potencjał regulacji splicingu genu *PKM*. **A.** Stosunek PKM2/PKM1. Istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do ASO4. **B.** Znormalizowana ekspresja izoform PKM1 i PKM2 dla powtórzeń sekwencji podstawowej D. Wartość znormalizowanej ekspresji podano w odniesieniu do komórek nietransfekowanych (100%). Istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do ASO4. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

Na podstawie wyników znormalizowanej ekspresji można ocenić, że BASO4-D1 wpływa jednocześnie na podwyższenie (dla 125 nM) lub obniżenie (dla 250 nM) ekspresji obydwu izoform. BASO4-D2 podnosi poziom ekspresji PKM1, jednak nie ma znaczącego wpływu na ekspresję PKM2. Wysoki poziom ekspresji PKM1 zanotowano po transfekcji BASO4-D3. Przy 125 nM stężeniu oligonukleotydu ekspresja PKM1 wzrosła o 81,4 punktów procentowych, a przy stężeniu 250 nM o 139,6 punktów procentowych względem kontroli. Niestety, jednocześnie podniósł się również poziom PKM2 (Rys. 18 B). Wydaje się, że trzykrotne powtórzenie sekwencji regulatorowej D zwiększa produkcję mRNA z dwoma eksonami (ekson 9 i ekson 10). Pomimo, że uzyskano satysfakcjonujący rezultat podniesienia ekspresji PKM1 przez BASO4-D3, to nie udało się zmniejszyć ilości mRNA PKM2, co byłoby oczekiwanym rezultatem. Na podstawie przedstawionych rezultatów można natomiast wywnioskować, że najbardziej efektywne jest czterokrotne powtórzenie sekwencji regulatorowej (BASO4-D4).

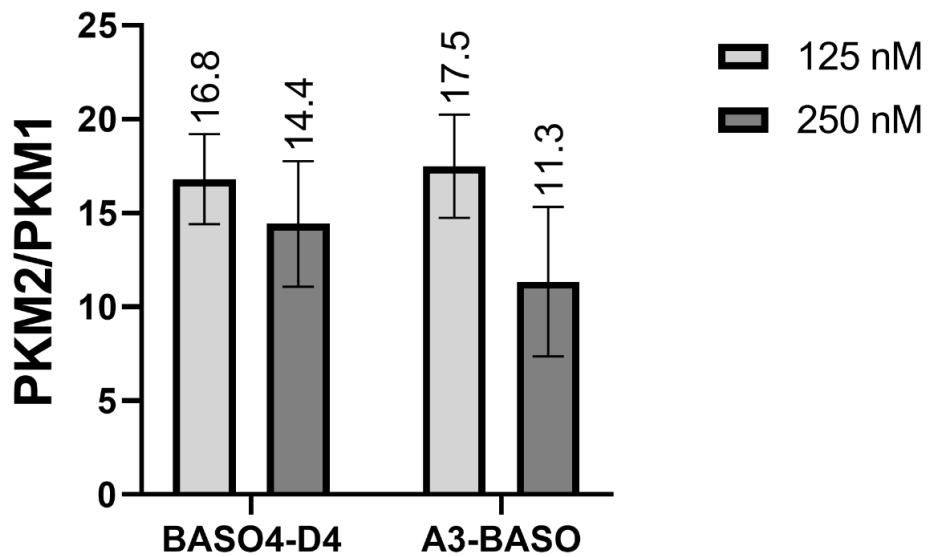
2.2.2 Wpływ sekwencji A3 na regulację alternatywnego splicingu

Badania wykonane metodą topnienia UV wykazały, że oligonukleotydy z grupy D mają tendencję do tworzenia struktur drugorzędowych. Natomiast, oligonukleotydy z grupy A nie tworzą struktur wyższego rzędu. Dla porównania efektywności ustrukturalizowanych i nieustrukturalizowanych oligonukleotydów oceniono również wpływ sekwencji A3 na regulację alternatywnego splicingu przez BASO. Wykonane eksperymenty udowodniły, że 125 nM stężenie BASO4-A3 ma taki sam potencjał zmiany stosunku PKM2/PKM1, jak BASO4-D4. Natomiast, stężenie 250 nM obniżyło stosunek do 11,3, co oznacza większą efektywność od BASO4-D4 (Rys. 19 A).

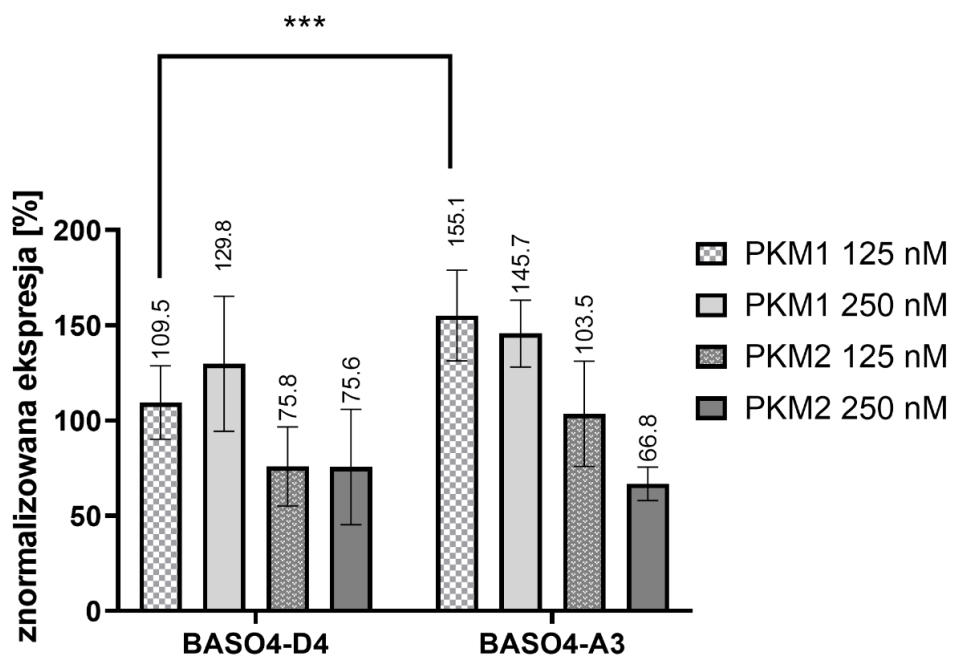
Wyniki znormalizowanej ekspresji wskazują na większą efektywność w podnoszeniu ilości izoformy PKM1 niż w przypadku BASO4-D4 (Rys. 19 B). Zarówno stężenie 125 nM jak i 250 nM zwiększyło poziom ekspresji PKM1 do około 150%. Należy jednak zauważyć, że w porównaniu z BASO4-D4 w stężeniu 125 nM, BASO4-A3 nie wpływa w żaden sposób na poziom ekspresji izoformy PKM2 (Rys. 19 B). Obniżenie ilości PKM2 pojawia się dopiero przy użyciu 250 nM stężenia oligonukleotydu. Niemniej jednak, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można wywnioskować, że oligonukleotydy zawierające sekwencję 5' CAGGUAAGU 3' również wykazują potencjał regulacyjny. Gendron i współpr. wykorzystali w BASOs

inną sekwencję, która występuje w miejscu donorowym (5' GUUGGUAUGA 3'). Autorzy zasugerowali, że efektywność tej sekwencji związana jest z interakcją z U1 snRNP. Należy zatem uwzględnić możliwość, że oligonukleotyd A3 rozpoznawany jest nie przez białko hnRNP A1, a U1 snRNP [89]. Przeprowadzony eksperyment potwierdził jednak zasadność użycia sekwencji miejsca 5'ss w części regulatorowej BASOs. Ciekawym wnioskiem jest to, że siła wiązania pomiędzy oligonukleotydem, a białkiem nie musi być skorelowana z potencjałem regulacyjnym. Zestawienie stałej wiązania sekwencji D4 oraz A3 mogłoby wskazywać, że oligonukleotyd A3 powinien mieć znacznie mniejszą efektywność. Możliwość rekrutacji innych białek regulatorowych do oligonukleotydu A3, utrudnia jednak wyciągnięcie wiążących wniosków. Mimo wszystko, w związku z dużym potencjałem sekwencji 5' CAGGUAAGU 3', również dla tej sekwencji oceniono wpływ jej powtórzeń na efektywność BASOs.

A



B



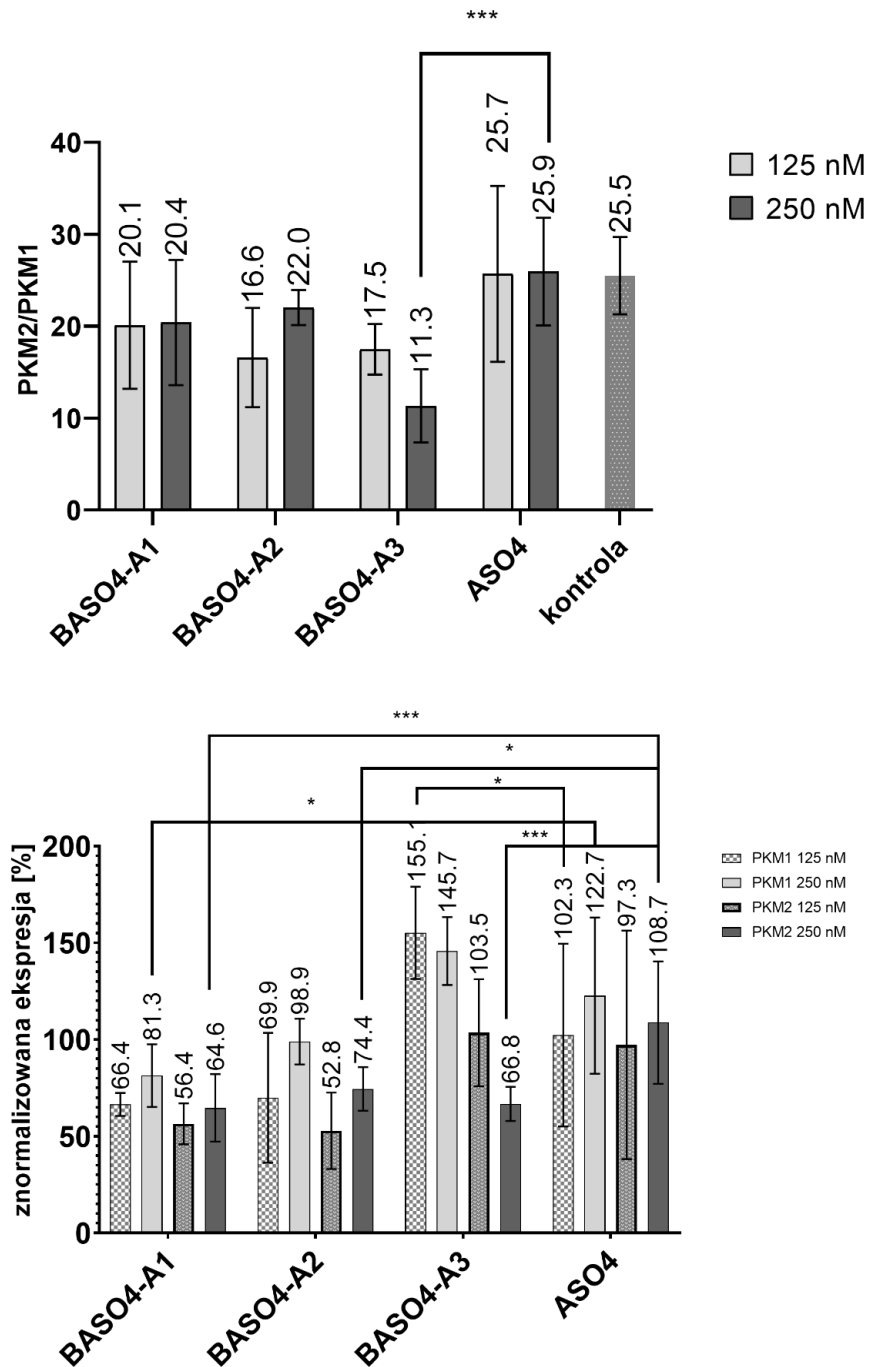
Rysunek 19. Porównanie efektywności oligonukleotydu BASO4 zawierającego sekwencję regulatorową D4 i A3. **A.** Stosunek PKM2/PKM1. **B.** Znormalizowana ekspresja izoform PKM1 i PKM2. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

2.2.3 Optymalizacja powtórzeń sekwencji 5' CAGGUAAGU 3'

Uwzględniając długość sekwencji A (9 nt), zarówno w eksperymentach EMSA, jak i komórkowych, została ona powtórzona maksymalnie 3 razy. Do transfekcji linii komórkowej HeLa wykorzystano oligonukleotydy z jednym (BASO4-A1), dwoma (BASO4-A2) oraz trzema (BASO4-A3) powtórzeniami sekwencji A.

Wszystkie trzy oligonukleotydy z sekwencją A obniżają stosunek procentowy PKM2/PKM1 (Rys. 20 A). BASO4-A1 wykazuje podobną aktywność dla dwóch użytych stężeń. BASO4-A2 w większym stopniu obniża stosunek PKM2/PKM1 przy 125 nM stężeniu (16,6) niż przy 250 nM (22,0). Najefektywniejszym oligonukleotydem z sekwencją A pozostał zatem BASO4-A3, który obniża PKM2/PKM1 do 17,5 przy stężeniu 125 nM oraz do 11,3 przy stężeniu 250 nM (Rys. 20 A).

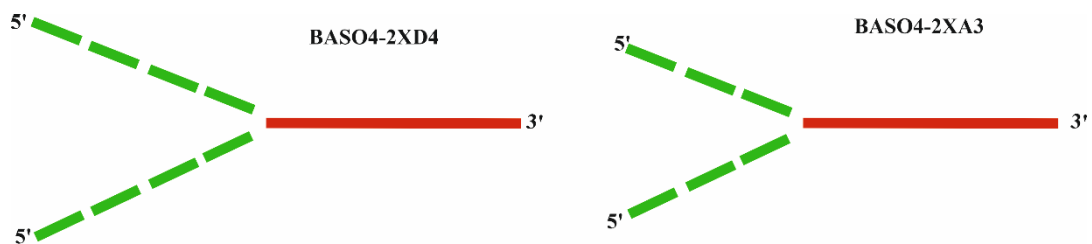
Wyniki znormalizowanej ekspresji pokazują, że zarówno BASO4-A1 jak i BASO4-A2 obniżają jednocześnie ekspresję obu izoform. Jedynie 250 nM stężenie BASO4-A2 zmniejszyło ekspresję PKM2, nie wpływając na poziom PKM1. Uzyskane rezultaty potwierdzają, że najefektywniejszym oligonukleotydem z grupy A, jest BASO4-A3, który w stężeniu 250 nM podnosi ekspresję PKM1 do 145,7% i jednocześnie obniża ekspresję PKM2 do 66,8% (Rys. 20 B). Porównując sekwencje 5' UAGGU 3' oraz 5' CAGGUAAGU 3' można wywnioskować, że sekwencja 5' CAGGUAAGU 3' jest mniej efektywna w regulacji alternatywnego splicingu. Zarówno pojedyncza sekwencja regulatorowa jak i dwukrotnie powtórzona nie zwiększyła ekspresji PKM1. Podniesienie ekspresji izoformy PKM1 można zauważyć dopiero przy trzykrotnym powtórzeniu sekwencji A. Natomiast, w przypadku sekwencji D, podniesienie ekspresji PKM1 jest widoczne już dla BASO4-D2.



Rysunek 20. Wpływ różnych powtórzeń sekwencji podstawowej A3 w BASOs na potencjał regulacji splicingu genu *PKM*. **A.** Stosunek PKM2/PKM1, istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do komórek transfekowanych ASO. **B.** Znormalizowana ekspresja izoform PKM1 oraz PKM2. Kontrola (komórki nietransfekowane) wynosi 100%. Istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do komórek transfekowanych ASO. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

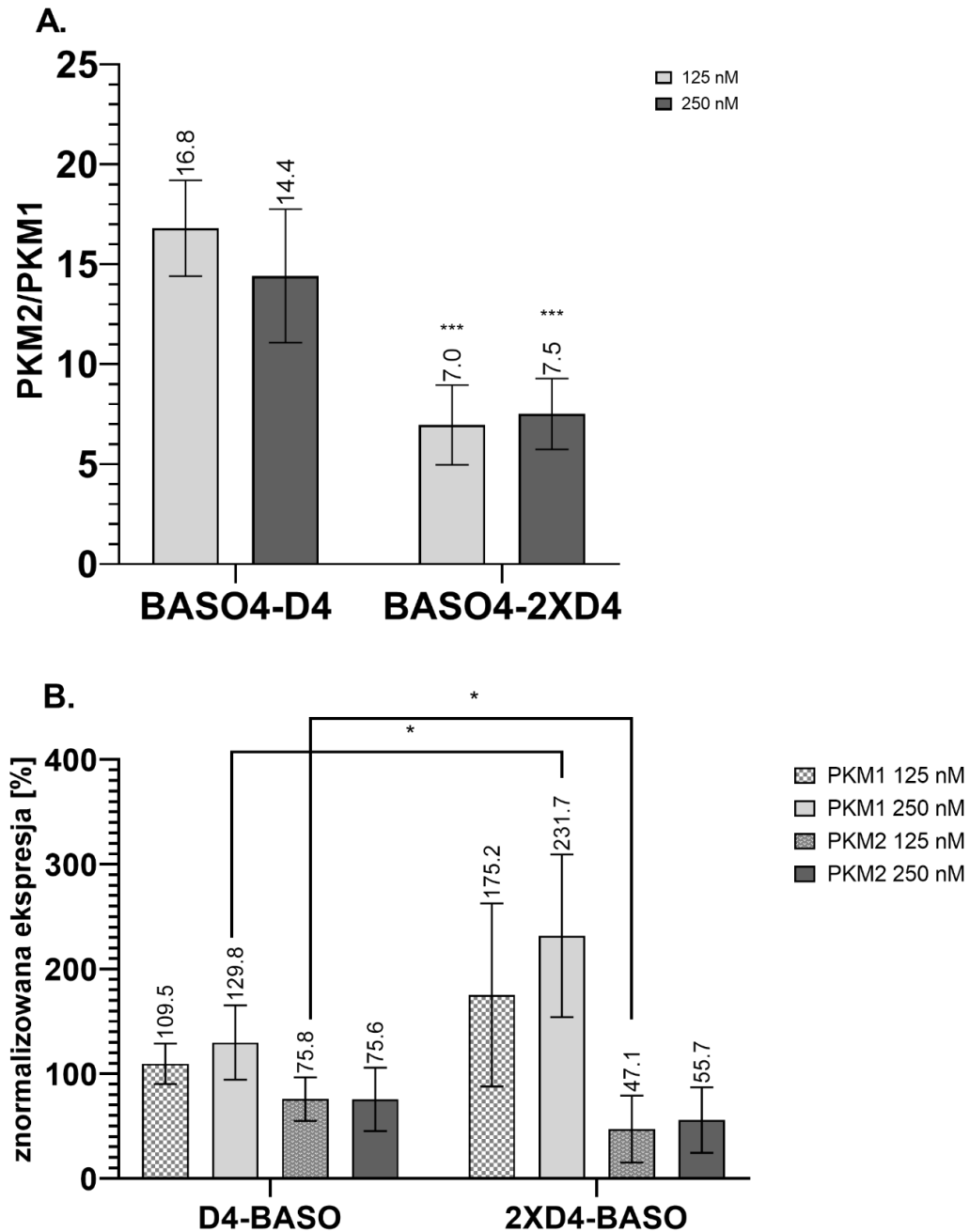
2.2.4 Rozgałęzione BASOs

W kolejnym etapie podjęto próbę regulacji alternatywnego splicingu za pomocą rozgałęzionych BASOs (ang. *branched bifunctional antisense oligonucleotides*, bBASOs), które umożliwiają połączenie dwóch oligonukleotydów regulatorowych z jednym oligonukleotydem antysensowym (Rys. 21). Podobne narzędzia molekularne zostały już użyte wcześniej w eksperymentach splicingu *in vitro* przez inną grupę badawczą [89]. Natomiast, w zaprezentowanych tutaj badaniach wykorzystano je po raz pierwszy w eksperymentach na liniach komórkowych. Rozgałęzione oligonukleotydy zostały utworzone poprzez zastosowanie dwóch sekwencji D4 (BASO4-2XD4) oraz dwóch sekwencji A3 (BASO4-2XA3). BASO4-2XD4 zawiera zatem łącznie osiem sekwencji regulatorowych, a BASO4-2XA3 sześć sekwencji regulatorowych. Części regulatorowe zostały połączone z oligonukleotydem antysensowym od strony 5' (Rys 21).



Rysunek 21. Schemat budowy rozgałęzionych BASOs. Kolorem czerwonym oznaczono część antysensową, a kolorem zielonym części regulatorowe bBASOs.

