

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu

Zakład Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych

Dorota Magner

**Wykorzystanie modyfikowanych
antysensowych oligonukleotydów do
alleloselektywnej degradacji RNA**

Rozprawa doktorska

Promotor:
Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Poznań 2014

*Serdecznie dziękuję Promotorowi,
Panu Profesorowi Ryszardowi Kierzkowi
za przekazaną wiedzę, poświęcony czas, wyrozumiałość
i wskazanie niezwykle ciekawej tematyki badawczej*

*Pani dr Ewie Białej
dziękuję za wszelką pomoc okazaną w trakcie realizacji eksperymentów*

*Koleżankom i Kolegom z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN
dziękuję za życzliwość i niepowtarzalną atmosferę pracy.*

*Rodzicom i Siostrze
dziękuję za nieocenione wsparcie zawsze i wszędzie*

*Pracę dedykuję
Mężowi Mariuszowi i Córcze Zosi,
dziękując za bezgraniczną wyrozumiałość,
wiarę we mnie, otuchę,
za wszystko!*

SPIS TREŚCI

I. CEL PRACY.....	6
II. WPROWADZENIE LITERATUROWE	8
1 RNA jako cel terapeutyczny	8
2 Strategie antysensowe	12
2.1 Mechanizmy blokady sterycznej (ang. <i>occupance-only</i>)	13
2.1.1 Zatrzymanie translacji	13
2.1.2 Modułacja splicingu	14
2.1.3 Zaburzenie struktury RNA	15
2.2 Mechanizm degradacji docelowego RNA (ang. <i>occupancy-activated destabilization</i>)	16
2.2.1 Aktywacja rybonukleazy H	16
2.2.2 Interferencja RNA	19
3 Terapeutyki oligonukleotydowe.....	23
3.1 Generacje antysensowych oligonukleotydów	23
3.2 siRNA.....	30
3.3 Rybozomy i DNAzomy.....	31
3.4 Aptamery i SELEX	34
4 Alleloselektywne wyciszanie genów	35
5 Mutacje i polimorfizmy w genomie ludzkim	37
6 Neurodegeneracja warunkowana obecnością mutacji punktowych.....	38
6.1 Choroba Alzheimerera	39
6.2 Choroba Parkinsona	41
6.3 ALS (ang. <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> , stwardnienie zanikowe boczne)	42
III. WYNIKI I DYSKUSJA	46
1 Obiekty badawcze.	46
2 Alleloselektywna hydroliza RNA zawierających substytucję nukleotydową (SNP), z wykorzystaniem tandemowych oligonukleotydów	47
2.1 Transwersja C/G (APP, A692G).....	48
2.2 Tranzycja G/A	60
2.2.1 APP V717I	60
2.2.2 SNCA E46K.....	71
2.2.3 SNCA A53T	80
2.3 Tranzycja C/T (SOD1, A4V)	88
2.4 Tranzycja A/G (APP, E693G).....	96
2.5 Podsumowanie	102
3 Zastosowanie motywów strukturalnych zaburzających helikalność dupleksu RNA/ASO, w celu alleloselektywnej hydrolizy RNA zawierających SNP	105
3.1 Transwersja C/G (APP A692G).....	106
3.2 Tranzycja G/A	129
3.2.1 APP V717I	129
3.2.2 SNCA E46K.....	138
3.2.3 SNCA A53T	143
3.3 Tranzycja C/T (SOD1 A4V)	149
3.4 Tranzycja A/G (APP E693G).....	160
3.5 Podsumowanie	164
4 Dyskusja i wnioski	170
IV. MATERIAŁY I METODY	182
1 MATERIAŁY	182

1.1	Odczynniki	182
1.2	Enzymy.....	183
1.3	Roztwory i bufory	183
1.4	Żele.....	186
1.5	Pożywki i media	187
1.6	Gotowe zestawy do reakcji enzymatycznych.....	189
1.7	Izotop promieniotwórczy	189
1.8	Plazmid.....	189
1.9	Komórki	189
1.10	Oligonukleotydy.....	190
1.10.1	Oligonukleotydy DNA do konstrukcji matryc do transkrypcji <i>in vitro</i> : ...	190
1.10.2	Oligonukleotydy DNA do konstrukcji insertów:	190
1.10.3	Oligonukleotydy RNA do badań <i>in vitro</i>	191
1.10.4	Oligonukleotydy antysensowe	194
1.10.5	Startery do reakcji PCR i qPCR	199
1.11	Akcesoria dodatkowe	200
1.12	Aparatura	200
1.13	Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe do analizy danych.....	201
2	METODY.....	201
2.1	Synteza oligonukleotydów	201
2.2	Odblokowanie oligonukleotydów nie zawierających naturalnego RNA (startery DNA, gapmery, oligonukleotydy antysensowe typu inhibitor)	201
2.3	Odblokowanie oligorybonukleotydów	202
2.4	Oczyszczanie oligonukleotydów	202
2.5	Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących	203
2.6	Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	203
2.7	Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego	204
2.8	Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu, po elucji z żelu poliakrylamidowego.....	204
2.9	Elektroforeza w żelach agarozowych.....	204
2.10	Ekstrakcja fenol-chloroform	204
2.11	Analiza MALDI-ToF-MS	205
2.12	Wyznaczanie parametrów termodynamicznych dupleksów metodą topnień UV (<i>ang. UV melting</i>).....	205
2.13	Znakowanie RNA izotopem ³² P.....	206
2.14	Znakowanie RNA 6-karboksyfluoresceiną (6-FAM)	206
2.15	Hydroliza alkaliczna RNA	207
2.16	Hydroliza RNA rybonukleazą T1	207
2.17	Hydroliza dupleksów RNA/ASO rybonukleazą H.....	207
2.18	Wyznaczanie stałej wiązania dupleksów RNA/ASO metodą EMSA (<i>ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	208
2.19	Przygotowanie matryc do transkrypcji <i>in vitro</i>	208
2.20	Transkrypcja <i>in vitro</i>	209
2.21	Konstrukcja insertów.....	210
2.22	Klonowanie do plazmidu ekspresyjnego.....	210
2.22.1	Trawienie restrykcyjne	210
2.22.2	Defosforylacja końców plazmidu po trawieniu restrykcyjnym	211
2.22.3	Ligacja.....	211
2.23	Transformacja komórek kompetentnych metodą szoku cieplnego	211
2.24	Selekcja klonów	211

2.25	Amplifikacja prawidłowych klonów	212
2.26	Rozmrażanie komórek <i>HeLa</i>	212
2.27	Hodowla linii komórkowej <i>HeLa</i>	213
2.28	Pasażowanie komórek	213
2.29	Mrożenie komórek <i>HeLa</i> (Bankowanie).....	213
2.30	Posiew na płytkę wielodołkową.....	214
2.31	Kotransfekcja komórek <i>HeLa</i> plazmidem i oligonukleotydami antysensowymi	214
2.32	Izolacja całkowitego RNA z komórek <i>HeLa</i>	215
2.33	Odwrotna transkrypcja	215
2.34	PCR ilościowy (Real-Time PCR, qPCR).....	216
2.35	Analiza statystyczna wyników	217
V. BIBLIOGRAFIA.....		218
VI. ZAŁĄCZNIKI		229
VII. STRESZCZENIE.....		243
ABSTRACT.....		245

I. CEL PRACY

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) zwany też substytucją nukleotydową jest najczęściej występującym typem zmienności genetycznej u organizmów. W genomie ludzkim występuje średnio raz na 1250 par zasad [1], w obrębie różnych funkcjonalnie rodzajów sekwencji (kodujących, intronowych, regulatorowych, itp.), w związku z czym może powodować różnorodne konsekwencje. Zmiana sekwencji genomu powodowana występowaniem SNP, może być dziedziczona, ujawniać się fenotypowo i prowadzić do rozwoju chorób o podłożu genetycznym. Dysfunkcja różnych białek, powodowana ich niepoprawną strukturą, determinowaną przez wystąpienie mutacji, jest częstą przyczyną m.in. chorób neurodegeneracyjnych, jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy ALS (stwardnienie zanikowe boczne). Choroby te rzadko są powodowane pojedynczą mutacją punktową, zwykle są wynikiem mutacji obejmujących większe regiony genu lub efektem nakładania się kilku czynników etiologicznych. Istnieją jednak mutacje punktowe (będące SNP dającym efekt fenotypowy), dla których określono istotny wpływ na rozwój wspomnianych chorób neurodegeneracyjnych. Rozwinięcie strategii umożliwiającej alleloselektywne wyciszenie ekspresji zmutowanych wariantów genu, powodujących rozwój stanu patologicznego, jest tematem podejmowanym przez wiele grup badawczych na świecie, z różnym skutkiem.

W niniejszej pracy podjęto próbę selektywnej degradacji zmutowanych wariantów genów APP, SNCA i SOD1, powstałych w rezultacie występowania SNP i związanych z rozwojem odpowiednio choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, oraz stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Wykorzystano do tego celu modyfikowane oligonukleotydy antysensowe i dobrze znany mechanizm degradacji RNA z udziałem rybonukleazy H. Prezentowane sposoby zastosowania antysensowych oligonukleotydów, oraz wykorzystywany do tego układ modyfikacji poszczególnych oligonukleotydów jak dotąd nie były opisane w literaturze. Wszystkie analizowane SNP w obrębie przytoczonych genów, są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący. Układem odniesienia była komórka heterozygotyczna, w której obok formy zmutowanej genu, równocześnie ekspresji ulega allel dziki, a jedynym czynnikiem różnicującym obydwie allele jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu. Badania dążyły do przeanalizowania kilku najbardziej powszechnych typów SNP i określenia, czy jest możliwa, w jakim przypadku, i od czego zależy alleloselektywna hydroliza RNA względem SNP, z udziałem rybonukleazy H.

Powyższy cel realizowano w oparciu o 2 sposoby. Pierwszy z nich wykorzystywał współdziałanie dwóch oligonukleotydów, z których krótszy, nie aktywujący rybonukleazy H, spełniający funkcję inhibitora kompetycyjnego dzikiego wariantu genu, miał ograniczać jego hybrydyzację z właściwym antysensowym oligonukleotydem (zaprojektowanym jako gapmer), komplementarnym do formy zmutowanej genu i indukującym jego degradację poprzez aktywację rybonukleazy H. Drugi sposób zakładał wprowadzenie motywów struktury drugorzędowej do dupleksów RNA/ASO, także z wykorzystaniem nukleotydowych i nienukleotydowych modyfikacji w obrębie oligonukleotydu antysensowego, w celu termodynamicznego lub strukturalnego zróżnicowania dupleksów cząsteczek dzikiej i zmutowanej względem rybonukleazy H. W cząsteczkach inhibitora i gapmeru stosowano modyfikacje LNA, 2'-O-metyloRNA, UNA, 8-bromodeoksyguanozynę, oraz alkilowe łączniki SP3 i SP18. Cele szczegółowe obejmowały:

- 1) określenie wpływu motywów struktury drugorzędowej dupleksu RNA – oligonukleotyd antysensowy na efektywność trawienia rybonukleazą H,
- 2) określenie wpływu parametrów termodynamicznych dupleksu RNA/ASO na efektywność trawienia rybonukleazą H,
- 3) zróżnicowanie poziomu ekspresji dwóch alleli genu różniących się SNP z zastosowaniem antysensowych oligonukleotydów zawierających nukleotydowe i nienukleotydowe modyfikacje,
- 4) próba wykorzystania strategii antysensowej do selektywnego wyciszania wariantów genu różniących się pojedynczym nukleotydem, w oparciu o reguły termodynamiczne lub uwarunkowania strukturalne.

II. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1 RNA jako cel terapeutyczny

W cząsteczkach RNA tkwi ogromny potencjał. Jego odkrywanie rozpoczęło się w końcu lat 70-tych XX wieku, od poznania funkcji katalitycznej, a także od ustalenia budowy i funkcji rybosomu. Nieprzerwanie do dziś odnajduje się nowe znaczenia RNA w komórce. Cząsteczka jeszcze do niedawna uznawana jedynie za ogniwo pośredniczące w procesie syntezy białek, stała się w ostatnich latach najpilniej poznawaną w organicznym świecie, ze względu na mnogość procesów biologicznych, w których spełnia lub może spełniać kluczowe funkcje.

Podstawową rolę RNA w komórce jest udział w procesie biosyntezy białka. Cząsteczka ta jest pośrednikiem w przepływie informacji genetycznej (mRNA, tRNA), oraz głównym elementem strukturalnym i katalitycznym rybosomu. Transferaza peptydylowa odpowiedzialna za tworzenie wiązania peptydowego, stanowi fragment rRNA (składnik 23S rRNA u *Prokaryota* i 28S rRNA u *Eukaryota*), będący rybozymem. Katalityczne właściwości RNA zaobserwował poraz pierwszy Thomas Cech, badając proces wycinania intronów (ang. *splicing*) z pre-mRNA, u jednokomórkowego organizmu eukariotycznego *Tetrahymena thermophila*. Nie mogąc zidentyfikować białkowego czynnika odpowiedzialnego za splicing, Cech dowiódł, że wycinanie intronów następuje na drodze autokatalizy RNA. Równolegle, Sidney Altman, badając budowę rybonukleaz odkrył, że odpowiedzialna za dojrzewanie cząsteczek tRNA domena rybonukleazy P nie jest białkiem, lecz kwasem rybonukleinowym [2]. Za udowodnienie obserwowanych zjawisk, w 1989 roku Thomas Cech i Sidney Altman otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Ich przełomowe odkrycie dało nowe spojrzenie na procesy biochemiczne zachodzące w komórce, stanowiąc punkt wyjścia dla hipotezy *świata RNA*, wedle której to cząsteczka kwasu rybonukleinowego była prekursorem DNA i enzymów białkowych. Ponadto otworzyło ono nowe perspektywy wykorzystania poznawanych właściwości RNA w biologii molekularnej, farmakologii czy w medycynie.

RNA jest celem terapeutycznym już od połowy XX wieku, choć do lat 80-tych zrozumienie tego faktu było ograniczone. Antybiotyki aminoglikozydowe stanowiły pierwszą grupę związków, dla których celem molekularnym była cząsteczka RNA. Mechanizm ich działania polega na blokowaniu procesu translacji u bakterii, poprzez bezpośrednie wiązanie się w miejscu akceptorowym prokariotycznego rybosomu, do cząsteczki 16S rRNA,

w obrębie małej podjednostki 30S. Struktura RNA warunkuje oddziaływania, dzięki którym obserwowany jest efekt terapeutyczny antybiotyków aminoglikozydowych. W rejonie miejsca akceptorowego, cząsteczka 16S rRNA tworzy charakterystyczny motyw niesymetrycznej pętli wewnętrznej, z jednostronnie wybrzuszoną adenozyną obok niekanonicznej pary A-A. Motyw ten formuje kieszeń dla wiążących się do większej bruzdy RNA aminoglikozydów [3, 4]. W rybosomie eukariotycznym występuje zamiana adenozyiny na guanozynę w obrębie wspomnianej niekanonicznej pary, skutkująca zmianą struktury w obrębie większej bruzdy i znacznym zmniejszeniem powinowactwa aminoglikozydów do rybosomalnego RNA. W efekcie tej praktycznie wyeliminowanej interakcji z rybosomem eukariotycznym, antybiotyki aminoglikozydowe znalazły zastosowanie kliniczne w terapii wielu ciężkich zakażeń bakteryjnych ludzi i zwierząt, w tym szpitalnych, m.in. posocznicy, gruźlicy i sepsy. Często jednak są stosowane w postaci skojarzonej z innym antybiotykiem, z racji ograniczonego spektrum działania także wśród bakterii.

