

Badania właściwości strukturalnych oraz fizykochemicznych G-kwadrupleksów potencjalnie związanych z aktywnością antyproliferacyjną

Streszczenie

Pomimo znacznego postępu w leczeniu wielu nowotworów, choroby te zajmują drugie miejsce na świecie pod względem umieralności. Wskazuje to na to konieczność rozwoju nowych podejść terapeutycznych i diagnostycznych oraz kontynuowania intensywnych badań nad czynnikami predysponującymi do powstawania nowotworów.

G-kwadrupleksy to struktury DNA lub RNA tworzone przez sekwencje bogate w guanozynę. Zdolność tworzenia tetramerycznych struktur przez te związki jest znana od 1962 roku, jednak dopiero w ciągu ostatnich dwóch dekad zaczęto rozważać możliwość ich wykorzystania w celach terapeutycznych. Struktury te stanowią obiecujące narzędzia molekularne, które mogą być nacelowane na różnorodne ligandy o znaczeniu biologicznym. Ponadto, G-kwadrupleksy mają stosunkowo małe rozmiary, mogą być łatwo modyfikowane chemicznie i wykazują wysoką stabilność. Można je również produkować w dużej skali w sposób ekonomiczny i są relatywnie łatwo wchłaniane przez komórki, wykazując przy tym świetną odporność na nukleazy, co czyni je również użytecznymi i ukierunkowanymi transporterami.

Głównym celem moich badań było określenie cech strukturalnych oraz fizykochemicznych właściwości różnorodnych G-kwadrupleksów i skorelowanie ich z biologicznym potencjałem badanych cząsteczek, jako czynników przeciwnowotworowych.

W celu poznania najnowszych postępów związanych z narzędziami molekularnymi opartymi na G-kwadrupleksach wykonaliśmy badania przeglądowe skupiające się na aptamerach tworzących struktury G-kwadrupleksów i ich potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych oraz diagnostycznych. Zauważyliśmy, że tworzenie struktur G-kwadrupleksów jest niezbędne do skutecznego hamowania proliferacji komórek nowotworowych, jednak brakuje informacji na temat korelacji między ich elementami strukturalnymi a

potencjalnymi właściwościami przeciwnowotworowymi. Mając to na uwadze przeprowadziliśmy badania eksperymentalne, które doprowadziły do analizy potencjalnej korelacji pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi G-kwadrupleksów, ich elementami strukturalnymi oraz potencjałem terapeutycznym. Badania rozpoczęliśmy od wybrania pięciu sekwencyjnie spokrewnionych cząsteczek DNA tworzących G-kwadrupleksy, analizy ich właściwości termodynamicznych oraz strukturalnych, jak również ich stabilności enzymatycznej oraz transportu przez błonę komórkową. Do dalszych badań wybraliśmy trzy sekwencje, które wykazywały najlepszy potencjał antyproliferacyjny. Przeanalizowaliśmy wpływ modyfikowanych reszt nukleotydowych (LNA, UNA, oraz 2'-O-metylo-RNA) na właściwości strukturalne, fizykochemiczne oraz biologiczne G-kwadrupleksów. W tym celu modyfikacje zostały wprowadzone w wybrane pozycje pętli oraz rdzeni G-kwadrupleksów, w rezultacie dając dwadzieścia siedem modyfikowanych wariantów. W celu lepszego zrozumienia korelacji pomiędzy strukturą G-kwadrupleksu a jego chemicznym charakterem wykonaliśmy również trzeci rodzaj badań. Obejmował on analizę puli sekwencyjnie spokrewnionych G-kwadrupleksów RNA oraz porównanie ich właściwości do G-kwadrupleksów DNA o tej samej sekwencji i umożliwił skorelowanie struktury, trwałości termodynamicznej oraz aktywności biologicznej powyższych cząsteczek. Badane G-kwadrupleksy różniły się nieznacznie długością pętli, ilością G-tetrad oraz jednorodnością rdzenia, umożliwiając znalezienie strukturalno-funkcjonalnych zależności, które mogą okazać się pomocne w opracowaniu potencjalnych związków przeciwnowotworowych.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej sugerują, że elementy strukturalne G-kwadrupleksów są niezbędne dla ich aktywności biologicznej oraz że niewielkie zmiany w sekwencji mogą przyczynić się do zmian w ich właściwościach. G-kwadrupleksy zbudowane z krótszych rdzeni i dłuższych pętli bardziej efektywnie hamowały wzrost komórek nowotworowych, a także lepiej wiązały się z nukleoliną. Natomiast, efektywność wnikania oligonukleotydów do komórek oraz ich trwałość enzymatyczna są ściśle związane z ich charakterystyką termodynamiczną, wskazując preferencje względem cząsteczek ustrukturalizowanych, posiadających wydłużony rdzeń oraz krótsze pętle. Modyfikacje UNA okazały się wydajnymi modulatorami stabilności termodynamicznej G-kwadrupleksów, ale nie wykazały potencjału do poprawy ich właściwości przeciwnowotworowych. W odróżnieniu od G-kwadrupleksów modyfikowanych resztami UNA, warianty posiadające reszty LNA oraz 2'-O-Me-RNA

wykazały pewien potencjał antyproliferacyjny. Ponadto, G-kwadrupeksy w serii DNA okazały się lepszymi inhibitorami wzrostu komórek nowotworowych w porównaniu z G-kwadrupeksami w serii RNA.

Zrozumienie cech strukturalnych G-kwadrupeksów i ich roli w inhibicji wzrostu komórek może ułatwić projektowanie nowych, obiecujących leków opartych na strukturze G-kwadrupeksów o wyjątkowych właściwościach przeciwnowotworowych.