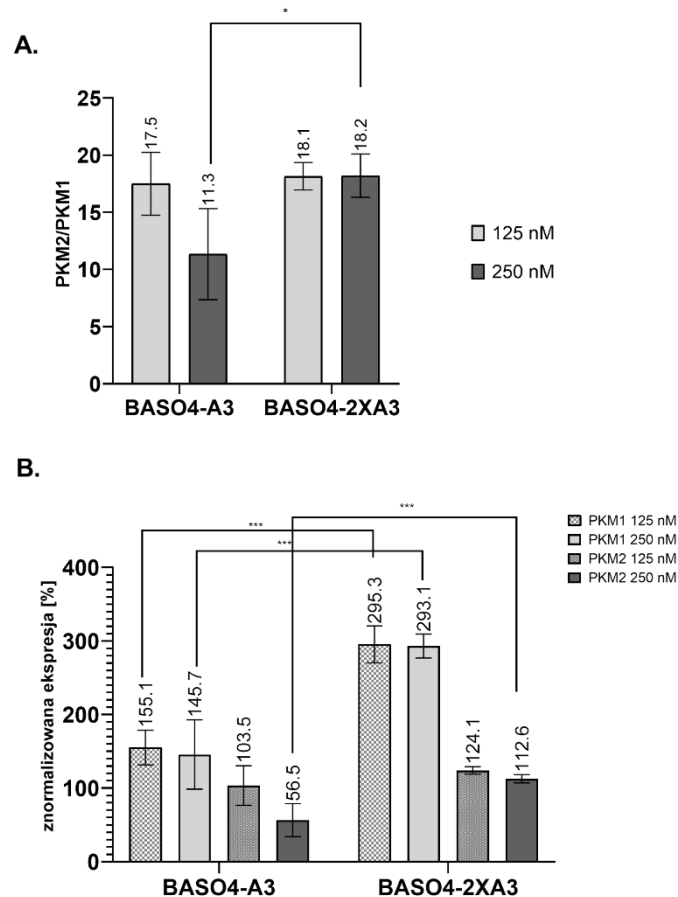
Zastosowanie rozgałęzienia znacząco zwiększyło efektywność BASOs. W przypadku BASO4 2XD4 zanotowano najsilniejszy spadek stosunku PKM2/PKM1 spośród wszystkich testowanych oligonukleotydów, który wynosi dla stężenia 125 nM 7,0, a dla 250 nM 7,5. Efekt ten jest zatem dwukrotnie większy niż dla oligonukleotydu BASO4-D4 (Rys. 22 A). Wyniki te znajdują odzwierciedlenie w poziomie ekspresji obu izoform. Przy 125 nM stężeniu bBASO poziom PKM2 został zmniejszony do 47%, a PKM1 zwiększony do 175%. Z kolei, przy 250 nM stężeniu bBASO poziom PKM2 spadł o 45, a poziom PKM1 wzrósł o 131 punktów procentowych (Rys. 22 B).



Rysunek 22. Porównanie efektywności rozgałęzionego BASO4-2XD4 z liniowym BASO4-D4. **A.** Stosunek PKM2/PKM1. **B.** Znormalizowana ekspresja izoform PKM1 oraz PKM2. Istotność statystyczną wyliczono porównując wyniki BASO4-2XD4 z BASO4-D4. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

Interesujące, że BASO4-2XA3 nie ma tak znaczącego wpływu na stosunek obu izoform jak BASO4-2XD4. Jego efektywność jest niższa nawet niż BASO4-A3. Przy obu stężeniach stosunek PKM2/PKM1 został obniżony do ok 18,0. Jest to wartość podobna

do tej otrzymanej dla BASO4-A3 przy 125 nM stężeniu, jednak znacznie wyższa od wartości otrzymanej dla BASO4-A3 przy stężeniu 250 nM (11,3) (Rys. 23 A). Jednak udało się znacząco zwiększyć poziom ekspresji izoformy PKM1. Poziom PKM1 został podwyższony dwukrotnie w porównaniu do BASO4-A3 przy użyciu obu stężeń BASO4-2XA3 (Rys. 23 B). Zaskakujące jest to, że oligonukleotyd ten nie wpłynął w żaden sposób na obniżenie produkcji izoformy PKM2. Jej poziom zwiększył się nawet do 124% oraz 112 %, odpowiednio dla stężeń 125 nM oraz 250 nM. Pomimo, że wzrost ekspresji izoformy PKM1 jest znaczący dla BASO4-2XA3, to bardziej oczekiwany rezultat został osiągnięty dla BASO4-2XD4, który nie tylko zwiększa ekspresję PKM1, ale też obniża PKM2. Fakt, że BASO4-2XA3 działa w inny sposób niż jego liniowy odpowiednik BASO4-A3 może potwierdzać wcześniej postawioną hipotezę, że oligonukleotydy z serii A mogą być rozpoznawane przez inne białka niż hnRNP A1.



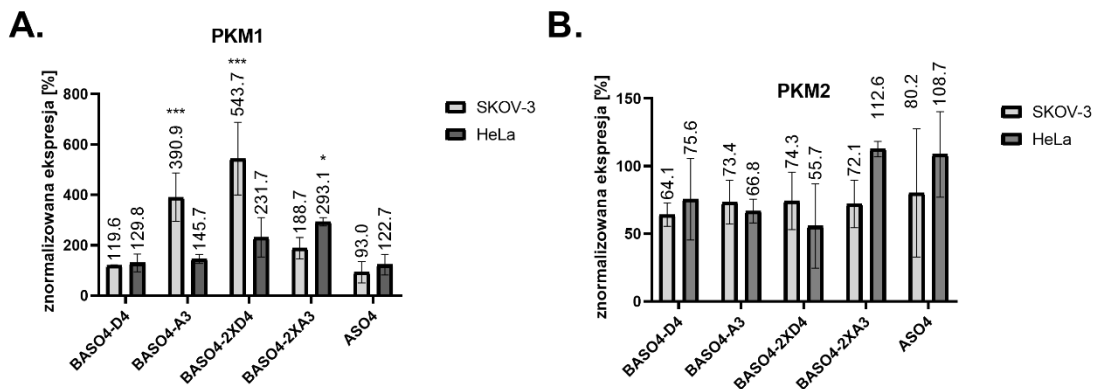
Rysunek 23. Porównanie efektywności rozgałęzionego BASO4-2XA3 z BASO4-A3. **A.** Stosunek PKM2/PKM1. **B.** Znormalizowana ekspresja izoform PKM1 oraz PKM2. Istotność statystyczna została wyliczona poprzez porównanie wyników BASO4-2XA3 z BASO4-A3. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

Pierwotnym celem wcześniejszych badań nad projektowaniem i syntezą rozgałęzionych kwasów nukleinowych (ang. *brached nucleic acids*, bNA) były próby identyfikacji białek, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie miejsca rozgałęzienia w pre-mRNA. Oligonukleotydy bNA miały przypominać strukturę lassa, która powstaje już podczas pierwszej reakcji transestryfikacji, a następnie w wyniku drugiej reakcji, intron uformowany w taką strukturę zostaje uwolniony i degradowany. Takie oligonukleotydy wykorzystują zarówno grupę 2'-jak i 3'-hydroksylową reszty adenozyne po to, by utworzyć odpowiednio wiązanie 2'-5' oraz 3'-5' z kolejnymi resztami nukleotydowymi. Udowodniono, że bNA mają funkcję hamującą splicing, pomimo że nie hybrydują z pre-mRNA [100]. Aktywność ta może wynikać z tego, że bNA są rozpoznawane przez białka, które naturalnie biorą udział w reakcji składania genów. Wprowadzenie bNA do komórki izoluje te białka od ich docelowych miejsc wiązania. Skutkiem tego dochodzi do zatrzymania reakcji splicingu. Ten typ oligonukleotydów został użyty w badaniach nad BASOs prowadzonych przed Gendrona i współprac. [89]. Autorzy wykorzystali bNA do połączenia z częścią antysensową dwóch oligonukleotydów nie posiadających właściwości regulatorowych. Okazało się, że zastosowanie bNA z tymi sekwencjami powoduje wyciszenie splicingu. Był to dowód na to, że sama obecność rozgałęzionej reszty adenozyne powoduje zmianę wzorca splicingu poprzez rekrutację odpowiednich białek. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach zastosowano inny typ rozgałęzionych BASOs. Jako łącznik umożliwiający połączenie dwóch oligonukleotydów regulatorowych z jednym oligonukleotydem antysensowym posłużył łącznik glicerolowy. W związku z tym, miejsce rozgałęzienia nie znajduje się w reszcie adenozyne. Co więcej, polarność nici względem miejsca rozgałęzienia jest również inna od polarności uzyskanej dla wcześniej publikowanych konstruktów bNA. Dlatego też można założyć, że efekt regulatorowy, który jest obserwowany przy użyciu bBASOs jest wynikiem obecności zwiększonej ilości sekwencji regulatorowych, a nie samego miejsca rozgałęzienia. Na podstawie wszystkich opisanych wyżej eksperymentów, nasuwa się wniosek, że ilość miejsc wiążących białka w BASOs pozytywnie koreluje z funkcją regulatorową tych cząsteczek.

3. Ocena efektywności BASOs w linii komórkowej SKOV-3

Następnym etapem realizacji pracy doktorskiej była ocena, czy zaprojektowane oligonukleotydy wykazują uniwersalną efektywność w różnych liniach komórkowych.

W tym celu wybrano linię komórkową SKOV-3. Są to komórki epitelialne, pochodzące z gruczołowego raka jajnika. Czynnikiem wpływającym na wybór tej linii, był fakt, że przeprowadzono na niej eksperymenty, w których oceniono wpływ wyciszenia izoformy PKM2 na cechy fenotypowe tych komórek [101]. Do transfekcji wybrano BASOs, które wykazały najwyższą efektywność w regulacji alternatywnego splicingu (BASO4-2XD4, BASO4-2XA3) oraz odpowiadające im oligonukleotydy liniowe (BASO4-D4, BASO4-A3). Dodatkowo, transfekowano również kontrolny oligonukleotyd antysensowy (ASO4). Transfekcję oligonukleotydów wykonano w stężeniu 250 nM. Komórki SKOV-3 były poddane działaniu BASOs przez 48 godzin, po czym wykonano izolację RNA oraz analizę ilości izoform metodą qPCR. Na rysunku 24 przedstawiono wyniki znormalizowanej ekspresji PKM1 oraz PKM2 w komórkach SKOV-3 w porównaniu do wyników uzyskanych dla linii komórkowej HeLa. Dla bardziej czytelnej analizy wyniki dla PKM1 oraz PKM2 przedstawiono na osobnych wykresach (Rys. 24 A i B).



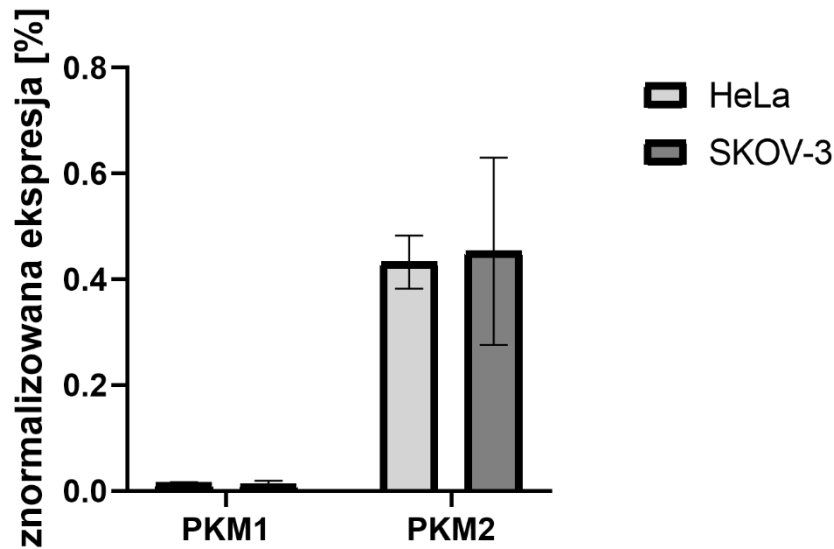
Rysunek 24. Porównanie poziomu ekspresji izoform PKM1 (A) oraz PKM2 (B) w linii komórkowej SKOV-3 i HeLa w wyniku transfekcji BASOs. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

Działanie oligonukleotydu BASO4-D4 jest podobne w obu liniach komórkowych. Zaobserwowana różnica pomiędzy poziomem ekspresji zarówno izoformy PKM1 jak i PKM2 wynosi około 10 punktów procentowych (Rys. 24 A i B). Z kolei znaczącą różnicę zanotowano dla BASO4-A3. Wpływ na regulację alternatywnego splicingu jest wyraźnie większy w linii SKOV-3 niż w HeLa. Poziom ekspresji izoformy PKM1 wzrósł

do 390,9% w porównaniu do komórek nietransfekowanych, podczas gdy w linii HeLa wynosił tylko 145,7% (Rys. 24 A). Co ważne, poziom izoformy PKM2 został w podobny sposób obniżony (Rys. 24 B). Jeszcze lepszy wynik uzyskano dla BASO4-2XD4. Oligonukleotyd bBASO ponad pięciokrotnie zwiększył produkcję PKM1 w linii komórkowej SKOV-3, co jest wynikiem ponad dwukrotnie wyższym niż w linii HeLa (Rys. 24 A). Zauważono jednak, że obniżenie ekspresji PKM2 było wyraźniejsze w komórkach HeLa (55,7%) niż w SKOV-3 (74,3%) (Rys. 24 B). Opisane wyżej BASOs wykazały podobną (BASO4-D4) lub nawet wyższą (BASO4-A3, BASO4-2XD4) aktywność w linii komórkowej SKOV-3. Tymczasem, sposób działania BASO4-2XA3 jest wyraźnie inny w linii komórkowej SKOV-3. W linii HeLa nastąpił znaczący wzrost ekspresji PKM1 w porównaniu z liniowym odpowiednikiem BASO4-A3, jednak nie zauważono obniżenia ekspresji PKM2. Z kolei, w linii SKOV-3 BASO4-2XA3 w mniejszym stopniu wpłynął na ekspresję PKM1. Poziom ekspresji podniósł się o 88,7 punktów procentowych, podczas gdy w linii HeLa o 193. Następną różnicą to wpływ na poziom izoformy PKM2. W linii komórkowej HeLa, nie udało się obniżyć poziomu PKM2, natomiast w SKOV-3 obniżył się do 72,1% (Rys. 24 B). W przypadku oligonukleotydu antysensowego ASO4 można wywnioskować, że podobnie jak w linii HeLa, wpływ na splicing nie jest znaczący. Zauważono jedynie niewielkie obniżenie ekspresji obu izoform (Rys. 24 A i B).

Opisane wyżej wyniki stanowią dowód na to, że efektywność BASOs może być zależna od typu komórek, które są poddawane ich działaniu. Obie wykorzystane linie komórkowe są epithelialne i pochodzą z gruczołowego nowotworu żeńskiego układu rozrodczego. Pomiedzy różnymi typami komórek oraz liniami komórkowymi występują różnice w poziomie ekspresji białek. Jedną z podstawowych przyczyn różnej efektywności BASOs w wybranych liniach komórkowych mogą być znaczące różnice w ilości transkryptu genu *PKM*. Wysoki poziom ekspresji PKM mógłby wymagać większego stężenia oligonukleotydów dla uzyskania podobnego efektu regulacji. Dlatego też, przeanalizowano poziom ekspresji izoform PKM1 i PKM2 w liniach komórkowych HeLa i SKOV-3 odnosząc go do poziomu aktywności genu referencyjnego (Rys. 25). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami komórkowymi.

Oznacza to, że poziom ekspresji PKM nie jest przyczyną rozbieżności w działaniu BASOs.



Rysunek 25. Znormalizowana ekspresja izoform PKM2 i PKM1 w liniach komórkowych HeLa oraz SKOV-3. Poziom ekspresji został znormalizowany z ekspresją genu referencyjnego – aktyny.

Różnice pomiędzy liniami komórkowymi w poziomie ekspresji białek dotyczą również białek zaangażowanych w regulację alternatywnego splicingu. W dostępnej literaturze, nie udało się odnaleźć porównania ekspresji białka hnRNP A1 w linii komórkowej HeLa oraz SKOV-3. Natomiast, porównano poziom białka hnRNP A1 w liniach takich jak HeLa, HEK293 (embrionalne komórki nerki), SK-NB-E (komórki nerwiaka zarodkowego), U-118MG (komórki glejaka) oraz A172 (komórki glejaka wielopostaciowego). Na podstawie wyników z metody Western-Blott ustalono, że podobna ilość hnRNP A1 znajduje się w liniach HeLa, HEK293 oraz SK-NB-E. Wyraźnie niższy poziom występuje w U-118MG oraz A172 [49]. Jest to dowód na to, że poziom tego białka nie jest stały we wszystkich liniach nowotworowych. Wydaje się, że najważniejszym czynnikiem, który może wpływać na efektywność BASOs w poszczególnych liniach komórkowych, jest właśnie poziom ekspresji białek, które są celem części regulatorowej BASOs. W przypadku opisanych w tej rozprawie BASOs, docelowym białkiem jest hnRNP A1. Ma to szczególne znaczenie dla modulacji składania genu *PKM*, gdyż jego alternatywny splicing jest zależny od białka hnRNP A1. Dodatkowo, korelacja pomiędzy poziomem ekspresji białka hnRNP A1, a alternatywnym składaniem genu *PKM* została potwierdzona w linii HeLa. Wysoki poziom białka hnRNP

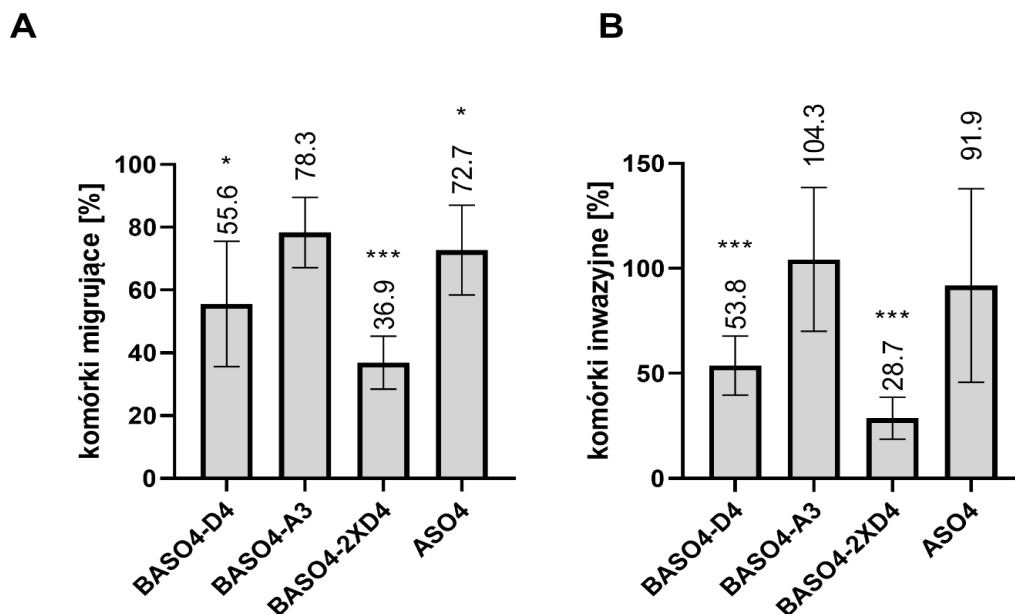
A1 może powodować, że pomimo rekrutacji białka przez BASOs, wciąż wszystkie miejsca wyciszające splicing eksonu 9 są okupowane przez białko hnRNP A1, co utrudnia rozpoznanie miejsc cięcia eksonu 9. W przypadku niskiego stężenia białka można postawić dwie hipotezy tłumaczące efektywność oraz brak efektywności BASOs w komórkach. Powinowactwo białka do RNA, jest zależne nie tylko od samej sekwencji nukleotydów, ale również od struktury drugorzędowej czy obecności innych białek (zarówno wspomagających wiązanie, jak i konkurujących o miejsce wiązania). Zatem niska efektywność BASOs może wynikać z większego powinowactwa białka hnRNP A1 do pre-mRNA niż do części regulatorowej oligonukleotydu. W warunkach, kiedy stężenie białka jest niskie, większość jego cząsteczek pozostaje związana z pre-mRNA, a BASOs bez połączenia z białkiem efektorowym nie wpływają na zmianę alternatywnego splicingu. Natomiast, jeśli udało się zaprojektować cząsteczki BASOs, które spowodują, że hnRNP A1 będzie miało większe powinowactwo do BASOs niż do pre-mRNA, to nawet przy niskim stężeniu białka efektorowego, przekierowanie jego cząsteczek w docelowe miejsce za pomocą BASOs umożliwi regulację składania genu. Na podstawie opublikowanych danych, można raczej założyć, że w przypadku linii komórkowej HeLa występuje zbyt wysoka ekspresja białka hnRNP A1. Zmiana wzorca składania genu *PKM* jest bardzo wyraźna w linii SKOV-3. Jeśli poziom hnRNP A1 w linii SKOV-3 jest niższy niż w HeLa może to tłumaczyć większą efektywność BASOs. W takim przypadku większość cząsteczek hnRNP A1 może być rekrutowanych do sekwencji regulatorowej BASO, co częściowo uniemożliwia oddziaływanie białka z pre-mRNA. Dotychczasowe badania nad BASOs były przeprowadzane zazwyczaj na jednej linii komórkowej, dlatego też ciężko znaleźć odniesienie w literaturze dla postawionej hipotezy. Jako przykład można tu jednak podać BASO z sekwencją wzmacniającą splicing, który został zaprojektowany dla regulacji składania genu białka Ron. Eksperyment przeprowadzono na linii raka żołądka (KATOIII) oraz jelita grubego (SW480). W obu liniach wykazano efektywność BASOs. Jednak, w linii KATOIII stosunek $\Delta\text{Ron}/\text{Ron}$ obniżył się z około 2,25 na około 1,25, a w linii SW480 z ok 1,75 na 1,25. Potwierdza to, że efektywność BASOs nie jest uniwersalna dla wszystkich linii komórkowych.

4. Ocena wpływu BASOs na migrację oraz inwazję komórek SKOV-3

W związku z satysfakcjonującym efektem regulacji alternatywnego splicingu przez BASOs w komórkach SKOV-3, zdecydowano o ocenie zmian fenotypowych pojawiających się w wyniku działania BASOs. Komórki podczas procesu nowotworzenia przechodzą szereg przemian, które nadają im charakteru komórek nowotworowych. Jedną z typowych cech komórek nowotworowych jest ich zdolność do przerzutowania, które jest możliwe dzięki takim procesom komórkowym jak migracja i inwazja. Procesy te umożliwiają komórkom przemieszczanie się z miejsca inicjacji guza, poprzez naczynia krwionośne do innych narządów i tkanek w organizmie. Komórki nabłonkowe w fizjologicznym stanie nie wykazują dużej zdolności do migracji. Jednak podczas rozwoju komórki nowotworowej może dojść do przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), czyli procesu podczas którego komórki tracą charakter komórek epitelialnych i nabywają cech komórek mezenchymalnych. Wiąże się to ze zmianą ekspresji markerów powierzchniowych. Dochodzi do zaniku ekspresji E-kadheryny, a pojawia się wimentyna, czy N-kadheryna, co skutkuje utratą połączeń międzykomórkowych [102]. Inicjacja migracji komórek nabłonkowych (epitelialnych) jest związana z pojawieniem się gradientu czynników wzrostu lub chemokin [103]. W następstwie, dochodzi do polaryzacji komórki i wydłużenia jej jednego końca, który nadaje kierunek migracji. Komórki łączą się z macierzą zewnątrzkomórkową, zaczynają się kurczyć, a siła trakcyjna umożliwia im ruch. Sam ruch komórek nie jest wystarczający, by mogły przedostać się do sąsiednich tkanek lub krwioobiegu. Migrujące komórki muszą strawić macierz zewnątrzkomórkową. W tym celu wytwarzają specjalne enzymy, czyli metaloproteinazy [104]. Zdolność komórek nowotworowych do poruszania się zgodnie z gradientem stężeń będzie tu nazywany migracją, natomiast wytwarzanie enzymów i zdolność do trawienia macierzy zewnątrzkomórkowej określono inwazją.