Rybosomalne RNA, z racji swej kluczowej funkcji strukturalno-katalitycznej, analogicznie jak w przypadku białek, jest skutecznym, molekularnym celem przede wszystkim dla związków niskocząsteczkowych. Innego rodzaju RNA komórkowe także wykazują potencjał jako cele w terapii molekularnej. Istotnym i przełomowym dla znaczenia RNA w tej kwestii, było odkrycie strategii antysensowej, którego dokonali Zamecnik i Stephenson w 1978 roku. Strategia antysensowa pozwala na modulację ekspresji genów, poprzez celowanie w cząsteczki informacyjnego RNA (mRNA), za pomocą krótkich oligonukleotydów, działających na podstawie reguły komplementarności. Udowadniając antywirusową aktywność 13-nukleotydowych DNA, względem RNA wirusa mięsaka Rousa (Rous Sarkoma Virus, RSV), Zamecnik i Stephenson wykazali potencjał strategii antysensowej w zastosowaniach terapeutycznych, co otworzyło szereg nowych możliwości dla farmakologii i medycyny [5]. Oferta stworzenia leków selektywnych względem pojedynczych genów, w oparciu o reguły hybrydyzacji Watsona-Cricka, w początkach intensywnego rozwoju biologii molekularnej, szybko znalazła wielu zwolenników i została rozpowszechniona jako obiekt badań, cieszący się niesłabnącym zainteresowaniem do chwili obecnej.

Pod koniec lat 90-tych ubiegłego wieku miało miejsce kolejne przełomowe odkrycie, uhonorowane Nagrodą Nobla, prezentujące ogromny potencjał tkwiący w cząsteczkach RNA – zjawisko interferencji RNA (ang. *RNA interference*, *RNAi*). Każdy kolejny krok w badaniach kwasu rybonukleinowego utwierdza w przekonaniu, że jest to cząsteczka, od której w zdecydowanej większości zależą losy komórki.

Sekwencjonowanie ludzkiego genomu ujawniło, że geny stanowią nie więcej niż 2% komórkowego DNA, które jednak w 75% ulega transkrypcji w pewnym miejscu, w pewnym czasie [6-8]. W miarę poznawania transkryptomu okazało się, że jest on bogaty w tzw. niekodujące RNA (ang. *non-coding RNAs*, ncRNAs) mogące spełniać funkcje regulatorowe. Przynajmniej 80% transkryptów stanowią długie (>200 nt) niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNAs*, lncRNAs) [9, 10], a mechanizm antysensowy jest naturalnie występującym w komórce regulatorem ekspresji genów. Analiza porównawcza sekwencji genomów różnych organizmów uwydatniła fakt, że nie liczba genów, a prawdopodobnie mnogość niekodujących regulatorowych RNA, sterujących ich ekspresją w odpowiednim miejscu i czasie, odpowiada za złożoność organizmu [8]. Wyższe organizmy, w porównaniu do mikroorganizmów, mają względnie stabilny proteom i stałą liczbę genów kodujących białka. Różnica w liczbie genów między prostym nicieniem *C. elegans*, zbudowanym z około 1000 komórek, a człowiekiem rozumnym (*H. sapiens*), którego organizm zbudowany z około 10^{14} komórek, wytworzył mocno zróżnicowane tkanki, narządy i układy, wynosi mniej niż 30% [6, 10]. Obserwacja ta sugeruje, że ilość regulatorowych RNA w stosunku do kodujących RNA wzrastała w miarę osiągnięcia wyższego poziomu ewolucyjnego organizmu.

Niekodujące RNA u ssaków mogą powstawać z 3 źródeł: z sekwencji intronowych, z sekwencji międzygenowych (ang. *long-intergenic non-coding RNAs*, lincRNAs) oraz jako antysensowe transkrypty (ang. *Natural Antisense Transcripts*, NATs). Postuluje się, że w genomach ssaków, nawet w 70%-80% transkrypcja przebiega dwukierunkowo, z obydwu nici DNA [8, 11], oraz że do 72% transkryptów w ludzkim transkryptomie posiada swoje antysensowe odpowiedniki [12-14]. Jako cząsteczki regulatorowe, zwykle RNA te ulegają ekspresji na niskim poziomie. Wyróżnia się wśród nich elementy działające w układzie *cis* (ang. *cis-acting ncRNAs*) oraz w układzie *trans* (ang. *trans-acting ncRNAs*). Elementy regulatorowe *cis* pochodzą z tego samego *locus*, co docelowy transkrypt, powstają przeważnie na matrycy sensowej nici DNA, i wykazują komplementarność, pokrywając przynajmniej częściowo docelowe RNA. Niektóre naturalne antysensowe RNA powstające na matrycy sensowej nici DNA, posiadają ramkę odczytu, sygnał poliadenylacji i mogą także kodować białka [15]. Dowiedziono, że NATs biorą udział w regulacji wielu procesów, kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jak stabilizacja mRNA, genomowe piętnowanie (ang. *imprinting*), alternatywne składanie genów (ang. *splicing*), inaktywacja chromosomu X, regulacja translacji, eksport RNA do cytoplazmy, metylacja DNA, modyfikacje histonów i rearanżacja chromatyny [14]. Ponadto, wiadomo, że cząsteczki te są zaangażowane w kontrolę procesów rozwojowych, adaptacji do warunków stresowych,

a także w odpowiedź organizmu na infekcje wirusowe. W związku z tym mają ogromne znaczenie dla utrzymania homeostazy organizmu i w wielu przypadkach mogą istotnie wpływać na ujawnianie się chorób [10, 16-20]. Jako elementy regulatorowe *cis* działają także cząsteczki piRNA (ang. *PIWI-interacting RNA*), co różni je od innych, małych regulatorowych RNA. Cząsteczki piRNA są charakterystyczne głównie dla męskich komórek płciowych, powstają z długich jednoniciowych, antysensowych transkryptów, i co dla nich znamienne, niezależnie od rybonukleazy Dicer [21, 22]. Mechanizm ich działania jest oparty o interferencję RNA. PiRNA występują jako 25-30-nukleotydowe cząsteczki, zwykle jedynie w orientacji antysensowej, i prezentują charakterystyczne cechy sekwencji, jak obecność urydyny jako pierwszego nukleotydu od 5' końca, oraz metylowanej grupy 2'-hydroksylowej w ostatnim nukleotydzie od 3' końca [22, 23]. Ich funkcją jest stabilizacja genomu podczas gametogenezy. Hybrydyzacja piRNA z docelowym transkrypcyjnie specyficznym rekrutuje białka PIWI, stanowiące podklasę białek Argonaute. W zależności od etapu mejozy, na którym cząsteczki te ulegają ekspresji, wyróżnia się piRNA pre-pachytenowe, oraz piRNA pachytenowe. Pre-pachytenowe piRNA, analogicznie jak endogenne siRNA, sekwencją odpowiadają ruchomym elementom powtarzalnym genomu i biorą udział w ich wyciszeniu. Wiążąc białka PIWIL2 i PIWIL4, regulują wzorzec metylacji transpozonów [22]. Pachytenowe piRNA powstają z międzygenowych regionów, nie będących transpozonami, a ich funkcja nie jest do końca poznana. [22, 24]

Antysensowe RNA działające w układzie *trans* pochodzą z *locus* innego niż docelowy transkrypt i często nie są do niego w pełni komplementarne. Najlepiej poznanymi regulatorowymi RNA, działającymi w układzie *trans*, są małe regulatorowe RNA działające na zasadzie interferencji RNA: miRNA (mikroRNA, ang. *microRNA*) oraz endogenne siRNA (ang. *short interfering RNA*) [25, 26].

MiRNA to dwuniciowe RNA o długości 20-23 nukleotydów. Powstają dwuetapowo, z jednoniciowego prekursora RNA o strukturze spinki, przy udziale białek Dicer i Drosha, sklasyfikowanych jako rybonukleazy III i posiadających aktywność względem dwuniciowych RNA. Geny mikroRNA zlokalizowane są zwykle między genami białek (ang. *intergenic regions*) lub w orientacji antysensowej do sąsiadującego genu (ang. *antisense transcripts*). U roślin miRNA są zwykle w pełni komplementarne do docelowego mRNA, podczas gdy u zwierząt dowiedziono, że miRNA są jedynie częściowo komplementarne, posiadają jednak kluczowy dla swej procesywności region, między 2 a 8 nukleotydem począwszy od 5' końca (ang. *seed region*). Niesparowania w obrębie tego regionu skutkują utratą zdolności

rekrutowania docelowego RNA do kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) [26].

SiRNA naturalnie są cząsteczkami pochodzenia egzogenne, pojawiającymi się w komórce na skutek infekcji wirusowej lub przez wniknięcie transgenu. U roślin, grzybów i zwierząt zidentyfikowano jednak endogenne siRNA o długości 23-27 nukleotydów i złożone z dwóch odrębnych komplementarnych nici, powstające z długich dwuniciowych cząsteczek RNA [27-29]. Cząsteczki te określone pierwotnie jako rasiRNA (ang. *repeat-associated siRNAs*), kodowane są głównie przez genomowe sekwencje powtarzające się (ang. *repetitive elements*), będące transpozonomi i retroelementami. Potwierdza to, że mechanizm RNAi pierwotnie funkcjonował jako ochrona przed ekspresją i powielaniem obcego materiału genetycznego.

Wiadomo, że w niektórych przypadkach profil ekspresji konkretnych miRNA może obrazować różnicowanie nowotworów [30, 31]. W związku z tym faktem, mikroRNA jawią się nie tylko jako bardzo obiecujące narzędzia diagnostyczne, ale także jako czynnik, którego regulacja aktywności może istotnie zahamować lub cofnąć proces nowotworzenia [10, 32]. Zaproponowano na przykład wiązanie miRNA przez swoiste dla nich tzw. antagomiry, lub wykorzystanie tzw. gąbek miRNA, które posiadają wielokrotne, sztuczne miejsca wiązania miRNA [33, 34]. Ponieważ nadekspresja niektórych miRNA związana jest z indukowaniem cech komórek macierzystych, także sztuczne wzmocnienie ekspresji niektórych miRNA stanowi obiecującą strategię terapeutyczną [10, 35, 36].

Strategia antysensowa wraz ze zjawiskiem interferencji RNA niosą ogromny potencjał terapeutyczny. Niekodujące RNA o poznanej już funkcji mogą stanowić zarówno cel molekularny, jak i środek do modulacji jego ekspresji, zależnie od potrzeb i stanu wiedzy. Gwałtowny rozwój badań dotyczących sterowania ekspresją różnych genów, w oparciu o terapeutyczne siRNA, czy antysensowe narzędzia oligonukleotydowe, dostarczył i cały czas dostarcza wielu przykładów sukcesu w regulacji ekspresji genów.

2 Strategie antysensowe

Komplementarne do docelowej sekwencji, antysensowe oligonukleotydy (ASOs, ang. *Antisense Oligonucleotides*) mogą działać według różnych mechanizmów, zależnie od miejsca, w które celują, oraz od modyfikacji, jakie zawierają w swojej strukturze. Mogą także przez dopasowanie przestrzenne struktury, funkcjonować jako aptamery względem białek, aminokwasów, również kwasów nukleinowych (por. rozdział 3.4). Zasadniczo, wyróżnia się

dwa rodzaje aktywności oligonukleotydów antysensowych w oparciu o regułę komplementarności: 1) wiązanie docelowej cząsteczki jako inhibitor kompetytywny, uniemożliwiające jej oddziaływanie z innymi molekułami w komórce (mechanizmy blokady sterycznej), oraz 2) formowanie dupleksu rekrutującego RNazy specyficzne względem dupleksów (RNA-RNA, lub RNA-DNA), tzw. dsRNazy (ang. *double-stranded RNases*), prowadzące do hydrolizy nici RNA

2.1 Mechanizmy blokady sterycznej (ang. *occupance-only*)

Wiążąc się do RNA, antysensowe oligonukleotydy mogą blokować miejsca normalnie dostępne dla komórkowych białek, innych kwasów nukleinowych, oraz różnych innych związków, z którymi RNA zwykle oddziałuje, a które wpływają na wystąpienie jego określonej funkcji. Takie przestrzenne unieczynnienie RNA może skutkować m. in. zahamowaniem translacji, zmianą wzorca splicingu, lub zmianą funkcjonalnej struktury RNA.

2.1.1 Zatrzymanie translacji

Polisomy tworzące się podczas translacji mają zdolność rozplatania struktur RNA, stąd oligonukleotydy antysensowe projektowane jako inhibitory translacji, ukierunkowywane są najczęściej na wiązanie się do regionów 5' UTR (ang. *Untranslated Regions*), motywów IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*) oraz w obrębie kodonu inicjacyjnego, gdzie z reguły działają najefektywniej. Mimo to jednak, obserwuje się także ich aktywność w stosunku do regionów kodujących [37, 38]. Dla wzrostu specyficzności oddziaływań oligonukleotydu z docelową sekwencją, oraz w celu wyeliminowania mechanizmu enzymatycznej degradacji RNA, stosuje się szereg modyfikacji chemicznych w obrębie reszty cukrowej, rzadziej zasady heterocyklicznej, pojedynczych nukleotydów (por. rozdział 3.1). Obok mechanizmów degradacji RNA, jest to jeden z najczęściej wykorzystywanych sposobów modulacji ekspresji genów. Wykorzystując mechanizm inhibicji translacji, z pomocą antysensowych oligonukleotydów udało się wyciszyć ekspresję wirusa HCV (ang. *Hepatitis C Virus*) w mysich hepatocytach [39, 40], gdzie obserwowano ogólny spadek efektywności działania oligomeru, w miarę oddalania miejsca jego wiązania od miejsca inicjacji translacji. Oligonukleotyd antysensowy wiążący się do kodonu inicjacyjnego powodował dużo mniejszy spadek produkcji wirusowego białka w porównaniu z oligomerem komplementarnym do pętli, występującej w regionie 5' UTR. Z kolei oligonukleotydy celowane w sekwencje kodujące działały tym gorzej, im były dalej od kodonu inicjacyjnego. Inne badania wykazały, że zablokowanie translacji w przypadku

ludzkiego mRNA ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) przebiegało najefektywniej, gdy oligonukleotydy wiązały region zawierający 5' kap. Powodowało to wzrost poziomu mRNA ICAM-1, przy jednoczesnym braku jego produktu białkowego w komórce, na skutek uniemożliwienia rozpoznania struktury czapeczki przez białkowy czynnik eIF4E, inicjujący tworzenie kompleksu translacyjnego [41].

