Marta Magdalena Gabryelska

# Wewnątrzcząsteczkowe determinanty aktywności rybozymów

Poznań 2012

# Praca wykonana w Samodzielnym Zespole Epigenetyki Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Promotor:

Prof. nadzw. dr hab. Eliza Wyszko

Praca przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii.

### PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy

Pani Prof. nadzw. Dr hab. Elizie Wyszko składam podziękowania za opiekę naukową, przekazaną wiedzę i wszechstronną pomoc, oraz wiarę w moje możliwości

Panu Prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu Dziękuję za cenne uwagi merytoryczne, wzbogacające dyskusje naukowe i codzienną motywację do pracy

Panu dr Mariuszowi Popendzie Dziękuję za wprowadzenie w tajniki modelowania struktur cząsteczek RNA oraz pomoc w analizie danych

Współpracownikom z:

Samodzielnego Zespołu Epigenetyki Zespołu Kwasów Nukleinowych Zespołu Biosyntezy Białka

Dziękuję za wspaniałą ciepłą atmosferę oraz okazaną pomoc

Pracę dedykuję Mojej Rodzinie

# SPIS TREŚCI

		Strona
1.	WPROWADZENIE I CEL PRACY	8
2.	WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	12
3.	OPRACOWANIE LITERATUROWE	15
	3.1. Hierarchiczna budowa katalitycznych cząsteczek RNA	15
	3.1.1. Elementy struktury RNA	16
	3.1.2. Metody analizy struktury RNA	21
	3.1.3. Zwijanie RNA	27
	3.1.4. Oddziaływania dalekiego zasięgu i allosteria RNA	31
	3.2. Katalityczne kwasy nukleinowe	36
	3.2.1. Rybozym typu hammerhead	36
	3.2.2. Porównanie rybozymu minimalnego z wydłużonym	39
	3.2.3. Reakcja transestryfikacji	43
	3.2.4. DNAzym typu 10-23	45
	3.3. Charakterystyka wybranych elementów struktury drugorzędowej związanych z	47
	katalitycznymi RNA	
	3.3.1. Czteronukleotydowe petle i ich receptory	47
	3.3.2. Motyw połaczenia trzech helis	48
	3.3.3. Motywy stabilizujące strukture trzeciorzedowa rybozymów	48
	3.4. Wewnatrzkomórkowe czynniki determinujące aktywność rybozymów	50
	3.4.1. Jony metali	50
	3.4.2. Stłoczenie czasteczkowe	53
	3.4.3. Białka opiekuńcze RNA	54
4.	WYNIKI I DYSKUSJA BADAŃ WŁASNYCH	57
	4.1. Opracowanie nowych rybozymów typu hammerhead	57
	4.1.1. Selekcja genów docelowych dla rybozymów	58
	4.1.2. Dostepność sekwencji 5'-GUC-3' w obrebie mRNA GFP. DNMT1. GLI1.	60
	CRYAB	
	4.1.2.1. Wybór miejsca docelowego mRNA	60
	4 1 2 2. Charakterystyka struktury drugorzedowej substratu	62
	4 1 2 3 Porównanie 16-nukleotydowych miejsc docelowych dla rybozymów w	
	obrebie mRNA	64
	4.1.3. Projektowanie rybozymów hammerhead obniżających poziom ekspresij	64
	genu GFP	
	4.1.4. Projektowanie rybozymów hammerhead obniżających poziom ekspresij	68
	genu DNMT1	70
	4.2 Aktywność <i>in vitro</i> rybozymów HHgfn oraz HHdnmt	70
	4.2.1 Optymalizacia warunków reakcii	72
	4.2.2. Parametry kinetyczne rybozymów HHofn oraz HHdnmt	73
	4.2.3. Tworzenie kompleksów rybozymów z substratami	75
	4.3 Aktywność rybozymów HHofn oraz HHdnmt w ludzkich liniach	76
	komórkowych	77
	4.3.1. Zmiany poziomu fluorescencii komórek w obecności rybozymów HHafp	
	4.3.2 Obniżanie noziomu mRNA oraz białka nod wnowem rybozymów	77
	4.3.2.1 Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimeryzacji do określenia zmian	
	noziomu mRNA GFP	78

	4.3.2.2. Zastosowanie ilościowego PCR w czasie rzeczywistym do określenia	
	zmian poziomu mRNA pod wpływem rybozymów	82
	4.3.2.3. Wykorzystanie metody Western Blot do określenia zmian poziomu	
	białka pod wpływem rybozymów	84
	4.3.2.4. Zastosowanie metody RPA do określenia zmian poziomu mRNA pod	85
	wpływem rybozymu HHgfp-5	
	4.4. Określenie struktury drugorzędowej rybozymów	85
	4.4.1. Zastosowanie metody chemicznej i enzymatycznej do analizy struktur	88
	drugorzędowych rybozymów HHgfp oraz HHdnmt	
	4.4.2. Właściwości katalityczne rybozymów HHgfp-5 oraz HHgfp-5 <sup>MUT3</sup> w	89
	reakcji z substratami o różnej długości	90
	4.4.3. Zaproponowanie struktury dla nowego rybozymu HH-5N	92
	4.5. Projektowanie rybozymów HH-5N wobec mRNA genów GLI1 oraz CRYAB	92
	4.6. Właściwości rybozymów HH-5N	
	4.6.1. Reakcja transestryfikacji <i>in vitro</i>	94
	4.6.2. Zastosowanie metody chemicznej i enzymatycznej do analizy struktur	
	drugorzędowych rybozymów HHgli oraz HHcry	97
	4.6.3. Obniżanie poziomu ekspresji genów GLI1 oraz CRYAB linii komórkowej	98
	U118 pod wpływem rybozymów	100
	4.6.4. Porównanie właściwości katalitycznych rybozymów	101
	4.7. Modelowanie struktur trzeciorzędowych rybozymów w kompleksie z	104
	substratami	105
	4.7.1. Uzyskanie tzw. "odcisku palca" rybozymów hammerhead	108
	4.7.2. Parametry geometryczne rybozymu hammerhead ("odcisk palca")	113
	4.7.1. Geometria cząsteczek HHgfp	114
	4.7.3. Geometria cząsteczek HH-0, HH-5	118
	4.7.4. Geometria rybozymów HHdnmt	118
	4.7.5. Korelacja parametrów geometrycznych i wyników eksperymentalnych	119
	4.8. Analiza <i>in silico</i> rybozymów typu hammerhead opisanych w literaturze	120
	4.8.1. Kryteria selekcji	121
	4.8.2. Rybozymy minimalne MRE763C oraz MRE764U	122
	4.8.3. Rybozym skrócony oraz wydłużony przeciwko mRNA gp41 wirusa HIV	123
	4.8.4. Rybozymy Rz420 oraz Rz1584 aktywne wobec mRNA E6AP	124
	4.8.5. Rybozym minimalny oraz skrócone przeciwko BCR-ABL	125
	4.8.6. Dwa rybozymy minimalne Rz161 oraz Rz212 aktywne wobec mRNA	
	MGMT	
	4.8.7. Korelacja wyników ekeperymentalnych oraz in silico	
	4.8.8. Odstępstwa od reguły D1/D2	
5.	PODSUMOWANIE	129
6.	MATERIAŁY I METODY	131
	6.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy	131
	6.1.1. Ważniejsze odczynniki, enzymy oraz zestawy gotowych odczynników	131
	6.1.2. Oligodeoksyrybonukleotydy, oligorybonukleotydy	132
	6.1.3. Wektory ekspresyjne	135
	6.2. Materiał biologiczny	136
	6.2.1. Szczepy bakteryjne	136
	6.2.2. Linie komórkowe	136
	6.2.3. Przeciwciała	136

6.3. Pożywki i bufory	137
6.4. Metody rozdziału i analizy kwasów nukleinowych	139
6.4.1. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	139
6.4.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym	140
6.4.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworach	140
6.4.4. Oczyszczanie RNA na żelu poliakrylamidowym	141
6.5. Metody rozdziału i analizy białek	141
6.6. Analiza właściwości katalitycznych rybozymów	142
6.6.1. Transestryfikacja substratu RNA w obecności rybozymów	142
6.6.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych	142
6.6.3. Znakowanie RNA przy końcu 5'	143
6.6.4. Hydroliza enzymatyczna RNA	144
6.6.5. Hydroliza chemiczna RNA z udziałem jonów ołowiu	145
6.6.6. Analiza tworzenia kompleksów rybozymów z substratem T16	145
6.7. Analiza ekspresji genów	145
6.7.1. Hodowla linii komórkowych	145
6.7.2. Transfekcja komórek	146
6.7.3. Analiza Western Blot	146
6.7.4. Izolacja całkowitego RNA	147
6.7.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	147
6.7.6. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR)	148
6.7.7. Oczyszczanie produktów PCR	149
6.7.8. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) w czasie rzeczywistym	149
6.7.9. Analiza RPA	150
6.8. Izolacja plazmidu pEGFP-N3 w dużej skali	152
6.9. Transkrypcja in vitro	152
6.10. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA przy pomocy metod	152
bioinformatycznych	
6.11. Modelowanie struktur trzeciorzędowych rybozymów w kompleksie z	153
substratami	153
6.12. Analiza statystyczna danych	
7. BIBLIOGRAFIA	154

### **1. WPROWADZENIE I CEL PRACY**

U podstaw funkcji kwasów nukleinowych leżą precyzyjne i specyficzne relacje sekwencji i struktury. Warunkują one swoiste oddziaływania z cząsteczkami RNA, małymi ligandami, czy białkami. Katalityczne RNA (tzw. rybozymy, RNAzymy) charakteryzują się obecnością specyficznych wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań trzeciorzędowych. Mogą katalizować transestryfikację RNA, powstawanie i rozkład wiązań P-O, C-C oraz wielu innych. Przebiegają one bez bezpośredniego udziału dodatkowych czynników białkowych w przebiegu reakcji.

Rozpoznawanie sekwencji docelowej przez kwasy nukleinowe na zasadzie komplementarności sprawia, że stanowią one obecnie obiekt intensywnych badań jako potencjalne czynniki mogące znaleźć zastosowanie w terapii genowej nowotworów [Mulhbacher i in. 2010]. Rybozym o strukturze głowy młotka (ang. hammerhead, HHRz) jest najmniejszym katalitycznym RNA pochodzenia naturalnego. Ze względu na niewielkie rozmiary i dużą aktywność od 25 lat stanowi dobry model do badań relacji struktury i funkcji RNA. Zidentyfikowano go w genomach wielu organizmów w tym u człowieka, co czyni go najczęściej występującym motywem autokatalitycznym w przyrodzie. Mechanizm reakcji transestryfikacji uwarunkowany jest odpowiednią aranżacją atomów centrum katalitycznego. Jego aktywność zależy od obecności dodatkowych elementów strukturalnych i różni się w minimalnym rybozymie hammerhead oraz jego wydłużonych wariantach. Projektowane są ich nowe pochodne o zwiększonej aktywności, które mogą zostać wykorzystane w biologii i medycynie molekularnej. Mimo rozległej wiedzy na temat jego budowy, dynamiki konformacyjnej oraz wpływu trzeciorzędowych motywów stabilizujących, wiele pytań dotyczących relacji sekwencji, struktury i funkcji pozostaje bez odpowiedzi.

Duże zainteresowanie budzi proces interferencji RNA [Bora i in. 2012]. Jednakże, pomimo, że siRNA mogą być efektywnymi czynnikami inaktywacji genów w stosunku do większości RNA cytoplazmatycznych, nie są aktywne względem RNA zlokalizowanych w jądrze komórkowym, mitochondriach czy chloroplastach. Ponadto, niektóre wirusy wykształciły mechanizmy obronne przed RNAi. Technologia ta nie jest też wolna od niespecyficznych efektów ubocznych (ang. off-target effects). W tym kontekście, bardzo atrakcyjną alternatywę stanowią nadal cząsteczki małych katalitycznych RNA, a w szczególności rybozymy typu hammerhead.

Celem moich badań było wyselekcjonowanie nowego wydłużonego rybozymu typu hammerhead wysoce aktywnego w obniżaniu ekspresji docelowych genów w ludzkich liniach komórkowych oraz określenie wewnątrzcząsteczkowych determinantów warunkujących jego właściwości.

W pracy podjęłam próbę wyjaśnienia aspektów strukturalno-funkcjonalnych istotnych dla mechanizmu transestryfikacji RNA z udziałem rybozymu hammerhead jako modelu w oparciu o zaproponowaną przez siebie hipotezę kompensacji parametrów rdzenia katalitycznego.

Założone cele realizowałam w następujących etapach:

- Zaprojektowałam rybozymy typu hammerhead przeprowadzające transestryfikację mRNA genów GFP oraz DNMT1
- Przeanalizowałam aktywność zaprojektowanych rybozymów *in vitro* oraz w liniach komórkowych
- Przeprowadziłam weryfikację struktury drugorzędowej rybozymów
- Wyselekcjonowany wariant rybozymu zastosowałam do obniżania poziomu ekspresji dwóch genów docelowych GLI1 oraz CRYAB
- Przeprowadziłam symulacje komputerowe oraz analizy obliczeniowe rybozymów w kompleksie z substratami

Istotnym osiągnięciem tej pracy jest zaproponowanie nowego wariantu wydłużonego rybozymu hammerhead oraz opracowanie metody przewidywania wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów w oparciu o hipotezę kompensacji parametrów rdzenia katalitycznego. Szersze rozpatrywanie zagadnienia zależności struktury i funkcji oraz wzbogacenie jej o badanie wpływu elementu sekwencji i oparcie w metodach obliczeniowych umożliwia powrót do badań nad rybozymami w odświeżonym kontekście. Zaproponowana metoda obliczeniowa stanowi pierwsze podejście *in silico* do przewidywania wewnątrzkomórkowej aktywności RNA. Może ona znaleźć szerokie zastosowanie do projektowania innych RNA o sprecyzowanej funkcji.

Wyniki były prezentowane w formie wystąpienia ustnego na Polsko-Niemieckiej Konferencji Biochemicznej połączonej z 47 zjazdem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Poznaniu w dniach 11-14 wrzesień 2012. Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy zostało zawartych w publikacjach:

- Gabryelska MM, Szymański M, Wyszko E, Popenda P, Barciszewski J (2012) Prediction of hammerhead ribozyme intracellular activity with the catalytic core parameters fingerprint. Manuskrypt wysłany, czerwiec 2012.
- Dietrich A, Rolle K, Gabryelska MM, Wyszko E, Val R, Szymanski M, Valentin C, Cosset A, Barciszewski J (2012) RNA technologies for mitochondrial genetics. From nucleic acids sequences to molecular medicine. Editors: Erdmann VA, Barciszewski J; 313-356.
- Gabryelska MM, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E, Barciszewski J (2012) Architektura funkcjonalna rybozymu hammerhead. Postępy Biochemii. Manuskrypt wysłany, wrzesień 2012.

Zagadnienia związane z kwasami nukleinowymi oraz wyciszaniem ekspresji genów były również omówione w publikacjach:

- Gabryelska MM, Barciszewski J (2011) Odyseja 1961: 50 lat kodu genetycznego. Nauka 3/2011, 77-88.
- Gabryelska MM, Szymański M, Barciszewski J (2009) DNA: od Mieschera do Ventera i dalej. Postępy Biochemii, 55/3, 342-354.
- Gabryelska MM, Szymański M, Barciszewski J (2009) DNA cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. Nauka 2/2009, 111-134.
- Gabryelska M, Rolle K, Wyszko E, Szymański M, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2008) Kontrola rozwoju, funkcji i patogenezy układu nerwowego z udziałem ncRNA. Na pograniczu chemii i biologii Tom XX, 41-75.
- Gabryelska M, Szymański M, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2008) Regulatorowe RNA w mózgu. Nauka 2/2008, 95-114.
- Rolle K, Gabryelska M, Wyszko E, Szymański M, Barciszewska MZ, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2008) Niekodujące RNA w centralnym układzie nerwowym ssaków. Neuroskop 10: 96-105.

- Gabryelska M, Wyszko E, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2007) Rola czynnika transkrypcyjnego Gli1 w ontogenezie i nowotworzeniu. Na pograniczu chemii i biologii Tom XVII, 49-75.
- Gabryelska M, Wyszko E, Szymański M, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2006) Potencjał terapeutyczny interferencji RNA. Na pograniczu chemii i biologii Tom XIV: 65-97.
- Gabryelska M, Wyszko E, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2006) Zastosowanie technologii interferencji RNA w medycynie. Neuroskop 8: 143-159.
- Gabryelska M, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2005) Uniwersalna metoda inhibicji ekspresji genów – interferencja RNA. Na pograniczu chemii i biologii Tom XII: 235-267.
- Gabryelska M, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2005) Interferencja RNA nowa technologia w leczeniu nowotworów. Neuroskop 7: 27-38.

# 2. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AA	-	aminokwas
ACTB	-	beta aktyna
APS	-	nadsiarczan amonu
ATP	-	5' trifosforan adenozyny
BrEt	-	bromek etydyny
CFPS	-	system translacji w środowisku pozakomórkowym (ang. cell-free protein
		synthesis)
CFQ	-	ang. charge flow and quenching
CLLM	-	(ang. conditional log-linear model)
CMCT	-	1-cyclohexyl-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluene sulfonate
СТР	-	5' trifosforan cytydyny
D1	-	odległość G12(N1)-C17(2'O)
D2	-	odległość G8(2'O)-C1.1(5'O)
D3	-	odległość G5(N1)-C1.1(5'O)
DEPC	-	eter dietylowy kwasu pirowęglowego
DMS	-	siarczek dimetylu
DNMT1	-	metylotransferaza 1 DNA
DNMT2	-	metylotransferaza 2 DNA
DNMT3A	-	metylotransferaza 3A DNA
DNMT3B	-	metylotransferaza 3B DNA
dNTP	-	5' trifosforan nukleotydu
DTT	-	ditiotreitol
EDTA	-	wersenian dwusodowy
FBS	-	płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum)
FGF-2	-	czynnik wzrostu fibroblastów 2 (fibroblast growth factor 2)
FMN	-	mononukleotyd flawinowo-adeninowy
FRET	-	transfer energii rezonansu fluorescencji (ang. fluorescence resonance energy
		transfer)
GAPDH	-	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego
GBM	-	wielopostaciowy glejak zarodkowy (łac. glioblastoma multiforme)
GFP	-	białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein)
Gli1	-	czynnik transkrypcyjny związany z gliomą (ang. glioma-associated oncogene 1)

Gli1ΔN	-	wariant białka GLI1 z delecja przy końcu N		
GTP	-	5' trifosforan guanozyny		
HCV	-	wirus zapalenia wątroby typu C (ang. hepatitis C virus)		
HDV	-	wirus zapalenia wątroby typu D (ang. hepatitis D virus)		
HHRz	-	rybozym typu hammerhead (ang. hammerhead ribozyme)		
$HHRz^{M}$	-	minimalny rybozym typu hammerhead (ang. minimal hammerhead ribozyme)		
$HHRz^W$	-	wydłużony rybozym typu hammerhead (ang. extended or full-length		
		hammerhead ribozyme)		
HPRT	-	fosforybozylotransferaza hipoksantynowa		
IRES	-	wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. internal ribosome entry site)		
K <sub>cat</sub>	-	stała szybkości katalizy		
KCl	-	chlorek potasu		
kDa	-	kilodalton, 1000 daltonów		
K <sub>m</sub>	-	stała Michaelisa		
$\mathbf{k}_{obs}$	-	obserwowana stała szybkości reakcji		
m.cz.	-	masa cząsteczkowa		
MFE	-	minimalna energia swobodna (ang. minima free energy)		
MgCl <sub>2</sub>	-	chlorek magnezu		
min	-	minuta		
mRNA	-	informacyjny RNA (ang. messenger RNA)		
NaCl	-	chlorek sodu		
NAIM	-	mapowanie miejsc interferencji analogów nukleotydów (ang. nucleotide analog		
		interference mapping)		
ncRNA	-	niekodujący RNA (ang. non-coding RNA)		
NGF- $\beta$	-	czynnik wzrostu nerwów beta (ang. nerve growth factor $\beta$ )		
NMR	-	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. nuclear magnetic resonance)		
nt	-	nukleotyd		
obj.	-	objętość		
OD	-	gęstość optyczna		
ON	-	oligonukleotyd		
PAA	-	poliakrylamid, akrylamid-N,N'-metylenobisakrylamid		
PEG	-	glikol polietylenowy		
PCR	-	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)		
PDB	-	baza danych struktur białkowych (ang. protein data bank)		
pz	-	para zasad		
qPCR	-	ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR)		

RNAi	-	interferencja RNA (ang. RNA interference)
RPA	-	ang. RNase protection assay
rpm	-	liczba obrotów na minutę
RT	-	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. reverse transcription)
S	-	sekunda
SANS	-	ang. small angle neutron scattering
SAXS	-	ang. small angle X-ray scattering
SDS	-	dodecylosiarczan sodu
SDSL	-	ang. site-directed spin labeling
SEA	-	aranżacja elementów strukturalnych (ang. structure elements arrangement)
SHAPE	-	selektywna acylacja grup 2'hydroksylowych analizowana techniką wydłużania
		startera (ang. selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)
siRNA	-	krótkie interferencyjne RNA (ang. short interfering RNA)
Smα	-	Schistosoma mansoni alpha
ssRNA	-	jednoniciowy RNA (ang. single-stranded RNA)
sTRSV	-	satelitarny RNA wirusa pierścieniowej plamistości tytoniu (ang. satellite RNA
		of tobacco ringspot virus)
TEMED	-	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
tGLI	-	wariant białka GLI1 skrócony o 48 aminokwasów
TL	-	czteronukleotydowa pętla (ang. tetraloop)
TLR	-	receptor czteronukleotydowej pętli (ang. tetraloop receptor)
Tris	-	hydroksymetyloaminometan
tRNA	-	transportujący RNA
tRNA <sup>fMet</sup>	-	tRNA N-formylometioninowy
$tRNA_i^{Met}$	-	tRNA inicjatorowy
TSM	-	motyw stabilizujący strukturę trzeciorzędową (ang. tertiary stabilizing motif)
u	-	jednostka aktywności enzymatycznej
UTP	-	5' trifosforan urydyny
UTR	-	region nie ulegający translacji
VEGF	-	czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)
α	-	kąt C1.1(5'O)-C17(2'O)-P
β	-	kąt C17(2'O)-G12(N1)-P
γ	-	kąt C1.1(5'O)-G8(2'O)-P

## **3. OPRACOWANIE LITERATUROWE**

#### 3.1. Hierarchiczna budowa katalitycznych cząsteczek RNA

Organizacja RNA wynika z hierarchicznej natury struktury. Sekwencja nukleotydów (zwana też strukturą pierwszorzędową) warunkuje strukturę drugorzędową oraz trzeciorzędową, definiowane przez zróżnicowane oddziaływania wybrzuszeń, helis, pętli oraz elementów łączących (Rys. 3.1). Determinują one funkcje oraz oddziaływanie z ligandami. Cztery nukleotydy RNA cechuje niska chemiczna różnorodność w porównaniu do 21 aminokwasów budujących białka. Jednocześnie jednak umożliwia to elastyczność zmian konformacyjnych, czyniąc z RNA wysoce funkcjonalny biopolimer [Schultes i Bartel 2000].

Geometria łańcucha fosforanowo-cukrowego opisana jest za pomocą 11 torsyjnych stopni swobody w porównaniu do 2 charakteryzujących łańcuch w peptydach [Laing i Schlick 2011]. Względna stabilność estrów fosforanowych oraz ich chemiczna elastyczność są uznawane za przyczyny, dla których w toku ewolucji zostały one wybrane do budowania cząsteczek odpowiedzialnych za przechowywanie i transfer informacji genetycznej [Emillson i in. 2003].

Poza analizą transkryptomu, obejmującą badanie sekwencji i poziomów ekspresji RNA, nowe narzędzia biologii molekularnej (takie jak technika SHAPE – ang. selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension czy FRET - ang. fluorescence resonance energy transfer) i bioinformatyki pozwalają na odkrywanie tzw. "strukturomu RNA" [Wan i in. 2011]. Wśród czynników ograniczających przewidywanie struktury RNA wymienia się: i) niekompletność reguł termodynamicznych; ii) przyjmowanie przez niektóre RNA struktur drugorzędowych, częściowo zależne od kinetyki zwijania; iii) wykorzystywanie przybliżeń przez algorytmy przewidywania struktur; iv) możliwość zwijania się niektórych RNA w więcej niż jedną strukturę [Mathews i Turner 2006]. Różnorodne możliwości upakowania RNA, elementy struktury drugorzędowej oraz 46 możliwych konformacji nukleotydów stanowi ogromne wyzwanie dla biologii obliczeniowej.

Przyjmowanie struktury drugorzędowej przez RNA jest opisane za pomocą ogólnie akceptowanych reguł termodynamicznych, ale relacja struktury drugorzędowej z całkowitą konformacją struktury trzeciorzędowej pozostaje nadal słabo zrozumiana [Bailor i in. 2010]. Wyzwanie dla biologii molekularnej stanowi projektowanie cząsteczek *in silico* o sprecyzowanej strukturze i funkcji. Większość współczesnych strategii angażuje metody

selekcji *in vitro* i/lub *in vivo*. Jednym z interesujących podejść biologii kwasów nukleinowych jest tzw. tektonika RNA. Polega ona na projektowaniu modułowych jednostek RNA (tektoRNA), które mogą zostać zaprogramowane do wzajemnego składania w nowe nano- i mezoskopowe konstrukty o zadanym rozmiarze i kształcie [Horiya i in. 2003, Nasalean i in. 2006]. Strategia ta wywodzi się od poglądu, że cząsteczki o zdefiniowanych kształtach i funkcjach można projektować w oparciu o łączenie jednostek strukturalnych [Westhof i in. 1996].



Rys. 3.1. Niektóre elementy struktury drugorzędowej RNA. (a) odcinek jednoniciowy, (b) helisa, (c) struktura typu spinka do włosów, (d) jednoniciowe końce 3', (e) jednoniciowe końce 5', (f) niesymetryczne wybrzuszenie obustronne, (g) wybrzuszenie jednostronne, (h) symetryczne wybrzuszenie obustronne, (i) kontakt pętli z wybrzuszeniem (ang. hairpin loop-bulge contact), (j) kontakt dwóch struktur typu spinka do włosów (ang. kissing hairpins), (k) pseudowęzeł (ang. pseudoknot), (l) połączenie trzech helis (ang. three-way junction), (l) połączenie czterech helis (ang. four-way junction).

#### 3.1.1. Elementy struktury RNA

Ilość potencjalnych konformacji nukleotydów zaangażowanych w tworzenie par zasad w helisie jest zdeterminowana przez ograniczoną liczbę możliwych wiązań wodorowych oraz oddziaływań warstwowych [Hermann i Patel 2000]. Nukleotydy w odcinkach jednoniciowych i niesparowanych elementach struktury drugorzędowej mają więcej możliwości aranżacji w przestrzeni. Ich konformacja zależy od strukturalnego kontekstu oraz wzajemnego wpływu reszt niesparowanych oraz par zasad w helisie [Hermann i Patel 2000].

Geometria elementów jednoniciowych jest w dużej mierze zależna od oddziaływań warstwowych helis zamykających. Oddziaływania warstwowe wpływają na stabilność RNA

poprzez ograniczanie ekspozycji hydrofobowych powierzchni zasad do polarnego rozpuszczalnika [Hermann i Patel 2000]. Niesparowane nukleotydy mogą uczestniczyć w oddziaływaniu warstwowym z helisą lub zostać wypchnięte w kierunku roztworu. Zginanie łańcucha fosforanowo-cukrowego związane z obecnością fragmentów niesparowanych, takich jak wybrzuszenia, może prowadzić do zbliżenia ujemnie naładowanych reszt fosforanowych. W ten sposób powstają miejsca wiązania jonów metali oraz rozpoznawania ligandów, a niektóre pary zasad budujące helisę stają się bardziej dostępne do oddziaływań [Herman i Westhof 1998].

Charakter oddziaływań między nukleotydami w RNA można łatwo obserwować dzięki nowej aplikacji EteRNA (http://eterna.cmu.edu) [Dunning 2012]. Program umożliwia dopasowywanie sekwencji do wybranej struktury drugorzędowej. Można w ten sposób obserwować globalne zmiany w strukturze cząsteczki spowodowane lokalną zmianą nawet pojedynczego nukleotydu.

Oddziaływania RNA-RNA zachodzą poprzez tworzenie par zasad typu Watsona-Cricka (AU, GC, GU Wooble) oraz specyficzne oddziaływania niekanoniczne, które można uporządkować w 12 rodzin geometrycznych w zależności od orientacji wiązania glikozydowego (*cis* lub *trans*), oddziałujących krawędzi zasad (płaszczyzna typu Watson-Crick, Hoogsteen lub ryboza, ang. sugar-edge), lokalnej orientacji nici (równoległa, antyrównoległa) oraz 10 typów interakcji zasady z resztą fosforanową RNA (Tab. 3.1) [Leontis i Westhof 2001, Leontis i in. 2002, Laing i Schlick 2011]. Większość zasad w pętlach tworzy niekanoniczne wiązania wodorowe, co pozwala na utworzenie specyficznych motywów (Rys. 3.2) [Leontis i in. 2006].

Motywy RNA to powtarzające się elementy strukturalne zawierające wiele międzycząsteczkowych oddziaływań RNA-RNA (Rys. 3.2) [Leontis i in. 2006]. Całkowita konformacja RNA jest zdefiniowana przez geometrię odcinków A-helikalnych, połączonych przez elementy, z których 70% stanowią połączenia dwóch helis [Bailor i in. 2010]. Jednymi z częściej występujących motywów trzeciorzędowych w RNA są helisy oddziałujące współosiowo (32%), motyw typu A-minor (37%), zamek rybozowy (20%), pseudowęzeł (6%), pętla-receptor (3%), oddziaływanie dwóch struktur typu spinka do włosów (ang. kissing hairpin) (1%) oraz pętle D i T w tRNA (1%) [Xin i in. 2008]. 67% adenozyn w RNA znajduje się w regionach jednoniciowych zaangażowanych w oddziaływania trzeciorzędowe. W każde oddziaływanie pętla-receptor zaangażowany jest przynajmniej jeden motyw zamka rybozowego, a większość z nich (73%) posiada nukleozydy związane z oddziaływaniem typu

17

A-minor [Xin i in. 2008]. Wraz z różnymi konformacjami łańcucha fosforanowo-cukrowego obrazuje to olbrzymi repertuar oddziaływań RNA.

Oddziaływania pomiędzy fragmentami RNA można podzielić na kategorie w zależności od typu interakcji: i) tworzenie par zasad Watsona-Cricka (pseudowęzeł, połączenie dwóch pętli); ii) oddziaływania z udziałem pętli T (ang. T-loop), helisa-helisa, z udziałem motywu drugorzędnych adenozyn (ang. A-minor) [Geary i in. 2008]. Na podstawie analizy motywów w rybosomie stwierdzono, że spośród nich oddziaływania typu A-minor występują najczęściej i dotyczą ~66% filogenetycznie zachowawczych reszt adenozyny [Nissen i in. 2001].

Ważnym elementem strukturalnym cząsteczki RNA jest grupa 2'OH, która może uczestniczyć w tworzeniu wiązania wodorowego zarówno jako donor, jak i akceptor protonu [Butcher i Pyle 2011]. Najpowszechniejszym typem interakcji 2'OH są motywy tzw. zamków rybozowych (ang. ribose zipper). Umożliwiają one zbliżenie łańcuchów fosforanowo-cukrowych, co stabilizuje sąsiadujące elementy strukturalne [Butcher i Pyle 2011]. Odgrywają one istotną rolę w centrum katalitycznym intronów grupy I [Cate i in. 1996].

Postuluje się, że powtarzalne segmenty helikalne posiadające charakterystyczną konfigurację łańcucha fosforanowo-cukrowego stanowią odrębne motywy (jak np. bakteryjna sekwencja Shine-Dalgarno) [Leontis i in. 2006]. Z kolei różne elementy strukturalne RNA mogą prowadzić do utworzenia topologicznie równoważnych oddziaływań helis [Geary i in. 2011]. Zależą one od szerszego strukturalnego kontekstu, w jakim się znajdują. Poszukuje się nowych motywów RNA wyróżniających się konfiguracją łańcucha fosforanowo-cukrowego.

Elementy strukturalne RNA odgrywają istotną rolę w procesach alternatywnego składania (np. Tau), wyciszania genów przez niekodujące RNA (np. Xist), zakończeniu transkrypcji (kwadrupleksy w mitochondriach), inicjacji translacji (np. element IRES), lokalizacji (Hac1, ATM1) i stabilności transkryptów (np. BDNF) [Wan i in. 2011, Goodarzi i in. 2012]. Zidentyfikowano 8 motywów strukturalnych typu spinka do włosów, znajdujących się przy końcu 5' lub 3' mRNA odgrywających znaczącą rolę w regulacji jego stabilności [Goodarzi i in. 2012].

G•A cis W.C./W.C.         C:s Watson-Crick/Watson-Crick         G•U cis W.C./W.C.         U•C cis W.C./W.C.         U•U cis (wobble)         U•C cis W.C./W.C.         U•U cis (wobble) W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./Hoogsteen         U•U trans W.C./Hoogsteen         U•A cis W.C./Hoogsteen         G•G trans W.C./Hoogsteen         U•A trans W.C./Hoogsteen         U•A trans W.C./Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C./ryboza         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C./ryboza         C•G trans W.C./ryboza         C•G trans W.C./ryboza<	Typ oddziaływania	Nazewnictwo	Symbol
C*C cis W.C./W.C. (wobble)         G*U cis W.C./W.C. (wobble)         U*C cis W.C./W.C.         U*U cis (wobble) W.C./W.C.         A*U trans W.C./W.C.         A*U trans W.C./W.C.         A*A trans W.C./W.C.         G*C trans W.C./W.C.         U*U trans W.C./W.C.         G*G cis W.C. /Hoogsteen         U*A cis W.C. /Hoogsteen         U*A cis W.C. /Hoogsteen         A*A trans W.C. /Hoogsteen         U*A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Hoogsteen         A*A trans W.C. /Hoogsteen         U*A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A*G cis W.C. /ryboza         A*U cis W.C. /ryboza         C*G trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /Hoogsteen <th></th> <th>G•A cis W.C./W.C.</th> <th></th>		G•A cis W.C./W.C.	
Cis Watson-Crick/Watson-Crick       G•U cis W.C./W.C. (wobble)         U•C cis W.C./W.C.       U•U cis (wobble) W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.       A•U trans W.C./W.C.         A•A trans W.C./W.C.       G•C trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.       G•C trans W.C./W.C.         U•C trans W.C./W.C.       U•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.       G•G cis W.C. /Hoogsteen         U•A cis W.C. /Hoogsteen       U•A cis W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen       C•C         G•G trans W.C. /Hoogsteen       O•□         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen/ Hoogsteen         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans		C•C cis W.C./W.C. (wobble)	
U•C cis W.C./W.C.         U•U cis (wobble) W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         A•A trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•C trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•C trans W.C./W.C.         U•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         U•A cis W.C./Hoogsteen         U•A trans W.C./Hoogsteen         U•A trans W.C./Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C./ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C./ryboza	Cis Watson-Crick/Watson-Crick	G•U cis W.C./W.C. (wobble)	
U•U cis (wobble) W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         A•U trans W.C./W.C.         A•A trans W.C./W.C.         G•G trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.         G•G cis W.C. /Hoogsteen         U•U trans W.C./Hoogsteen         G•G cis W.C. /Hoogsteen         H•••         G•G trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G cis W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen		U•C cis W.C./W.C.	
A+U trans W.C./W.C.         A+A trans W.C./W.C.         G+G trans W.C./W.C.         G+G trans W.C./W.C.         G+C trans W.C./W.C.         G+U trans W.C./W.C.         G+C trans W.C./W.C.         U+C trans W.C./W.C.         U+C trans W.C./W.C.         G+G cis W.C. /Hoogsteen         U+A cis W.C. /Hoogsteen         G+G cis W.C. /Hoogsteen         A+G cis W.C. /Hoogsteen         G+G trans W.C. /Hoogsteen         G+G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Hoogsteen         G+G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A+G cis W.C. /ryboza         Cis Watson-Crick/ryboza         A+G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Watson-Crick/ryboza         A+G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         A+G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         A+G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         A+G trans Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza		U•U cis (wobble) W.C./W.C.	
Trans Watson-Crick/Watson-CrickA·A trans W.C./W.C. G·C trans W.C./W.C. A·C trans W.C./W.C. G·U trans W.C./W.C. U·U trans W.C./W.C. U·U trans W.C./W.C. U·U trans W.C./W.C. G·C trans W.C./W.C. U·U trans W.C./W.C. G·G cis W.C. /Hoogsteen G·A cis W.C. /Hoogsteen A+·G cis W.C. /Hoogsteen G·A trans W.C. /Hoogsteen U·A trans W.C. /Hoogsteen C·A trans W.C. /Hoogsteen G·G trans W.C. /Hoogsteen G·G trans W.C. /Hoogsteen G·G trans W.C. /Hoogsteen G·A cis W.C. /Hoogsteen G·A trans W.C. /Hoogsteen O·CTrans Watson-Crick/Hoogsteen C·A trans W.C. /Hoogsteen C·A trans W.C. /Hoogsteen C·A trans W.C. /Hoogsteen C·A trans W.C. /rybozaO·CCis Watson-Crick/ryboza C·G trans W.C. /ryboza A·U cis W.C. /rybozaO·CTrans Watson-Crick/ryboza C·G trans W.C. /rybozaA·G trans W.C. /ryboza A·U cis W.C. /rybozaTrans Hoogsteen /Hoogsteen C·G trans W.C. /rybozaA·G trans Hoogsteen /HoogsteenTrans Hoogsteen /Hoogsteen Cis Hoogsteen /HoogsteenA·A trans Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /Hoogsteen Cis Hoogsteen /HoogsteenA·A trans Hoogsteen /HoogsteenCis ryboza/rybozaA·G trans Hoogsteen /ryboza C·U trans Hoogsteen /rybozaCis ryboza/rybozaA·G trans Hoogsteen /ryboza C·U trans Hoogsteen /ryboza		A•U trans W.C./W.C.	
Trans Watson-Crick/Watson-Crick       G•G trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.       A•C trans W.C./W.C.         G•U trans W.C./W.C.       G•U trans W.C./W.C.         G•C trans W.C./W.C.       U•C trans W.C./W.C.         U•U trans W.C./W.C.       U•U trans W.C./W.C.         G•G cis W.C. /Hoogsteen       G•G cis W.C. /Hoogsteen         Karsen-Crick/Hoogsteen       G•G trans W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         Karsen-Crick/Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen/Hoogsteen         Trans Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen/Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen/Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•A trans Hoogsteen/ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•G trans Hoogsteen/ ryboza		A•A trans W.C./W.C.	
Trans Watson-Crick/Watson- Crick       G•C trans W.C./W.C. A•C trans W.C./W.C. G•U trans W.C./W.C. U•C trans W.C./W.C. U•C trans W.C./W.C. U•U trans W.C./W.C. U•U trans W.C./W.C.         Cis Watson-Crick/Hoogsteen       G•G cis W.C. /Hoogsteen G•A cis W.C. /Hoogsteen A+•G cis W.C. /Hoogsteen G•G trans W.C. /Hoogsteen U•A trans W.C. /Hoogsteen G•G trans W.C. /Hoogsteen O•C         Trans Watson-Crick/Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen G•G trans W.C. /Hoogsteen O•C         Cis Watson-Crick/Pyboza       A•G cis W.C. /Hoogsteen C•A trans W.C. /Hoogsteen O•C         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /ryboza A•U cis W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /ryboza         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /ryboza         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza	Tuong Watson Crick/Watson	G•G trans W.C./W.C.	
A+C trans W.C./W.C.         G-U trans W.C./W.C.         G-U trans W.C./W.C.         U+C trans W.C./W.C.         U+C trans W.C./W.C.         U+U trans W.C./Hoogsteen         G+G cis W.C. /Hoogsteen         G+A cis W.C. /Hoogsteen         A++G cis W.C. /Hoogsteen         G+G trans W.C. /Hoogsteen         U+A trans W.C. /Hoogsteen         U+A trans W.C. /Hoogsteen         G+G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Pyboza         A+G cis W.C. /Pyboza         A+G trans W.C. /Pyboza         A+G trans W.C. /Pyboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen         A+A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         A+A trans Hoogsteen /Pyboza         A+A trans Hoogsteen /Pyboza         Cis ryboza/ryboza         A+G trans Hoogsteen /Pyboza         Cis ryboza/ryboza         A+A trans Hoogsteen /Pyboza         Cis ryboza/ryboza         A+A trans Hoogsteen /Pyboza         Cis ryboza/ryboza		G•C trans W.C./W.C.	4
G-U trans W.C./W.C.         U-C trans W.C./W.C.         U-C trans W.C./W.C.         U-U trans W.C./W.C.         U-U trans W.C./W.C.         U-U trans W.C./W.C.         U-U trans W.C./W.C.         G-G cis W.C. /Hoogsteen         U-A cis W.C. /Hoogsteen         A+G cis W.C. /Hoogsteen         A+G cis W.C. /Hoogsteen         U-A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Hoogsteen         A-G cis W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A-G cis W.C. /ryboza         A-G trans W.C. /ryboza         C-G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen         A-G trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza         A-G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         A-G trans Hoogsteen/ryboza         C-U trans Hoogsteen/ryboza         Cis ryboza/ryboza         Cis ryboza/ryboza	Crick	A•C trans W.C./W.C.	
U•C trans W.C./W.C. C•C trans W.C./W.C. U•U trans W.C./W.C.Cis Watson-Crick/HoogsteenMarket StrengthCis Watson-Crick/HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenG•G trans W.C. /HoogsteenG•G trans W.C. /HoogsteenCis Watson-Crick/HoogsteenCis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /HoogsteenCis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen /ItongsteenCis Hoogsteen /ItongsteenA•A trans Hoogsteen /ItongsteenCis Hoogsteen /ItongsteenA•A trans Hoogsteen /ItongsteenCis Hoogsteen /ItongsteenA•G trans Hoogsteen /ItongsteenCis Hoogsteen /ItongsteenA•G trans Hoogsteen /ItongsteenCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaA•A trans Hoogsteen /rybo	CHER	G•U trans W.C./W.C.	
C•C trans W.C./W.C. U•U trans W.C./W.C.Cis Watson-Crick/Hoogsteen G•A cis W.C. /Hoogsteen A+•G cis W.C. /Hoogsteen A+•G cis W.C. /HoogsteenTrans Watson-Crick/Hoogsteen G•G trans W.C. /Hoogsteen U•A trans W.C. /Hoogsteen U•A trans W.C. /Hoogsteen C•A trans W.C. /Hoogsteen C•A trans W.C. /rybozaCis Watson-Crick/ryboza Trans Watson-Crick/ryboza Cis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaTrans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaTrans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaTrans Hoogsteen /HoogsteenA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans Hoogsteen /HoogsteenA•G trans Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen/ ryboza C•U trans Hoogsteen/ rybozaCis ryboza/ryboza		U•C trans W.C./W.C.	
U•U trans W.C./W.C.Cis Watson-Crick/HoogsteenG•G cis W.C. /HoogsteenG•A cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenA+•G cis W.C. /HoogsteenG•G trans W.C. /HoogsteenG•G trans W.C. /HoogsteenU•A trans W.C. /HoogsteenCis Watson-Crick/HoogsteenCis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /rybozaA•G cis W.C. /rybozaCis Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenTrans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaCis Hoogsteen /rybozaCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen /rybozaA•A trans Hoogsteen /r		C•C trans W.C./W.C.	
Cis Watson-Crick/Hoogsteen       G•G cis W.C. /Hoogsteen         G•A cis W.C. /Hoogsteen       G•A cis W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen       A+•A trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       G•G cis W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       G•G trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       G•G trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen       G•G trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /ryboza         A•G cis W.C. /ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         C•U trans Hoogsteen /ryboza       C•U trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza		U•U trans W.C./W.C.	
Cis Watson-Crick/Hoogsteen       U•A cis W.C. /Hoogsteen         G•A cis W.C. /Hoogsteen       A+•G cis W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen       A•A trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen       U•A trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen       G•G trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen       U•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /Hoogsteen         A•U cis W.C. /Hoogsteen       O→O         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /ryboza         A•U cis W.C. /ryboza       O→O         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen /ryboza         C·U trans Hoogsteen /ryboza       Image: A•A trans Hoogsteen / ryboza         C·U trans Hoogsteen /ryboza       Image: A•A trans Hoogsteen / ryboza         C·U trans Hoogsteen / ryboza       Image: A•A trans Hoogsteen / ryboza         C·U trans Hoogsteen / ryboza       Image: A•A trans Hoogsteen / ryboza         C·U trans		G•G cis W.C. /Hoogsteen	
G•A cis W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen         A+•G cis W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/Hoogsteen         A•G cis W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G cis W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen         A•A trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza         A•G trans Hoogsteen/ ryboza         C•U trans Hoogsteen/ ryboza         C•U trans Hoogsteen/ ryboza         C•U trans Hoogsteen/ ryboza	Cis Watson-Crick/Hoogsteen	U•A cis W.C. /Hoogsteen	
A+•G cis W.C. /Hoogsteen         A•A trans W.C. /Hoogsteen         G•G trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen         U•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza         A•G cis W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen         A•A trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         C·U trans Hoogsteen /ryboza         C·U trans Hoogsteen /ryboza	Cis Watson-Crick/Hoogsteen	G•A cis W.C. /Hoogsteen	
Trans Watson-Crick/HoogsteenA•A trans W.C. /HoogsteenG•G trans W.C. /HoogsteenU•A trans W.C. /HoogsteenU•A trans W.C. /HoogsteenC•A trans W.C. /HoogsteenCis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /rybozaA•U cis W.C. /rybozaA•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen/HoogsteenTrans Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen/HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/ItoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/ItoogsteenCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen/Itoogsteen		A+•G cis W.C. /Hoogsteen	
Trans Watson-Crick/HoogsteenG•G trans W.C. /Hoogsteen U•A trans W.C. /Hoogsteen C•A trans W.C. /HoogsteenO-□Cis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /ryboza A•U cis W.C. /ryboza●●●Trans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaOー●Cis Hoogsteen /HoogsteenA•G trans W.C. /ryboza●●●Trans Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen/Hoogsteen●●●Cis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/Hoogsteen●●●Cis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/Hoogsteen●●●Cis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/ryboza●●●Cis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/ryboza●●●Cis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/ryboza●●●Cis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen/ryboza●●●Cis ryboza/rybozaA•O trans Hoogsteen/ryboza●●Cis ryboza/rybozaA•O trans Hoogsteen/ryboza●●A•O trans Hoogsteen/ryboza●●●Cis ryboza/rybozaA•O trans Hoogsteen/ryboza●●Cis ryboza/rybozaA•O trans Hoogsteen/ryboza●● <t< th=""><th></th><td>A•A trans W.C. /Hoogsteen</td><td></td></t<>		A•A trans W.C. /Hoogsteen	
ITails watson-Crick/ribogsteen       U-A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /ryboza         A•U cis W.C. /ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza	Trans Watson Crick/Hoogstoon	G•G trans W.C. /Hoogsteen	0-0
C•A trans W.C. /Hoogsteen         Cis Watson-Crick/ryboza       A•G cis W.C. /ryboza         A•U cis W.C. /ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Watson-Crick/ryboza       A•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•G trans W.C. /ryboza         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen /Hoogsteen         Trans Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen / Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•G trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza         Cis ryboza/ryboza       A•A trans Hoogsteen / ryboza	Trans watson-Crick/Hoogsteen	U•A trans W.C. /Hoogsteen	
Cis Watson-Crick/rybozaA•G cis W.C. /ryboza A•U cis W.C. /rybozaTrans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen/HoogsteenTrans Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen/HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/rybozaCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen/rybozaCis ryboza/rybozaA•G trans Hoogsteen/rybozaCis ryboza/rybozaA•A trans Hoogsteen/ryboza		C•A trans W.C. /Hoogsteen	
A•U cis W.C. /ryboza         A•U cis W.C. /ryboza         A•G trans W.C. /ryboza         C•G trans Hoogsteen /Hoogsteen         A•A trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         A•G trans Hoogsteen /ryboza         C•U trans Hoogsteen /ryboza         Cis ryboza/ryboza	Cis Watson Crick/ryboza	A•G cis W.C. /ryboza	
Trans Watson-Crick/rybozaA•G trans W.C. /ryboza C•G trans W.C. /rybozaCis Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen /HoogsteenTrans Hoogsteen /HoogsteenA•A trans Hoogsteen /HoogsteenCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen / rybozaCis Hoogsteen /rybozaA•G trans Hoogsteen / rybozaCis Hoogsteen /rybozaImage: Cell trans Hoogsteen / ryboza C•U trans Hoogsteen / rybozaCis ryboza/rybozaImage: Cell trans Hoogsteen / rybozaCis ryboza/rybozaImage: Cell trans Hoogsteen / ryboza	CIS Watson-Crick/1yboza	A•U cis W.C. /ryboza	
Trans Watson-Crick/Fyb02a       C•G trans W.C. /ryboza         Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen / Hoogsteen         Trans Hoogsteen /ryboza       Image: Comparison of the second seco	Trans Watson Crick/ryboza	A•G trans W.C. /ryboza	0-0
Cis Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen / Hoogsteen         Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen / Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen/ ryboza         Trans Hoogsteen /ryboza       A•A trans Hoogsteen/ ryboza         Cis ryboza/ryboza       Image: Cis ryboza/ryboza	TTails Watson-CTICK/Tyboza	C•G trans W.C. /ryboza	
Trans Hoogsteen /Hoogsteen       A•A trans Hoogsteen/ Hoogsteen         Cis Hoogsteen /ryboza       Image: A•G trans Hoogsteen/ ryboza         A•G trans Hoogsteen/ ryboza       A•A trans Hoogsteen/ ryboza         Cis ryboza/ryboza       Image: A•G trans Hoogsteen/ ryboza         Cis ryboza/ryboza       Image: A•G trans Hoogsteen/ ryboza	Cis Hoogsteen /Hoogsteen		
Cis Hoogsteen /ryboza     A•G trans Hoogsteen/ ryboza       Trans Hoogsteen /ryboza     A•A trans Hoogsteen/ ryboza       Cis ryboza/ryboza     Image: Cis ryboza/ryboza	Trans Hoogsteen /Hoogsteen	A•A trans Hoogsteen/ Hoogsteen	Ļ
Trans Hoogsteen /ryboza       A•G trans Hoogsteen/ ryboza         A•A trans Hoogsteen/ ryboza       C•U trans Hoogsteen/ ryboza         Cis ryboza/ryboza       Image: Comparison of the trans Hoogsteen/ ryboza	Cis Hoogsteen /ryboza		
Trans Hoogsteen /ryboza       A•A trans Hoogsteen/ ryboza         C•U trans Hoogsteen/ ryboza         Cis ryboza/ryboza		A•G trans Hoogsteen/ ryboza	
C•U trans Hoogsteen/ ryboza	Trans Hoogsteen /ryboza	A•A trans Hoogsteen/ ryboza	⊡→>
Cis ryboza/ryboza		C•U trans Hoogsteen/ ryboza	
	Cis ryboza/ryboza		-
Trans ryboza/ryboza G•G trans Hoogsteen/ ryboza	Trans ryboza/ryboza	G•G trans Hoogsteen/ ryboza	
Rozwidlone pary zasad B	Rozwidlone pary zasad		B
(pośrednie między dwoma	(pośrednie między dwoma		-
układami)	układami)		
Para zasad z udziałem wody 🛛 🖤	Para zasad z udziałem wody		W
Pojedyncze wiązanie wodorowe	Pojedyncze wiązanie wodorowe		

Tab. 3.1. Oddziaływania niekanoniczne pomiędzy zasadami w RNA wg [Leontis i Westhof 2001].