Przedstawiono dowody na to, że izoforma PKM2 w istotny sposób przyczynia się do inwazyjności różnych komórek nowotworowych [63,72,101]. Dlatego też, podjęto próbę oceny, czy regulacja alternatywnego splicingu genu *PKM* przez BASOs może wpływać na właściwości inwazyjne komórek nowotworowych SKOV-3. Do tej pory opublikowane dane dotyczące wpływu PKM2 na migrację i inwazję skupiały się na wyciszeniu izoformy PKM2. Brakuje informacji o tym, jak na te procesy wpływa

regulacja splicingu genu *PKM* i podniesienie ekspresji izofromy PKM1. Do wykonania eksperymentów zastosowano test migracji i inwazji wykorzystujący wkładki z przepuszczalną membraną, zawierającą pory (ang. *transwell assay*). Komórki zostały zawieszane w pożywce niezawierającej płodowego serum z cieląt (ang. *fetal bovine serum*, FBS) i wysiane na wewnętrznej stronie wkładki. Wkładka została umieszczona w studziencie płytki 24-dołkowej, w której znajdowała się pożywka z FBS-em. Gradient czynników wzrostu (zawartych w serum) stymuluje komórki do migracji na zewnętrzną stronę membrany. Dla oceny inwazyjności zastosowano wkładki, które są pokryte matrycelem. Jest to substancja imitująca macierz zewnątrzkomórkową, którą komórki muszą najpierw strawić, by przedostać się do pożywki z serum. Komórki, które przemigrowały na zewnętrzną stronę wkładki zostały następnie utrwalone, wybarwione i przeliczone pod mikroskopem (Rys. 27). Na rysunku 26 przedstawiono wartość procentową komórek migrujących lub inwazyjnych dla każdego z BASOs, w odniesieniu do ilości komórek migrujących/inwazyjnych, które nie były poddawane transfekcji.



Rysunek 26. Wyniki testów migracji (A) i inwazyjności (B). Wyniki przedstawiają wartość procentową komórek migrujących i inwazyjnych w odniesieniu do nietransfekowanych komórek kontrolnych. Komórki zliczono z 10 różnych pól. * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że niektóre z BASOs mają aktywność hamującą migrację oraz inwazję komórek SKOV-3 (Rys. 26). Oligonukleotyd BASO4-2XD4 w największym stopniu wpłynął na migrację oraz inwazję tych komórek. W wyniku transfekcji BASO4-2XD4 tylko 36,9% komórek zostało utrwalonych na zewnętrznej warstwie membrany. Natomiast w teście inwazji, tylko 28,7% komórek było w stanie zdegradować matrigel i przedostać się na drugą stronę membrany. Uzyskany wynik jest bardzo podobny lub nawet lepszy niż przy zastosowaniu siRNA wyciszającego PKM2, który spowodował obniżenie ilości komórek migrujących o około 54%, a komórek inwazyjnych o około 65% [101]. BASO4-D4 również wpłynął na właściwości komórek nowotworowych. Liczba komórek migrujących oraz inwazyjnych spadła o około 50%. Znacznie gorszy wynik uzyskano dla BASO4-A3, który obniżył ilość komórek migrujących o 22 % i nie wpłynął w żaden sposób na inwazyjność komórek SKOV-3. Co ciekawe, bardzo podobne wyniki uzyskano dla ASO4. Otrzymane rezultaty trudno skorelować ze zmianą alternatywnego splicingu genu *PKM*, która następuje w wyniku transfekcji BASOs. Najwyższy poziom PKM1 występuje w komórkach transfekowanych BASO4-2XD4 oraz BASO4-A3. W przeprowadzonych testach migracji oraz inwazji, te dwa oligonukleotydy mają zupełnie inną efektywność, która jest bardzo wysoka dla BASO4-2XD4 i znikoma dla BASO4-A3. Co więcej, BASO4-D4 ma znacznie większy wpływ na migrację i inwazję niż oligonukleotyd BASO4-A3, pomimo że wzrost PKM1 jest znacznie mniejszy. Wskazuje to na to, że poziom PKM1 nie jest związany ze zmianami w zdolności komórek nowotworowych do migracji oraz inwazji. Poziom PKM2 otrzymany w wyniku transfekcji wszystkich BASOs jest bardzo podobny, przy czym najniższy poziom PKM2 obserwuje się dla oligonukleotydu BASO4-D4. Ponownie, nie można tu znaleźć zależności pomiędzy ekspresją PKM2, a wynikami z testów migracji i inwazyjności. Zastanawiające jest jednak to, że zastosowanie samego oligonukleotydu ASO4 również powoduje obniżenie ilości komórek migrujących, które jest na podobnym poziomie, co w przypadku BASO4-A3. ASO4 również w niewielki sposób obniża poziom ekspresji PKM2. Jest możliwe, że spadek izoformy PKM2 o około 20 % jest wystarczający, by zaobserwować niewielkie zmiany w migracji komórek SKOV-3, jednak nie ma to wpływu na ich inwazyjność. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że zmiany w migracji i inwazji komórek SKOV-3 muszą być zależne jeszcze od innych czynników niż poziom PKM1 i PKM2.

Wydaje się, że główną przyczyną uzyskanych różnic w efektywności poszczególnych oligonukleotydów jest rodzaj użytej sekwencji regulatorowej. Najwyraźniejszy efekt zaobserwowano dla oligonukleotydów zawierających różne powtórzenia sekwencji podstawowej D (5' UAGGU 3'). Ponadto, wpływ na migrację oraz inwazję jest skorelowany z ilością powtórzeń sekwencji podstawowej. Oligonukleotyd BASO4-D4 zawierający czterokrotnie powtórzoną sekwencję 5' UAGGU 3' obniża ilość komórek migrujących i inwazyjnych o około 50%, a BASO4-2XD4, który zawiera osiem powtórzeń sekwencji D dodatkowo zwiększa tą efektywność. Sugeruje to, że sama obecność sekwencji regulatorowej, która jest rozpoznawana przez białko hnRNP A1, jest przyczyną zmian w zdolnościach migracyjnych oraz inwazyjnych komórek nowotworowych. Może to oznaczać, że wprowadzenie oligonukleotydu z sekwencją regulatorową rekrutuje białka hnRNP A1, przez co obniża się pula aktywnych cząsteczek tego białka, które są wymagane dla inwazji oraz migracji komórek SKOV-3. Oznacza to, że BASOs mogą funkcjonować jako oligonukleotydy-pułapki (ang. *decoy oligonucleotides*), które wyłapują czynniki splicingowe w komórce, uniemożliwiając im wiązanie się z RNA. Takie wykorzystanie oligonukleotydów zostało zaproponowane w 2019 roku przez Denichenko i współprac. Oligonukleotydy-pułapki zawierają sekwencję RNA, która jest rozpoznawana przez czynniki splicingowe, czyli dokładnie tak jak część regulatorowa BASOs. W opublikowanych badaniach zaprojektowano takie oligonukleotydy dla białek PTB1, RBFOX oraz SRSF1 [105]. Metodą qPCR oceniono zmiany alternatywnego splicingu różnych genów, których splicing jest regulowany przez wyżej wymienione białka. Autorzy uzyskali satysfakcjonujące wyniki dotyczące regulacji splicingu wybranych genów, a także zmiany w fenotypie komórek nowotworowych. Zastanawiające jest jednak stężenie oligonukleotydów, które zostało użyte. Efekt uzyskano przy stężeniu 2,5-5 μM . W przypadku opisywanych w niniejszej pracy badaniach wykorzystano stężenie 250 nM. Wskazuje to na większą efektywność BASOs. Znaczenie może mieć jednak budowa chemiczna oligonukleotydu. W przytoczonych badaniach wykorzystano reszty 2'-O-metylo RNA, które mogą obniżać wiązanie z docelowymi białkami. Natomiast, w przypadku BASOs użyto wyłącznie nukleotydów RNA, które mimo mniejszej stabilności w komórce, wykazują duże powinowactwo do białek i w związku z tym większą efektywność.

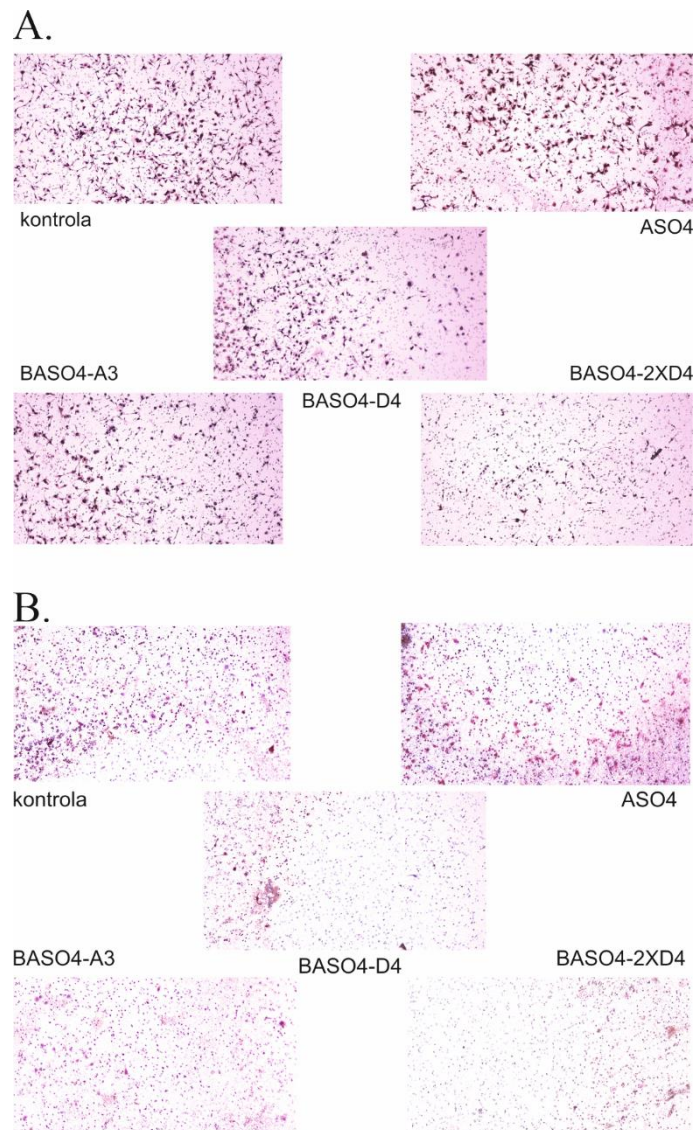
Rola białka hnRNP A1 w procesach inwazji i migracji została potwierdzona w licznych badaniach [50,106]. Komórki raka żołądka poddano działaniu siRNA

wyciszającego hnRNP A1, w wyniku czego zauważono obniżenie ich migracji oraz inwazyjności. Ponadto, zmniejszenie oddziaływań międzykomórkowych, zmianę kształtu komórek, obniżenie ekspresji E-kadheryny, zwiększenie ekspresji wimentyny zaobserwowano w wyniku indukcji nadekspresji białka hnRNP A1. Są to dowody na to, że hnRNP A1 indukuje przejście epithelialno-mezenchymalne [50]. Najbardziej prawdopodobną przyczyną opisanych zmian molekularnych oraz fenotypowych podczas wyciszenia hnRNP A1 jest obniżenie udziału tego białka w regulacji alternatywnego splicingu genów, których produkty są zaangażowane w przeprowadzanie procesu inwazji. Jednym z takich genów jest gen *PKM*, którego regulacja splicingu przez białko hnRNP A1 została szczegółowo opisana w części literaturowej. W literaturze przedstawiono co najmniej dwie ścieżki sygnałowe, w których izoforma PKM2 bierze udział, i które powiązano ze zwiększoną migracją lub inwazją komórek nowotworowych. Pierwszą z nich zaobserwowano w linii komórkowej raka piersi. PKM2 oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym c-MYC, który w następstwie włącza ekspresję białka surwiwiny. W drugiej ścieżce sygnałowej wykrytej w komórkach raka prostaty, PKM2 fosforyluje ERK1/2. ERK1/2 następnie fosforyluje c-Jun, który włącza ekspresję genu cyklooksygenazy. W wynikach badań opublikowanych przez Chen i współpracowników wykazano, że nadekspresja białka hnRNP A1 zwiększa ekspresję białek takich jak c-Jun oraz surwiwina [50]. Zatem można wysnuć wniosek, że obniżenie aktywności hnRNP A1 przez BASOs wiąże się z obniżeniem ekspresji białek, które wpływają na zdolności inwazyjne komórek nowotworowych. Pojawiają się tu dwie możliwości. Obniżenie aktywności hnRNP A1, obniża poziom PKM2, a to wpływa na poziom białek, z którymi wchodzi w interakcję PKM2 lub obniżenie aktywności hnRNP A1 niezależnie od PKM2, wpływa na ekspresję białek zaangażowanych w inicjowanie inwazji. Uwzględniając jednak fakt, że podobny poziom PKM2 zaobserwowano dla wszystkich BASOs, a znaczący wpływ na migrację osiągnięto dla BASO4-D4 i BASO4-2XD4, można wywnioskować, że hnRNP A1 niezależnie od PKM2, wpływa na ekspresję wyżej wymienionych białek. Na podstawie dostępnej literatury i przedstawionych w tej pracy wyników badań trudno jednak określić, w jaki sposób hnRNP A1 przyczynia się do zmniejszenia poziomu tych białek.

Podsumowując, zaobserwowany efekt zahamowania migracji komórek SKOV-3 przez oligonukleotydy BASO4-D4, BASO4-2XD4 oraz w niewielkim stopniu BASO4-

A3 i ASO4, a także zahamowania inwazji przez BASO4-D4 i BASO4-2XD4 może wynikać z dwóch nakładających się mechanizmów:

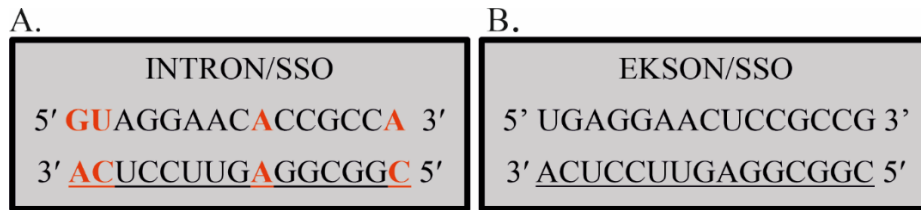
1. Regulacja alternatywnego splicingu genu *PKM* w wyniku czego dochodzi do obniżenia ekspresji PKM2.
2. Obniżenie aktywności białka hnRNP A1, co przekłada się na obniżenie poziomu białek lub produkcji różnych izoform białek zaangażowanych w proces inwazji i migracji, takich jak c-Jun i surwiwina.



Rysunek 27. Wizualizacja komórek migrujących (**A**) oraz inwazyjnych (**B**), które zostały wybarwione na zewnętrznej warstwie membrany. Zdjęcia wykonano pod 5x powiększeniem mikroskopu.

5. Optymalizacja sekwencji oligonukleotydu antysensowego zmieniającego splicing (SSO)

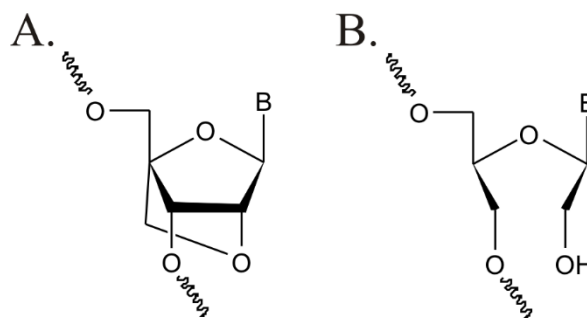
Oligonukleotyd antysensowy zmieniający splicing (SSO), którego sekwencja została zaprojektowana przez grupę profesora Adriana Krainera, hybrydyzuje do komplementarnego fragmentu w eksonie 10 genu *PKM* [62]. Oligonukleotyd wycisza splicing eksonu 10 i powoduje wzrost ekspresji izoformy PKM1 oraz obniżenie poziomu PKM2. W wyniku transfekcji tego oligonukleotydu do linii komórkowej A172 uzyskano wzrost poziomu izoformy PKM1 o około 50 punktów procentowych. Autorzy zauważyli jednak, że w intronie 9 genu *PKM* znajduje się sekwencja o wysokim stopniu identyczności z sekwencją w eksonie 10 (Rys. 28). W związku z tym założono, że SSO może hybrydyzować jednocześnie w dwóch miejscach. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów z użyciem minigenu udowodniono, że wyciszenie splicingu eksonu 10 za pomocą oligonukleotydu antysensowego następuje przede wszystkim w wyniku interakcji SSO z eksonem 10. Zasugerowano jednak, że częściowo efekt ten może być wspomagany poprzez jednoczesną hybrydyzację ASO do fragmentu w intronie 9. Pełna komplementarność par zasad w dupleksie SSO z fragmentem eksonu powoduje jego większą stabilność termodynamiczną niż dupleksu z udziałem intronu, który zawiera cztery niesparowania. Mimo tego, SSO może hybrydyzować z dwiema sekwencjami, jednak większe prawdopodobieństwo interakcji powinno występować dla eksonu 10. Postawiono zatem pytanie badawcze, czy blokowanie zarówno sekwencji w eksonie 10 jak i sekwencji w intronie 9 jest faktycznie korzystne dla właściwości regulatorowych oligonukleotydu. Jeśli tak, zwiększenie oddziaływania SSO z intronem 9 poprzez modyfikację sekwencji oligonukleotydu, może zwiększyć jego efekt regulatorowy. Z drugiej strony, istnieje możliwość, że intron 9 nie wpływa w istotny sposób na regulację alternatywnego splicingu genu *PKM*, wskazując tym samym konieczność podjęcia starań, by zmaksymalizować hybrydyzację oligonukleotydu z eksonem 10.



Rysunek 28. Dupleksy utworzone pomiędzy SSO a fragmentem intronu 9 (**A**) oraz eksonu 10 (**B**). Podkreślone litery przedstawiają sekwencję SSO. Czerwone litery to pozycje niesparowanych reszt nukleotydowych.

Preferencję oligonukleotydu do hybrydyzacji z fragmentem, w którym występuje większy stopień komplementarności, a zatem tworzy się dupleks z bardziej korzystną energią swobodną, nazywamy dyskryminacją niesparowań. W pełni komplementarny dupleks charakteryzuje się wyższą temperaturą topnienia (T_M) oraz niższą energią swobodną (ΔG°_{37}). Wprowadzanie modyfikowanych nukleotydów w pozycję niesparowań jest jednym ze sposobów wpływania na zmianę dyskryminacji niesparowań [107–109].

W tej części eksperymentów postanowiono zmodyfikować chemicznie oligonukleotyd antysensowy zmieniający splicing genu *PKM*, poprzez wprowadzenie modyfikowanych nukleotydów, które w istotny sposób mogą zmieniać parametry termodynamiczne tworzonych dupleksów. W tym celu wykorzystano modyfikowane kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (ang. *locked nucleic acids*, LNAs), w których występuje dodatkowy mostek metylenowy pomiędzy atomem węgla C4' a atomem tlenu O2' reszty rybozy (Rys. 29 A). Z punktu widzenia projektowania oligonukleotydów terapeutycznych, jedną z bardzo ważnych właściwości reszt LNA jest zdolność do ponadprzeciętnego zwiększania stabilności termodynamicznej dupleksów oraz zwiększania dyskryminacji niesparowań [110,111]. Druga modyfikacja, która została zastosowana w tych badaniach, ma odwrotny wpływ na termodynamikę dupleksów. Acykliczne, elastyczne analogi rybonukleotydów (ang. *unlocked nucleic acids*, UNAs) nie zawierają wiązania pomiędzy atomami węgla C2' oraz C3' reszty rybozy (Rys. 29 B). Modyfikacja UNA zmniejsza stabilność termodynamiczną dupleksów DNA i RNA oraz wpływa na zmniejszenie dyskryminacji niesparowań [110].



Rysunek 29. Struktury modyfikowanych reszt nukleotydowych LNA (A) oraz UNA (B).