2.1.2 Modulacja splicingu

W komórce eukariotycznej, RNA powstające w procesie transkrypcji jest poddawane wieloetapowej obróbce, która czyni je funkcjonalną cząsteczką. Podstawowym procesem w ramach tej obróbki jest splicing, odpowiedzialny za współistnienie wielu form tego samego RNA. Proces ten polega na wycinaniu intronów z prekursorowego informacyjnego RNA tzw. pre-mRNA, będącego bezpośrednim produktem transkrypcji. Za wycinanie intronów, w większości przypadków odpowiedzialny jest wielocząsteczkowy kompleks zwany spliceosomem, którego elementy snRNA (ang. *small nuclear RNA*) specyficznie rozpoznają miejsca połączeń intron/ekson, miejsca rozgałęzienia, etc. Sposób połączenia eksonów w dojrzałej cząsteczce RNA określa się jako wzorzec splicingu. Wykorzystując antysensowe oligonukleotydy nie aktywujące komórkowych RNaz, można modulować splicing poprzez jego inhibicję lub zmianę wzorca [42].

Do 95% ludzkich genów naturalnie poddawanych jest procesowi alternatywnego składania RNA [43], który jest źródłem ogromnej różnorodności izoform białek w różnych tkankach, na różnych etapach rozwoju, w zależności od płci, czy wpływu warunków zewnętrznych. Hybrydyzacja oligonukleotydu antysensowego do sekwencji kluczowych w procesie splicingu, może maskować ich obecność i uniemożliwiać rozpoznanie przez właściwe elementy spliceosomu, lub blokować ich wycinanie, przez fizyczne odcięcie dostępu do miejsc rozszczepienia. W zależności, w którym miejscu dojdzie do takiego maskowania, intron może zostać włączony do sekwencji RNA (ang. *intron inclusion*), lub ekson może zostać z niej wykluczony (ang. *exon skipping*). W efekcie takiego działania powstanie dojrzała cząsteczka RNA, inna, niż zakładał to oryginalny wzorzec splicingu. Indukcja alternatywnego splicingu za pomocą odpowiednio modyfikowanych antysensowych oligonukleotydów, stanowi obiecujący mechanizm naprawczy wobec szeregu chorób powodowanych nieprawidłowym wzorcem składania, lub mutacjami w obrębie połączeń intron/ekson, skutkującymi zmianami wzorca składania RNA. Aktualnie, trwają próby kliniczne weryfikujące aktywność trzech antysensowych oligonukleotydów, indukujących alternatywny splicing pre-mRNA dystrofiny w odniesieniu do dystrofii mięśniowej

Duchenne'a, w oparciu o mechanizm wykluczania eksonów. Dwa z testowanych oligonukleotydów to oligomery morfolinowe (ang. *PMO*, *phosphorodiamidate morpholino oligo*), trzeci zawiera modyfikację 2'-MOE (ang. 2'-*O-methoxyethyl-RNA*) [44].

Ciekawym przykładem jest także regulacja alternatywnego składania RNA genu Bcl-x. Naturalnie występują 2 warianty Bcl-x spełniające w komórce różne funkcje – dłuższa forma Bcl-xL posiada właściwości antyapoptotyczne, natomiast krótsza forma Bcl-xS – właściwości proapoptotyczne. Obie formy, w odpowiedniej proporcji, są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jednak zauważono, że forma Bcl-xL ulega nadekspresji w wielu przypadkach nowotworów. Zablokowanie miejsca splicingowego odpowiedzialnego za powstawanie dłuższego wariantu Bcl-x, z wykorzystaniem antysensownych oligonukleotydów, skutkowało zwiększeniem proporcji Bcl-xS do Bcl-xL i kierowaniem nowotworowych komórek na szlak apoptozy [45-48].

2.1.3 Zaburzenie struktury RNA

RNA w komórce występuje w postaci silnie ustrukturalizowanej, determinowanej przez wiązania wodorowe, oddziaływania warstwowe, van der Waalsa oraz hydrofobowe. Struktura przestrzenna dodaje cząsteczce RNA stabilności i pozwala spełniać różnorodne funkcje warunkowane obecnością motywów strukturalnych, rozpoznawanych przez jej komórkowe receptory: białka, inne RNA czy kompleksy białkowo-nukleinowe (ang. *RNP*, *ribonucleoprotein*). Najczęściej spotykanym motywem strukturalnym RNA jest spinka (ang. *hairpin*, *stem loop*). Występuje ona m.in. w wielu kluczowych regionach wirusowego RNA, np. w domenie TAR wszystkich znanych typów wirusa HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) czy w regionie 5'UTR wirusa HCV [49, 50]. Wykazano, że oligonukleotydy antysensowne mogą skutecznie zaburzać strukturę spinek, czym blokują ekspresję genów wirusa [51]. Mechanizm ten zyskuje na znaczeniu, jako że spinka TAR okazała się być źródłem miRNA. Powstają one z regionu helikalnego, i wyciszają geny ERCC1 i IER3, odpowiedzialne odpowiednio za naprawę DNA oraz kierowanie zainfekowanych komórek na szlak apoptozy [52]. W literaturze opisano także przykład zaburzenia stabilności struktury rybosomu, skutkujący inhibicją biosyntezy białka, jako rezultat działania oligonukleotydów komplementarnych do 17-nukleotydowej pętli spinki w obrębie 28S RNA, w oocytach żaby z gatunku *Xenopus* [53].

2.2 Mechanizm degradacji docelowego RNA (ang. *occupancy-activated destabilization*)

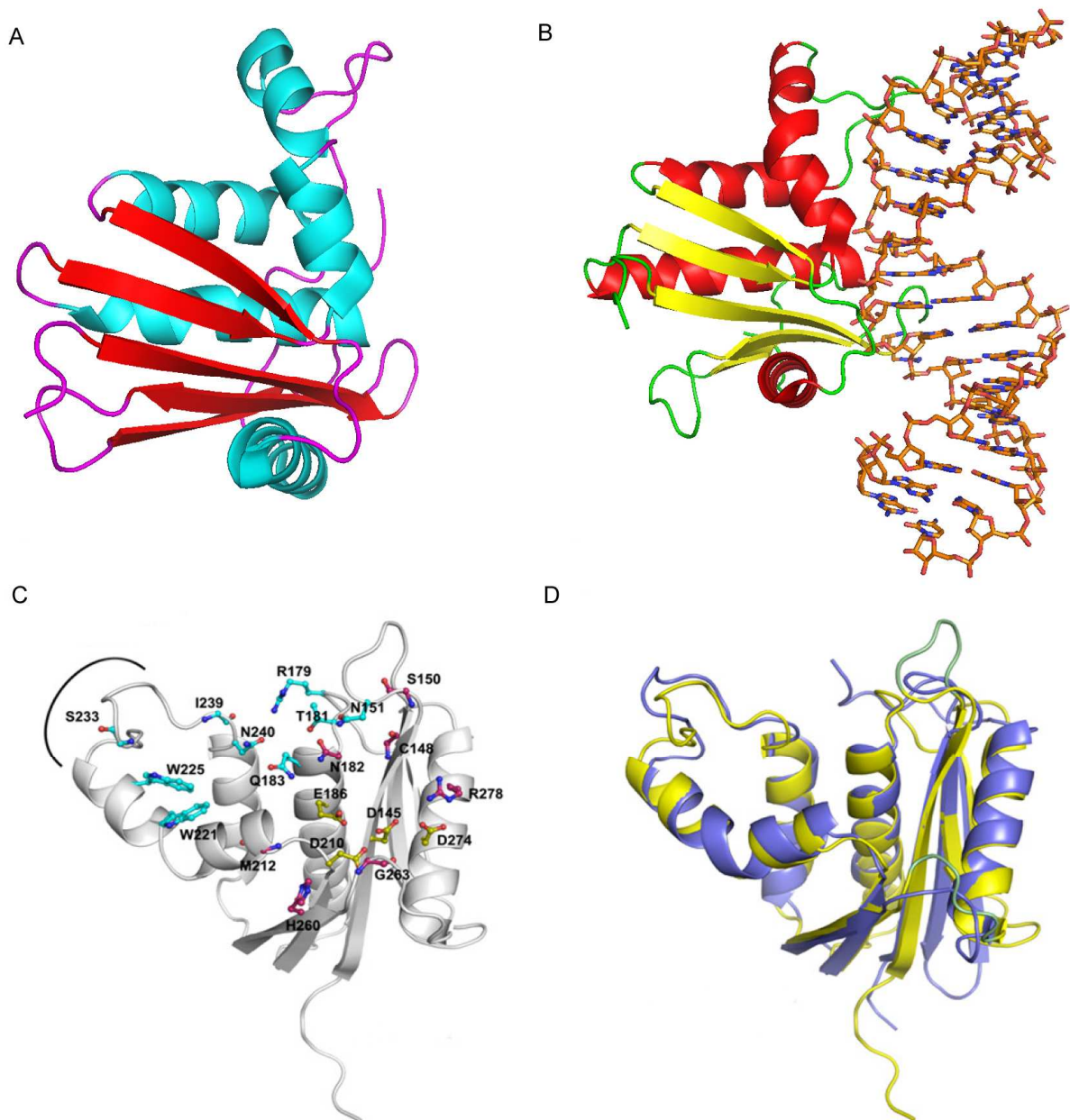
Najważniejszy z mechanizmów antysensowych, prowadzący do destabilizacji komórkowego RNA, to aktywacja RNaz specyficznych względem dupleksów RNA-DNA (rybonukleaza H) lub RNA-RNA (interferencja RNA). Destabilizacja RNA może się także odbywać na drodze nieenzymatycznej, poprzez celowanie antysensowych oligonukleotydów w regiony mRNA odpowiedzialne za jego stabilność, jak struktura 5' kapu, czy ogon poli-A, o czym częściowo wspomniano w poprzednim podrozdziale, co jest jednak zdecydowanie gorzej poznane i udokumentowane.

2.2.1 Aktywacja rybonukleazy H

Rybonukleaza H jest endonukleazą komórkową, należącą do klasy nukleotydylotransferaz, występującą powszechnie u organizmów prokariotycznych, eukariotycznych oraz u wirusów. Katalizuje hydrolizę nici RNA w heterodupleksach RNA/DNA. Biologicznie, jej funkcja wiąże się z zapewnieniem stabilności DNA w procesach replikacji i naprawy, transkrypcji, a u wirusów także odwrotnej transkrypcji, poprzez usuwanie m.in. krótkich RNA, pojawiających się na szlakach wspomnianych procesów. RNaza H należy do rodziny białek, obejmujących wiele izotypów, które różnią się masą molekularną, lecz wykazują podobną aktywność i preferencje substratowe. Wszystkie znane rybonukleazy H wymagają do działania jonów dwuwartościowych, zwykle Mg^{2+} i/lub Mn^{2+} , a podczas hydrolizy RNA generują produkty posiadające grupę fosforanową na końcu 5' i grupę hydroksylową na końcu 3' [54, 55].

W komórkach prokariotycznych zidentyfikowano dotychczas trzy klasy enzymów o aktywności rybonukleazy H: RNaza HI reprezentująca typ 1, oraz RNaza HII i RNaza HIII należące do typu 2. Obydwa typy wykazują niską homologię sekwencyjną, natomiast ich trzeciorzędowe struktury są podobne. Najbardziej rozpowszechnioną wśród bakterii jest rybonukleaza HII, natomiast najlepiej poznaną – rybonukleaza HI z *E. coli*. Prokariotyczne rybonukleazy H, pomimo przynależności do jednej klasy, mogą wykazywać znaczne różnice w sekwencji aminokwasowej, strukturze domen i specyficzności względem substratów, zależnie od gatunku [56]. U żadnego z prokariotów nie wykryto aktywności enzymów wszystkich trzech klas jednocześnie. Ponadto, genomy bakteryjne zawierają często kilka genów kodujących RNazę H danej klasy. Postuluje się, że zwielokrotnienie tych genów, obserwowane także dla genomów eukariotycznych, stanowi ochronę przed letalną mutacją, pozbawiającą organizm aktywności rybonukleazy H.

Rybonukleaza HI z *E. coli* jest białkiem monomerycznym, zbudowanym ze 155 aminokwasów, o masie molekularnej 17,6 kDa i strukturze typu $\alpha+\beta$, w obrębie której pięć arkuszy β jest rozlokowanych między pięcioma α -helisami. Wykazuje ona silną homologię sekwencyjno-strukturalną do C-końcowej domeny katalitycznej ludzkiej RNazy H1 [57] (Rysunek 1). W sekwencji występuje kilka wysoce zakonserwowanych ewolucyjnie reszt aminokwasowych, tworzących miejsce aktywne, odpowiadających za wiązanie jonów dwuwartościowych, preferencyjnie jonów magnezu, i reszt biorących udział w wiązaniu substratu. Miejsce aktywne wiążące jony magnezu zawiera charakterystyczny motyw DEDD, tworzony przez łańcuchy boczne aminokwasów: Asp10, Glu48, Asp70 i Asp134. W przypadku ludzkiej RNazy H1 są to odpowiednio Asp145, Glu186, Asp210, Asp274. Motyw ten zawiera także rybonukleaza H stanowiąca podjednostkę odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Jego rolą jest odpowiednie ustawienie względem siebie jonów magnezu, cząsteczek wody i heterodupleksu RNA/DNA, tak by mogła zajść wydajna hydroliza. Podkreśla się także znaczenie histydyny 124 (His264 dla ludzkiej RNazy H), której obecność sprzyja uwalnianiu produktu [56]. Miejsce aktywne otoczone jest α -helisami zawierającymi reszty lizyny, które na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych pozycjonują heterodupleks w miejscu aktywnym [58, 59]. Hydroliza RNA w heterodupleksie z DNA przebiega według mechanizmu dwujonowej katalizy, dość powszechnego dla wielu rybonukleaz. Zgodnie z nim, jeden jon metalu inicjuje wytworzenie nukleofilu, w postaci jonu hydroksylowego z cząsteczki wody, który atakuje grupę fosforanową substratu (RNA). Drugi z jonów stabilizuje produkt przejściowy w postaci cyklicznego fosforanu i ułatwia uwolnienie 3'oksyjonu [60]. Ludzka RNaza H1, zlokalizowana przed wszystkim w jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie [61], jest 286-aminokwasowym, monomerycznym białkiem o masie 32kDa, przy N-końcu zawierającym 26-aminokwasową sekwencję sygnałną. Odpowiada ona za kierowanie enzymu do mitochondriów, i może być odcinana, lub pozostawać, zależnie od potrzeb komórki. W odróżnieniu od RNazy HI z *E. coli*, ludzka rybonukleaza H zbudowana jest z trzech domen. N-końcowa 73-aminokwasowa domena wiążąca heterodupleks (HBD, ang. *hybrid binding domain*) jest połączona z C-końcową domeną katalityczną, nieustrukturalizowaną domeną łączącą. Funkcja 62-aminokwasowej domeny łączącej nie jest sprecyzowana, udowodniono natomiast, że jest ona konieczna dla aktywności enzymu [59, 62]. Domena N-końcowa, oprócz wiązania heterodupleksów, posiada także właściwość wiązania homodupleksów RNA/RNA, jednak nie są one