Rys. 3.2. Struktura drugorzędowa (po lewej) oraz trzeciorzędowa (po prawej) motywów występujących powszechnie w RNA. (A) Skręcony zwrot (ang. kink turn), (B) pętla T, (C) pętla C, (D) skręt U, (E) pętla 6nukleotydowa, (F) ostry skręt (ang. hook turn), (G) ang. tandem sheared, (H) ang. sarcin-ricin, (I) ang. Aminor, (J) pętla E, (K) ang. G-ribo, (L) połączenie trzech helis: rodzina A, (M) rodzina B, (N) rodzina C, (O) receptor czteronukleotydowych pętli/platforma AA/motyw A-minor[Masquida i in. 2010].

#### 3.1.2. Metody analizy struktury RNA

Ze względu na trudności związane z precyzyjnym określeniem budowy dużych RNA (powyżej 700 nukleotydów) istnieje duże zapotrzebowanie na nowe wysoko-rozdzielcze metody przewidywania struktury oraz rozwiązania eksperymentalne (Tab. 3.2) [Popenda i in. 2012].

Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA opiera się o: i) minimalizację energii swobodnej (ang. minimal free energy, MFE); ii) kinetykę zwijania; iii) wykorzystanie parametrów z puli znanych struktur drugorzędowych [Mathews i Turner 2006]. Nowe strategie optymalizacji przewidywania struktury drugorzędowej RNA wykorzystują: i) statystyczną mechanikę zwijania RNA; ii) algorytmy umożliwiające przewidywanie pseudowęzłów; iii) poszukiwanie struktury drugorzędowej wspólnej dla grupy sekwencji homologicznych (Tab. 3.3) [Mathews i Turner 2006].

Minimalizacja energii swobodnej stanowi najbardziej popularną metodę przewidywania struktury drugorzędowej RNA, która polega na analizie zależności sekwencji od stabilności termodynamicznej tworzonych kanonicznych par zasad [Mathews i Turner 2006]. Dla sekwencji krótszych niż 700 nukleotydów pozwala ona na prawidłowe przewidzenie struktury drugorzędowej w 70% [Wan i in. 2011]. Dla dłuższych sekwencji dokładność spada do 20-60%. Wadą modelowania w oparciu o MFE jest ujednolicenie znaczenia poszczególnych elementów strukturalnych dla procesu zwijania RNA, który zachodzi w sposób kooperatywny i zależny od kontekstu strukturalnego. W celu udokładnienia przewidywanych struktur RNA tworzone są algorytmy, umożliwiające aplikację wyników eksperymentalnych (Tab. 3.4).

Tab. 3.2. Wzajemne relacje pomiędzy otwartymi zagadnieniami biologicznymi a podejściami eksperymentalnymi dotyczącymi kwasów nukleinowych [Giége i in. 2011]. W biologii molekularnej można wyróżnić wiele zagadnień dotyczących kwasów nukleinowych, które nadal nie zostały precyzyjnie wyjaśnione (A). Coraz szersze zaplecze eksperymentalne pomaga w zrozumieniu zależności strukturalno-funkcjonalnych RNA (B). SAXS - ang. small angle X-ray scattering, SANS - ang. small angle neutron scattering, SHAPE - ang. selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension, NMR - ang. nuclear magnetic resonance.

A. Podstawowe zagadnienia biologiczne			
<ul> <li>Wiedza częściowa:</li> <li>Różnorodność sekwencji i struktur trzeciorzędowych</li> <li>Reguły zwijania RNA</li> <li>Hierarchiczny charakter budowy RNA</li> </ul>	<ul> <li>Otwarte kwestie: <ul> <li>Przełącznik stanów konformacyjnych</li> <li>Dynamika</li> <li>Polimorficzne i "patogeniczne" zmiany w strukturze</li> <li>Identyfikatory funkcji oraz znaczniki ewolucyjne obecne w strukturze</li> <li>Mechanizm przejść allosterycznych</li> <li>Nietrwałe aspekty plastyczności strukturalnej</li> <li>Struktury w warunkach komórkowych</li> </ul> </li> </ul>		
B. Rozwiązania eksperymentalne			
<ul> <li>Przygotowanie RNA Izolacja Chromatografia Narzędzia biotechnologiczne Synteza chemiczna</li> <li>Biochemia analityczna Chromatografia Elektroforeza Spektrometria mas Enzymologia</li> <li>Metody biofizyczne analizy w roztworach SAXS SANS NMR Mikroskopia elektronowa Temperatura topnienia</li> <li>Sekwencjonowanie Na poziomie RNA (wraz z modyfikacjami) Na poziomie DNA</li> </ul>	<ul> <li>Metody chemiczne Analiza struktury Technologia SHAPE Synteza RNA (wraz z modyfikacjami) Chemiczne modyfikacje</li> <li>Zaawansowana bioinformatyka Analiza sekwencji Zwijanie Dynamika molekularna</li> <li>Krystalografia</li> <li>Modelowanie Na podstawie danych z analiz w roztworach Na podstawie analogii</li> <li>Analiza pojedynczych cząsteczek</li> <li>Metody wysokoprzepustowe Sekwencjonowanie Krystalografia</li> </ul>		

Tab. 3.3. Charakterystyka programów umożliwiających przewidywanie struktury drugorzędowej jednoniciowych RNA (ssRNA). CLLM - ang. conditional log-linear model, MFE – minimalna energia swobodna (ang. minimal free energy).

Program	Charakterystyka	Referencje
AlteRNA	Algorytm umożliwiający poszukiwanie alternatywnych struktur	Saffarian 2012
	drugorzędowych danej sekwencji	
CentroidFold	Uogólnione oszacowanie proponowanych struktur	Sato i in. 2009
CentroidHomfold	Wykorzystuje informacje o sekwencjach homologicznych	Hamada i in. 2009
CONTRAfold	Warunkowe modelowanie CLLM (ang. conditional log-linear	Do i in. 2006
	model), elastyczna grupa uogólnianych modeli probabilistycznych	
Cylofold	Lokowanie helis pozwalające na tworzenie pseudowęzłów	Bindewald i in. 2010
Kinefold	Kinefold         Kinetyka zwijania RNA z uwzględnieniem pseudowęzłów oraz	
	implementacji rozdziału funkcji węzłów	2005
Mfold	Algorytm obliczania MFE RNA	Zuker i Stiegler 1981
Pknots	Dynamiczny algorytm dla optymalnego przewidywania	Rivas i Eddy 1999
	pseudowęzłów z wykorzystaniem modelu energii najbliższego	
	sąsiedztwa	
PknotsRG	Dynamiczny algorytm dla przewidywania ograniczonej grupy	Reeder i in. 2007
	pseudowęzłów	
RNAfold	Algorytm obliczania MFE RNA; zawiera implementację rozdziału	Hofacker 2004
	funkcji dla obliczeń prawdopodobieństwa parowania zasad oraz	
	możliwość zwijania kolistych cząsteczek RNA	
RNAshapes	Algorytm obliczania MFE RNA na bazie oddzielonych kształtów	Steffen i in. 2006
RNAstructure	Algorytm obliczania MFE oraz prawdopodobieństwa parowania	Reuter i Mathews 2010
	zasad RNA oraz DNA; przewidywanie struktur można uzupełnić o	
dodatkowe informacje eksperymentalne		
Sfold	Statystyczne losowanie wszystkich możliwych struktur	Ding i in. 2004
UNAFold	Połączony system programów symulujących zwijanie,	Markham i Zuker 2008
	hybrydyzację oraz krzywe topnienia dla jednej lub dwóch	
	sekwencji kwasów nukleinowych	
RNAmetaserver	Zapewnia jednoczesny dostęp do 20 programów przewidywania	Puton i in.; w druku
	struktur drugorzędowych ssRNA oraz 10 programów działających	
	na zasadzie metod porównawczych	

Tab. 3.4. Metody chemiczne oraz enzymatyczne określania struktury RNA. DMS - siarczek dimetylu, DEPC - eter dietylowy kwasu pirowęglowego, CMCT - 1-cyclohexyl-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluene sulfonate, NAIM - ang. nucleotide analog interference mapping, CFQ - ang. charge flow and quenching.