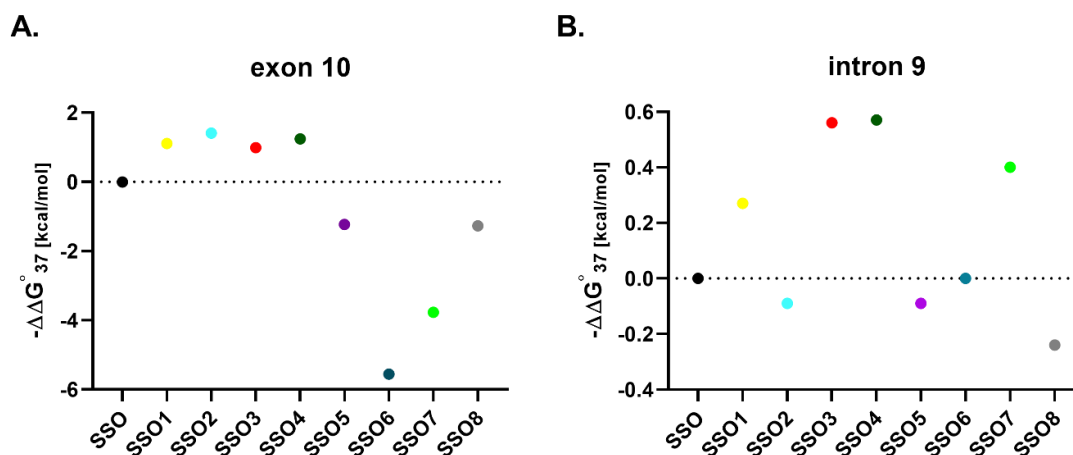
5.1 Wpływ reszt LNA i UNA na stabilność termodynamiczną tworzonych dupleksów

W celu określenia wpływu reszt LNA oraz UNA na stabilność termodynamiczną tworzonych dupleksów oraz na dyskryminację niesparowań zsyntetyzowano serię modelowych oligonukleotydów o skróconej sekwencji w stosunku do wyjściowego SSO (Tab. 5). Przyczyną użycia krótszych oligonukleotydów była wysoka stabilność tworzonych 15-nukleotydowych dupleksów, która uniemożliwiała ocenę wpływu modyfikacji stabilizujących na parametry termodynamiczne dupleksu. Krótsze oligonukleotydy charakteryzują się niższą temperaturą topnienia, dzięki czemu przy zastosowaniu metody topnienia w świetle UV w zakresie temperatur 4°C-90°C, możliwa jest detekcja pojawiających się zmian. Zsyntetyzowane, krótsze oligonukleotydy SSO zawierały wszystkie pozycje, w których dochodzi do niesparowań z sekwencją intronu 9 oraz reszty nukleotydowe bezpośrednio sąsiadujące z tymi pozycjami. W pozycji 2' reszty rybozy każdej reszty nukleotydowej innej niż LNA oraz UNA zastosowano grupę 2'-O-metoksyetylową. W wiązaniach internukleotydowych natomiast jeden z niewiążących atomów tlenu został zastąpiony atomem siarki prowadząc do powstania wiązań tiofosforanowych.

Tabela 5. Sekwencje oligonukleotydów 2'-O-metoksyetylo-RNA (2'MOE-RNA) modyfikowanych resztami LNA (C^L , A^L) oraz UNA (C^U , A^U) użytych w badaniach termodynamicznych.

Nazwa	Sekwencja
SSO	CGGAGUCA
SSO1	C^L GGAGUCA
SSO2	CGG A^L GUCA
SSO3	CGGAGUC C^L A
SSO4	CGGAGUCA A^L
SSO5	C^U GGAGUCA
SSO6	CGG A^U GUCA
SSO7	CGGAGUC C^U A
SSO8	CGGAGUCA A^U

Przeprowadzone badania umożliwiły ocenę wpływu modyfikowanych reszt nukleotydowych na stabilność termodynamiczną dupleksów SSO ze skróconymi fragmentami eksonu 10 (sE10) oraz intronu 9 (sI9). Analiza porównawcza wartości entalpii oraz entropii wyznaczonych dwoma metodami wskazuje, że wszystkie dupлексы rozplatają się zgodnie z modelem dwustanowym. Na rysunku 30 przedstawiono różnice energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) pomiędzy niemodyfikowanym dupлекsem SSO-sE10 lub SSO-sI9, a modyfikowanymi dupлексами tego samego typu, natomiast w tabelach 6 oraz 7 podano pełne dane termodynamiczne. Wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ poniżej wartości 0 oznaczają stabilizację dupлекsu, a wartości powyżej wartości 0 świadczą o destabilizacji dupлекsu.



Rysunek 30. Wykresy zmian energii swobodnej dupleksów $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] po wprowadzeniu reszt LNA lub UNA. **A.** Wyniki dla dupлекsu SSO z fragmentem eksonu 10. **B.** Wyniki dla dupлекsu SSO z fragmentem intronu 9.

Pojedyncza reszta LNA zwiększa stabilność termodynamiczną dupleksów SSO ze skróconym fragmentem eksonu, jak i intronu (Rys. 30 A, Tab. 6). Jednak efekt ten jest większy dla dupleksu utworzonego z sE10, w którym występuje pełna komplementarność par zasad. Maksymalna zmiana energii swobodnej (ΔG°_{37}) w przypadku dupleksu z sE10 wystąpiła dla SSO2. Obecność reszty LNA-A w pozycji środkowej spowodowała wzrost trwałości termodynamicznej o 1,41 kcal/mol (Tab. 6). Zaobserwowany efekt jest zgodny z wcześniejszymi danymi opublikowanymi dla dupleksów 2'-O-Me-RNA/RNA, w których obecność reszty LNA-A w pozycji centralnej powodowała spadek wartości energii swobodnej dupleksów ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) w zakresie 0,96-1,42 kcal/mol w zależności od sąsiadujących reszt nukleotydowych [108]. Najmniejszą, jednak nadal istotną, stabilizację ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0.99$ kcal/mol) w przypadku w pełni komplementarnego dupleksu zaobserwowano z kolei dla dupleksu SSO3-sE10, zawierającego resztę LNA-C w pozycji bliskiej 3' końca SSO (Tab. 6). Efekt ten jest nieco niższy od wcześniej opublikowanego dla reszty LNA-C w podobnej pozycji ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1,42$ kcal/mol) [108]. Różnice mogą wynikać jednak z odmiennego sąsiedztwa modyfikowanej reszty nukleotydowej w obydwu typach dupleksów, a co za tym idzie w odmiennym oddziaływaniu pomiędzy sobą cząstkowych ładunków grup funkcyjnych reszt zasad heterocyklicznych. Reszta LNA-C znajdująca się na 5' końcu oligonukleotydu zwiększyła stabilność termodynamiczną dupleksu SSO1-sE10 o 1,11 kcal/mol (Tab. 6). Większa stabilizacja została zaobserwowana dla dupleksu SSO4-sE10 zawierającego resztę LNA-A znajdującą się na 3' końcu modyfikowanego oligonukleotydu ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1,24$ kcal/mol) (Tab. 6). Zatem, w przypadku wprowadzania reszt LNA w terminalne fragmenty dupleksu, nieco większy efekt stabilizacyjny otrzymuje się modyfikując 3' koniec SSO. Wniosek ten znajduje potwierdzenie w literaturze, chociaż efekt stabilizacyjny reszty LNA-C na 5' końcu SSO1 okazał się o wiele wyższy niż efekty opisywane wcześniej dla reszt LNA ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,33 \div -0,59$ kcal/mol) w tej terminalnej pozycji [108]. W badaniach opublikowanych przez grupę profesora Kierzka, wykazano, że reszta cytydyny w serii LNA obecna na końcu 5' nici 2'-O-Me-RNA zwiększa stabilność termodynamiczną dupleksu 2'-O-Me-RNA/RNA o 0,40 kcal/mol, a reszta adenozyiny w serii LNA na końcu 3' zwiększa stabilność termodynamiczną dupleksu o 1,30 kcal/mol (Tab. 6). Należy zaznaczyć, że ostatnia zależność została zachowana dla wszystkich możliwych 3' końcowych reszt LNA, z wyjątkiem urydyny. Ponadto, w przytoczonych badaniach, ustalono również, że największy efekt stabilizacyjny dupleksu 2'-O-Me-RNA/RNA otrzymuje się poprzez

wprowadzenie reszty LNA w centralnej pozycji oligonukleotydu. Ponownie, efekt ten występuje dla każdej reszty nukleotydowej z serii LNA, z wyjątkiem urydyny [108].

Reszta LNA w znacznie mniejszym stopniu przyczynia się do stabilizacji dupletu SSO ze skróconym fragmentem intronu 9 (sI9), co było spodziewane ze względu na udział modyfikowanych reszt LNA w niesparowaniach (Rys. 30 B, Tab.6). Największa zmiana ΔG°_{37} została zaobserwowana dla dupletu SSO3-sI9 oraz SSO4-sI9 i wynosiła odpowiednio $-0,56$ kcal/mol ($\underline{\mathbf{C}}^{\mathbf{L}}/\mathbf{U}$) i $-0,57$ ($\underline{\mathbf{A}}^{\mathbf{L}}/\mathbf{G}$) kcal/mol (Tab. 6) w porównaniu do niemodyfikowanego, izosekwencyjnego dupletu SSO-sI9. W tych oligonukleotydach, reszta LNA znajduje się w przedostatniej oraz ostatniej pozycji od strony 3'. Co ciekawe, SSO2, który tworzy najbardziej stabilny duplet ze skróconym fragmentem eksonu 10, z sI9 tworzy duplet o podobnej energii swobodnej, jak w przypadku niemodyfikowanego dupletu SSO-sI9. Efekt ten wynika najprawdopodobniej ze zmniejszenia stopni swobody, spowodowanego obecnością reszty LNA, które utrudnia przyjęcie przez niesparowanie $\underline{\mathbf{A}}^{\mathbf{L}}/\mathbf{A}$ bardziej korzystnej energetycznie konformacji.

Wpływ reszt UNA na stabilność termodynamiczną badanych dupletów jest odwrotny niż reszt LNA (Tab. 7, Rys. 30 A i B). Modyfikacja UNA znacząco zmniejsza stabilność termodynamiczną dupletu ze skróconym fragmentem eksonu 10 (Tab. 7). W przypadku UNA można zaobserwować wyraźną różnicę pomiędzy efektem termodynamicznym modyfikacji w centralnej pozycji oligonukleotydu, a modyfikacji terminalnych. Podobnie jak w przypadku LNA, najbardziej znaczący efekt termodynamiczny uzyskano dla reszty adenozy w serii UNA umieszczonej w centralnej pozycji oligonukleotydu (SSO6). We wspomnianej pozycji reszta UNA-A zmniejszyła stabilność termodynamiczną dupletu SSO6-sE10 aż o 5,56 kcal/mol. W przypadku SSO7, w którym UNA występuje w przedostatniej reszcie nukleotydowej od strony 3', stabilność termodynamiczna dupletu SSO7-sE10 zmniejszyła się o 3,77 kcal/mol (Tab. 7). Natomiast, mniejszą destabilizację zaobserwowano dla modyfikacji UNA obecnych w końcowych pozycjach oligonukleotydu. Efekt ten jest bardzo podobny dla reszt UNA na dwóch końcach oligonukleotydu i wynosi 1,23 kcal/mol na 5' końcu SSO oraz 1,27 kcal/mol na 3' końcu SSO (Tab. 7). Wyniki te są zgodne z opublikowanymi wcześniej danymi, które wykazały, że największy efekt destabilizacyjny dla dupletu RNA/RNA uzyskuje się poprzez wprowadzenie reszt UNA w centralnej pozycji jednej z nici [107]. Ponadto, wielkość destabilizacji w duplesie

SSO6-sE10 zawierającym centralnie położoną resztę UNA-A jest porównywalny do efektów obserwowanych wcześniej dla dupleksów RNA/RNA modyfikowanych w pozycji środkowej tą samą resztą nukleotydową ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 4,52 \div 5,36$ kcal/mol).

Modyfikacja UNA ma o wiele mniejszy wpływ na zmiany stabilności termodynamicznej duplesu SSO z sI9 niż duplesu z sE10 (Rys. 30 B). W przypadku oligonukleotydu SSO7 zaobserwowano nawet stabilizację termodynamiczną duplesu SSO7-sI9 w wyniku obecności niesparowania typu C^U/U ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,4$ kcal/mol) (Tab. 7). Efekt ten jest zaskakujący, gdyż jest to jedyna pozycja, w której UNA powoduje stabilizację duplesu. Jednakże, niesparowanie C^U/U sąsiaduje z kolejną resztą nukleotydową, która również nie tworzy kanonicznej pary. W związku z tym, obecność modyfikacji zwiększającej elastyczność niesparowania C/U przy jednoczesnym rozluźnieniu struktury duplesu w pozycji końcowej ze względu na sąsiedztwo niekanonicznej pary A/G może ułatwić rearanżację struktury w kierunku oddziaływań korzystniejszych energetycznie. W przytoczonych już wcześniej badaniach, stabilizacja termodynamiczna duplesu została zaobserwowana jedynie dla niesparowania U^U/G, dla którego spadek energii swobodnej wynosił 0,45 kcal/mol [107]. Jednak to niesparowanie znajdowało się na 5' końcu oligonukleotydu, w związku z tym trudno znaleźć bezpośrednią zależność, która wpływa na ewentualną stabilizację duplesu wywołaną przez obecność modyfikacji UNA. Kolejną istotną różnicą efektów termodynamicznych związanych z obecnością UNA w duplesach typu SSO-sI9 w porównaniu do SSO-sE10 jest brak zmiany w energii swobodnej duplesu SSO-sI9 po wprowadzeniu reszty UNA w centralnej pozycji (SSO6-sI9, niesparowanie A^U/A). Świadczyć to może o tym, że pomiędzy dwoma resztami adozyn w tej pozycji nie dochodzi do żadnych oddziaływań, które mają wpływ na stabilność duplesu lub też, co bardziej prawdopodobne, że lokalne zwiększenie elastyczności niesparowania A/A nie wpływa negatywnie na oddziaływania pomiędzy tymi oraz sąsiednimi resztami nukleotydowymi. Efekt ten może być zależny od sąsiadujących z UNA-A reszt guanozyn, które tworzą stabilne pary z resztami cytydyn. W badaniach opublikowanych wcześniej wykazano, że wprowadzenie modyfikacji UNA-A do centralnego niesparowania typu A/A, powoduje destabilizację duplesu o 0,92 kcal/mol [107]. Jednak w zaprezentowanym układzie niesparowanie to sąsiaduje z jedną parą G-C oraz z jedną parą U-A, tak więc najbliższe sąsiedztwo różni się od analizowanego w niniejszej rozprawie przypadku.

Tabela 6. Parametry termodynamiczne tworzenia dupleksów typu SSO/RNA modyfikowanych resztami LNA^a.

Sekwencja SSO (5'-3')	Sekwencja komplementarnego fragmentu RNA (5'-3')	Średnia dopasowania krzywych topnienia				T_M^{-1} vs $\log C_T$					
		$-\Delta H^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-\Delta G^\circ_{37}$	T_M^b	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-\Delta G^\circ_{37}$	T_M^b	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$	ΔT_M^b
		(kcal/mol)	(eu)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/mol)	(eu)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/mol)	(°C)
CGGAGUCA (SSO)	UGACUCCG	73,5±1,8	197,13±5,5	12,36±0,11	63,7	68,5±1,2	182,3±3,5	12,01±0,08	64,0	0	0
<u>C</u> ^L GGAGUCA (SSO1)	UGACUCCG	78,9±2,1	210,7±6,1	13,57±0,20	67,4	73,5±1,5	194,5±4,3	13,12±0,12	67,6	-1,11	3,6
CGG <u>A</u> ^L GUCA (SSO2)	UGACUCCG	70,0± 4,4	183,5±13,2	13,07±0,30	69,0	74,0±8,6	195,4±25,1	13,42±0,81	68,8	-1,41	4,8
CGGAGU <u>C</u> ^L A (SSO3)	UGACUCCG	76,9±1,0	204,5±2,8	13,53±0,14	68,0	69,7±4,2	182,7±12,7	13,00±0,32	68,7	-0,99	4,7
CGGAGU <u>A</u> ^L (SSO4)	UGACUCCG	76,2± 2,5	202,9 ± 7,6	13,30±0,18	67,2	75,7±5,1	201,3±15,1	13,25±0,38	67,2	-1,24	3,2
CGGAGUCA (SSO)	GUACACCA	47,4±3,1	134,9±10,1	5,53±0,10	30,6	49,8±4,7	143,1±16,5	5,46±0,22	30,5	0	0
<u>C</u> ^L GGAGUCA (SSO1)	GUACACCA	43,0±5,1	120,3±16,6	5,69±0,10	31,0	40,7±4,1	112,8±13,6	5,73±0,20	31,0	-0,27	0,5
CGG <u>A</u> ^L GUCA (SSO2)	GUACACCA	44,6±4,3	125,9±14,0	5,53±0,13	30,2	48,9±3,4	140,3±11,4	5,37±0,16	29,8	0,09	-0,7
CGGAGU <u>C</u> ^L A (SSO3)	GUACACCA	45,5±3,3	127,7±10,9	5,93±0,14	32,9	43,2±2,0	119,9±6,8	6,02±0,08	33,4	-0,56	2,9
CGGAGU <u>A</u> ^L (SSO4)	GUACACCA	43,6±6,2	121,5±20,5	5,87±0,24	32,4	38,1±4,3	103,4±14,4	6,03±0,27	33,0	-0,57	2,5

a – bufor: 50 mM NaCl, 20 mM sodium cacodylate, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7,0, b - calculated for 10⁻⁴ M oligomer concentration; sE10: 5'UGACUCCG, sI9: 5'GUACACCA

Tabela 7. Parametry termodynamiczne tworzenia dupleksów typu SSO/RNA modyfikowanych resztami UNA^a.

Sekwencja SSO (5'-3')	Sekwencja komplementarnego fragmentu RNA (5'-3')	Średnia dopasowania krzywych topnienia				T_M^{-1} vs $\log C_T$					
		$-\Delta H^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-\Delta G^\circ_{37}$	T_M^b	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-\Delta G^\circ_{37}$	T_M^b	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$	ΔT_M^b
		(kcal/mol)	(eu)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/mol)	(eu)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/mol)	(°C)
CGGAGUCA (SSO)	UGACUCCG	73,5±1,8	197,1±5,5	12,36±0,11	63,7	68,5±1,2	182,3±3,5	12,01±0,08	64,0	0,00	0,00
<u>C</u> GGAGUCA (SSO5)	UGACUCCG	70,3±3,0	190,0±8,8	11,3±0,29	59,7	61,6±2,4	163,8±7,3	10,78±0,15	60,0	1,23	-4,00
CGG <u>A</u> GUCA (SSO6)	UGACUCCG	57,6±2,0	165,0±6,6	6,40±0,10	36,3	55,0±2,0	156,5±6,5	6,45±0,04	36,5	5,56	-27,50
CGGAGU <u>C</u> A (SSO7)	UGACUCCG	68,1±7,4	192,6±23,2	8,38±0,25	45,7	59,9±6,9	166,4±22,0	8,24±0,22	46,1	3,77	-17,90
CGGAGUCA <u>A</u> (SSO8)	UGACUCCG	71,8±4,9	195,4±14,7	11,16±0,31	58,4	63,8±2,3	171,2±7,1	10,74±0,12	58,9	1,27	-5,10
CGGAGUCA (SSO)	GUACACCA	47,4±3,1	134,9±10,1	5,53±0,10	30,6	49,8±4,7	143,1±16,5	5,46±0,22	30,5	0,00	0,00
<u>C</u> GGAGUCA (SSO5)	GUACACCA	43,8±2,5	123,6±8,4	5,42±0,07	29,3	45,3±1,5	128,7±5,2	5,37±0,07	29,2	0,09	-1,30
CGG <u>A</u> GUCA (SSO6)	GUACACCA	46,5±10,6	132,5±36,0	5,36±0,67	29,4	45,0±5,8	127,5±19,5	5,46±0,35	29,8	0	-0,70
CGGAGU <u>C</u> A (SSO7)	GUACACCA	40,9±3,4	113,0±11,1	5,85±0,12	32,0	41,4±3,2	114,4±10,7	5,86±0,16	32,0	-0,4	1,50
CGGAGUCA <u>A</u> (SSO8)	GUACACCA	47,2±11,1	134,8±37,2	5,35±0,50	29,4	50,9±6,4	147,3±21,37	5,22±0,35	29,2	0,24	-1,30

a – bufor: 50 mM NaCl, 20 mM sodium cacodylate, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7,0, b - calculated for 10⁻⁴ M oligomer concentration; sE10: 5'UGACUCCG, sI9: 5'GUACACCA

5.2 Wpływ reszt LNA oraz UNA na dyskryminację niesparowań

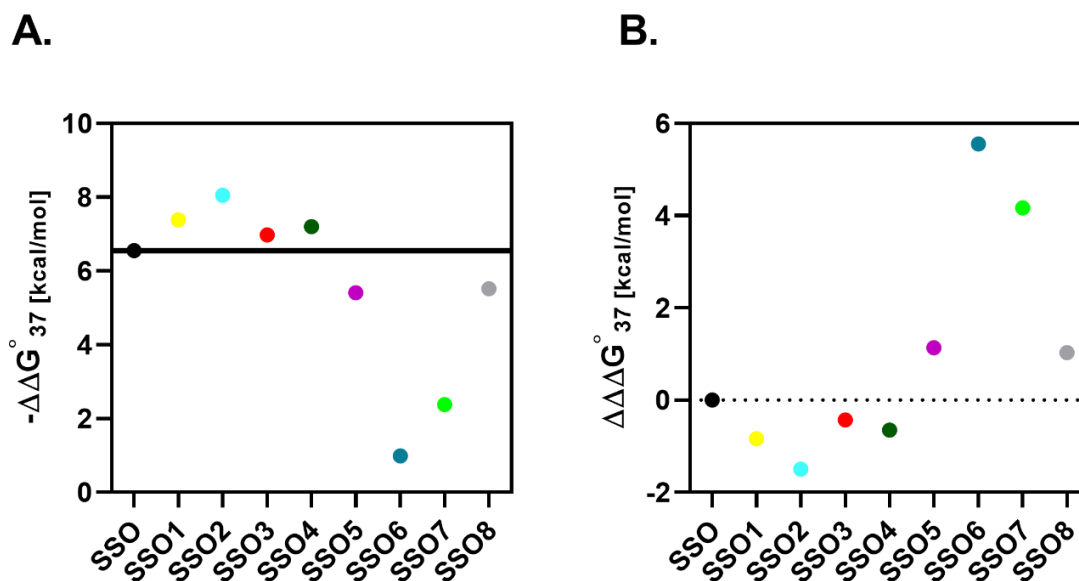
Dzięki przeprowadzonym badaniom termodynamicznym, udało się znaleźć pozycje wprowadzenia modyfikowanych nukleotydów, które w znaczący sposób przyczyniają się do zmian parametrów termodynamicznych dupleksów utworzonych przez hybrydyzację SSOs do podobnych sekwencji pre-mRNA genu *PKM* (ekson 10 i intron 9). Kolejnym krokiem była analiza, w jaki sposób reszty LNA oraz UNA wpływają na dyskryminację niesparowań. W tym celu należało uwzględnić wartość energii swobodnej ΔG°_{37} otrzymaną dla wszystkich dupleksów utworzonych przez modyfikowane SSO ze skróconymi fragmentami intronu oraz eksonu (Tab. 8).