Rysunek 1. Struktury krystalograficzne rybonukleaz H: (A) RNaza HI z *E. coli*, pdbID: 1RDD, (B) domena katalityczna ludzkiej RNazy H1(mutant D210N) w kompleksie z 18-nukleotydowym dupleksem RNA/DNA, pdbID: 2QK9, (C) reszty aminokwasowe domeny katalitycznej ludzkiej RNazy H1 zaangażowane w: katalizę (żółty), wiązanie RNA (różowy), wiązanie DNA (niebieski), (D) Nałożone struktury RNazy HI z *E.coli* (fiolet) i domeny katalitycznej ludzkiej RNazy H (żółty) [63].

hydrolizowane. Związanie homodupleksu RNA/RNA lub heterodupleksu RNA/DNA zasadniczo nie zmienia konformacji enzymu [63]. Ważna dla aktywnej hydrolizy substratu jest szerokość mniejszej bruzdy dupleksu. RNA przyjmuje zwykle formę helisy typu A, natomiast DNA – helisy typu B. Powstały heterodupleks RNA/DNA, przyjmujący pośrednią, nietypową konformację helisy typu A/B, jest charakterystyczny w swojej strukturze, czym determinuje aktywność hydrolityczną enzymu [58, 64]. Dwie lizyny i tryptofan w obrębie

domeny wiążącej RNA, pozycjonują enzym na pierwszej parze dupleksu RNA/DNA, natomiast domena katalityczna przeprowadza cięcie w odległości o jeden skręt helisy od miejsca związania enzymu [59].

U człowieka, obok RNazy H1 występuje także RNaza H2. Ludzka RNaza H2 jest kompleksem enzymatycznym występującym w jądrze komórkowym jako heterotrimer, zbudowanym z 3 podjednostek 2A, 2B i 2C [65, 66]. Podjednostka 2A o długości 299 aminokwasów i masie cząsteczkowej 33,4 kDa, spełnia funkcję katalityczną i wykazuje podobieństwo do monomerycznej prokariotycznej rybonukleazy HII. Podjednostki 2B i 2C, o masie odpowiednio 34,8 kDa i 17,8 kDa, zbudowane z 308 i 164 aminokwasów są integralnym składnikiem kompleksu, istotnym dla jego procesywności, jednakże ich funkcja nie została dotychczas sprecyzowana [67]. Kompleks RNazy H2, rozpoznając sąsiedztwo nukleotydów RNA-DNA, wykazuje aktywność wobec dupleksów DNA/DNA zawierających nawet pojedynczy rybonukleotyd. Zasadniczo więc różni się aktywnością od rybonukleazy H1, wspierając jednak tę samą funkcję w komórce czyli udział w procesach naprawy DNA. Wiadomo, że oligonukleotydy aktywujące RNazę H1 nie indukują aktywności RNazy H2 [61, 68].

Degradacja docelowego mRNA, w oparciu o rekrutację komórkowej rybonukleazy H1 przez heterodupleks RNA/DNA, jest uznawana za najlepiej poznany, najbardziej efektywny i najczęściej wykorzystywany mechanizm antysensowy. Rozwiązana struktura enzymu i stosowanie różnego rodzaju modyfikacji chemicznych w obrębie grup funkcyjnych oligonukleotydów, pozwalają na jego ciągłe ulepszanie poprzez poprawianie specyficzności w celu maksymalnej możliwej eliminacji efektów *off-target*.

2.2.2 Interferencja RNA

Zjawisko interferencji RNA polega na wysoce specyficznej inhibicji ekspresji genów, na poziomie potranskrypcyjnym, w odpowiedzi na dwuniciowe RNA obecne w komórce. Uważa się, że mechanizm ten został wypracowany w celu zabezpieczenia komórki przed wpływem materiału genetycznego pochodzącego z zewnątrz, w postaci wirusów, transgenów i transpozonów. Wiadomo także, że komórka używa tego samego mechanizmu do regulacji ekspresji własnych genów.

W szlaku RNAi biorą udział dwa typy małych regulatorowych RNA: miRNA i siRNA, różniące się pochodzeniem i powstawaniem w komórce, a u ssaków także mechanizmem działania. Są to krótkie, 21-28-nukleotydowe, dwuniciowe RNA, rozpoznające docelowe mRNA w oparciu o regułę komplementarności i tworzenie par zasad typu Watsona-

Cricka. MiRNA powstają z długich prekursorów tworzących struktury typu spinki, charakteryzujących się niepełną komplementarnością, i są produktem ekspresji własnego genomu komórki. SiRNA są generowane z długich, całkowicie komplementarnych dwuniciowych RNA, zwykle pochodzenia egzogenne [69, 70], jakkolwiek poznano także endogenne siRNA. Dojrzewanie i aktywność obydwu typów cząsteczek zależne są od białek z rodziny RNazy III oraz Argonaute (Ago). Rodzina białek sklasyfikowanych jako RNaza III, reprezentowana przez enzymy Dicer i Drosha, odpowiada za wycinanie funkcjonalnych si- oraz miRNA z ich prekursorów, natomiast białka Ago katalizują degradację docelowego komórkowego mRNA, włączonego przez jedną z nici małych dsRNA w kompleks RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*).

Formowanie kompleksu RISC u człowieka polega na asocjacji trzech białek: Dicer, TRBP i Ago-2. Powstały trimer ma zdolność wiązania dwuniciowych RNA, generowania z nich siRNA, włączania siRNA w miejsce aktywne Ago-2 i usuwania nici pasażerskiej, wytwarzając funkcjonalny RISC. Druga z nici, zwana nicią wiodącą, kieruje kompleks RISC do docelowego komplementarnego mRNA, prowadząc do jego degradacji. Degradacja jest indukowana przez domenę PIWI białka Ago, która przeprowadza hydrolizę wiązania fosfodiesterowego między nukleotydami docelowego RNA tworzącymi pary z 10 i 11 nukleotydem siRNA, uwalniając produkty zakończone wolną resztą 5'-fosforanową i 3'-hydroksylową [70]. Proces selekcji nici wiodącej opiera się na porównaniu stabilności termodynamicznej obu końców dupletu siRNA. Nić, której 5' koniec znajduje się przy mniej stabilnym termodynamicznie końcu dupletu wybierana jest na nić wiodącą. Duplet o równie stabilnych końcach generuje dwie nici wiodące, włączane do kompleksu RISC w równym stopniu [70]. Po przecięciu, docelowe RNA oddysocjowuje, uwalniając siRNA, które zdolne jest rekrutować kolejne komplementarne RNA.

Białka typu Dicer, generujące funkcjonalne siRNA z ich prekursorów, charakteryzują się specyficzną sekwencją domen katalitycznych, z których kluczowe dla aktywności hydrolitycznej enzymu są domena PAZ i dwie domeny RNazy III. Wycinanie siRNA następuje preferencyjnie od końców długich dsRNA. Domena PAZ jest specyficzna także dla białek Ago, i jest wyspecjalizowana w wiązaniu końców dupletu RNA, zwłaszcza zawierających od strony 3' wolne nukleotydy. Dicer posiada centrum katalityczne zwykle w odległości dwóch skrętów helisy dupletu od miejsca związania końców, gdzie dwie domeny RNazy III, tworzące wewnątrzcząsteczkowy dimer, przecinają po jednej nici dupletu, generując nowe 3'-końce z dwunukleotydowym niesparowanym fragmentem [25]. Odległość między domenami PAZ i RNazy III warunkuje długość powstałych siRNA

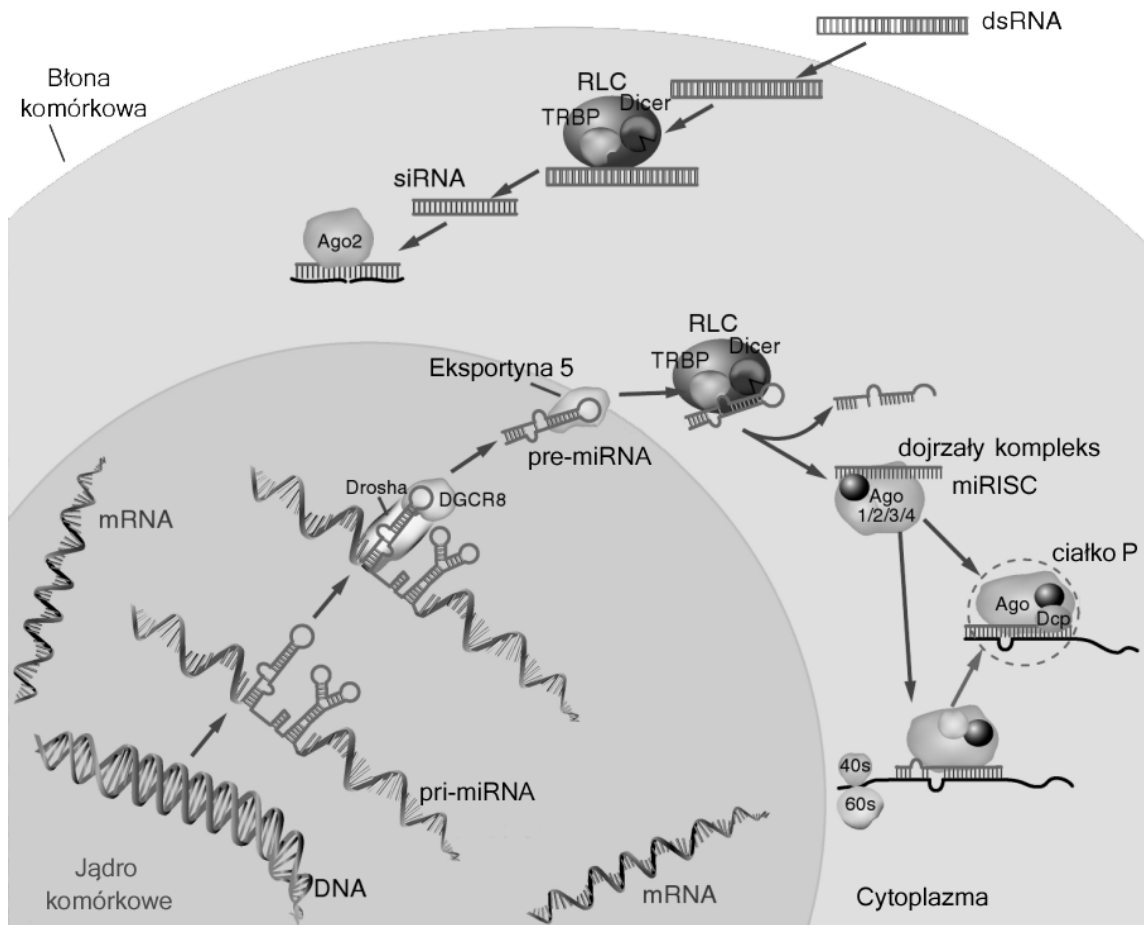
i miRNA [71, 72]. Aktywność rybonukleazy Dicer u człowieka jest niezależna od ATP, w przeciwieństwie do enzymów z *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*, u których mutacje w obrębie domeny ATPazy skutkowały zniesieniem aktywności Dicer.

Proces biogenezy mikroRNA przebiega dwuetapowo. Ich długie ustrukturalizowane prekursor, zwane pri-miRNA (ang. *primary microRNA*) są produktem transkrypcji przeprowadzanej przez polimerazę RNA II, rzadziej III, z międzygenowych regionów DNA, sekwencji intronowych, lub z nici sensowej DNA; posiadają 5' kap i sygnał poliadenylacji [73]. Obróbka pri-miRNA zależy od jego zwinięcia w strukturę typu spinki. Pierwszym etapem dojrzewania tej cząsteczki jest wycięcie struktury typu spinki, zwykle składającej się z około 33 nie w pełni komplementarnych par zasad, zakończonych pętlą z jednej strony, i jednoniciowymi segmentami okalającymi z drugiej strony. Etap ten zachodzi w jądrze komórkowym z udziałem tzw. kompleksu mikroprocesora, składającego się z rybonukleazy Drosha, należącej do białek z rodziny rybonukleazy III, oraz kofaktora w postaci dwóch domen wiążących dwuniciowe RNA (dsRBD, ang. *double stranded RNA Binding Domain*), określanych jako DGCR8. Asocjacja z kofaktorem zapewnia wydajne i precyzyjne wycinanie pre-miRNA z pri-miRNA [74], jako że pozycjonuje on rybonukleazę Drosha w odległości jednego skrętu dwuniciowej helisy RNA (11 par zasad) od miejsca łączenia segmentów flankujących i trzonu helisy. Dzięki asocjacji z DGCR8, pierwszy etap obróbki generuje bardzo dokładne końce powstającego miRNA, które zwiększają jego specyficzność względem docelowego RNA, rekompensując w ten sposób niepełną komplementarność sekwencji przy rozpoznawaniu celu [25]. U zwierząt zaobserwowano także alternatywny szlak powstawania pre-miRNA, bez udziału kompleksu mikroprocesora. Pre-miRNA, strukturalnie upodabniając się do intronów w obrębie pri-miRNA, zostają wycięte na drodze splicingu [75, 76]. Jest to proces zdecydowanie rzadszy, ale spotykany w komórkach zwierzęcych. Powstałe pre-miRNA są transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie z udziałem rybonukleazy Dicer zostaje odcięta pętla terminalna i wytworzony drugi koniec funkcjonalnego dupleksu miRNA/miRNA*.

Dojrzały dupleks miRNA/miRNA*, przy udziale rybonukleazy Dicer, asocjuje z białkiem Ago i białkiem GW182 tworząc funkcjonalny kompleks miRISC. W obrębie kompleksu, dupleks miRNA/miRNA* zostaje rozpleciony, nicią wiodącą zostaje zwykle nić miRNA, podczas gdy nić miRNA* zostaje utracona, jako że jej degradacja przez Ago, tak jak odbywa się to w przypadku siRNA, jest najczęściej uniemożliwiona obecnością niesparowań. Podobnie jak w przypadku siRNA, wybór nici wiodącej opiera się na stabilności

termodynamicznej końców, mniej stabilny koniec 5' staje się końcem 5' nici wiodącej. Ogólny schemat interferencji RNA przedstawia rysunek 2.