Metoda		Charakterystyka	Referencja
	V1	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po dowolnych nukleotydach	
		zaangażowanych w oddziaływania drugorzędowe lub warstwowe,	
		pozostawiając wolną grupę 3'OH	
	T1	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po resztach guanozyny,	
		pozostawiając fosforan przy końcu 3'	
	T2	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po resztach adenozyny	
		(A>C, U, G), pozostawiając fosforan przy końcu 3'	Ehrosmonn
Dyhonyldoory	U2	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po resztach adenozyny,	Enresmann
Kybollukleazy		pozostawiając fosforan przy końcu 3'	1 111. 1987
	CL3	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po resztach cytozyny,	
		pozostawiając fosforan przy końcu 3'	
	PhyM	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po resztach adenozyny i	
		urydyny, pozostawiając fosforan przy końcu 3'	
	S1	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego po dowolnych nukleotydach	
	Fasola Mung	w odcinkach jednoniciowych, pozostawiając wolną grupę 3'OH	
	Neurospora crassa		
	Н	Hydroliza wiązania fosfodiestrowego RNA w dwuniciowych	Dutkiewicz
		fragmentach RNA-DNA	i in. 2008
	DMS	Metylacja reszt guaniny w pozycji N7, adeniny w N1 oraz	
		cytozyny w N3, jeżeli nie są zaangażowane w tworzenie wiązań	
Reagenty		wodorowych lub oddziaływanie z białkami	<ul> <li>Ehresmann i in. 1987</li> <li>Dutkiewicz i in. 2008</li> <li>Ehresmann i in. 1987</li> <li>Chevalier i in. 2009</li> <li>Ding i in. 2012</li> <li>McGinnis i in. 2012, Merino i in. 2005</li> <li>Regulski i Breaker 2008</li> <li>Frątczak i in. 2011</li> <li>Cochrane i Strobel</li> </ul>
specyficzne	DEPC	Karboksymetylacja reszt purynowych w regionach	Ehresmann
wobec zasad		jednoniciowych	1 in. 1987
	Ketoksal	Modyfikacja guaniny (N1, N2) w regionach jednoniciowych	
	CMCT	Modyfikacja urydyny (N3) i guaniny (N1, w mniejszym stopniu)	
	Jony olowin	Salaktuwna wiazania z fragmantami jadnonicjowymi PNA j	Chavaliar i
Analiza	Joily Gowiu	następcza hydroliza sasiadujących wiazań fosfodiestrowych	in 2009
dostepności	Wolne rodniki •OH	Generowanie wolnych rodników które oddziałuja z rdzeniem	Ding i in.
cząsteczki		fosforanowo-cukrowym (z ryboza), prowadzac do jego pekania,	2012
· ·		poprzez odciagniecie protonu od atomu rybozy C4'. C5' lub obu:	
		pokazuje dostępność rdzenia fosforanowo-cukrowego	
	SHAPE	Selektywna acylacia grup 2'OH analizowana technika wydłużania	McGinnis i
		startera; reaktywność spada, gdy ruchliwość nukleotydów	in. 2012,
		ograniczona jest przez sparowanie komplementarnych zasad	Merino i in.
			2005
Inne	Analiza "In-line"	Wykorzystuje naturalną niestabilność RNA w wysokim pH,	Regulski i
		analizując zdolność nukleotydów do spontanicznej wewnętrznej	Breaker
		transestryfikacji	2008
	Mikromacierze	Wykorzystanie specyficznych sond, komplementarnych "krok po	Frątczak 1
	izoenergetyczne	kroku" do sekwencji RNA; wyznacznikami są srodki	in. 2011
	NAIM	Manowania za nomoca interferencii analogomi nukleotudów	Cochrana i
		wnowadzanymi do cząsteczki RNA w trakcje transkrupcji in	Strobel
		vitro	2004
	CFO	Wprowadzenie ładunku elektrycznego do cząsteczki i	Leung i Sen
	~~~~	monitorowanie jego przepływu: daie informacie o oddziaływaniu	2010
		helis, dynamice określonych zasad, zwijaniu i nietypowych	
		właściwościach nukleotydów	

BARNACLEModelowanie struktury trzeciorzędowej na podstawie podanej struktury drugorzędowejFrellsen i in. 2009FARNAAutomatyczna metoda przewidywania natywnych struktur trzeciorzędowych RNA de novoDas i Baker 2007iFoldRNAPrzewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNASharma i in. 2006MC-Fold MC-SymFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011	Program	Charakterystyka	Referencje
struktury drugorzędowejDas i Baker 2007FARNAAutomatyczna metoda przewidywania natywnych struktur trzeciorzędowych RNA de novoDas i Baker 2007iFoldRNAPrzewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNASharma i in. 2006MC-FoldFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011	BARNACLE	Modelowanie struktury trzeciorzędowej na podstawie podanej	Frellsen i in. 2009
FARNAAutomatyczna metoda przewidywania natywnych struktur trzeciorzędowych RNA de novoDas i Baker 2007iFoldRNAPrzewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNASharma i in. 2006MC-Fold MC-SymFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011		struktury drugorzędowej	
trzeciorzędowych RNA de novoiFoldRNAPrzewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNASharma i in. 2006MC-FoldFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011	FARNA	Automatyczna metoda przewidywania natywnych struktur	Das i Baker 2007
iFoldRNAPrzewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNASharma i in. 2006MC-FoldFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011		trzeciorzędowych RNA de novo	
MC-Fold MC-SymFunkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów nukleotydów; struktury 2D i 3DParisien i Major 2008NASTPrzybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnościąJonikas i in. 2009ModeRNAMetoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencjiRother i in. 2011	iFoldRNA	Przewidywanie struktury trzeciorzędowej i zwijania RNA	Sharma i in. 2006
MC-Sym         nukleotydów; struktury 2D i 3D         2008           NAST         Przybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską dokładnością         Jonikas i in. 2009           ModeRNA         Metoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencji         Rother i in. 2011	MC-Fold	Funkcjonuje na bazie termodynamiki oraz cyklicznych motywów	Parisien i Major
NAST         Przybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską         Jonikas i in. 2009           dokładnością         ModeRNA         Metoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencji         Rother i in. 2011	MC-Sym	nukleotydów; struktury 2D i 3D	2008
dokładnością       ModeRNA     Metoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencji     Rother i in. 2011	NAST	Przybliżone modelowanie dużych cząsteczek RNA z niską	Jonikas i in. 2009
ModeRNA         Metoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika sekwencji         Rother i in. 2011		dokładnością	
sekwencji	ModeRNA	Metoda porównawcza na bazie zdefiniowanej przez użytkownika	Rother i in. 2011
		sekwencji	
<b>RNAComposer</b> Funkcjonuje na zasadzie tłumaczenia informacji zawartej w bazie Popenda i in. 2012	RNAComposer	Funkcjonuje na zasadzie tłumaczenia informacji zawartej w bazie	Popenda i in. 2012
danych fragmentów 2D RNA FRABASE na struktury 3D		danych fragmentów 2D RNA FRABASE na struktury 3D	
<b>SETTER</b> Algorytm do porównywania struktur trzeciorzędowych na podstawie Cech i in. 2012	SETTER	Algorytm do porównywania struktur trzeciorzędowych na podstawie	Cech i in. 2012
podanej struktury drugorzędowej z wykorzystaniem podziału cząsteczki na elementy strukturalne		podanej struktury drugorzędowej z wykorzystaniem podziału cząsteczki na elementy strukturalne	

Tab. 3.5. Charakterystyka programów umożliwiających przewidywanie struktury trzeciorzędowej jednoniciowych RNA (ssRNA).

Do badania struktur drugorzędowych i/lub trzeciorzędowych RNA w komórkach wykorzystuje się siarczek dimetylu (DMS), jony ołowiu, wolne rodniki [Zemora i Waldsich 2010]. DMS jest najczęściej stosowany do analiz strukturalnych RNA *in vivo* od bakterii po eukarionty. Szybko przenika do komórki i nie powoduje jej permeabilizacji [Liebeg i Waldsich 2009]. W komórce DMS metyluje reszty guaniny w pozycji N7, adeniny w N1 oraz cytozyny w N3, jeżeli nie są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych lub oddziaływanie z białkami. Octan ołowiu jest wykorzystywany między innymi do określania struktury RNA w bakteriach, ponieważ łatwo przenika do komórek i powoduje specyficzną hydrolizę RNA w pozycjach silnego wiązania jonów metali [Lindell i in. 2005]. Miejsca te wizualizowano techniką wydłużania startera (ang. primer extention).

W odróżnieniu od ogromnej liczby rozwiązanych struktur trzeciorzędowych białek, ilość struktur RNA w bazie danych PDB jest niewielka. Stanowi to duże ograniczenie na drodze do zrozumienia aspektów strukturalno-funkcjonalnych kwasów nukleinowych. Tworzone są nowe narzędzia przewidywania struktury trzeciorzędowej RNA (Tab. 3.5). Jednym z nich jest RNAComposer (Rys. 3.3) [Popenda i in. 2012]. Pozwala on na automatyczne przewidywanie struktury trzeciorzędowej przez użytkownika struktury drugorzędowej. Aplikacja funkcjonuje w oparciu o bazę danych RNA FRABASE, która dostarcza informacji na temat struktury trzeciorzędowej fragmentów o zdefiniowanej strukturze drugorzędowej [Popenda i in. 2010]. RNAComposer wykazuje wyższość nad

innymi metodami przewidywania budowy trzeciorzędowej we wszystkich aspektach jakości stereochemicznej oraz dokładności uzyskanych struktur.



Rys. 3.3. Metodologia programu RNAComposer. (A) Schemat działania bazy danych FRABASE, (B) Etapy modelowania struktury trzeciorzędowej RNA w programie RNAComposer [Popenda i in. 2012].

#### 3.1.3. Zwijanie RNA

RNA w odróżnieniu od białek nie posiadają silnie hydrofobowych centrów ułatwiających zwijanie. Helisy są połączone ze sobą niewielką liczbą motywów oddziałujących trzeciorzędowo, w których zakodowana jest struktura natywna [Leontis i in. 2006]. Orientacja i topologia (rozwinięcie, wydłużenie i usztywnienie) fragmentów helikalnych RNA są istotne dla pełnienia przez cząsteczkę funkcji biologicznych [Montange i Batey 2008].

Zwijanie RNA (fałdowanie RNA, ang. RNA folding) kierowane jest przez maksymalizację oddziaływań warstwowych zasad, które zapewniają odseparowanie większości pierścieni hydrofobowych od roztworu oraz stabilizację elektrostatyczną łańcucha fosforanowo-cukrowego [Butcher i Pyle 2011]. Efektem zwijania RNA w roztworze jest pula cząsteczek przyjmujących wiele możliwych stanów konformacyjnych. Znajdują się one w stanie równowagi dynamicznej, a ich ilościowa nadreprezentacja zależy od tego, który z nich jest najbardziej zbliżony do stanu natywnego.

Sekwencja nukleotydów nie dostarcza wystarczających informacji dla metod obliczeniowych do precyzyjnego określenia unikalnego zestawu struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych, które może przyjąć RNA w trakcie zwijania. Właściwości RNA zależą od jego konformacji, która ma charakter dynamiczny [Scott 2010]. Każdy czynnik, który wpływa na proces przyjmowania przez RNA natywnej struktury, determinuje właściwości RNA w kontekście czasu i przestrzeni. Proces zwijania RNA został dość wnikliwie przebadany *in vitro*, ale nadal trudno jest scharakteryzować go w warunkach *in vivo* [Zemora i Waldsich 2010]. Warunki jonowe zwijania RNA *in vitro* często znacznie odbiegają od komórkowych (np. 500 mM jony monowalentne, 100 mM Mg<sup>2+</sup>, 42°C dla intronów grupy II) [Zemora i Waldsich 2010].

Oddziaływania molekularne, które stabilizują strukturę RNA są stałe w warunkach fizjologicznych i nawiązują się spontanicznie bardzo szybko [Woodson 2010A]. Zwijanie RNA związane jest z występowaniem problemów takich jak ograniczona złożoność chemiczna polinukleotydów, większa stabilność struktur drugorzędowych względem trzeciorzędowych oraz ujemny ładunek elektrostatyczny rdzenia fosforanowo-cukrowego [Chen 2008]. W komórce proces ten zależy od transkrypcji, translacji, udziału białek oraz innych makrocząsteczek, metabolitów, jonów itd.

Interakcje segmentów helikalnych i niehelikalnych prowadzą do organizacji RNA w struktury trzeciorzędowe. Jednak badania pokazują, że schemat ten jest zbyt uproszczony, aby opisać złożony i specyficzny charakter mechanizmu zwijania [Woodson 2010A]. Wiele sekwencji RNA może tworzyć więcej niż jedną stabilną strukturę wyższego rzędu, co jest

związane z chemicznym podobieństwem czterech podstawowych zasad azotowych. Zanim cząsteczka przyjmie natywną strukturę trzeciorzędową, konieczne jest wyselekcjonowanie poprawnego układu drugorzędowego spośród wielu energetycznie do siebie podobnych [Woodson 2010A]. Badania pokazują, że tworzenie helis zależy od oddziaływań trzeciorzędowych w trakcie zwijania się RNA w stanach przejściowych i może wpływać na dokładność ich formowania [Woodson 2010B].

Część trzeciorzędowych elementów RNA jest zależnych od kontekstu strukturalnego i w niektórych przypadkach zasady przyjmują właściwą konfigurację tylko w obecności oddziałującego motywu [Lescoute i Westhof 2006]. Proces przyjmowania natywnej konformacji może odbywać się poprzez lokalną reorganizację parowania zasad oraz oddziaływań warstwowych lub nawet większe zmiany w obrębie struktury drugorzędowej [Woodson 2010A].



Rys. 3.4. Krajobraz energii swobodnej dla cząsteczki RNA podczas procesu zwijania. (A) Cząsteczka po transkrypcji. (B) Konformacja natywna. Strzałki obrazują różne możliwości, jakimi może przebiegać proces zwijania RNA. Kształt krajobrazu zależy od względnych wartości energii specyficznych konformacji oraz kinetycznych barier między nimi, obrazowanymi w postaci wzniesień i zaglębień.

Proces zwijania RNA prowadzi poprzez wiele różnych konformacji, a liczba możliwych struktur zmniejsza się w miarę, jak łańcuch RNA oddziałuje z elementami własnej cząsteczki. Prawdopodobieństwo przyjęcia specyficznej konformacji jest opisywane jako tzw. "krajobraz energii swobodnej", który zależy od względnych wartości energii specyficznych konformacji

oraz kinetycznych barier między nimi (Rys. 3.4) [Woodson 2010A]. Część populacji cząsteczek RNA szybko przyjmuje strukturę natywną, podczas gdy wiele innych pozostaje uwięzionych w alternatywnej nieaktywnej konformacji. Indywidualne niezwinięte RNA mogą przyjąć różne struktury początkowe i podążać dalej odmiennymi ścieżkami w kierunku uzyskania struktury natywnej, dając subpopulacje cząsteczek zwijających się szybciej lub wolniej [Thirumalai i Woodson 1996]. Niektóre z nich mogą wymagać minut lub nawet godzin, aby przearanżować strukturę i przyjąć konformację natywną [Woodson 2010B].

Specyficzna konformacja rdzenia fosforanowo-cukrowego RNA oraz jego interakcje są istotne dla własności katalitycznych RNA, wiązania cząsteczek oraz oddziaływania z białkami [Richardson i in. 2008]. Konformacja nukleotydu w obrębie RNA lub DNA jest zdefiniowana przez sześć kątów torsyjnych rdzenia fosforanowo-cukrowego  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  oraz  $\zeta$ , glikozydowy kąt torsyjny  $\chi$ , orientację pseudorotacji cukru furanozowego P (0-360°) oraz amplitudę  $\Phi$  [Julien i in. 2008]. Pseudorotacja furanozy ogranicza się do dwóch konfromerów C3'-endo (0-36°, A-helisa) oraz C2'-endo (144-180°, B-helisa) [Julien i in. 2008]. Regiony niehelikalne mogą zawierać nukleotydy w jednej z tych dwóch konformacji lub wykazywać stan równowagi pomiędzy tymi dwoma stanami. Łącznie zidentyfikowano 46 odrębnych konformerów opisujących rozkład kątów torsyjnych i geometrię jednostki fosforanowo-cukrowej [Richardson i in. 2008]. Ponad 75% przeciętnego dwuniciowego RNA jest opisanych za pomocą jednego z nich. Zmiana choćby jednego kąta torsyjnego prowadzi do lokalnych zmian, dając cząsteczki róźniące się właściwościami [Richardson i in. 2008].

Większość nukleotydów w cząsteczce RNA występuje w konformacji C3'-endo. Chociaż C2'-endo występuje rzadziej, często pojawia się w miejscach katalitycznych [Richardson i in. 2008, Julien i in. 2008]. W niektórych przypadkach konformacja C2'-endo rybozy określonego nukleotydu powodowała powolne zwijanie cząsteczki [Mortimer i Weeks 2009]. Sugeruje się, że nukleotydy C2'-endo mogą funkcjonować jako molekularne zegary determinujące tempo przemian w procesach zwijania RNA oraz reakcjach rozpoznawania ligandów [Mortimer i Weeks 2009]. Do RNA, które wykazują powolne tempo zwijania należą cząsteczki różnych rozmiarów od małych ryboprzełączników i katalitycznych RNA, poprzez średniej wielkości samowycinające się introny aż do dużych rybosomalnych RNA [Mortimer i Weeks 2009].

Wykazano, że tRNA w zależności od stężenia jonów metali może zwijać się w dwie alternatywne struktury: nieaktywnej typu spinka do włosów lub aktywnej typu liścia koniczyny [Madore i in. 1999, Shelton i in. 2001]. Komórka potencjalnie może regulować konformacje RNA, a przez to ich aktywność na zasadzie zależnej od gradientu jonów

magnezu lub ich uwalniania/wiązania. Rezultatem różnorodności warunków wewnątrzkomórkowych są olbrzymie możliwości wpływania na strukturę cząsteczki. Zjawisko to daje przewagę adaptacyjną wielu funkcjonalnym RNA [Marek i in. 2011]. Zaburzenia regulacji tego procesu stanowią potencjalne zagrożenie dla komórki.

Heterogenność procesu zwijania scharakteryzowano między innymi dla intronów grupy I *Tetrahymena* [Solomatin i in. 2010]. Subpopulacje tego rybozymu wykazywały szerokie zróżnicowanie (>800-krotne) stałej równowagi przyłączania substratu z jednoczesnym zachowaniem aktywności katalitycznej. 94% cząsteczek posiadało tą samą stałą szybkości katalizy. Podobną sytuację opisano dla rybozymu HDV, hairpin, czy aptameru AN58 [Solomatin i in. 2010]. Wykazano, że rybozym HDV może zwinąć się w alternatywną strukturę, która ma aktywność ligazy LIG1 [Schultes i Bartel 2000]. Taka różnorodność konformacyjna niesie za sobą korzyści dla cząsteczki RNA w postaci możliwości adaptacji do niekorzystnych warunków (np. obecności inhibitora) [Solomatin i in. 2010]. W przypadku niektórych wydłużonych wariantów rybozymów hammerhead, które wykazywały niską aktywność *in vitro* obserwowano tworzenie alternatywnych struktur kompleksów rybozym:substrat wolniej migrujących w żelu poliakrylamidowycm [Roychowdhury-Saha i in. 2011]. Etap alternatywnego zwijania się cząsteczek może być czynnikiem limitującym szybkość reakcji [Buskiewicz i Burke, 2012].

Duże nadzieje budzi metoda analizy lokalnych cech dynamiki strukturalnej makrocząsteczek SDSL (ang. site-directed spin labeling), która polega na monitorowaniu kowalentnie przyłączonego stabilnego chemicznie rodnika NO z użyciem spekroskopii EPR (ang. elektron paramagnetic resonance) [Nguyen i Qin 2011]. Pozwala ona na badanie dynamiki zdefiniowanych stanów strukturalnych oraz przejść konformacyjnych RNA. Metoda ta została wykorzystana do badania zmian konformacyjnych wydłużonego rybozymu hammerhead pod wpływem jonów Mg<sup>2+</sup> [Kim i in. 2010]. Wykazano, że wzrost stężenia magnezu jest skorelowany ze zmniejszeniem dynamiki konformacyjnej. Wpływ jonów na rybozym różni się w aspekcie dynamiki konformacyjnej, katalizy oraz ich roli strukturalnej. Technikę SDSL wykorzystano również do analizy interakcji zachodzących pomiędzy czteronukleotydową pętlą (ang. tertraloop, TL) i jej receptorem (ang. tertraloop receptor, TLR) [Kim i in. 2005]. Wykazano, że w roztworze zarówno Mg<sup>2+</sup> jak i TL są niezbędne do stabilizacji konformacji związanego receptora. Sugeruje to energetyczne sprzężenie pomiędzy zmianami konformacyjnymi receptora, koordynacją specyficznych jonów magnezu oraz wiązaniem TL [Nguyen i Qin 2011].

Wprowadzenie substytucji zmieniających oddziaływania trzeciorzędowe w intronach grupy I wykazało, że większość tych interakcji ma mały wpływ na stabilność struktury natywnej [Behrouzi i in. 2012]. Tworzenie rdzenia katalitycznego oraz motywów strukturalnych w produktach pośrednich zwijania bliskich strukturze natywnej ma charakter kooperatywny i zależy od orientacji natywnych helis. Pojawienie się sieci wzajemnych oddziaływań na wczesnym etapie zwijania przeciwdziała przyjmowaniu alternatywnych, nieaktywnych struktur, prowadząc do przyjęcia stanu natywnego [Behrouzi i in. 2012].

Wysoce kooperatywny i specyficzny proces zwijania RNA jest rezultatem selekcji naturalnej i nie wynika jedynie z własności helis [Behrouzi i in. 2012]. Syntetyczne sekwencje RNA o tej samej długości i składzie zasad nie posiadają specyficzności zwijania, takiej jak cząsteczki, będące wynikiem działania ewolucji [Schultes i in. 2005]. Z tego względu przewidywanie i projektowanie RNA powinno wziąć pod uwagę energetyczną kooperatywność zwijania RNA [Behrouzi i in. 2012]. Projektowane cząsteczki, posiadające elementy strukturalne różnych RNA mogą zatem wykazywać inne cechy, niż fragmenty te w natywnych strukturach pochodzenia naturalnego. Podejście to stanowi alternatywę, dla strategii opartej o tzw. tektonikę RNA [Westhof i in. 1996].

### 3.1.4. Oddziaływania dalekiego zasięgu i allosteria RNA

Wiele białek wykazuje zmiany powinowactwa chemicznego do cząsteczek (efekt allosteryczny) poprzez możliwość przyjmowania dwóch lub więcej nieznacznie różniących się struktur natywnych, których względna stabilność i występowanie zależą od obecności ligandów, substratów lub efektorów [Schurr i in. 1998]. Dotyczy to zwłaszcza białek zbudowanych z wielu podjednostek lub domen, oddziałujących kooperatywnie. Wszystkie te cechy posiadają też cząsteczki RNA.

Efekty dalekiego zasięgu w kwasach nukleinowych wynikają z korelacji struktury oraz związanych z nią właściwości [Schurr i in. 1998]. Już w latach 70-tych XX wieku wykazano, że denaturacja regionu DNA zależy od sekwencji oddalonych o 35 lub więcej par zasad oraz przyłączania dodatkowych czynników do DNA [Burd i in. 1975, Wells i in. 1977]. Zjawisko to nazwano telestabilnością.

Każda cząsteczka, która zmienia swoją konformację w wyniku oddziaływania z inną cząsteczką może być określona mianem chemicznego przełącznika [Silverman 2003]. Ryboprzełączniki to RNA, które regulują ekspresję genów poprzez zmiany konformacyjne związane z przyłączeniem ligandu [Mironov i in. 2009]. Rybozymy allosteryczne to

katalityczne RNA, których aktywność została zmodyfikowana i jest kontrolowana poprzez oddziaływanie z małymi cząsteczkami organicznymi, białkami czy oligonukleotydami (Rys. 3.5) [Silverman 2003]. Mogą one być projektowane na bazie takich cząsteczek jak rybozymy hammerhead, HDV, hairpin, introny grupy I *Tetrahymena*. Indukowany teofiliną rybozym hammerhead zastosowano do kontroli ekspresji genu reporterowego [Ausländer i in. 2010]. Wśród innych cząsteczek efektorowych stosowano ATP, FMN, cykliczne monofosforany nukleotydów, doksycyklinę, 3-metyloksantynę, pefloksacynę i różne jony metali [Silverman 2003].



Rys. 3.5. Przykłady allosterycznych efektów modyfikowanych rybozymów typu hammerhead.(A) Aptamer przyłącza białko efektorowe, co powoduje zmianę aktywności rybozymu, (B) W obecności białka efektorowego dochodzi do zmian w strukturze rybozymu, co umożliwia przyłączenie i następnie transestryfikację substratu (C) Hybrydyzacja oligonukleotydu inhibitora powoduje odłączenie elementu regulatorowego hybrydyzującego do centrum katalitycznego rybozymu, (D) Przyłączenie atenuatora, komplementarnego do nici rybozymu i substratu zwiększa aktywność katalityczną. Na podstawie [Silverman 2003].

RNA może funkcjonować jako aptamer, czyli cząsteczka mogąca specyficznie wiązać ligand. Związanie cząsteczki docelowej powoduje stabilizację struktury aptameru poprzez zmiany strukturalne [Soukup 2004]. Naturalne aptamery występują w regionach 5'UTR prokariotycznych mRNA, gdzie regulują ekspresję poprzez zmiany konformacji indukowane związaniem liganda [Soukup 2004]. Rybozym może być połączony z aptamerem tworząc tzw. aptazym, co daje możliwość kontrolowania jego aktywności. Oba elementy zjednoczone są przez tzw. łącznik. Nie jest jasne w jaki sposób element ten determinuje drogi alternatywnego zwijania cząsteczki RNA [Laing i Schlick 2011]. Działanie aptazymu opiera się o modularny charakter RNA, co oznacza, że element aptameru, łącznik i rybozym funkcjonują niezależnie od siebie. Jednak badania pokazały, że w praktyce elementy te wzajemnie wpływają na własną aktywność [Silverman 2003].

Modułowe łączenie trzech elementów RNA posiadających sprecyzowane funkcje: odebrania sygnału, przekazywania informacji oraz odpowiedzi na bodziec pozwala na zbudowanie platformy regulatorowej [Liang i Smolke 2012]. Związanie liganda w regionie odczytu jest przekazywane w postaci zmian strukturalnych przez helikalny łącznik do aktywatora oddziałującego z maszynerią transkrypcyjną komórki. Aktywność elementu efektora zależy od przyjęcia przez niego dwóch alternatywnych konformacji [Liang i Smolke 2012]. Umożliwia to zmiany poziomu ekspresji genu. Najważniejszym elementem tej strategii jest przeniesienie informacji strukturalnej przez fragment helikalny (Rys. 3.6). W tym przypadku związanie liganda prowadzi do obniżenia energii swobodnej, promując wybraną konformację. Na podobnej zasadzie projektowane są nowe warianty rybozymów, posiadające dodatkowe elementy strukturalne przy końcach 5', 3' lub obu, w których za element przekazujący informację można uznać jedno lub oba ramiona oddziałujące z substratem [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B, Val i in. 2011]. Funkcjonowanie takiego układu jest ściśle zależne od komórkowego kontekstu.

Wprowadzenie odcinka o długości 16 par zasad do fragmentu DNA o długości ponad tysiąca par zasad powoduje zmiany strukturalne w regionach oddalonych nawet o 330-550 par zasad, tzw. efekt dalekiego zasięgu [Kim i in. 1993]. Miejsca oddziaływań trzeciorzędowych są często oddalone w natywnej strukturze o 25-35 Å od centrum cząsteczki, ale efekty lokalnych zmian strukturalnych mogą być przenoszone na duże odległości poprzez sztywność helis [Behrouzi i in. 2012]. Może to wyjaśniać, dlaczego mała ilość fragmentów dwuniciowych jest wystarczająca do kierowania zwijaniem cząsteczki i precyzuje jej strukturę trzeciorzędową. Świadczy to również o dużym znaczeniu składu i długości fragmentów helikalnych.



Rys. 3.6. Efekty dalekiego zasięgu w cząsteczkach RNA. Przyłączenie dodatkowych elementów strukturalnych (kolor czerwony) lub zmiana struktury trzeciorzędowej prowadzi do przeniesienia informacji strukturalnej poprzez helikalny element łączący (kolor szary). Uzyskany rezultat może powodować zmiany allostaryczne w odległym miejscu, co przypomina przenoszenie energii w tzw. perpetuum mobile.

Wiązanie fragmentów kwasów nukleinowych na zasadzie komplementarności leży u podstaw wielu procesów biologicznych np. translacji, dimeryzacji RNA wirusów, interferencji RNA, aktywności katalitycznych RNA [Serikov i in. 2011]. Zaproponowano mechanizm tzw. inwazji oligonukleotydu (ON) (ang. oligonucleotide invasion) do natywnej struktury RNA. Pokazuje on w jaki sposób może dojść do indukcji zmian strukturalnych RNA i zwiększenia jej dostępności poprzez wymuszenie przejścia z formy dwuniciowej do jednoniciowej [Serikov i in. 2011]. Drożdżowy tRNA<sup>Phe</sup> inkubowano z oligonukleotydem komplementarnym do jego końca 3', a ich oddziaływania monitorowano z wykorzystaniem fluoroforu i "wygaszacza" (ang. quencher). Pierwszym etapem było utworzenie nietrwałych kompleksów pomiędzy nukleotydami tRNA i ON, w którym uczestniczą początkowo dwie cząsteczki oligonukleotydu. Jedna z nich oddziałuje z pętlą T, co prowadzi do rozplecenia ramienia akceptorowego tRNA, stanowiącego miejsce wiązania drugiego oligonukleotydu. Pierwszy ON oddysocjowuje od petli T. Te kooperatywne przejścia zwiazane sa z efektem strukturalnym oraz wewnętrzną destabilizacją, wywieranymi każdorazowo poprzez częściowe związanie lub dysocjację każdego z ON. Do inicjacji procesu inwazji oligonukleotydów wystarczy tworzenie jedynie kilku par zasad lub wiązań wodorowych. W podobny sposób można doprowadzić do inwazji oligonukleotydu w kształcie litery Z (tzw. ssZorro) do dupleksu DNA [Zaghloul i in. 2010]. Taki ON posiada dwa fragmenty komplementarne do DNA oraz element łączący.

Proces zwijania RNA (*in cis*) ma charakter kooperatywny, ale podobne oddziaływania mogą zachodzić również między dwoma cząsteczkami *in trans*. Znane są efektywne i specyficzne mechanizmy rozpoznawania cząsteczek RNA w oparciu o strukturę trzeciorzędową (np. rozpoznanie tRNA przez RNazę P) [Harris i Christian 2003]. Oddziaływanie elementów strukturalnych RNA wymaga ich rearanżacji, która w przypadku elementów typu spinka do włosów jest zależna od wielkości i składu nukleotydowego zarówno pętli, jak i helisy [Scott i in. 2009].

W komórce występuje olbrzymia puli fragmentów cząsteczek RNA [Tuck i Tollervey 2011]. W świetle tych doniesień regulacja aktywności rybozymu poprzez oddziaływanie z oligonukleotydem (inhibitorem, atenuatorem, [Silverman 2003]) oraz mechanizm inwazji oligonukleotydu [Serikov i in. 2011] ukazuje możliwości złożonych mechanizmów wpływających na aktywność i strukturę RNA *in vivo*.

Rozpoznawanie tRNA przez syntetazę aminoacylo-tRNA jest zależne od nawet najmniejszych zmian w sekwencji antykodonu tRNA [Stello i in. 1999]. Przyłączenie aminokwasu przy końcu 3' (CCA) zmienia właściwości strukturalne cząsteczki. tRNA bez aminokwasu nie dostają się do rybosomu. Związanie tRNA do kodonu mRNA może powodować rearanżacje struktury, których rezultatem jest ustawienie aminokwasu wobec tworzącego się wiązania peptydowego. Potwierdzają to porównania struktur tRNA wolnych i związanych na rybosomie [Giegé i in. 2011]. Wprowadzenie do układu miRNA hybrydyzującego do regionu 5'UTR mRNA poprawia wydajność translacji w środowisku pozakomórkowym (ang. cell-free protein synthesis, CFPS), co stanowi obiecującą alternatywę dla produkcji białek *in vivo* [Freischmidt i in. 2012]. Przyłączenie miRNA powoduje prawdopodobnie zmiany strukturalne ułatwiające dostępność sekwencji Shine-Dalgarno dla rybosomów. Niewykluczone, że niektóre niekodujące RNA (ang. non-coding RNA, ncRNA) mogą w podobny sposób działać *in vivo*. Stosowane w eksperymencie białka opiekuńcze RNA oraz helikazy RNA obniżały efektywność translacji [Freischmidt i in. 2012].

W latach 70-tych XX wieku odkryto, że tRNA jest podatny na hydrolizę z udziałem jonów ołowiu w obrębie pętli D [Brown i in. 1983]. Okazało się, że skrócony tRNA (pozbawiony pętli T) nie ulega reakcji [Krzyżosiak i in. 1988]. Sugerowano, że efekt ten jest związany z zmianami konformacyjnymi dalekiego zasięgu. Niektóre tRNA wykazują podatność na degradację w rezultacie długiego przechowywania, np. roślinny oraz ludzki

inicjatorowy tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> ulega hydrolizie w pętli antykodonu [Perbandt i in. 2003]. Nie dotyczy to jednak tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> z drożdży i tRNA<sup>fMet</sup> *E. coli*. Za efekt ten odpowiadają duże zmiany konformacyjne związane z różnicą w jednym nukleotydzie pętli antykodonu (U33 lub C33), która zwiększa podatność na hydrolizę [Perbandt i in. 2003].

Wprowadzenie mutacji do miejsc zaangażowanych w oddziaływania trzeciorzędowe oddalone od centrum katalitycznego rybozymu *Tetrahymena* prowadziło do spadku jego aktywności (20-100-krotnego) [Benz-Moy i Herschlag 2011]. Wpływ elementów stabilizujących strukturę trzeciorzędową przenosi się w postaci efektów dalekiego zasięgu i może determinować aktywność katalityczną RNA. RNA i białka mają podobną organizację centrów katalitycznych, ale w przypadku kwasów nukleinowych niewiele wiadomo na temat wpływu zmian szerszego strukturalnego kontekstu na aktywność cząsteczki [Benz-Moy i Herschlag 2011].

#### 3.2. Katalityczne kwasy nukleinowe

Katalityczne kwasy nukleinowe (rybozymy, DNAzymy, leadzym) charakteryzują się obecnością wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań trzeciorzędowych i przeprowadzają transestryfikację RNA, hydrolizę/ligację, syntezę peptydu, fosforylację, adenylację aminokwasów, polimeryzację RNA, reakcję aldolową, utlenianie alkoholi, redukcję aldehydów, syntezę nukleotydów pirymidynowych, aminoacylację i wiele innych [Silverman 2008]. Reakcje katalizowane przez RNA oraz DNA przebiegają bez udziału dodatkowych czynników białkowych [Scherer i Rossi 2003].

#### 3.2.1. Rybozym typu hammerhead

Rybozym o strukturze typu głowa młotka (ang. hammerhead ribozyme, HHRz) ze względu na niewielkie rozmiary i dużą aktywność od 25 lat stanowi model do badań relacji struktury i funkcji RNA [Perrault i in. 2011]. Został odkryty jako samowycinający się fragment genomowego RNA roślinnych wiroidów i wirusoidów [Bruening, 1989].


Rys. 3.7. Minimalny (po lewej) i wydłużony (po prawej) rybozym typu hammerhead w kompleksach z substratami. (A) Struktury drugorzędowe. (B-C) Struktury trzeciorzędowe. N - oznacza dowolny nukleotyd, H - każdy nukleotyd z wyjątkiem G, H1, H2, H3 – numeracja helis. Domena katalityczna została przedstawiona kolorem czerwonym (sekwencja CUGAUGA) oraz zielonym (sekwencja GAA), a substrat kolorem żółtym. Niebieskimi ramkami zaznaczono oddziaływania pomiędzy pętlą ramienia II a wybrzuszeniem w ramieniu I. Miejsce transestryfikacji oznaczono strzałką. Numeracja nukleotydów zgodnie z [Hammann, 2002].

Redukując wielkość cząsteczki, zidentyfikowano najprostszy aktywny wariant, tzw. minimalny rybozym hammerhead (HHRz<sup>M</sup>), katalizujący transestryfikację wiązania fosfodiestrowego w docelowych RNA *in trans* [Uhlenbeck, 1987]. Jego struktura drugorzędowa przypomina kształtem literę "Y" i składa się z trzech ramion (HI, HII, HIII), które otaczają wysoce zachowawczą domenę katalityczną (rdzeń katalityczny) (Rys. 3.7). Helisy II i III ułożone są współosiowo, podczas gdy helisa I leży pod kątem ostrym do helisy II. Wszystkie występują w konformacji typu A RNA. Kieszeń katalityczną tworzy sekwencja (3)CUGAUGA(9) z charakterystycznym motywem U-skrętu między nukleotydami U4 i G5 oraz nukleotydy (12)GAA(14) [Pley i in. 1994]. Trzeciorzędowa struktura minimalnego rybozymu typu hammerhead w kompleksie z substratem została rozwiązana 20 lat temu (Rys. 3.8) [Pley i in. 1994, Scott i in. 1995, Scott i in. 1996].

W rybozymach katalizujących reakcje w układzie *in trans* (transestryfikacja odrębnej cząsteczki RNA) helisy I i III tworzone są przez hybrydyzację katalitycznego RNA z komplementarnymi sekwencjami substratu. Rybozymy hammerhead w układzie *in cis* (transestryfikacja własnej cząsteczki) można podzielić na trzy typy, w zależności od tego, która z helis zawiera końce 5' i 3' (helisa I – typ 1, helisa II – typ 2, helisa III – typ 3) (Rys. 3.8) [Burke i Greathouse 2005, Roychowdhury-Saha i in. 2011].

Wykazano, że dodatkowe elementy strukturalne występujące w naturalnych rybozymach hammerhead odgrywają istotną rolę w stabilizacji aktywnej konformacji cząsteczki, co zwiększa aktywność katalityczną *in vitro* oraz *in vivo* [Khforova i in. 2003]. Warianty te nazywane są rybozymami pełnej długości (ang. full-length) lub wydłużonymi (ang. extended) (HHRz<sup>W</sup>). W 2006 roku rozwiązano trzeciorzędową strukturę takiego rybozymu w kompleksie z RNA zawierającym grupę 2'-O-metylową w miejscu transestryfikacji [Martick i Scott 2006]. Najbardziej charakterystyczną cechą pełnej długości rybozymu HHRz<sup>w</sup> jest oddziaływanie pomiędzy pętlą ramienia II i wybrzuszeniem w ramieniu I, warunkujące tworzenie stabilnej i aktywnej konformacji domeny katalitycznej (Rys. 3.7 i 3.8) [Khvorova i in. 2003]. Rybozym ten jest cząsteczką dwukrotnie większą niż wariant minimalny. Kształtem przypomina literę " $\gamma$ ", gdzie ramię II leży w jednej osi z ramieniem III. Zarówno kieszeń katalityczna, jak i U-skręt różnią się znacznie od obserwowanych w wariancie minimalnym [Martick i Scott 2006].



Rys. 3.8. Motyw łączenia trzech helis RNA w kształcie litery "Y" w rybozymach. (A) Trzy typy rybozymów hammerhead in cis w zależności od tego, która z helis zawiera końce 5' i 3' cząsteczki. Kropkami zaznaczono miejsca oddziaływań trzeciorzędowych. Cyframi I, II, III oznaczono helisy rybozymu. Helisy II i III oddziałują współosiowo (zielona strzałka), pętle helis I i II biorą udział w ustaleniu oddziaływań trzeciorzędowych (niebieska strzałka). (B) Rybozymy hammerhead in trans. Kolor pomarańczowy - nić substratu, kolor czarny i niebieski – nic rybozymu. HHRz<sup>M</sup> - rybozym minimlany, HHRz<sup>W</sup> – rybozym wydłużony.

## 3.2.2. Porównanie rybozymu minimalnego z wydłużonym

Zaobserwowano duże różnice aktywności oraz właściwości strukturalnych pomiędzy minimalnym i wydłużonym rybozymem hammerhead. W strukturze rdzenia katalitycznego HHRz<sup>M</sup> można wyróżnić dwie odrębne domeny (Rys. 3.9). Zasada G8 oddziałuje z A13 pomiędzy parami G12-A9 i A14-U7 w obrębie domeny 2, natomiast reszta C17 połączona jest z C3 jednym wiązaniem wodorowym znajdując się pomiędzy parą G2.1-C1.1 a U4 w obrębie domeny 1 [Nelson i Uhlenbeck 2008A]. Produkt 5' reakcji katalizowanej przez

cząsteczki pozbawione oddziaływań trzeciorzędowych oddysocjowuje 100-300 razy szybciej niż w przypadku wydłużonego rybozymu [Shepotinovskaya i Uhlenbeck 2010]. W HHRz<sup>W</sup> rdzeń katalityczny zwija się wokół reszty C17, co utrudnia uwalnianie produktów. Usunięcie reszty C17 powoduje oddysocjowanie produktu reakcji z prędkością porównywalną do produktu 5' minimalnego HHRz<sup>M</sup> [Shepotinovskaya i Uhlenbeck 2010].

Centrum katalityczne rybozymu wydłużonego zwija się w jeden zwarty rdzeń, w którym atakowany fosforan sąsiaduje z resztami o potencjalnie katalitycznym charakterze (Rys. 3.9). Oddziaływania pętla:wybrzuszenie w rybozymie o pełnej długości powodują zmianę miejsca aktywnego poprzez umieszczenie nukleotydów G8 oraz U7 w kieszeni katalitycznej (Rys. 3.7, Rys. 3.9) [Nelson i Uhlenbeck 2008A]. G8 znajduje się w pozycji zajmowanej przez nukleotyd C17 w strukturze rybozymu minimalnego tworząc wiązania typu Watsona-Cricka z C3, natomiast U7 leży w bliskim sasiedztwie U4. Para C3-G8 jest zlokalizowana pomiędzy terminalną parą G2.1-C1.1 helisy I a U7. Zastąpienie nukleotydów C3 i G8 innymi, z zachowaniem parowania zasad, utrzymuje aktywność katalityczną rybozymu [Przybilski i Hammann 2007]. Obecność dodatkowych nukleotydów w obrębie kieszeni katalitycznej powoduje przesunięcie reszty C17 (miejsce transestryfikacji) w bezpośrednie sasiedztwo centrum katalitycznego (G12, A13 i A14). Struktura wydłużonego rybozymu wskazuje na udział nukleotydów G8 i G12 w mechanizmie katalizy kwasowozasadowej [Martick i Scott 2006]. W obrębie rdzenia katalitycznego dochodzi do obrotu G8, która tworzy parę z A13 helisy II w strukturze o niskiej aktywności, natomiast parę z C3 helisy I w strukturze aktywnej. Wiązania wodorowe G10.1-C11.1, A15.1-U16.1 oraz C3-G8 są prawdopodobnie niezbędne do stabilizacji rdzenia katalitycznego [Nelson i Uhlenbeck 2008B]. Wydłużone rybozymy hammerhead z reguły wykazują wysoką aktywność in vitro, często 50 do 500 razy lepszą niż wariant minimalny [Saksmerprome i in. 2004, Carbonell i in. 2011, Nelson i Uhlenbeck 2008B].

Na podstawie symulacji komputerowych rybozymów oraz ich mutantów zaproponowano, że parowanie zasad Watsona-Cricka pomiędzy G8 i C3, sieć wiązań wodorowych pomiędzy C17 a G5 oraz oddziaływania warstwowe (ang. base stacking) zasad G8 i C1.1 są kluczowe dla utrzymania aktywnej konformacji rybozymu [Lee i York 2010]. Oddziaływania te umożliwiają ułożenie liniowe grupy atakującej, fosforanu i grupy opuszczającej [Scott i in. 2009]. Aktywna konformacja rybozymu minimalnego odpowiada podstawowej konformacji rybozymu wydłużonego.



Rys. 3.9. Centrum katalityczne minimalnego (A) i wydłużonego (B) rybozymu hammerhead. Miejsce transestryfikacji oznaczono strzałką. Numeracja nukleotydów zgodnie z [Hammann, 2002]. (A) W rybozymie minimalnym zasada G8 oddziałuje z A13 pomiędzy parami G12-A9 i A14-U7 w obrębie domeny 2, natomiast reszta C17 połączona jest z C3 jednym wiązaniem wodorowym znajdując się pomiędzy parą G2.1-C1.1 a U4 w obrębie domeny 1. (B) W rybozymie wydłużonym nukleotydy G8 oraz U7 umieszczone są w kieszeni katalitycznej. G8 znajduje się w pozycji zajmowanej przez nukleotyd C17 w strukturze rybozymu minimalnego tworząc wiązania typu Watsona-Cricka z C3, natomiast U7 leży w bliskim sąsiedztwie U4. Para C3-G8 jest zlokalizowana pomiędzy terminalną parą G2.1-C1.1 helisy I a U7. Obecność dodatkowych nukleotydów w obrębie kieszeni katalitycznej powoduje przesunięcie położenia reszty C17 (miejsce transestryfikacji) w bezpośrednie sąsiedztwo centrum katalitycznego (G12, A13 i A14). Domeny katalityczne zaznaczono szarymi owalami.

Reakcje transestryfikacji i ligacji katalizowane przez minimalny rybozym hammerhead mogą być opisane przez trzy składowe: i)  $K_u$  - szybka izomeryzacja pomiędzy wieloma nieaktywnymi konformacjami rybozymu przed reakcją i jedną aktywną, ii)  $K_{int}$  kataliza prowadzona przez aktywny rybozym zależna od równowagi pomiędzy stałymi reakcji transestryfikacji (k<sub>2</sub>) a ligacji (k<sub>-2</sub>); iii)  $K_c$  - szybka izomeryzacja jednej aktywnej konformacji po reakcji do wielu możliwych konformacji nieaktywnych (Rys. 3.10) [Nelson i Uhlenbeck 2008A]. Na tej podstawie oszacowano, że przeciętnie rybozym przed reakcją przyjmuje aktywną konformację tylko przez 0,2% czasu, a po transestryfikacji pozostaje w tej konformacji przez 0,03% czasu [Nelson i Uhlenbeck 2008A].



Rys. 3.10. Schemat równowagi dynamicznej reakcji transestryfikacji-ligacji rybozymu minimalnego. (A) Większość cząsteczek rybozymu hammerhead przed transestryfikacją tworzy dynamiczną pulę struktur, które przypominają strukturę krystaliczną rybozymu minimalnego. (B) Niewielka frakcja cząsteczek zdefiniowana przez stałą równowagi  $K_u$  nietrwale przyjmuje aktywną konformację, która przypomina strukturę krystaliczną rybozymu wydłużonego. Wewnętrzna stała równowagi transestryfikacji/ligacji ( $K_{int}$ ) opisana jest jako stosunek stałej transestryfikacji ( $k_2$ ) i ligacji ( $k_{-2}$ ). (C) Struktura aktywnej cząsteczki po reakcji znajduje się w równowadze  $K_c$  z mieszaniną nieaktywnych struktur, które przypominają strukturę krystaliczną rybozymu minimalnego. (D) Cząsteczki rybozymu hammerhead po reakcji tworzą dynamiczną pulę struktur [na podstawie Nelson i Uhlenbeck 2008A]. Czarny – rybozym, niebieski - substrat przed reakcją; zielony - produkty reakcji.

Porównanie struktur dwóch wydłużonych HHRz<sup>w</sup> Smα i sTRSV o różnych wartościach K<sub>int</sub> pozwoliło na postawienie hipotezy o istnieniu mechanizmu konformacyjnego przełącznika pomiędzy reakcją transestryfikacji i ligacji. Miałby on działać poprzez zmiany w regionach oddziaływań trzeciorzędowych jak i w rdzeniu katalitycznym [Scott i in. 2009]. Interakcje pomiędzy pętlą GNRA rybozymu a wybrzuszeniem helisy I zależą od ekspozycji reszty A do utworzenia wiązania typu Hoogsteen i są związane z termodynamiczną rywalizacją z konformacją kanoniczną charakterystyczną dla odizolowanej pętli. Z kolei w wielu przypadkach naturalnych wydłużonych rybozymów hammerhead konserwatywna zasada U tworząca parę typu Hoogsteen z A pętli ma możliwość tworzenia równocześnie pary

AU lub GU. Zatem elementy strukturalne mogą występować w różnych konformacjach [Scott i in. 2009].

## 3.2.3. Reakcja transestryfikacji

Reakcja transestryfikacji zachodzi spontanicznie bardzo wolno z szybkością ~  $10^{-7}$  min<sup>-1</sup>, co odpowiada zerwaniu jednego wiązania fosfodiestrowego na rok, natomiast w przyrodzie z największą szybkością katalizuje ją rybonukleza A (RNaza A), przyspieszając ją 12-krotnie [Emilsson i in. 2003]. Okres półtrwania wiązania w RNA w obecności RNazy A wynosi kilka mikrosekund. Enzym ten wykorzystuje cztery strategie katalityczne: i) liniowe ułożenie atomów uczestniczących w reakcji, ii) neutralizacja ujemnego ładunku tlenu niemostkowego przy atomie fosforu, iii) deprotonacja nukleofila 2'OH, iv) protonacja 5'O grupy odchodzącej [Emilsson i in. 2003]. Katalityczne kwasy nukleinowe wykorzystują kombinacje wyżej wymienionych strategii, jednak szybkość reakcji nie przekracza ~2 min<sup>-1</sup>, co sugeruje, że korzystają w pełni jedynie z dwóch z nich [Breaker i in. 2003].

Rybozym hammerhead HHRz rozpoznaje sekwencję w RNA według reguł parowania typu Watsona-Cricka. Długość i skład nukleotydowy ramion otaczających miejsce transestryfikacji powinny zapewniać na tyle silne wiązanie rybozymu HHRz do substratu, aby uniemożliwić przedwczesne oddysocjowanie [Fedor i Uhlenbeck, 1990]. Rybozym hammerhead katalizuje transestryfikację substratów po sekwencji 5'-NUH-3', gdzie N oznacza dowolny nukleotyd, U urydynę natomiast H adenozynę, cytozynę lub urydynę niezwiązaną wiązaniami wodorowymi. Stała szybkości reakcji katalizowanej przez rybozym HHRz in vitro maleje w następującym porządku: GUC, AUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA >UUU, CUU [Sun i in. 2000]. Szybkość reakcji jest także zależna od nukleotydu w pozycji -1 względem sekwencji 5'-NUH-3' zgodnie z preferencją U>C>A>G [Lee i in. 2011]. W przypadku rybozymów minimalnych obserwowano nawet 70krotne różnice szybkości transestryfikacji in vitro dla różnych substratów [Fedor i Uhlenbeck, 1990]. Rozbieżność ta może być związana z szybkością dysocjacji produktów oraz drobnymi zmianami w strukturze [Sawata i in. 1993]. Tolerancja podstawień niektórych nukleotydów rdzenia katalitycznego wskazuje, że system oddziaływań elementów struktury drugorzędowej oraz trzeciorzędowej mimo odległości moduluje lokalną strukturę centrum katalitycznego [Przybilski and Hammann, 2007].

Rybozymy przy fizjologicznym pH katalizują wewnętrzną reakcję transestryfikacji ze sprawnością porównywalną do enzymów białkowych. Według ogólnego mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej funkcję zasady pełnią pary elektronów zasad heterocyklicznych

kwasów nukleinowych [Westhof 1999]. Grupa 2'-OH rybozy przeprowadza atak nukleofilowy na 3' fosforan zgodnie z modelem reakcji SN2, a produkty reakcji posiadają 2',3'-cykliczny fosforan oraz grupę 5'-OH (Rys. 3.11) [Ferre-D'Amare i Scott 2010]. Reszta G12(N1) odgrywa rolę kwasu, natomiast G8(2'OH) – zasady [Rios i Tor 2009]. Grupa atakująca, fosforan w miejscu transestryfikacji oraz grupa opuszczająca ułożone są w linii prostej. W pierwszym etapie następuje utworzenie aktywnej konformacji kompleksu rybozym:substrat, następnie transestryfikacja wiązania internukleotydowego oraz oddysocjowanie produktów reakcji. Rybozym może transestryfikować kolejny substrat [Fedor i Uhlenbeck 1990].



Rys. 3.11. Mechanizm katalizy kwasowo-zasadowej rybozymu hammerhead (na podstawie [Doherty, 2001]). W wyniku ataku nukleofilowego grupy 2'-OH rybozy w na wiązanie fosfodiestrowe powstają produkty reakcji, z których jeden zakończony jest 2',3'-cyklicznym fosforanem, a drugi grupą 5'-OH. H-A – ogólny kwas, :B – ogólna zasada, Z – zasada azotowa.

Centrum katalityczne rybozymu hammerhead musi spełniać następujące warunki: i) zasada G12 musi znajdować się w położeniu umożliwiającym deprotonację grupy nukleofilowej (C17 2'OH) w celu utworzenia aktywnego prekursora; ii) zmiany konformacji miejsca aktywnego muszą zapewnić ułożenie liniowe aktywowanego nukleofila (C17 2'OH) i atakowanej reszty fosforanowej; iii) integralność miejsca aktywnego, a także bliskość A9 i atakowanego fosforanu muszą pozwolić na wiązanie jonu dwuwartościowego, iv) reszta G8 musi być utrzymana w pozycji umożliwiającej oddanie protonu grupie opuszczającej (C1.1 5'O) [Lee i York 2010].

Stała Michaelis-Menten dla rybozymów wyznaczana jest w warunkach wieloi jednokrotnego udziału rybozymu w reakcji [Fedor i Uhlenbeck 1990; Stage-Zimmermann i Uhlenbeck 1998]. Wartości  $K_{cat}$  i  $K_M$  dla rybozymów hammerhead zazwyczaj mieszczą się odpowiednio w zakresie 1-2 min<sup>-1</sup> i 20-200nM [Sun i in. 2000]. Protonacja 5'O powinna zajść przed utworzeniem pentakoordynacyjnego dianionu lub tylko wtedy, gdy fosforan występuje w formie uprotonowanego monoanionu [Emilsson i in. 2003]. Odłączenie grupy opuszczającej jest prawdopodobnie czynnikiem determinującym szybkość reakcji katalitycznej [Emilsson i in. 2003].

Obserwowalna stała szybkości reakcji dla katalitycznych kwasów nukleinowych zależy także od czasu potrzebnego na hybrydyzację do substratu zgodnie z komplementarnością zasad czy przyjęcie natywnej konformacji kompleksu. Wymienione cztery strategie mogą być wykorzystywane przez rybozymy w formie jednej z 16 (2<sup>4</sup>) możliwych kombinacji, uzależnionych od wewnętrznej budowy cząsteczki. Zmiana szybkości reakcji o daną wartość może być rezultatem całkowicie odmiennych rearanżacji wewnątrz cząsteczki, wpływających w określonym stopniu na element składowy reakcji [Emilsson i in. 2003].