Tabela 8. Wartości energii swobodnej, ΔG°_{37} [kcal/mol] dla modyfikowanych SSOs w duplesie z eksonem 10 lub z intronem 9. W ostatniej kolumnie przedstawiono wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] otrzymane po odjęciu ΔG°_{37} [kcal/mol] duplesu z intronem od ΔG°_{37} [kcal/mol] duplesu z eksonem.

Nazwa	Sekwencja	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] sE10	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] sI9	$\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol]	$\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol]
SSO	CGGAGUCA	12,01	5,46	-6,55	0
SSO1	<u>C</u> ^L GGAGUCA	13,12	5,73	-7,39	-0,84
SSO2	CGGA ^L GUCA	13,42	5,37	-8,05	-1,50
SSO3	CGGAGUC ^L A	13,00	6,02	-6,98	-0,43
SSO4	CGGAGUCA ^L	13,23	6,03	-7,20	-0,65
SSO5	<u>C</u> ^U GGAGUCA	10,78	5,37	-5,41	1,14
SSO6	CGGA ^U GUCA	6,45	5,46	-0,99	5,56
SSO7	CGGAGUC ^U A	8,24	5,86	-2,38	4,17
SSO8	CGGAGUCA ^U	10,74	5,22	-5,52	1,03

Poprzez odjęcie wartości energii swobodnej duplesu z intronem od wartości energii swobodnej duplesu z eksonem możemy uzyskać wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$, która pokazuje z jaką preferencją oligonukleotyd hybryduje do fragmentu eksonu 10 w stosunku do fragmentu intronu 9. Różnica w energii swobodnej obu niemodyfikowanych

dupleksów ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) wynosi $-6,55$ kcal/mol (Rys 31, Tab. 8). Zmniejszenie wartości ujemnych $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ (wartość $\Delta\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ większa od 0) poprzez wprowadzenie modyfikowanych nukleotydów oznacza zmniejszenie dyskryminacji niesparowań. Natomiast, zwiększenie ujemnych wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ (wartość $\Delta\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ większa od 0) świadczy o zwiększeniu dyskryminacji niesparowań, a co za tym idzie zwiększoną preferencją do oddziaływania z eksonem 10.



Rysunek 31. Wpływ modyfikowanych reszt nukleotydowych LNA oraz UNA na dyskryminację niesparowań wyrażony wartością: **A.** $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol], uzyskaną poprzez odjęcie wartości ΔG°_{37} dupleksu z intronem od wartości ΔG°_{37} dupleksu z eksonem oraz **B.** $\Delta\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol], uzyskaną poprzez odjęcie wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] niemodyfikowanego oligonukleotydu od wartości $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ [kcal/mol] modyfikowanego oligonukleotydu.

Wykonane eksperymenty wykazały, że reszta LNA obecna w każdej z możliwych pozycji przyczynia się do zwiększenia dyskryminacji niesparowań. Jak opisano wyżej, LNA zwiększa stabilność termodynamiczną w pełni komplementarnego dupleksu SSO- sE10 w większym stopniu niż dupleksu SSO- sI9 zawierającego niesparowania. Skutkiem tego, różnica pomiędzy wartością energii swobodnej dupleksu z udziałem eksonu, a dupleksu z udziałem intronu wzrasta. Tym samym, preferencja oligonukleotydu do hybrydyzacji z sE10 w stosunku do sI9 zostaje zwiększona. W przypadku LNA najbardziej wyraźny efekt można zaobserwować dla dupleksów zawierających modyfikowaną resztę adenozyiny w centralnej pozycji oligonukleotydu, dla których wartość $\Delta\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosi $-1,5$ kcal/mol ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -8,05$ kcal/mol) w stosunku do różnicy

między niemodyfikowanymi dupleksami, co przekłada się na ponad 11-krotne zwiększenie różnicy pomiędzy wartościami stałych równowagi procesu hybrydyzacji SSO-ekson vs. SSO-intron (Tab. 8). Kolejno, dużą zmianę efektu termodynamicznego otrzymano dla dupleksów z resztą LNA-cytydyny w oligonukleotydzie SSO1 ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,84$ kcal/mol; $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -7,39$ kcal/mol) (Tab. 8). Słabszy efekt termodynamiczny zaobserwowano natomiast dla modyfikowanych, 3'-terminalnych reszt nukleotydowych (Tab. 8).

Reszta UNA wykazuje odwrotny efekt do LNA. W wyniku wprowadzenia modyfikacji UNA w każdej z możliwych pozycji, różnica pomiędzy ΔG°_{37} obu typów dupleksów zmniejsza się (Tab. 8). Oznacza to, że pomimo pełnej komplementarności SSO z eksonem 10, wprowadzenie w pozycje niesparowań reszty UNA zwiększa prawdopodobieństwo oddziaływania oligonukleotydu z dwiema sekwencjami. Ponownie, największy efekt został zaobserwowany dla reszty UNA-A w centralnej pozycji oligonukleotydu. W tej pozycji różnica energii swobodnej pomiędzy dupleksami, $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosi 0,99 kcal/mol, co oznacza, że dyskryminacja niesparowań została silnie zredukowana, prowadząc równocześnie do ponad 8000-krotnego spadku różnicy pomiędzy wartościami stałych równowagi procesu hybrydyzacji SSO-ekson vs. SSO- intron (Tab. 8). Zgodnie z danymi literaturowymi, niesparowanie \underline{A}^U/A przyczynia się do największego spadku dyskryminacji niesparowań spośród wszystkich niesparowań adenozyne [107]. Znacząca redukcja różnicy energii swobodnej została zaobserwowana również dla oligonukleotydu SSO7, dla którego wartość $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ wynosi jedynie -2,38 kcal/mol (Tab. 8). Najśłabszy efekt zmniejszenia dyskryminacji niesparowań uzyskano dla reszt UNA obecnych w terminalnych resztach nukleotydowych. Modyfikowana reszta cytydyny na końcu 5' dupleksów obniżyła wartość różnicy energii swobodnej $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ do -5,41 kcal/mol ($\Delta\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -1,14$ kcal/mol), a modyfikowana reszta adenozyne na końcu 3' zmniejsza dyskryminację niesparowań o -1,03 kcal/mol ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -5,52$ kcal/mol) (Tab. 8).

6. Wpływ modyfikowanych SSOs na regulację alternatywnego splicingu genu *PKM*

Wyniki przedstawionych wyżej eksperymentów termodynamicznych udowodniły, że wprowadzenie reszt UNA oraz LNA w pozycje niesparowań ma znaczący wpływ na parametry termodynamiczne tworzonych dupleksów. Sugerując się

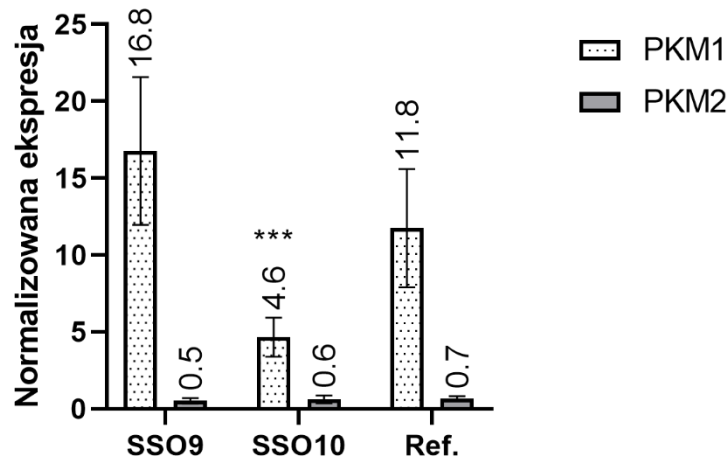
otrzymanymi danymi, można oczekiwać, że wprowadzenie LNA do SSO, spowoduje większą preferencję oligonukleotydu do oddziaływania z eksonem 10. Natomiast, efektem zastosowania UNA, jest wyrównanie energii swobodnej tworzonych dupleksów, w wyniku czego oligonukleotydy powinny hybrydyzować z podobnym prawdopodobieństwem z dwoma sekwencjami. W kolejnym etapie badań zsyntetyzowano zatem pełnej długości SSOs z resztami nukleotydowymi LNA lub UNA w pozycjach niesparowań (Tab. 9). Dokonano transfekcji oligonukleotydów o stężeniu 125 nM nowotworowej linii komórkowej HeLa. Eksperyment zakończono po 48 godzinach i zastosowano metodę qPCR w celu określenia ilości powstających izoform PKM1 oraz PKM2.

Tabela 9. Lista oligonukleotydów SSO 2'-O-metoksyetylo-RNA (2'MOE-RNA) zawierających internukleotydowe wiązanie tiofosforanowe, zaprojektowanych do eksperymentów komórkowych.

Nazwa	Sekwencja
SSO9	CGGCGGA ^L GUUCCUCA
SSO10	CGGCGGA ^U GUUCCUCA
SSO11	^C GGCGGA ^L GUUCCUCA ^L
SSO12	CGGCGGA ^U GUUCCUC ^U A
Referencja (Ref.)	CGGCGGAGUUCCUCA

W pierwszej kolejności zsyntetyzowano i transfekowano oligonukleotydy z modyfikacją reszty adenozyliny wyłącznie w pozycji centralnej (SSO9 (LNA), SSO10 (UNA)), gdyż to w tej pozycji zaobserwowano największy wpływ obu modyfikacji na zmianę wielkości dyskryminacji niesparowań.

Wprowadzenie tylko jednej reszty LNA-A znajdującej się w centralnej pozycji wpływa na regulację alternatywnego splicingu genu *PKM*. Zaobserwowano zmianę poziomu ekspresji izoformy PKM1, jak i PKM2 (Rys. 32). Sugeruje to, że różnica w energii swobodnej obu dupleksów zmieniła się na tyle istotnie, by wpłynąć na preferencję oddziaływań oligonukleotydu, co przekłada się na efektywność regulacji. Równie istotną zmianę w regulacji splicingu zaobserwowano dla UNA. Zastosowanie jednego modyfikowanego nukleotydu zmniejszyło ilość izoformy PKM1 dwukrotnie, przy zachowaniu podobnego poziomu PKM2 (Rys. 32).

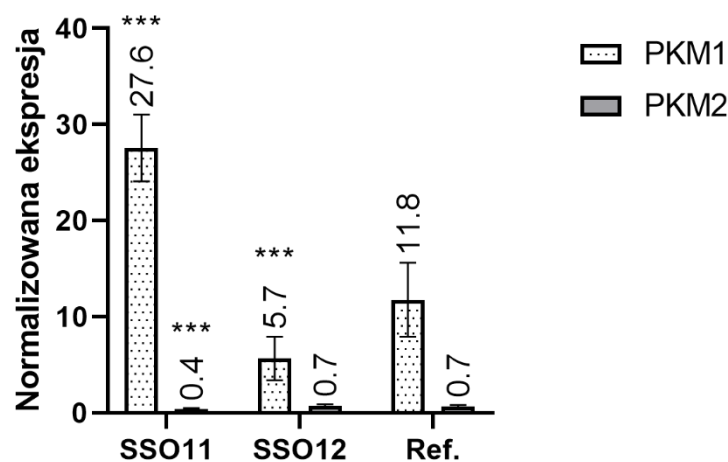


Rysunek 32. Poziom ekspresji izoform PKM1 oraz PKM2 otrzymany w wyniku transfekcji oligonukleotydów z modyfikowaną resztą adenozy w pozycji środkowej. Istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do oligonukleotydu referencyjnego (Ref.). * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

W kolejnym etapie badań, zsyntetyzowano oligonukleotydy z większą ilością modyfikowanych reszt nukleotydowych. Wybrano takie pozycje wprowadzenia modyfikacji, w których otrzymano największy efekt termodynamiczny (Tab. 9). W oligonukleotydzie SSO11 wprowadzono reszty LNA w pozycje 1, 7 oraz 15. Reszta UNA znajdowała się natomiast w dwóch pozycjach, 7 oraz 14. Jak zaprezentowano w wyżej opisanych badaniach, obecność UNA w większym stopniu zmienia energię swobodną dupletu, w związku z tym wykorzystano mniejszą ilość modyfikowanych nukleotydów, by oddziaływanie oligonukleotydu z RNA wciąż było możliwe.

Zastosowanie większej ilości modyfikowanych nukleotydów przyczyniło się do istotnej zmiany w regulacji alternatywnego splicingu przez SSOs (Rys. 33). Reszty LNA obecne w trzech pozycjach ponad dwukrotnie zwiększyły poziom izoformy PKM1 (Rys. 33). Z drugiej strony, nie zaobserwowano różnicy pomiędzy efektywnością jednej reszty UNA, a dwoma. Jak wykazały badania zastosowanie jednej reszty LNA, zwiększa stabilność termodynamiczną dupletu z eksonem o ponad 1 kcal/mol. Natomiast, w przypadku oddziaływania z intronem, maksymalny efekt termodynamiczny był o około połowę mniejszy. Zatem, użycie LNA w trzech pozycjach, wpływa na preferencję oligonukleotydu do hybrydyzacji z eksonem 10, a nie intronem 9. Otrzymane wyniki udowadniają zatem, że to fragment eksonu 10, jest głównym wzmacniaczem splicingu tego eksonu, a zatem interakcja oligonukleotydu właśnie z tą sekwencją

umożliwia regulację alternatywnego splicingu. Ten wniosek jest zgodny z interpretacją grupy badawczej prof. Adriana Krainera, która zasugerowała, że główną sekwencją, której oddziaływanie z SSO zmienia wzorzec składania genu, jest sekwencja w eksonie 10 [62]. Jednocześnie, autorzy proponują, że częściowo efekt regulacyjny jest spowodowany hybrydyzacją SSO w intronie 9. Przeprowadzone przez mnie badania pokazują jednak, że im bardziej zwiększano preferencję oligonukleotydu do oddziaływania z eksonem 10, tym większy efekt regulacji jest obserwowany. Wskazuje to raczej na to, że hybrydyzacja z intronem 9 nie jest wymagana do regulacji splicingu przez SSOs.



Rysunek 33. Poziom ekspresji izoform PKM1 oraz PKM2 otrzymany w wyniku transfekcji oligonukleotydów ze zwiększoną ilością modyfikowanych reszt nukleotydowych. Istotność statystyczna została wyliczona w odniesieniu do oligonukleotydu referencyjnego (Ref.). * odnosi się do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,05$; a *** do poziomu istotności statystycznej o wartości $p < 0,01$.

Poprzez wprowadzenie UNA do SSO i destabilizację przede wszystkim dupletu z fragmentem eksonu 10, zwiększono prawdopodobieństwo oddziaływania oligonukleotydu w podobny sposób z fragmentami intronu 9 i z eksonu 10. Wynika to z faktu, że reszta UNA w znikomy sposób obniża stabilność termodynamiczną dupletu z fragmentem intronu, natomiast istotnie obniża stabilność termodynamiczną dupletu z fragmentem eksonu. W takiej sytuacji, zakładamy, że oba potencjalne miejsca regulatorowe mogą być zakryte poprzez oddziaływanie z SSO. Jednak na podstawie przeprowadzonych eksperymentów komórkowych, możemy wywnioskować, że

hybrydyzacja oligonukleotydu do intronu jak i eksonu nie jest korzystna dla regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*. Na skutek wprowadzenia do komórki oligonukleotydów modyfikowanych UNA, dochodzi do obniżenia produkcji izoformy *PKM1*, co oznacza, że oligonukleotyd znacząco stracił potencjał regulacyjny.

Wyżej opisane wyniki wskazują, że zastosowanie reszt LNA oraz UNA może mieć istotne znaczenie w projektowaniu oligonukleotydów zmieniających splicing. Działanie tych oligonukleotydów opiera się na blokowaniu sekwencji regulatorowych, które mają wpływ na proces składania genu. Jak pokazuje przykład genu *PKM*, tylko w obrębie jednego genu mogą znajdować się podobne sekwencje, które oddziałują z tym samym oligonukleotydem antysensowym. Ponadto, w całym, komórkowym transkryptomie również istnieje ryzyko występowania wielu sekwencji, które, pomimo braku pełnej komplementarności, mogą tworzyć trwałe duplekisy z oligonukleotydem. Oddziaływanie oligonukleotydu z sekwencją inną niż docelowa, nazywamy efektem off-target. W przypadku genu *PKM*, dwie podobne do siebie sekwencje obecne są w bliskiej do siebie odległości, w związku z tym obie mogą mieć wpływ na splicing eksonu 10, poprzez interakcję z tymi samymi białkami regulatorowymi. Zatem niecelowe blokowanie sekwencji w intronie 9 mogło przynieść pozytywny efekt regulacyjny, wynikający z zablokowania obu sekwencji regulatorowych jednocześnie, lub sekwencja w intronie 9 może nie pełnić żadnej funkcji regulatorowej, a jej oddziaływanie z SSO, powoduje zmniejszenie stężenia oligonukleotydu, który powinien blokować wyłącznie sekwencję w eksonie 10. Ponadto, możliwe jest również, że sekwencja w intronie 9 pełni inną funkcję w alternatywnym splicingu i jej zablokowanie może doprowadzić do nieoczekiwanych zmian w procesie składania genu. Dodatkowo, oddziaływanie SSO z sekwencjami obecnymi w innych genach, może doprowadzić do zmian w procesie składania tych genów.

Dla użytego w tych badaniach SSO, oprócz sekwencji w intronie 9, znaleziono jeszcze 22 geny, z którymi oligonukleotyd może hybrydyzować. Dla 19 z tych genów zaobserwowano istotne zmiany we wzorcu ich składania [112]. Oznacza to, że wprowadzenie tego oligonukleotydu do komórki, może niekorzystnie wpłynąć na efekt terapeutyczny, ze względu na zmiany w produkcji izoform wielu genów. W związku z tym, istnieje potrzeba poszukiwania metod, które pozwolą na minimalizowanie niespecyficznego oddziaływania oligonukleotydów. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, modyfikacja LNA przyczynia się do zwiększenia dyskryminacji niesparowań, a zatem

intensyfikuje oddziaływanie SSO z docelowym fragmentem RNA. Z drugiej strony, modyfikacja UNA obniża dyskryminację niesparowań, co wiąże się z możliwością hybrydyzacji oligonukleotydu z sekwencjami, które nie wykazują pełnej komplementarności. Otwiera to możliwość projektowania oligonukleotydów, które jednocześnie mogą oddziaływać z dwoma celami terapeutycznymi, w których występują sekwencje regulatorowe o wysokim stopniu podobieństwa. Umożliwia to syntezę jednej sekwencji oligonukleotydu, która reguluje alternatywny splicing dwóch różnych genów jednocześnie. W niniejszej pracy udało się udowodnić generalną zasadność zastosowania modyfikacji LNA oraz UNA w ściśle sprecyzowanych pozycjach oligonukleotydów zmieniających splicing.

VII. PODSUMOWANIE

Celem prowadzonych badań była optymalizacja sekwencji oraz struktury dwóch różnych oligonukleotydowych narzędzi molekularnych wykorzystanych do regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*. Na podstawie wykonanych badań można wyciągnąć wnioski, które opisano poniżej.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dotyczących części regulatorowej BASOs wyłoniono efektywnie działające sekwencje regulatorowe, które nie były dotychczas użyte w tym typie cząsteczek. Wnioski płynące z eksperymentów *in vitro* przeprowadzonych z białkiem hnRNP A1 udowadniają, że białko to ma zdolność do oddziaływania z jednoniciowymi oraz przyjmującymi strukturę drugorzędową oligonukleotydami.

Ocena działania dwóch wybranych sekwencji regulatorowych pozwoliła stwierdzić, że stała wiązania dla układu oligonukleotyd-białko nie musi być parametrem determinującym efektywność BASOs w komórkach, co zostało udowodnione poprzez zastosowanie w BASO sekwencji A3 o słabszym oddziaływaniu z białkiem hnRNP A1.

W kolejnym etapie badań dokonano optymalizacji liczby powtórzeń motywów RNA wiążących białko w części regulatorowej BASOs. W przypadku sekwencji D (5' UAGGU 3'), najbardziej obiecujący wynik uzyskano dla czterokrotnego powtórzenia tej sekwencji, co objawiało się wzrostem poziomu izoformy PKM1 oraz obniżeniem poziomu PKM2. Natomiast, BASO zawierający sekwencję A (5' CAGGUAAGU 3'), był najbardziej skuteczny w regulacji splicingu przy zastosowaniu trzech powtórzeń tej sekwencji, co było maksymalną, przebadaną ilością powtórzeń w tych eksperymentach. Porównanie obu sekwencji wskazuje na wyższą efektywność sekwencji D, ze względu na fakt, że wpływ na splicing był obserwowany przy mniejszej ilości powtórzeń sekwencji regulatorowej. Dodatkowo, wykazano zasadność użycia rozgałęzionych oligonukleotydów, w celu zwiększenia ilości motywów RNA wiążących białko, co istotnie przekłada się na efekt regulacyjny BASOs. W obu zaprojektowanych cząsteczkach bBASOs uzyskano około dwukrotne zwiększenie poziomu izoformy PKM1 w porównaniu do liniowego BASOs w linii komórkowej HeLa. Jednak, poziom regulacji splicingu był znacznie lepszy w komórkach SKOV-3, gdzie dla BASO4-2XD4 uzyskano

pięciokrotne zwiększenie poziomu PKM1. Wiąże się to z następnym wnioskiem, który wskazuje, że BASOs są skuteczne w obu badanych liniach komórkowych, jednak poziom regulacji splicingu w tych liniach jest różny.

Udało się również udowodnić, że BASOs wpływają na niektóre cechy fenotypowe komórek nowotworowych. W badaniach oceniono zmianę zdolności komórek SKOV-3 do migracji oraz inwazji. W rezultacie wywnioskowano, że efekt zahamowania tych procesów jest spowodowany obecnością sekwencji regulatorowej 5' UAGGU 3', co oznacza, że oddziaływanie oligonukleotydu regulatorowego z białkiem hnRNP A1 obniża udział tego białka w stymulowaniu migracji oraz inwazji. Dodatkowo, efekt inhibitorowy jest spowodowany również częściowo obniżeniem ekspresji izoformy PKM2.