Znacząca liczba miRNA powstaje pod kontrolą genów, których ekspresję reguluje, działając na zasadzie podwójnie ujemnego sprzężenia zwrotnego. U zwierząt, z racji niedoskonałej komplementarności do docelowego RNA, miRNA częściej funkcjonują na zasadzie sterycznej blokady transkryptu. Do prawidłowego rozpoznania docelowej sekwencji kluczowy jest tzw. region seed, znajdujący się między 2-8 nukleotydem od 5' końca miRNA [26]. Obecność niesparowań, zwłaszcza umiejscowionych centralnie w obrębie dupletu, inhibuje aktywność białka Ago, promując mechanizm represji translacji, uznawany za wiodący w przypadku funkcjonowania miRNA w komórce zwierzęcej. Z pewnymi wyjątkami, miejsca wiązania miRNA znajdują się głównie w regionach 3'UTR mRNA i są tam reprezentowane w kilku kopiach. Z kolei mikroRNA funkcjonujące w komórce roślinnej charakteryzują się zwykle pełną komplementarnością do docelowej cząsteczki RNA, hybrydują w regionach kodujących, i prowadzą do degradacji RNA katalizowanej przez białko Ago.



Rysunek 2. Mechanizm interferencji RNA [77]

Dla niektórych mRNA regulowanych przez miRNA obserwuje się spadek ilości kopii w komórce, powodowany jednak nie degradacją przez białko Argonaute, lecz destabilizacją wynikającą z kierowania mRNA przez miRNA na szlaki deadenyacji, odłączania 5' kapu i egzonukleolitycznego trawienia przez komórkowe rybonukleazy. Proces ten wymaga współdziałania białka Ago, GW182 oraz komórkowych maszynerii katalizujących wspomniane procesy. Niewyjaśnione jest, czy taka destabilizacja jest konsekwencją represji translacji. Istnieją dowody, że jest to niezależny mechanizm dezaktywacji niektórych mRNA [25, 78, 79].

3 Terapeutyki oligonukleotydowe

Oligonukleotydy, czyli krótkie jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA, mogą być wykorzystane jako narzędzia w terapii genowej, działając na kilku poziomach ekspresji genu. Podejście antygenowe zakłada stosowanie oligonukleotydów DNA, tzw. TFO (ang. *Triplex Forming Oligonucleotide*) zdolnych do hybrydyzacji do dwuniciowego DNA na zasadzie oddziaływań typu Hoogsteena, i inhibicji jego transkrypcji, przez steryczne zablokowanie dostępności substratu dla czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA [80-82]. Podejście antysensowe wykorzystuje naturalne oraz modyfikowane oligonukleotydy DNA i RNA, w celu zatrzymania ekspresji genu na poziomie pre-mRNA/mRNA. Technologie antysensowe z racji prostego, dobrze poznanego, naturalnego dla kwasów nukleinowych sposobu wzajemnego oddziaływania, w oparciu o regułę komplementarności, zdecydowanie zdominowały zastosowanie oligonukleotydów w terapii genowej. Narzędzia oligonukleotydowe służące jako potencjalne terapeutyki można ogólnie podzielić ze względu na sposób działania, na kilka grup: antysensowe oligonukleotydy, siRNA, rybozymy, oraz aptamery.

3.1 Generacje antysensowych oligonukleotydów

Środowisko komórki, w którym antysensowe oligonukleotydy mają spełniać swoje funkcje terapeutyczne, nie sprzyja ich stabilności i aktywności. Z tego względu stosuje się cząsteczki DNA lub RNA w różny sposób modyfikowane chemicznie, zbudowane najczęściej z około 13-25 nukleotydów, komplementarne do określonych komórkowych mRNA [83]. Pierwszy problem dla ASO stanowi wnikanie do komórki. Z reguły, oligonukleotydy pobierane są przez komórkę na drodze adsorpcyjnej endocytozy, inicjowanej w kilku

możliwych szlakach [84], a następnie w zależności od aktywowanej ścieżki, są przekazywane do określonego kompartmentu komórkowego. Wprowadzanie ASO w postaci biokonjugatów z różnego typu ligandami, ułatwiającymi integrację z błoną komórkową, czy stosowanie nośnikowych nanocząstek, ma pomóc w ich dostarczaniu, możliwie bez szkód dla komórki i bezpośrednio w przedział subkomórkowy, do którego mają trafić. Po drugie, po wnikięciu, wszechobecne w komórce enzymy nukleolityczne bardzo szybko degradują naturalne kwasy nukleinowe, zwłaszcza pochodzenia egzogenne, nie posiadające swoistych sygnałów ochronnych (jak np. komórkowe mRNA). Ponadto dowiedziono, że produkty degradacji naturalnych oligonukleotydów mogą być cytotoksyczne i wywoływać efekty antyproliferacyjne, poprzez inhibicję niektórych białek kluczowych dla cyklu komórkowego jak np. kinaza tymidynowa [85-87]. Aby pokonać wspomniane ograniczenia, wprowadzono szereg modyfikacji chemicznych, zwiększających efektywność działania oligonukleotydów antysensowych w środowisku komórkowym i często pomagających redukować efekty niespecyficzne (ang. *off-target effects*), poprzez zwiększenie powinowactwa do docelowych mRNA i termodynamicznej trwałości tworzonych dupleksów. Modyfikacje te mogą dotyczyć każdej składowej nukleotydu, tj. zasady heterocyklicznej, reszty cukrowej oraz reszty fosforanowej, przy czym umiejscowienie modyfikacji zwykle determinuje mechanizm działania zawierającego ją oligonukleotydu.

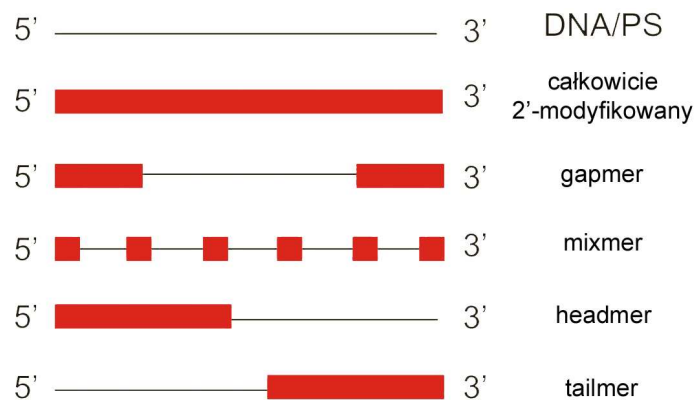
Oligonukleotydy antysensowe pierwszej generacji zawierają podstawienia w obrębie reszt fosforanowych i są efektem pionierskich prac w zakresie modyfikacji oligonukleotydów. Pierwszym chemicznie zsyntetyzowanym modyfikowanym oligonukleotydem był metylofosfonian DNA [88]. Częsteczka DNA zawierała podstawienie jednego z niewiążących atomów tlenu grupy fosforanowej grupą metylową, co powodowało zniesienie jej ujemnego ładunku. Pomimo dużej stabilności w układach biologicznych, oligonukleotydy te wykazywały obniżoną rozpuszczalność, nie indukowały aktywności rybonukleazy H w dupleksach z RNA, które z kolei charakteryzowały się obniżoną trwałością termodynamiczną. Wszystkie te cechy dyskryminowały stosowanie metylofosfonianów w podejściach antysensowych [83].

Podobną modyfikacją DNA, opisaną w późnych latach 60-tych XX wieku, było podstawienie jednego z niewiążących atomów tlenu grupy fosforanowej atomem siarki [89]. Powstały w ten sposób oligonukleotyd tiofosforanowy (PS, ang. *Phosphorothioate Oligonucleotide*), został poraz pierwszy wykorzystany 18 lat później, do inhibicji replikacji wirusa HIV [90]. Wprowadzenie internukleotydowego wiązania tiofosforanowego w miejsce tradycyjnego wiązania fosfodiesterowego, zwiększyło odporność oligonukleotydu na działanie

nukleaz, wydłużając czas półtrwania w ludzkim serum około 10-krotnie [91-93]. Nie zaburzyło ono tworzenia kanonicznych par Watsona-Cricka, ani zdolności aktywacji rybonukleazy H, utrzymując jednocześnie ujemny ładunek cząsteczki DNA i dobrą rozpuszczalność w wodzie. Wprowadzenie do wiązania fosfodiesterowego siarki zamiast tlenu przy atomie fosforu w oligonukleotydzie powoduje, że taki oligonukleotyd staje się chiralny. Dowiedziono, że jedynie izomer S charakteryzuje się zwiększoną stabilnością względem nukleaz, natomiast izomer R zachowuje się podobnie jak oligonukleotyd zawierający naturalne wiązanie fosfodiesterowe. Wszystkie przedstawione właściwości świadczyły o dużej atrakcyjności wspomnianej modyfikacji w kontekście strategii antysensowej, i rzeczywiście, do dziś wiązanie tiofosforanowe to jedna z wiodących modyfikacji oligonukleotydów testowanych klinicznie. Jednak intensywne jej zastosowanie w badaniach komórkowych ujawniło, że szkielet tiofosforanowy indukuje niezależne od sekwencji, a zależne od długości, zwiększone powinowactwo do białek wiążących polianiony, jak wiele czynników wzrostu (FGF, ang. *Fibroblast Growth Factor*, VEGF, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), laminina, fibronektyna [94], generując tym samym efekty cytotoksyczne. Ponadto, duplekсы tworzone z RNA charakteryzują się, podobnie jak w przypadku metylofosfonianów, obniżoną trwałością termodynamiczną, w stosunku do dupleksów DNA/RNA, średnio o 0,5°C na parę nukleotydów.

W odpowiedzi na ograniczenia oligonukleotydów antysensowych pierwszej generacji, rozwinięto nową grupę modyfikacji, poprawiających stabilność termodynamiczną tworzonych dupleksów, specyficzność wiązania docelowych mRNA i odporność na komórkowe nukleazy. Do oligonukleotydów drugiej generacji zalicza się cząsteczki posiadające podstawiony atom wodoru przy grupie hydroksylowej w pozycji 2' rybozy, przede wszystkim grupą metylową (2'-OMe) i metoksyetylową (2'-MOE). Okazały się one mniej toksyczne niż tiofosforany DNA, nie mają jednak zdolności aktywacji RNazy H, ze względu na zbyt małą szerokość mniejszej bruzdy helisy dupleksu (forma A-RNA). Z tego względu nie prowadzą one do degradacji mRNA, a jedynie do sterycznego zablokowania jego dalszej ekspresji (inhibicja translacji, modulacja splicingu, zaburzenie funkcjonalnej struktury RNA, por. rozdział 2.1). Jednak by zapewnić możliwie najwydajniejsze działanie, w większości zastosowań oligonukleotydy drugiej generacji łączą w sobie kilka modyfikacji, występując w postaci tzw. gapmerów. Cząsteczki takie zawierają centralnie umieszczony trzon sekwencji (ang. *gap*), zbudowany z nukleotydów DNA lub tiofosforanowych DNA, który na każdym z końców zawiera kilka rybonukleotydów modyfikowanych grupami 2'-OMe lub 2'-MOE. Wykazano, że już 4-5 nukleotydowy gap jest wystarczający do aktywacji rybonukleazy H, zarówno

z *E. coli* jak i ludzkiej [95, 96], natomiast otaczające go nukleotydy 2'-modyfikowane wydajnie chronią oligonukleotyd przed degradacją nukleolityczną. Testowano wiele sposobów rozlokowania opisanych modyfikacji w obrębie oligonukleotydu (Rysunek 3) i wykazano, że konfiguracja gapmeru jest rozwiązaniem najbardziej efektywnym, zapewniającym cząsteczce antysensowej najlepsze cechy obydwu generacji modyfikacji. Obecność 2'-O-modyfikowanych nukleotydów flankujących gap, zwiększa specyficzność hydrolizy indukowanej przez dany gapmer, ograniczając trawienie do miejsc hybrydyzacji z fragmentem DNA. Odnosząc to do miejsc alternatywnego wiązania oligonukleotydu, gapmer potencjalnie będzie się wiązał silniej i przeprowadzi bardziej specyficzną hydrolizę niż oligonukleotyd DNA, czy tiofosforanowy DNA o tej samej sekwencji. Dzieje się tak z racji konfiguracyjnie ukierunkowanego miejsca hydrolizy oraz wzmocnionego powinowactwa i zwiększonej stabilności termodynamicznej końców dupleksu z docelową sekwencją [97, 98].

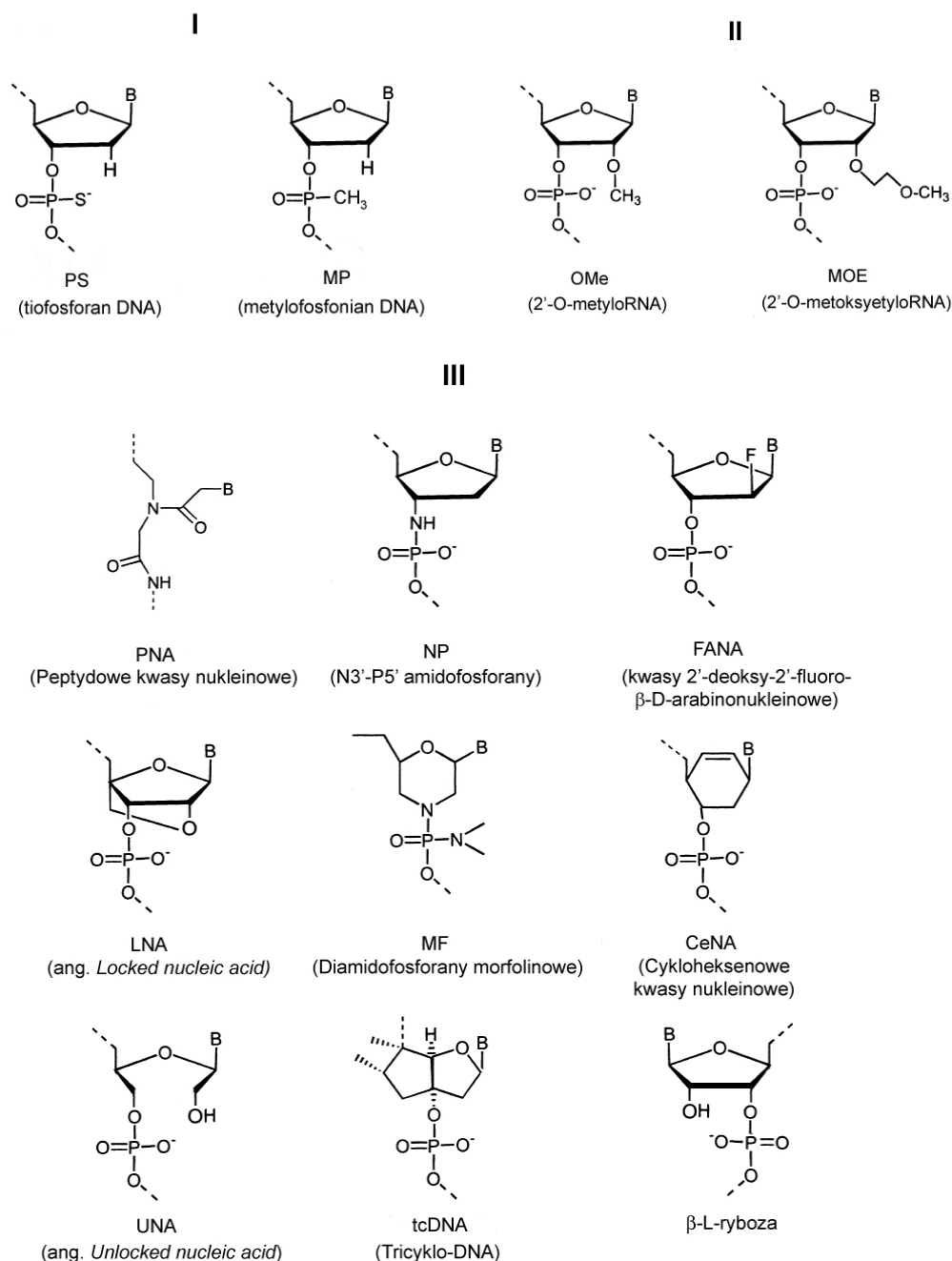


Rysunek 3. Konfiguracje oligonukleotydów chimerowych [99]

Projektowanie i testowanie nowych modyfikacji poprawiających właściwości ASO ciągle trwa. Oligonukleotydy trzeciej generacji stanowią najbardziej różnorodną pod względem chemicznym grupę związków.