### 3.2.4. DNAzym typu 10-23

W latach 90-tych XX wieku po raz pierwszy pokazano, że DNA uzyskany metodą selekcji *in vitro* może katalizować transestryfikację wiązania fosfodiestrowego w RNA pod wpływem jonów ołowiu [Breaker i Joyce 1994]. Reakcja ta polega na ataku nukleofilowym grupy 2'-hydroksylowej na najbliższe wiązanie fosfodiestrowe z utworzeniem produktów posiadających 2',3'-cykliczny fosforan oraz grupę 5'hydroksylową [Baum i Silverman 2008]. Nie są znane żadne DNAzymy pochodzenia naturalnego.

Najbardziej znanymi cząsteczkami tej klasy są DNazymy 10-23 oraz 8-17, nazwane ze względu na indywidualne numery cyklu selekcji *in vitro* (pierwsza cyfra) oraz uzyskanych klonów (druga cyfra) (Rys. 3.12) [Santoro i Joyce 1997]. Oba do aktywności wymagają jonów magnezu. DNAzymy mają wysoki potencjał do zastosowania jako praktyczne narzędzia loboratoryjne [Höbartner i Silverman 2007].

Porównując DNAzymy oraz rybozymy pod względem chemicznym różnią się obecnością (RNA) lub brakiem (DNA) grupy 2'OH, która często uczestniczy w tworzeniu wiązań wodorowych. Sugeruje to, że DNA może być słabszym katalizatorem niż RNA [Baum i Silverman 2008]. Brak 2'OH przyczynia się również do mniejszej ilości oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych i większej prostoty strukturalnej cząsteczek DNA. Jednakże eksperymenty wskazują, że tempo przyspieszania reakcji przez katalityczne RNA i DNA jest

podobne [Chandra i Silverman 2008]. W porównaniu do rybozymu, DNAzymy wykazują jednak wyższą stabilność chemiczną i biologiczną, a ich synteza jest prostsza i tańsza [Baum i Silverman 2008]. Analiza właściwości katalitycznych tych cząsteczek *in vitro* wobec tych samych substratów wykazała, że DNAzymy mogą mieć wyższy potencjał katalityczny [Kurreck i in. 2002] (Rys. 3.13). Deoksyrybozymy transestryfikujące RNA stanowią uniwersalne narzędzia biochemiczne i analityczne *in vitro*, jak i *in vivo* [Baum i Silverman 2008].



Rys. 3.12. DNAzymy 10-23 oraz 8-17 (kolor zielony) katalizujące transestryfikację docelowego RNA (kolor czarny). Miejsce transestryfikacji zaznaczono czerwoną strzałką. R – puryna, Y – pirymidyna.



Rys. 3.13. Porównanie przyspieszenia reakcji katalitycznych przez trzy klasy cząsteczek mających zdolność transestryfikacji RNA. Na podstawie [Santoro i Joyce 1997, Breaker 2000].

# 3.3. Charakterystyka wybranych elementów struktury drugorzędowej związanych z katalitycznymi RNA

# 3.3.1. Czteronukleotydowe pętle i ich receptory

Receptory czteronukleotydowych pętli (ang. tetraloop receptor, TLR) (GNRA oraz GANC) występują powszechnie w RNA [Butcher i Pyle 2011]. Zidentyfikowano kilka typów TLR. Najbardziej skomplikowany receptor stanowi 11-nukleotydowy wysoce zachowawczy motyw wewnętrznej pętli (11nt-TLR), specyficznie i silnie wiążący GAAA oraz motyw IC3 o mniejszej specyficzności wobec GNRA [Butcher i Pyle 2011]. Na podstawie analizy struktury krystalograficznej intronów grupy I opisano oddziaływania pomiędzy GAAA a 11nt-TLR. Obejmują one dwa główne elementy: i) druga adenina GAAA oddziałuje warstwowo tworząc platformę A-A (rzadziej A-C), tworzoną wewnątrz pętli receptora oraz tworzy dodatkowe wiązania wodorowe z TLR; ii) pozostałe zasady TL zaangażowane są w tworzenie sieci wiązań wodorowych z parami GC helisy receptora [Cate i in. 1996]. Inne typy TLR mogą wykorzystywać tylko jedną z wymienionych strategii [Butcher i Pyle 2011]. Najprostsza klasę TLR stanowią tandemowe powtórzenia par G-C helisy, które tworzą wiązania wodorowe z zasadą i rybozą nukleotydów w pozycji 3 i 4 czteronukleotydowej pętli [Butcher i Pyle 2011].

Czteronukleotydowa pętla GAAA oraz jej receptor były przedmiotem intensywnych badań strukturalnych zarówno w formie związanej, jak i osobno [Butcher i in. 1997, Cate i in. 1996, Davis i in. 2005]. Oddziaływanie GAAA-TLR w przypadku domeny P4-P6 rybozymu *Tetrahymena* funkcjonuje jako termodynamiczna klamra spinająca domenę po zakończeniu procesu zwijania [Young i Silverman 2002, Fiore i in. 2009]. Jednakże w warunkach zbliżonych do fizjologicznych oddziaływanie to wykazuje pewną niestabilność [Fiore i in. 2009].

W oddziaływaniu pętli GAAA z 11-ntTLR można wyróżnić submotywy, które wchodzą w skład receptora (uchwyt UA, ang. UA handle oraz platformę AA), a także składowe pętli GNRA (skręt U, ang. U-turn, tworzenie pary G/RA). Dodatkowym elementem powstającym w wyniku interakcji *de novo* jest oddziaływanie typu A-minor pomiędzy czwartą adeniną pętli i parą GC TLR oraz zamek rybozowy, w którym dwie grupy hydroksylowe TL i receptora tworzą dwa wiązania wodorowe [Vander Meulen i in. 2008, Geary i in. 2008]. Dalsza stabilizacja prowadzi do utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy drugą adeniną i submotywem uchwytu UA oraz oddziaływania warstwowego drugiej adeniny z platformą AA.

Oddziaływania typu A-minor występują pomiędzy powtarzającymi się resztami adenin a dwoma parami zasad w obrębie mniejszej bruzdy helikalnego receptora [Geary i in. 2008]. Najczęściej powstaje w ten sposób do czterech wiązań wodorowych pomiędzy adeniną a płaszczyzną N1-C2-N3 pary zasad w orientacji *in trans* [Nissen i in. 2001]. Często oddziaływanie to jest częścią wiązania pętli GNRA z receptorem TLR [Geary i in. 2008].

#### 3.3.2. Motyw połączenia trzech helis

Połączenia helis RNA (ang. RNA junction, multi-branch loop) stanowią ważne elementy strukturalne i funkcjonalne. Ten powszechny motyw stanowi między innymi domenę autokatalityczną rybozymu hammerhead (Rys. 3.7, 3.8), odpowiada za rozpoznawanie liganda przez domenę wiążącą ryboprzełącznika purynowego oraz inicjację translacji wirusa HCV (ang. hepatitis C virus) w miejscu IRES (ang. internal ribosome entry site) [Laing i in. 2012]. Cechą charakterystyczną tych połączeń jest współosiowe oddziaływanie helis, zapewniające termodynamiczną stabilność cząsteczce jako całości i zbliżające regiony pętli i wybrzuszeń, które mogą ze sobą potencjalnie oddziaływać [Butcher i Pyle 2011].

Na przykładzie analizy tRNA zaobserwowano, ze wybór helisy oddziałującej współosiowo jest elementem krytycznym i determinuje ogólny kształt cząsteczki [Butcher i Pyle 2011]. Połączenia dwóch pętli oraz pseudowęzły to przykłady elementów strukturalnych całkowicie zależne od oddziaływań warstwowo-współosiowych budujących je helis. Chociaż wpływ sekwencji jest istotny, oddziaływania te mogą być determinowane przez warunki jonowe oraz cechy topologiczne [Bailor i in. 2010]. Kąty, opisujące ułożenie helis w miejscach połączeń, różnią się nieznacznie od siebie. Ograniczają one elastyczność struktury oraz ilość możliwych stanów konformacyjnych [Butcher i Pyle 2011].

Wyróżniono rodziny topologiczne elementu połączenia trzech helis w zależności od kąta, pod którym ułożona jest trzecia helisa względem dwóch pozostałych ułożonych współosiowo (rodzina A, B, C) [Lescoute i Westhof 2006]. Jeżeli dwie helisy nie są odseparowane żadnym nukleotydem, to oddziałują warstwowo, gdy trzecia jest od nich oddzielona dłuższym łącznikiem [Lescoute i Westhof 2006]. W przypadku, gdy elementy łączące są równej długości o oddziaływaniu współosiowym decyduje energia swobodna zależna od par zasad Watsona-Cricka [Walter i Turner 1994].

#### 3.3.3. Motywy stabilizujące strukturę trzeciorzędową rybozymów

Rybozymy hammerhead stabilizowane poprzez trzeciorzędowe motywy (ang. tertiary stabilizing motif, TSM) wykazują wysoką aktywność katalityczną *in vitro* oraz *in vivo* w

układzie *in trans* [Carbonell i in. 2011]. Chociaż oddziaływania te mają miejsce w dużej odległości od centrum katalitycznego rybozymu, wpływają na jego strukturę poprzez zmiany geometrii cząsteczki [Shepotinovskaya i Uhlenbeck 2010].

Badając dynamikę konformacyjną wydłużonych rybozymów hammerhead z wykorzystaniem techniki FRET (ang. fluorescence resonance energy transfer) wykazano, że oddziaływania pętli ramion I i II zwiększają aktywność cząsteczki. Podobną rolę pełnią jony Mg<sup>2+</sup> dla rybozymu minimalnego. Pozwalają one cząsteczkom częściej przyjmować konformację katalitycznie aktywną [McDowell i in. 2010]. Oddziaływania donora oraz akceptora fluoroforu zlokalizowanych przy końcach ramion I i II jako funkcji stężenia jonów magnezu wykazały, że zwijanie się rybozymu w tym rejonie i uzyskiwanie aktywnej konformacji zachodzą dwuetapowo [McDowell i in. 2010]. Stężenia jonów magnezu w dwóch etapach zmian konformacji rybozymu wydłużonego są niższe niż dla rybozymu minimalnego [Rueda i in. 2003]. Potwierdzono, że oddziaływania wybrzuszeń helis I i II prowadzą do zmian struktury rybozymu w oddalonym o ponad 10 Å miejscu aktywnym, co jest skorelowane z większa aktywnościa katalityczna [McDowell i in. 2010]. Ich usunięcie prowadzi do utworzenia struktury charakterystycznej dla minimalnego rybozymu z zachowaniem orientacji helis i rearanżacja rdzenia katalitycznego do konformacji otwartej nieaktywnej [Nelson i Uhlenbeck 2008B]. Tego typu mechanizm allosteryczny obserwowany jest w przypadku innych motywów ze strukturą typu "Y" [De la Pena i in. 2009].

Motywy TSM pochodzenia naturalnego w rybozymach hammerhead nie są zachowawcze ewolucyjnie. W przypadku rybozymu hammerhead virusa sTRSV (ang. satellite RNA of tobacco ringspot virus) potwierdzono tworzenie pary zasad typu Hoogsteen pomiędzy adeniną pętli helisy HHRz a uracylem niehelikalnego regionu helisy I [Chi i in. 2008]. Oddziaływanie to występuje w większości naturalnych rybozymów hammerhead, co wskazuje na jego istotność funkcjonalną. Interakcje pomiędzy pętlami helis I i II mogą zachodzić w obrębie bruzdy RNA. W rezultacie zmian konformacyjnych reszta A przy końcu 3' pętli helisy II może tworzyć parę z wyeksponowaną resztą U przy końcu 5' pętli helisy I [Dufour i in. 2009]. Te cechy oddziaływań trzeciorzędowych występują w wielu naturalnych HHRz [Dufour i in. 2009].

#### 3.4. Wewnątrzkomórkowe czynniki determinujące aktywność rybozymów

#### 3.4.1. Jony metali

Na aktywność rybozymów *in vivo* wpływa stężenie jonów magnezu, woda, siła jonowa, temperatura, pH, dostępność substratu, oddziaływanie ze składnikami komórkowymi oraz kompartmentacja [Chen i in. 2009]. Utworzenie dupleksu oraz przyjmowanie złożonych struktur trzeciorzędowych jest możliwe dopiero po zrównoważeniu ujemnego ładunku łańcucha fosforanowo-cukrowego kwasów nukleinowych [Schnabl i Sigel 2010]. Z tego względu, RNA i DNA występują w komórce w postaci zasocjowanej z kationami. Kationy dwuwartościowe biorą udział w oddziaływaniu elektrostatycznym, które może mieć znaczący wpływ na aktywność katalityczną [Leclerc 2010]. Kationy wielowartościowe lepiej stabilizują RNA ponieważ silniej oddziałują z ujemnie naładowanymi łańcuchami i mogą występować w mniejszej ilości [Woodson 2010A].

Zmiana jonów metali w mieszaninie reakcyjnej z reguły wywiera silny wpływ na aktywność rybozymów (Tab. 3.6) [Schnabl i Sigel 2010]. Wszystkie jony metalu (M<sup>n+</sup>) mogą wpływać na przyjmowanie aktywnej konformacji przez rybozym hammerhead, ale obserwowane między nimi różnice w przyspieszeniu reakcji katalitycznej sięgają rzędu 10<sup>4</sup>, z których Mn<sup>2+</sup> jest najlepszym kofaktorem [Schnabl i Sigel 2010].

Analizując struktury krystaliczne rybozymów hammerhead stwierdzono, że zarówno w miejscu katalitycznym, jak i w jego najbliższym otoczeniu brak jonów magnezu [Pley i in. 1994; Scott i in. 1995; Martick i Scott 2006]. Zaproponowano model, w którym jony metalu wpływają na stabilizację struktury cząsteczki. Potwierdzały to eksperymenty z chemiczną modyfikacją wymienionych zasad oraz obserwacje, że rybozymy hammerhead są aktywne w obecności wyłącznie jonów jednowartościowych (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) czy poliamid organicznych [Murray i in. 1998]. Istnieje również związek pomiędzy aktywnością rybozymu a zależnością G8 i G12 od pH [Han i Burke 2005, Thomas i Perrin 2009]. Wpływ pH środowiska, jak również grup funkcyjnych jest taki sam w przypadku transestryfikacji z udziałem rybozymu HHRz w obecności kationów jedno- i dwuwartościowych [Curtis i Bartel, 2001; O'Rear i in. 2001].

W warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (ang. high hydrostatic pressure, HHP) wykazano, że jony magnezu stabilizują strukturę rybozymu i nie są bezpośrednio zaangażowane w katalizę, a reakcja może być rozpatrywana jako kwasowa hydroliza estrów [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2007, Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009A]. Pod wpływem ciśnienia dochodzi do dysocjacji cząsteczek wody. W pierwszym etapie następuje przyłączenie protonu do tlenu grupy fosforanowej, co powoduje, że staje się ona podatna na atak nukleofilowy grupy 2'-OH rybozy zawierającej wolną parę elektronową (Rys. 3.11). Po utworzeniu pięcioskoordynacyjnego stanu przejściowego, następuje protonacja atomu 5'O i w konsekwencji zerwanie wiązania pomiędzy fosforem a tlenem [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B, Fedoruk-Wyszomirska i in. 2007].

Tab. 3.6. Występowanie niektórych jonów w komórce i ich wpływ na aktywność katalityczną rybozymu hammerhead Schistosoma. B.d. – brak danych.  $k_{obs}$  (min<sup>-1</sup>) obliczone dla reakcji w warunkach: w 0.1 M NaCl i 1 mM  $M^{2+}$  lub 600 mM  $M^+$  (SchistosomaHH). Na podstawie [Boots i in. 2008, Schnabl i Sigel 2010, Williams i Fraústo da Silva 2000].

Jon	Stężenie w cytoplazmie [M]	Stężenie toksyczne w cytoplazmie [M]	Główny przedział komórkowy, w którym występuje	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )
$Mg^{2+}$	10 <sup>-3</sup>	10-1	Cytoplazma	2.6
Mn <sup>2+</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	Aparat Goldiego Mitochondrium	200
Fe <sup>2+</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	Cytoplazma	b.d.
Na <sup>+</sup>	b.d.	10-1	Zewnątrzkomórkowo	< 0.02
Ca <sup>2+</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-3</sup>	Retikulum endoplazmatyczne	0.14
Zn <sup>2+</sup>	10-11	10 <sup>-9</sup>	Pęcherzyki	82
Cu <sup>2+</sup>	10 <sup>-15</sup>	10 <sup>-9</sup>	Aparat Goldiego, Retikulum endoplazmatyczne, Zewnątrzkomórkowo	b.d.
Ni <sup>2+</sup>	10 <sup>-16</sup>	10-10	Wakuole roślinne	b.d.
Co <sup>2+</sup>	10-15	10 <sup>-10</sup>	Cytoplazma	140



Rys. 3.11. Mechanizm kwasowej hydrolizy estrów katalizowanej przez rybozymu hammerhead (na podstawie [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2007]). Obecność uprotonowanych cząsteczek wody zwiększa na atak nukleofilowy na wiązanie fosfodiestrowe. W wyniku reakcji powstają produkty, z których jeden zakończony jest 2',3'- cyklicznym fosforanem, a drugi grupą 5'-OH. Z – zasada azotowa.

Efektywność procesu zwijania HHRz osiąga maksimum przy stężeniu 2-3 mM magnezu, natomiast szybkość transestryfikacji lub ligacji wzrasta wraz ze stężeniem jonów i nie zawsze ulega nasyceniu nawet przy 100 mM [Shepotinovskaya i Uhlenbeck 2010]. Sugeruje to istnienie słabego miejsca wiązania magnezu być może w pobliżu centrum katalitycznego lub zachodzenie zmian strukturalnych przy wyższym stężeniu tego jonu [Shepotinovskaya i Uhlenbeck 2010]. Zaproponowano udział jonów metalu związanych koordynacyjnie i działających w bezpośredniej bliskości rdzenia katalitycznego oraz niespecyficznych, oddziałujących z zasadami w większej odległości od centrum reakcji [Leclerc 2010]. Sugeruje się, że kation może być wiązany koordynacyjnie przez nukleotyd, który odgrywa rolę kwasu w modelu kooperatywnego działania nukleotyd-metal. Obecność drugiego kationu w roli strukturalnej byłaby niezbędna do kształtowania centrum katalitycznego, przesuniecia równowagi w kierunku aktywnej konformacji lub stabilizacji ujemnego ładunku stanu przejściowego [Leclerc 2010]. Na podstawie symulacji komputerowych zaproponowano, że jon dwuwartościowy migruje pomiędzy A9 i G10. Sugeruje się, że może on tworzyć połączenie pomiędzy tlenem fosforanu przy A9 a tlenem atakowanego fosforanu oddalonych od siebie o 4.3 Å, co umożliwia osiągnięcie przez G8 pKa umożliwiającego katalizowanie reakcji [Lee i York 2010].

Sugeruje się, że jony magnezu położone na zewnątrz cząsteczki RNA, oddalone od niej o 3-5 Å i związane koordynacyjnie, modulują jej dynamikę [Hayes i in. 2012]. Lokalnie,

zmieniają one konformację RNA, natomiast globalnie spowalniają wahania cząsteczki. Odkrycie to zmienia ogólnie przyjęty model oddziaływań jonów magnezu z cząsteczkami RNA, w którym postulowano, że kilka jonów jest silnie związanych z RNA, a pozostałe otaczają cząsteczkę w stanie rozproszonym.

### 3.4.2. Stłoczenie cząsteczkowe

Naturalna konsekwencją olbrzymiej ilości białek, kwasów nukleinowych i innych makrocząsteczek w komórce jest efekt stłoczenia (ang. molecular crowding effect). Jest on rezultatem działania makromolekuł obojętnych chemicznie wobec badanej reakcji [Elcock 2010]. Jedyne oddziaływanie, jakie może zachodzić pomiędzy badanymi cząsteczkami a czynnikiem determinującym stłoczenie to zmniejszenie objętości dostępnej przestrzeni. Rozpatrując ten efekt trzeba wziąć pod uwagę kilka faktów: i) czy istnieją prawdziwie obojętne chemicznie czynniki, mogące wywołać jedynie pożądany rezultat bez efektów ubocznych; ii) czy jest możliwe stworzenie modeli opisujących w sposób ilościowy wpływ cząsteczek generujących efekt stłoczenia; iii) czy otoczenie zdominowane przez czynniki generujące stłoczenie (Ficoll, Dextran, PEG, białka, poliwinylopirolidon) dobrze naśladują środowisko wewnątrzkomórkowe (Rys. 3.12) [Elcock 2010]. Wpływ stłoczenia molekularnego na cząsteczkę jest też zależny od jej wielkości [Ellis 2001].



Rys. 3.12. Porównanie właściwości czynników imitujących stłoczenie cząsteczkowe (po lewej) oraz środowisko wewnątrzkomórkowe E.coli (po prawej) [Elcock 2010].

Oszacowano, że stężenie makrocząsteczek w cytoplazmie wynosi 80-400 mg/ml, przyjmując zajęcie objętości komórki na 40% [Rivas i in. 2004, Perham i in. 2007]. W obrębie takiego środowiska istnieje konkurencja pomiędzy zwijaniem a agregacją cząsteczek

[Kinjo i Takada 2003]. Poliaminy, takie jak spermina, stanowią polikationowe ligandy, występujące w komórce w stężeniu milimolarnym, które mają wpływ na konformację kwasów nukleinowych oraz poprawiają aktywność katalityczną *in vitro* rybozymów typu hairpin [Real and Greenall, 2004]. Duże kationy, w których ładunki dodatnie są rozdzielone obojętnymi atomami węgla układają się mniej ściśle wokół zwiniętego RNA i słabiej otaczają cząsteczkę w porównaniu z jonami Mg<sup>2+</sup>, co zapewnia jej więcej swobody [Woodson 2010A]. Wykazano, że konformacje pośrednie zwijania są mniej zwarte w roztworze w obecności spermidyny lub jonów Ba<sup>2+</sup> niż w przypadku Mg<sup>2+</sup> [Moghaddam i in. 2009]. Zwiększa to prawdopodobieństwo prawidłowego zwinięcia RNA [Woodson 2010A].

Wiele typów makrocząsteczek może powodować zmiany konformacji rybozymu hammerhead nawet w niskich stężeniach także poprzez zderzenia międzycząsteczkowe lub słabe niespecyficzne oddziaływania [Nakano i in. 2009; Kilburn i in. 2010]. Wykazano, że białka komórkowe, takie jak nukleokapsyd p7 HIV-1, rybonukleoproteina hn RNP A1 oraz dehydrogenaza GAPDH zwiększają szybkość reakcji katalitycznej rybozymów *in vitro* oraz oddysocjowania produktów [Tsuchihashi i in. 1993, Bertrand i Rossi 1994, Herschlag i in. 1994, Sioud i Jespersen 1996].

Kompartmentacja komórki utrudnia porównanie działania molekuł *in vitro* i *in vivo*. Stężenie poszczególnych makrocząsteczek, metabolitów, jonów różni się w poszczególnych przedziałach komórki, jak i w obrębie danego przedziału, a efektywność zwijania i funkcjonowania danej cząsteczki jest zależna od miejsca i czasu. Zaburzenia prawidłowej lokalizacji cząsteczek mogą powodować zmiany patologiczne [Hung i Link 2011]. Każda cząsteczka, aby działać prawidłowo musi znaleźć się w odpowiednim miejscu i czasie w natywnej formie strukturalnej.

#### 3.4.3. Białka opiekuńcze RNA

Wiele niekodujących RNA przyjmuje strukturę trzeciorzędową mimo utrudnień związanych z niespecyficznym parowaniem zasad, słabymi oddziaływaniami trzeciorzędowymi, barierami elektrostatycznymi oraz wymogiem oddziaływania ze sobą końców 5' i 3' transkryptów [Woodson 2010A]. Przejściowe związanie białek opiekuńczych RNA (ang. RNA chaperone proteins) destabilizuje konformacje przejściowe i obniża ich energię, co prowadzi do bardziej "wygładzonego krajobrazu energii swobodnej" zwijania. Przyspiesza to fałdowanie RNA i zwiększa prawdopodobieństwo przyjęcia struktury natywnej [Woodson 2010B]. Proces ten odgrywa istotną rolę w komórce (Tab. 3.7). Oddziaływania elektrostatyczne silnie wpływają na stabilność i dynamikę strukturalną RNA. Białka

opiekuńcze RNA są bogate w zasadowe reszty aminokwasowe, a elektrostatyczne oddziaływania z ujemnie naładowanymi substratami RNA mogą bezpośrednio stymulować ich ponowne zwijanie [Woodson 2010B].

Tab. 3.7. Niektóre białka opiekuńcze RNA.

Cząsteczka	Efekt działania	Referencje		
hnRNP A1	Renaturacja tRNA, zwiększenie aktywności HHRz in vitro	Karpel i in. 1975, Herschlag i in.		
		1994		
HIV-1 NC	Dimeryzacja genomowego RNA wirusa, zwiększenie	Thomas i in. 2008, Herschlag i in.		
	aktywności HHRz in vitro	1994		
E. coli StpA	Poprawność zwijania intronu grupy I faga T4 td	Waldsich i in. 2002		
Białka	Niespecyficzne	Rajkowitsch i Schroeder 2007		
rybosomalne				
La (drożdże) Ro	Niespecyficzne	Pannone i in. 1998, Stein i in. 2005		
(człowiek)				
Hfq (bakterie)	Niespecyficzne	Hopkins i in. 2009		
CYT19 (białko	Poprawność zwijania rybozymu Tetrahymena	Bhaskaran i Russel 2007		
typu DEAD-box)				
CYT18	Zwijanie rdzenia katalitycznego intronów grupy I	Caprara i in. 1996		
CRS1	Choroplastowy czynnik splicingowy intronów grupy II	Ostersetzer i in. 2005		
(chloroplast)				
Mss116p	Stymulacja zwijania intronów	Fedorova i in. 2010		
SdAg	Replikacja wirusa HDV	Wang i in. 2003		
Core	Replikacja Flaviviridae	Ivanyi-Nagy i in. 2008		
Tat	Transkrypcja wirusowego RNA HIV-1	Kuciak i in. 2008		

Białka opiekuńcze RNA powinny spełniać kilka kryteriów: i) przejściowo oddziaływać z kwasami nukleinowymi i wykazywać niską specyficzność oddziaływania RNA-białko; ii) nie korzystać z zewnętrznego źródła energii, jak hydroliza ATP; iii) oddziaływać przejściowo z RNA i nie być konieczne do podtrzymania uzyskanej funkcjonalnej konformacji RNA [Zúñiga i in. 2009]. Białka DEAD-box łączą potencjał chemiczny hydrolizy ATP z powtarzalnymi cyklami wiązania i uwalniania RNA, rozszerzając zakres warunków, w jakich mogą one uczestniczyć w ponownym zwijaniu RNA [Pan i Russell 2010]. Helikazy RNA zależne od ATP oraz białka opiekuńcze RNA niezależne od ATP przyspieszają zwijanie cząsteczek poprzez destabilizację helis oraz ich częściowe rozwijanie (Rys. 3.13) [Woodson 2010B].



Rys. 3.13. Porównanie działania helikaz RNA, białek opiekuńczych oraz hybrydyzujących RNA w charakterze białek opiekuńczych.

# 4. WYNIKI I DYSKUSJA BADAŃ WŁASNYCH

## 4.1. Opracowanie nowych rybozymów typu hammerhead

W strukturze drugorzędowej RNA można wyróżnić elementy dwuniciowe utworzone z kanonicznych par zasad typu Watson-Crick i dodatkowych niekanonicznych par zasad oraz regiony jednoniciowe jak pętle apikalne, wewnętrzne czy połączenia helis. Mogą one pełnić rolę bloków budulcowych cząsteczek RNA o rożnych wewnątrzkomórkowych funkcjach [Laing i Schlick 2009]. Modułowa budowa RNA pozwala projektować cząsteczki o nowych właściwościach zbudowane z elementów strukturalnych różnego pochodzenia. Są one często analizowane metodą selekcji *in vitro*, chociaż środowisko to bardzo różni się od warunków występujących wewnątrz komórek [Kang i Lee 2012]. Tworzenie aktywnej konformacji RNA (zwijanie RNA) jest procesem kooperatywnym i zależy zarówno od elementów strukturalnych cząsteczki jak i środowiska zewnętrznego [Behrouzi i in. 2012]. Rezultat zależy od kontekstu czasu i przestrzeni, którego zmiana może powodować przyjęcie przez RNA innych struktur natywnych.

Znane są różne strategie regulacji ekspresji genów. Biorą w nich udział takie cząsteczki jak rybozymy, DNazymy, antysensowne oligonukleotydy, małe interferujące RNA (ang. short interfering RNA, siRNA), mikroRNA, aptamery, aptazymy czy ryboprzełączniki [Silverman 2008, Mulhbacher i in. 2010, Ferré-D'Amaré i Scott 2010]. Szczególne zainteresowanie wzbudza proces intereferencji RNA (RNAi), umożliwiający efektywne i wysoce specyficzne blokowanie ekspresji genów przy użyciu krótkich (~20 nt) interferencyjnych RNA (ang. short interfering RNA, siRNA) [Bora i in. 2012]. Pomimo, że siRNA mogą być efektywnymi czynnikami inaktywacji genów w stosunku do większości RNA cytoplazmatycznych, nie są aktywne względem RNA zlokalizowanych w jądrze komórkowym czy organellach półautonomicznych [Gabryelska i in. 2005, Gabryelska i in. 2006]. Ponadto, niektóre wirusy wykształciły mechanizmy obronne przed RNAi, a technologia ta jest wiązana z występowaniem niespecyficznych efektów ubocznych (ang. off-target effects) [Singh i in. 2011]. W tym kontekście, bardzo atrakcyjną alternatywę stanowią nadal cząsteczki małych katalitycznych RNA, a w szczególności rybozymy o strukturze typu "głowa młotka" (ang. hammerhead).

### 4.1.1. Selekcja genów docelowych dla rybozymów

W celu analizy właściwości katalitycznych rybozymów wybrano gen białka zielonej fluorescencji (GFP) w układzie modelowym oraz geny DNMT1 (metylotransferaza 1 DNA), GLI1 (ang. glioma associated oncogene 1), CRYAB (α-B-krystalina) ze względu na ich potencjał terapeutyczny.

Białko zielonej fluorescencji o masie 28 kDa zostało odkryte w trakcie badań nad bioluminescencją meduzy *Aequorea victoria* [Shimomura i in. 1962]. Emituje ono jasne zielone światło (505 nm) pod wpływem promieniowania niebieskiego (478 nm) lub ultrafioletowego (395 nm) [Müller-Taubenberger i Anderson 2007]. Białko to stanowi uniwersalny marker fluorescencyjny do monitorowania wielu procesów komórkowych.

Wyniki wielu eksperymentów wskazują, że stosowanie GFP nie zakłóca fizjologii komórki i nie generuje efektów ubocznych [Wiedenmann i in. 2009]. Mutageneza GFP pozwoliła na otrzymanie wielu pochodnych emitujących światło niebieskie i żółte, a później także czerwone i inne [Wiedenmann i in. 2009]. Aby białko GFP wykazywało bioluminescencję, musi przyjąć odpowiednią strukturę, co trwa około 10 minut ( $t_{0.5}$ ). Dochodzi do autokatalitycznej reakcji (cyklizacja, dehydratacja, utlenianie), prowadzącej do powstania funkcjonalnego chromoforu ( $t_{0.5} = 22-86$  min). Transfekcja wektorem ekspresyjnym pEGFP powoduje emisję światła zielonego już po upływie 6.5 godziny [Wiedenmann i in. 2009].

Zaburzenia we wzorze metylacji DNA są najlepiej scharakteryzowaną epimutacją [Denis i in. 2011]. Odwracalność tych zmian, czyni z nich atrakcyjny cel terapii chorób nowotworowych. Zahamowanie metylacji w kolejnych podziałach komórki nie powoduje jej natychmiastowej śmierci, ale pozwala na aktywację wyciszonych przez hipermetylację genów supresorowych. Reaktywacja genów proapoptotycznych i regulatorów cyklu komórkowego w wyniku demetylacji daje szanse na inhibicję procesu nowotworzenia [Yoo i Jones 2006]. U ssaków funkcjonują cztery metylotransferazy DNA o różnej specyficzności: DNMT1, DNMT2, DNMT3A oraz DNMT3B [Rajendran i in. 2011]. DNMT1 jest głównym enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie wzorca metylacji DNA podczas replikacji [Turek-Plewa i Jagodziński 2005].

Gen GLI1 (ang. glioma-associated oncogene 1, LOC2735) został opisany po raz pierwszy w 1987 roku [Kinzler i in. 1987]. W wielopostaciowym glejaku zarodkowym (ang. glioblastoma multiforme, GBM) obserwowano ponad 50-krotny wzrost liczby kopii tego genu [Gabryelska i in. 2007]. GLI1 to czynnik transkrypcyjny posiadający motywy palców cynkowych, który jest efektorem szlaku Hedgehog, regulującego ekspresję genów istotnych dla różnych stadiów rozwoju nowotworów [Carpenter i Lo 2012]. Transkrypt Gli1 podlega alternatywnemu składaniu prowadząc do powstania trzech białek: pełnej długości Gli1, wariantu z delecją 128 aminokwasów przy końcu aminowym (Gli1ΔN) oraz skróconego o 41 aminokwasów tGli, które posiadają różne profile ekspresji [Shimokava i in. 2008, Lo i in. 2009].

Warianty Gli1 $\Delta$ N oraz GLI1 regulują ekspresję tych samych genów, lecz Gli1 $\Delta$ N wywołuje słabszy efekt. Występują one w komórkach zarówno zdrowych jak i nowotworowych. tGLI ulega ekspresji jedynie w tkankach nowotworowych [Cao i in. 2012]. Ze względu na niewielką różnicę wielkości pomiędzy GLI1 oraz tGLI nie do końca wiadomo, które efekty są rezultatem działania poszczególnych wariantów, ale z najnowszych badań wynika, że tGLI stanowi silniejszy czynnik promujący nowotworzenie i powstawanie przerzutów [Carpenter i Lo 2012].  $\beta$ -katenina razem z GLI1 stanowią markery prognostyczne w przypadkach guzów typu glioblastoma [Rossi i in. 2011].

α-B-krystalina to małe białko szoku cieplnego, początkowo zidentyfikowane w soczewce oka kręgowców [Waley 1965, Klemenz i in. 1994]. Występuje także w mięśniach szkieletowych, sercu i innych tkankach. Oddziałuje z desminą, aktyną i funkcjonuje jako białko opiekuńcze, które w warunkach stresowych wiąże białka i zapobiega ich denaturacji i agregacji [Sanbe 2011]. CRYAB jest zaangażowane w regulację szlaku ubikwityny-proteasomu [Lin i in. 2006]. Może również hamować apoptozę [Liu i in. 2007]. Białko to silnie oddziałuje z czynnikami FGF-2, NGF-β, VEGF, insuliną oraz β-kateniną [Ghosh i in. 2007].

Zaburzenia funkcji, ekspresji i mutacje genu alpha-B-krystaliny są związane z występowaniem chorób neurodegeneracyjnych, jak choroba Alzheimer'a, choroba Alexandra, Parkinsona, stwardnienie rozsiane, miopatie, desminopatie, katarakta, wielosystemowa atrofia, nowotwory [Kida i in. 2010, Jehle i in. 2010]. Akumulacja CRYAB zwłaszcza w oligodendrocytach i astrocytach, rzadziej w neuronach jest wiązana z występowaniem wylewów, encefalopatii, chorób infekcyjnych i demielinacji, leukodystrofii oraz epilepsji [Kida i in. 2010].

# 4.1.2. Dostępność sekwencji 5'-GUC-3' w obrębie mRNA GFP, DNMT1, GLI1 i CRYAB

### 4.1.2.1. Wybór miejsca docelowego mRNA

Rybozym hammerhead katalizuje transestryfikację substratów po sekwencji 5'-NUH-3', gdzie N oznacza dowolny nukleotyd, U urydynę natomiast H adenozynę, cytozynę lub urydynę niezwiązaną wiązaniami wodorowymi. Stała szybkości reakcji katalizowanej przez rybozym HHRz maleje w następującym porządku: GUC, AUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA >UUU, CUU [Sun i in. 2000]. Z tych względów jako miejsca docelowe działania rybozymów wybrano trinukleotydy GUC przy końcu 5' mRNA wybranych genów GFP, DNMT1, CRYAB, GLI1 (Rys. 4.1 - 4.4). Ze względu na istotność wariantów alternatywnego składania genu GLI1, wybrane miejsce GUC znajduje się w regionie wspólnym dla wszystkich trzech izoform.



Rys. 4.1. Sekwencja końca 5' mRNA genu CRYAB wraz z zaznaczonymi trinukleotydami GUC (gtc) w kolorze różowym. Wybrane miejsce docelowe zaznaczono kolorem zielonym (T1-255 nt).

NM_005269, Hom	o sapiens, GLI1,	3618 bp mRN	JA		
1 ccca	gactcc agccctggac	cgcgcatccc	gagcccagcg	cccagacaga	gt <mark>gtc</mark> cccac
61 accc	teetet <u>gag</u> aegeeat	gttcaact <u>cg</u>	atgaccccac	caccaatcag	tagctatggc
121 gagc	cctgct <mark>gtc</mark> tccggcc	cctcccca <mark>gt</mark>	<mark>c</mark> agggggccc	<u>c</u> cagtgtggg	gacagaagga
181 ct <mark>gt</mark>	ctggcc cgcccttctg	ccaccaagct	aacctcat <mark>gt</mark>	ccggccccca	cagttatggg
241 ccag	ccagag agaccaacag	ctgcaccgag	ggcccactct	tttcttctcc	ccggagtgca
301 <mark>gtc</mark> a	agttga ccaagaagcg	ggcact <mark>gtc</mark> c	atctcacctc	t <mark>gtc</mark> ggatgc	cagcctggac
361 ctgc	agacgg ttatccgcac	ctcacccagc	tccctcgtag	ctttcatcaa	ctcgcgatgc
421 acat	ctccag gaggctccta	cg <mark>gtc</mark> atctc	tccattggca	ccatgagc <u>cc</u>	atctctggga
481 ttcc	cagccc agatgaatca	ccaaaaaggg	ccctcgcctt	cctttggg <mark>gt</mark>	<mark>c</mark> cagccttgt
541 g <mark>gtc</mark>	cccatg actctgc <u>ccg</u>	gggtgggatg	atcccac <mark>atc</mark>	ctca <mark>gtc</mark> ccg	<mark>ggga</mark> cccttc
601 ccaa	cttgcc agct <u>gaa<mark>gtc</mark>.</u>	tgagctggac	atgctggttg	gcaagtgccg	ggaggaaccc
661 ttgg	aaggtg atat <mark>gto</mark> cag	ccccaactcc	acaggcatac	aggatcccct	gttggggatg
721 ctgg	atgggc gggaggacct	cgagagagag	gagaagcgtg	agcctgaatc	tgtgtatgaa
781 actg	actgcc gttgggatgg	ctgcagccag	gaatttgact	cccaagagca	gctggtgcac
841 caca	tcaaca gcgagcacat	ccacggggag	cggaaggagt	tcgtgtgcca	ctgggggggc
901 tact	ceaaaa aactaaaace	ct ticaaa do d	cag tia ca tigo	tiaatiaatiti ca	catacacada

Rys. 4.2. Sekwencja końca 5' mRNA genu GL11 wraz z zaznaczonymi trinukleotydami GUC (gtc) w kolorze różowym. Wybrane miejsce docelowe zaznaczono kolorem zielonym (T1-585 nt).

U57609, C	loning vecto	or pEGFP-N3,	675-1394:	gene="egfp	•	
661	gatccatcgc	caccatggtg	agcaagggcg	aggagctgtt	cac <u>cgg</u> ggtg	gtgcccatcc
721	tg <mark>gtc</mark> gagct	ggacggcgac	gtaaacggcc	acaagttcag	cgt <mark>gtc</mark> cggc	gagggcgagg
781	gcgatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	agttcatctg	caccaccggc	aagctgcccg
841	tgccctggcc	caccctcgtg	accaccctga	cctacggcgt	<u>g</u> cagtgcttc	agc <u>cgc</u> tacc
901	ccgaccacat	gaagcagcac	gactt <mark>cttca</mark>	a <mark>gtc</mark> cgccat	g <mark>cccgaaggc</mark>	tac <mark>gtc</mark> cagg
961	agcgcaccat	cttcttcaag	gacgacggca	actacaagac	ccgcgccgag	gtgaagttcg
1021	agggcgacac	cctggtgaac	cgcatcgagc	tgaagggcat	cgacttcaag	gaggacggca
1081	acatcctggg	gcacaagctg	gagtacaact	acaacagcca	caac <mark>gtc</mark> tat	atcatggccg
1141	acaagcagaa	gaacggcatc	aaggtgaact	tcaagatccg	ccacaacatc	gaggacggca
1201	gcgtgcagct	cgccgaccac	taccagca <u>ga</u>	acacccccat	cggcgacggc	cccgtgctgc
1261	tgcccgacaa	ccactacctg	agcaccca <mark>gt</mark>	<pre>cgccctgag</pre>	caaagacccc	aacgagaagc
1321	gcgatcacat	g <mark>gtc</mark> ctgctg	gagttcgtga	ccgccgccgg	gatcactctc	ggcatggacg
1.381	addtatadaa	atiaalaalaada	cacaactictia	at cataat.c	addatadda	catititatada
1						

*Rys. 4.3. Sekwencja kodująca gen GFP na wektorze pEGFP-N3 wraz z zaznaczonymi trinukleotydami GUC (gtc) w kolorze różowym. Wybrane miejsce docelowe zaznaczono kolorem zielonym (T1-92 nt).* 

1	aactccattc	catecttete	cacagggtat	cacctctctc	catttaatac	atcoctco
61	cccccacqcc	cadactadad	taatagacac	cacctccact	categecect	ccccatcgg
121	ttccgcgcga	aaaaccaaaa	cacctacact	accaccacca	catatactaa	agecteega
181	ataccaacac	gtaccgcccc	agcccgggtg	cccacactgg		catctcgct
241	cccgacgatg	tecacaaaca	gctcaaagat	ttogaaagag	acagettaac	agaaaagga
301	tatataaaga	agaaattgaa	tetettgcac	gaatttctgc	aaacagaaat	aaagaatca
361	ttatgtgact	tggaaaccaa	attacgtaaa	gaagaattat	ccaaagaaga	ctacctooc
421	aaaataaaat	cccttttaaa	taaagatttg	tccttqqaqa	acqqtqctca	tgcttacaa
481	cgggaagtga	atggacatet	agaaaacggg	aaccaaqcaa	gaagtgaagc	ccatagagt
541	ggaatggcag	atgccaacag	ccccccaaa	cccctttcca	aacctcgcac	acccaaaa
601	agcaagtdcg	atggagaggc	taagcctgaa	ccttcaccta	gccccaggat	tacaaggaa
661	agcaccagge	aaaccaccat	cacatetcat	tttgcaaagg	gccctgccaa	acqqaaacc
721	caggaagagt	ctgaaagagc	caaatcggat	gantecatca	aggaagaaga	caaagacca
781	gatgagaaga	gacgtagagt	tacatccaga	gaacgagttg	ctagaccgct	tcctgcaga
841	gaacctgaaa	gagcaaaatc	aggaacgcgc	actgaaaagg	aagaagaaag	agatgaaaa
901	qaaqaaaaqa	gactccgaag	tcaaaccaaa	gaaccaacac	ccaaacaqaa	actgaagga
961	gageeggaea	gagaagccag	ggcaggcgtg	caggetgacg	aqqacqaaqa	tggagacga
1021	aaagatgaga	agaagcacag	aaatcaaccc	aaagatctag	ctoccaaaco	qaqqcccqa
1081	qaaaaaqaac	ctgaaaaagt	aaatccacaq	atttctgatg	aaaaaqacqa	qqatqaaaa
1141	gaqqaqaaqa	gacgcaaaac	gacccccaaa	gaaccaacgg	agaaaaaaat	ggetegege
1201	aaaaca <mark>atc</mark> a	tgaactccaa	gacccaccct	cccaagtgca	ttcagtgcgg	gcagtacct
1261	gacgaccctg	acctcaaata	tgggcagcac	ccaccagacg	cggtggatga	gccacagat
1321	ctgacaaatg	agaagetate	catetttgat	gccaacgagt	ctggctttga	gagttatga
1381	gcgcttcccc	agcacaaact	gacctgcttc	agtgtgtact	gtaagcacgg	tcacctqtc
1441	cccatcgaca	ccggcctcat	cgagaagaat	atcgaactct	tcttttctgg	ttcagcaaa
1501	ccaatctatg	atgatgaccc	atctcttgaa	ggtggtgtta	atggcaaaaa	tcttggccd
1561	ataaatgaat	ggtggatcac	tggctttgat	ggaggtgaaa	aggccctcat	cggcttcag
1621	acctcatttg	ccgaatacat	tctgatggat	cccagtoccg	agtatgcgcc	catatttgg
1681	ctgatgcagg	agaagatcta	catcagcaag	attgtggtgg	agttcctgca	gagcaatto
1741	gactcgacct	atgaggacct	gatcaacaag	atcgagacca	cggttcctcc	ttctggcct
1801	aacttgaacc	gcttcacaga	ggactccctc	ctgcgacacg	cgcagtttgt	ggtggagca
1861	gtggagagtt	atgacgaggc	cggggacagt	gatgagcagc	ccatcttcct	gacacccto
1921	atgcgggacc	tgatcaagct	<mark>ggctggg</mark> gte	acgctgggac	agaggcgagc	ccaggcgag
1981	cggcagacca	tcaggcattc	taccagggag	aaggacaggg	gacccacgaa	agccaccad
2041	accaagctgg	tctaccagat	cttcgatact	ttcttcgcag	agcaaattga	aaaggatga
2101	agagaagaca	aggagaacgc	ctttaagcgc	cggcgatgtg	gc <mark>alo</mark> tgt <mark>ga</mark>	<mark>ggtgt</mark> gic <mark>a</mark>
2161	<mark>cagcc</mark> tgagt	gtgggaaatg	taaagcctgc	aaggacatgg	ttaaatttgg	tggcagtgg
2221	cggagcaagc	aggettgeea	agagcggagg	t <mark>gro</mark> ccaata	tggccatgaa	ggaggcaga
2281	gacgatgagg	aa <mark>gt g</mark> atga	taacatccca	gagatgccgt	cacccaaaaa	aatgcacca
2341	gggaagaaga	agaaacagaa	caagaatcgc	atctcttggg	tcggagaagc	c <mark>itc</mark> aagad
2401	gatgggaaga	agagttacta	taagaaggtg	tgcattgatg	cggaaaccct	ggaagtggo
2461	gactgtgtgt	ctgttattcc	agatgattcc	tcaaaaccgc	tgtatctagc	aagggtgad
2521	gcgctgtggg	aggacagcag	caacgggcag	atgtttcacg	cccactggtt	ctgcgctgc
2581	acagacacag	tcctcggggc	cacatoggac	cctctggagc	tgttcttggt	ggatgaatg
2641	gaggacatoc	agettteata	tatccacago	aaaqtqaaaq	tcatctacaa	ageccete

Rys. 4.4. Sekwencja końca 5' mRNA genu DNMT1 wraz z zaznaczonymi trinukleotydami GUC (gtc) w kolorze różowym. Wybrane miejsce docelowe zaznaczono kolorem zielonym (T1-1338 nt). Ramiona otaczające alternatywne trinukleotydy zaznaczono kolorem żółtym (T2-223 nt, T3-607 nt, T4-1656 nt, T5-1949 nt, T6-2156 nt, T7-2516 nt).

#### 4.1.2.2. Charakterystyka struktury drugorzędowej substratu

W celu analizy dostępności miejsc transestryfikacji w obrębie mRNA wykorzystano program RNAfold do przewidywania struktury drugorzędowej substratów. Do programu wprowadzono ~200 nukleotydowe sekwencje regionów zawierających miejsce GUC podlegające transestryfikacji. Wszystkie wybrane miejsca transestryfikacji (T1) występowały w regionach zaangażowanych w tworzenie par zasad (Rys. 4.5). W przypadku substratu GFP, GUC znajdowała w regionie sekwencja się symetrycznego obustronnego jednonukleotydowego wybrzuszenia, natomiast w mRNA GLI1 nukleotyd G stanowił jednostronne wybrzuszenie (Rys. 4.5). Substrat CRYAB znajdował się w krótkim regionie dwuniciowym (6 pz) w pobliżu dwustronnego niesymetrycznego wybrzuszenia. Trinukleotyd (T1) GUC mRNA DNMT1 znajdował się w obrębie helisy o długości 9 pz.

Pierwsze algorytmy przewidywania struktury drugorzędowej RNA były oparte o metody wykorzystujące najniższą wartość energii swobodnej (ang. minimal free energy, MFE) [Mathews i in. 1999]. Obecnie aplikacje wykorzystują dodatkowo programowanie dynamiczne oraz analizy statystyczne. Metody przewidywania w oparciu o MFE mają pewne ograniczenia: i) model najbliższego sąsiedztwa nie jest kompletny, ii) nie wszystkie cząsteczki RNA znajdują się w stanie równowagi, a kinetyka procesu zwijania może mieć wpływ na ostatecznie przyjętą strukturę, iii) niektóre cząsteczki RNA mogą przyjmować docelowo kilka aktywnych konformacji [Mathews 2006]. Mimo swoich ograniczeń metoda ta jest najczęściej wykorzystywana do przewidywania struktury drugorzędowej. Spośród przyjętych modeli termodynamicznych najbardziej popularny jest tzw. model Turnera [Mathews i in. 1999]. Posiada on 7600 oszacowanych zasad najbliższego sąsiedztwa i opiera się na założeniu, że stabilność danej pary zasad lub pętli zależy od jej sekwencji oraz przylegającej pary zasad lub reszt niesparowanych [Hajiaghayi i in. 2012].

Bioinformatyczne metody oszacowania dostępności miejsc katalitycznych dla rybozymów nie biorą pod uwagę wpływu sekwencji substratu na geometrię centrum katalitycznego i aktywność cząsteczki [Mercatanti i in. 2002, Lucier i in. 2006]. Zaproponowano mechanizm inwazji oligonukleotydu (ON) do natywnej struktury RNA, pokazujący w jaki sposób może dojść do wymuszenia dostępności sekwencji RNA [Serikov i in. 2011]. Zjawisko to może wyjaśniać działanie np. rybozymów. Z tych względów wybrane miejsca docelowe nie zostały odrzucone pomimo cech sugerujących brak dostępności ze względu na charakter dwuniciowy.



Rys. 4.5. Struktura drugorzędowa ~200-nukleotydowych fragmentów mRNA genów GFP, DNMT1, GL11 oraz CRYAB uzyskana metodą minimalizacji energii swobodnej MFE w programie RNAfold. Docelową sekwencję GUC zaznaczono w czerwonym owalu. Kolor niebieski – regiony dwuniciowe, kolor żółty – regiony jednoniciowe.

# 4.1.2.3. Porównanie 16-nukleotydowych miejsc docelowych dla rybozymów w obrębie mRNA

Wszystkie wybrane miejsca docelowe rybozymów posiadały sekwencję 5'-GUC-3' oraz C w pozycji +1 (5'-GUCC-3'), parę A-U lub U-A w pozycji -1 (5'- $^{A}$ / $_{U}$ GUC-3') oraz parę G-C lub C-G w pozycji -2 (5'- $^{G}$ / $_{C}$  $^{A}$ / $_{U}$ GUC-3') (Rys. 4.6). Podobieństwo sekwencji 16-nukleotydowych fragmentów substratów w obrębie ramion (poza GUC) do GFP wynosiły odpowiednio: DNMT1 (30.8%), CRYAB (23%), GLI1 (23%). Najwyższe podobieństwo sekwencji wykazywały między sobą substraty CRYAB-GLI1 (53.8%), mniejsze GLI1-DNMT1 (15.4%) oraz CRYAB-DNMT1 (23%). Ilość par GC w obrębie ramion (poza GUC) wynosiła 53.8% (CRYAB), 69.2% (GLI1), 76.9% (GFP) oraz 38.5% (DNMT1). Spośród wielu możliwych miejsc w większości przypadków wybrano te, których 6-nukleotydowe sekwencje otaczające zawierały 50% lub więcej nukleotydów G/C.

Sekwencja substratu ma wpływ na aktywność rybozymów typu hammerhead *in vitro* [Fedor i Uhlenbeck 1990]. Jest bardzo prawdopodobne, że także w warunkach komórkowych ma ona istotne znaczenie dla aktywności cząsteczki nie tylko w aspekcie dostępności substratu. Niestety nadal niewiele wiadomo na temat wpływu reszt w określonych pozycjach ramion rybozymu.

Rys. 4.6. Porównanie sekwencji 16-nukleotydowych substratów rybozymów w obrębie mRNA GFP, GLII, DNMT1 oraz CRYAB. Kolorem różowym zaznaczono trinukleotyd GUC. Ciemnozielony – reszty guanozyny, zielony – reszty cytydyny, żółty – reszty urydyny, niebieski – reszty adenozyny.

# 4.1.3. Projektowanie rybozymów hammerhead obniżających poziom ekspresji genu GFP

Projektowanie nowego, wysoce aktywnego w warunkach komórkowych, rybozymu typu hammerhead oparto o optymalizację długości elementu łączącego centrum katalityczne cząsteczki z dodatkowym motywem stabilizującym strukturę trzeciorzędową (ang. tertiary stabilizing motif, TSM). Motywy TSM nie wykazują zachowawczości ewolucyjnej [Chi i in. 2008]. Czteronukleotydowa pętla GAAA (ang. tetraloop, TL) stanowi integralny element

ramienia II rybozymu typu hammerhead. Z tego względu postanowiono wykorzystać w charakterze TSM element receptora czteronukleotydowych pętli (ang. tetraloop receptor, TLR).

Zaprojektowano cztery rybozymy hammerhead wobec mRNA białka zielonej fluorescencji (GFP) (substrat T1 - lokalizacja: 92 nt): minimalny HHgfp-0 oraz trzy wydłużone HHRz. Rybozymy wydłużone zawierały dodatkowy motyw stabilizujący strukturę trzeciorzędową (TSM) oparty o sekwencję receptora czteronukleotydowych pętli (TLR) pochodzącą z intronów grupy I *Tetrahymena*. HHRz<sup>W</sup> różniły się od siebie długością helisy I łączącej TSM z centrum katalitycznym cząsteczki, która wynosiła 6 pz (HHgfp-6), 5 pz (HHgfp-5), 4 pz (HHgfp-4) (Rys. 4.7). Celem badań było oszacowanie wpływu położenia względem siebie elementów strukturalnych TLR i TL oraz wyselekcjonowanie wariantu najbardziej aktywnego w ludzkich liniach komórkowych. Projektowanie oparto o modularny charakter RNA zdefiniowany w tej pracy w postaci tzw. strategii aranżacji elementów strukturalnych (ang. structure elements arrangement, SEA). Polega ona na łączeniu fragmentów RNA o zdefiniowanej strukturze drugorzędowej. Takie podejście pojawiło się w biologii molekularnej pod nazwą tektoniki RNA i oparte jest na założeniu, że elementy struktury drugorzędowej wykazują wysoką trwałość niezależnie od kontekstu przestrzennego [Westhof i in. 1996].

Wobec mRNA GFP zaprojektowano łącznie 4 rybozymy hammerhead, DNAzym 10-23, antysensowy DNA (AS-DNA), antysensowy RNA (AS-RNA), DNA o sekwencji nie wykazującej komplementarności do komórkowych RNA tzw. przypadkowej (ang. scrambled) (SKR-DNA) oraz trzy mutanty rybozymu HHgfp-5 (HHgfp-5<sup>MUT1</sup>, HHgfp-5<sup>MUT2</sup>, HHgfp-5<sup>MUT3</sup>). MUT1 oraz MUT2 posiadały mutacje w obrębie centrum katalitycznego rybozymu, MUT3 posiadał TSM w postaci spinki do włosów z przewagą par zasad G-C w trzonie helisy (Rys. 4.7). Zostały one wykorzystane w charakterze cząsteczek kontrolnych do analizy dostępności miejsca transestryfikacji w mRNA oraz do porównania aktywności z zaprojektowanymi rybozymami. Wszystkie zaprojektowane rybozymy wobec mRNA GFP określono jako grupę HHgfp.



Rys. 4.7. Struktury drugorzędowe rybozymów grupy HHgfp. HHgfp-0 – rybozym minimalny. Pozostałe rybozymy zostały wydłużone poprzez dołączenie elementu TLR (receptor czteronukleotydowej pętli, ang. tetraloop receptor) przy końcu 5'. Na fioletowym tle zaznaczono rybozymy wydłużone HHgfp<sup>W</sup> będące punktem wyjścia do dalszych analiz. Cząsteczki zaprojektowane w oparciu o SEA (ang. structure elements arrangement) posiadają symbol "a", w oparciu o minimalizację energii swobodnej (MFE) przypis "b", jeżeli sekwencja została zmieniona po modelowaniu MFE, oznaczenie "c". Regiony zmutowane rybozymów MUT1-3 zaznaczono na niebieskim tle. Miejsce transestryfikacji oznaczono czarnym pełnym trójkątem (pustym w przypadku rybozymów nie wykazujących aktywności katalitycznej). W prostokątnych ramkach zaznaczono region łączący TSM i centrum katalityczne rybozymu o różnej długości w zależności od wariantu cząsteczki. Kolor czerwony – nić substratowa, kolor niebieski – nic rybozymu, TL – czteronukleotydowa pętla (ang. tetraloop).

DNAzymy katalizują transestryfikację RNA w reakcji zależnej od jonów dwuwartościowych. Do katalizy dochodzi pomiędzy pirymidyną zaangażowaną w tworzenie pary zasad oraz wolną puryną. Największą aktywność katalityczną wykazują DNAzymy 10-23 rozpoznające miejsca AU oraz GU [Santoro i Joyce 1997]. Z tego względu zastosowane deoksyrybozymy mogły zostać zaprojektowane w celu rozpoznawania i transestryfikacji tych samych miejsc docelowych co rybozymy hammerhead. Antysensowe kwasy nukleinowe rozpoznają miejsca docelowe na zasadzie komplementarności i prowadzą do zablokowania procesu biosyntezy białka funkcjonując na zasadzie zawady przestrzennej lub poprzez udział RNazy H [Dias i Stein 2002].

Dotychczas do stabilizacji struktury trzeciorzędowej rybozymów wykorzystywano naturalne motywy TSM, otaczające ich domenę katalityczną [Khvorova i in. 2003; Saksmerprome i in. 2004; Weinberg i Rossi 2005; Nelson i Uhlenbeck 2008A]. Nową generację efektywnych HHRz działających *in trans* tworzono na dwa sposoby: i) poprzez wydłużenie helisy I i zastąpienie pętli wybrzuszeniem lub ii) wprowadzenie do helisy I końców 5' i 3' odpowiednio rybozymu i substratu [Carbonell i in. 2011]. Najbardziej aktywne *in trans* są pochodne rybozymu wirusa PLMVd (ang. peach latent mosaic viroid) oraz sTRSV [Carbonell i in. 2011].

Receptory czteronukleotydowych pętli GNRA zaangażowane są w oddziaływania trzeciorzędowe i często występują w dużych cząsteczkach RNA. W intronach grupy I i II oraz RNazie P domena ta została zidentyfikowana jako ewolucyjnie zachowawcza [Costa i Michel 1995]. Rybozym TLR-HRz-gp41 hydrolizujący transkrypt genu gp41 wirusa HIV-1 zaprojektowano poprzez dołączenie do końca 5' minimalnego rybozymu HHRz<sup>m</sup> fragmentu RNA zawierającego motyw receptora dla czteronukleotydowej pętli GAAA [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B]. Przyjęto, że oddziaływania pomiędzy czteronukleotydową pętlą i jej receptorem będą stabilizować aktywną konformację rdzenia katalitycznego podnosząc wydajność transestryfikacji w niskich stężeniach jonów magnezu [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B]. Zaprojektowano tylko jeden rybozym zawierający TLR, nie potwierdzono jego struktury drugorzędowej i nie przeprowadzono optymalizacji położenia elementów strukturalnych względem siebie.