Badania nad optymalizacją BASOs pozwoliły na:

- ✓ Zastosowanie nowych sekwencji regulatorowych w BASOs.
- ✓ Ustalenie ilości powtórzeń motywów RNA wiążących białko, które są niezbędne dla osiągnięcia oczekiwanego efektu regulacji.
- ✓ Wykazanie zasadności użycia rozgałęzień oligonukleotydu, w celu maksymalizacji efektu regulatorowego.
- ✓ Wykazanie różnic w skuteczności BASOs w różnych liniach komórkowych.
- ✓ Udowodnienie inhibitorowego wpływu BASOs na migrację i inwazję komórek SKOV-3 oraz zaproponowanie możliwego mechanizmu tego zjawiska.

Podczas optymalizacji oligonukleotydu antysensowego zmieniającego splicing (SSO) wykorzystano modyfikowane nukleotydy, które mają wpływ na dyskryminację niesparowań. W wyniku przeprowadzonych badań termodynamicznych udało się ustalić, że reszta LNA zwiększa dyskryminację niesparowań w duplesie, w wyniku czego zwiększa się prawdopodobieństwo oddziaływania oligonukleotydu z eksonem 10. Przeciwny efekt wykazuje reszta UNA, która znacząco zmniejsza dyskryminację niesparowań, wyrównując tym samym szanse na oddziaływanie oligonukleotydu zarówno z eksonem 10, jak i intronem 9.

Zmiana preferencji SSO do hybrydyzacji z dwiema badanymi sekwencjami znacząco wpłynęła na jego efekt regulacyjny w linii komórkowej HeLa. Zwiększenie

oddziaływania z eksonem 10 poprzez zastosowanie reszt nukleotydowych LNA wzmacnia regulację alternatywnego splicingu, co objawia się zwiększoną produkcją izoformy PKM1. Natomiast, oddziaływanie oligonukleotydu zarówno z eksonem 10, jak i intronem 9 obniża działanie SSO, co zostało wywnioskowane na podstawie zmniejszonej ekspresji PKM1 w porównaniu z oligonukleotydem referencyjnym.

Badania nad optymalizacją SSO pozwoliły na:

- ✓ Wykazanie zasadności wykorzystania modyfikowanych nukleotydów LNA w SSOs dla zwiększenia dyskryminacji niesparowań.
- ✓ Wykazanie zasadności wykorzystania modyfikowanych nukleotydów UNA w SSOs, w celu zmniejszenia dyskryminacji niesparowań, a zatem zmiany preferencji oligonukleotydu do hybrydyzacji z jedną sekwencją docelową.
- ✓ Wykazanie, że to sekwencja w eksonie 10 warunkuje efektywność SSO.

Przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji na temat projektowania oligonukleotydów zmieniających splicing. Uzyskane wyniki mogą być pomocne w tworzeniu nowych narzędzi terapeutycznych do leczenia chorób, których przyczyną są zaburzenia alternatywnego splicingu.

VIII. MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

Kolumny illustra NAP-25 z żelem typu Sephadex G-25 – **GE Healthcare**

Kolumny Sep-Pak C18 - **Waters Corporation**

Amicon® Ultra-15 10kDA – **Merck**

Płytki TLC z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ – **Merck**

1.1 Startery do reakcji qPCR

Nazwa	Sekwencja (5'-3')
Aktyna-F	GCCAGCAGCCTCTGATCTG
Aktyna-R	CTGGTTCTTGCCAGCCTCTAG
PKM1-F	GTTCCACCGCAAGCTGTTTGAAGA
PKM1-R	TGCCAGACTCCGTCAGAACTATCA
PKM2-F	ATTGCCCGTGAGGCAGAGG
PKM2-R	TGCCAGACTTGGTGAGGACGATTA

1.2 Odczynniki

Kakodylan sodu, chlorek sodu, chlorek potasu, błękit bromofenolowy, cyjanol ksylenowy, glicerol, nadsiarczan amonu (APS), N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), fluorowodorek trietyloamoniowy (TEA·3HF), octan amonu, β-merkaptoetanol, tiocyjanian amonu, tiocyjanian guanidyny, octan sodu, hematoksylina, eozyna Y - **Sigma-Aldrich**

Pepton, wyciąg drożdżowy, izopropylotiogalaktozyd (IPTG), PBS 10x stężony, kanamycyna, chloramfenikol, mocznik, fenol, chloroform/alkohol izoamylowy (24:1 v/v), L-arginina, L-glutamina, sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na₂EDTA), tri(hydroksymetylo)aminometan (Tris), kwas borowy, mocznik – **Bioshop**

akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid (29:1; 37,5:1) – **Bio-Rad**

Amoniak (roztwór 30%), amoniak (roztwór 25%), 1-propanol, metanol, 96 % etanol, n-butanol, acetonitryl, izopropanol, N,N'-dimetyloformamid (DMF) – **Chempur**

Roti-Aqua Phenol – **Roth**

1.3 Gotowe zestawy do badan biochemicznych

LunaScript® - **New England Biolabs**

Luna® Universal qPCR Master Mix – **New England Biolabs**

1.4 Roztwory i bufor

- **Odczynnik do ekstrakcji fenolowo-chloroformowej**

Roti-Aqua Phenol

100 mM octan sodu, pH 5,0

β-merkaptioetanol

3M octan sodu pH 5,0

Tiocyanian guanidyny

Tiocyanian amonowy

50% glicerol

0,5M Na₂EDTA

20 % N-Lauroilosarkozyna, sól sodowa

Roti-Aqua Phenol zalano równoważną objętością 100mM octanu sodu (pH 5,0). Wyrzäsano przez noc, przy 100 rpm, w temperaturze 4°C, chroniąc przed światłem. Ogrzano odczynnik do temperatury pokojowej i usunięto większość fazy wodnej. Dodano 50µl β-merkaptioetanolu. Następnie 38 ml przygotowanego fenolu zmieszano z 3,34 ml 3M octanu sodu (pH 5,0), po czym 11,82 g tiocyanianu guanidyny oraz 7,61 g tiocyanianu amonowego rozpuszczono w około 20 ml wody. Oba roztwory połączone ze sobą. Dodano 10 ml 50% glicerolu. Uzupełniono wodą do 100 ml.

- **Bufor TBE używany do rozdzielu kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w żelach poliakrylamidowych (10x stężony)**

1 M Tris

1 M kwas borowy

10 mM Na₂EDTA; pH 8,3

Do rozdzielu elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych stosowano bufor 1x stężony.

- **Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego**
0,3 M octan sodu, pH 5,5
- **Bufor do topień UV dupleksów**
50 mM NaCl
20 mM kakodylan sodu
0,5 mM Na₂EDTA; pH 7,0
- **Bufor do topień UV oligonukleotydów regulatorowych**
100 mM KCl
20 mM kakodylan sodu
0,5 mM Na₂EDTA; pH 7,0
- **Bufor obciążający używany do rozdzielu kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w denaturujących żelach poliakrylamidowych (2x stężony)**
8 M mocznik
0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy
0,2% (w/v) Orange G
- **Bufory do oczyszczania białka hnRNP A1**

Bufor	Skład	pH
Bufor do lizy	15 mM imidazol 0,5 M NaCl 20 mM Na ₂ HPO ₄	7,0
Bufor płuczący	40-50 mM imidazol 0,5 M NaCl 20 mM Na ₂ HPO ₄	7,0
Bufor elucyjny	300 mM imidazol 0,5 M NaCl 20 mM Na ₂ HPO ₄	7,0

- **Bufor do dializy białka hnRNP A1**
 - 150 mM KCl
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 0,2 mM Na₂EDTA
 - 50 mM L-Glutamina
 - 50 mM L-Arginina
 - 0,05% β-merkaptioetanol
 - 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,0

- **Bufor obciążający do rozdzielania mieszanin oligonukleotydów RNA z białkiem hnRNP A1 w metodzie opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (10x stężony)**
 - 10mM Tris
 - 50 % (v/v) glicerol
 - 0.001% (w/v) błękit bromofenolowy
 - 0.001% (w/v) cyjanol ksylenowy

1.5 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 50 µg/ml. Pożywkę wylewano na płytki Petriego pod komorą 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 50 µg/ml.

- **HeLa pożywka hodowlana**

Medium hodowlane RPMI 1640

10% FBS

1x roztwór witamin

1x roztwór antybiotyków

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

- **HeLa pożywka hodowlana 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.

- **SKOV-3 pożywka hodowlana**

Medium hodowlane RPMI 1640

10% FBS

1x roztwór antybiotyków

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

- **SKOV-3 pożywka hodowlana używana po odmrażaniu komórek**

Medium hodowlane RPMI 1640

30% FBS

1x roztwór antybiotyków

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

1.6 Żele poliakrylamidowe

- **Żele poliakrylamidowe 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 szklane płyty i pozostawiano do polimeryzacji.

- **Niedenaturujące żele poliakrylamidowe do rozdzielania mieszanin oligonukleotydów RNA z białkiem hnRNP A1**

4,5% v/v akrylamid:N,N'-metylenobisakrylamid (37,5:1)

1x bufor TBE

5% (w/v) glicerol

0,7% (w/v) APS

0,06% (v/v) TEMED

Żel wylewano między szklane płyty i pozostawiano do polimeryzacji.

1.7 Aparatura

automatyczny licznik komórek TC20 Bio-Rad

spektrofotometr UV-Vis JASCO V-650 z termoprogramatorem

syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation

komputerowy skaner FLA-5100 FujiFilm

CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)

spektrofotometr NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher Scientific)

2. Metody

2.1 Synteza i odblokowanie oligonukleotydów DNA (startery do reakcji qPCR)

Startery do reakcji qPCR zostały zsyntetyzowane metodą amidofosforynową na podłożu stałym na syntetyzerze BioAutomation Coporation MerMade 12 z użyciem komercyjnie dostępnych amidofosforynów nukleozydów (Gene Pharma). W celu odblokowania zasadolabilnych grup ochronnych zastosowano 16-godziną inkubację w 55°C z 2 ml 30% roztworu amoniaku. Roztwór amoniaku z uwolnionym oligonukleotydem zebrano znad podłoża. Podłoże przepłukano dwukrotnie 0,5 ml wody, w celu odpłukania pozostałości oligonukleotydu. Całość odparowano do sucha. Odblokowane kwasy nukleinowe oczyszczano metodą rozdzielania elektroforetycznego w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm; prążki reprezentujące pożądaną długości oligonukleotydy wycinano z żelu. Z wyciętych fragmentów żelu eluowano oligodeoksyrybonukleotydy, a następnie strącano.

2.2 Synteza i odblokowanie oligonukleotydów RNA

Oligonukleotydy RNA zostały zsyntetyzowane metodą amidofosforynową na podłożu stałym na syntetyzerze BioAutomation Coporation MerMade 12 z użyciem komercyjnie dostępnych amidofosforynów nukleozydów (Gene Pharma). Tą samą procedurę zastosowano również do syntezy modyfikowanych chemicznie oligonukleotydów zawierających reszty LNA (Gene Pharma), UNA (Ribotask) oraz 2'-O-metoksyetylo-RNA (ChemGenes) z wyjątkiem etapu utlenienia wiązania fosforynowego, w którym zastosowano 15 minutową inkubację z 0,5M roztworem disulfidu tetraetylotiuramu (TETD) w acetonitrylu zamiast klasycznego roztworu jodu, prowadząc tym samym do otrzymania oligonukleotydów zawierających wiązania tiofosforanowe. Po automatycznej syntezie, w celu odcięcia oligonukleotydu od podłoża stałego oraz odblokowania zasadolabilnych grup ochronnych zastosowano 16-godziną inkubację w 55°C z 1,5 ml 30% roztworu amoniaku i 0,5 ml 96% etanolu (RNA) lub z 2 ml 30% roztworu amoniaku (oligonukleotydy 2'-O-metoksyetylo-RNA). Roztwór amoniaku z uwolnionym oligonukleotydem zebrano znad podłoża. Podłoże przepłukano

dwukrotnie 0,5 ml wody, w celu odpłukania pozostałości oligonukleotydu. Całość odparowano do sucha. Kolejnym etapem (wyłącznie dla oligonukleotydów RNA) było usunięcie silylowych grup ochronnych znajdujących się w pozycji 2'OH przy użyciu 30 μ l N'N'-dimetyloformamidu i 270 μ l fluorowodoru trietyloamoniowego. W przypadku oligonukleotydów dłuższych niż 12 reszt nukleotydowych, objętość użytych odczynników zwiększono dwukrotnie. Oligonukleotydy krótsze niż 12 reszt nukleotydowych inkubowano przez 2 godziny w 55°C, a dłuższe niż 12 reszt nukleotydowych inkubowano przez 3 godziny w tej samej temperaturze. Następnie dodano 4 ml n-butanolu i strącano w temperaturze -20°C przez 1 godzinę. Kolejno, wirowano przez 10 minut, 5000 rpm, w 4°C w celu odwirowania strąconego oligonukleotydu. Supernatant odlano, a osad wysuszono pod próżnią. Oligonukleotydy następnie odsolono przy użyciu kolumn zawierających Sephadex G-25 (oligonukleotydy dłuższe niż 10 reszt nukleotydowych) lub kolumn Sep-Pak (Waters Corporation) (oligonukleotydy krótsze niż 10 reszt nukleotydowych).

2.3 Odsalanie oligonukleotydów na kolumnach zawierających Sephadex G-25

Kolumny illustra NAP-25 każdorazowo przed użyciem regenerowano przepuszczając przez kolumny 30 ml wody. Osad oligonukleotydu rozpuszczono w 0,5 ml wody i nałożono na kolumnę, po czym zebrano pierwszą frakcję. Następnie na kolumnę dodano 1 ml wody i zebrano do tej samej probówki. Kolejno nakładano na kolumnę 7 porcji wody po 1,5 ml i frakcje zbierano do 7 kolejnych probówek. Obecność oligonukleotydów we frakcjach potwierdzono poprzez nałożenie 2 μ l roztworu na płytkę TLC i detekcję w świetle UV o długości fali 260 nm. W większości przypadków oligonukleotyd był obecny we frakcjach 3 i 4. Frakcje z roztworem oligonukleotydu odparowano.

2.4 Odsalanie oligonukleotydów na kolumnach Sep-Pak

Kolumny Sep-Pak każdorazowo przed użyciem regenerowano poprzez przepuszczenie przez kolumnę kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM octanu amonu. Osad oligonukleotydu rozpuszczono w 10 ml 10 mM octanu amonu i nałożono na zregenerowaną kolumnę. Frakcję zebrano, a kolumnę przepłukano 10 ml

10 mM octanu amonu. Oligonukleotyd wymyto z kolumny za pomocą 5 ml roztworu acetonitryl:woda w stosunku objętościowym 3:7. Obecność oligonukleotydów w poszczególnych frakcjach sprawdzono poprzez nałożenie 2 μ l roztworu na płytkę TLC i detekcję w świetle UV o długości fali 260 nm. Frakcję zawierającą oligonukleotyd odparowano.

2.5 Oczyszczanie oligonukleotydów w żelu poliakrylamidowym

Oligonukleotydy dłuższe niż 12 reszt nukleotydowych oczyszczano przez elektroforezę w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Zastosowano żel o usieciowaniu 29:1 w/w (bisakrylamid:akrylamid) z dodatkiem 7 M mocznika. Do polimeryzacji żelu użyto 900 μ l 10 % nadsiarczanu amonu oraz 60 μ l N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy na 150 ml roztworu bisakrylamidu:akrylamidu. Elektroforezę przeprowadzano w buforze 1xTBE. Przed nałożeniem oligonukleotydów na żel przeprowadzano preelektroforezę trwającą 30 minut przy mocy 25 W. Osad oligonukleotydu rozpuszczono w buforze obciążającym zawierającym 4 M roztwór mocznika oraz odpowiednie barwniki. Roztwór oligonukleotydu denaturowano przez 5 minut w 90°C. Następnie roztwór ochłodzono i nałożono na przygotowany żel poliakrylamidowy. Elektroforezę przeprowadzano przez około 2-3 godziny, aż do momentu migracji pomarańczowego barwnika (Orange G) do końca żelu. Lokalizację oczyszczanego oligonukleotydu ustalano za pomocą światła UV o długości 260 nm. Fragment żelu zawierający oligonukleotyd wycięto, przeniesiono do 13 ml próbówki i poddano elucji.

2.6 Elucja i strącanie oligonukleotydu po oczyszczaniu w żelu poliakrylamidowym

Fragment żelu zawierający oligonukleotyd zalano 0,3 M roztworem octanu sodu. Zawartość próbówki wytrząsano przez 2 godziny, 750 rpm, 4°C. Następnie, roztwór z żelu zebrano do nowej próbówki, do której dodano 96% etanol w ilości odpowiadającej 2,5 krotności objętości odsączonego roztworu. Fragment żelu ponownie zalano 0,3 M octanem sodu. Całą procedurę powtórzono dwukrotnie, w wyniku czego otrzymano trzy frakcje wyeluowanego oligonukleotydu. Wszystkie frakcje zawierające oligonukleotyd z etanolem przeniesiono do -20°C na co najmniej 16 godzin. Mieszaninę wirowano przy 6000 rpm w temperaturze 4°C przez 30 minut. Supernatant dekantowano, a osad suszono

pod próżnią. Stężenie oligonukleotydów używanych w badaniach termodynamicznych określano na podstawie pomiaru absorbancji światła UV o długości fali 260 nm, w temperaturze 80°C oraz korzystając z obliczonego w kalkulatorze OligoAnalyzer™ (Integrated DNA Technologies) współczynnika ekstynkcji. Stężenie pozostałych oligonukleotydów oceniono na podstawie pomiaru absorbancji światła UV o długości fali 260 nm używając spektrofotometru NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis.

2.7 Oczyszczanie oligonukleotydów metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Oligonukleotydy o długości poniżej 12 reszt nukleotydowych rozdzielono na płytkach TLC zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej: n-propanol: 25% amoniak: woda, w stosunku 55/35/10 (v/v/v). Fragment żelu krzemionkowego zawierający oligonukleotyd zdrapywano z płytki i przenoszono do 13 ml probówki. Żel krzemionkowy trzykrotnie przepłukiwano 2 ml wody, za każdym razem wytrząsając zawartość probówki przez kilka minut. Zebrane frakcje połączono razem i odparowano do sucha. Osad rozpuszczono w 500 µl wody. W celu oddzielenia pozostałości żelu krzemionkowego, roztwór odwirowano przez 10 minut, 1400 rpm, RT. Supernatant przeniesiono do nowej probówki. Stężenie oligonukleotydów oceniono na podstawie pomiaru absorbancji światła UV o długości fali 260 nm.

2.8 Transformacja komórek kompetentnych BL21(DE3) codon-plus (RIL)

Plazmid pet24b z umieszczonym fragmentem genu białka hnRNPA1 otrzymano dzięki uprzejmości profesora Frederica Allein'a (Instytut Biochemii, ETH Zurych, Szwajcaria). Komórki BL21(DE3) codon-plus (RIL) transformowano plazmidem zawierającym sekwencję kodującą białko hnRNP A1. Komórki rozmrożono na lodzie i dodano 1 µl plazmidu o stężeniu 50 ng/µl. Komórki inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie, przeniesiono je na 20 sekund do temperatury 42°C i z powrotem przełożono na lód na 2 minuty. Pożywkę SOC podgrzano do temperatury 42°C i 0,9 ml dodano do komórek. Zawiesinę komórek wytrząsano (240 rpm) przez 1 godzinę w 37°C. Następnie 200 µl zawiesiny wysiano na płytki z kanamycyną (50 µg/ml) i pozostawiono w temperaturze 37°C na 24 godziny.

2.9 Nadekspresja białka hnRNP A1 w systemie ekspresyjnym *E. Coli* BL21 (DE3) codon plus

Do 5 ml pożywki LB dodano 2,5 μ l kanamycyny (0,1g/ml) oraz 2,5 μ l chloramfenikolu (0,1g/ml etanolu), a następnie zaszczerpiono kolonią komórek BL21 (DE3) codon plus zawierającą plazmid z genem dla białka hnRNP A1. Pozostawiono do całonocnej inkubacji w 37°C ze stałym mieszaniem (225 rpm). Kolejno, 5 ml rozhodowanej zawiesiny przeniesiono do 0,5 l pożywki LB z dodatkiem 250 μ l kanamycyny (0,1g/ml). Hodowlę inkubowano przez 4 godziny w 37°C stale mieszając (225 rpm). Do indukcji ekspresji białka użyto 0,5 ml IPTG (0,5 M). Indukcję przeprowadzano przez 18 godzin w 30°C, stale mieszając (225 rpm). Hodowlę zwirowano (7830 rpm, 4°C, 10 minut dla 50 ml hodowli) i rozpoczęto oczyszczanie białka.

2.10 Oczyszczanie białka hnRNPA1 na złożu niklowym

Do fragmentu genu hnRNPA1 została dołączona etykieta 6xHis umożliwiająca oczyszczenie białka na złożu niklowym. Osad bakteryjny rozpuszczono w 35 ml buforu do lizy. Dodano liofilizowanego lizozymu (końcowe stężenie 0,5 mg/ml), 200 μ l DNAzy (2000 U) i mieszano na kołyszce laboratoryjnej przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zawiesinę poddano sonifikacji w warunkach: 2 sekundy sonifikacji, 9,9 sekundy przerwy przy amplitudzie 75% i łącznym czasie sonifikacji 4 minut. Uzyskaną zawiesinę odwirowano przez 1 godzinę, 7830 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przelano do nowej probówki, dodano 15 μ l RNazy A (10mg/ml), 100 μ l DNazy I (1000U) i mieszano przez 1 godzinę na lodzie. Przygotowano złożo niklowe poprzez dwukrotne przepłukanie buforem do lizy w objętości odpowiadającej dwukrotnej objętości złoża. Ekstrakt z komórek bakteryjnych połączono ze złożem i inkubowano przez 30 minut na lodzie ciągle mieszając. Zawiesinę złoża z ekstraktem bakteryjnym nałożono na kolumnę i podłączono do pompy perystaltycznej. Zebrano frakcję białek niezwiązanych do złoża. Złożo przepłukano pięciokrotnie 10 ml buforem płuczącym. Białko eluowano dwukrotnie 8 ml buforu elucyjnego. Określono stężenie białka za pomocą spektrofotometru przy długości fali 280 nm, uwzględniając współczynnik ekstynkcji wyznaczony za pomocą narzędzia ProtParam (Expasy) oraz masę molekularną białka.