Niejednokrotnie reprezentowane w próbach klinicznych są analogi oligonukleotydów, tzw. PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*) zawierające elastyczny, pozbawiony ładunku szkielet poliamidowy, zbudowany z jednostek N-(2-aminoetylo)-glicyny, do którego zasady heterocykliczne przyłączone są metylenowo-karbonyłowym łącznikiem [100-102]. Oligomery te tworzą trwałe duplekisy lub trypleksy z naturalnymi DNA i RNA, są stabilne w środowisku komórkowym, nie wykazują niespecyficznego powinowactwa do białek, nie aktywują także żadnych komórkowych nukleaz, działając jedynie na zasadzie zawady

przestrzennej. Mogą hybrydyzować zarówno do dwuniciowego DNA, działając jako czynnik antygenowy i blokując inicjację transkrypcji oraz powstawanie RNA, jak i do RNA, wpływając na jego składanie, lub inhibując inicjację translacji czy wydłużanie łańcucha polipeptydowego [103-105].



Rysunek 4. Generacje antysensowych oligonukleotydów.

Innym przykładem modyfikacji szkieletu fosforanowego są N3'-P5' amidofosforany, w których grupa 3'-hydroksylowa deoksyrybozy jest podstawiona grupą aminową. Modyfikacja ta zwiększa powinowactwo do komplementarnej nici RNA oraz podnosi

odporność na nukleazy. Dupleksy mRNA/ N3'-P5' amidofosforany nie indukują hydrolizy z udziałem rybonukleazy H. Potencjał tych oligonukleotydów został udowodniony *in vivo*, w eksperymentach wyciszających ekspresję genu *c-myc*, których efektem było zatrzymanie białaczki szpiku u myszy [106].

Wśród oligonukleotydów posiadających modyfikowaną resztę cukrową można wyróżnić LNA (ang. *Locked Nucleic Acid*), FANA (ang. *2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabino nucleic acid*), oligonukleotydy morfolinowe (MF, ang. *Morpholino Oligonucleotides*), CeNA (ang. *Cyclohexene nucleic acids*), tricyklo-DNA (tcDNA). Ich struktury przedstawione są na rysunku 4. LNA, z racji usztywnionej, przez mostek metylenowy pomiędzy atomami O2' i C4', konformacji C3'-endo rybozy, znacząco podnosi trwałość termodynamiczną tworzonych dupleksów. Jednak w rezultacie przyjmowania przez dupleks struktury helisy typu A, niemożliwa jest jego hydroliza z udziałem rybonukleazy H. Obecność modyfikacji LNA w oligonukleotydach chroni je przed aktywnością nukleolityczną, znacząco poprawiając ich czas półtrwania w komórce i w płynach ustrojowych. Nukleotydy LNA często występują razem z DNA, w postaci oligonukleotydów chimerowych (np. gapmery). Z racji ich większego, od naturalnych kwasów nukleinowych, powinowactwa do komplementarnych sekwencji, mogą być także stosowane w innych funkcjonalnych kwasach nukleinowych jak rybozomy i DNAzomy, sztuczne siRNA [107], a także w starterach do reakcji PCR i RT-PCR [108], w celu poprawienia ich efektywności w procesach, w które są zaangażowane. Jednak silne powinowactwo LNA do tworzenia par zasad może być także źródłem efektów niespecyficznych, co w niektórych przypadkach może być czynnikiem ograniczającym ich zastosowanie.

W przypadku oligonukleotydów FANA, resztę cukrową stanowi epimer rybozy, arabinoza, podstawiona przy węglu 2' atomem fluoru. Jest to jedyna jak dotąd modyfikacja pierścienia cukrowego, zdolna indukować aktywność hydrolityczną rybonukleazy H w dupleksach z RNA [109-111]. Widma dichroizmu kołowego wykazały, że dupleksy RNA/FANA posiadają konformację helisy zbliżoną do dupleksów RNA/DNA. Uważa się, że atom fluoru wystaje w głąb większej bruzdy helisy, co powoduje, że nie zaburza on mechanizmu hydrolitycznego RNazy H. Udowodniono że modyfikacja ta przynosi lepsze efekty występując w oligonukleotydach chimerowych, niż w jednorodnych oligomerach. Przykładowo, zastosowanie oligonukleotydów chimerowych FANA/PS w kulturach komórkowych, skutkowało 30-krotnym spadkiem IC₅₀ w stosunku do czystych oligonukleotydów tiofosforanowych [110].

Oligonukleotydy morfolinowe to niejonowe analogi DNA, wnoszące modyfikacje jednocześnie w obrębie reszty cukrowej i wiązania fosfodiesterowego. Pentoza zastąpiona jest pierścieniem morfolinowym, który łączy się z kolejnym, przez pozbawione ładunku wiązanie diamidofosforanowe. Cząsteczki te są stabilne w układach biologicznych, lecz nie działają w oparciu o mechanizm angażujący rybonukleazę H. Trwałość tworzonych przez nie dupleksów z RNA jest porównywalna do dupleksów RNA/DNA. Domyślnym dla MF mechanizmem działania jest inhibicja inicjacji translacji, z tego też względu, najlepiej ukierunkowywać te oligonukleotydy na region 5'UTR i pierwszych 25 nukleotydów od kodonu start [98].

Rzadziej stosowane oligonukleotydy CeNA i tcDNA to kolejne przykłady na wzmocnienie powinowactwa i siły oddziaływań z komplementarną nicią RNA. W przypadku dupleksów z CeNA, odnotowano bardzo powolną hydrolizę z udziałem rybonukleazy H, około 600-krotnie wolniejszą w porównaniu do standardowego dupleksu RNA/DNA [112, 113]. Z kolei dla tricyklo-DNA obserwowano niezwykle efektywną modulację alternatywnego splicingu mRNA β -globiny, w porównaniu z kontrolnie zastosowanym chimerowym tiofosforanem 2'-O-metylo-RNA [114].

Jedną z najnowszych, wprowadzanych do kwasów nukleinowych modyfikacji, jest UNA (ang. *Unlocked Nucleic Acid*). Prowadzi ona do rozluźnienia struktury dupleksu, natomiast wykazuje kompatybilność z mechanizmem RNazy H, blokuje także aktywność 3'-egzonukleazową w teście fosfodiesterazy z jadu węża (ang. *Snake venom phosphodiesterase*). Wykazuje niską cytotoksyczność, w zasadzie nie indukuje efektów niespecyficznych z racji obniżonego powinowactwa do komplementarnych sekwencji, stanowiąc tym samym potencjalne źródło modyfikacji dla siRNA, modyfikacji struktur G-kwadrupleksów i celowanych w nie aptamerów [115].

Niedawno pojawiły się także doniesienia o obiecującej aktywności oligonukleotydów zawierających w szkielecie fosforanowo-cukrowym, zamiast naturalnie występującej D-rybozy, jej izomer optyczny - L-rybozę. Cząsteczki te, będące lustrzanym odbiciem naturalnych kwasów nukleinowych, poraz pierwszy w serii RNA opisane 15 lat temu [116, 117], okazały się specyficzne sekwencyjnie i odporne na komarkowe nukleazy w zastosowaniu jako rybozomy (tzw. spiegelzomy [118], por. rozdział 3.3). Inne badania wykazały, że zastosowanie, nawet w wysokich dawkach, L-RNA jako aptamerów (por. rozdział 3.4) *in vivo*, nie powodowało efektów ubocznych [119], i nie indukowało odpowiedzi immunologicznej [120]. W serii deoksyrybonukleotydów enancjomery L znane były od 1993 roku, jednak nie udowodniono, że jako oligonukleotydy mogą tworzyć stabilne

heterodupleksy z RNA [121]. Im więcej L-nukleotydów zawierała cząsteczka, tym wyższa była destabilizacja dupleksów [122]. Oligonukleotydy chimerowe zawierające L/D-DNA hybrydując do RNA aktywowały RNazę H i wykazywały stabilność w ludzkim serum [122].

Dla potrzeb oligonukleotydów antysensowych, zakres modyfikacji pierścienia heterocyklicznego zasad azotowych jest znacznie ograniczony ze względu na fakt, że występowanie oddziaływań typu Watsona-Cricka między nimi jest podstawą działania strategii antysensowych [123]. Wprowadzenie modyfikacji przy zasadzie może wpływać na zaburzenie tych oddziaływań i obniżenie specyficzności sekwencyjnej oligonukleotydu. Testowano na przykład modyfikacje zasad pirymidynowych, jak 5-propynylo-cytosyna, 5-metylo-cytosyna czy tzw. G-clamp, które wzmacniały powinowactwo oligonukleotydów do wiązania się zarówno z DNA jak i RNA [124, 125]. 5-propynylo-cytosyna zwiększając potencjał działania oligonukleotydów tiofosforanowych, okazała się być silnie hepatotoksyczna, co dyskwalifikuje wykorzystanie terapeutyczne oligonukleotydów ją zawierających [126].

Mnogość modyfikacji kwasów nukleinowych, dostępnych na potrzeby strategii antysensowych, sprawia, że potencjalnie każda modulacja ekspresji genów wydaje się możliwa i stosunkowo prosta w realizacji, z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych ASO. Jednak wiele zagadnień w odniesieniu do oddziaływań syntetycznych modyfikowanych oligonukleotydów w komórce pozostaje niezbadanych, wskutek czego globalne konsekwencje ich aktywności w układach biologicznych mogą sięgać znacznie dalej niż jest to obserwowane.

3.2 siRNA

Omawiane w poprzednim podrozdziale modyfikacje mogą być także wprowadzane do dupleksów siRNA w celu kontroli selekcji nici wiodącej, zwiększenia ich trwałości w komórce, czy wzmocnienia powinowactwa do hybrydyzacji z komplementarnym celem, i eliminacji efektów niespecyficznych. Najczęściej wykorzystywane w przypadku małych interferencyjnych RNA są modyfikacje 2'-O-metylo-RNA, LNA i UNA. Dwie pierwsze z nich, stabilizujące oddziaływania w dupleksie, zwiększają też stabilność w otoczeniu komórkowym, z kolei zastosowanie nukleotydów UNA, destabilizujących oddziaływania w dupleksie, może być rozpatrywane jako idealne rozwiązanie do programowania trwałości termodynamicznej końców i naznaczania nici wiodącej. Dowiedziono jednak, że wprowadzenie modyfikacji UNA na końcach 5' nici sensowej i antysensowej siRNA,

skutkowało całkowitym zahamowaniem szlaku RNAi, natomiast ograniczenie jej występowania jedynie do nici sensowej, przywróciło aktywność siRNA, w dalszym ciągu limitując wyciszanie nici sensowej, jednocześnie zwiększając potencjał wyciszający nici antysensowej. Obecność UNA na 5' końcu syntetycznej nici siRNA okazała się blokować jej fosforylację w komórce, niezbędną do oddziaływania w kompleksie RISC [127, 128].

W obrębie siRNA testowano także inne, wspomniane już modyfikacje, jak 2'-F-RNA, 2'-O-allilo, czy tiofosforany RNA. Modyfikacja 5' końcowego nukleotydu 2'-O-allilo-RNA skutkowała, podobnie jak w przypadku UNA, utratą aktywności cząsteczki [127, 129, 130]. Całkowita modyfikacja typu 2'-O-metylo-RNA lub PS-RNA skutkowała wzmożoną cytotoksycznością [131, 132], natomiast duplekсы zawierające kombinację modyfikacji 2'-O-metylo-RNA i 2'-F-RNA działały efektywnie *in vitro* i *in vivo* [133].

W celu racjonalnego projektowania siRNA, należy pamiętać, że zarówno rybonukleaza Dicer, jak i białko Argonaute, zaangażowane w katalizę w szlaku RNAi, mają określone wymagania strukturalne względem substratu, przez co zbyt daleko idąca zmiana helikalności struktury dupleksu w obrębie dojrzałego RISC, może skutkować zahamowaniem jego aktywności.