Obecność magnezu wpływa na oddziaływanie pętli TL z receptorem TLR. Pomiędzy 0 i 10 mM stężeniem MgCl<sub>2</sub> występuje około 40-krotny wzrost siły wiązania, ale kompleks pętla:receptor jest tworzony nawet w środowisku pozbawionym jonów Mg<sup>2+</sup> [Hodak i in. 2005]. Z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic resonance, NMR) wykazano, że dwuwartościowe jony metali stabilizują kompleks czteronukleotydowej pętli GAAA z jej receptorem [Davis i in. 2007].

# 4.1.4. Projektowanie rybozymów hammerhead obniżających poziom ekspresji genu DNMT1

Projektowanie wykorzystujące modularny charakter RNA (SEA) zakłada, że rybozymy opracowane na podstawie tego samego schematu powinny wykazywać podobną aktywność wobec różnych genów docelowych. Analogicznie do cząsteczek skierowanych wobec mRNA GFP, zaprojektowano dwa zestawy rybozymów rozpoznających miejsca GUC (substraty T1-1338 nt oraz T2-223 nt) mRNA metylotransferazy I DNA (DNMT1): minimalny HHdnmt-0 oraz wydłużone HHdnmt-6, HHdnmt-5, HHdnmt-4 zawierające dodatkowy element TLR (Rys. 4.8). W celu sprawdzenia dostępności miejsc transestryfikacji zaprojektowano 7 DNAzymów (T1-1338 nt, T2-223 nt, T3-607 nt, T4-1656 nt, T5-1949 nt, T6-2156 nt, T7-2516 nt). Wszystkie zaprojektowane rybozymó wrobec mRNA DNMT1 określono jako grupę HHdnmt. Struktury drugorzędowe rybozymów HHdnmt oparte o MFE różniły się od tych dla HHgfp.



Rys. 4.8. Struktury drugorzędowe rybozymów grupy HHdnmt (T1). HHdnmt-0 rybozym minimalny. Pozostałe rybozymy zostały wydłużone poprzez dołączenie elementu TLR (receptor czteronukleotydowej pętli, ang. tetraloop receptor) przy końcu 5'. Cząsteczki zaprojektowane w oparciu o SEA (ang. structure elements arrangement) posiadają symbol "a", w oparciu o minimalizację energii swobodnej (MFE) przypis "b", jeżeli sekwencja została zmieniona po modelowaniu MFE, oznaczenie "c". Na fioletowym tle zaznaczono rybozymy wydłużone przeciwko DNMT1 wg MFE. Miejsce transestryfikacji oznaczono czarnym pelnym trójkątem. W prostokątnych ramkach zaznaczono region łączący TSM i centrum katalityczne rybozymu o różnej długości w zależności od wariantu cząsteczki. Kolor czerwony – nić substratowa, kolor niebieski – nic rybozymu, TL – czteronukleotydowa pętla (ang. tetraloop).

#### 4.2. Aktywność in vitro rybozymów HHgfp oraz HHdnmt

## 4.2.1. Optymalizacja warunków reakcji

Analizę aktywności katalitycznej zaprojektowanych rybozymów prowadzono w warunkach reakcji jednoobrotowej z nadmiarem rybozymu względem substratu. Reakcję można podzielić na dwa etapy: denaturację/renaturację (I) oraz transestryfikację (II) (Tab. 4.1).

*Tab. 4.1. Warunki reakcji katalizowanej przez HHRz in vitro podlegające zmianom w trakcie badań z wyszczególnieniem etapów denaturacji/renaturacji (I) oraz transestryfikacji (II). PEG – glikol polietylenowy.* 

Etap	Warunki				
	Denturacja 2' 70°C lub jej brak				
	• Schładzanie do 25 °C 2h w urządzeniu Thermomixer lub przez noc w				
Ι	łaźni wodnej				
	• Substrat z rybozymem razem w mieszaninie lub osobno				
	• Stosunek rybozym:substrat (1:10, 1:100)				
	• Stężenie jonów Mg <sup>2+</sup> (1 mM, 10 mM, 100 mM)				
	• Obecność innych jonów (Mn <sup>2+</sup> )				
	• Temperatura (25 °C, 37 °C)				
II	• pH buforu (7.5, 8)				
	• Czas reakcji (45 min – 8h)				
	Obecność dodatkowych związków (spermina, PEG)				
	• Długość substratu (12, 16, 24, 138 nukleotydów)				
ļ					

Warunki transestryfikacji substratu *in vitro* wybrano analizując aktywność rybozymów skierowanych wobec mRNA GFP (Denaturacja 2 min 70°C oraz schładzanie do 25 °C 2h przez noc w łaźni wodnej, 5h reakcji transestryfikacji 37 °C, pH 7,5, stosunek rybozym:substrat 1:100, 1 oraz 10 mM stężenie magnezu, substrat 16 lub 24 nt oraz 10 mM spermina). Zostały one wykorzystane do oceny aktywności pozostałych rybozymów i obliczenia wartości obserwowanej stałej szybkości reakcji (k<sub>obs</sub>).

Potwierdzono, że analizowane warianty wykazują specyficzną względem sekwencji reakcję *in vitro* w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (Rys. 4.9). Wykazano, że wydłużenie czasu renaturacji i wolniejsze schładzanie mieszaniny reakcyjnej poprawiają parametry kinetyczne rybozymów, a długość substratu (16 nt – 138 nt) ma niewielki wpływ

na aktywność większości cząsteczek. Zastosowanie buforu o pH 8 zwiększało aktywność katalityczną rybozymów, jednakże taka wartość pH odbiega od warunków komórkowych, dlatego w reakcji optymalnej stosowano bufor o pH 7.5. Stosowano dwa stężenia jonów magnezu: 1 mM w celu potwierdzenia możliwości transestryfikacji przy niskim stężeniu tego jonu oraz 10 mM, aby wyodrębnić wyraźne różnice w aktywności wszystkich rybozymów (Rys. 4.9). Rybozymy zmutowane w obrębie centrum katalitycznego nie wykazywały aktywności katalitycznej *in vitro* (Rys. 4.10).



Rys. 4.9. Aktywność katalityczna rybozymów HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4 in vitro w wyselekcjonowanych warunkach optymalnych różniących się stężeniem jonów magnezu ( $A - 1 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $B - 10 \text{ mM MgCl}_2$ ). K1 – substrat w wodzie, K2 – substrat w buforze z magnezem, T16 – substrat o długości 16 nt, P8 – produkt reakcji o długości 8 nt.



*Rys.* 4.10. Aktywność katalityczna rybozymów HHgfp-0, HHgfp- $5^{MUT1}$ , HHgfp- $5^{MUT2}$  in vitro w wyselekcjonowanych warunkach optymalnych. K – substrat w buforze z 10 mM MgCl<sub>2</sub>, T16 – substrat o długości 16 nt, P8 – produkt reakcji o długości 8 nt.

Jednym z ograniczeń związanych z zastosowaniem katalitycznych RNA jako terapeutyków jest zależność ich aktywności od względnie wysokich stężeń jonów magnezu [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B]. *In vitro*, najwyższą wydajność hydrolizy RNA katalizowaną przez minimalny rybozym HHRz<sup>M</sup> obserwuje się w obecności około 10 mM Mg<sup>2+</sup> [Stage-Zimmermann i Uhlenbeck 1998], podczas gdy stężenie magnezu w komórce waha się w zakresie 0.5 - 1 mM [Uetani i in. 2003]. Nie wiadomo, czy stężenie jonów nie ulega zmianom w kontekście czasu i przestrzeni. Podstawowym celem w projektowaniu nowych katalitycznych kwasów nukleinowych jest zwiększenie ich aktywności katalitycznej w fizjologicznym stężeniu jonów magnezu. Nie zbadano jednak rozmieszczenia przestrzennego stężeń jonów w komórce. Różnice mogą wynikać między innymi z asocjacji z kwasami nukleinowymi.

Obecność w komórce różnych jonów może wspólnie mieć wpływ na aktywność katalityczną rybozymów [Schnabl i Sigel 2010]. Mangan stanowi najlepszy kofaktor (wzmacnia reakcję około 1000-krotnie lepiej niż magnez), jednakże występuje w najwyższym stężeniu w mitochondriach. Jest ono jednak 1000-krotnie niższe od stężenia magnezu w cytoplazmie. Sumując te efekty, z równym prawdopodobieństwem w mitochondriach kofaktorem może być  $Mg^{2+}$  lub  $Mn^{2+}$ . Stwierdzenie, który jon komórkowy i w jakim stężeniu jest niezbędny do wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów jest dalece utrudnione.

## 4.2.2. Parametry kinetyczne rybozymów HHgfp oraz HHdnmt

Warianty minimalne rybozymów grup HHgfp oraz HHdnmt były najbardziej aktywne *in vitro*, natomiast wydłużone wykazywały niższą efektywność reakcji (Tab. 4.2). W przypadku rybozymów minimalnych obserwowano pojawienie się produktu reakcji już przy czasie początkowym (0 min) (Rys. 4.11). Jest to związane z wysoką aktywnością tego wariantu, który katalizuje reakcję transestryfikacji już w czasie etapu renatruracji bez obecności jonów magnezu.

Uzyskane wartości obserwowanej stałej szybkości reakcji katalitycznej dla wydłużonych rybozymów hammerhead HHgfp oraz HHdnmt były niższe od opisywanych dla minimalnych oraz wydłużonych rybozymów pochodzenia naturalnego. Wartości k<sub>obs</sub> dla tych cząsteczek mieszczą się w zakresie 0.1-2 min<sup>-1</sup> przy 10 mM stężeniu jonów Mg<sup>2+</sup> [Roychowdhury-Saha i in. 2011, Sheptinovskaya i Uhlenbeck 2010, Nelson i Uhlenbeck 2008A].
Rybozym	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	Bląd
HHgfp-0	0.42277	± 0.1
HHgfp-6	0.05744	± 0.03
HHgfp-5	0.00525	$\pm 0.002$
HHgfp-4	0.000184	$\pm 0.0001$
HHdnmt-5	0.00891	$\pm 0.001$

Tab. 4.2. Wartości  $k_{obs}$  (min<sup>-1</sup>) rybozymów hammerhead HHgfp oraz HHdnmt-5.



Rys. 4.11. Wydajność powstawania produktów reakcji transestryfikacji in vitro katalizowanej przez rybozymy HHgfp-5 (A) oraz HHgfp-0 (B) w zależności od czasu. K – substrat w buforze z magnezem, T16 – substrat o długości 16 nt, P8 – produkt reakcji o długości 8 nt, 0'-256' – czas w minutach.

#### 4.2.3. Tworzenie kompleksów rybozymów z substratami

Aby znaleźć przyczyny niskiej aktywności *in vitro* wydłużonych rybozymów hammerhead, analizowano wydajność tworzenia ich kompleksów z substratami. Obserwacja znakowanego radioizotopowo HHgfp-5 w mieszaninie z substratem i w obecności różnych buforów wykazała zróżnicowaną wydajność tworzenia kompleksów w zależności od składu mieszaniny reakcyjnej. Inkubacja w buforze V1 powodowała efektywną transestryfikację oraz tworzenie kompleksu (45.6%) (Rys. 4.12 A). Natomiast w środowisku Tris-HCl pH 7.5 uzyskano kompleks z wydajnością 12%. W pozostałych przypadkach kompleks tworzony był na poziomie 50% dla buforu S1, 52% dla TMN oraz 30% dla buforu hybrydyzacyjnego (H). Bufory różniły się składem i stężeniem jonów metalu oraz pH. Z tych względów nie mogły zostać wykorzystane do analizy aktywności rybozymów *in vitro*.

Wynikiem inkubacji fluorescencyjnie znakowanego substratu z rybozymem w warunkach reakcji bez magnezu i sperminy było powstanie kilku dodatkowych prążków, migrujących wolniej w natywnym żelu poliakrylamidowym (Rys. 4.12 B). Sugerowało to tworzenie alternatywnych konformerów, przyłączanie kilku cząsteczek substratu lub agregację rybozymów. W przypadku rybozymu HHgfp-0 pojawiły się dwa dodatkowe prążki, HHgfp-6 oraz HHgfp-4 – trzy, natomiast cztery dla HHgfp-5. Analiza densytometryczna ujawniła zróżnicowany udział ilościowy prążków.



Rys. 4.12. Analiza tworzenia kompleksów rybozymów z substratem T16 w natywnym żelu poliakrylamidowym. (A) Obserwacja znakowanego radioizotopowo HHgfp-5 w mieszaninie z substratem i w obecności różnych buforów. (B) Badanie fluorescencyjnie znakowanego substratu inkubowanego z rybozymem w warunkach reakcji bez magnezu i sperminy. K(A) –rybozym HHgfp-5, K(B) –substrat T16,  $H_2O$  – rybozym w wodzie, Tris – rybozym w buforze Tris-HCl pH 7.5, S1, V1, TMN, H – bufory, P8 – produkt reakcji o długości 8 nt, 1-4 – dodatkowe pasma alternatywnych konformerów, połączonych kilku cząsteczek substratu lub agregacje rybozymów z substratami.

Niska wydajność tworzenia kompleksu rybozym:substrat w warunkach *in vitro* w buforze Tris-HCl pH 7.5 pokazała, że warunki te nie są wystarczające, aby wydłużone rybozymy mogły przyjąć konformację natywną niezbędną do wydajnej transestryfikacji. Pozostałe analizowane bufory (S1, V1, TMN, H) nie mogły zostać wykorzystane do określania aktywności katalitycznej cząsteczek ze względu na zawartość jonów jedno- oraz dwuwartościowych. Zaobserwowano, że wydłużone HHgfp-6, HHgfp-5 oraz HHgfp-4 mogą tworzyć alternatywne konformery, lub też wiązać niespecyficznie dodatkowe cząsteczki substratu lub rybozymu. Taka heterogenność konformacyjna może wyjaśniać ich niższą aktywność *in vitro* względem HHgfp-0.

Możliwość przyjmowania alternatywnych struktur jest cechą różnych cząsteczek RNA. Wykazano, że modelowy tRNA może przyjmować dwie alternatywne struktury – nieaktywną typu spinka do włosów oraz aktywną typu liścia koniczyny w zależności od stężenia jonów metalu [Madore i in. 1999, Shelton i in. 2001]. Podobny proces scharakteryzowano dla intronów grupy I *Tetrahymena*, które mogą występować w postaci subpopulacji cząsteczek różniących się efektywnością hybrydyzacji substratu i katalizy [Solomatin i in. 2010]. Podobne obserwacje uczyniono dla innych wydłużonych rybozymów hammerhead [Roychowdhury-Saha i in. 2011, Kaddour i in. 2011].

Niewielkie cząsteczki RNA przyjmują natywną strukturę trzeciorzędową w czasie niższym niż 50 ms [Woodson 2010A]. Wraz ze zwiększaniem rozmiarów cząsteczki wzrasta czas przyjmowania aktywnej konformacji RNA *in vitro* i może on wynosić kilka minut, a nawet kilka godzin ze względu na konieczność dużych zmian strukturalnych cząsteczki [Woodson 2010A]. Powolne zwijanie cząsteczki determinuje tempo, w jakim RNA może pełnić swoją biologiczną funkcję. Proces ten stanowi specyficzne "wąskie gardło" reakcji katalitycznej i potencjalnie wymaga zaangażowania mechanizmów komórkowych [Mortimer i Weeks 2009].

#### 4.3. Aktywność rybozymów HHgfp oraz HHdnmt w ludzkich liniach komórkowych

Warunki *in vitro* nie umożliwiły wyboru najbardziej aktywnego wydłużonego wariantu rybozymu. Z tych względów wszystkie cząsteczki poddano analizie w ludzkich liniach komórkowych. Jako układ modelowy do badania wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów wykorzystano linie komórkowe HeLa. W przypadku HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4 oraz cząsteczek kontrolnych (antysensowego DNA, DNA o sekwencji przypadkowej, antysensowego RNA, zmutowanych rybozymów w obrębie rdzenia katalitycznego HHgfp-5<sup>MUT1</sup>, HHgfp-5<sup>MUT2</sup> i w obszarze TSM HHgfp-5<sup>MUT3</sup> oraz DNAzymu

10-23) wykonywano równoległą transfekcję wektorem pEGFP-N3, kodującym gen GFP pod kontrolą silnego promotora (ang. co-transfection). Komórki poddawano analizie 24 godziny po transfekcji. Warunki procesu wprowadzania cząsteczek katalitycznych oraz wektora do komórek zostały zoptymalizowane i nie wpływały na aktywność kwasów nukleinowych.

Analizę aktywności wewnątrzkomórkowej dla grupy rybozymów HHdnmt obniżających poziom mRNA DNMT1 (T1) przeprowadzono w komórkach HeLa oraz HEK 293T.

#### 4.3.1. Zmiany poziomu fluorescencji komórek w obecności rybozymów HHgfp

Wyniki eksperymentów z wykorzystaniem HHgfp badano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego oraz czytnika płytek (Rys. 4.13). Analiza ilościowa wykazała obniżenie emisji światła zielonego przez komórki o około 60-70% przy transfekcji najbardziej aktywnymi cząsteczkami (HHgfp-5, HHgfp-4). Rybozymy wykazywały aktywność zależną od stężenia, a przy 50 nM można było najwyraźniej zaobserwować różnice w aktywności cząsteczek.



Rys. 4.13. Analiza wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów na poziomie fluorescencji z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (A) oraz czytnika płytek (B-C). (A) Zmniejszenie ilości komórek, w których ekspresji ulega gen GFP pod wpływem transfekcji rybozymami. (B) Ilościowa analiza poziomu fluorescencji wpływem rybozymów i cząsteczek kontrolnych. (C) Obniżenie poziomu fluorescencji w zależności od stężenia rybozymu HHgfp-5. HH – rybozym hammerhead, SKR – sekwencja nie wykazującą komplementarności do RNA komórek HeLa i pEGFP, AS – sekwencja antysensowa, K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi.

#### 4.3.2. Obniżanie poziomu mRNA oraz białka pod wpływem rybozymów

Przeprowadzono izolację całkowitego RNA oraz poddano go działaniu DNazy I. Jakość uzyskanego materiału sprawdzano poprzez analizę rozdziału w żelu agarozowym (Rys. 4.14). Do dalszych badań wybierano próby wykazujące równą ilość materiału oraz brak degradacji. Uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji cDNA posłużył jako matryca do łańcuchowej reakcji polimeryzacji (ang. polymerase chain reaction, PCR) oraz ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR, qPCR). W przypadku większości genów wykorzystano po jednym zestawie starterów.



Rys. 4.14. Elektroforeza RNA w żelu agarozowym jako metoda analizy jakościowej. K – materiał z komórek nie transfekowanych rybozymem, 1-4 materiał z komórek transfekowanych odpowiednio rybozymami HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4.

### 4.3.2.1. Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimeryzacji do określenia zmian poziomu mRNA GFP

Uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji cDNA GFP posłużył jako matryca do łańcuchowej reakcji polimeryzacji (ang. polymerase chain reaction, PCR). Oceny poziomu ekspresji dokonano względem genu referencyjnego GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego) (Rys. 4.15).

Analiza prążków wykazała obniżenie poziomu cDNA GFP w komórkach HeLa po transfekcji rybozymami hammerhead. Wyższą aktywność wewnątrzkomórkową wykazywały rybozymy wydłużone względem wariantu minimalnego, przy czym HHgfp-5 oraz HHgfp-4 najlepiej obniżały poziom mRNA GFP.



Rys. 4.15. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR GFP w żelu agarozowym wobec markera wielkości 100-1000 pz (M) oraz genu referencyjnego GAPDH. K – produkty PCR na matrycy cDNA z komórek nie transfekowanych rybozymem, 1-4 produkty PCR na matrycy cDNA z komórek transfekowanych odpowiednio rybozymami HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4. GFP – białko zielonej fluorescencji, GAPDH – dehydrogenza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego.

## 4.3.2.2. Zastosowanie ilościowego PCR w czasie rzeczywistym do określenia zmian poziomu mRNA pod wpływem rybozymów

Analizę ilościową qPCR przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej. Z tego względu wykonywanie reakcji zostało poprzedzone analizą wykorzystywanych starterów techniką rozcieńczeń matrycy (Rys. 4.16) [Schefe i in. 2006]. Polega ona na przeprowadzeniu reakcji qPCR na wspólnej matrycy cDNA oraz jej rozcieńczeniach dla wszystkich par starterów. W wykonanych badaniach analizowano uzyskane krzywe standardowe zależności rozcieńczenia matrycy od cyklu, w którym obserwowano tzw. punkt odcięcia (Ct) (Rys. 4.16 A). Powinny być one równoległe do siebie, a współczynnik "a" równania nachylenia krzywej (y = a x + b) nie powinien różnić się o więcej niż 0.1 pomiędzy zestawem starterów dla genu badanego oraz referencyjnych (beta aktyna, ACTB oraz fosforybozylotransferaza hipoksantyny-guaniny, HPRT).

Wyselekcjonowany w układzie modelowym najlepszy wariant rybozymu miał posłużyć do zaprojektowania analogicznych cząsteczek do obniżania poziomu mRNA GLI1 oraz CRYAB. Równolegle zaprojektowano i analizowano startery dla tych genów. Ze względu na istotność funkcjonalną izoform genu GLI1 zaprojektowano dwa zestawy primerów tGLI1 (dla izoformy tGLI) oraz 123GLI1 (obejmujących wszystkie izoformy). Celem takiego działania

było sprawdzenie zróżnicowanego wpływu rybozymu na obniżanie poziomu mRNA izoform zaangażowanych w procesy nowotworzenia.

W większości przypadków różnica wartości nachylenia krzywych standardowych (współczynników "a" ze wzoru y = a x + b) dla wybranych starterów wobec genów referencyjnych nie przekraczała 0.05 ( $\Delta$ ACTB,  $\Delta$ HPRT) (Rys. 4.16 B). Jakość uzyskanych produktów PCR oceniano poprzez analizę krzywych topnienia (Rys. 4.17). W większości przypadków (wyjątek stanowił zestaw dla tGLI1) uzyskiwano produkty o wysokiej czystości o czym świadczyły pojedyncze piki na wykresie. Ze względu na niejednorodność produktu PCR powstałego w wyniku amplifikacji z użyciem starterów tGLI, nie zostały one wykorzystane w dalszych analizach.



Rys. 4.16. Analiza starterów do reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym metodą rozcieńczeń matrycy. (A) Krzywe standardowe dla wszystkich starterów wykorzystanych w analizach qPCR uzyskane przy rozcieńczeniach matrycy cDNA x1, x5, x25, x125, x625. (B) Porównanie parametru nachylenia krzywej (współczynnika a ze wzoru y = a x + b) i różnic pomiędzy nimi wobec genów referencyjnych ( $\Delta ACTB$  oraz  $\Delta HPRT$ ).



Rys. 4.17. Przykładowe krzywe amplifikacji reakcji qPCR i topnienia starterów dla wybranych eksperymentów. (A) Otrzymywanie krzywych standardowych do optymalizacji starterów GFP, ACTB oraz HPRT reakcji metodą rozcieńczeń matrycy. (B) Analiza qPCR GFP dla prób kontrolnych oraz traktowanych rybozymami. (C) Analiza qPCR genów referencyjnych ACTB oraz HPRT tego samego eksperymentu.

Analiza zmian poziomu mRNA pokazała, że wydłużone rybozymy wykazują wyższą aktywność w komórkach niż rybozym minimalny, przy czym HHgfp-5 najbardziej obniża ekspresję genu do 0.27 względnego poziomu docelowego RNA (Rys. 4.18). Pozostałe cząsteczki obniżały ekspresję do 0.78 (HHgfp-0), 0.69 (HHgfp-6), 0.4 (HHgfp-4), 0.78 (Dzgfp), 1.07 (AS-DNA), 0.9 (AS-RNA), 0.83 (SKR-DNA), 0.38 (HHgfp-5<sup>MUT3</sup>). Wyniki były istotne statystycznie (p<0.05).



Rys. 4.18. Obniżenie poziomu mRNA GFP pod wpływem dzialania rybozymów i DNAzymów w komórkach HeLa analizowane z wykorzystaniem techniki qPCR. K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, Dz – DNAzym 10-23.



Rys. 4.19. Obniżenie poziomu mRNA DNMT1 pod wpływem działania rybozymów i DNAzymów w komórkach HEK 293T analizowane z wykorzystaniem techniki qPCR (A - dla substratu T1, B - dla substratu T2, C - analiza dostępności miejsc T1-6). K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, Dz – DNAzym 10-23, DNMT1 – metylotransferaza 1 DNA, T1-6 – numer miejsca docelowego w substracie mRNA.

Analiza aktywności wewnątrzkomórkowej rybozymów wobec DNMT1 (T1) wykazała ich niską aktywność w komórkach HeLa oraz HEK 293T. Cząsteczki obniżały poziom mRNA następująco: HHdnmt-0 (0.97), HHdnmt-6 (0.96), HHdnmt-5 (0.82), HHdnmt-4 (0.85), Dzdnmt (0.9) (Rys. 4.19). Różnice pomiędzy aktywnością rybozymów nie wykazywały istotności statystycznej przy p<0.05. Zastosowane kontrolne DNAzymy, skierowane na 5 miejsc docelowych oraz grupa rybozymów HHdnmt skierowanych na miejsce (T2) nie doprowadziły do spadku poziomu ekspresji. Nie uzyskano analogicznych wyników aktywności rybozymów skierowanych przeciwko GFP oraz DNMT1.

Zastosowany w obu przypadkach system projektowania oparty o modularny charakter RNA nie bierze pod uwagę wpływu sekwencji substratu na strukturę kompleksu rybozym:substrat. Zaprojektowane wobec różnych genów docelowych rybozymy z grup HH-6, HH-5, HH-4 nie posiadały analogicznych struktur (Rys. 4.7, 4.8). Drugą przyczynę niskiej aktywności rybozymów HHdnmt może stanowić brak dostępności dwuniciowego fragmentu mRNA DNMT1 oraz mała ilość par GC w sekwencji substratu, co sprzyja szybkiemu oddysocjowaniu rybozymu od mRNA (Rys. 4.6). Rybozym hammerhead HHRz rozpoznaje docelową sekwencję w RNA według reguł parowania typu Watsona-Cricka. Długość i skład nukleotydowy ramion otaczających miejsce hydrolizy powinny zapewniać na tyle silne wiązanie rybozymu HHRz do substratu, aby uniemożliwić przedwczesne oddysocjowanie [Fedor i Uhlenbeck, 1990]. Z tych względów zweryfikowano strategię projektowania cząsteczek katalitycznych RNA.

## 4.3.2.3. Wykorzystanie metody Western Blot do określenia zmiany poziomu białek pod wpływem rybozymów

W równolegle prowadzonych eksperymentach zebrano komórki, przeprowadzono izolację całkowitego białka oraz oszacowano jego ilość w celu wykonania analizy Western Blot. Jakość uzyskanego materiału sprawdzano poprzez rozdział w żelu poliakrylamidowym z SDS (Rys. 4.20). Do dalszych badań wybierano jedynie próby wykazujące równą ilość materiału oraz brak degradacji. Densytometryczną analizę ilościową reakcji prowadzono po skanowaniu membran i ich ocenie w programie MultiGauge 3.0 (FujiFilm).



Rys. 4.20. Analiza jakości oraz ilości białka w żelu poliakrylamidowym z SDS. K – materiał z komórek HeLa nie transfekowanych rybozymem, 1-4 materiał z komórek HeLa transfekowanych odpowiednio rybozymami HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4.



Rys. 4.21. Aktywność rybozymów i cząsteczek kontrolnych wobec mRNA GFP w komórkach HeLa analizowana na poziomie białka. A - Western Blot przeciwko genom GFP oraz GAPDH (referencja). K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, Dz – DNAzym 10-23, SKR – sekwencja przypadkowa, AS – sekwencja antysensowa, GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, GFP – białko zielonej fluorescencji.



Rys. 4.22. Aktywność rybozymów i cząsteczek kontrolnych wobec mRNA DNMT1 w komórkach HeLa analizowana na poziomie białka. A - Western Blot przeciwko genom DNMT1 oraz GAPDH (referencja). K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego, DNMT1 – metylotransferaza 1 DNA.

Analiza metodą Western Blot potwierdziła, że wydłużone rybozymy wykazują wyższą aktywność w komórkach wobec mRNA GFP niż rybozym minimalny, przy czym HHgfp-5 powoduje najwyższe obniżenie ekspresji genu docelowego do 0.25 na poziomie białka (Rys. 4.21). Pozostałe cząsteczki obniżały ekspresję do 0.53 (HHgfp-0), 0.4 (HHgfp-6), 0.43 (HHgfp-4), 0.45 (Dzgfp), AS-0.56 (DNA), 0.49 (AS-RNA), 0.71 (SKR-DNA), 0.43 (HHgfp-5<sup>MUT3</sup>). Analizę wpływu nieaktywnych katalitycznie rybozymów HHgfp-5<sup>MUT1</sup> oraz HHgfp-5<sup>MUT2</sup> badano na poziomie białka, którego poziom wynosił odpowiednio do 0.95 oraz 1.12. Uzyskane wyniki były istotne statystycznie (p<0.05). Analiza Western Blot aktywności rybozymów grupy HHdnmt nie wykazała istotnego wpływu tych cząsteczek na ekspresję genu DNMT1 (Rys. 4.22).

# 4.3.2.4. Zastosowanie metody RPA do określenia zmian poziomu mRNA pod wpływem rybozymu HHgfp-5

Przeprowadzono analizę RPA (ang. RNAse Protection Assay) pozwalającą na wykrycie i analizę ilościową określonych cząsteczek RNA w mieszaninie komórkowych RNA [Young i in. 2003]. W tym celu zaprojektowano sondy o sekwencji antysensowej (komplementarnej) oraz sensowej (kontrolną). Sondy inkubowano w warunkach sprzyjających hybrydyzacji z całkowitym RNA komórek kontrolnych HeLa oraz transfekowanych wektorem pEGFP-N3 i rybozymem HHgfp-5. Próby kontrolne traktowano jedynie plazmidem pEGFP-N3. Mieszaninę po hybrydyzacji poddawano hydrolizie rybonukleazami. Następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym i dokonywano analizy ilościowej w programie MultiGauge. Wykorzystana sonda oprócz wiązania specyficznej sekwencji mRNA GFP, wiązała się także niespecyficznie z rybonukleazami oraz prawdopodobnie DNA pozostałym po syntezie sondy pomimo zastosowania DNAzy I. Przed analizą ilościową podjęto normalizację uzyskanych wyników. Polegała ona na odjęciu wartości niespecyficznego prążka (w próbie "+") od wartości prążków istotnych eksperymentalnie (w próbach K2 oraz HHgfp-5). Po tym etapie oszacowano, że HHgfp-5 obniżał poziom mRNA GFP o 85% (Rys. 4.23). Wyniki były istotne statystycznie (p<0.05).



Rys. 4.23. Analiza poziomu RNA z komórek kontrolnych HeLa (K2) oraz traktowanych rybozymem HHgfp-5 metodą RPA (ang. RNase protection asay). Po lewej kontola negatywna z sondą o sekwencji sensowej (S). Po prawej eksperyment z wykorzystaniem sondy o sekwencji antysensowej (A). K1 – sama sonda, S-A –mieszanina sond o sekwencji sensowej (S) oraz antysensowej (A), + kontrola bez matrycy, z tRNA oraz RNazami, - kontrola bez matrycy i RNAz z tRNA.

#### 4.4. Określenie struktury drugorzędowej rybozymów

# 4.4.1. Zastosowanie metody chemicznej i enzymatycznej do analizy struktur drugorzędowych rybozymów HHgfp oraz HHdnmt

W projektowaniu rybozymów rozważane były dwa podejścia strategiczne: łączenie bloków RNA metodą SEA oraz modelowanie w oparciu o MFE. Struktury zaproponowane dzięki SEA oznaczane były jako "a", natomiast uzyskane w oparciu o MFE "b". Aby dociec, które podejście jest bardziej precyzyjne przeprowadzono analizę struktury drugorzędowej rybozymów metodą chemiczną (z wykorzystaniem jonów ołowiu) oraz enzymatyczną (rybonukleazy T1, S1, V1) *in vitro*. Analizie tej poddano rybozymy HHgfp-5, HHgfp-6, HHgfp-4, HHdnmt-5. Ze względu na niską efektywność tworzenia kompleksu rybozymu z substratem oraz wysoki poziom transestryfikacji w buforze V1 analiza strukturalna objęła jedynie region TSM rybozymu nie związanego z substratem. Struktura drugorzędowa tego elementu stanowiła czynnik różnicujący cząsteczki projektowane w oparciu o MFE i SEA (Rys. 4.24).

Zgodność danych eksperymentalnych z modelem struktury drugorzędowej obliczono poprzez zsumowanie liczby oznaczonych miejsc hydrolizy zgodnych z założonym modelem, pomnożenie przez 100% i podzielenie przez całkowitą liczbę oznaczonych eksperymentalnie lokalizacji. Dla HHgfp-5b wyniosła ona 94% w porównaniu do 65% dla HHgfp-5a (Rys. 4.24). W przypadku HHgfp-6 79% dla struktury "b" oraz 50% dla struktury "a". Struktury HHdnmt-5a oraz HHdnmt-5b wykazywały równą zgodność z wynikami eksperymentalnymi 58%. Jedynie w przypadku HHgfp-4 struktura "a" wykazała większą zgodność z wynikami eksperymentalnymi (75%) niż "b" (50%). Uzyskane wyniki potwierdziły dużą zgodność danych eksperymentalnych z modelowaniem w oparciu o MFE.

Struktury drugorzędowe wygenerowane z wykorzystaniem MFE dla grupy rybozymów HHdnmt różniły się od HHgfp. Pomimo jednakowej strategii projektowania w oparciu o SEA uzyskano dwie populacje cząsteczek różniących się od siebie. Sugeruje to, że projektowanie rybozymów stabilizowanych przez element TLR powinno wziąć pod uwagę wpływ sekwencji substratu na całkowitą konformację kompleksu, a struktura powinna zostać potwierdzona eksperymentalnie. Zidentyfikowano 46 odrębnych konformerów opisujących rozkład kątów torsyjnych i geometrię jednostki fosforanowo-cukrowej [Richardson i in. 2008]. Zmiana choćby jednego kąta torsyjnego, w związku z powstającymi oddziaływaniami rybozym:substrat może prowadzić do lokalnych zmian, dając cząsteczki różniące się właściwościami [Richardson i in. 2008].

Dane eksperymentalne uzyskane metodami wykorzystującymi jony ołowiu oraz rybonukleazy wzajemnie się uzupełniają. Odczynniki chemiczne reagują z cząsteczkami RNA w miejscach stereochemicznej dostępności. Z kolei rybonukleazy wykazują specyficzność względem zdefiniowanych miejsc w strukturze bądź sekwencji RNA. Warunki działania nukleaz różnią się jednak od siebie, co może mieć wpływ na strukturę RNA. Z kolei hydroliza RNA w pewnych miejscach może potencjalnie powodować zmiany strukturalne i prowadzić do powstania artefaktów [Ehresmann i in. 1987].

Minimalizacja energii swobodnej mimo swoich ograniczeń stanowi najbardziej popularną metodę przewidywania struktury drugorzędowej RNA, która polega na analizie zależności sekwencji od stabilności termodynamicznej tworzonych kanonicznych par zasad [Mathews i Turner 2006]. Dla sekwencji krótszych niż 700 nukleotydów pozwala ona na prawidłowe przewidzenie struktury drugorzędowej w 70% [Wan i in. 2011].



Rys. 4.24. Struktura drugorzędowa regionu TSM rybozymu HHgfp-5 (na szarym tle, elementy niezależne od obecności substratu). (A) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy enzymatycznej rybozymu znakowanego radioaktywnym fosforem przy końcu 5'. (B) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy z udziałem jonów ołowiu Pb<sup>2+</sup> rybozymu znakowanego radioaktywnym fosforem przy końcu 5'. Po prawej alternatywne struktury rybozymów w oparciu o projektowanie według SEA (HHgfp-a) oraz MFE (HHgfp-b). Czarny trójkąt – hydroliza z udziałem VI, strzałka - hydroliza z udziałem 51, kropki - hydroliza z udziałem jonów Pb<sup>2+</sup>, K – cząsteczka nietraktowana, L – alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych, T1 – ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1, HH – rybozym hammerhead, HH+T16 – rybozym w obecności substratu T16.

# 4.4.2. Właściwości katalityczne rybozymów HHgfp-5 oraz HHgfp-5<sup>MUT3</sup> w reakcji z substratami o różnej długości

Zaproponowana strategia projektowania rybozymów SEA dała w rezultacie cząsteczki różniące się strukturą drugorzędową. Według projektów rybozymów i analizy MFE kompleksów rybozymów z substratami struktura rybozymu HHgfp-5b wykazuje zależność od hybrydyzacji substratu, ponieważ region 5' rybozymu tworzy z nim helisę o długości 3 pz. Natomiast w projekcie opartym o SEA, struktura rybozymu nie jest zależna od substratu. W związku z tym porównano aktywności in vitro HHgfp-5 oraz HHgfp-5<sup>MUT3</sup>, którego struktura (wg MFE) wskazuje na niezależność struktury regionu TSM od sekwencji substratu (Rys. 4.25). W badaniach wykorzystano substraty o długości 12 oraz 16 nukleotydów (T12, T16). Krótszy substrat był pozbawiony regionu oddziałującego dodatkowym fragmentem helikalnym z HHgfp-5b. Efektywność transestryfikacji T12 z udziałem HHgfp-5 była bardzo niska (15.5%), podczas gdy dla T16 wyniosła aż 98% (Rys. 4.26). HHgfp-5<sup>MUT3</sup> wykazywał wysoką aktywność działania niezależnie od długości substratu. Obniżony poziom transestryfikacji substratu T12 przez rybozym HHgfp-5b był rezultatem braku możliwości przyjęcia struktury warunkującej wydajną aktywność katalityczną. Hybrydyzacja rybozymu do substratu o długości co najmniej 16 nukleotydów umożliwiała przyjęcie struktury charakterystycznej dla modelu HHgfp-5b.



Rys. 4.25. Porównanie cech struktury drugorzędowej rybozymów HHgfp-5b (A) oraz HHgfp-5<sup>MUT3</sup> (B) oraz sekwencji substratów T16 oraz T12 (C). Miejsce transestryfikacji oznaczono czarnym pełnym trójkątem. Kolor czerwony – nić substratu, kolor niebieski – nić rybozymu.



Rys. 4.26. Porównanie aktywności rybozymów HHgfp-5 oraz HHgfp-5<sup>MUT3</sup> w zależności od długości substratu in vitro. K – substrat w buforze Tris pH 7.5 z magnezem, 1 – substrat, rybozym w buforze z 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 - substrat, rybozym w buforze z 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 10 mM sperminą, T16 – substrat o długości 16 nt, T12 – substrat o długości 12 nt, P8 – produkt reakcji o długości 8 nt, P7 – produkt reakcji o długości 7 nt.

#### 4.4.3. Zaproponowanie struktury dla nowego rybozymu HH-5N.

Na podstawie badań w liniach komórkowych oraz analiz strukturalnych zaproponowano nowy wydłużony rybozym hammerhead HH-5b (HH-5N) (Rys. 4.27). Jest on stabilizowany przez dodatkowy element TSM przy końcu 5', składający się ze struktury typu spinka do włosów (A) z helisą H4, połączenia trzech helis (B) oraz dodatkowego regionu rozpoznawania substratu (H5). Spinka A oddziałuje z H2, co determinuje przyjęcie przez centrum katalityczne rybozymu odpowiedniej geometrii warunkującej wysoką aktywność wewnątrzkomórkową. Połączenie trzech helis B zawiera cztery niesparowane nukleotydy, których lokalizacja pomiędzy helisami umożliwia ułożenie względem siebie elementów A oraz H2. Region H5 poprawia specyficzność rybozymu i powinien zawierać co najmniej 3 pary zasad, najlepiej silne pary G-C. Rybozym HH-5N wykazuje wysoką wydajność wewnątrzkomórkowej transestryfikacji wobec różnych docelowych mRNA. Pewną wadą jest występowanie dodatkowego regionu hybrydyzacji z substratem (H5). Jednocześnie stanowi on kluczowy element cząsteczki, zapewniający przyjęcie odpowiedniej konformacji i zwiększający specyficzność działania.



Rys. 4.27. Modele struktury drugorzędowej (po lewej) oraz trzeciorzędowej (po prawej) rybozymu HH-5N (HH-5b). Regiony oddziaływań trzeciorzędowych zaznaczono ramkami. H1-5 – helisy, A – pętla motywu typu spinka do włosów, B – motyw połączenia trzech helis, kolor niebieski – rybozym minimalny, czerwony – substrat RNA, różowy – motyw stabilizujący strukturę trzeciorzędową. Miejsce transestryfikacji oznaczono czarnym trójkątem.

### 4.5. Projektowanie rybozymów HH-5N wobec mRNA genów GLI1 oraz CRYAB

Wyselekcjonowano najbardziej aktywny w komórkach wariant rybozymu HH-5N i na jego podstawie zaprojektowano cząsteczki wobec transkryptów genów GLI1 oraz CRYAB (Rys. 4.28).

Pierwotny projekt na bazie strategii SEA został zmodyfikowany o najniższą wartość energii swobodnej (MFE) i wsparty modelowaniem cząsteczek rybozymów w kompleksie z substratami. Struktury rybozymów w oparciu o SEA posiadają określenie "a", w oparciu o MFE "b". Jeżeli sekwencja rybozymu musiała zostać zmieniona, aby struktura drugorzędowa odpowiadała wzorcowemu rybozymowi HH-5N uzyskiwała przypis "c".



Rys. 4.28. Struktury drugorzędowe rybozymów wobec mRNA GLI1 oraz CRYAB. HHgli-0 – rybozym minimalny. Pozostałe rybozymy zostały wydłużone poprzez dołączenie elementu TLR (receptor czteronukleotydowej pętli, ang. tetraloop receptor) przy końcu 5'. Na fioletowym tle zaznaczono rybozym wydłużony HHgfp-5b będący punktem wyjścia do projektowania nowych cząsteczek. Rybozym HHgli-5b został zaprojektowany poprzez dołączenie elementu TLR zgodnie z SEA, ale przedstawiony w oparciu o minimalizację energii swobodnej (MFE). Jeżeli sekwencja została zmieniona po modelowaniu, dodano oznaczenie "c" (zmiany sekwencji na szarym tle). W okręgach zaznaczono rybozymy o tej samej strukturze drugorzędowej HH-5N. Miejsce transestryfikacji oznaczono czarnym pełnym trójkątem. Kolor czerwony – nić substratowa, kolor niebieski – nic rybozymu.

Wobec mRNA GLI1 zastosowano rybozym minimalny HHgli-0, wydłużony HHgli-5b (oparty o strategię SEA) oraz HHgli-5c (wg MFE ze zmianami w sekwencji) oraz DNAzym 10-23. W celu obniżenia ekspresji mRNA CRYAB wykorzystano rybozym HHcry-5c (wg MFE ze zmianami w sekwencji) oraz DNAzym 10-23. Aby otrzymać HHgli-5c zmieniono 6, a w HHcry-5c 4 nukleotydy przy końcu 5' rybozymu. Wprowadzenie zmian było niezbędne w celu uzyskania modelu struktury drugorzędowej HH-5N, a różnice wynikały z odmiennych sekwencji substratu.

Strategie projektowania rybozymów powinny uwzględniać wpływ sekwencji substratu na strukturę rybozymu oraz możliwe dodatkowe oddziaływania pomiędzy oddalonymi nukleotydami. Pierwotne podejście do projektowania oparte o aranżację elementów strukturalnych SEA zostało zmodyfikowane i ostatecznie oparte o analizę struktur drugorzędowych uzyskanych poprzez minimalizację energii swobodnej wraz z jej weryfikacją poprzez analizy strukturalne *in vitro*. Uzyskanie możliwie najbardziej precyzyjnej struktury drugorzędowej jest elementem niezbędnym do otrzymania wiarygodnych modeli struktury trzeciorzędowej. Wykazano, że skrócenie cząsteczki tylko o jeden nukleotyd może mieć daleko idące konsekwencje strukturalne i funkcjonalne.

#### 4.6. Właściwości rybozymów HH-5N

### 4.6.1. Reakcja transestryfikacji in vitro

Porównano aktywność katalityczną rybozymów *in vitro* w wybranych warunkach optymalnych (Rozdz. 4.2.1). We wszystkich przypadkach warianty minimalne rybozymów wykazywały wyższą aktywność niż wydłużone (Tab. 4.3) (Rys. 4.29 A). Wyniki były istotne statystycznie (p<0.05). Analizy *in vitro* wydłużonych rybozymów wykazały, że szybkość reakcji katalitycznej zwiększała się dopiero około 30 minut po jej rozpoczęciu poprzez dodanie jonów magnezu i sperminy (Rys. 4.29 B). Sugeruje to, że obecność tych czynników w mieszaninie reakcyjnej była niezbędna dla cząsteczek do przyjęcia aktywnej konformacji, co następowało w czasie około 30 minut.

Rybozym	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	Błąd
HHgfp-0	0.42277	± 0.12
HHgfp-6	0.05744	± 0.03
HHgfp-5	0.00525	$\pm 0.002$
HHgfp-4	0.000184	$\pm 0.0001$
HHdnmt-5	0.00891	± 0.001
HHgli-0	1.11797	± 0.12
Rzgli-5b	0.323525	± 0.12
Rzcry-5c	0.17652	± 0.07
Rzgli-5c	0.02443	± 0.004

Tab. 4.3. Wartości k<sub>obs</sub> (min<sup>-1</sup>) rybozymów hammerhead HHgfp, HHdnmt, HHgli, HHcry.



*Rys.* 4.29. Porównanie aktywności rybozymów in vitro. (A) Obliczony parametr  $k_{obs}$  rybozymów. (B) Porównanie własności kinetycznych rybozymów jako funkcji efektywności reakcji (%) w zależności od czasu w minutach.

Wszystkie rybozymy klasy HH-5N wykazywały niską aktywność *in vitro* w porównaniu do ich minimalnych odpowiedników, często wymagając 10 mM stężenia jonów magnezu, dodatku 10 mM sperminy oraz długiego okresu renaturacji (16 godzin) do uzyskania aktywności katalitycznej. Niezależnie od przedstawionych różnic w aktywności, badania *in vitro* potwierdziły, że katalizowana reakcja zachodzi w sposób specyficzny względem sekwencji przy niskim stężeniu Mg<sup>2+</sup>, zbliżonym do fizjologicznego.

Wcześniej pokazano, że obecność sperminy w mieszaninie reakcyjnej może zwiększać aktywność katalityczną *in vitro* rybozymu hairpin [Earnshaw i Gait 1998] oraz wpływać na konformacje kwasów nukleinowych [Real i Greenall 2004]. Syntetyczne sekwencje RNA o tej samej długości i składzie zasad mogą ulegać procesowi zwijania inaczej niż cząsteczki, będące wynikiem działania presji selekcyjnej w toku ewolucji [Schultes i in. 2005]. Projektowane rybozymy, posiadające elementy strukturalne różnych RNA (TLR z intronów grupy I *Tetrahymena* oraz minimalny rybozym typu hammerhead wirusa roślinnego) mogą zatem wykazywać inne cechy, niż fragmenty te w natywnych strukturach pochodzenia naturalnego. Wysoce kooperatywny i specyficzny proces zwijania RNA jest rezultatem selekcji naturalnej i nie wynika jedynie z własności helis. Z tego względu postuluje się, że przewidywanie i projektowanie RNA [Behrouzi i in. 2012].

# 4.6.2. Zastosowanie metody chemicznej i enzymatycznej do analizy struktur drugorzędowych rybozymów HHgli oraz HHcry

Aby potwierdzić struktury drugorzędowe zaprojektowanych rybozymów przeprowadzono analizę metodą chemiczną (z wykorzystaniem jonów ołowiu) oraz enzymatyczną (z zastosowaniem rybonukleaz T1, S1, V1) *in vitro*. Poddano jej rybozymy HHgli-5b, HHgli-5c oraz HHcry-5. Analiza strukturalna objęła jedynie region TSM rybozymu nieoddziałujący z nicią substratu, który różnił się w cząsteczkach projektowanych w oparciu o MFE i SEA.

Obliczono ją analogicznie jak w przypadku rybozymów grupy HHgfp. Struktury HHgli-5c (Rys. 4.30), HHcry-5c (Rys. 4.31), oraz HHgli-5b były zgodne z przewidzianym modelem MFE odpowiednio w 78%, 86% oraz 92%. Uzyskane wyniki potwierdziły dużą zgodność danych eksperymentalnych z modelowaniem w oparciu o MFE.



Rys. 4.30. Struktura drugorzędowa regionu TSM rybozymu HHgli-5c (na szarym tle, elementy niezależne od obecności substratu). (A) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy enzymatycznej rybozymu znakowanego radioaktywnie przy końcu 5'. (B) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy z udziałem jonów ołowiu  $Pb^{2+}$  rybozymu znakowanego radioaktywnym fosforem przy końcu 5'. U dołu struktura rybozymu w oparciu o projektowanie według MFE. Czarny trójkąt – hydroliza z udziałem V1, strzałka - hydroliza z udziałem S1, kropki - hydroliza z udziałem jonów  $Pb^{2+}$ , K – cząsteczka nietraktowana, L – alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych, T1 – ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1, HH – rybozym hammerhead.



Rys. 4.31. Struktura drugorzędowa regionu TSM rybozymu HHcry-5c (na szarym tle, elementy niezależne od obecności substratu). (A) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy enzymatycznej rybozymu znakowanego radioaktywnym fosforem przy końcu 5'. (B) Autoradiogram 20% żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy z udziałem jonów ołowiu  $Pb^{2+}$  rybozymu znakowanego radioaktywnym fosforem przy końcu 5'. U dołu struktura rybozymu w oparciu o projektowanie według MFE. Czarny trójkąt – hydroliza z udziałem V1, strzałka - hydroliza z udziałem S1, kropki - hydroliza z udziałem jonów  $Pb^{2+}$ , K – cząsteczka nietraktowana, L – alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych, T1 – ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1, HH – rybozym hammerhead.

# 4.6.3. Obniżanie poziomu ekspresji genów GLI1 oraz CRYAB w linii komórkowej U118 pod wpływem rybozymów

Badanie aktywności cząsteczek obniżających ekspresję genów GLI1 oraz CRYAB przeprowadzono w linii komórkowych U118. Wykazano wysoką aktywność HHcry-5c oraz HHgli-5c, prowadzącą do obniżenia względnego poziomu mRNA odpowiednio do 0.65 oraz 0.54 i białka do 0.78 i 0.48 (Rys. 4.32, 4.33). Pozostałe cząsteczki doprowadziły do obniżenia poziomu ekspresji genów docelowych do 0.9 (Dzcry), 0.58 (HHgli-0), 0.79 (Dzgli), 0.99 (HHgli-5b). Wyniki były istotne statystycznie (p<0.05). Zaprojektowana dodatkowo cząsteczka kontrolna HHgli-5b bez zmian w sekwencji oraz posiadająca inną strukturę drugorzędową niż HH-5N nie wykazała aktywności wewnątrzkomórkowej w porównaniu do HHgli-5c.



Rys. 4.32. Aktywność rybozymów i DNAzymów wobec CRYAB oraz GLI1 w komórkach U118 analizowana na poziomie RNA metodą qPCR. K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, Dz - DNAzym 10-23, GLI1 – ang. glioma associated oncogene 1, CRYAB –  $\alpha$ -B-krystalina.

Różnice w skuteczności obniżania poziomu ekspresji genów docelowych GFP, CRYAB oraz GLI1 mogą być spowodowane czynnikami takimi jak sekwencja substratu, różna dostępność transkryptu, jego stabilność czy regulacja ekspresji w cyklu komórkowym. Aby sprawdzić wpływ dostępności mRNA na wynik eksperymentów zastosowano DNAzymy 10-23. Porównanie aktywności HH-0, HH-5b/c oraz DNAzymów działających przeciwko temu samemu substratowi w komórce wykazało, że grupa HH-5b/c stanowi najbardziej aktywne rybozymy.



Rys. 4.33. Aktywność rybozymów i cząsteczek kontrolnych wobec mRNA GLI1 oraz CRYAB w komórkach U118 analizowana na poziomie białka względem genu referencyjnego GAPDH. A - Western Blot przeciwko genom DNMT1 oraz GAPDH (referencja). B – Ocena ilościowa Western Blot. K – komórki nie traktowane rybozymami lub cząsteczkami kontrolnymi, HH – rybozym hammerhead, GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, GL11 – ang. glioma associated oncogene 1, CRYAB –  $\alpha$ -B-krystalina.

#### 4.6.4. Porównanie właściwości katalitycznych rybozymów

Zaprojektowano 31 cząsteczek kwasów nukleinowych w celu inhibicji ekspresji genów według różnych strategii wobec mRNA czterech genów docelowych. Ich aktywność analizowano *in vitro* oraz w 3 liniach komórkowych HeLa, HEK 293T oraz U118 (Rys. 4.34).

Analiza własności kinetycznych rybozymów klasy HH-5N wykazała istnienie populacji cząsteczek o różnych właściwościach katalitycznych (przyjmujących aktywną konformację z różną szybkością w zależności od składu mieszaniny reakcyjnej, Rozdz. 4.6.1). Sugeruje to, że zamiana nieaktywnych rybozymów w aktywne konformery w obecności jonów magnezu i sperminy wymaga czasu (15-60 minut) (Rozdz. 4.6.1). Wydaje się, że nieaktywne konformery znajdują się w kinetycznej pułapce i nie przekształcają się w aktywne cząsteczki nawet po długim okresie czasu [Nashimoto 2000, Herschlag 1995]. Sugerowano, że



dwuetapowy proces zwijania może stanowić czynnik ograniczający tempo katalizy, co wyjaśnia niską aktywność *in vitro* niektórych cząsteczek [Buskiewicz i Burke 2012].

Rys. 4.34. Geny docelowe oraz cząsteczki kwasów nukleinowych zastosowane do inhibicji poziomu ekspresji. HH – rybozym hammerhead, AS- sekwencja antysensowa, SKR – sekwencja przypadkowa, Dz – DNAzym, T – docelowe miejsce w substracie mRNA, MUT1-3 – rybozymy z wprowadzoną mutacją.

Zastosowane DNAzymy potwierdziły dostępność mRNA i obniżały poziom ekspresji genów docelowych z niższą wydajnością niż HH-5N. Oligonukleotydy o sekwencji antysensowej oraz przypadkowej (RNA i DNA) nie powodowały znaczącego obniżenia poziomu mRNA oraz białka. Działały one prawdopodobnie na zasadzie przeszkody strukturalnej procesu biosyntezy białka. Rybozymy zmutowane w obrębie centrum katalitycznego (HHgfp-5<sup>MUT1</sup> oraz HHgfp-5<sup>MUT2</sup>), które nie wykazywały aktywności katalitycznej *in vitro*, nie prowadziły do obniżenia poziomu białka. Co ciekawe mutant HHgfp-5<sup>MUT3</sup>, o sekwencji zmienionej w obrębie TSM (struktura typu spinka do włosów z dużą ilością silnych par G-C) oraz 5 par zasad w helisie I był bardzo aktywny *in vitro* jak i *ex vivo*. Jego aktywność wewnątrzkomórkowa była podobna do tej, którą prezentowały inne wydłużone rybozymy. Dodanie dowolnej struktury typu spinka do włosów przy końcu 5' rybozymu może stanowić wystarczający czynnik zmieniający geometrię centrum katalitycznego. Może być to spowodowane przez połączony efekt specyfiki topologii

połączenia trzech helis oraz możliwości oddziaływania czteronukleotydowej pętli jedynie z bruzdą RNA w regionie par G-C.