2.11 Dializa i zagęszczanie rekombinowanego białka hnRNP A1

Fracje elucyjne zawierające białko przeniesiono do woreczka dializacyjnego i umieszczono w zlewce zawierającej bufor do dializy. Dializę przeprowadzano w objętości 1 l w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. Bufor do dializy usunięto po około 16 godzinach i dodano 0,5 l świeżego buforu. Bufor wymieniono po kolejnych 3 godzinach, dodano nową porcję buforu, a po kolejnych 3 godzinach przystąpiono do zagęszczania białka. Białko zagęszczano za pomocą probówek Amicon Ultra-15, które zawierały membranę o wartości odcięcia masy cząsteczkowej 10kDa.

2.12 Test przesiewowy oligonukleotydów wiążących białko hnRNP A1

Oligonukleotydy, które oddziaływały z rekombinowanym białkiem hnRNP A1 wybrano na podstawie metody opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (ang. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). Każdy, znakowany fluorescencyjnie, oligonukleotyd w roztworze o stężeniu 0,5 μM został poddany inkubacji z roztworem białka hnRNP A1 o stężeniu 60 μM. Mieszaninę białka i oligonukleotydu o objętości 10 μl przygotowano w buforze do dializy. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 4°C przez 30 minut. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w natywnym żelu poliakrylamidowym (akrylamid:bisakrylamid 37,5:1 w/w) przez 2 godziny, przy napięciu prądu 300 V i w temperaturze 4°C. Do wizualizacji rozdziału użyto skaner Fuji FLA 5100.

2.13 Wyznaczenie wartości Kd dla oddziaływania oligonukleotydów z rekombinowanym białkiem hnRNP A1

Przygotowano 14 roztworów białka o podanych stężeniach: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 3,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 60,00 μM w buforze do dializy. Znakowane fluoresceiną oligonukleotydy zostały użyte w roztworach o stałym stężeniu 0,50 μM. Gotowe mieszaniny reakcyjne o objętości 10 μl inkubowano przez 30 minut w 4°C. Następnie, próbki wirowano przez 10 minut, 14 000 rpm, 4°C i odpipetowano 5 μl roztworów do nowych probówek. Dodano 0,5 μl 10x stężonego buforu obciążającego do EMSY. Rozdział kompleksów białka z oligonukleotydem wykonano w 4,5% żelu poliakrylamidowym (bisakrylamid:akrylamid 37,5:1 w/w). Elektroforezę

przeprowadzano przez 2 godziny, przy napięciu 300 V w buforze 1xTBE, w temperaturze 4°C. Przed nałożeniem próbek na żel przeprowadzono 30 minutową preelektroforezę. Obraz rozdziału elektroforetycznego otrzymano za pomocą skanera Fuji FLA-5100.

Intensywność prążków odpowiadających kompleksowi i wolnemu oligonukleotydowi oceniono za pomocą oprogramowaniu MultiGauge. Na podstawie tej intensywności wyznaczono jaki jest stosunek procentowy kompleksu i wolnego oligonukleotydu w każdej ścieżce odpowiadającej roztworowi białka o danym stężeniu. Stałą wiązania wyznaczono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0 uwzględniając ilość kompleksu powstającego w kolejnych roztworach białka. Zastosowano model nieliniowej regresji, uwzględniający współczynnik Hilla.

2.14 Topnienia oligonukleotydów regulatorowych w świetle UV

Pomiary termodynamiczne prowadzono na spektrofotometrze JASCO V-650 z termoprogramatorem. Pomiary wykonano przy długości fali 260nm, w celu detekcji dwuniciowych struktur drugorzędowych oraz 295 nm, co umożliwia wykrycie oddziaływań Hoogsteen'a występujących w strukturze G-kwadrupleksu. Oligonukleotydy rozcieńczono w buforze do topnień zawierającym 100 mM KCl do uzyskania stężeń roztworów w zakresie 10^{-4} - 10^{-5} M w objętości 30 μ l. Do eksperymentów użyto kwarcowe mikrokuwety o drodze optycznej 1 mm. Topnienia wykonano w zakresie temperatur 85°C-4°C, obniżając temperaturę o 0,5°C co minutę. Uzyskane krzywe topnienia analizowano w programie MeltWin 3.5.

2.15 Badania termodynamiczne dupleksów SSO

Pomiary termodynamiczne prowadzono na spektrofotometrze JASCO V-650 z termoprogramatorem. Przygotowano dziewięć roztworów oligonukleotydów SSO z RNA w stosunku molowym 1:1, zakresie stężeń 10^{-3} - 10^{-6} M. Roztwory przygotowano w buforze do topnień zawierającym 50 mM NaCl. Zastosowano kwarcowe mikrokuwety o drodze optycznej 1 mm (30 μ l), 5 mm (150 μ l), 10 mm (300 μ l). Topnienia wykonano przy długości fali 260 nm w zakresie temperatur 90°C-4°C, obniżając temperaturę w tempie 1°C/min, a wartość absorbancji próbek mierzona była co 0,5 minuty. Uzyskane krzywe topnienia analizowano w programie MeltWin 3.5.

2.16 Hodowla i pasaż komórek HeLa

Komórki HeLa hodowano w inkubatorze w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i wilgotności powietrza około 90%. Stosowano pożywkę hodowlaną RPMI 1640 uzupełnioną 10% FBS, antybiotykami oraz witaminami. Przy osiągnięciu przez komórki konfluencji wynoszącej około 90% powierzchni butelki hodowlanej, przeprowadzano pasaż hodowli w rozcieńczeniu od 1:5 do 1:12. Podłoże hodowlane usunięto, komórki przepłukano 10 ml buforu PBS, odlano i dodano 1 ml trypsyny (1x). Inkubowano przez 3 minuty w 37°C. Następnie, butelkę delikatnie wstrząśnięto, w celu oderwania komórek od dna naczynia. Dodano odpowiednią objętość medium hodowlanego, kilkakrotnie przepipetowano zawartość butelki i przeniesiono do probówki. Ponownie przepipetowano zawiesinę i przeniesiono 1 ml do nowej butelki hodowlanej, a następnie dodano 9 ml świeżego medium hodowlanego.

2.17 Transfekcja linii komórkowej HeLa

Komórki HeLa zawieszono w pożywce RPMI 1640 i wysiano na płytkę 24-dółkową w ilości 100 000 komórek na jeden dołek. Po 24 godzinach pożywkę usunięto, komórki przepłukano buforem PBS i dodano 450 µl pożywki RPMI 1640 bez antybiotyków.

Przygotowano odpowiednio zagęszczone roztwory oligonukleotydów umożliwiające uzyskanie pożądanego stężenia w objętości 500 µl w dołku płytki 24-dółkowej. Do transfekcji użyto produktu Lipofektamina 3000, w której skład wchodzi lipofektamina oraz dodatkowo odczynnik P3000. Następnie 1 µl lipofektaminy 3000 połączono z 25 µl OPTI-MEM, a 1 µl odczynnika P3000 połączono z 25 µl OPTI-MEM. Roztwór z lipofektaminą dodano do przygotowanego roztworu oligonukleotydu, a następnie dodano roztwór z odczynnikiem P3000. Całość inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie 50 µl mieszaniny dodano do 450 µl medium hodowlanego w dołku płytki. Pozostawiono w inkubatorze w warunkach 37°C, 5% CO₂, oraz 90% wilgotności na 48 godzin.

2.18 Hodowla i pasaż komórek SKOV-3

Komórki SKOV-3 hodowano w inkubatorze zapewniającym temperaturę 37°C, 5% CO₂ i wilgotność powietrza około 90%. Stosowano podłoże hodowlane RPMI 1640 uzupełnione 10% FBS oraz antybiotykami. Przy osiągnięciu przez komórki konfluencji równej około 90% w butelce T-75, poddawano je pasażowi w rozcieńczeniu od 1:2 do 1:8. Pożywkę z nad komórek usuwano, komórki przepłukiwano buforem PBS i dodawano 1 ml 1x stężonej trypsyny. Inkubowano przez 3 do 5 minut w temperaturze 37°C, 5% CO₂, przy wilgotności 90%. Butelkę wstrząsnięto, a następnie dodano odpowiednią ilość medium hodowlanego. Do nowej butelki przeniesiono 1 ml zawiesiny komórek i dodano 9 ml świeżego medium.

2.19 Transfekcja linii komórkowej SKOV-3

Komórki SKOV-3 zawieszono w pożywce RPMI 1640 i wysiano na płytkę 6-dołkową w ilości 200 000 komórek na jeden dołek. Po 24 godzinach pożywkę usunięto, komórki przepłukano buforem PBS i dodano 2250 µl pożywki RPMI 1640 bez antybiotyków. Do transfekcji użyto produktu Lipofektamina 3000, w której skład wchodzi lipofektamina oraz dodatkowo odczynnik P3000. Następnie 5 µl lipofektaminy 3000 połączono z 125 µl OPTI-MEM, a 5 µl odczynnika P3000 połączono z 125 µl OPTI-MEM. Roztwór z lipofektaminą dodano do przygotowanego roztworu oligonukleotydu, a następnie dodano roztwór z odczynnikiem P3000. Całość inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie 250 µl mieszaniny dodano do 2250 µl pożywki w dołku płytki. Pozostawiono w inkubatorze w warunkach 37°C, 5% CO₂, oraz 90% wilgotności na 48 godzin.

2.20 Izolacja RNA z linii komórkowych HeLa oraz SKOV-3

Po 48 godzinach inkubacji usunięto pożywkę, komórki przepłukano buforem PBS i zalano odczynnikiem do ekstrakcji fenolowo-chloroformowej w ilości 500 µl na dołek dla płytki 24-dołkowej i 1000 µl na dołek dla płytki 6-dołkowej. Komórki zeskrabano z powierzchni płytki i przeniesiono do probówki. Dodano 100 µl (200 µl dla płytki 6-dołkowej) chloroformu, wymieszano i pozostawiono do inkubacji w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Zawiesinę zwirowano (14000 rpm, 10 minut, 4°C). Górną

fazę wodną przeniesiono do nowej probówki i dodano 250 μ l izopropanolu (500 μ l dla płytki 6-dółkowej). Pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10 minut i zwirowano (14000 rpm, 10 minut, 4°C). Supernatant usunięto, a otrzymany osad RNA przepłukano 200 μ l 75% etanolu, zwirowano (14000 rpm, 10 minut, 4°C), a supernatant usunięto. Procedurę płukania etanolem powtórzono jeszcze raz. Pozostałości etanolu odparowano poprzez pozostawienie otwartej probówki w temperaturze 37°C. Osad RNA rozpuszczono w 50 μ l wody. Dokonano pomiaru stężenia kwasów nukleinowych za pomocą spektrofotometru. Dodatkowo oceniono wartość stosunku 260/280, który świadczy o zawartości zanieczyszczeń białkowych.

2.21 Usunięcie zanieczyszczeń DNA i odwrotna transkrypcja

500 ng RNA poddano działaniu DNazy I, w celu usunięcia zanieczyszczeń kwasem 2'-deoksyrybonukleinowym. Reakcję przeprowadzano w objętości 10 μ l, w obecności 1 μ l DNazy I (5U/ μ l) oraz 1 μ l 10x buforu dla DNazy I. Reakcję degradacji DNA prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie, dodano 2 μ l 25 mM Na₂EDTA i inkubowano w 65°C przez 10 minut. W celu uzyskania cDNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji w objętości 10 μ l. Do reakcji użyto 2 μ l zestawu LunaScript® RT SuperMix oraz 4 μ l roztworu RNA po usunięciu zanieczyszczeń DNA. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono zgodnie z poniższym protokołem:

1. Przyłączanie starterów: 25°C, 2 minuty
2. Synteza cDNA: 55°C, 10 minut
3. Inaktywacja termiczna enzymu: 95°C, 1 minuta

2.22 Ocena poziomu ekspresji mRNA izoform PKM1 i PKM2 za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR)

Reakcję qPCR przeprowadzono w objętości 10 μ l, w obecności starterów dla wariantów mRNA PKM1 (PKM1-F, PKM1-R), PKM2 (PKM2-F, PKM2-R) oraz β -aktyny (Aktyna- F, Aktyna-R) jako genu referencyjnego. Użyto 5 μ l gotowej mieszaniny reakcyjnej LUNA® Universal qPCR Master Mix NEB, 0,5 μ l starterów

o stężeniu 5 pmol/ μ l oraz 1 μ l cDNA. Reakcję qPCR przeprowadzono przy użyciu CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) zgodnie z poniższym protokołem:

1. Wstępna denaturacja: 95°C, 1 minuta
2. Denaturacja: 95°C, 15 sekund
3. Przyłączanie starterów i amplifikacja: 60°C, 30 sekund.
4. Etapy 2 i 3 powtórzono 34 razy.

Wyniki zostały przeanalizowane w programie CFX Maestro (Bio-Rad). Poziom ekspresji wariantów mRNA PKM1 oraz PKM2 został znormalizowany względem genu referencyjnego β -aktyny.

2.23 Przygotowanie wkładek z membraną do testu oceny inwazji komórek SKOV-3

Wkładki do testu inwazji przechowywano w temperaturze -20°C. Przed rozpoczęciem eksperymentu, wkładki ogrzano do temperatury pokojowej. Studzienki płytki 24-dołkowej wypełniono 700 μ l pożywki RPMI 1640 (bez serum). Wkładki umieszczono sterylnie w studzienkach płytki 24-dołkowej. Do każdej wkładki dodano 200 μ l RPMI 1640 (bez serum). Pozostawiono na 2 godziny w inkubatorze zapewniającym warunki 37°C, 5% CO₂ oraz wilgotność 90%. Po tym czasie pożywkę usunięto i przystąpiono do procedury opisanej niżej.

2.24 Ocena zdolności komórek SKOV-3 do migracji oraz inwazji.

Komórki SKOV-3 poddano transfekcji zgodnie z opisem (2.19) w czasie 24 godzin. Po tym czasie podłoże hodowlane z dołków usunięto, przepłukano buforem PBS i dodano 0,5 ml trypsyny (1x stężonej). Wstawiono na 3 minuty do inkubatora zapewniającego warunki 37°C, 5% CO₂ i wilgotność 90%. Do każdego dołka dodano 1 ml medium i całość przeniesiono do odpowiednio opisanych probówek. Zawiesinę komórek zwirowano (1000 rpm, temperatura pokojowa, 3 minuty), pożywkę usunięto, a komórki zawieszono w 0,5 ml medium z 0,5% serum. Ilość komórek w zawieszynie policzono i przygotowano zawiesinę komórek o stężeniu 75 000 komórek/ml w medium z 0,5% serum. Do studzienek w płytce dodano 700 μ l medium z 10% serum.

Do przygotowanych wkładek do testu inwazji nałożono 200 μ l zawiesiny komórek i pozostawiono na około 17 godzin w warunkach 37°C, 5% CO₂ i wilgotności 90%.

Wkładki do testu migracji sterylnie wyjęto z opakowania i umieszczono w studzienkach.

Do każdej studzienki nałożono 200 μ l zawiesiny komórek i pozostawiono na około 17 godzin w warunkach 37°C, 5% CO₂ i wilgotności 90%.

2.25 Utrwalenie i wybarwienie komórek migrujących i inwazyjnych

Usunięto podłoże hodowlane z wkładek oraz studzienek w płytce. Wkładki oraz studzienki przepłukano buforem PBS. Patyczkiem z końcówką zakończoną wacikiem usunięto komórki z wewnętrznej strony membrany. Do studzienek dodano 700 μ l metanolu i włożono do nich wkładki. Płytkę przeniesiono do 4°C na 10 minut. Usunięto metanol i pozostawiono do odparowania pozostałości. Do studzienek dodano 700 μ l roztworu hematoksyliny (1 g/l), w barwniku zanurzono wkładki i pozostawiono w ciemności na 10 minut. Usunięto barwnik i dwukrotnie przepłukano wkładki oraz studzienki wodą. Wkładki umieszczono w studzienkach wypełnionych 700 μ l eozyny (0,5% roztwór wodny) i pozostawiono na jedną minutę. Barwnik odpłukano, a wkładki pozostawiono do wyschnięcia.

2.26 Obserwacja komórek migrujących i inwazyjnych

Wkładkę umieszczono na szkiełku nakrywkowym membraną do góry. Szkiełko z wkładką położono na stoliku mikroskopu świetlnego. Komórki zliczano pod mikroskopem w 20-krotnym powiększeniu. Ilość komórek wyliczono jako średnią z 10 różnych pól.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Cobb, M. 60 Years Ago, Francis Crick Changed the Logic of Biology. *PLOS Biol.* **2017**, *15*, e2003243
2. Samn, S.; Smith, C.; Luhrman, R. *Alternative Splicing: Theory and Protocols*; Wiley-Blackwell, 2014;
3. Valadkhan, S. The Spliceosome : A Ribozyme at Heart ? *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 693–697
4. Deutsch, M.; Long, M. Intron – Exon Structures of Eukaryotic Model Organisms. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3219–3228.
5. Robberson, B.L.; Cote, G.J.; Berget, S.M. Exon Definition May Facilitate Splice Site Selection in RNAs with Multiple Exons. **1990**, *10*, 84–94.
6. Rino, J.; Carmo-Fonseca, M. The Spliceosome: A Self-Organized Macromolecular Machine in the Nucleus? *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 375–384,
7. Will, C.L.; Lu, R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 1–23.
8. Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., Tress, M.L. Multiple Evidence Strands Suggest That There May Be as Few as 19 000 Human Protein-Coding Genes. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *23*, 5866–5878.
9. Pan, Q.; Shai, O.; Lee, L.J.; Frey, B.J.; Blencowe, B.J. Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1413–1415
10. Wang, Y.; Liu, J.; Huang, B.; Xu, Y.-M.; Li, J.; Hang, L.-F.; Lin, J.; Zhang, J.; Min, Q.-H.; Yang, W.-M.; Wang, X-Z. Mechanism of Alternative Splicing and Its Regulation. *Biomed. Reports* **2015**, *3*, 152–158
11. Roca, X.; Krainer, A.R.; Eperon, I.C. Pick One, but Be Quick: 5' Splice Sites and the Problems of Too Many Choices. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 129–144.
12. Cho, S.; Hoang, A.; Sinha, R.; Zhong, X.; Fu, X. Interaction between the RNA Binding Domains of Ser-Arg Splicing Factor 1 and U1-70K SnRNP Protein Determines Early Spliceosome Assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 8233–8238,

13. Shen, H.; Kan, J.L.C.; Green, M.R. Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly. *Mol. Cell* **2004**, *13*, 367-76
14. Jean-Philippe, J.; Paz, S.; Caputi, M. HnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 18999–19024
15. Beusch, I.; Barraud, P.; Moursy, A.; Cléry, A.; Allain, F.H.T. Tandem HnRNP A1 RNA Recognition Motifs Act in Concert to Repress the Splicing of Survival Motor Neuron Exon 7. *Elife* **2017**, *6*, 1–35
16. Zahler, A.M.; Damgaard, C.K.; Kjems, J.; Caputi, M. SC35 and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A / B Proteins Bind to a Juxtaposed Exonic Splicing Enhancer / Exonic Splicing Silencer Element to Regulate HIV-1 Tat Exon 2 Splicing *. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10077–10084.
17. Rooke, N.; Markovtsov, V.; Cagavi, E.; Black, D.L. Roles for SR Proteins and HnRNP A1 in the Regulation of c -Src Exon N1. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 1874–1884
18. Cléry, A.; Sinha, R.; Anczuków, O.; Corriero, A.; Moursy, A.; Daubner, G.M.; Valcárcel, J.; Krainer, A.R.; Allain, F.H.-T. Isolated Pseudo–RNA-Recognition Motifs of SR Proteins Can Regulate Splicing Using a Noncanonical Mode of RNA Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, E2802–E2811,
19. Okunola, H.L.; Krainer, A.R. Cooperative-Binding and Splicing-Repressive Properties of hnRNP A1. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 5620–5631
20. Blanchette, M.; Chabot, B. Modulation of Exon Skipping by High-Affinity hnRNP A1-Binding Sites and by Intron Elements That Repress Splice Site Utilization. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1939–1952
21. Buratti, E.; Muro, A.F.; Giombi, M.; Gherbassi, D.; Iaconcig, A.; Baralle, F.E. RNA Folding Affects the Recruitment of SR Proteins by Mouse and Human Polypurinic Enhancer Elements in the Fibronectin EDA Exon. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1387–1400
22. Warf, M.B.; Diegel, J. V.; Von Hippel, P.H.; Berglund, J.A. The Protein Factors MBNL1 and U2AF65 Bind Alternative RNA Structures to Regulate Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 9203–9208,
23. Hiller, M.; Zhang, Z.; Backofen, R.; Stamm, S. Pre-mRNA Secondary Structures Influence Exon Recognition. *PLoS Genet.* **2007**, *3*, 2147–2155,
24. Shepard, P.J.; Hertel, K.J. Conserved RNA Secondary Structures Promote

- Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *14*, 1463–1469,
25. Varani, L.; Hasegawa, M.; Spillantini, M.G.; Smith, M.J.; Murrell, J.R.; Ghetti, B.; Klug, A.; Goedert, M.; Varani, G. Structure of Tau Exon 10 Splicing Regulatory Element RNA and Destabilization by Mutations of Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*: 8229-34
 26. Liu, F.; Gong, C.X. Tau Exon 10 Alternative Splicing and Tauopathies. *Mol. Neurodegener.* **2008**, *3*
 27. Zapletalová, E.; Hedvičáková, P.; Kozák, L.; Vondráček, P.; Gaillyová, R.; Maříková, T.; Kalina, Z.; Jüttnerová, V.; Fajkus, J.; Fajkusová, L. Analysis of Point Mutations in the SMN1 Gene in SMA Patients Bearing a Single SMN1 Copy. *Neuromuscul. Disord.* **2007**, *17*, 476–481
 28. Burghes, A.H.M.; Beattie, C.E. Spinal Muscular Atrophy: Why Do Low Levels of Survival Motor Neuron Protein Make Motor Neurons Sick? *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 597–609.
 29. Singh, N.N.; Singh, R.N.; Androphy, E.J. Modulating Role of RNA Structure in Alternative Splicing of a Critical Exon in the Spinal Muscular Atrophy Genes. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 371–389
 30. Conlon, E.G.; Lu, L.; Sharma, A.; Yamazaki, T.; Tang, T.; Shneider, N.A.; Manley, J.L. The C9ORF72 GGGGCC Expansion Forms RNA G-Quadruplex Inclusions and Sequesters HnRNP H to Disrupt Splicing in ALS Brains. *Elife* **2016**, *5*:e17820
 31. Von Hacht, A.; Seifert, O.; Menger, M.; Schütze, T.; Arora, A.; Konthur, Z.; Neubauer, P.; Wagner, A.; Weise, C.; Kurreck, J. Identification and Characterization of RNA Guanine-Quadruplex Binding Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6630–6644
 32. Gomez, D.; Lamarteleur, T.; Lacroix, L.; Mailliet, P.; Mergny, J.L.; Riou, J.F. Telomerase Downregulation Induced by the G-Quadruplex Ligand 12459 in A549 Cells Is Mediated by hTERT RNA Alternative Splicing. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 371–379
 33. Marcel, V.; Tran, P.L.T.; Sagne, C.; Martel-Planche, G.; Vaslin, L.; Teulade-Fichou, M.P.; Hall, J.; Mergny, J.L.; Hainaut, P.; van Dyck, E. G-Quadruplex Structures in TP53 Intron 3: Role in Alternative Splicing and in Production of P53 mRNA Isoforms. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 271–278

34. Reinke, L.M.; Xu, Y.; Cheng, C. Snail Represses the Splicing Regulator Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36435–36442,
35. Weldon, C.; Dacanay, J.G.; Gokhale, V.; Boddupally, P.V.L.; Behm-Ansmant, I.; Burley, G.A.; Branlant, C.; Hurley, L.H.; Dominguez, C.; Eperon, I.C. Specific G-Quadruplex Ligands Modulate the Alternative Splicing of Bcl-X. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 886–896.
36. Ghosh, A.; Stewart, D.; Matlashewski, G. Regulation of Human P53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 7987–7997,
37. Bartys, N.; Kierzek, R.; Lisowiec-Wachnicka, J. The Regulation Properties of RNA Secondary Structure in Alternative Splicing. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 194401
38. Lovci, M.T.; Ghanem, D.; Marr, H.; Arnold, J.; Gee, S.; Parra, M.; Liang, T.Y.; Stark, T.J.; Gehman, L.T.; Hoon, S.; et al. Rbfox Proteins Regulate Alternative mRNA Splicing through Evolutionarily Conserved RNA Bridges. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 1434–1442
39. Singh, N.N.; Lawler, M.N.; Ottesen, E.W.; Upreti, D.; Kaczynski, J.R.; Singh, R.N. An Intronic Structure Enabled by a Long-Distance Interaction Serves as a Novel Target for Splicing Correction in Spinal Muscular Atrophy. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 8144–8165.
40. Merkhofer, E.C.; Hu, P.; Johnson, T.L. Introduction to Cotranscriptional RNA Splicing. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1126*, 83–96.
41. Cramer, P.; Pesce, C.G.; Baralle, F.E.; Kornblihtt, A.R. Functional Association between Promoter Structure and Transcript Alternative Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11456–11460
42. De La Mata, M.; Kornblihtt, A.R. RNA Polymerase II C-Terminal Domain Mediates Regulation of Alternative Splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 973–980
43. Scotti, M.M.; Swanson, M.S. RNA Mis-Splicing in Disease. *Nat. Publ. Gr.* **2015**, *17*, 19–32
44. Karni, R.; Stanchina, E. de; Lowe, S.W.; Sinha, R.; Mu, D.; Krainer, A.R. The Gene Encoding the Splicing Factor SF2/ASF Is a Proto-Oncogene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 185–193
45. Anczuków, O.; Krainer, A.R. Splicing-Factor Alterations in Cancers. *RNA* **2016**,

- 22, 1285–1301
46. Ghigna, C.; Giordano, S.; Shen, H.; Benvenuto, F.; Castiglioni, F.; Comoglio, P.M.; Green, M.R.; Riva, S.; Biamonti, G. Cell Motility Is Controlled by SF2/ASF through Alternative Splicing of the Ron Protooncogene. *Mol. Cell* **2005**, *20*, 881–890
 47. Kurokawa, K.; Akaike, Y.; Masuda, K.; Kuwano, Y.; Nishida, K.; Yamagishi, N.; Kajita, K.; Tanahashi, T.; Rokutan, K. Downregulation of Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 3 Induces G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1407–1417
 48. Sen, S.; Langiewicz, M.; Jumaa, H.; Webster, N.J.G. Deletion of Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 3 in Hepatocytes Predisposes to Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Hepatology* **2015**, *61*, 171–183
 49. Clower, C. V.; Chatterjee, D.; Wang, Z.; Cantley, L.C. The Alternative Splicing Repressors HnRNP A1 / A2 and PTB Influence Pyruvate Kinase Isoform Expression and Cell Metabolism. **2010**, *107*
 50. Chen, Y.; Liu, J.; Wang, W.; Xiang, L.; Wang, J. High Expression of HnRNPA1 Promotes Cell Invasion by Inducing EMT in Gastric Cancer. *Oncol. Rep.* **2018**, 1693–1701,
 51. Golan-Gerstl, R.; Cohen, M.; Shilo, A.; Suh, S.S.; Bakacs, A.; Coppola, L.; Karni, R. Splicing Factor hnRNP A2/B1 Regulates Tumor Suppressor Gene Splicing and Is an Oncogenic Driver in Glioblastoma. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4464–4472.
 52. Denley, A.; Wallace, J.C.; Cosgrove, L.J.; Forbes, B.E. The Insulin Receptor Isoform Exon 11- (IR-A) in Cancer and Other Diseases: A Review. *Horm. Metab. Res.* **2003**, *35*, 778–785.
 53. Venables, J.P.; Klinck, R.; Koh, C.; Gervais-Bird, J.; Bramard, A.; Inkel, L.; Durand, M.; Couture, S.; Froehlich, U.; Lapointe, E.; et al. Cancer-Associated Regulation of Alternative Splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 670–676,
 54. Scotti, M.M.; Swanson, M.S. RNA Mis-Splicing in Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 19–32.
 55. Mazurek, S. Pyruvate Kinase Type M2 : A Key Regulator of the Metabolic Budget System in Tumor Cells. *Int. J. Biochem.* **2011**, *43*, 969–980,
 56. Israelsen, W.J.; Heiden, M.G. Vander Pyruvate Kinase: Function, Regulation and Role in Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *43*, 43–51,
 57. Noguchi, T.; Inoue, H.; Tanaka, T. The M1- and M2-Type Isozymes of Rat

- Pyruvate Kinase Are Produced from the Same Gene by Alternative RNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13807–13812.
58. Hsu, M.C.; Hung, W.C. Pyruvate Kinase M2 Fuels Multiple Aspects of Cancer Cells: From Cellular Metabolism, Transcriptional Regulation to Extracellular Signaling. *Mol. Cancer* 2018, *17*.
 59. David, C.J.; Chen, M.; Assanah, M.; Canoll, P.; Manley, J.L. hnRNP Proteins Controlled by C-Myc Deregulate Pyruvate Kinase mRNA Splicing in Cancer. *Nature* **2010**, *463*, 364–368.
 60. Chen, M.; David, C.J.; Manley, J.L. Concentration-Dependent Control of Pyruvate Kinase M Mutually Exclusive Splicing by hnRNP Proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 346–354
 61. Wang, Z.; Chatterjee, D.; Jeon, H.Y.; Akerman, M.; Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Krainer, A.R. Exon-Centric Regulation of Pyruvate Kinase M Alternative Splicing via Mutually Exclusive Exons. *J. Mol. Cell Biol.* **2012**, *4*, 79–87
 62. Wang, Z.; Jeon, H.Y.; Rigo, F.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Manipulation of PK-M Mutually Exclusive Alternative Splicing by Antisense Oligonucleotides. *Open Biol.* **2012**, *2*, 120133
 63. Guo, W.; Zhang, Z.; Li, G.; Lai, X.; Gu, R.; Xu, W.; Chen, H.; Xing, Z.; Chen, L.; Qian, J.; et al. Pyruvate Kinase M2 Promotes Prostate Cancer Metastasis Through Regulating ERK1/2-COX-2 Signaling. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 544288
 64. Xiao, H.; Zhang, L.; Chen, Y.; Zhou, C.; Wang, X.; Wang, D. PKM2 Promotes Breast Cancer Progression by Regulating Epithelial Mesenchymal Transition. **2020**, *2020*
 65. Hu, H.; Tu, W.; Chen, Y.; Zhu, M.; Jin, H.; Huang, T.; Zou, Z.; Xia, Q. The Combination of PKM2 Overexpression and M2 Macrophages Infiltration Confers a Poor Prognosis for PDAC Patients. *J Cancer.* **2022**, *11*, 2022-2031
 66. Zheng, B.; Wang, K. Overexpression of Pyruvate Kinase Type M2 (PKM2) Promotes Ovarian Cancer Cell Growth and Survival via Regulation of Cell Cycle Progression Related with Upregulated CCND1 and Downregulated CDKN1A Expression. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 3103–3112
 67. Zhang, Z.; Deng, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Sun, L.; Chen, F. PKM2 , Function and Expression and Regulation. *Cell Biosci.* **2019**, 1–25,
 68. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*

- 2011**, *144*, 646–674.
69. Li, Z.; Yang, P.; Li, Z. The Multifaceted Regulation and Functions of PKM2 in Tumor Progression. *BBA - Rev. Cancer* **2014**, *1846*, 285–296,
 70. Luo, W.; Semenza, G.L. Pyruvate Kinase M2 Regulates Glucose Metabolism by Functioning as a Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Cells. *Oncotarget* **2011**, *2*, 551–556
 71. Azoitei, N.; Becher, A.; Steinestel, K.; Rouhi, A.; Diepold, K.; Genze, F.; Simmet, T.; Seufferlein, T. PKM2 Promotes Tumor Angiogenesis by Regulating HIF-1 α through NF-KB Activation. *Mol. Cancer* **2016**, *15*
 72. Yu, P.; Li, A.-X.; Chen, X.-S.; Tian, M.; Wang, H.-Y.; Wang, X.-L.; Zhang, Y.; Wang, K.-S.; Cheng, Y. PKM2-c-Myc-Survivin Cascade Regulates the Cell Proliferation, Migration, and Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 550469
 73. Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L. Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 280–284
 74. Rigo, F.; Seth, P.P.; Bennett, C.F. Antisense Oligonucleotide-Based Therapies for Diseases Caused by pre-mRNA Processing Defects w *Systems Biology of RNA Binding Proteins. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: New York, 2014; pp. 303–352, ISBN 9781493912216.
 75. Dhuri, K.; Bechtold, C.; Quijano, E.; Pham, H.; Gupta, A.; Vikram, A.; Bahal, R. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2004.
 76. Havens, M.A.; Hastings, M.L. Splice-Switching Antisense Oligonucleotides as Therapeutic Drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016, *44*, 6549–6563.
 77. Shirley, M. Casimersen : First Approval. *Drugs* **2021**, *81*, 875–879,
 78. Stein, C.A.; Castanotto, D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1069–1075,
 79. Heo, Y.A. Golodirsen: First Approval. *Drugs* **2020**, *80*, 329–333.
 80. Strona Internetowa: <https://www.ema.europa.eu/en> (dostęp 20 czerwiec 2022).
 81. Duan, D.; Goemans, N.; Takeda, S.; Mercuri, E.; Aartsma-Rus, A. Duchenne Muscular Dystrophy. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 13
 82. Watanabe, N.; Nagata, T.; Satou, Y.; Masuda, S.; Saito, T.; Kitagawa, H.; Komaki, H.; Takagaki, K.; Takeda, S. NS-065/NCNP-01: An Antisense Oligonucleotide for

- Potential Treatment of Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2018**, *13*, 442–449
83. Brosseau, J.P.; Lucier, J.F.; Lamarche, A.A.; Shkreta, L.; Gendron, D.; Lapointe, E.; Thibault, P.; Paquet, É.; Perreault, J.P.; Elela, S.A.; Chabot B. Redirecting Splicing with Bifunctional Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e40
84. Skordis, L.A.; Dunkley, M.G.; Yue, B.; Eperon, I.C.; Muntoni, F. Bifunctional Antisense Oligonucleotides Provide a Trans-Acting Splicing Enhancer That Stimulates SMN2 Gene Expression in Patient Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4114–4119
85. Baughan, T.D.; Dickson, A.; Osman, E.Y.; Lorson, C.L. Delivery of Bifunctional RNAs That Target an Intronic Repressor and Increase SMN Levels in an Animal Model of Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 1600–1611,
86. Ghigna, C.; De Toledo, M.; Bonomi, S.; Valacca, C.; Gallo, S.; Apicella, M.; Eperon, I.; Tazi, J.; Biamonti, G. Pro-Metastatic Splicing of Ron Proto-Oncogene mRNA Can Be Reversed: Therapeutic Potential of Bifunctional Oligonucleotides and Indole Derivatives. *RNA Biol.* **2010**, *7*, 495–503
87. Villemaire, J.; Dion, I.; Elela, S.A.; Chabot, B. Reprogramming Alternative Pre-Messenger RNA Splicing through the Use of Protein-Binding Antisense Oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50031–50039,
88. Li, M.; Wang, D.; He, J.; Chen, L.; Li, H. Bcl-XL: A Multifunctional Anti-Apoptotic Protein. *Pharmacol. Res.* 2020, *151*: 104547
89. Gendron, D.; Carriero, S.; Garneau, D.; Villemaire, J.; Klinck, R.; Elela, S.A.; Damha, M.J.; Chabot, B. Modulation of 5' Splice Site Selection Using Tailed Oligonucleotides Carrying Splicing Signals. *BMC Biotechnol.* **2006**, *6*, 1–12,
90. Dickson, A.; Osman, E.; Lorson, C.L. A Negatively Acting Bifunctional RNA Increases Survival Motor Neuron Both in Vitro and in Vivo. *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 1307–1315
91. Burd, C.G.; Dreyfuss, G. RNA Binding Specificity of hnRNP A1: Significance of hnRNP A1 High-Affinity Binding Sites in Pre-mRNA Splicing. **1994**, *EMBO J.*, 1–8.
92. Hua, Y.; Vickers, T.A.; Okunola, H.L.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Antisense Masking of an hnRNP A1/A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 834–848,
93. Bruun, G.H.; Doktor, T.K.; Borch-Jensen, J.; Masuda, A.; Krainer, A.R.; Ohno,

- K.; Andresen, B.S. Global Identification of hnRNP A1 Binding Sites for SSO-Based Splicing Modulation. *BMC Biol.* **2016**, *14*:54
94. Hamilton, B.J.; Nagy, E.; Malter, J.S.; Arrick, B.A.; Rigby, W.F. Association of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 and C Proteins with Reiterated AUUUA Sequences. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8881–8887.
95. Morgan, C.E.; Meagher, J.L.; Levengood, J.D.; Delproposto, J.; Rollins, C.; Stuckey, J.A.; Tolbert, B.S. The First Crystal Structure of the UP1 Domain of hnRNP A1 Bound to RNA Reveals a New Look for an Old RNA Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 3241–3257,
96. De Conti, L.; Skoko, N.; Buratti, E.; Baralle, M. Complexities of 5' Splice Site Definition: Implications in Clinical Analyses. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 911–923,
97. Liu, X.; Ishizuka, T.; Bao, H.L.; Wada, K.; Takeda, Y.; Iida, K.; Nagasawa, K.; Yang, D.; Xu, Y. Structure-Dependent Binding of hnRNPA1 to Telomere RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7533–7539,
98. Cléry, A.; Sinha, R.; Anczuków, O.; Corrionero, A.; Moursy, A.; Daubner, G.M.; Valcárcel, J.; Krainer, A.R.; Allain, F.H.T. Isolated Pseudo-RNA-Recognition Motifs of SR Proteins Can Regulate Splicing Using a Noncanonical Mode of RNA Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*: E2802-E2811
99. Liu, H.X.; Zhang, M.; Krainer, A.R. Identification of Functional Exonic Splicing Enhancer Motifs Recognized by Individual SR Proteins. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1998–2012
100. Carriero, S.; Damha, M.J. Inhibition of Pre-mRNA Splicing by Synthetic Branched Nucleic Acids. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6157–6167,
101. Miao, Y.; Lu, M.; Yan, Q.; Li, S.; Feng, Y. Inhibition of Proliferation, Migration, and Invasion by Knockdown of Pyruvate Kinase-M2 (PKM2) in Ovarian Cancer SKOV3 and OVCAR3 Cells. *Oncol. Res.* **2016**, *24*, 463–475,.
102. Zijl, F. Van; Krupitza, G.; Mikulits, W. Mutation Research / Reviews in Mutation Research Initial Steps of Metastasis: Cell Invasion and Endothelial Transmigration. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2011**, *728*, 23–34,
103. Balcerak, A.; Wakuła, M.; Trębińska, A.; Grzybowska, E.A. Migracja i Inwazyjność Komórek Nowotworowych ; Rola Plastyczności Komórek i Udział Macierzy Zewnątrzkomórkowej w Tworzeniu Przerzutów. *Nowotwory. Journal of Oncology.* **2016**, *66*, 45–52,
104. Bozzuto, G.; Ruggieri, P.; Molinari, A. Molecular Aspects of Tumor Cell

- Migration and Invasion. *Ann. dell'Istituto Super. di Sanità* **2010**, *46*, 66–80.
105. Denichenko, P.; Mogilevsky, M.; Cléry, A.; Welte, T.; Biran, J.; Shimshon, O.; Barnabas, G.D.; Danan-Gotthold, M.; Kumar, S.; Yavin, E.; Levanon E.Y., Allain F.H., Geiger T., Levkowitz G., Karni R. Specific Inhibition of Splicing Factor Activity by Decoy RNA Oligonucleotides. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–15,
106. Zhou, K.I.; Shi, H.; Lyu, R.; Wylder, A.C.; Matuszek, Ž.; Pan, J.N.; He, C.; Parisien, M.; Pan, T. Regulation of Co-Transcriptional pre-mRNA Splicing by M6A through the Low-Complexity Protein nRNPG. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 70-81.e9.
107. Pasternak, A.; Wengel, J. Thermodynamics of RNA Duplexes Modified with Unlocked Nucleic Acid Nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6697–6706,
108. Kierzek, E.; Ciesielska, A.; Pasternak, K.; Mathews, D.H.; Turner, D.H.; Kierzek, R. The Influence of Locked Nucleic Acid Residues on the Thermodynamic Properties of 2'-O-Methyl RNA/RNA Heteroduplexes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5082–5093
109. Owczarzy, R.; You, Y.; Groth, C.L.; Tataurov, A. V. Stability and Mismatch Discrimination of Locked Nucleic Acid-DNA Duplexes. *Biochemistry* **2011**, *50*: 9352-9367
110. Campbell, M.A.; Wengel, J. Locked vs. Unlocked Nucleic Acids (LNA vs. UNA): Contrasting Structures Work towards Common Therapeutic Goals. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680–5689.
111. You, Y.; Moreira, B.G.; Behlke, M.A.; Owczarzy, R. Design of LNA Probes That Improve Mismatch Discrimination. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e60
112. Scharner, J.; Ma, W.K.; Zhang, Q.; Lin, K.T.; Rigo, F.; Frank Bennett, C.; Krainer, A.R. Hybridization-Mediated off-Target Effects of Splice-Switching Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 802–816,

Życiorys naukowy

Wykształcenie:

- | | |
|------------------|--|
| 2018 – aktualnie | Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie NanoBioTech
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN |
| 2015-2017 | Uniwersytet Łódzki

Studia magisterskie – biotechnologia medyczna
Tytuł pracy dyplomowej:
<i>„Określenie poziomu swoistych przeciwciał myszy szczepionych antygenami chimerycznymi Toxoplasma gondii”</i> |
| 2012-2015 | Uniwersytet Marie Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Studia licencjackie- biotechnologia
Tytuł pracy dyplomowej:
<i>„Wirusy onkolityczne w terapii nowotworów”</i> |

Opublikowane artykuły:

1. **Bartyś N.**, Pasternak A., Lisowiec-Wąchnicka J., Optimization of bifunctional antisense oligonucleotides for regulation of mutually exclusive alternative splicing of PKM gene. *Molecules*, 2022 27(11), 5682. IF: 4,927
2. **Bartyś N.**, Kierzek R, Lisowiec-Wachnicka J. The regulation properties of RNA secondary structure in alternative splicing. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019, 1862(11-12):19440. IF: 4,490
3. Lisowiec-Wąchnicka J, **Bartyś N.**, Pasternak A. A systematic study on the influence of thermodynamic asymmetry of 5'-ends of siRNA duplexes in relation to their silencing potency. *Sci Rep.* 2019, 9(1):2477. IF: 4,379

Udział w projektach jako wykonawca:

1. SONATA 11; Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe - optymalizacja w regulacji alternatywnego splicingu w nowotworowych liniach komórkowych, 2016/21/D/NZ5/01906
2. OPUS 19; Oligonukleotydy tworzące trypleksy jako nowe narzędzia do rozplatania struktury G-kwadrupleksu oraz selektywnej inhibicji transkrypcji onkogenu c-Myc, 2020/37/B/NZ7/02008

Staż naukowy:

1. wrzesień 2021 - grudzień 2021- Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Nowotworów;

Udział w konferencjach międzynarodowych:

1. XXIV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 28-31 sierpnia 2022, Sztokholm, Szwecja

Prezentacja plakatu: *Regulation of PKM gene mutually-exclusive alternative splicing by Bifunctional Antisense Oligonucleotides*

2. The NA World 3.0 – 20-22 czerwca 2022, Rzym, Włochy
3. 4th International Caparica Conference in Splicing, 26 – 29 lipca 2021, Caparica, Portugalia.

Prezentacja plakatu: *Modified nucleotides – impact on interactions between splicing factors and oligonucleotides*

Nagrody i wyróżnienia:

1. Stypendium naukowe ICHB PAN dla najlepszych doktorantów w roku 2018/2019.
2. Nagroda Dyrektora ICHB PAN za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w Instytucie w 2019 roku.
3. Brązowy Krzyż Zasługi przyznany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Andrzeja Dudę za zasługi w działalności naukowo-badawczej.