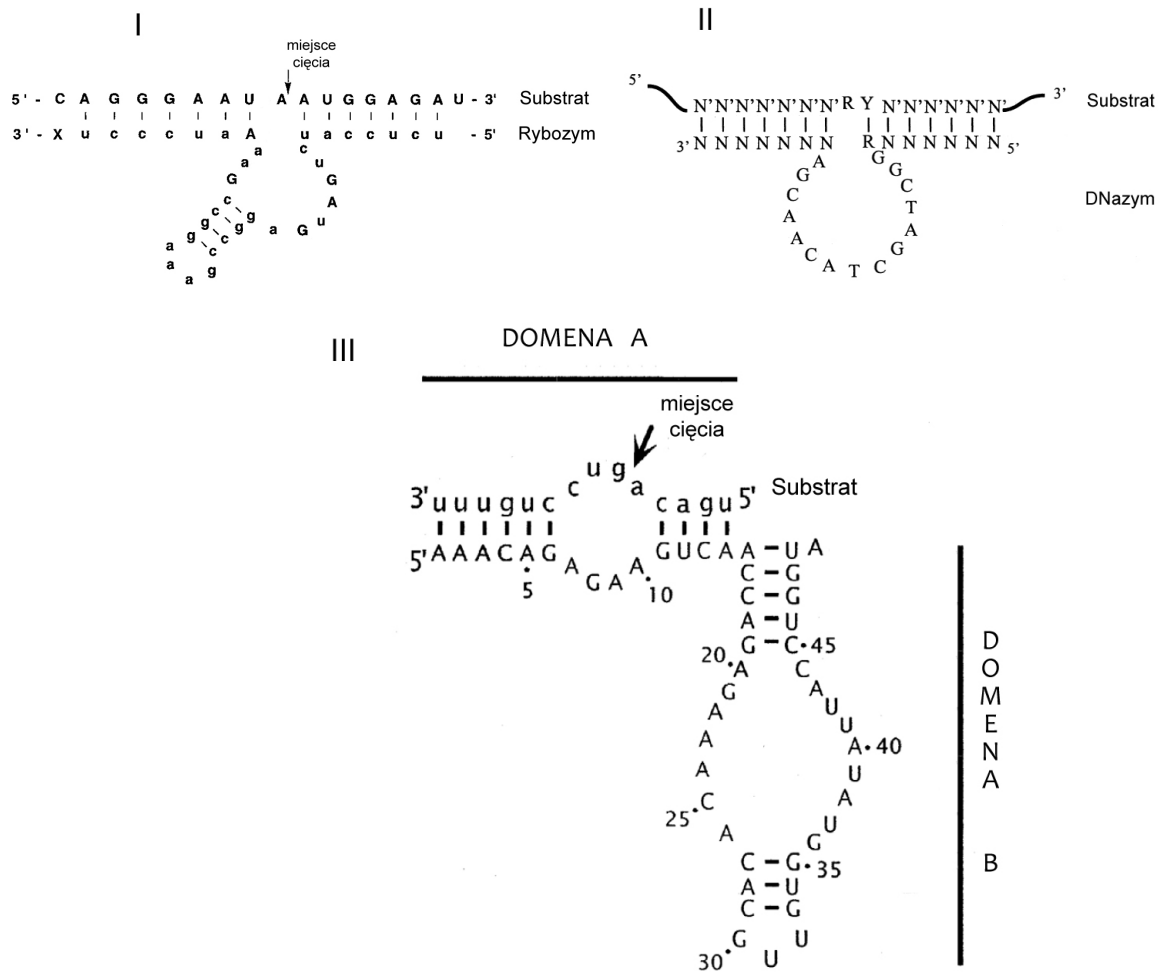
3.3 Rybozomy i DNAzomy

Rybozomy (ang. ***ribonucleic enzymes***) to katalityczne kwasy nukleinowe, zdolne do przeprowadzenia hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w sposób analogiczny do białkowych enzymów, w naturze działając przede wszystkim *in cis*. Aktywność rybozomu w dużej mierze jest determinowana strukturą drugorzędową. Katalizowana przez rybozym reakcja, naturalnie może być odwracalna, jeśli substraty po reakcji pozostają ze sobą jakkolwiek związane, co oznacza że oprócz hydrolizy, możliwa jest także ligacja RNA. Znanych jest wiele przykładów naturalnych rybozymów, działających w oparciu o różne mechanizmy jak rRNA, RNaza P, introny grupy I i II, rybozym HDV, *hairpin* czy *hammerhead*. Małe rybozomy jak *hammerhead* i *hairpin* stanowią wzorzec i odniesienie dla projektowania sztucznych rybozymów i DNAzymów do zastosowań terapeutycznych [134, 135].

Najlepiej poznanym jest rybozym *hammerhead*. Został wyizolowany poraz pierwszy z wiroidów RNA pozyskanych z roślin [136, 137], a jego rozdzielenie na część katalityczną i nici substratowe, doprowadziło do uzyskania aktywności *in trans*, na wolnym substracie [138, 139]. Ukazało to potencjał rybozymów dla zastosowań jako terapeutyki w układach biologicznych.

Syntetyczne rybozomy posiadają zwykle część antysensową, komplementarną do właściwego sobie celu, oraz określoną strukturę drugorzędową, która umożliwia im aktywność hydrolityczną. Przykłady ilustruje rysunek. 5. Najmniejszy aktywny *hammerhead* to niespełna 40-nukleotydowa cząsteczka, posiadająca domenę katalityczną otoczoną przez dwa ramiona wiążące substrat [98]. Katalizuje ona trawienie, komplementarnej do ramion wiążących, sekwencji RNA w obrębie występowania sekwencji U-H, gdzie H to każdy nukleotyd z wyjątkiem guanozyny. Przykładowy rybozym *hairpin*, pochodzący z satelitarnego RNA wirusa pierścieniowej plamistości tytoniu (TRSV ang. *Tobacco Ringspot Virus*) posiada dwie niezależnie fałdujące domeny A i B, z których każda zawiera pętlę wewnętrzną otoczoną strukturami helikalnymi. Domena A tworzy opisaną strukturę po związaniu substratu [140]. Cięcie następuje w obrębie pętli wewnętrznej domeny A, zawsze za sekwencją CUG. Reakcje katalizowane przez rybozomy *hammerhead* i *hairpin* są silnie stymulowane obecnością kationów metali [140]. DNAzomy to cząsteczki całkowicie sztuczne, stworzone na wzór aktywnych rybozymów.

Aby stworzyć wydajnie działające w komórce rybozomy, należy odpowiednio je zaprojektować, mając na uwadze, analogiczne jak w przypadku ASO, ograniczenia i zagrożenia płynące ze środowiska, w jakim mają działać. Podstawowymi problemami są tu ponownie efektywne dostarczanie do komórki, zapewnienie stabilności w obecności nukleaz, oraz zapewnienie funkcjonalnej struktury. Stabilizacja rybozymów z wykorzystaniem różnych modyfikacji chemicznych, w obrębie grup funkcyjnych kwasów nukleinowych, jest o tyle trudniejsza, że wprowadzanie ich często indukuje konformacyjne zmiany struktury, pozbawiające cząsteczkę aktywności. Analizując wiele możliwych typów i kombinacji modyfikacji dla rybozymu *hammerhead*, Beigelman i wsp. zidentyfikowali kluczowe w jego aktywności grupy hydroksylowe przy pięciu nukleotydach purynowych G5, A6, G8, G12 i A15.1, pozostawiając je bez modyfikacji, reszta nukleotydów zawierała modyfikację 2'-O-Me-RNA, a 3' koniec został zabezpieczony połączoną wiązaniem 3'-3' fosfodiestrowym tymidyną (tzw. odwrócona tymidyna). Dodatkowo obecność modyfikacji 2'-C-allilo-urydyny w pozycji 4, lub 2'-amino-urydyny w pozycjach 4 i 7 zwiększała stosunek stabilności do aktywności ponad 1500-krotnie w stosunku do naturalnego rybozymu RNA [141]. Równie efektywny, a bardziej stabilny od naturalnego rybozymu *hammerhead*, okazał się DNAzym 10-23, skonstruowany z deoksyrybonukleotydów. Charakteryzuje się wysoką specyficznością sekwencyjną i jest zdolny katalizować każde połączenie puryny i pirymidyny w dedykowanym miejscu cięcia [142].



Rysunek 5. Schematyczne struktury drugorzędowe małych rybozymów: naturalny rybozym *hammerhead* [141], DNazym 10-23 [142], rybozym *hairpin* [140].

Dostarczanie rybozymów do komórki przeprowadza się w sposób analogiczny do ASO, najczęściej wykorzystując do tego celu kationy lipidowe. Wykazano, że stabilizowane rybozomy dużo efektywniej niż ASO są pobierane przez komórkę bez żadnego systemu transfekcyjnego. Po ich bezpośrednim podaniu do mazi stawowej obserwowano, na przykład, spadek poziomu mRNA metaloproteiny stromelizyny indukowanej interleukiną 1 α [143]. Mimo to, udział różnego rodzaju nośników transfekcyjnych wydaje się przynosić większe korzyści, gdyż poprawa wydajności wnikania kwasów nukleinowych do komórki, przekłada się na zwiększenie efektywności ich działania. W przypadku rybozymów niejednokrotnie sprawdzały się wektory ekspresyjne. Rybozym kodowany w plazmidzie powstawał w komórce analogicznie jak jej własne RNA, wtedy jednak był rybozymem nie zawierającym nukleotydów modyfikowanych. Zaobserwowano, że przyłączenie do rybozemu niskocząsteczkowego linkera poli(etylenoiminy) skutkowało nie tylko zwiększonym jego

pobieraniem przez komórkę, ale nadawało także cząsteczce odporność na komórkowe nukleazy [144].

Kilka rybozymów testowanych było w badaniach klinicznych. Modyfikowany rybozym Angiozyme, przeciwko czynnikom wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF, został zaprojektowany w celu ograniczenia wzrostu nowotworów przez zablokowanie procesu angiogenezy [145]. Inny modyfikowany rybozym Heptazyme ukierunkowany był na region IRES wirusa zapalenia wątroby typu C i udokumentowano, że w kulturach komórkowych prowadził on do zahamowania replikacji wirusa w 90% [146]. Obecnie prowadzone są prace nad rybozymami anti-HIV (rybozym OZ1 [147]) czy modyfikowaną RNazą P [148].

3.4 Aptamery i SELEX

Aptamery to względnie krótkie kwasy nukleinowe (około 40-180 nukleotydów) zarówno RNA jak i DNA, których sekwencja umożliwia zwinięcie do określonych struktur drugo- i trzeciorzędowych, działających jak ligandy i wiążących docelową cząsteczkę z powinowactwem i specyficznością porównywalną do przeciwciał monoklonalnych [107]. Cząsteczki te mają ogromny potencjał względem wielu różnych celów jak jony metali, barwniki, neuroprzekaźniki, nukleotydy, aminokwasy, oligonukleotydy, antybiotyki, białka, organella, a nawet całe komórki, jak np. zarodniki *Bacillus anthracis* (Iasieczka wąglika, Davlieva 2014), służąc zarówno do celów diagnostycznych jak i terapeutycznych. Uzyskiwane są w procedurze SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), nazywanej także selekcją *in vitro*, SAAB (ang. *Selected And Amplified Binding site*) lub CASTing (ang. *Cyclic Amplification and Selection of Targets*). Działa ona w oparciu o mechanizm imitujący darwinowską selekcję naturalną, w którym miarą sukcesu jest dopasowanie [149, 150]. Syntetyczną bibliotekę jednoniciowych oligonukleotydów DNA o losowej sekwencji, otoczonej regionami stanowiącymi startery w reakcji PCR, selekcjonuje się przez jej inkubację w określonych warunkach z docelowym ligandem, a następnie usunięcie niezwiązanych oligonukleotydów, najczęściej na drodze chromatografii powinowactwa. Oligonukleotydy, które związały docelową cząsteczkę wymywa się z kolumny i amplifikuje, a następnie ponownie wystawia na interakcje z ligandem. Cykl taki powtarza się 10-15 razy, zaostrażając za każdym razem warunki elucji, by wyselekcjonować tylko najbardziej specyficznie związane cząsteczki. W przypadku selekcji aptamerów RNA, syntetyczny prekursor DNA zawiera w obrębie sekwencji promotor dla polimerazy T7 RNA, umożliwiając etap transkrypcji. Długość sekwencji w bibliotece determinuje jej złożoność. Krótkie około 10-nukleotydowe fragmenty często nie tworzą odpowiednich funkcjonalnych

motywów, z kolei wytworzenie długich sekwencji często ograniczone jest wydajnością chemicznej syntezy. Wiele naturalnych miejsc oddziaływań kwasów nukleinowych i białek angażuje regiony 15-25 nukleotydowe. Przyjęto, że taka długość sekwencji, powstała z losowo wbudowywanych nukleotydów, jest wystarczająca, generując pulę 10^{13} - 10^{15} różnych wariantów sekwencyjnych aptamerów [151].

Często także wykorzystuje się modyfikowane nukleotydy, głównie pochodne rybozy podstawione w pozycji 2', jak 2'-F-RNA, 2'-O-metylo-RNA, czy 2'-N-metylo-RNA [152], a także nukleotydy LNA, czy *spiegelmer* (lustrzane odbicia aptamerów), by zwiększyć trwałość i zmniejszyć cytotoksyczność selekcionowanych cząsteczek, przez wyeliminowanie efektów ubocznych [107]. Znając charakterystykę poszczególnych modyfikacji i miejsca kluczowe dla aktywności oligonukleotydów, niezależnie czy są to ASO, rybozomy, siRNA, czy aptamery, można skutecznie regulować ich aktywność i stabilność, uzyskując wysoce specyficzne oligonukleotydowe narzędzia terapeutyczne.

Kamieniem milowym w zastosowaniu technologii aptamerów było zatwierdzenie przez amerykańską agencję do spraw żywności i leków (FDA ang. *Food and Drug Administration*) pierwszego leku aptamerowego, o nazwie Macugen, przeciw związanemu z wiekiem zwyrodnieniu plamki żółtej.

4 Alleloselektywne wyciszanie genów

Zjawisko wyciszania genów tradycyjnie wiąże się z epigenetyczną regulacją ich ekspresji, na drodze reakcji chemicznych, modyfikujących zasady azotowe w DNA i RNA (np. metylacja), z udziałem komórkowych enzymów. Odkąd znana jest strategia antysensowa, potranskrypcyjne wyciszanie genów z jej wykorzystaniem, stało się potencjalnym sposobem terapii wielu chorób powodowanych aktywnością nieprawidłowych białek czy RNA, generowanych przez mutacje. Odkrycie interferencji RNA umożliwiło niezwykle selektywne celowanie w określony wariant genu, dzięki wysokiej specyficzności sekwencyjnej kompleksu RISC, i jego zdolności identyfikowania pojedynczych niesparowań w obrębie katalizowanych dupleksów. Strategia ta ma szczególne znaczenie w przypadku zmian genetycznych dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, gdzie selektywna degradacja zmutowanego wariantu genu, spośród kilku współistniejących prawidłowych alleli, może zatrzymać rozwój choroby.