Porównanie wyników *ex vivo* oraz *in vitro* pokazało, że mieszanina reakcyjna może stanowić jedynie przybliżenie warunków komórkowych. Do tej pory uważano, że wydłużone rybozymy hammerhead są bardzo aktywne zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [Khvorova i in. 2003, Saksmerprome i in. 2004, Burke i Greathouse 2005, Carbonell i in. 2011]. Najwyraźniej dotyczy to tylko cząsteczek, których elementy strukturalne mają wspólne pochodzenie ewolucyjne. Istnieją doniesienia, że rybozymy, wykazujące niską aktywność *in vitro* mogą sprawnie obniżać poziom mRNA *in vivo* [Roychowdhury-Saha i in. 2011, L'Huillier i in. 1992, Crissel i in. 1993].

Różnice w aktywności rybozymów *in vitro* oraz *ex vivo* sugerują, że mieszanina reakcyjna nie odzwierciedla warunków komórkowych, dlatego wykorzystywanie jej do selekcji cząsteczek jest mało wiarygodne. Rozsądnym wydaje się być zastosowanie łączonej metody selekcji *in vitro/in vivo*, która przezwycięża niedoskonałości obu metod [Chen i in. 2009]. Podobne rozwiązanie oferuje metoda selekcji oparta jedynie o wyniki analiz aktywności wewnątrzkomórkowej rybozymów katalizujących proces składania genów *in trans* [Olson i Müller 2012].

Aktywność rybozymu *in vivo* jest ograniczona nie tylko ze względu na stężenie jonów magnezu, ale także siłę jonową, temperaturę, dostępność substratu, oddziaływanie z komponentami komórki oraz lokalizację [Chen i in. 2009]. Makrocząsteczki mogą indukować zmiany konformacyjne rybozymu hammerhead poprzez zderzenia, niespecyficzne słabe interakcje oraz efekt stłoczenia cząsteczkowego [Nashimoto 2000, Nakano i in. 2009, Kilburn i in. 2010, Bertrand i Rossi 1994, Sioud i Jespersen 1996].

### 4.7. Modelowanie struktur trzeciorzędowych rybozymów w kompleksie z substratami

W celu porównania własności rybozymów w kontekście zależności strukturalnofunkcjonalnych wykorzystano modele struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksach z substratami. Jako punkt wyjścia do modelowania wykorzystano struktury drugorzędowe o najwyższej zgodności z wynikami analiz strukturalnych *in vitro*. We wszystkich przypadkach rybozymów wydłużonych oprócz HHgfp-4 wykorzystano struktury w oparciu o MFE. Do analizy bioinformatycznej wpływu sekwencji substratu na geometrię centrum katalitycznego zaprojektowano wyłącznie do badań *in silico*) 61 minimalnych rybozymów hammerhead różniących się sekwencją 16-nukleotydowego substratu.

#### 4.7.1. Uzyskanie tzw. "odcisku palca" rybozymów hammerhead

Modele struktury trzeciorzędowej aktywnych stanów konformacyjnych rybozymów w kompleksie z substratami posłużyły do zrozumienia różnic we właściwościach zaprojektowanych cząsteczek (Rys. 4.36). Modele uzyskano wykorzystując program RNAComposer [Popenda i in. 2012]. Działa on na zasadzie zamiany struktury drugorzędowej RNA na trzeciorzędową w oparciu o bazę danych RNA FRABASE v. 2.0 [Popenda i in. 2010]. Wykorzystuje ona struktury RNA zdeponowane w bazie danych PDB (ang. protein data bank), sekwencje RNA oraz struktury drugorzędowe zapisane w postaci kropek i nawiasów (ang. dot-bracket), struktury fragmentów RNA oraz struktury trzeciorzędowe.

Tworzenie modeli rozpoczynało się od wyboru miejsca docelowego w mRNA oraz elementów strukturalnych rybozymu (Rys. 4.35 A). Następnie wirtualnie łączono 5' końca nici substratu z 3' końcem nici rybozymu sekwencją GGG, co umożliwiało zbudowanie modelu rybozymu *in cis* typu I, co było niezbędne do modelowania kompleksu rybozymu z substratem (Rys. 4.35 B). Do przewidywania struktury drugorzędowej wykorzystano program RNAfold. Uzyskany wynik zapisany w postaci kropek i nawiasów (ang. dot-bracket) był wzbogacany o utworzenie pary zasad C3-G5 centrum katalitycznego, charakterystycznej dla aktywnej konformacji HHRz (Rys. 4.35 C). Modelowanie struktury trzeciorzędowej prowadzono w programie RNAComposer (Rys. 4.35 D). Dla każdej struktury drugorzędowej konstruowano 10 modeli, z których 5 o najniższych wartościach energii siłowej pola CHARMM wybierano do dalszych obliczeń.

W wyniku przeprowadzonych symulacji uzyskiwano modele struktur trzeciorzędowych, których szczegółowe zbadanie wymagało wytypowania istotnych funkcjonalnie różnicujących cech geometrycznych, które mogłyby podlegać pomiarom (Rys. 4.37). Miejsca oddziaływań trzeciorzędowych są często oddalone w natywnej strukturze o 25-35 Å od centrum cząsteczki, ale efekty lokalnych zmian strukturalnych mogą być przenoszone na duże odległości poprzez sztywność helis [Behrouzi i in. 2012]. Sugeruje to również duże znaczenie składu i długości fragmentów helikalnych. Założono, że różnice w budowie trzeciorzędowej mają wpływ na centrum katalityczne. Dla każdego rybozymu określano unikalny zestaw parametrów, stanowiący tzw. "odcisk palca" rybozymu (Rys. 4.35 E-F).



Rys. 4.35. Uzyskiwanie informacji na temat geometrii centrum katalitycznego rybozymów. (A) Wybór miejsca docelowego (optymalnie GUC lub AUC) i projektowanie rybozymów. (B) Zaproponowanie struktury rybozymów w kompleksach z substratem. Na podanym przykładzie przedstawiono rybozym minimalny oraz wydłużony przy końcu 5'. Nić substratu zostaje połączona in silico z nicią rybozymu sekwencją GGG, co umożliwia zbudowanie modelu rybozymu in cis typu I, co jest niezbędne do modelowania kompleksu rybozymu z substratem. (C) Przewidywanie struktury drugorzędowej w oparciu o program RNAfold. Sekwencja centrum katalitycznego zostaje zamieniona na serię NNNNNNN (CUGAUGA) oraz NNN (GAA), aby nie zaburzać formowania struktury w oparciu o MFE. Uzyskany wynik w postaci serii kropek i nawiasów (ang. dot-bracket) zostaje wzbogacony o utworzenie pary zasad C3-G5 centrum katalitycznego, charakterystycznej dla aktywnej konformacji rybozymu. (D) Modelowanie struktury trzeciorzędowej w programie RNAComposer. Dla każdej struktury drugorzędowej konstruowanych jest 10 modeli, z których 5 o najniższych wartościach energii siłowej pola CHARMM zostaje wybranych do dalszych obliczeń. (E) Pomiary w programie PyMol. Dla każdego rybozymu zostaje określony unikalny zestaw parametrów tzw. "odcisk palca" rybozymu. (F) Porównanie uzyskanych parametrów dla różnych rybozymów.



Rys. 4.36. Modele struktury trzeciorzędowej rybozymów HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4 w kompleksach z substratem. Niebieski – rybozym, czerwony – substrat, żółty – reszta cytydyny, po której następuje transestryfikacja.

### 4.7.2. Parametry geometryczne rybozymu hammerhead ("odcisk palca")

W celu wybrania istotnych funkcjonalnie parametrów geometrycznych HHRz zastosowano ogólnie akceptowane założenia mechanistyczne. Uwzględniono rolę G12 oraz G8 jako głównej zasady i kwasu według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej [Martick i Scott 2006]. Wykorzystano także założenia strukturalne: parowanie typu Watsona-Cricka pomiędzy G8 oraz C3, sieć oddziaływań wodorowych pomiędzy C17 a G5 oraz oddziaływanie warstwowe pomiędzy G8 a C1.1 [Lee i York 2010]. Oddziaływania te umożliwiają ułożenie liniowe grupy atakującej i opuszczającej [Scott i in. 2009]. Aktywna konformacja rybozymu minimalnego odpowiada podstawowej konformacji rybozymu wydłużonego.

Analizując nukleotydy zaangażowane w reakcję katalityczną, wybrano siedem parametrów charakteryzujących aktywną konformację cząsteczek tuż przed zajściem reakcji. Parametry centrum katalitycznego to specyficzne odległości i kąty pomiędzy atomami, opisujące aktywną konformacje rybozymu. Założono, że istotne znaczenie funkcjonalne ma odległość reszty odgrywającej rolę zasady (G12) od miejsca transestryfikacji, oraz pełniącej funkcję kwasu (G8) od grupy odchodzącej oraz kąty pomiędzy nimi. Zbadano także odległość reszty G5 zaangażowanej w tworzenie wiązań wodorowych od miejsca katalizy. Wśród wewnątrzcząsteczkowych determinantów aktywności rybozymów typu hammerhead znalazły się: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami centrum katalitycznego: G12(N1)-C17(2'O) [D1], G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], G5(N1)- C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji (Rys. 4.37). Siódmy parametr stanowiła odległość pomiędzy najbliżej położonymi atomami regionów TSM oraz H2 (H1-H2), które potencjalnie mogłyby ze sobą oddziaływać.

Podobnego opisu geometrii cząsteczek RNA dokonywano w oparciu o dane krystalograficzne [Chi i in. 2008]. Później stwierdzono, że aktywną konformację można analizować poprzez oszacowanie rozkładu kąta i odległości atakującej grupy nukleofilowej względem fosforanu [Lee i in. 2009, Lee i York 2010]. W ten sposób analizowano wpływ substytucji zasad centrum katalitycznego. Podobną strategię wykorzystano do opisu dynamiki strukturalnej rybozymów w zależności od zaistniałych kontaktów w strukturze trzeciorzędowej ramion I i II [McDowell i in. 2010]. Pomiary zastosowano do opisu zmian,



które zachodzą w cząsteczkach modeli struktur trzeciorzędowych w trakcie symulacji komputerowych.

Rys. 4.37. Reprezentacja centrum katalitycznego rybozymu hammeread oraz wybranych parametrów. Numeracja nukleotydów zaadoptowana od [Martick i Scott 2006]. Przedstawiono sześć parametrów charakteryzujących geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: G12(N1)-C17(2'O) [D1], G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji.

### 4.7.3. Geometria cząsteczek HHgfp

Wykonano analizę porównawczą parametrów charakteryzujących grupę rybozymów HHgfp. W tym celu wykorzystano modele struktury trzeciorzędowej w kompleksie z substratem i obliczono parametry D1, D2, D3,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D1/D2 oraz odległości H1-2 (Rys. 4.38).



Rys. 4.38. Analiza porównawcza siedmiu parametrów centrum katalitycznego rybozymu dla cząsteczek HHgfp-0, HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp-4 (A-F) oraz dodatkowo HHgli i HHcry (G, H) w oparciu o ich modele w kompleksie z substratami. Przedstawiono siedem parametrów charakteryzujących geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: (A) G12(N1)-C17(2'O) [D1], (B) G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], (C) G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: (D) C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], (E) C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], (F) C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. (G) Stosunek odległości D1/D2 dla różnych rybozymów. Siódmy parametr to odległość pomiędzy najbliższymi atomami ramion H1-H2 zaznaczonych u dołu prostokątami (H).

Analiza porównawcza *in silico* grupy rybozymów HHgfp potwierdziła, że HHgfp-5 różni się od pozostałych cząsteczek oraz posiada zdefiniowane parametry najniższe (D2, D3, HI-II) lub najwyższe ( $\gamma$ , D1/D2) w analizowanej grupie. Wyjątek stanowił kąt  $\beta$ , dla którego HHgfp-5 przyjmował wartości pośrednie wobec pozostałych rybozymów oraz D1 i  $\alpha$  o wartościach równych dla HHgfp-5 oraz HHgfp-4. Porównując modele zaobserwowano, że największa różnica odległości pomiędzy dwoma cząsteczkami w obrębie jednego parametru wynosiła 1.083 Å dla odległości D1. Są to różnice o niskiej wartości bezwzględnej, ale wysokiej istotności funkcjonalnej.

Pomiary kątów potwierdziły konieczność ułożenia liniowego atomów biorących udział w reakcji C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], których wartości były zbliżone do odchylenia o 10° (Rys. 4.38). Najwyższa różnica wartości kąta pomiędzy rybozymami wynosiła 3.54° dla  $\alpha$  oraz 2.28° dla  $\beta$ . W przypadku kąta C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], jego zwiększanie wydaje się być związane ze wzrostem aktywności rybozymu. Dla HHgfp-5 wynosił on 29.03°, a największa różnica między cząsteczkami wynosiła 1.41°. Obliczenia wykazały istotne statystycznie różnice (p>0.05) pomiędzy rybozymami w zakresie parametrów D1,  $\alpha$ , H1-H2, D1/D2.

Porównanie rybozymów grupy HHgfp wykazało (Rys. 4.38), że odległość pomiędzy C17(2'O) a G12 (N1) jest największa w przypadku HHgfp-5 oraz HHgfp-4, które wykazywały najwyższą aktywność wewnątrzkomórkową (Rys. 4.18, 4.21). Jest to wynik niespójny z ogólnie przyjętym mechanizmem katalizy kwasowo-zasadowej [Scott 2010]. Wyniki eksperymentów oraz analiz *in silico* sugerują, ze pierwszym etapem reakcji jest protonacja atomu 5'O. Powoduje to, że grupa fosforanowa staje się podatna na atak nukleofilowy. Aby oszacować odstępstwo cech geometrycznych rybozymów od mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej zaproponowano określenie stosunku parametrów D1/D2, który mówi o względnym przybliżeniu miejsca transestryfikacji w kierunku G8(2'O). Wartość D1/D2 powyżej 1 sugeruje preferencyjnie rozpoczęcie reakcji od protonacji grupy C1.1. (5'O) z udziałem G8(2'O). Wyniki te umożliwiają zaproponowanie nowego mechanizmu odwróconej katalizy kwasowo-zasadowej (Rys. 4.39).

Katalityczne RNA oraz DNA wykorzystują kombinację czterech możliwych strategii katalitycznych pozwalających na wysoce efektywną transestryfikację RNA: i) prawidłowa geometria umożliwiająca przyjęcie pentakoordynacyjnego stanu przejściowego; ii) wysoki ujemny ładunek dianionu; iii) niska nukleofilowość grupy 2'hydroksylowej oraz iv) ograniczone uwalnianie odchodzącej grupy 5'oksyanionu [Emilsson i in. 2003]. Zaproponowano, że uwalnianie grupy odchodzącej może stanowić etap determinujący szybkość reakcji, a protonacja 5'O zachodzi przed utworzeniem pentakoordynacyjnego dianionu [Emilsson i in. 2003]. Może to wyjaśnić dlaczego HHgfp-5 wykazuje najwyższą aktywność posiadając przewagę w ułatwieniu pierwszego etapu reakcji, czyli protonacji grupy odchodzącej 5'O. Analizy pomiarowe modeli struktur trzeciorzędowych, ze szczególnym uwzględnieniem stosunku D1/D2 są spójne z danymi eksperymentalnymi.

Pomiar odległości H1-H2 pokazał, że cząsteczki HH-5 oraz HH-4 cechuje najmniejsza odległość pomiędzy wskazanymi ramionami. Porównując uzyskane wyniki do stosunku D1/D2 okazało się, że występuje między nimi odwrotna zależność. Przybliżenie helis H1-H2 jest związane ze wzrostem D1/D2, a więc zmniejszeniem odległości 5'O do G8(2'O). Jest to dowód na to, że przyłączenie dodatkowych struktur przy końcu 5' rybozymu wykazuje efekt dalekiego zasięgu i wywołuje kierunkowe zmiany geometrii centrum katalitycznego.

Ze względu na brak dokładności metod przewidywania struktur drugorzędowych oraz trzeciorzędowych obserwowano stosunkowo wysokie wartości odchylenia standardowego. Pomimo tego wykorzystane metody wraz z weryfikacją struktur *in vitro* stanowią najlepsze dostępne obecnie narzędzia bioinformatyczne porównywania geometrii cząsteczek, dla których nie są znane struktury krystalograficzne.



Rys. 4.39. Proponowany mechanizm odwróconej katalizy kwasowo-zasadowej przeprowadzanej przez rybozym HHRz. W wyniku protonacji atomu tlenu z udziałem kwasu (1) dochodzi do aktywacji atomu fosforu (2), co umożliwia atak nukleofilowy grupy 2'-OH rybozy na wiązanie fosfodwuestrowe (3). Powstają produkty reakcji, z których jeden zakończony jest 2',3'-cyklicznym fosforanem, a drugi grupą 5'-OH. H-A – ogólny kwas, :B – ogólna zasada, Z – zasada azotowa.

#### 4.7.4. Geometria cząsteczek HH-0, HH-5

Wykonano analizę porównawczą parametrów charakteryzujących grupę rybozymów HH-0, HH-5 oraz rybozymów minimalnych zaprojektowanych wyłącznie w celu wykonania pomiarów centrum katalitycznego *in silico* (HH-0is) (Rys. 4.40). W tym celu wykorzystano modele struktury trzeciorzędowej w kompleksie z substratem i obliczono parametry D1, D2, D3,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D1/D2. Określono unikalny zestaw parametrów stanowiący tzw. "odcisk palca" rybozymów (Tab. 4.4).
Analizowano wpływ sekwencji substratu na właściwości rdzenia katalitycznego rybozymów o tej samej strukturze drugorzędowej. Zaobserwowano podobną tendencję różnic pomiędzy HH-0 oraz HH-5 dla określonych par substratów (dwa na trzy rozpatrywane przypadki GFP, CRYAB, GLI1) w obrębie zaproponowanych parametrów. Wartość wzrastała od HH-0 do HH-5 dla grup GFP oraz GLI1 przy parametrze D1, dla GFP i CRYAB przy D2 oraz  $\gamma$ , dla GLI1 oraz CRYAB przy D3,  $\alpha$  oraz  $\beta$ . Substraty GLI1 oraz CRYAB wykazywały najwyższe podobieństwo sekwencji (Rozdz. 4.1.2.3). Obliczenia wykazały istotne statystycznie różnice (p>0.05) pomiędzy rybozymami HH-0 i HH-5 w zakresie parametrów D1, D2, H1-H2, D1/D2. Prawdopodobnie sekwencja substratu wpływa na budowę centrum katalitycznego.

Dodatkowe pomiary odległości pomiędzy atomami leżącymi najbliżej siebie pomiędzy helisą H2 a regionem TSM rybozymu wykazały, że w przypadku HH-5b elementy te leżą najbliżej siebie (2.58 Å HHgfp-5b, 2.62 Å HHgli-5c, 2.92 Å HHcry-5c). W przypadku innych cząsteczek odległości te wynosiły 10.64 Å (HHgfp-0), 7.17 Å (HHgfp-6), 2.58 Å (HHgfp-4), 4.96 Å (HHgli-0).

Do rozważań nad wpływem sekwencji ramion I i III wykorzystano 61 rybozymów HH-0 *in silico* (HH-0is) specyficznych wobec substratów o sprecyzowanej sekwencji takich jak np. poliC, poliA, poliG oraz poliU zawierających insercję miejsca docelowego rybozymów GUC (Rys. 4.40, Tab. 4.4). Wszystkie posiadały tą samą strukturę drugorzędową. Analiza komputerowa wykazała różnice w parametrach, które zależały od ilości puryn, pirymidyn oraz ich lokalizacji. Uzyskany wynik nie był jedynie rezultatem parowania typu Watsona-Cricka, ale zależał także od tego, na której nici (rybozymu czy substratu) znajduje się dana reszta. Obliczenia wykazały istotne statystycznie różnice (p>0.05) pomiędzy rybozymami HH-0is w zakresie parametrów D1, D3, D1/D2.

D1 wykazuje zależność od tego, na której nici (rybozymu, czy substratu) znajdują się puryny. Jeżeli występują one na nici substratu, powoduje to obniżenie odległości D1 (Rys. 4.40 A). Podobny efekt można zaobserwować dla D3, gdzie wartość parametru spada, gdy na nici substratu znajduje się G lub U, ale wzrasta dla C i A. Z kolei  $\alpha$  oraz  $\beta$  wykazują podobną preferencję, w zależności od określonego nukleotydu. Wartość kąta wzrasta, gdy na nici substratowej jest G, a spada, gdy jest to U. Odległość D2 zależy od tego, czy rybozym wiąże się z substratem z przewagą wiązań wodorowych podwójnych (wartość wzrasta) czy potrójnych (wartość maleje). Porównanie parametru D1/D2 (Tab. 4.4) pokazuje, że wśród wielu różnych rybozymów minimalnych, w niektórych przypadkach stosunek ten jest wyższy od 1.



Rys. 4.40. Analiza porównawcza sześciu parametrów centrum katalitycznego rybozymu dla grup cząsteczek HH-0, HH-5 oraz czterech rybozymów in silico (HH1C, HH2G, HH3A, HH4U) w oparciu o ich modele struktury trzeciorzędowej w kompleksie z substratami. Przedstawiono siedem parametrów charakteryzujących geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: (A) G12(N1)-C17(2'O) [D1], (B) G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], (C) G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: (D) C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], (E) C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], (F) C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. (G) Stosunek odległości D1/D2 dla różnych rybozymów.

Tab. 4.4. Parametry centrum katalitycznego rybozymów weryfikowanych eksperymentalnie (na zielonym tle) oraz jedynie in silico (pozostałe). W sekwencji substratu podkreślono miejsce GUC wraz z otaczającymi pozycjami +1 oraz -1. Pogrubioną czcionką zaznaczono parametr D1/D2 o wartości równej lub wyższej od jedności. Parametry charakteryzujące geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: G12(N1)-C17(2'O) [D1], G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [a], C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. D1/D2 - stosunek odległości D1 i D2. SD – odchylenie standardowe.

			Odległość [Å]				Kąt [°]							
Rybozym	Sekwencja substratu 5'-3'	D1	SD(D1)	D2	SD(D2)	D3	SD(D3)	α	SD(a)	β	SD(β)	γ	<b>SD</b> (γ)	D1/D2
HHgfp_0		3.37	0.208	3.37	0.115	6.93	0.208	11.77	0.666	9.37	2.055	27.77	0.757	1.001
HHgfp_6		2.95	0.289	3.38	0.150	6.93	0.222	9.45	1.912	11.28	1.864	27.63	0.846	0.873
HHgfp_5	AGCG <u>UGUCC</u>	4.03	0.252	3.17	0.058	6.83	0.058	8.33	1.250	10.17	1.801	29.03	0.666	1.273
HHgfp_4	GGCGAGG	4.03	0.320	3.23	0.250	6.85	0.238	8.23	1.884	9.00	3.755	28.53	1.348	1.251
HHdnmt_0		4.07	0.252	3.77	0.361	7.60	0.361	9.80	1.929	6.57	2.371	24.80	0.608	1.079
HHdnmt_6	AAGCUGUCC	3.33	0.155	3.47	0.265	7.50	0.200	10.50	2 524	8.80	1.039	26.80	0.200	0.962 1 103
HHdnmt 4	AUCUUUG	4.23	0.058	3.63	0.306	7.83	0.306	11.60	1.179	7.23	3.355	25.80	2.022	1.168
HHgli_0		2.87	0.058	3.17	0.208	6.83	0.208	8.97	1.792	11.13	3.272	28.53	0.473	0.907
HHgli_5	CCUC <u>AGUCC</u> CGGGGA	4.38	0.206	3.58	0.275	7.20	0.258	9.93	2.032	6.63	2.985	26.45	1.572	1.226
HHcry_5	CCUG <u>AGUCC</u>	3.85	0.443	3.38	0.189	7.23	0.171	11.03	0.768	5.98	2.00	27.40	1.140	1.116
HHcry_0	CUUCUA	4.10	0.173	3.57	0.231	6.97	0.058	9.13	1.484	6.80	1.277	26.30	1.819	1.154
HH1C	CCCC <u>CGUCC</u> CCCCCCC	2.93	0.351	3.1	0.361	6.97	0.231	9.80	0.819	10.63	1.305	29.37	1.955	0.948
HH2G	GGGG <u>GGUCC</u> GGGGGGGG	2.55	0.129	3.05	0.332	6.60	0.141	11.03	1.109	13.78	2.606	28.95	2.384	0.841
ННЗА	AAAA <u>AGUCC</u> AAAAAAA	2.78	0.259	3.28	0.217	7.12	0.286	9.32	2.341	11.36	3.397	28.20	1.227	0.848
HH4U	UUUU <u>UGUCC</u> UUUUUUU	3.53	0.222	3.125	0.263	6.83	0.171	7.95	2.057	9.2	3.255	29.10	1.055	1.130
HH5CG	CCCC <u>CGUCC</u> GGGGGGGG	2.68	0.084	3.22	0.259	6.72	0.192	9.12	2.645	13.36	1.467	28.38	1.297	0.832
HH6GC	GGGG <u>GGUCC</u> CCCCCCC	2.76	0.472	3.04	0.182	6.9	0.316	9.2	3.075	13.28	1.672	29.4	0.789	0.908
HH7AU	AAAA <u>AGUCC</u> UUUUUUU	3.08	0.630	3.16	0.195	6.84	0.167	9.8	1.298	10.1	3.563	28.36	1.036	0.975
HH8UA	UUUU <u>UGUCC</u> AAAAAAA	3.3	0.406	3.58	0.634	6.68	0.259	7.82	2.469	11.36	3.645	26.26	4.095	0.922
НН9СА	CCCC <u>CGUCC</u> AAAAAAA	2.86	0.456	3.6	0.515	6.46	0.422	8.54	2.868	13.5	4.903	25.56	2.825	0.794
HH10AC	AAAA <u>AGUCC</u> CCCCCCC	2.8	0.346	3.18	0.228	6.84	0.219	7.68	1.942	12.46	2.704	28.64	1.262	0.881
HH11UG	UUUU <u>UGUCC</u> GGGGGGGG	3.2	0.354	3.42	0.239	6.62	0.622	9.74	3.449	11.26	3.444	27.02	1.669	0.936
HH12GU	GGGG <u>GGUCC</u> UUUUUUU	3.56	0.709	3.44	0.498	6.98	0.217	8.0	1.470	10.44	5.096	26.98	2.711	1.035
HH13CU	CCCC <u>CGUCC</u> UUUUUUU	3.22	0.545	3.44	0.493	6.82	0.249	9.04	3.313	11.66	5.323	26.82	3.603	0.936
HH14UC	UUUU <u>UGUCC</u> CCCCCCC	3.18	0.602	3.26	0.297	6.48	1.023	9.12	1.842	10.52	2.240	28.42	1.859	0.975
HH15AG	AAAA <u>AGUCC</u> GGGGGGGG	3.06	0.573	3.48	0.507	6.98	0.729	8.52	2.335	11.96	3.589	26.78	3.332	0.879
HH16GA	GGGG <u>GGUCC</u> AAAAAAA	3.08	0.572	3.56	0.650	6.6	0.265	7.72	3.663	15.72	4.846	26.08	3.505	0.865
HH17CA	CACA <u>CGUCC</u> ACACACA	3.64	0.404	3.12	0.192	6.88	0.130	7.52	2.379	11.66	2.293	29.28	1.728	1.167
HH18AC	ACAC <u>AGUCA</u> CACACAC	2.9	0.283	3.04	0.230	7.0	0.579	5.22	3.916	11.76	2.974	26.62	1.965	0.954
HH19GA	GAGA <u>GGUCG</u> AGAGAGA	3.86	0.716	3.82	0.192	7.48	0.363	8.16	2.367	6.36	2.699	24.64	1.167	1.010
HH20AG	AGAG <u>AGUCA</u> GAGAGAG	3.04	0.241	3.3	0.224	6.86	0.513	5.06	1.443	10.4	2.957	27.26	2.269	0.921
HH21CG	CGCG <u>CGUCC</u> GCGCGCG	6.7	1.503	9.1	2.088	11.6	3.502	10.64	1.481	12.1	10.627	9.86	2.392	0.736

HH22GC	GCGC <mark>GGUCG</mark> CGCGCGC	3.14	0.568	3.32	0.492	7.1	0.316	8.34	2.493	11.0	4.215	27.96	3.107	0.946
HH23UA	UAUA <u>UGUCU</u> AUAUAUA	3.54	0.483	3.66	0.152	6.96	0.207	8.94	1.743	7.52	2.286	26.0	1.000	0.967
HH24AU	AUAU <u>AGUCA</u> UAUAUAU	2.88	0.303	3.14	0.167	7.44	0.792	7.7	3.283	9.3	2.833	25.28	1.975	0.917
HH25UG	UGUG <u>UGUCU</u> GUGUGUG	2.88	0.303	3.42	0.536	6.62	0.402	8.7	3.849	12.28	2.228	27.06	3.193	0.842
HH26GU	GUGU <u>GGUC</u> UGUGUGU	3.36	0.344	3.08	0.311	6.78	0.349	11.7	2.706	10.06	2.579	27.98	1.585	1.091
HH27UC	UCUC <u>UGUC</u> U CUCUCUC	3.64	0.270	3.62	0.164	6.88	0.179	8.68	1.663	6.98	1.028	26.04	1.295	1.006
HH28CU	CUCU <u>CGUCC</u> UCUCUCU	3.28	0.427	3.26	0.114	6.88	0.277	8.64	2.707	10.38	1.999	28.12	0.934	1.006
HH29mono C+A	CCCC <u>CGUCA</u> CCCCCCC	2.66	0.207	4.06	0.820	8.56	1.571	7.52	3.651	14.78	9.744	20.48	5.002	0.655
HH30mono C+G	CCCC <u>CGUCG</u> CCCCCCC	2.78	0.295	3.44	0.541	6.64	0.321	8.84	4.059	17.42	3.708	25.92	3.885	0.808
HH31mono C+U	CCCC <u>CGUCU</u> CCCCCCC	2.78	0.228	4.94	0.114	7.2	0.381	8.58	3.293	12.26	2.558	18.52	0.363	0.563
HH32mono G+A	GGGG <u>GGUCA</u> GGGGGGGG	2.86	0.297	3.12	0.179	7.28	0.661	8.88	3.028	9.36	1.804	23.7	2.881	0.917
HH33mono G+G	GGGG <u>GGUC</u> GGGGGGGG	2.74	0.279	3.08	0.421	6.74	0.230	13.16	1.392	10.94	3.229	26.3	2.935	0.890
HH34mono G+U	GGGGGGGUCU GGGGGGGG	2.94	0.288	3.44	0.532	6.58	0.327	9.58	3.306	11.26	2.163	26.86	3.653	0.855
HH35mono A+A	AAAA <u>AGUCA</u> AAAAAAA	2.8	0.283	3.86	0.462	7.42	0.936	7.54	2.988	11.08	1.692	22.0	2.145	0.725
HH36mono A+G	AAAA <u>AGUC</u> G AAAAAAA	2.88	0.536	3.22	0.217	6.8	0.505	10.42	2.038	11.16	2.203	28.2	1.620	0.894
HH37mono A+U	AAAA <u>AGUC</u> U AAAAAAA	3.1	0.778	3.94	0.615	6.8	0.600	6.32	2.286	14.16	4.516	24.1	3.872	0.787
HH38mono U+A	UUUU <u>UGUCA</u> UUUUUUU	3.22	0.327	3.28	0.327	7.32	0.729	5.78	1.883	6.18	1.232	26.96	3.042	0.982
HH39mono U+G	UUUU <u>UGUC</u> UUUUUUU	3.8	0.775	3.48	0.497	6.96	0.439	9.88	2.742	7.42	4.596	26.72	2.686	1.092
HH40mono U+U	UUUU <u>UGUCU</u> UUUUUUU	3.66	0.336	3.46	0.577	6.86	0.230	9.18	2.692	6.92	0.952	27.2	3.630	1.058
HH41mono C-A	CCCC <u>AGUCC</u> CCCCCCC	2.92	0.421	3.3	0.283	7.0	0.212	7.68	1.180	11.14	3.912	28.12	1.630	0.885
HH42mono C-G	CCCC <u>GGUCC</u> CCCCCCC	3.08	0.502	3.36	0.251	7.14	0.114	7.66	1.767	10.48	5.619	27.64	1.481	0.917
HH43mono C-U	CCCC <u>UGUCC</u> CCCCCCC	2.78	0.239	3.26	0.230	7.24	0.251	7.6	3.757	13.24	4.535	28.34	1.337	0.853
HH44mono G-A+G	GGGG <u>AGUC</u> GGGGGGG	3.32	0.832	3.36	0.666	6.68	0.421	11.66	5.241	12.98	3.199	25.42	5.645	0.988
HH45mono G-U+A	GGGG <u>UGUC</u> GGGGGGG	3.1	0.696	3.06	0.251	7.02	0.130	12.04	2.016	10.72	3.887	27.8	2.135	1.013
HH46mono G-C+G	GGGG <u>CGUCG</u> GGGGGGGG	3.58	0.672	3.22	0.148	6.9	0.187	10.36	2.103	9.94	1.983	28.0	1.259	1.112
HH47mono A-G+A	AAAA <u>GGUCA</u> AAAAAAA	2.9	0.235	3.32	0.785	6.96	0.439	9.36	2.658	9.46	1.099	23.74	3.925	0.873
HH48mono A-U+A	AAAA <u>UGUCA</u> AAAAAAA	3.48	0.581	3.42	0.259	7.64	0.829	11.08	2.293	11.6	1.470	23.6	3.060	1.018
HH49mono A-C+A	AAAA <u>CGUCA</u> AAAAAAA	2.86	0.251	3.26	0.537	7.5	0.831	7.04	4.081	9.0	4.093	24.96	3.690	0.877
HH50mono U-G+U	UUUU <u>GGUCU</u> UUUUUUU	3.48	0.676	3.28	0.303	6.88	0.259	10.06	2.348	8.02	3.345	27.36	1.710	1.061
HH51mono U-A+U	UUUU <u>AGUCU</u> UUUUUUU	3.54	0.760	3.64	0.555	6.88	0.110	8.8	2.966	8.68	3.492	25.68	3.317	0.973
HH52mono U-C+U	UUUU <u>CGUCU</u> UUUUUUU	4.56	2.182	4.38	1.618	6.48	0.618	9.0	3.523	17.1	11.587	22.88	7.317	1.041
HH53mono G-A+C	GGGG <u>AGUCC</u> GGGGGGGG	3.44	0.750	3.54	0.462	6.8	0.292	9.38	3.204	14.32	0.928	25.44	3.928	0.972
HH54mono G-U+C	GGGG <u>UGUCC</u> GGGGGGG	3.14	0.550	3.38	0.455	7.14	0.344	8.96	1.794	9.9	3.058	27.26	2.626	0.929
HH55mono G-C+C	GGGG <mark>CGUCC</mark> GGGGGGGG	3.22	0.460	3.42	0.164	7.14	0.378	8.94	2.588	10.68	1.662	27.42	1.119	0.942
HH56mono A-G+C	AAAA <u>GGUCC</u> AAAAAAA	3.46	0.669	3.7	0.660	6.68	0.130	8.04	2.288	9.94	1,769	25.66	4.086	0.935
HH57mono A-U+C	AAAA <u>UGUCC</u> AAAAAAA	3.58	0.205	3.78	0.335	7.1	0.828	8.48	1.408	6.42	1.260	25.08	2.408	0.947

HH58mono A-C+C	AAAA <u>CGUCC</u> AAAAAAA	3.62	0.512	3.46	0.629	6.54	0.513	9.1	2.540	13.32	2.747	26.8	3.809	1.046
HH59mono U-G+C	UUUU <u>GGUC</u> UUUUUUU	4.12	0.585	3.48	0.415	7.08	0.396	7.6	2.863	8.62	3.579	26.86	2.260	1.184
HH60mono U-A+C	UUUU <u>AGUC</u> UUUUUUU	3.34	0.780	3.34	0.365	7.02	0.370	8.94	2.257	9.34	4.239	27.7	2.481	1.000
HH61mono U-C+C	UUUU <u>CGUCC</u> UUUUUUU	4.6	2.621	4.6	1.646	6.38	0.510	8.88	3.253	16.18	5.545	21.7	7.598	1.000

Porównanie parametrów HH-0, HH-5 oraz analizowanych wyłącznie *in silico* rybozymów minimalnych sugerują wpływ sekwencji substratu na cechy centrum katalitycznego (Rys. 4.40). Wcześniej postulowano, że sekwencja ma wpływ na szybkość dysocjacji produktów reakcji [Fedor i Uhlenbeck 1990]. Jednakże sugerowano również wpływ na zmiany w strukturze [Amarzguioui i Prydz 1998]. Tolerancja pewnych zmian nukleotydów w centrum katalitycznym stanowi dowód na złożony system oddziaływań elementów struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej, prowadzący poprzez efekty dalekiego zasięgu do indywidualnej modulacji lokalnej struktury centrum katalitycznego [Przybilski i Hammann 2007]. Jest prawdopodobne, że taka zależność od sekwencji ma znaczenie także w przypadku innych katalitycznych RNA.

Porównanie wszystkich modeli pokazało, że różnica długości nici rybozymów nawet o jeden nukleotyd (rybozymy HHgfp-6, HHgfp-5, HHgfp4) lub zmiana sekwencji ramion otaczających może mieć duży wpływ na oddziaływania helis I-II, parametry centrum katalitycznego oraz aktywność rybozymu. Razem z wynikami badań *in vitro* oraz podjętych w liniach komórkowych wyniki te podkreślają plastyczność cząsteczek RNA.

#### 4.7.5. Geometria rybozymów HHdnmt

Wykonano analizę porównawczą parametrów charakteryzujących grupę rybozymów HHdnmt. W tym celu wykorzystano modele struktury trzeciorzędowej w kompleksie z substratem i obliczono parametry D1, D2, D3,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D1/D2 (Rys. 4.41). Dla grupy rybozymów przeciwko DNMT1 wykonano analogiczne pomiary i nie znaleziono istotnej korelacji z wynikami eksperymentów ani podobieństwa do wyników grupy GFP.



Rys. 4.41. Analiza porównawcza sześciu parametrów centrum katalitycznego rybozymu dla cząsteczek HHdnmt-0, HHdnmt-6, HHdnmt-5, HHdnmt-4 w oparciu o ich modele w kompleksie z substratami. Przedstawiono siedem parametrów charakteryzujących geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: (A) G12(N1)-C17(2'O) [D1], (B) G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], (C) G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: (D) C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [ $\alpha$ ], (E) C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], (F) C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. (G) Stosunek odległości D1/D2 dla różnych rybozymów.

# 4.7.6. Korelacja parametrów geometrycznych i wyników eksperymentalnych

Obliczono współczynniki korelacji wszystkich parametrów z wynikami eksperymentalnymi (Tab. 4.5). Współczynnik korelacji mieści się w granicach od -1 (związek ujemny, wzrost wartości jednego parametru związany ze spadkiem drugiego) do +1 (związek dwóch parametrów o wspólnie rosnących wartościach) [Łomnicki 2010]. Zaobserwowano prawie pełną korelację (o wartości bezwzględnej 0.9-1.0) pomiędzy wynikami ilościowego qPCR rybozymów obniżających poziom mRNA GFP a parametrami D2, D3,  $\gamma$ , HI-HII oraz pomiędzy D1 a D2. Wysoka aktywność wewnątrzkomórkowa HHgfp-5 jest związana ze zmniejszenie odległości G8(2'O) od C1.1(5'O) [D2] oraz oddaleniem G12(N1) od C17(2'O)

[D1]. Związek pomiędzy tymi parametrami określa stosunek D1/D2, który rośnie powyżej 1 dla rybozymów wykazujących wyższą aktywność w komórkach (HHgfp-0; 1.0012, HHgfp-5: 1.273) (Rys. 4.41). Bardzo wysoką korelację (0.7 – 0.9) odnotowano pomiędzy wynikami qPCR dla grupy GFP a parametrami takimi jak D1/D2, D1,  $\alpha$ . Wiele pozostałych par czynników wykazywało korelację wysoką (0.5-0.7). Jedynie w przypadku kąta  $\beta$ , nie zaobserwowano żadnego związku z innymi parametrami i wynikami eksperymentów.

Tab. 4.5. Obliczone współczynniki korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami centrum katalitycznego oraz wynikami aktywności wewnątrzkomórkowej oraz in vitro osobno dla grupy czterech rybozymów HHgfp oraz dla wszystkich zakwalifikowanych cząsteczek. Parametry charakteryzujące geometrię centrum katalitycznego: trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami: G12(N1)-C17(2'O) [D1], G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], G5(N1)-C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [a], C17(2'O)-G12(N1)-P [ $\beta$ ], C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [ $\gamma$ ], gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. D1/D2 - stosunek odległości D1 i D2. Helisa I-II - odległość pomiędzy najbliższymi atomami ramion H1-H2.

Parametry	Współczynnik korelacji				
	Grupa HHgfp	Wszystkie grupy			
D1 – qPCR	-0.85794	-0.5111			
D1 – Western Blot	-0.55964	-0.48748			
D1 – helisa I-II	-0.76641	-0.65182			
D2 – qPCR	0.978857	0.520034			
D2 – Western Blot	0.819418	-0.1368			
D2 – helisa I-II	0.894632	0.098734			
D1 – D2	-0.93344	0.331302			
D1/D2 – qPCR	-0.88994	-0.70172			
D1/D2 – Western Blot	-0.61455	-0.4991			
D1/D2 – helisa I-II	-0.79955	-0.70828			
D3 – qPCR	-0.991142	0.37133			
kąt α – qPCR	0.880036	0.84137			
kąt β – qPCR	0.174475	-0.09911			
kąt γ– qPCR	-0.96093	-0.58022			
helisa I – II – qPCR	0.959146	0.751522			
helisa I – II – Western Blot	0.856755	-0.057469			
$k_{obs} - qPCR$	0.775472	0.297158			
k <sub>obs</sub> – helisa I-II	0.897635	0.318746			
$k_{obs} - D1/D2$	-0.45339	-0.61426			

Zaobserwowano korelację pomiędzy wydajnością transestryfikacji *in vitro*, geometrią cząsteczki oraz aktywnością wewnątrzkomórkową dla grupy HHgfp. Współczynniki korelacji wyników eksperymentalnych i D1/D2 posiadały wyższą wartość dla analiz qPCR niż k<sub>obs</sub>. Sugeruje to, że zastosowana metoda oceny własności rybozymów *in silico* ma większą wiarygodność dla charakterystyki aktywności wewnątrzkomórkowej cząsteczek, szczególnie

w przypadku, gdy są one zaprojektowane wobec jednego miejsca docelowego tego samego substratu.

Biorąc pod uwagę wszystkie przeanalizowane *ex vivo* rybozymy uzyskano wysokie i bardzo wysokie wartości korelacji, przy czym dla kąta α, odległości HI-II oraz stosunku D1/D2 były one najwyższe i wynosiły odpowiednio 0.84137, 0.751522 oraz -0.70172. Kąt α potwierdza konieczność ułożenia liniowego grupy atakującej, fosforanu oraz grupy odchodzącej, co było już sugerowane na podstawie analiz krystalograficznych [Martick i Scott 2006, Chi i in. 2008, Lee i York 2010]. Z kolei pomiar odległości HI-II wykonywany był manualnie i obarczony większym niż w pozostałych przypadkach ryzykiem błędu. Z tego względu do dalszych analiz wybrano stosunek parametrów D1/D2 mówiący o kierunkowych zmianach w obrębie centrum katalitycznego. Obniżenie poziomu ekspresji genów docelowych, będące efektem działania rybozymów jest związane ze wzrostem D1/D2, a więc oddaleniem G12 od grupy atakującej i przybliżeniem G8 do grupy odchodzącej (Rys. 4.42).

Odległości H1-H2 wykazują wysoką korelację względem stosunku odległości D1/D2 oraz wyników analizy aktywności w komórkach. Wskazuje to, że motyw TSM przyjmuje najbardziej optymalną strukturę wobec TL(H2) w rybozymach klasy HH-5b/c, a jego dołączenie do HH-0 powoduje zbliżenie ramion I i II. Wydłużenie rybozymu minimalnego o element TSM powoduje zmiany jego geometrii przenoszące się na znaczne odległości i wpływające na parametry rdzenia katalitycznego. Różnica odległości H2-TSM pomiędzy HH-0 oraz HH-5b jest największa dla grupy rybozymów przeciwko GFP (8.06 Å), natomiast zmniejsza się dla GLI1 (2.34 Å) oraz CRYAB (0.66 Å). Sugeruje to wpływ sekwencji substratu na geometrię całej cząsteczki. Jednocześnie rozbieżności te pokrywają się z różnicami pomiędzy aktywnością rybozymu minimalnego oraz HH-5b/c danej grupy. Różnica wydajności wewnątrzkomórkowej katalizy pomiędzy HHgli-5 a HHgli-0 (Rys. 4.32).

Całkowita sekwencja substratu (nie tylko ograniczona do NUX) oraz struktura drugorzędowa kompleksu rybozym:substrat modulują geometrię konformeru. Ze względu na istniejącą sieć zależności, różnice odległości oraz wartości kątów mogą się wzajemnie rekompensować do pewnego stopnia, tak aby sumaryczny czas od przyjęcia aktywnej konformacji do zajścia reakcji katalitycznej był jak najkrótszy. Szybkość zachodzenia tej reakcji wynika z sumowania czasów potrzebnych do zajścia poszczególnych jej etapów. Parametry centrum katalitycznego sprzyjające skróceniu tego czasu można uzyskać dla wariantu minimalnego poprzez optymalizację sekwencji substratu. Jeżeli sekwencja ta nie umożliwia dobrej aranżacji atomów centrum katalitycznego, można to zrekompensować

poprzez dołączenie domeny TSM z potwierdzeniem uzyskanej struktury na bazie minimalizacji energii swobodnej. Jest to hipoteza kompensacji parametrów centrum katalitycznego. Wyjaśnia ona różnice w aktywności rybozymów poza dostępnością substratu.



Rys. 4.42. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu docelowego a parametrem D1/D2 dla rybozymów grupy HHgfp (A) oraz HHgfp wraz z klasą HH-0 oraz HH-5b/c (B). Spadek poziomu ekspresji genu docelowego (linia niebieska) koreluje ze wzrostem stosunku D1/D2 (linia czerwona).

Dystrybucja parametrów geometrycznych cząsteczki jest cechą unikalną i specyficzną. Stanowi identyfikator, który ją scharakteryzuje, dlatego można go określić mianem "odcisku palca rybozymu" (ang. ribozyme fingerprint). Taki profil rybozymu stanowi zestaw cyfr, który odzwierciedla centrum katalityczne i umożliwia przewidywanie jego aktywności *in vivo*. Z przedstawionych parametrów stosunek D1/D2 zapewnia wysoką wartość korelacji o niskiej zależności od sekwencji substratu. Istnieje również wysoka korelacja pomiędzy odległością helis I-II oraz wewnątrzkomórkową aktywnością rybozymów. Im bliżej siebie znajdują się atomy helis I i II, tym wyższy jest współczynnik D1/D2 oraz aktywność rybozymów. Zaproponowana metoda przewidywania aktywności katalitycznych RNA ma zastosowanie do cząsteczek opartych o minimalny rybozym hammerhead działający *in trans* wobec miejsc GUC lub AUC w zwierzęcych liniach komórkowych, wymodelowanych do analiz w postaci rybzoymów *in cis* typu I. Jest to bardzo pomocny system selekcji *in silico* cząsteczek wysoce aktywnych wobec danego substratu.

Rybozymy o strukturze HH-5 wykazują wysoką aktywność przeciwko różnym genom docelowym. Pozwala to na wykorzystanie ich nie tylko w celach terapeutycznych, ale także do badania funkcji genów w systemie odwróconej genetyki (ang. reverse genetics). Hipoteza kompensacji parametrów centrum katalitycznego stanowi interesującą i godną zaufania alternatywę dla tradycyjnego projektowania rybozymów. Wysoka korelacja pomiędzy parametrami modeli struktur trzeciorzędowych a eksperymentami *ex vivo* pokazuje, że projektowanie RNA wsparte analizami komputerowymi może stanowić klucz do przewidywania aktywności cząsteczek.

#### 4.8. Analiza in silico rybozymów typu hammerhead opisanych w literaturze

#### 4.8.1. Kryteria selekcji

Współczynnik korelacji w przypadku wszystkich przebadanych rybozymów pomiędzy D1/D2 – qPCR był bardzo wysoki (-0,70172). Analiza statystyczna wykazała najwyższy poziom istotności dla D1/D2. Z tych względów w oparciu o ten parametr zaproponowano metodę przewidywania wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów hammerhead. Jej weryfikację przeprowadzono wykorzystując dane literaturowe. Postępowanie w tej metodzie podzielone zostało na sześć kroków, zmierzających do oszacowania wartości D1/D2, której porównanie dla danych cząsteczek określi, która z nich ma parametry sprzyjające lepszej aktywności wewnątrz komórek (Rys. 4.35, 4.43). Cząsteczki poddane weryfikacji musiały spełniać następujące kryteria:

- projektowanie na podstawie rybozymu hammerhead
- preferowane docelowe miejsce GUC lub AUC
- analiza aktywności wewnątrzkomórkowej w zwierzęcych liniach komórkowych
- aktywność in trans
- pomiary w oparciu o utworzenie rybozymu in cis typu I
- cząsteczki zaprojektowanych i sprawdzanych eksperymentalnie w jednej pracy badawczej



Rys. 4.43. Wykorzystanie tzw. "odcisku palca" rybozymu hammerhead do oszacowania jego aktywności wewnątrzkomórkowej.

#### 4.8.2. Rybozymy minimalne MRE763C oraz MRE764U

Do obniżenia ekspresji genu N-ras zaprojektowano pięć rybozymów typu hammerhead, z czego dwa przeszły pozytywnie selekcję *in vitro* i zostały wykorzystane w linii komórkowej HeLa [Scherr i in. 1997]. W eksperymentach *ex vivo* cząsteczki zostały zmodyfikowane poprzez wprowadzenie grupy 2'fluoro-2'deoksyurydyny/cytydyny. Rybozym MRE763C skierowany był na miejsce docelowe GUC, natomiast MRE764U na GUU. Cząsteczki posiadały dwie pary zasad w helisie 2 oraz pętlę czteronukleotydową GUUA. Między sobą różniły się jedynie sekwencją substratu. Gen docelowy został wprowadzony do plazmidu niosącego gen reporterowy lucyferazy. Efektywność działania rybozymu mierzono poprzez spadek aktywności lucyferazy 48 godzin po transfekcji. MRE763C wykazywał wyższą

aktywność prowadząc do spadku aktywności lucyferazy o 54% w porównaniu do rybozymu MRE764U (39%).

Dane z publikacji dotyczące budowy i sekwencji rybozymów oraz substratów zostały wykorzystane do uzyskania modeli struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami. Następnie modele poddano analizie obliczeniowej i określono parametr D1/D2. Wyniósł on 0.795106 dla MRE764U oraz 0.92676 dla MRE763C, co według zaproponowanej metody oszacowania aktywności wskazuje na drugi rybozym jako wariant bardziej aktywny w komórkach. Wyniki analiz *in silico* potwierdzają wyniki eksperymentalne podane w publikacji (Rys. 4.44) [Scherr i in. 1997].



Rys. 4.44. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Scherr i in. 1997] (A) oraz in silico (B) wskazujących na MRE763C jako wariant rybozymu bardziej aktywny w liniach komórkowych. K – komórki nietransfekowane.

#### 4.8.3. Rybozym skrócony oraz wydłużony przeciwko mRNA gp41 wirusa HIV

Do obniżenia poziomu mRNA gp41 wirusa HIV-1 został wykorzystany rybozym skrócony, posiadający dwie pary zasad w helisie drugiej oraz wydłużony, stabilizowany poprzez dołączenie receptora czteronukleotydowej pętli TLR przy końcu 5' [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B]. Fragment cDNA gp41 został wprowadzony do plazmidu wraz z fragmentem genu białka zielonej fluorescencji. Substratem obu cząsteczek była ta sama sekwencja zawierająca miejsce GUA. Efektywność działania rybozymów w różnych stężeniach w odniesieniu do cząsteczek kontrolnych została oszacowana w komórkach HeLa 24 godziny po transfekcji na podstawie reakcji RT-PCR. Spośród analizowanych cząsteczek

TLR-HRz-gp41 wykazał wyższą aktywność doprowadzając do obniżenia poziomu mRNA gp41 o około 58% w porównaniu do 41% dla cząsteczki HRz-gp41.

Dane z publikacji dotyczące budowy i sekwencji rybozymów oraz substratu zostały wykorzystane do uzyskania modeli struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami. Następnie modele poddano analizie obliczeniowej i określono parametr D1/D2. Wyniósł on 0.827198 dla HRz-gp41 oraz 0.910576 dla TLR-HRz-gp41, co według zaproponowanej metody oszacowania aktywności wskazuje na drugi rybozym jako wariant bardziej aktywny w komórkach. Wyniki analiz *in silico* potwierdzają wyniki eksperymentalne podane w publikacji (Rys. 4.45) [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B].



Rys. 4.45. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Fedoruk-Wyszomirska i in. 2009B] (A) oraz in silico (B) wskazujących na TLR-HRz-gp41 jako wariant rybozymu bardziej aktywny w liniach komórkowych. K – komórki nietransfekowane.

#### 4.8.4. Rybozymy Rz420 oraz Rz1584 aktywne wobec mRNA E6AP

W celu znalezienia najlepszego wariantu rybozymu do obniżenia ekspresji genu E6AP przeprowadzono selekcję *in vitro* dostępności miejsc w substracie RNA [Kim i in. 2003]. W następnym etapie 5 rybozymów zastosowano do obniżenia ekspresji genu E6AP w komórkach, z czego dwa spełniały kryteria omówione powyżej (Rozdz. 4.8.1). Oba rybozymy posiadały 12-nukleotydowe ramiona oraz taka samą budowę helisy II. Różniły się jedynie sekwencją substratu. Miejscem docelowym dla Rz420 było AUC, natomiast GUC dla Rz1584. Sekwencje kodujące rybozymy zostały wprowadzone do wektorów ekspresyjnych i

po transfekcji ulegały ekspresji w komórkach HeLa w postaci cząsteczek chimerycznych. Efektywność działania cząsteczek wewnątrz komórek oszacowano na poziomie białka. Rz420 obniżał poziom białka o około 51%, natomiast Rz1584 o 60%, co czyni z niego efektywniejszą cząsteczkę.

Dane z publikacji dotyczące budowy i sekwencji rybozymów oraz substratów zostały wykorzystane do uzyskania modeli struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami. Następnie modele poddano analizie obliczeniowej i określono parametr D1/D2. Wyniósł on 0.75329 dla Rz420 oraz 0.987464 dla Rz1584, co według zaproponowanej metody oszacowania aktywności wskazuje na drugi rybozym jako wariant bardziej aktywny w komórkach. Wyniki analiz *in silico* potwierdzają wyniki eksperymentalne podane w publikacji (Rys. 4.46) [Kim i in. 2003].



*Rys.* 4.46. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Kim i in. 2003] (A) oraz in silico (B) wskazujących na Rz1584 jako wariant rybozymu bardziej aktywny w liniach komórkowych.

# 4.8.5. Rybozym minimalny oraz skrócone przeciwko BCR-ABL

Dziewiętnaście cząsteczek katalitycznych zostało zaprojektowanych do obniżenia ekspresji genu fuzyjnego BCR-ABL z czego 3 stanowiły rybozymy typu hammerhead spełniające założone kryteria [Kato i in. 2001]. Jeden stanowił rybozym minimalny (WtRz), a dwa kolejne to skrócone warianty posiadające jedną parę zasad w helisie II oraz inne czteronukleotydowe pętle (MiniA, MiniB). Sekwencje rybozymów wprowadzono do plazmidów i transfekowano komórki HeLa. Po 36 godzinach przeprowadzono analizę poziomu ekspresji docelowego genu wprowadzonego do plazmidu z genem lucyferazy.

Wewnątrzkomórkowa aktywność rybozymów została przedstawiona jako funkcja spadającego poziomu aktywności lucyferazy. Największą aktywność wykazał rybozym minimalny, obniżając aktywność lucyferazy o około 70%. Na kolejnym miejscu była cząsteczka MiniB (o 45%) oraz MiniA (o 25%).

Dane z publikacji dotyczące budowy i sekwencji rybozymów oraz substratów zostały wykorzystane do uzyskania modeli struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami. Następnie modele poddano analizie obliczeniowej i określono parametr D1/D2. Wyniósł on 0.816437 dla MiniA, 0.837608 dla MiniB oraz 0.89273 dla WtRz, co według zaproponowanej metody oszacowania aktywności wskazuje na trzeci rybozym jako wariant najbardziej aktywny w komórkach. Wyniki analiz *in silico* potwierdzają wyniki eksperymentalne podane w publikacji (Rys. 4.47) [Kato i in. 2001].



*Rys.* 4.47. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Kato i in. 2001] (A) oraz in silico (B) wskazujących na WtRz jako wariant rybozymu najbardziej aktywny w liniach komórkowych. K – kontrola.

#### 4.8.6. Dwa rybozymy minimalne Rz161 oraz Rz212 aktywne wobec mRNA MGMT

Obniżenie ekspresji genu O6-metyloguanino DNA metylotransferazy (MGMT) uzyskano z wykorzystaniem 3 rybozymów typu hammerhead przeciwko miejscom GUC, z czego dwa spełniały przyjęte kryteria [Zhang i in. 2004]. Aktywność rybozymów w komórkach HeLa określano z wykorzystaniem metod Western-Blot, Northern-Blot oraz analizy funkcji genu MGMT. Aktywność białka MGMT oraz jego ilość została obniżona w przybliżeniu o 92% i 97,5% odpowiednio przez rybozymy Rz161 oraz Rz212. Druga z cząsteczek wykazała wyższą aktywność wewnątrzkomórkową. Dane z publikacji dotyczące budowy i sekwencji rybozymów oraz substratów zostały wykorzystane do uzyskania modeli struktury trzeciorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami. Następnie modele poddano analizie obliczeniowej i określono parametr D1/D2. Wyniósł on 0.89565 dla Rz161 oraz 0.948393 dla Rz212, co według zaproponowanej metody oszacowania aktywności wskazuje na drugi rybozym jako wariant bardziej aktywny w komórkach. Wyniki analiz *in silico* potwierdzają wyniki eksperymentalne podane w publikacji (Rys. 4.48) [Zhang i in. 2004].



Rys. 4.48. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Zhang i in. 2004] (A) oraz in silico (B) wskazujących na Rz212 jako wariant rybozymu bardziej aktywny w liniach komórkowych. K – kontrola.

# 4.8.7. Korelacja wyników ekeperymentalnych oraz in silico

Dla wszystkich przedstawionych analiz obliczono współczynnik korelacji pomiędzy podanymi w publikacjach wynikami eksperymentalnymi a badaniami *in silico* (Rys. 4.49). Uzyskano wartość -0.60011 mieszczącą się w granicach przedziału dla wysokiej korelacji. Niższa wartość współczynnika w porównaniu do przedstawionych w tej pracy wyników eksperymentów własnych może wynikać z różnych podejść eksperymentalnych, w tym metod określania aktywności rybozymów, wybranych linii komórkowych, genów docelowych o różnych poziomach i profilach ekspresji, zastosowania wektorów ekspresyjnych i innych. Dodatkowo struktury niektórych rybozymów wydłużonych nie zostały potwierdzone eksperymentalnie. Ponadto parametry geometryczne cząsteczki warunkują jej aktywność

tylko częściowo. Wśród innych determinant aktywności znajdują się: dostępność sekwencji docelowej w obrębie substratu mRNA, szybkość hybrydyzacji substratu i dysocjacji produktów i wiele innych.



Rys. 4.49. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu docelowego a parametrem D1/D2 dla rybozymów analizowanych według danych literaturowych. Spadek poziomu mRNA (linia niebieska) koreluje ze wzrostem stosunku D1/D2 (linia czerwona).

# 4.8.8. Odstępstwa od reguły D1/D2

Spośród publikacji znalezionych w bazie danych PubMed (NCBI) dotyczących zastosowania rybozymów hammerhead do obniżania poziomu ekspresji genów w liniach komórkowych nie wzięto pod uwagę niektórych badań. Przykładem mogą być analizy aktywności cząsteczek hybrydowych, ze względu na indywidualny wpływ wykorzystanych dodatkowych funkcjonalnych elementów modyfikujących strukturę przy końcu 5' (sekwencja promotora tRNA<sup>Val</sup> odpornego na RNAzy) jak i 3' (sygnał poliA rekrutacji helikazy) [Stobart i in. 2009]. Przebadane rybozymy naturalne [Saksmerprome i in. 2004, Khvorova i in. 2003,

Burke i Greathouse 2005] nie dały możliwości wymodelowania rybozymów wraz z substratami jako cząsteczek działających *in cis* typu I. Ponadto były analizowane *in vivo* w modelu roślinnym. Ponieważ w niniejszej pracy nie oszacowano parametrów korelacji dla rybozymów działających w układzie roślinnym także prace Val i in. oraz Carbonell i in. nie mogły zostać wykorzystane w powyższej analizie [Val i in. 2011, Carbonell i in. 2011]. Ze względu na brak możliwości oszacowania indywidualnej wewnątrzkomórkowej aktywności rybozymów znajdujących się w składzie konstruktów multimerycznych, nie mogły one także wejść w skład analizy [Nazari i in. 2008].

Wśród odstępstw od zaproponowanej metody znalazły się rybozymy zaprojektowane w celu obniżania poziomu ekspresji genu vIRF [Zhang i in. 2001]. Trzy rybozymy R1, R2, R3 rozpoznające trzy miejsca GUC miały wydłużone ramiona rozpoznające substrat (20 nukleotydów, w porównaniu do wykorzystywanych najczęściej 6 nukleotydów). Cząsteczki te powodowały obniżenie poziomu genu docelowego odpowiednio o 72% (R1), 34% (R2), 35% (R3). Analizy *in silico* na podstawie zawartych w publikacji danych umożliwiły oszacowanie stosunku D1/D2, który wynosił 1.2155 (R1), 1.2139 (R2), 1.000 (R3). Wyniki te są tylko częściowo zgodne z rezultatami eksperymentów (Rys. 4.50). R1 oraz R3 wykazują zgodność wyników. Wyjątek stanowi cząsteczka R2. Może być to spowodowane nietypowym wydłużeniem ramion rybozymu, które mogą stanowić dodatkowy czynnik wpływający na ich aktywność. Sekwencja tych elementów może regulować szybkość hybrydyzacji substratu i dysocjacji produktów.

Kolejny interesujący przykład stanowi analiza właściwości katalitycznych wydłużonych rybozymów pochodzenia naturalnego (HHesTRSV- $\Delta$ L1, HHePLMVd oraz zmutowany HHePLMVd-G5 $\rightarrow$ U) do transestryfikacji wiroidowego RNA w roślinach [Carbonell i in. 2011]. Dwie kultury *Agrobacterium thumefaciens* poddano transfekcji wektorami niosącymi rybozym oraz substrat, a następnie wprowadzono do liści *N. benthamiana*. Analizę poziomu docelowego wiroidowego RNA przeprowadzono metodą Northern Blot. Jedynie HHe-PLMVd efektywnie obniżał poziom docelowego RNA. Wyniki analiz *in silico* wykazały, że HHe-sTRSV charakteryzuje wyższy poziom D1/D2, co sugeruje, że ta cząsteczka powinna wykazać wyższą aktywność. Nie uzyskano zatem zgodności z wynikami eksperymentów (Rys. 4.51) [Carbonell i in. 2011]. Przyczyną tej rozbieżności może być zastosowanie wektorów oraz dwóch ośrodków, w których się znajdowały (bakteria i roślina). Czynniki te mogą wpływać na poziom cząsteczek zarówno substratu jak i rybozymu w układzie docelowym.



Rys. 4.50. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Zhang i in. 2001] (A) oraz in silico (B) wskazujących na Rz1 oraz Rz2 jako warianty rybozymu najbardziej aktywne w liniach komórkowych. K – kontrola.



Rys. 4.51. Porównanie danych eksperymentalnych dostępnych w publikacji [Carbonell i in. 2011] (A) oraz in silico (B) wskazujących na HHe-sTRSV jako wariant rybozymu bardziej aktywny w liniach komórkowych. K – kontrola.

Stosunek D1/D2 dostarcza istotnych informacji na temat geometrii centrum katalitycznego rybozymu hammerhead. Nie jest to jednak jedyny parametr wpływający na wydajność reakcji katalitycznej. Z tego względu mogą występować pewne niespójności pomiędzy D1/D2 a wynikami eksperymentów.

Pomimo zaobserwowanych odstępstw od reguły pozwalającej na przewidywanie aktywności wewnątrzkomórkowej rybozymów typu hammerhead, znajduje ona potwierdzenie w większości przeanalizowanych przypadków. Oszacowanie czynników determinujących funkcje katalitycznych RNA pozwala na wybór parametrów, które umożliwiają przewidywanie ich aktywności wewnątrz komórek. Zasada ta może znaleźć zastosowanie nie

tylko do charakterystyki różnych katalitycznych RNA, ale także dowolnych RNA o sprecyzowanej funkcji. Pozwala na porównywanie właściwości różnych cząsteczek. Analiza parametrów geometrycznych pokazała, że aktywność rybozymów w komórce zależy w większym stopniu od ich struktury trzeciorzędowej w kompleksie z substratem niż od takich czynników jak dostępność miejsca docelowego w obrębie mRNA, czy szybkość hybrydyzacji do substratu i oddysocjowania produktów reakcji.

# **5. PODSUMOWANIE**

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowego wysoce aktywnego w komórkach wydłużonego rybozymu hammerhead oraz określenie czynników determinujących jego właściwości wewnątrzkomórkowe na poziomie molekularnym.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wyciągnięto następujące wnioski:

- Rybozymy HH-0, HH-6, HH-5, HH-4 katalizują transestryfikację docelowego RNA w warunkach *in vitro* oraz w ludzkich liniach komórkowych. Rybozymy HHgfp-5b, HHgli-5c oraz HHcry-5c (o strukturze drugorzędowej HH-5N) wykazują wysoką aktywność w warunkach komórkowych. Zaproponowany nowy rybozym HH-5N w perspektywie może stanowić narzędzie terapii genowej.
- Właściwości katalityczne rybozymów różnią się dla mieszaniny reakcyjnej *in vitro* oraz modelu komórkowego. Warunki *in vitro* zaburzają przyjmowanie konformacji aktywnej przez badane cząsteczeki katalityczne.
- Projektowanie cząsteczek RNA w oparciu o łączenie elementów o zdefiniowanej strukturze drugorzędowej wykazuje niski poziom zgodności z analizą eksperymentalną metodami chemicznymi i enzymatycznymi w porównaniu do modelowania w oparciu o minimalizację energii swobodnej.

• Ustalono wewnątrzcząsteczkowe determinanty aktywności katalitycznych RNA na przykładzie rybozymów typu hammerhead:

Odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami centrum katalitycznego: G12(N1)-C17(2'O) [D1] G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2] G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] Odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: C1.1(5'O)-C17(2'O)-P [α] C17(2'O)-G12(N1)-P [β] C1.1(5'O)-G8(2'O)-P [γ] Odległość pomiędzy najbliżej położonymi atomami regionów TSM oraz H2. Stosunek parametrów D1/D2.

- Oddalenie G12(N1) od C17(2'O) oraz przybliżenie G8(2'O) do C1.1(5'O) wyrażane przez stosunek D1/D2 charakteryzuje reakcję katalizowaną przez rybozymy hammerhead w warunkach komórkowych według odwróconego mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej.
- Na podstawie obliczeń parametrów centrum katalitycznego oraz korelacji z wynikami eksperymentalnymi zaproponowano metodę oszacowania unikalnego profilu ("odcisku palca") rybozymu, umożliwiającego przewidywanie wewnątrzkomórkowej aktywności cząsteczki.

# 6. MATERIAŁY I METODY

# 6.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy

# 6.1.1. Ważniejsze odczynniki, enzymy oraz zestawy gotowych odczynników

Tab. 6.1. Ważniejsze odczynniki stosowane w pracy.

Odczynnik	Producent
MEGAscript <sup>®</sup> High Yield Transcription Kit T3, MEGAscript <sup>®</sup> High Yield	Ambion
Transcription Kit T7 (zestaw odczynników do transkrypcji in vitro), woda RNAse-	
free, rybonukleaza V1, glikogen 5 mg/ml, RPA III (zestaw odczynników do analizy	
RPA)	
Bacto-Agar, Bakto-Trypton, ekstrakt drożdżowy	Difco
Perfectprep <sup>®</sup> Plasmid Midi, FastPlasmid <sup>TM</sup> Mini (zestawy odczynników do izolacji	Eppendorf
plazmidowego DNA)	
Sephadex G-50 Medium	Farmacia
bufor obciążający do agarozy (Loading Buffer 6x), mieszanina 10mM dNTP, enzymy	Fermentas
restrykcyjne EcoR I i Hind III oraz bufory, kinaza polinukleotydowa T4, standardy	
wielkości DNA (1 kpz, 100 pz), polimeraza Taq i bufor do polimerazy, RevertAid <sup><math>TM</math></sup>	
First Strand cDNA Synthesis Kit (zestaw odczynników do odwrotnej transkrypcji), T4	
DNA ligaza	
DyNAmo HS Sybr Green qPCR Kit	FINNZYMES
Opti-MEM Medium	Gibco
γ[ <sup>32</sup> P]dATP (3000Ci/mmol)	ICN
bydlęca surowica płodowa (FBS), Lipofectamine 2000, pożywka Opti-MEM Medium,	Invitrogen
Trizol Reagent	
Xylene cyanol	Koch Light
	Labolatories
Bromophenol blue, chlorek potasu, kwas borowy, chlorek magnezu, mocznik, chlorek	Merck
sodu, octan potasu	
Naczynia do hodowli linii komórkwych	Nalge Nunc
	International
pT7T3α-18	MFE Technologies
chloroform cz.d.a, kwas borowy, mocznik, kwas octowy, metanol cz.d.a.	Polskie odczynniki
	chemiczne
ATP, octan sodu, rybonukleaza S1	Promega

Odczynnik	Producent
agaroza, akryloamid, ampicylina, albumina, APS, BCIP/NBT, tRNA <sup>Phe</sup> (1 µg/µl),	Sigma
chlorek wapnia, DTT, DMSO, EDTA, etanol, fenol, glicerol, glicyna, izopropanol,	
N,N'-metylenobisakryloamid, PBS, RPMI-1640 Medium oraz zestaw witamin	
(Vitamins Solution) i antybiotyków (Antibiotic Antimycotic), nadsiarczan amonu,	
octan ołowiu, SDS, Tris, TEMED, trypsyna-EDTA, Tween 20, rybonukleaza T1	
Błony rentgenowskie	Foton
Streptomycyna, bydlęca surowica płodowa (FBS)	ATTC
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (zestaw odczynników do ekstrakcji DNA z żelu	QIAGEN
agarozowego)	

# 6.1.2. Oligodeoksyrybonukleotydy, oligorybonukleotydy

Substraty RNA znakowane fluoresceiną przy końcu 5', rybozymy oraz RNA o sekwencji antysensowej syntetyzowane były przez IBA GmbH (Göttingen, Niemcy) oraz Future Synthesis Sp. z o.o. (Poznań). Oligonukleotydy DNA syntetyzowane były w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa) oraz przez Genomed S.A. (Warszawa).

Tab. 6.2. Zestawieni	e oligodeoksyrybor	ukleotydów wykorz	ystywanych w pracy.
----------------------	--------------------	-------------------	---------------------

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja 5'-3'
Dzdnmt-T1	DNAzymy 10-23 wobec różnych	GATGGAGGCTAGCTACAACGAAGCTTC
	miejsc w obrębie mRNA DNMT1	
Dzdnmt-T2		CCATCGGAGGCTAGCTACAACGATTGCTCC
Dzdnmt-T3		ACTCGGGAGGCTAGCTACAACGATGGGAT
Dzdnmt-T4		CAGCGTGAGGCTAGCTACAACGACCCAGC
Dzdnmt-T5		GCTGCTGAGGCTAGCTACAACGAACACCT
Dzdnmt-T6		CGCCGTGAGGCTAGCTACAACGACCTTGC
Dzgfp	DNAzym 10-23 wobec mRNA GFP	GCCGGAGGCTAGCTACAACGAACGCTG
Dzcry	DNAzym 10-23 wobec mRNA	AAGGGAGGCTAGCTACAACGATCAGGG
	CRYAB	
Dzgli	DNAzym 10-23 wobec mRNA GLI1	CCGGGAGGCTAGCTACAACGATGAGGA
AS-DNA-GFP	Sekwencja antysensowa w stosunku	CCTCGCCGGACACGCT
	do mRNA GFP	
SKR-DNA	Sekwencja przypadkowa	CGCTAAGGCCCTGCCC
DnmtF	Startery reakcji qPCR do syntezy	GAGGAGGGCTACCTGGCTAAA
DnmtR	cDNA DNMT1 człowieka	CCCGTGGGAAATGAGATGTGAT

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja 5'-3'
Gli123F	Startery reakcji qPCR do syntezy	GTACCACTGTGTCCCGCCGC
Gli123R	cDNA GLI1 człowieka	GCAGGTAGTGCTGGGCAGGC
tGliF	-	CCCAGTGTGGGGACAGAAGTCA
tGliR		TCCCAGAGATGGGCTCATGGTGC
eT129E	Startary do atraymonia matryay do	
81130F	suntery transformty T128 i sondy	
<b>T120D</b>	syntezy transkryptu 1158 i sondy	
s1138K	sens RPA w reakcji PCR	CGTAGGTCAGGGTGGTCA
aT138R	Startery do otrzymania sondy	AGCAAGAATTCGAATTGTAATACGACTCACTATAGG
	antysens RPA w reakcji PCR	CGTAGGTCAGGGTGGTCA
aT138F		ACGTAAACGGCCACAAGT
CryF	Startery reakcji qPCR do syntezy	GATCCGCCGCCCTTCTTTCC
CryR	cDNA CRYAB człowieka	CAGGCGCATCTCTGAGAGTCCAGT
HprtF	Startery reakcji qPCR do syntezy	CTGAGGATTTGGAAAGGGTG
HprtR	cDNA HPRT człowieka	AATCCAGCAGGTCAGCAAAG
ActbF	Startery reakcji qPCR do syntezy	TCTGGCACCACACCTTCTAC
ActbR	cDNA ACTB człowieka	GATAGCACAGCCTGGATAGC
GfpF	Startery reakcji qPCR do syntezy	CCTGAAGTTCATCTGCACCA
GfpR	cDNA GFP człowieka	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
GFP1	Startery reakcji PCR do syntezy	CTGACCCTGAAGTTCATCTG
	cDNA GFP człowieka	
GFP2	1	CTTCTCGTTGGGGTCTTT
GAPDH1	Startery reakcji PCR do syntezy	TCCCATCACCATCTTCCA
GAPDH2	cDNA GAPDH człowieka	CATCACGCCACAGTTTCC

Tab.6.3. Zestawienie oligorybonukleotydów stosowanych w pracy

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja 5'-3'
AS-RNA-gfp	Sekwencja antysensowa w	CCUCGCCGGACACGCU
	stosunku do mRNA GFP	
sT138 gfp	Substrat reakcji in vitro GFP,	ACGUAAACGGCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGGCG
	sonda sens RPA	AGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCA
		UCUGCACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCCUGGCCCACCC

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja 5'-3'
		UCG
asT138 gfp	Sonda antysens RPA	CGAGGGUGGGCCAGGGCACGGGCAGCUUGCCGGUGGUGC
		AGAUGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCGUAGGUGGCAUCGC
		CCUCGCCCUCGCCGGACACGCUGAACUUGUGGCCGUUUA
		CGU
T16 gfp	Substrat reakcji in vitro GFP	AGCGUGUCCGGCGAGG
C16 cry	Substrat reakcji in vitro	CCCUGAGUCCCUUCUA
	CRYAB	
G16 gli	Substrat reakcji in vitro GLI1	UCCUCAGUCCCGGGGA
T12 gfp	Substrat reakcji in vitro GFP	GCGUGUCCGGCG
T24 dnmt	Substrat reakcji in vitro	AAAUGAGAAGCUGUCCAUCUUUGA
	DNMT1	
HHgli-0		GCCCGGCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACUGAG
HHgfp-0	Rybozym minimalny typu	UCGCCGCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACGC
HHdnmt-0-T1	hammerhead	AAGAUGCUGAUGAGGUCGAAAGACCGAAACAGCU
HHdnmt-0-T2	-	GGCCGGCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACGGCC
HHcry-5c		GGUAAAGGCCAAAGCUAUGGCAAGGCUGAUGAGGCCGAA
		AGGCCGAAACUCAG
HHgli-5c		GUCGAUGCCAAAGCUAUGGCCCGGCUGAUGAGGCCGAAA
		GGCCGAAACUGAG
HHgfp-6		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGUCGCCGCUGAUGAGGCCGAA
		AGGCCGAAACACGC
HHgfp-5	-	CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCGCCGCUGAUGAGGCCGAAA
	Wydłużony rybozym typu	GGCCGAAACACGC
HHgfp-4	hammerhead	CCUAAGGCCAAAGCUAUGGGCCGCUGAUGAGGCCGAAAG
		GCCGAAACACGC
HHgfp-5 <sup>MUT1</sup>		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCGCCGCAGAUGCGGCCGAAA
		GGCCGUAACACGC
HHgfp-5 <sup>MUT2</sup>		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCGCCGCUGAUCUGGCCGAAA
		GGCCCAAACACGC
HHgfp-5 <sup>MUT3</sup>	-	CCAUGAGGCCAAAGCCUCAUGGCGCCGCUGAUGAGGCCG
		AAAGGCCGAAACACGC
HHdnmt-6-T1	-	CCUAAGGCCAAAGCUAUGGAAGAUGCUGAUGAGGUCGAA
		AGACCGAAACAGCU
HHdnmt-5-T1		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGAGAUGCUGAUGAGGCCGAAA
		GGCCGAAACAGCU
HHdnmt-4-T1		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGGAUGCUGAUGAGGUCGAAAG
		ACCGAAACAGCU

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja 5'-3'
HHdnmt-6-T2		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGGGCCGGCUGAUGAGGCCGAA
		AGGCCGAAACGGCC
HHdnmt-5-T2		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGGCCGGCUGAUGAGGCCGAAA
	Wydłużony rybozym typu	GGCCGAAACGGCC
HHdnmt-4-T2	hammerhead	CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCCGGCUGAUGAGGCCGAAAG
		GCCGAAACGGCC
HHgli-5b		CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCCCGGCUGAUGAGGCCGAAA
		GGCCGAAACUGAG

# 6.1.3. Wektory ekspresyjne

W badaniach wykorzystano wektor pEGFP-N3 kodujący wariant białka zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą wczesnego promotora CMV (ang. human cytomegalovirus). Został on inżynieryjnie zmodyfikowany w celu uzyskania jasnej fluorescencji i wysokiego poziomu ekspresji w komórkach ssaków (maksimum wzbudzenia = 488nm, maksimum emisji = 507nm). Gen EGFP posiada dwie substytucje aminokwasów Phe-64 na Leu oraz Ser65 na Thr. Sekwencja kodująca odpowiada preferencji dystrybucji kodonów w genomie człowieka. Sygnał poliadenylacji SV40 poniżej sekwencji genu zapewnia optymalne przygotowanie mRNA do translacji. Wektor pEGFP-N3 jest przystosowany do powielania w szczepie bakteryjnym *E. coli* DH5α w obecności kanamycyny.



Rys. 6.1. Mapa restrykcyjna oraz miejsce wielokrotnego klonowania (ang. multi cloning site, MSC) wektora ekspresyjnego pEGFP-N3 (Clontech).  $P_{CMV IE}$  – wczesny promotor CMV, EGFP – gen białka zielonej fluorescencji, Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup> – gen oporności na kanamycynę i neomycynę, pUC ori – miejsce startu replikacji plazmidu.

# 6.2. Materiał biologiczny

# 6.2.1. Szczepy bakteryjne

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) [F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG,  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17( $r_{K}^{-}m_{K}^{+}$ ),  $\lambda$ – ]

# 6.2.2. Linie komórkowe

**HeLa** – linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy. Komórki transformowane nowotworowo na skutek zakażenia wirusem brodawczaka HPV 18 (ang. human papilloma virus). Nazwa pochodzi od imienia i nazwiska dawcy – Henrietta Lacks.

**HEK 293T** – linia komórkowa wyprowadzona z ludzkich komórek nabłonkowych nerki (ang. human endothelial kidney cells).

**U118 MG** – linia ludzkich komórek glejowych pochodzących z glejaka złośliwego. Morfologicznie jest to mieszanina komórek nowotworów glioblastoma oraz astrocytoma.

## Pożywki do hodowli linii komórkowych:

- RPMI-1640 Medium (Sigma)
- OptiMEM (Invitrogen)
- DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATTC)
- DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)

## 6.2.3. Przeciwciała

Przeciwciała I-rzędowe:

Monoklonalne przeciwciało anty-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-47724) Monoklonalne przeciwciało anty-GFP (Santa Cruz Biotechnology, sc-81045) Monoklonalne przeciwciało anty-GLI1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271075) Monoklonalne przeciwciało anty-CRYAB (Santa Cruz Biotechnology, sc-53919) Monoklonalne przeciwciało anty-DNMT1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-52919)

## Przeciwciała II-rzędowe:

Anty-mysie IgG skoniugowane z biotyną (Sigma)

# 6.3. Pożywki i bufory

Płynna pożywka LB	1%	baktopepton
	0.5%	ekstrakt drożdżowy
	1%	NaCl
Bufor 10x TBE pH 8.3	0.5 M	Tris-HCl pH 8.3
	0.5 M	kwas borowy
	10 mM	EDTA pH 8.0
	2004	
6x bufor obciążający do elektroforezy	30%	glicerol
kwasów nukleinowych w żelach	0.25%	bromophenol blue
agarozowych	0.25%	Xylene cyanol
	1x	TEB
Bufor obciążający do elektroforezy	62.5 mM	Tris-HCl, pH 8.3
białek SBLU	5.9 M	mocznik
	2%	SDS
	0.1 M	DTT
	0.05%	błękit bromofenolowy
Bufor obciążający do elektroforezy	62.5 mM	Tris-HCl, pH 8.3
białek SBL	2%	SDS
	0.1 M	DTT
	0.05%	błękit bromofenolowy
Bufor obciążający 1x do elektroforezy	1 M	cytrynian sodu pH 5
kwasów nukleinowych w żelach PAA	0.1 M	EDTA
	7 M	mocznik
	0.1%	błękit bromofenolowy (BB)
	0.1%	fiolet ksylenowy (XC)

Bufor STOP do obciążania	1x	TMN
kompleksów kwasów nukleinowych	50%	glicerol
(10x)	0.1%	błękit bromofenolowy (BB)
	0.1%	fiolet ksylenowy (XC)
Bufor do hybrydyzacji kwasów	20 mM	Tris-HCl pH 7.5
nukleinowych (H, 5x)	50 mM	NaCl
Bufor TMN (1x)	20 mM	Tris-HCl pH 7.5
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	NaCl
Bufor do elucji RNA z żelu	0.5 M	NaOAc
poliakrylamidowego	1 mM	EDTA
Roztwór do hydrolizy alkalicznej RNA	50 mM	NaOH
	1 mM	EDTA
Bufor do elektrotransferu białek	25 mM	Tris-HCl
	190 mM	Glicyna
	20%	Metanol
Bufor do płukania membrany Western	1x	PBS
Blot	0.05%	Tween20
Bufor do blokowania membrany po	10%	Mleko w proszku
transferze Western Blot	1x	PBS
	0.05%	Tween20
Bufor do inkubacji membrany z	1x	PBS
przeciwciałem Western Blot	0.05%	Tween20
	3%	BSA

Bufor do rozdziału	144 g	Glicyna
elektroforetycznego białek w żelu	30.2 g	Tris-HCl pH
białkowym (10x, 1l)	10 g	SDS
Bufor do barwienia białek w żelu PAA	0.2%	Comassie Brilant R-250
·	50%	Metanol
	10%	Kwas octowy
Odbarwiacz do żelu PAA po	30%	Metanol
barwieniu białek	7%	Kwas octowy
Roztwór do barwienia kwasów	40%	Metanol
nukleinowych w żelach PAA	1%	Kwas octowy
	0.1%	Błękit toluidynowy

#### 6.4. Metody rozdziału i analizy kwasów nukleinowych

# 6.4.1. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Analizę jakościową RNA i DNA przeprowadzano w 1-1.5% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 1x TBE, o wymiarach 11 x 7 cm i grubości 0.5 cm (Tab. 6.4) [Ausubel i in. 1994]. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/6 objętości buforem do elektroforezy agarozowej. Rozdział prowadzono przez około 1 godzinę, przy napięciu ok. 5V/cm i natężeniu prądu 50 – 70 mA w temperaturze pokojowej. Metodą tą analizowano wyizolowany całkowity RNA, produkty PCR, plazmid pEGFP-N3 po izolacji. Do oznaczania długości fragmentów DNA używano markerów wielkości 1000 pz i 100 pz (Fermentas). Rozdzielony DNA/RNA uwidaczniano poprzez fluorescencję (System dokumentacji żeli GelDoc, UVP).

Tab. 6.4. Skład żeli agarozowych.

Składniki	1%	1.5%
Agaroza	0.5 g	0.75 g
1x TBE	50 ml	50 ml
bromek etydyny	0.5 µg/ml	0.5 µg/ml

#### 6.4.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym

Analizę elektroforetyczną oligodeoksyrybonukleotydów, oligorybonukleotydów, produktów reakcji transestryfikacji, analizy enzymatycznej i chemicznej struktur rybozymów oraz transkrypcji *in vitro* przeprowadzano w 10%, 15% i 20% żelu PAA z 7 M mocznikiem o wymiarach 16 cm x 14 cm, 20 cm x 16 cm, 30 cm x 40 cm i grubości 0.4 mm - 0.8 mm, przy napięciu 500 V - 2000 V i natężeniu prądu 5 mA - 40 mA w temperaturze pokojowej, w buforze 1x TBE (Tab. 6.5) [Digweed i in. 1986]. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do kwasów nukleinowych PAA w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzano ok. 30 min pre-elektroforezą (ang. pre-run electrophoresis). Rozdział prowadzono przez około 1-6 godzin.

Analizę migracji kompleksów rybozymów i substratów prowadzono w 15% natywnym żelu poliakrylamidowym bez mocznika o wymiarach 20 cm x 16 cm grubości 0.4 mm, przy napięciu 500 V i natężeniu prądu 20 mA w temperaturze 4 °C, w buforze 0.5x TBE.

Tab. 6.5. Skład żeli poliakrylamidowych.

Składniki	Żel denaturujący			Żel natywny
	10%	15%	20%	15%
40% akryloamid/bisakryloamid (38:2)	25 ml	37.5 ml	50 ml	50 ml
mocznik 7 M	42 g	42 g	42 g	-
10x TBE	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Woda	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml
10% APS	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
100% TEMED	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

#### 6.4.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworach

RNA lub DNA w żelach poliakrylamidowych identyfikowano w świetle UV lub wykorzystując roztwór błękitu toluidyny [Ausubel i in. 1994, Farrell 2005]. RNA lub DNA w żelach agarozowych identyfikowano w świetle UV wykorzystując zjawisko interkalacji bromku etydyny przy wykorzystaniu systemu dokumentacji żeli GelDoc (UVP). Znakowany radioaktywnie RNA analizowano za pomocą autoradiografii. Ekspozycję żeli prowadzono w temperaturze -70°C stosując ekrany wzmacniające i błony rentgenowskie RTG-XS. Optymalny czas ekspozycji ustalano na podstawie pomiaru radioaktywności próbek poddawanych elektroforezie [Ausubel i in. 1994]. Analizę RNA znakowanego fluorescencyjnie oraz radioaktywnie, poziomu transestryfikacji prowadzono z wykorzystaniem pomiaru densytometrycznego przy użyciu urządzenia odwzorowującego FLA-5100 (FujiFilm) i oprogramowania Multi Gauge V3.0 (FujiFilm).

Stężenie kwasów nukleinowych w roztworach oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 260 nM przy zastosowanie spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

#### 6.4.4. Oczyszczanie RNA na żelu poliakrylamidowym

W celu oczyszczenia RNA stosowano rozdział elektroforetyczny w denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem, o wymiarach 20 cm x 16 cm i grubości 0.4 mm, przy napięciu 500 V - 2000 V i natężeniu prądu 5 mA - 40mA w temperaturze pokojowej, w buforze 1x TBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym w składzie 7 M mocznik oraz jeden wybrany barwnik (błękit bromofenolowy lub fiolet ksylenowy) w stosunku 1:1. Wielkość analizowanego RNA determinowała wybór barwnika. Po rozdziale RNA uwidaczniano wykorzystując zjawisko fluorescencji RNA w świetle UV na płytce fluorescencyjnej. Indywidualne prążki wycinano sterylnym skalpelem, rozdrabniano i umieszczano w probówce typu eppendorf w buforze do elucji RNA z żeli poliakrylamidowych (300-400 μl). Elucję z żelu prowadzono przez noc w temperaturze 4°C. Eluat przenoszono do nowej probówki typu eppendorf i wytrącano z dodatkiem 1/10 objętości 3 M octanu sodu pH 4.8, 2.5 objętości etanolu 96% oraz 1 μl glikogenu 5 mg/ml (Ambion), w temperaturze -20°C przez 16 godzin, a następnie wirowano 30 min przy 13.5 tysiąca rpm w temperaturze 4 °C. Wytrącony RNA rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz.

#### 6.5. Metody rozdziału i analizy białek

Analizę elektroforetyczną białek przeprowadzano w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS o wymiarach 10 cm x 10 cm grubości 0.4 mm - 0.8 mm, przy napięciu 250 V i natężeniu prądu 40 mA w temperaturze pokojowej, w buforze do rozdziału elektroforetycznego białek (Tab. 6.6) [Laemmli, 1970]. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym SBLU lub SBL (przy przygotowaniu żelu do analizy Western Blot) w stosunku 1:1. Rozdział prowadzono przez około 1-2 godzin. Do oznaczania wielkości białek używano markerów wielkości Spectra<sup>TM</sup> Multicolor oraz PageRuler<sup>TM</sup> Plus (Fermentas). Po rozdziale białka uwidaczniano poprzez barwienie w roztworze Comassie Brilant R-250 z metanolem i kwasem octowym przez 2 godziny w temperaturze pokojowej i odbarwianie przez 16 godzin [Ausubel i in. 1994]. Wybarwiony żel wizualizowano w świetle widzialnym z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli GelDoc (UVP).

Stężenie białek w próbkach oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 280 nM przy zastosowanie spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Białka przechowywano krótkoterminowo w -20°C lub długoterminowo w temp. -80°C.

Tab. 6.6. Skład żeli poliakrylamidowych z SDS.

Składniki	Żel zagęszczający (10 ml)	15% żel rozdzielający (20 ml)	6% żel rozdzielający (20 ml)
30% akryloamid/bisakryloamid	1.7 ml	10 ml	4 ml
(30:0:8)			
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2 ml	-	-
3 M Tris-HCl pH 8.8	-	7.5 ml	7.5 ml
20% SDS	50 µl	100 µl	100 µl
woda	7 ml	2.3 ml	8.3 ml
10% APS	75 μl	150 µl	150 µl
100% TEMED	7.5 μl	15 μl	15 µl

#### 6.6. Analiza właściwości katalitycznych rybozymów

#### 6.6.1. Transestryfikacja substratu RNA w obecności rybozymów

Aktywność katalityczna rybozymów typu hammerhead była badana w warunkach reakcji jednoobrotowej przy nadmiarze rybozymu względem fluorescencyjnie znakowanego substratu (od 10:1 do 100:1). Substraty miały długość 12, 16, 24 oraz 138 nukleotydów. Substrat o długości 138 nt był znakowany radioizotopowo. Reakcję prowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl pH 7.5-8. Mieszaniny reakcyjne zawierające substrat i rybozym (lub te składniki osobno, które później łączono) poddawano 2 minutowej denaturacji w 72°C, a następnie schładzano w łaźni wodnej przez 16 godzin. Alternatywnie przeprowadzano szybkie schładzanie mieszaniny lub wcale nie przeprowadzano denaturacji. Reakcje transestryfikacji indukowano poprzez dodanie MgCl<sub>2</sub> (lub MnCl<sub>2</sub>) w ilości zapewniającej stężenie końcowe 1-100 mM oraz 10 mM sperminy. Alternatywnie reakcje prowadzono bez sperminy. Reakcje prowadzono od 1 minuty do 8 godzin w temperaturze 25-37°C. Wpływ czynnika stłoczenia cząsteczkowego sprawdzano dodając do mieszaniny reakcyjnej PEG8000 do końcowego stężenia 20%. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μl.

#### 6.6.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych

Obserwowaną stałą szybkości reakcji (k<sub>obs</sub>) dla katalitycznych kwasów nukleinowych wyznaczano w warunkach optymalnych dla reakcji jednoobrotowej (Tab. 6.7).

Przed rozpoczęciem reakcji próby były denaturowane 2 min w temperaturze 72°C, a następnie schładzane przez 16 godzin w łaźni wodnej do 25°C. Następnie odebrano 10 µl mieszaniny jako próbę kontrolną (K), a do pozostałej części w celu zainicjowania reakcji dodawano MgCl<sub>2</sub> oraz sperminę. Po upływie odpowiednio 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 oraz 256 minut odbierano kolejne 10 µl mieszaniny reakcyjnej. Reakcje hamowano przez dodanie równej objętości buforu obciążającego do PAA i umieszczenie w 0 °C. Produkty transestryfikacji rozdzielano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE w temperaturze pokojowej. Ilość substratu,

który uległ reakcji oceniano przy użyciu oprogramowania Multi Gauge V3.0 (FujiFilm). Wartości k<sub>obs</sub> były liczone korzystając z programu Microcal Origin 6.0 stosując wzór:

$$f_t=1 - \exp(K_{obs}t),$$

gdzie f<sub>t</sub> oznacza ilość substratu po transestryfikacji w czasie t.

Tab. 6.7. Skład mieszaniny reakcyjnej do wyznaczania parametrów kinetycznych rybozymów.

Składniki	Stężenie końcowe
Znakowany fluorescencyjnie substrat RNA	0.2 µM
Rybozym	20 µM
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
Spermina	10 µM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

# 6.6.3. Znakowanie RNA przy końcu 5'

1 μg RNA cząsteczek poddawanych analizie strukturalnej lub substratu T138 poddawano znakowaniu z wykorzystaniem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] w objętości 10 μl. Reakcja polegała na fosforylacji końcowej grupy 5'OH RNA za pomocą [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Tab. 6.8) [Digweed i in. 1986, Farrell 2005]. Próby inkubowano przez 45 minut w 37°C. Znakowany RNA oczyszczano na żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem (Rozdz. 6.4.4). Po ekspozycji żelu na błonę rentgenowską, prążek zawierający znakowany RNA wycinano, rozdrabniano i zanurzano w buforze do elucji RNA z żelu. Elucję prowadzono przez noc w temperaturze 4°C. Eluat przenoszono do nowej probówki typu eppendorf i wytrącano z dodatkiem 1/10 objętości 3 M octanu sodu pH 4.8, 2.5 objętości etanolu 96% oraz 1 μl glikogenu 5 mg/ml (Ambion), w temperaturze -20°C przez 16 godzin, a następnie wirowano 30 min przy 13.5 tysiąca rpm w temperaturze 4 °C. Wytrącony RNA rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz.

Pomiaru radioaktywności dokonywano z wykorzystaniem licznika scyntylacyjnego Beckamn γ-mate II.

Składniki	Znakowanie przy końcu 5'	
RNA	1 µg	
Kinaza polinukleotydowa T4 30 U/µl (USB)	0.3 µl	
Bufor do kinazy 10x (USB)	1 µl	
[γ- <sup>32</sup> P] – 50 μCi (3000Ci/mmmol)	50 µCi	
woda	do 10 µl	

Tab. 6.8. Skład mieszaniny reakcyjnej do znakowania RNA przy końcu 5'.

# 6.6.4. Hydroliza enzymatyczna RNA

RNA znakowany przy końcu 5' (30 000 cpm) poddawano hydrolizie z udziałem specyficznych rybonukleaz T1 (0.3 U), S1 (0.5 U) oraz V1 (0.02 U) w obecności niefrakcjonowanego tRNA z *Lupinus luteus* (Tab. 6.9). W tabeli przedstawiono wykaz enzymów stosowanych w poszczególnych reakcjach, źródła ich pochodzenia, specyficzność działania oraz warunki reakcji (Tab. 6.10). Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrolę wykorzystywano RNA w wodzie oraz RNA poddany hydrolizie alkalicznej (60 000 cpm, 2-3 min, 95°C, w obecności 50 mM NaOH oraz 10 mM EDTA).

Tab. 6.9. Skład mieszanin reakcyjnych do hydrolizy enzymatycznej RNA.

Składniki	Hydroliza alkaliczna	Hydroliza T1	Hydroliza S1	Hydroliza V1
RNA	60 000 cpm	30 000 cpm	30 000 cpm	30 000 cpm
tRNA Lupinus luteus	4 µg	2 µg	2 µg	2 µg
enzym	-	T1 (0.3 U)	S1 (0.5 U)	V1 (0.02 U)
bufor	do 15 μl	do 10 µl	1 µl (10x)	1 µl (10x)
woda	-	-	do 10 µl	do 10 µl

Tab. 6.10. Wykaz enzymów stosowanych w reakcjach hydrolizy enzymatycznej RNA.

RNAza	Pochodzenie	Specyficzność	Temperatura i czas
			reakcji
T1	Aspergillus oryzae	Gp ↓ N	55°C, 20 min
S1	Aspergillus oryzae	N ↓ pN w odcinkach jednoniciowych	37 °C, 30 min
V1	Jad węża <i>Naja naja</i> <i>oziana</i> (kobra)	N ↓ pN w odcinkach dwuniciowych	25 °C, 15 min
#### 6.6.5. Hydroliza chemiczna RNA z udziałem jonów ołowiu

RNA znakowany przy końcu 5' (30 000 cpm) poddawano hydrolizie indukowanej jonami ołowiu. Reakcja przebiegała w temperaturze 25°C przez 15 minut w obecności 2 µg niefrakcjonowanego tRNA z Lupinus luteus w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 z różnym stężeniem ołowiu: 0.2 mM, 0.7 mM, 1.4 mM. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrolę wykorzystywano RNA w wodzie oraz RNA poddany hydrolizie alkalicznej jak i enzymatycznej przy pomocy rybonukleazy T1 (0.3 U).

## 6.6.6. Analiza tworzenia kompleksów rybozymów z substratem T16

Kompleksy rybozymów z substratami wizualizowano wykorzystując właściwości znakowanego fluorescencyjnie substratu T16 lub znakowanego radioizotopowo rybozymu HHgfp-5. Inkubowano substrat oraz rybozym w stosunku 1:10 w wybranych buforach Tris-HCl pH 7.5, bufor do rybonukleazy S1, bufor do rybonukleazy V1, bufor TMN, bufor hybrydyzacyjny, woda w końcowej objętości 10 µl. Próby ogrzewano 2 min w 72°C, a następnie schładzano do 25°C. Próby obciążano buforem STOP do analiz kompleksów RNA, nakładano na 15% natywny żel poliakrylamidowy bez mocznika i rozdzielano w TEB x0.5 w 4°C.

#### 6.7. Analiza ekspresji genów

## 6.7.1. Hodowla linii komórkowych

Do namnożenia komórek (Rozdz. 6.2.2) w celu przygotowania odpowiedniej ilości materiału do przesiania komórek na płytki 6-dołkowe wykorzystywane były butelki do hodowli komórkowych 75 cm<sup>3</sup> (Nunc). Komórki wysiewano, a hodowle prowadzono w 10 ml pożywki z suplementami w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> do osiągnięcia konfluencji 80%. Co 24 h pożywkę wymieniano na świeżą. W celu odklejenia komórek od dna butelki hodowle przemywano buforem PBS, a następnie dodawano 2 ml roztworu trypsyny-EDTA i inkubowano 2 min w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 8 ml odpowiedniej pożywki i całość wirowano 3 min przy 1600 rpm w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 5 ml świeżej pożywki, z czego 10 μl wykorzystywano do mierzenia ilości komórek z wykorzystaniem komory Bürkera.

Komórki HeLa, U118 oraz HEK 293T wysiewano na płytki 6-dołkowe do hodowli komórkowych (Nunc) w ilości 6 x  $10^5$  komórek/dołek. Hodowle prowadzono w 2.5 ml pożywki uzupełnionej suplementami (Tab. 6.11) w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 h i osiągnięciu przez komórki konfluencji 85-95% pożywkę usuwano, a komórki przytwierdzone do dna przemywano buforem PBS i umieszczano w świeżym medium (2 ml) bez dodatkowych składników. Tak przygotowane hodowle komórkowe wykorzystywane były do transfekcji kwasami nukleinowymi.

Składniki pożywki	HeLa	HEK 293T	U118
pożywka	RPMI-1640 (Sigma)	DMEM (Sigma)	DMEM (ATTC)
suplementy	<ul> <li>10% płodowa surowica bydlęca (FBS)</li> <li>1% roztwór antybiotyków (Sigma)</li> <li>1% mieszanina witamin (Sigma)</li> </ul>	<ul> <li>10% płodowa surowica bydlęca (FBS)</li> <li>1% roztwór antybiotyków (Sigma)</li> <li>1% mieszanina witamin (Sigma)</li> </ul>	<ul> <li>10% płodowa surowica bydlęca (FBS)</li> <li>Streptomycyna 1x (ATTC)</li> </ul>

Tab. 6.11. Skład pożywek do hodowli linii komórkowych.

# 6.7.2. Transfekcja komórek

Komórki hodowano na płytce 6-dołkowej w pożywce z dodatkiem suplementów. Przed transfekcją zbierano pożywkę, a komórki płukano roztworem PBS. Następnie dodawano 1.5 ml czystej pożywki. Do transfekcji przygotowywano roztwory kwasów nukleinowych w stężeniu końcowym 5-300 nM (HHgfp) oraz 300 nM (HHcry, HHdnmt, HHgli) z pożywką Opti-MEM w objętości 250 µl. W przypadku HHgfp dokonywano równoległej transfekcji (ang. co-transfection) z 4 µg pEGFP-N3 (do końcowego stężenia 0.655 nM). W osobnych probówkach przygotowywano roztwór 6.5 µl lipofektaminy 2000 z 243.5 µl Opti-MEM. Mieszaniny inkubowano osobno w temperaturze pokojowej przez 5-7 minut, a następnie dodawano po 250 µl roztworu lipofektaminy do każdego z roztworów kwasów nukleinowych i inkubowano razem w temperaturze pokojowej przez kolejne 20 minut. 500 µl mieszaniny dodawano do komórek. Do komórek kontroli dodawano 493.5 µl Opti-MEM z 6.5 µl lipofektaminy. Po transfekcji komórki hodowano 24 godziny w 37°C przy 5% stężeniu CO<sub>2</sub>.

# 6.7.3. Analiza Western Blot

Komórki 24 godziny po transfekcji przemywano buforem PBS oraz ścierano mechanicznie w obecności 10 mM Tris-HCl PH 7.5, a następnie poddawano sonikacji w następujących warunkach: 4 x 10 sek. z przerwą 1 min przy amplitudzie 75% oraz wirowano 10 min przy 13.2 tys rpm w 4°C. Ilość białek mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000. Jakość uzyskanego materiału oceniano elektroforetycznie (Rozdz. 6.5). Każda próba była poddawana denaturacji 10 min w 95°C. Uzyskany całkowity ekstrakt białkowy w ilości 30µg/GAPDH, 30µg/GFP, 150µg/GLI1, 150µg/DNMT1, 150µg/CRYAB nakładano na żel poliakrylamidowy z SDS (GLI1, DNMT1 – żel 6%; GAPDH, GFP, CRYAB – żel 15%) obciążając buforem SBL w stosunku 1:1 wobec znaczników wielkości Spectra<sup>TM</sup> Multicolor oraz PageRuler<sup>TM</sup> Plus (Fermentas). Rozdzielone białka były przenoszone na membranę PVDF w procesie

elektrotransferu z wykorzystaniem urządzenia Western Unit (BioRad) w buforze do elektrotransferu Towbin. Membranę blokowano w roztworze mleka w proszku w 1xPBS/0.05%Tween20 w 4°C przez 16 godzin, a następnie odmywano trzykrotnie w 1xPBS/0.05%Tween20 przez 10 min przy 350 rpm w temperaturze pokojowej. Membranę inkubowano z mysimi pierwszorzędowymi przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi wobec białek GFP (1:500), GAPDH (1:500), DNMT1 (1:100), GLI1 (1:100) oraz CRYAB (1:100) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po trzykrotnym przemyciu membrany w 1xPBS/0.05%Tween20, membranę inkubowano z biotynylowanym przeciwciałem anty-mysim w stosunku 1:2000 (Sigma) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po trzykrotnym przepłukaniu inkubowano z roztworem streptawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą przez 15 min w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po przemyciu przyłączone przeciwciała uwidaczniano z wykorzystaniem płynnego systemu BCIP/NBT (Sigma), a uzyskane prążki oceniano densytometrycznie przy wykorzystaniu programu ImageQuant (Molecular Dynamics).

## 6.7.4. Izolacja całkowitego RNA

RNA izolowano przy pomocy odczynnika Trizol Reagent (Invitrogen) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Komórki z płytek 6-dołkowych przemywano buforem PBS, a następnie poddawano lizie przy użyciu 1000 µl Trizolu. Uzyskane lizaty zbierano do probówek i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 15-30°C, po czym dodawano 200 µl chloroformu. Wytrząsano przez 15 s, a następnie inkubowano w temperaturze 15-30°C przez 2-3 minut. Próby wirowano 15 minut w 4°C przy 13000 rpm. Fazę górną przenoszono do nowej probówki, a RNA wytrącano przez dodanie 500 µl izopropanolu. Próby inkubowano 10 minut w temperaturze 15-30°C, a następnie wirowano 10 minut w 4°C przy 13000 rpm. Osad przemywano 1000 µl 70% etanolu i wytrząsano. Całość wirowano 10 minut w 4°C przy 13000 rpm. Osad suszono na powietrzu przez 5-10 minut, a następnie zawieszano w 20 µl wody. Zawartość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. RNA przechowywano krótkoterminowo w -20°C lub długoterminowo w temp. -80°C. Do przechowywania RNA oraz do reakcji z jego udziałem używano wody wolnej od RNaz (woda RNAse-free, Ambion). Do pozostałych reakcji używano sterylną wodę dejonizowaną (Mili-Q, Millipore).

Wyizolowany RNA poddawano działaniu DNazy I z wykorzystaniem zestawu odczynników DNA Free (Ambion) zgodnie z opisem dołączonym przez producentów.

## 6.7.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) zgodnie z opisem załączonym przez producenta w objętości 20 µl. Matrycę stanowił całkowity RNA wyizolowany z linii komórkowych. Skład

mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli (Tab. 6.12). Mieszaninę starterów (Random hexamer primer) oraz 1-2 µg całkowitego RNA zawieszano w wodzie, inkubowano 5 minut w 70°C, a następnie umieszczano na lodzie. Do prób dodawano 5x bufor (5x Reaction buffer), RNAse Inhibitor RiboLock oraz dNTP MIX 10 mM. Całość inkubowano 5 minut w 25°C. Następnie dodawano M-MuLV RT i inkubowano 10 minut w 25°C, 60 minut w 42°C oraz 10 minut w 70°C. Produkty reakcji przechowywano w -20°C. Uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji komplementarny DNA (cDNA) wykorzystywano jako matryce do łańcuchowej reakcji polimeryzacji.

Tab. 6.12. Skład mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji w objętości 20 μl.

Składnik	Odwrotna transkrypcja	
matryca RNA całkowity	1-2 μg	
Random hexamer primer 0.2 µg/µl	0.01 µg/µl	
Reaction buffer 5x	1x	
RNAse Inhibitor RiboLock 20 u/µl	1 u/µl	
dNTP MIX 10 mM	1 mM	
M-MuLV RT 200 u/µl	10 u/µl	
woda	do 20 µl	

## 6.7.6. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR)

Reakcje PCR przeprowadzano w objętości 10 µl [Farrell 2005]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki prowadzonych reakcji przedstawiono w tabelach (Tab. 6.13, 6.14). Matrycę stanowił cDNA uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Rozdz. 6.7.5). RT-PCR prowadzono z wykorzystaniem starterów GFP1 i GFP2 umożliwiających amplifikację fragmentu cDNA genu *GFP* (501 pz) oraz GAPDH1 i GAPDH2 w celu amplifikacji fragmentu cDNA genu *GAPDH* (380 pz). Matrycę do uzyskania DNA do syntezy sond RPA o sekwencji sensowej (sens) oraz antysensowej (antysens) stanowił plazmid pEGFP-N3. RT-PCR prowadzono z wykorzystaniem starterów sT138for i aT138rev (sonda sens) oraz aT138for i aT138rev (sonda antysens) umożliwiających amplifikację fragmentu cDNA genu *GFP* (138 pz). Startery projektowano w programie Primer3 (v. 0.4.0). W zależności od dalszego przeznaczenia produkty reakcji PCR poddawane były:

- analizie elektroforetycznej w żelu agarozowym,
- oczyszczaniu przy użyciu zestawu odczynników QUIAGEN PCR Purification Kit lub NucleoSpin Extract II (Marchery&Nagel) zgodnie z procedurami podanymi przez producentów.

Ilość uzyskanego DNA po oczyszczaniu oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 260 nM przy zastosowaniu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Składnik	Stężenie/ilość		
matryca cDNA	10-100 ng (2 µl RT)		
bufor	1x		
MgCl <sub>2</sub>	1 mM		
dNTP Mix	0.2 mM		
starter 1	0.5 pmol/µl		
starter 2	0.5 pmol/µl		
polimeraza Taq	0.1 u/µl		
woda	do 10 µl		

Tab. 6.13. Skład mieszaniny do reakcji PCR w objętości 10 µl.

Tab. 6.14. Warunki prowadzonych reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	94°C	3 min	1
Denaturacja	94°C	30 s	
Wiązanie starterów	55°C	30 s	30-35
Synteza	72°C	45 s	
Synteza końcowa	72°C	5 min	1

# 6.7.7. Oczyszczanie produktów PCR

W celu przygotowania produktów PCR do transkrypcji *in vitro* DNA oczyszczano używając zestawu odczynników QIAGEN PCR Purification Kit lub NucleoSpin Extract II (Marchery&Nagel) zgodnie z procedurami podanymi przez producentów.

# 6.7.8. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) w czasie rzeczywistym

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej mRNA wykonano reakcję ilościowego PCR w czasie rzeczywistym dla genów GFP, GLI1, CRYAB oraz DNMT1. Matrycę stanowił cDNA uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Rozdz. 6.7.5). Analizę ilościową względem genów referencyjnych ACTB oraz HPRT przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej (metoda  $\Delta\Delta$ ) [Livak i Schmittegen 2001, Farrell 2005]. Każda próbka cDNA była analizowana trzykrotnie w termocyklerze Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). Mieszaninę reakcyjną o objętości 25 µl przygotowano z wykorzystaniem zestawu odczynników DyNAmo HS Sybr Green qPCR Kit (FINNZYMES) (Tabela 6.15). Do reakcji wykorzystano startery pozwalające na amplifikację fragmentu cDNA o danej długości przy danej temperaturze wiązania starterów: DnmtF, DnmtR (300

pz, 62°C), Gli123F, Gli123R (189 pz, 59°C), tGLIF, tGLIR (198 pz, 57°C), CryF, CryR (184 pz, 60°C), HprtF, HprtR (155 pz, 60°C), ActbF, ActbR (168 pz, 60°C), GfpF, GfpR (120 pz, 60°C) (Tab. 6.16).

Krzywe standardowe uzyskano poprzez amplifikację serii pięciu rozcieńczeń cDNA (x1, x5, x25, x125, x625). Jakość uzyskanych produktów PCR sprawdzano poprzez analizę krzywych topnienia. W razie nieregularnego przebiegu krzywych przeprowadzano dodatkową analizę jakościową w żelu agarozowym.

Tab. 6.15. Skład mieszaniny do reakcji qPCR w c	objętości	$25 \ \mu l.$
-------------------------------------------------	-----------	---------------

Składniki	Ilość	
MasterMix 2x	1x	
ROX reference dye	0.3x	
starter1	0.3 μΜ	
starter2	0.3 μΜ	
matryca cDNA	2 µl	
woda	do 25 µl	

Tab. 6.16. Warunki prowadzonych reakcji qPCR.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	
Wiązanie starterów	57-62°C	30 s	40-50
Synteza	72°C	30 s	
Oznaczanie krzywej	95°C	1 min	1
topnienia	55°C	30 s	
	55-95°C	(0.1°C/s)	
	95°C	30 s	

# 6.7.9. Analiza RPA

Zaprojektowano sondy o sekwencji antysensowej (komplementarnej) oraz sensowej (kontrolną) o długości 138 nt obejmującej miejsce transestryfikacji (T1 GFP). Matrycę do syntezy sondy uzyskano metodą PCR wykorzystując startery posiadające sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7. Następnie wykonano reakcję transkrypcji *in vitro*, a

produkty poddano działaniu DNAzy I i oczyszczaniu. Sondy znakowano radioizotopowo przy końcu 5'.

W celu wykonania analizy RPA przygotowywano mieszaniny reakcyjne (Tab. 6.17, 6.18) wykorzystując zestaw odczynników RPA III Kit (Ambion) według zaleceń podanych przez producenta. Mieszaninę wytrącano w -20°C przez 16 godzin. Następnie próby wirowano 15 min przy 13.2 tys. rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu, osad suszono na powietrzu przez 10 min. Dodawano 10 µl załączonego buforu do hybrydyzacji i inkubowano w 90-95°C przez 3-4 min i następnie 16 godzin w 42°C. W kolejnym etapie dodawano 150 µl mieszaniny buforu oraz rybonukleaz A/T1, natomiast do prób RNA<sup>Y</sup> (RNAza-) jedynie samego buforu. Próby inkubowano 30 min w 37°C, dodawano 225 µl inhibitora RNAz i wytrącano przez 16 godzin w -20°C. Następnie próby wirowano 15 min przy 13.2 tys rpm w 4°C, osad suszono i rozpuszczano w Gel Loading Buffer II, inkubowano 3 min w 90-95°C i nakładano na 10% żel poliakrylamidowy z 7M mocznikiem. Próby RNA<sup>Y</sup> zawierały RNA z drożdży (RPA III Kit Ambion).

Tab. 6.17. Skład mieszanin reakcyjnych do reakcji RPA z sondą o sekwencji typu sens (kontrola negatytwna).

Składniki	Komórki kontrolne	Komórki HHgfp-5	RNAY	RNAY	sens-antysens
	(całkowity RNA)	(całkowity RNA)	(RNAza+)	(Rnaza-)	
RNA	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg	-
sonda sens	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm
sonda antysens	-	-	-	-	0.1 µg
woda	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl
octan amonu 5 M	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 μl
etanol 96 %	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl

Tab. 6.18. Skład mieszanin reakcyjnych do reakcji RPA z sondą o sekwencji typu antysens.

Składniki	Komórki kontrolne	Komórki HHgfp-5	RNAY	RNAY	sens-
	(całkowity RNA)	(całkowity RNA)	(RNAza+)	(Rnaza-)	antysens
RNA	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg	-
sonda sens	-	-	-	-	0.2 µg
sonda antysens	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm	200 000 cpm
woda	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl	do 80 µl
octan amonu 5 M	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
etanol 96 %	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl

## 6.8. Izolacja plazmidu pEGFP-N3 w dużej skali

Zawiesinę bakteryjną zawierającą bakterie *E.coli* DH5 $\alpha$  z plazmidem pEGFP-N3 otrzymano dzięki uprzejmości pani dr Agnieszki Fedoruk-Wyszomirskiej (Rozdz. 6.1.3). Zawiesinę przenoszono do płynnej pożywki LB (10 ml) z kanamycyną (30 µg/ml pożywki) i hodowano przez noc w 37°C przy wytrząsaniu około 200-250 rpm. Inokulowano dwie kolby płynnej pożywki LB (100 ml) z kanamycyną (30 µg/ml pożywki) 1 ml nocnej hodowli. Hodowle bakterii prowadzono do momentu osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> = 1.5. Hodowle łączono i wirowano 20 minut w 4°C przy 4000 rpm. Izolację plazmidu przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu odczynników Perfectprep Plasmid Midi (Eppendorf) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Objętość początkowa zawiesiny bakteryjnej wynosiła 200 ml. Pomiaru stężenia uzyskanych roztworów DNA dokonywano spektrofotrycznie przy długości fali 260 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000. Wydajność izolacji wynosiła około 150-200 µg plazmidowego DNA. DNA przechowywano w -20°C.

## 6.9. Transkrypcja in vitro

Syntezę sond o sekwencji sensowej oraz antysensowej do analizy RPA (Rozdz. 6.7.9) przeprowadzono na matrycach cDNA produktów reakcji PCR z zestawami starterów aT138F, aT138R oraz sT138F, sT138R z wykorzystaniem zestawów odczynników MEGAscript<sup>®</sup> High Yield Transcription Kit T7 (Ambion) w objętości 20 µl zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Mieszaniny reakcyjne zawierały każdy z oligonukleotydów (ATP, CTP, GTP, UTP) w stężeniach końcowych 7.5 mM, 10x bufor reakcyjny, 1 µg cDNA oraz polimerazę T7 (2 µl Enzyme Mix z zestawu). Całość inkubowano przez 16 godzin w 37°C. Produkty transkrypcji oczyszczano z wykorzystaniem zestawu odczynników NucAway Spin Columns (Ambion) i poddawano działaniu DNazy I z wykorzystaniem zestawu odczynników DNA Free (Ambion) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Następnie uzyskane sondy znakowano radioaktywnie przy końcu 5′.

# 6.10. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA przy pomocy metod bioinformatycznych

Analizę struktury drugorzędowej rybozymów w kompleksie z substratami oraz substratów przeprowadzono przy pomocy programu RNAfold web server (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgibin/RNAfold.cgi) z wykorzystaniem standardowych parametrów wykorzystywanych do przewidywania struktur o najniższej wartości energii swobodnej (tzw. model Turnera) [Mathews i in. 1999].

## 6.11. Modelowanie struktur trzeciorzędowych rybozymów w kompleksie z substratami

Modele uzyskano wykorzystując program RNAComposer [Popenda i in. 2012]. Funkcjonuje on w oparciu o bazę danych RNA FRABASE v. 2.0 [Popenda i in. 2010]. Tworzenie modeli rozpoczynało się od wirtualnego łączenia 5' końca nici substratu z 3' końcem nici rybozymu sekwencją GGG, co umożliwiało zbudowanie modelu rybozymu in cis typu I, co było niezbedne do modelowania kompleksu rybozymu z substratem. Do przewidywania struktury drugorzędowej wykorzystano program RNAfold. Sekwencję centrum katalitycznego zamiano na serię NNNNNN (CUGAUGA) oraz NNN (GAA), aby nie zaburzać formowania struktury w oparciu o MFE. Uzyskany wynik zapisany w postaci kropek i nawiasów (ang. dot-bracket) był wzbogacany o utworzenie pary zasad C3-G5 centrum katalitycznego, charakterystycznej dla aktywnej konformacji rybozymu. Modelowanie struktury trzeciorzędowej prowadzono w programie RNAComposer. Dla każdej struktury drugorzędowej konstruowano 10 modeli, z których 5 o najniższych wartościach energii siłowej pola CHARMM wybierano do dalszych obliczeń. Dla każdego rybozymu określano unikalny zestaw parametrów, stanowiący tzw. "odcisk palca" rybozymu. Z wykorzystaniem programu PyMol (DeLano Scientific LLC) obliczano trzy odległości pomiędzy zdefiniowanymi atomami centrum katalitycznego: G12(N1)-C17(2'O) [D1], G8(2'O)-C1.1(5'O) [D2], G5(N1)- C1.1(5'O) [D3] oraz odchylenie ułożenia atomów od układu liniowego w trzech przypadkach: C1.1(5'O)-C17(2'O)-P  $[\alpha]$ , C17(2'O)-G12(N1)-P  $[\beta]$ , C1.1(5'O)-G8(2'O)-P  $[\gamma]$ , gdzie P oznacza fosforan w miejscu transestryfikacji. Siódmy parametr stanowiła odległość pomiędzy najbliżej położonymi atomami regionów TSM oraz H2.

## 6.12. Analiza statystyczna danych

W celu określenia istotności statystycznej danych uzyskanych w eksperymentach *in vitro*, *ex vivo* oraz *in silico* przeprowadzono analizę statystyczną z wykorzystaniem programu GraphPad Prism. Istotność statystyczną przy p>0.05 obliczano z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa, który porównuje rozkłady zmiennych w populacjach [Kruskal i Wallis 1952].

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Ausländer S, Ketzer P, Hartig JS (2010) A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. Mol BioSyst 6: 807-814
- Ausubel FM, Brent RE, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Eds. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York, Vol. 1, pp. 4.7.1.-4.7.6.
- Bailor MH, Sun X, Al-Hashimi HM (2010) Topology links RNA secondary structure with global conformation, dynamics, and adaptation. Science 327: 202-206
- Balny C, Masson P, Heremans K (2002) High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. Biochim Biophys Acta 1595: 3-10
- Baum DA, Silverman SK (2008) Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. Cell Mol Life Sci 65: 2156-2174
- Behrouzi R, Roh JH, Kilburn D, Briber RM, Woodson SA (2012) Cooperative tertiary interaction network guides RNA folding. Cell 149: 348-357
- Benz-Moy TL, Herschlag D (2011) Structure-function analysis from the outside in: long-range tertiary contacts in RNA exhibit distinct catalytic roles. Biochemistry 50: 8733-8755
- Bertrand EL, Rossi JJ (1994) Facilitation of hammerhead ribozyme catalysis by the nucleocapsid protein of HIV-1 and the heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1. EMBO J 13: 2904-2912
- Bhaskaran H, Russell R (2007) Kinetic redistribution of native and misfolded RNAs by a DEAD-box chaperone. Nature 449: 1014-1018
- Bhat R, Steinman L (2009) Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. Neuron 64: 123-132
- Bindewald E, Kluth T, Shapiro BA (2010) CyloFold: secondary structure prediction including pseudoknots. Nucleic Acids Res 38 (Web Server issue): W368-372
- Boots JL, Canny MD, Azimi E, Pardi A (2008) Metal ion specificities for folding and cleavage activity in the Schistosoma hammerhead ribozyme. RNA 14: 2212-2222
- Bora RS, Gupta D, Mukkur TK, Saini KS (2012) RNA interference therapeutics for cancer: Challenges and opportunities. Mol Med Report 6: 9-15
- Branch AD, Robertson HD (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. Science 223: 450-455
- Breaker RR (2000) Making catalytic DNAs. Science 290: 2095-2096
- Breaker RR, Emilsson GM, Lazarev D, Nakamura S, Puskarz IJ, Roth A, Sudarsan N (2003) A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. RNA 9: 949-957
- Breaker RR, Joyce GF (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. Chem Biol 1: 223-229

- Brown RS, Hingerty BE, Dewan JC, Klug A (1983) Pb(II)-catalysed cleavage of the sugar-phosphate backbone of yeast tRNAPhe--implications for lead toxicity and self-splicing RNA. Nature 303: 543-546
- Bruening G (1989) Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. Methods Enzymol 180: 546-558
- Burd JF, Larson JE, Wells RD (1975) Further studies on telestability in DNA. The synthesis and characterization of the duplex block polymers d(C20A10) - d(T10G20) and d(C20A15) d(T15G20). J Biol Chem 250: 6002-6007
- Burke DH, Greathouse ST (2005) Low-magnesium, trans-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. BMC Biochem 6: 14
- Buskiewicz IA, Burke JM (2012) Folding of the hammerhead ribozyme: Pyrrolo-cytosine fluorescence separates core folding from global folding and reveals a pH-dependent conformational change. RNA 18: 434-448
- Butcher SE, Dieckmann T, Feigon J (1997) Solution structure of a GAAA tetraloop receptor RNA. EMBO J 16: 7490-7499
- Butcher SE, Pyle AM (2011) The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks. Acc Chem Res 44: 1302-1311
- Cao X, Geradts J, Dewhirst MW, Lo HW (2012) Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. Oncogene 31: 104-115
- Caprara MG, Lehnert V, Lambowitz AM, Westhof E (1996) A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core. Cell 87: 1135-1145
- Carbonell A, Flores R, Gago S (2011) Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA. Nucleic Acids Res 39: 2432-2444
- Cate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou K, Golden BL, Kundrot CE, Cech TR, Doudna JA (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. Science 273: 1678-1685
- Cech P, Svozil D, Hoksza D (2012) SETTER: web server for RNA structure comparison. Nucleic Acids Res 40 (Web Server issue): W42-48
- Chandra M, Silverman SK (2008) DNA and RNA can be equally efficient catalysts for carbon-carbon bond formation. J Am Chem Soc 130: 2936-2937
- Chen SJ (2008) RNA folding: conformational statistics, folding kinetics and ion electrostatics. Annu Rev Biophys 37: 197-214
- Chen X, Denison L, Levy M, Ellington AD (2009) Direct selection for ribozyme cleavage activity in cells. RNA 15: 2035-2045

- Cherneva R, Petrov D, Georgiev O, Slavova Y, Toncheva D, Stamenova M, Trifonova N (2010) Expression profile of the small heat-shock protein alpha-B-crystallin in operated-on nonsmall-cell lung cancer patients: clinical implication. Eur J Cardiothorac Surg 37: 44-50
- Chevalier C, Geissmann T, Helfer AC, Romby P (2009) Probing mRNA structure and sRNA-mRNA interactions in bacteria using enzymes and lead(II). Methods Mol Biol 540: 215-232
- Chi Y, Martick M, Lares M, Kim R, Scott WG, Kim S (2008) Capturing hammerhead ribozyme structures in action by modulating general base catalysis. PLoS Biol 6: 2060-2068
- Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. Trends Biotechnol 23: 605-613
- Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Physiol Rev (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol Rev 90: 1103-1163
- Cochrane JC, Strobel SA (2004) Probing RNA structure and function by nucleotide analog interference mapping. Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 6:Unit 6.9.
- Conaty J, Hendry P, Lockett T (1999) Selected classes of minimised hammerhead ribozyme have very high cleavage rates at low Mg<sup>2+</sup> concentration. Nucleic Acids Res 27: 2400-2407
- Costa M, Michel F (1995) Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. EMBO J 14: 1276-1285
- Crissel P, Thompson S, James W (1993) Inhibition of HIV-1 replication by ribozymes that show poor activity in vitro. Nucleic Acids Res 21: 5251-5255
- Curtis EA, Bartel DP (2001) The hammerhead cleavage reaction in monovalent cations. RNA 7: 546-552
- Das R, Baker D (2007) Automated de novo prediction of native-like RNA tertiary structures. Proc Natl Acad Sci USA 104: 14664-14669
- Davis JH, Foster TR, Tonelli M, Butcher SE (2007) Role of metal ions in the tetraloop-receptor complex as analyzed by NMR. RNA 13: 76-86
- Davis JH, Tonelli M, Scott LG, Jaeger L, Williamson JR, Butcher SE (2005) RNA helical packing in solution: NMR structure of a 30 kDa GAAA tetraloop-receptor complex. J Mol Biol 351: 371-382
- De la Pena M, Dufour D, Gallego J (2009) Three-way RNA junctions with remote tertiary contacts: a recurrent and highly versatile fold. RNA 15: 1949-1964
- De la Pena M, Garcia-Robles I (2010) Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. RNA 16: 1943-1950
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. EMBO Rep 12: 647-656
- DeRose VJ (2003) Metal ion binding to catalytic RNA molecules. Curr Opin Struct Biol 13: 317-324
- Dias N, Stein CA (2002) Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. Mol Cancer Ther 1: 347-355

- Digweed M, Pieler T, Erdmann VA (1986) RNA sequencing, Advance methods in protein microsequence analysis. Springer-Verlag Heidelberg.
- Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, Olsson AK, Schiller P, Wikner C, Bohman S, Botling J, Lukinius
  A, Wawrousek EF, Claesson-Welsh L (2008) alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis
  by increasing vascular survival during tube morphogenesis. Blood 111: 2015-2023
- Ding F, Lavender CA, Weeks KM, Dokholyan NV (2012) Three-dimensional RNA structure refinement by hydroxyl radical probing. Nat Methods 9: 603-608
- Ding Y, Chan CY, Lawrence CE (2004) Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. Nucleic Acids Res 32(Web Server issue): W135-141
- Ditzler MA, Rueda D, Mo J, Håkansson K, Walter NG (2008) A rugged free energy landscape separates multiple functional RNA folds throughout denaturation. Nucleic Acids Res 36: 7088-7099
- Do CB, Woods DA, Batzoglou S (2006) CONTRAfold: RNA secondary structure prediction without physics-based models. Bioinformatics 22: e90-98
- Doherty EA, Doudna JA (2001) Ribozyme structures and mechanisms. Annu Rev Biophys Biomol Struct 30: 457-475
- Doudna JA, Cech TR (2002) The chemical repertoire of natural ribozymes. Nature 418: 222-228
- Draper DE, Grilley D, Soto AM (2005) Ions and RNA folding. Annu Rev Biophys Biomol Struct 34: 221-243
- Dufour D, de la Pena M, Gago S, Flore R, Gallego J (2009) Structure-function analysis of the ribozymes of chrysanthemum chlorotic mottle viroid: a loop-loop interaction motif conserved in most natural hammerheads. Nucleic Acids Res 37: 368-381
- Dunning H (2012) Toying with RNA. The Scientist, http://the-scientist.com/2012/06/26/toying-withrna/
- Dutkiewicz M, Grunert HP, Zeichhardt H, Lena SW, Wengel J, Kurreck J (2008) Design of LNAmodified siRNAs against the highly structured 5' UTR of coxsackievirus B3. FEBS Lett 582: 3061-3066
- Eckstein F, Kore AR, Nakamaye KL (2001) In vitro selection of hammerhead ribozyme sequence variants. Chembiochem 2: 629-635
- Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, Aquilina JA, Benesch JL, Robinson CV, Macphee CE, Carver JA (2007) Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin affects its chaperone activity. Biochem J 401: 129-141
- Ehresmann C, Baudin F, Mougel M, Romby P, Ebel JP, Ehresmann B (1987) Probing the structure of RNAs in solution. Nucleic Acids Res 15: 9109-91028
- Elcock AH (2010) Models of macromolecular crowding effects and the need for quantitative comparisons with experiment. Curr Opin Struct Biol 20: 196-206

- Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. Trends Biochem Sci 26: 597-604
- Emilsson GM, Nakamura S, Roth A, Breaker RR (2003) Ribozyme speed limits. RNA 9: 907-918
- Farrell RE (2005) RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. Elsevier Academic Press, London.
- Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. J Neurol Sci [publikacja w formie elektronicznej przed drukiem]
- Fedor MJ, Uhlenbeck OC (1990) Substrate sequence effects on hammerhead RNA catalytic efficiency. Proc Nat Acad Sci USA 87: 1668-1672
- Fedorova O, Solem A, Pyle AM (2010) Protein-facilitated folding of group II intron ribozymes. J Mol Biol 397: 799-813
- Fedoruk-Wyszomirska A, Giel-Pietraszuk M, Wyszko E, Szymański M, Ciesiołka J, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2009A) The mechanism of acidic hydrolysis of esters explains the HDV ribozyme activity. Mol Biol Rep 36: 1647-1650
- Fedoruk-Wyszomirska A, Szymański M, Wyszko E, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2009B) Highly active low magnesium hammerhead ribozyme. J Biochem 145: 451-459
- Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E, Giel-Pietraszuk M, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2007) High hydrostatic pressure approach proves RNA catalytic activity without magnesium. Int J Biol Macromol 41: 30-35
- Ferré-D'Amaré AR, Scott WG (2010) Small self-cleaving ribozymes. Cold Spring Harb Perspect Biol 2: a003574
- Fiaschi M, Rozell B, Bergström A, Toftgård R (2009) Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1. Cancer Res 69: 4810-4817
- Fiore JL, Kraemer B, Koberling F, Edmann R, Nesbitt DJ (2009) Enthalpy-driven RNA folding: single-molecule thermodynamics of tetraloop-receptor tertiary interaction. Biochemistry 48: 2550-2558
- Frątczak A, Kierzek R, Kierzek E (2011) Isoenergetic microarrays to study the structure and interactions of DsrA and OxyS RNAs in two- and three-component complexes. Biochemistry 50: 7647-7665
- Freischmidt A, Liss M, Wagner R, Kalbitzer HR, Horn G (2012) RNA secondary structure and in vitro translation efficiency. Protein Expr Purif 82: 26-31
- Frellsen J, Moltke I, Thiim M, Mardia KV, Ferkinghoff-Borg J, Hamelryck T (2009) A probabilistic model of RNA conformational space. PLoS Comput Biol 5:e1000406
- Gabryelska M, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2005) Uniwersalna metoda inhibicji ekspresji genów interferencja RNA. Na pograniczu chemii i biologii Tom XII: 235-267
- Gabryelska M, Wyszko E, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2007) Rola czynnika transkrypcyjnego Gli1 w ontogenezie i nowotworzeniu. Na pograniczu chemii i biologii Tom XVII, 49-75

- Gabryelska M, Wyszko E, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2006) Zastosowanie technologii interferencji RNA w medycynie. Neuroskop 8: 143-159
- Gabryelska MM, Szymański M, Wyszko E, Popenda P, Barciszewski J (2012) Prediction of hammerhead ribozyme intracellular activity with the catalytic core parameters fingerprint. Manuskrypt wysłany, czerwiec 2012
- Geary C, Chworos A, Jaeger L (2010) Promoting RNA helical stacking via A-minor junctions. Nucleic Acids Res 39: 1066-1080
- Ghosh JG, Shenoy AK Jr, Clark JI (2007) Interactions between important regulatory proteins and human alphaB crystallin. Biochemistry 46: 6308-6317
- Giegé R, Jühling F, Pütz J, Stadler P, Sauter C, Florentz C (2011) Structure of transfer RNAs: similarity and variability. Wiley Interdiscip Rev RNA 3: 37-61
- Giel-Pietraszuk M, Fedoruk-Wyszomirska A, Barciszewski J (2010) Effect of high hydrostatic pressure on hydratation and activity of ribozymes. Mol Biol Rep 37: 3713-3719
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu Rev Biochem 74: 481-514
- Goodarzi H, Najafabadi HS, Oikonomou P, Greco TM, Fish L, Salavati R, Cristea IM, Tavazoie S (2012) Systematic discovery of structural elements governing stability of mammalian messenger RNAs. Nature 485: 264-268
- Graw J (2009) Genetics of crystallins: cataract and beyond. Exp Eye Res 88: 173-189
- Hajiaghayi M, Condon A, Hoos HH (2012) Analysis of energy-based algorithms for RNA secondary structure prediction. BMC Bioinformatics 13: 22
- Hamada M, Sato K, Kiryu H, Mituyama T, Asai K (2009) Predictions of RNA secondary structure by combining homologous sequence information. Bioinformatics 25: i330-338
- Hammann C, Lilley DM (2002) Folding and activity of the hammerhead ribozyme. Chembiochem 3: 690-700
- Han J, Burke JM (2005) Model for general acid-base catalysis by the hammerhead ribozyme: pH activity relationships of G8 and G12 variants at the putative active site. Biochemistry 44: 7864–7870
- Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S (2007) DNA methylation regulates MicroRNA expression. Cancer Biol Ther 6: 1284-1288
- Harris ME, Christian EL (2003) Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. Curr Opin Struct Biol 13: 325-333
- Hayes RL, Noel JK, Mohanty U, Whitford PC, Hennelly SP, Onuchic JN, Sanbonmatsu KY (2012) Magnesium fluctuations modulate RNA dynamics in the SAM-I riboswitch. J Am Chem Soc 134: 12043-12053
- Heidenreich O, Benseler F, Fahrenholz A, Eckstein F (1994) High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates.J Biol Chem 269: 2131-2138

Hermann T, Patel DJ (2000) RNA bulges as architectural and recognition motifs. Structure 8: R47-54

- Hermann T, Westhof E (1998) Exploration of metal ion binding sites in RNA folds by Browniandynamics simulations. Structure 6: 1303-1314
- Herschlag D (1995) RNA chaperons and the RNA foldin problem. J Biol Chem 270: 20871-20874
- Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z, Karpel RL (1994) An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. EMBO J 13: 2913-2924
- Hertel KJ, Herschlag D, Uhlenbeck OC (1994) A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. Biochemistry 33: 3374-3385
- Hertel KJ, Herschlag D, Uhlenbeck OC (1996) Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. EMBO J 15: 3751-3757
- Höbartner C, Silverman SK (2007) Recent advances in DNA catalysis. Biopolymers 87: 279-292
- Hodak JH, Downey CD, Fiore JL, Pardi A, Nesbitt DJ (2005) Docking kinetics and equilibrium of a GAAA tetraloop-receptor motif probed by single-molecule FRET. Proc Natl Acad Sci USA 102: 10505-10510
- Hofacker IL (2004) RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package. Curr Protoc Bioinformatics Chapter 12: Unit 12.2.
- Hopkins JF, Panja S, McNeil SA, Woodson SA (2009) Effect of salt and RNA structure on annealing and strand displacement by Hfq. Nucleic Acids Res 37: 6205-6213
- Horiya S, Li X, Kawai G, Saito R, Katoh A, Kobayashi K, Harada K (2003) RNA LEGO: magnesiumdependent formation of specific RNA assemblies through kissing interactions. Chem Biol 10: 645-654
- Houck SA, Clark JI (2010) Dynamic subunit exchange and the regulation of microtubule assembly by the stress response protein human alphaB crystallin. PLoS One 5: e11795
- Hung MC, Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. J Cell Sci 124: 3381-3392
- Ivanov O, Chen F, Wiley EL, Keswani A, Diaz LK, Memmel HC, Rademaker A, Gradishar WJ, Morrow M, Khan SA, Cryns VL (2008) alphaB-crystallin is a novel predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 111: 411-417
- Ivanyi-Nagy R, Lavergne JP, Gabus C, Ficheux D, Darlix JL (2008) RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. Nucleic Acids Res 36: 712-725
- Jehle S, Rajagopal P, Bardiaux B, Markovic S, Kühne R, Stout JR, Higman VA, Klevit RE, van Rossum BJ, Oschkinat H (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. Nat Struct Mol Biol 17: 1037-1042
- Jimenez RM, Delwart E, Luptak A (2011) Structure-based search reveals hammerhead ribozymes in the human microbiome. J Biol Chem 286: 7737-7743
- Jonikas MA, Radmer RJ, Altman RB (2009) Knowledge-based instantiation of full atomic detail into coarse-grain RNA 3D structural models. Bioinformatics 25: 3259-3266

- Julien KR, Sumita M, Chen PH, Laird-Offringa IA, Hoogstraten CG (2008) Conformationally restricted nucleotides as a probe of structure-function relationships in RNA. RNA 14: 1632-1643
- Kang KN, Lee YS (2012) RNA Aptamers: A Review of Recent Trends and Applications. Adv Biochem Eng Biotechnol [publikacja w formie elektronicznej przed drukiem]
- Karpel RL, Swistel DG, Miller NS, Geroch ME, Lu C, Fresco JR (1975) Acceleration of RNA renaturation by nucleic acid unwinding proteins. Brookhaven Symp Biol 26: 165-174
- Kato Y, Kuwabara T, Warashina M, Toda H, Taira K (2001) Relationsfips between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. J Biol Chem 276: 15378-15385
- Khvorova A, Lescoute A, Westhof E, Jayasena SD (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. Nat Struct Biol 10: 708-712
- Kida E, Wierzba-Bobrowicz T, Palminiello S, Kaur K, Jarzabek K, Walus M, Albertini G, Golabek AA (2010) Molecular chaperone alphaB-crystallin is expressed in the human fetal telencephalon at midgestation by a subset of progenitor cells. J Neuropathol Exp Neurol 69: 745-759
- Kilburn D, Roh JH, Guo L, Briber RM, Woodson SA (2010) Molecular crowding stabilizes folded RNA structure by the excluded volume effect. J Am Chem Soc 132: 8690-8696
- Kim NK, Bowman MK, DeRose VJ (2010) Precise mapping of RNA tertiary structure via nanometer distance measurements with double electron-electron resonance spectroscopy. J Am Chem Soc 132: 8882-8884
- Kim NK, Murali A, DeRose VJ (2005) Separate metal requirements for loop interactions and catalysis in the extended hammerhead ribozyme. J Am Chem Soc 127: 14134-14135
- Kim US, Fujimoto BS, Furlong CE, Sundstrom JA, Humbert R, Teller DC, Schurr JM (1993) Dynamics and structures of DNA: long-range effects of a 16 base-pair (CG)8 sequence on secondary structure. Biopolymers 33: 1725-1745
- Kim Y, Cairns MJ, Marouga R, Sun L (2003) E6AP gene suppression and characterization with in vitro selected hammerhead ribozymes. Cancer Gene Ther 10: 707-716
- Kinjo AR, Takada S (2003) Competition between protein folding and aggregation with molecular chaperones in crowded solutions: insight from mesoscopic simulations. Biophys J 85: 3521-3531
- Klemenz R, Scheier B, Müller A, Steiger R, Aoyama A (1994) Alpha B crystallin expression in response to hormone, oncogenes and stress. Verh Dtsch Ges Pathol 78: 34-35
- Kore AR, Vaish NK, Kutzke U, Eckstein F (1998) Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. Nucleic Acids Res 26: 1116-1120

- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. Cell 31: 147-157
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. J Am Statist Assoc 47: 583–621
- Krzyżosiak WJ, Marciniec T, Wiewiórowski M, Romby P, Ebel JP, Giegé R (1988) Characterization of the lead(II)-induced cleavages in tRNAs in solution and effect of the Y-base removal in yeast tRNAPhe. Biochemistry 27: 5771-5777
- Kuciak M, Gabus C, Ivanyi-Nagy R, Semrad K, Storchak R, Chaloin O, Muller S, Mély Y, Darlix JL (2008) The HIV-1 transcriptional activator Tat has potent nucleic acid chaperoning activities in vitro. Nucleic Acids Res 36: 3389-3400
- Kumar P, Sood V, Vyas R, Gupta N, Banerjea AC, Khanna M (2010) Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozyme constructs. Antiviral Res 87: 204-212
- Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA (2002) Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. J Biol Chem 277: 7099-7107
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Laing C, Schlick T (2011) Computational approaches to RNA structure prediction, analysis, and design. Curr Opin Struct Biol 21: 306-318
- Laing C, Wen D, Wang JT, Schlick T (2012) Predicting coaxial helical stacking in RNA junctions. Nucleic Acids Res 40: 487-498
- Leclerc F (2010) Hammerhead ribozyme: true metal or nucleobase catalysis? Where is the catalytic power from? Molecules 15: 5389-5407
- Lee T, York DM (2010) Computational mutagenesis studies of hammerhead ribozyme catalysis. J Am Chem Soc 132: 13505-13518
- Lee TS, Giambaşu G, Harris ME, York DM (2011) Characterization of the Structure and Dynamics of the HDV Ribozyme at Different Stages Along the Reaction Path. J Phys Chem Lett 2: 2538-2543
- Leontis NB, Lescoute A, Westhof E (2006) The building blocks and motifs of RNA architecture. Curr Opin Struct Biol 16: 279-287
- Leontis NB, Stombaugh J, Westhof E (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. Nucleic Acids Res 30: 3497-3531
- Leontis NB, Westhof E (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. RNA 7: 499-512
- Lescoute A, Westhof E (2006) The interaction networks of structured RNAs. Nucleic Acids Res 34, 6587-6604.

Lescoute A, Westhof E (2006) Topology of three-way junctions in folded RNAs. RNA 12: 83-93

- Leung EK, Sen D (2010) The use of charge flow and quenching (CFQ) to probe nucleic acid folds and folding. Methods 52: 141-149
- Li X, Kuang E, Dai W, Zhou B, Yang F (2005) Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by hammerhead ribozymes delivered by hepatitis delta virus. Virus Res 114: 126-132
- Liang JC, Smolke CD (2012) Rational design and tuning of ribozyme-based devices. Methods Mol Biol 848: 439-544
- Liebeg A, Waldsich C (2009) Probing RNA structure within living cells. Methods Enzymol 468: 219-238
- Lin DI, Barbash O, Kumar KG, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJ, Rustgi A, Fuchs SY, Diehl JA (2006) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. Mol Cell 24: 355-366
- Lindell M, Brännvall M, Wagner EG, Kirsebom LA (2005) Lead (II) cleavage analysis of RNase P RNA in vivo. RNA 11: 1348-1354
- Liu S, Li J, Tao Y, Xiao X (2007) Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 354: 109-114
- Lo HW, Zhu H, Cao X, Aldrich A, Ali-Osman F (2009) A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. Cancer Res 69: 6790-6798
- Lucier JF, Bergeron LJ, Brière FP, Ouellette R, Elela SA, Perreault JP (2006) RiboSubstrates: a web application addressing the cleavage specificities of ribozymes in designated genomes. BMC Bioinformatics 7: 480
- Łomnicki A (2010) Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa: 220-227
- Łuczak MW, Jagodziński PP (2006) The role of DNA methylation in cancer development. Folia Histochem Cytobiol 44: 143-154
- Madore E, Florentz C, Giegé R, Lapointe J (1999) Magnesium-dependent alternative foldings of active and inactive Escherichia coli tRNA(Glu) revealed by chemical probing. Nucleic Acids Res 27: 3583-3588
- Markham NR, Zuker M (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. Methods Mol Biol 453: 3-31
- Martick M, Horan LH, Noller HF, Scott WG (2008) A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. Nature 454: 899-902
- Martick M, Scott WG (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. Cell 126: 309-320
- Masquida B, Beckert B, Jossinet F (2010) Exploring RNA structure by integrative molecular modelling. N Biotechnol 27: 170-183

- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. J Mol Biol 288: 911-940
- Mathews DH, Turner DH (2006) Prediction of RNA secondary structure by free energy minimization. Curr Opin Struct Biol 16: 270-278
- Mathews DH (2006) Revolutions in RNA secondary structure prediction. J Mol Biol 359: 526-532
- McDowell SE, Jun JM, Walter NG (2010) Long-tertiary interactions in single hammerhead ribozymes bias motional sampling toward catalytically active conformations. RNA 16: 2414-2426
- McGinnis JL, Dunkle JA, Cate JH, Weeks KM (2012) The mechanisms of RNA SHAPE chemistry. J Am Chem Soc 134: 6617-6624
- Mercatanti A, Rainaldi G, Mariani L, Marangoni R, Citti L (2002) A method for prediction of accessible sites on an mRNA sequence for target selection of hammerhead ribozymes. J Comput Biol 9: 641-653
- Merino EJ, Wilkinson KA, Coughlan JL, Weeks KM (2005) RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). J Am Chem Soc 127: 4223-4231
- Mironov A, Epshtein V, Nudler E (2009) Transcriptional approaches to riboswitch studies. Methods Mol Biol 540: 39-51
- Moghaddam S, Caliskan G, Chauhan S, Hyeon C, Briber RM, Thirumalai D, Woodson SA (2009) Metal ion dependence of cooperative collapse transitions in RNA. J Mol Biol 393: 753-764
- Montange RK, Batey RT (2008) Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. Annu Rev Biophys 37: 117-133
- Mortimer SA, Weeks KM (2009) C2'-endo nucleotides as molecular timers suggested by the folding of an RNA domain. Proc Natl Acad Sci USA 106: 15622–15627
- Müller-Taubenberger A, Anderson KI (2007) Recent advances using green and red fluorescent protein variants. Appl Microbiol Biotechnol 77: 1-12
- Mulhbacher J, St-Pierre P, Lafontaine DA (2010) Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. Curr Opin Pharmacol 10: 551-556
- Murray JB, Seyhan AA, Walter NG, Burke JM, Scott WG (1998) The hammerhead, hairpin and vs. ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. Chem Biol 5: 587–595
- Nakano S, Karimata HT, Kitagawa Y, Sugimoto N (2009) Facilitation of RNA enzyme activity in the molecular crowding media of cosolutes. J Am Chem Soc 131: 16881-16888
- Nasalean L, Baudrey S, Leontis NB, Jaeger L (2006) Controlling RNA self-assembly to form filaments. Nucleic Acids Res 34: 1381-1392
- Nazari R, Ma XZ, Joshi S (2008) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 entry using vectors expressing a multimeric hammerhead ribozyme targeting the CCR5 mRNA. J Gen Virol 89: 2252-2261

- Nelson JA, Uhlenbeck OC (2008A) Minimal and extended hammerheads utilize a similar dynamic reaction mechanism for catalysis. RNA 14: 43-54
- Nelson JA, Uhlenbeck OC (2008B) Hammerhead redux: Does the new structure fit the old biochemical data? RNA 14: 605-615
- Nguyen P, Qin PZ (2011) RNA dynamics: perspectives from spin labels. Wiley Interdiscip Rev RNA 3: 62-72
- Nissen P, Ippolito JA, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. Proc Natl Acad Sci USA 98: 4899-4903
- O'Rear JL, Wang S, Feig AL, Beigelman L, Uhlenbeck OC, Herschlag D (2001) Comparison of the hammerhead cleavage reactions stimulated by monovalent and divalent cations. RNA 7: 537-545
- Ostersetzer O, Cooke AM, Watkins KP, Barkan A (2005) CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains. Plant Cell 17: 241-255
- Pakhomov AA, Martynov VI (2008) GFP family: structural insights into spectral tuning. Chem Biol 15: 755-764
- Pan C, Russell R (2010) Roles of DEAD-box proteins in RNA and RNP Folding. RNA Biol 7: 667-676
- Pannone BK, Xue D, Wolin SL (1998) A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. EMBO J 17: 7442-7453
- Parisien M, Major F (2008) The MC-Fold and MC-Sym pipeline infers RNA structure from sequence data. Nature 452: 51-55
- Perham M, Stagg L, Wittung-Stafshede P (2007) Macromolecular crowding increases structural content of folded proteins. FEBS Lett 581: 5065-5069
- Perreault J, Weinberg Z, Roth A, Popescu O, Chartrand P, Ferbeyre G, Breaker RR (2011) Identification of hammerhead ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. PLoS Comp Biol 7: e1002031
- Pley HW, Flaherty KM, McKay DB (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. Nature 372: 68-74
- Popenda M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, Blazewicz J, Adamiak RW (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs. Nucleic Acids Res 40: e112
- Popenda M, Szachniuk M, Blazewicz M, Wasik S, Burke EK, Blazewicz J, Adamiak RW (2010) RNA FRABASE 2.0: an advanced web-accessible database with the capacity to search the threedimensional fragments within RNA structures. BMC Bioinformatics 11: 231
- Przybilski R, Hammann C (2007) The tolerance to exchanges of the Watson-Crick base pair in the hammerhead ribozyme core is determined by surrounding elements. RNA 13: 1625-1630

- Puton T, Kozlowski L, Kalinowski S, Rother K, Tkalinska E, Bujnicki JM. RNA metaserver. Bioinformatics. Manuskrypt wysłany.
- Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Muzumdar D, Goel A, Shiras A (2011) Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. J Neurooncol 104: 483-494
- Rajkowitsch L, Schroeder R (2007) Dissecting RNA chaperone activity. RNA 13: 2053-2060
- Real AN, Greenall RJ (2004) Influence of spermine on DNA conformation in a molecular dynamics trajectory of d(CGCGAATTCGCG)(2): major groove binding by one spermine molecule delays the A-->B transition. J Biomol Struct Dyn 21: 469-488
- Reeder J, Steffen P, Giegerich R (2007) pknotsRG: RNA pseudoknot folding including near-optimal structures and sliding windows. Nucleic Acids Res 35(Web Server issue): W320-324
- Regulski EE, Breaker RR (2008) In-line probing analysis of riboswitches. Methods Mol Biol 419: 53-67
- Reuter JS, Mathews DH (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics 11: 129
- Richardson JS, Schneider B, Murray LW, Kapral GJ, Immormino RM, Headd JJ, Richardson DC, Ham D, Hershkovits E, Williams LD, Keating KS, Pyle AM, Micallef D, Westbrook J, Berman HM, RNA Ontology Consortium (2008) RNA backbone: consensus all-angle conformers and modular string nomenclature (an RNA Ontology Consortium contribution). RNA 14: 465-481
- Rivas E, Eddy SR (1999) A dynamic programming algorithm for RNA structure prediction including pseudoknots. J Mol Biol 285: 2053-2068
- Rivas G, Ferrone F, Herzfeld J (2004) Life in a crowded world. EMBO Rep 5: 23-27
- Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A (2011) β-catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. Cancer Biol Ther 11: 753-761
- Rother M, Rother K, Puton T, Bujnicki JM (2011) RNA tertiary structure prediction with ModeRNA. Brief Bioinform 12: 601-613
- Roychowdhury-Saha M, Roychowdhury S, Burke DH (2011) Conformational heterogeneity and the determinants of tertiary stabilization in the hammerhead ribozyme from Dolichopoda cave crickets. RNA Biol 8: 1-11
- Rueda D, Wick K, McDowell SE, Walter NG (2003) Diffusely bound Mg2+ ions slightly reorient stems I and II of the hammerhead ribozyme to increase the probability of formation of the catalytic core. Biochemistry 42: 9924-9936
- Saffarian A, Giraud M, Touzet H (2012) Searching for alternate RNA structures. In preparation.

- Saksmerprome V, Roychowdhury-Saha M, Jayasena S, Khvorova A, Burke DH (2004) Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. RNA 10: 1916-1924
- Sanbe A (2011) Molecular mechanisms of  $\alpha$ -crystallinopathy and its therapeutic strategy. Biol Pharm Bull 34: 1653-1658
- Santoro SW, Joyce GF (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4262-4266
- Sato K, Hamada M, Asai K, Mituyama T (2009) CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction. Nucleic Acids Res 37(Web Server issue): W277-280
- Sawata S, Shimayama T, Komiyama M, Kumar PK, Nishikawa S, Taira K (1993) Enhancement of the cleavage rates of DNA-armed hammerhead ribozymes by various divalent metal ions. Nucleic Acids Res 21: 5656-5660
- Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. J Mol Med (Berl) 84: 901-910
- Scherer LJ, Rossi JJ (2003) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. Nat Biotechnol 21: 1457-1465
- Scherr M, Grez M, Ganser A, Engels JW (1997) Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-ras mRNA in vitro and ex vivo. J Biol Chem 272: 14304-14313
- Schnabl J, Sigel RKO (2010) Controlling ribozyme activity by metal ions. Curr Op in Chem Biol 14: 269-275
- Schultes EA, Bartel DP (2000) One sequence, two ribozymes: implications for the emergence of new ribozyme folds. Science 289: 448-452
- Schultes EA, Spasic A, Mohanty U, Bartel DP (2005) Compact and ordered collapse of randomly generated RNA sequences. Nat Struct Mol Biol 12: 1130-1136
- Schurr JM, Delrow JJ, Fujimoto BS, Benight AS (1997) The question of long-range allosteric transitions in DNA. Biopolymers 44: 283-308
- Scott WG (2010) What can the new hammerhead ribozyme structures teach us about design? RNA technologies and their applications. Eds: VA Erdmann, J Barciszewski; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 305-323
- Scott WG, Finch JT, Klug A (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. Cell 81: 991-1002
- Scott WG, Martick M, Chi Y (2009) Structure and function of regulatory RNA elements: ribozymes that regulate gene expression. Biochim Biophys Acta 1789: 634-641
- Scott WG, Martick M, Chi YI (2009) Structure and function of regulatory RNA elements: ribozymes that regulate gene expression. Biochim Biophys Acta 1789: 634-641

- Scott WG, Murray JB, Arnold JR, Stoddard BL, Klug A (1996) Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. Science 274: 2065-2069
- Seehafer C, Kalweit A, Steger G, Graf S, Hammann C (2011) From alpaca to zebrafish: hammerhead ribozymes wherever you look. RNA 17: 21-26
- Serikov R, Petyuk V, Vorobijev Y, Koval V, Fedorova O, Vlassov V, Zenkova M (2011) Mechanism of antisense oligonucleotide interaction with natural RNAs. J Biomol Struct Dyn 29: 27-50
- Seward HE, Bagshaw CR (2009) The photochemistry of fluorescent proteins: implications for their biological applications. Chem Soc Rev 38: 2842-2851
- Sharma S, Ding F, Nie H, Watson D, Unnithan A, Lopp J, Pozefsky D, Dokholyan NV (2006) iFold: a platform for interactive folding simulations of proteins. Bioinformatics 22: 2693-2694
- Shelton VM, Sosnick TR, Pan T (2001) Altering the intermediate in the equilibrium folding of unmodified yeast tRNAPhe with monovalent and divalent cations. Biochemistry 40: 3629-3638
- Shepotinovskaya I, Uhlenbeck OC (2010) Enhanced product stability in the hammerhead ribozyme. Biochemistry 49: 4494-4500
- Shimokawa T, Tostar U, Lauth M, Palaniswamy R, Kasper M, Toftgård R, Zaphiropoulos PG (2008) Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal. J Biol Chem 283: 14345-14354
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol 59: 223-239
- Silverman SK (2008) Nucleic acid enzymes (ribozymes and deoxyribozymes): in vitro selection and application. Wiley encyclopedia of chemical biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Silverman SK (2003) Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA. RNA 9: 377-383
- Singh S, Narang AS, Mahato RI (2011) Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. Pharm Res 28, 2996-3015
- Sioud M, Jespersen L (1996) Enhancement of hammerhead ribozyme catalysis by gliceraldehyde-3phosphate dehydrogenase. J Mol Biol 257: 775-789
- Solomatin SV, Greenfeld M, Chu S, Herschlag D (2010) Multiple native states reveal persistent ruggedness of an RNA folding landscape. Nature 463: 681-684
- Soukup GA (2004) Aptamers meet allostery. Chem Biol 11: 1031-1032
- Stage-Zimmermann TK, Uhlenbeck OC (1998) Hammerhead ribozyme kinetics. RNA 4: 875-889
- Steffen P, Voss B, Rehmsmeier M, Reeder J, Giegerich R (2006) RNAshapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. Bioinformatics 22: 500-503

- Stegh AH, Chin L, Louis DN, DePinho RA (2008) What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator. Cell Cycle 7: 2833-2839
- Stein AJ, Fuchs G, Fu C, Wolin SL, Reinisch KM (2005) Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. Cell 121: 529-539
- Steitz TA, Steitz JA (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. Proc Natl Acad Sci USA 90: 6498–6502
- Stello T, Hong M, Musier-Forsyth K (1999) Efficient aminoacylation of tRNA(Lys,3) by human lysyltRNA synthetase is dependent on covalent continuity between the acceptor stem and the anticodon domain. Nucleic Acids Res 27: 4823-4829
- Stobart MJ, Simon SL, Plews M, Lamoureux L, Knox JD (2009) Efficient knockdown of human prnp mRNA expression levels using hybrid hammerhead ribozymes. J Toxicol Environ Health A 72: 1034-1039
- Stobart MJ, Simon SLR, Plews M, Lamoureux L, Konx JD (2009) Efficient knockdown of human prnp mRNA expression levels using hybrid hammerhead ribozymes. J Tox Env Health Part A 72: 1034-1039
- Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. Pharmacol Rev 52: 325-347
- Symons RH (1989) Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. Trends Biochem Sci 14: 445-450
- Tang Q, Liu YF, Zhu XJ, Li YH, Zhu J, Zhang JP, Feng ZQ, Guan XH (2009) Expression and prognostic significance of the alpha B-crystallin gene in human hepatocellular carcinoma. Hum Pathol 40: 300-305
- Thirumalai D, Woodson SA (1996) Kinetics of folding of protein and RNA. Acc Chem Res 29: 433-439
- Thomas JA, Gorelick RJ (2008) Nucleocapsid protein function in early infection processes. Virus Res 134: 39-63
- Thomas JM, Perrin DM (2009) Probing general acid catalysis in the hammerhead ribozyme. J Am Chem Soc 131: 1135–1143
- Thomas ZI, Gibson W, Sexton JZ, Aird KM, Ingram SM, Aldrich A, Lyerly HK, Devi GR, Williams KP (2011) Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration. Br J Cancer 104: 1575-1586
- Tsuchihashi Z, Khosla M, Herschlag D (1993) Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. Science 262: 99-102
- Tuck AC, Tollervey D (2011) RNA in pieces. Trends Genet 27: 422-432
- Turek-Plewa J, Jagodziński PP (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Cell Mol Biol Lett 10: 631-647

- Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery. J Biol Chem 278: 47491-47497
- Uhlenbeck OC (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. Nature 328: 596-600
- Val R, Wyszko E, Valentin C, Szymanski M, Cosset A, Alioua M, Dreher TW, Barciszewski J, Dietrich A (2011) Organelle trafficking of chimeric ribozymes and genetic manipulation of mitochondria. Nucleic Acids Res 39: 9262-9274
- Vander Meulen KA, Davis JH, Foster TR, Record MT Jr, Butcher SE (2008) Thermodynamics and folding pathway of tetraloop receptor-mediated RNA helical packing. J Mol Biol 384: 702-717
- Waldsich C, Grossberger R, Schroeder R (2002) RNA chaperone StpA loosens interactions of the tertiary structure in the td group I intron in vivo. Genes Dev 16: 2300-2312
- Waley SG (1965) Structural studies of a-crystallin. Biochem J 96: 722-728
- Walter AE, Turner DH (1994) Sequence dependence of stability for coaxial stacking of RNA helixes with Watson-Crick base paired interfaces. Biochemistry 33: 12715-12719
- Wan Y, Kertesz M, Spitale RC, Segal E, Chang HY (2011) Understanding the transcriptome through RNA structure. Nat Rev Genet 12: 641-655
- Wang CC, Chang TC, Lin CW, Tsui HL, Chu PB, Chen BS, Huang ZS, Wu HN (2003) Nucleic acid binding properties of the nucleic acid chaperone domain of hepatitis delta antigen. Nucleic Acids Res 31: 6481-6492
- Weinberg MS, Rossi JJ (2005) Comparative single-turnover kinetic analyses of trans-cleaving hammerhead ribozymes with naturally derived non-conserved sequence motifs. FEBS Lett 579: 1619-1624
- Wells RD, Blakesley RW, Hardies SC, Horn GT, Larson JE, Selsing E, Burd JF, Chan HW, Dodgson JB, Jensen KF, Nes IF, Wartell RM (1977) The role of DNA structure in genetic regulation. CRC Crit Rev Biochem 4: 305-340
- Westhof E (1999) Chemical diversity in RNA cleavage. Science 286: 61-62
- Westhof E, Masquida B, Jaeger L (1996) RNA tectonics: towards RNA design. Fold Des 1: R78-88
- Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus GU (2009) Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. IUBMB Life 61: 1029-1042
- Williams RJP, Fraústo da Silva JJR (2000) The distribution of elements in cells. Coordin Chem Rev 200-202: 247-348
- Woodson SA (2005) Metal ions and RNA folding: a highly charged topic with a dynamic future. Curr Opin Chem Biol 9: 104-109
- Woodson SA (2010) Taming free energy landscapes with RNA chaperons. RNA Biol 7: 677-686
- Woodson SA (2010B) Compact intermediates in RNA folding. Annu Rev Biophys 39: 61-77

- Xayaphoummine A, Bucher T, Isambert H. Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. Nucleic Acids Res 33 (Web Server issue): W605-610
- Xin Y, Laing C, Leontis NB, Schlick T (2008) Annotation of tertiary interactions in RNA structures reveals variations and correlations. RNA 14: 2465-2477
- Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nat Rev Drug Discov 5: 37-50
- Young BT, Silverman SK (2002) The GAAA tetraloop-receptor interaction contributes differentially to folding thermodynamics and kinetics for the P4-P6 RNA domain. Biochemistry 41: 12271-12276
- Young HA, Subleski JJ, Krebs SM (2003) Multiprobe ribonuclease protection assay for simultaneous measurement of mRNA expression. Curr Protoc Immunol Chapter 10: Unit 10.29
- Zemora G, Waldsich C (2010) RNA folding in living cells. RNA Biol 7: 634-641
- Zhang Q, Ohannesian DW, Erickson LC (2004) Hammerhead ribozyme-mediated sensitization of human tumor cells after treatement with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. J Pharmacol Exp Ther 309: 506-514
- Zhang YJ, Wang XP, Deng JH, Salinas RA, Oishi N, Gao S-J (2001) Suppression of oncogenic viral interferon regulatory factor (vIRF) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by ribozyme-mediated cleavage. Cancer Gene Ther 8: 285-293
- Zhu H, Lo HW (2010) The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. Curr Genomics 11: 238-245
- Zuker M, Stiegler P (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Res 9: 133-148
- Zúñiga S, Sola I, Cruz JL, Enjuanes L (2009) Role of RNA chaperones in virus replication. Virus Res 139: 253-266

Oświadczam, że jestem stypendystą w ramach projektu pt.: "Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski", Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.