Zdecydowana większość badań, prezentujących alleloselektywne różnicowanie ekspresji genu, wykorzystuje aktywność białka Argonaute. Specyficzność tradycyjnego

szlaku antysensowego z zastosowaniem rybonukleazy H, wydaje się być niewystarczająca, wszystko jednak zależy od specyfiki czynnika różnicującego obydwa allele. Intensywnie i powszechnie testowane są modele chorób neurodegeneracyjnych, reprezentujące mutacje dziedziczone w sposób dominujący, zgodnie z prawami Mendla. Wiele prób podejmuje się względem chorób poliglutaminowych, przede wszystkim choroby Huntingtona i ataksji mózdkowo-rdzeniowych, w których współistnieją allele różniące się liczbą trójnukleotydowych powtórzeń CAG. Celowanie w regiony powtórzeń, z wykorzystaniem siRNA, nie przyniosło jednak oczekiwanych efektów. Zaczęto więc wykorzystywać neutralne polimorfizmy, występujące poza traktem powtórzeń, których warianty segregują z określonymi allelami [153-155]. Są to zarówno polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, jaki i kilkunukleotydowe delecje bądź insercje, obecne w jednym tylko z alleli. Obserwowano, że wprowadzanie niesparowań do dupleksu siRNA wzmacniało różnicę w powinowactwie do określonego wariantu genu, zwiększając specyficzną degradację w szlaku RNAi [156]. Takie podejście zaowocowało znacznym wzrostem selektywności, stając się szeroko wykorzystywanym sposobem na różnicowanie dwóch form tego samego genu. Często podejmowanym celem są także geny zaangażowane w rozwój choroby Alzheimera i ALS, dla których istnieją sprawdzone modele mysie [157].

Strategia alleloselektywnego wyciszania umożliwia także różnicowanie ekspresji izoform RNA, generowanych w wyniku alternatywnego splicingu. Różne izoformy tego samego RNA mogą powstawać np. zależnie od stopnia zróżnicowania danej komórki, lub być tkankowo specyficzne. Przykładowo, czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF, występuje w pięciu izoformach, z których jedna jest silnie zaangażowana w angiogenezę nowotworów. Selektywne wyciszenie tej izoformy prowadzi do ograniczenia wzrostu guza, nie zaburzając funkcji innych izoform, kluczowych dla normalnego funkcjonowania komórki [158, 159].

Dowiedziano, że wprowadzenie odpowiednio modyfikowanych nukleotydów może zwiększyć potencjał antysensowych oligonukleotydów względem siRNA. Stosując oligomery PNA i oligonukleotydy zawierające LNA, osiągnięto specyficzną degradację zmutowanej ataksyny 3 i huntingtyny z wykorzystaniem tradycyjnych mechanizmów antysensowych, które okazały się być bardziej skuteczne niż krótkie dwuniciowe RNA [160].

5 Mutacje i polimorfizmy w genomie ludzkim

Genomy nieustannie ewoluują, a jednym z podstawowych źródeł ich zmienności są mutacje. Zasadniczo wyróżnia się dwa rodzaje zmian w materiale genetycznym: (1) mutacje spontaniczne, powstające wskutek błędów procesu replikacji, naturalnie występujących deaminacji i depurynacji, czy zjawiska transpozycji oraz (2) mutacje indukowane wpływem środowiska zewnętrznego, np. promieniowanie jonizujące, UV, określone substancje chemiczne, wirusy, transgeny itp. Częstość mutacji jest wypadkową wspomnianych czynników i jest różna dla różnych organizmów, zależna od wielkości genomu, liczby i tempa podziałów komórkowych, stopnia zróżnicowania komórek i tkanek, itd. [161]. U ssaków szacuje się, że wynosi ona średnio 1 na 1-10 milionów komórek *per locus* na generację, co oznacza, że przeciętnie każdy osobnik posiada co najmniej jeden gen, który uległ mutacji w komórkach rozrodczych. U ludzi tempo mutacji genów jest większe u mężczyzn, i wzrasta z wiekiem, ze względu na znacznie większą liczbę podziałów komórkowych w procesie spermatogenezy, w porównaniu np. z oogenezą u kobiet [161, 162]. Dzięki mechanizmom naprawczym, jakie wykształciła komórka broniąc się przed przekazywaniem wadliwego materiału genetycznego, mutacje są w znacznym stopniu eliminowane. Istnienie mechanizmów naprawczych nie wyklucza jednak całkowicie pojawiania się przypadkowej zmienności sekwencji genomu.

Mutacje można podzielić ze względu na ich zasięg, na trzy główne grupy: (a) mutacje genowe, zwane także nukleotydowymi lub punktowymi, dotyczące pojedynczych nukleotydów, (b) mutacje chromosomowe, dotyczące przemieszczenia, utraty lub powielenia fragmentu chromosomu oraz (c) mutacje genomowe, związane ze zwielokrotnieniem całego genomu (powszechne u roślin, letalne u zwierząt).

Mutacje spontaniczne polegają najczęściej na miejscowych zmianach nukleotydów w sekwencji, stąd nazywane są genowymi lub punktowymi. Zmiana ta może wystąpić jako: (i) substytucja, czyli podstawienie jednego nukleotydu innym, (ii) delecja, czyli utrata pojedynczego lub kilku nukleotydów, (iii) insercja, czyli pojawienie się dodatkowego nukleotydu w sekwencji. W zależności od regionu genu w jakim się pojawią (ekson, intron, sekwencja regulatorowa), mutacje te mogą wywoływać efekt fenotypowy w postaci zmiany aktywności lub funkcji genu (ang. *gain of function* – zyskanie dodatkowej aktywności funkcjonalnego produktu genu; ang. *loss of function* – utrata funkcji genu), lub mogą pozostać bez wpływu na gen w jakim wystąpią m.in. ze względu na degenerację kodu genetycznego. Insercje i delecje pojedynczych nukleotydów zwykle wiążą się ze zmianą ramki odczytu, co

w przypadku eksonów, oznacza, że w procesie ekspresji takiego genu powstaje produkt o innym składzie aminokwasowym i właściwościach, a przez to dysfunkcjonalny.

Wśród substytucji wyróżnia się tranzycje i transwersje. Tranzycje dotyczą podstawienia puryny inną puryną lub pirymidyny inną pirymidyną, natomiast transwersje to zmiany puryny na pirymidynę, i odwrotnie. Bioinformatyczne analizy częstości mutacji wskazują, że prawdopodobieństwo wystąpienia poszczególnych typów mutacji nie rozkłada się równomiernie i pewne typy substytucji występują częściej niż inne, m.in. ze względu na budowę chemiczną zasad azotowych. Zależność tą obserwowano nie tylko dla człowieka ale także innych organizmów (*Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Pan troglodytes*, *Danio rerio*). Z obserwacji tych wynika, że generalnie tranzycje są częstsze od transwersji, a w obrębie tranzycji, częściej występuje zmiana G/A, oraz C/T niż A/G oraz T/C [163, 164]. (Tab.)

U organizmów wielokomórkowych, mutacje które zaszły w komórkach rozrodczych i przekazane zostały kolejnym pokoleniom, mają szansę utrwalić się w populacji. Jeśli występują w niej z częstością powyżej 1%, nie powodując przy tym efektów fenotypowych, określane są mianem polimorfizmów. Mutacje punktowe są zatem źródłem SNPs (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*), które w toku ewolucji mogą generować nowe allele genów.

Istnieje wiele chorób człowieka wywoływanych występowaniem mutacji punktowych, pojawiających się *de novo*, jak i dziedziczonych, zarówno w sposób dominujący (neurofibromatoza, achondroplazja, zespół Marfana), jak i recesywny (fenyloketonuria, galaktozemia, albinizm, alkaptonuria, choroba Tay-Sachsa, anemia sierpowata, mukowiscydoza). Wiadomo także, że polimorfizmy, o ile bezpośrednio nie powodują, to często predysponują do rozwoju określonych schorzeń, stanowiąc dzięki temu swoiste markery diagnostyczne. Znalezienie czynnika selektywnie różnicującego allel prawidłowy i zmutowany, w wielu przypadkach pozwoliłoby potencjalnie uniknąć rozwoju i następstw choroby.

6 Neurodegeneracja warunkowana obecnością mutacji punktowych

Neurodegeneracja czyli postępująca utrata struktury i funkcji komórek nerwowych, prowadząca do ich śmierci, jest przyczyną wielu chorób układu nerwowego. Jest to proces nieodwracalny, złożony i zależny od wielu czynników, zarówno genetycznych jak i środowiskowych. W przeważającej większości, mechanizmy procesów

neurodegeneracyjnych pozostają nieznane, pomimo, iż dla wielu jednostek chorobowych zidentyfikowano molekularne przyczyny stanu patologicznego.

Najczęstsze z chorób neurodegeneracyjnych, dotykające ludzkość współcześnie to choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer disease*), choroba Parkinsona (PD, ang. *Parkinson disease*) i stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). W około 90% są to przypadki sporadyczne, nieuwarunkowane genetycznie. Dominującym czynnikiem ryzyka zachorowania jest postępujący wiek. Ze względu na starzenie się populacji, a także postęp w diagnostyce umożliwiający wzrost wykrywalności chorób, liczba corocznych zachorowań zwiększa się systematycznie. Znamienne jest, że choć każda z tych chorób może mieć różny przebieg u różnych pacjentów, objawy psychosomatyczne w większości przypadków pokrywają się. Z histopatologicznego punktu widzenia, przyczyną wspomnianych chorób jest odkładanie się złogów niepoprawnie pofałdowanych białek, tworzących agregaty i prowadzących do zaburzeń funkcji neuronu i uszkodzeń jego struktury.

Mutacje nukleotydowe analizowane w niniejszej pracy, występujące w obrębie genów APP (ang. *Amyloid-beta Precursor Protein*), SNCA (ang. *Synuclein-alpha*) i SOD1 (ang. *Superoxide dysmutase 1*), związanych z omawianymi powyżej chorobami neurodegeneracyjnymi, skutkują istotną dla struktury produktów białkowych zmianą aminokwasu w sekwencji. Zmiana ta generuje powstawanie niepoprawnie pofałdowanego białka, zwiększającego pulę szkodliwych agregatów. Substytucje te stanowią przyczynę choroby w jej dziedzicznej postaci, związanej zwykle z ujawnieniem się w młodszy wieku, dotyczą więc nielicznej grupy pacjentów. Zmiany te zatem, pojawiając się kiedyś *de novo* jako SNP w komórkach płciowych, wytworzyły allele patogenne, które utrwały się, zostając przekazane kolejnym pokoleniom. Prawdopodobieństwo, że zmiana genetyczna, stanowiąca przyczynę sporadycznych postaci choroby, pojawiająca się *de novo*, zajdzie w komórkach płciowych, jest jednak zdecydowanie mniejsze, niż to, że zajdzie ona w komórkach somatycznych, bezpośrednio funkcjonujących w zmieniających się warunkach, np. stresu oksydacyjnego.

6.1 Choroba Alzheimera

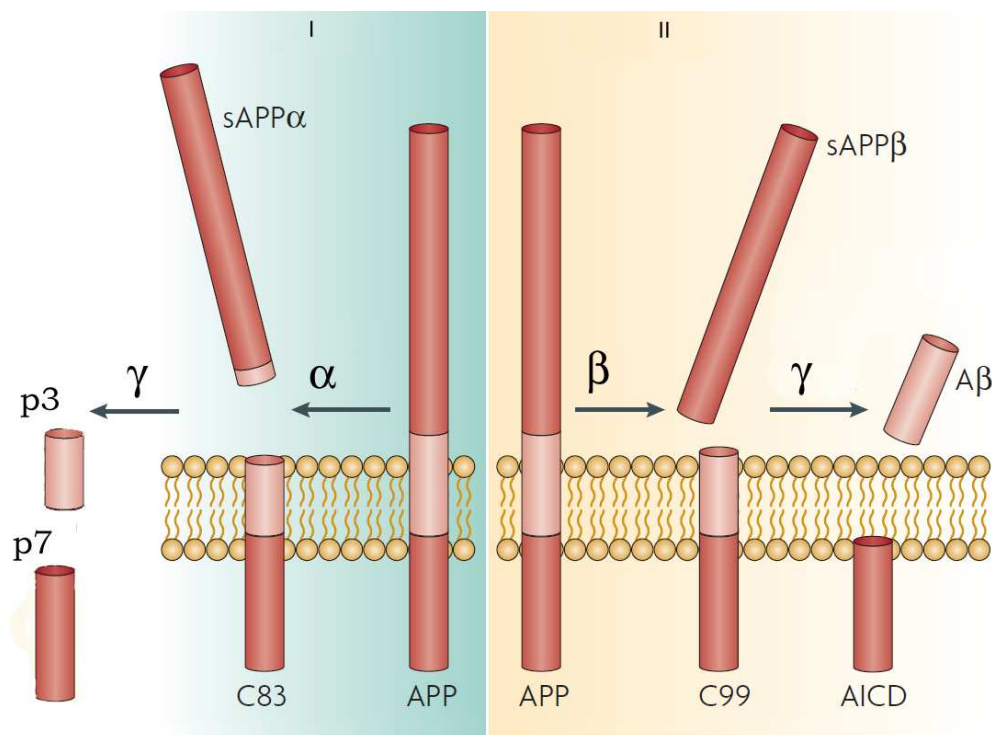
Rodzinna postać choroby Alzheimera dotyczy około 5% wszystkich przypadków, ujawnia się wcześnie, zwykle między 40 a 65 rokiem życia i jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. Rozróżnienie jej od formy sporadycznej, stanowiącej około 95% przypadków, na podstawie objawów klinicznych, jest bardzo trudne, jako że w obydwu postaciach obserwowane są zewnątrzkomórkowe, ale także wewnątrzkomórkowe depozyty β -

amyloidu ($A\beta$) [165-168], określane jako płytki starcze, oraz wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne (ang. *Neurofibrillary tangles*, NTFs), złożone z hiperfosforylowanego białka *tau* [169-171]). Molekularne podłoże rodzinnej postaci Alzheimerera związane jest z mutacjami w obrębie trzech genów: APP, PSEN1 i PSEN2. Gen APP (ang. *Amyloid- β Protein Precursor*), znajdujący się na chromosomie 21, koduje białko prekursorowe β -amyloidu, integralne białko transbłonowe występujące w komórkowej plazmalemmie, a także w błonach siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego, endosomów, lizosomów czy mitochondriów. W największym stężeniu występuje ono w synapsach neuronów, odgrywając główną rolę w patogenezie choroby Alzheimerera.

Białko prekursorowe β -amyloidu ulega regulowanej transbłonowej proteolizie (mechanizm RIP, ang. *Regulated Intramembrane Proteolysis*) w dwóch możliwych szlakach, z udziałem α -, β -, γ -sekretyz (Rysunek 6). W szlaku nieamyloidogennym, α -sekretyza przecina je, generując rozpuszczalną, długą N-końcową domenę sAPP α , wydzielaną zewnątrzkomórkowo, oraz 83-aminokwasowy, zakotwiczony w błonie fragment C-końcowy, który następnie ulega cięciu przez kompleks γ -sekretyazy, złożony z heterodimerów presenilin 1 i 2 (kodowany przez geny PSEN1 i PSEN2), do rozpuszczalnych peptydów p3 i p7 [168, 172]. Poszczególne fragmenty białka APP pełnią rolę w transporcie aksonalnym, adhezji komórek, metabolizmie cholesterolu, transkrypcji genów i procesach poznawczych (uczenie się i zapamiętywanie), mając duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu [168, 173-175]. Szlak amyloidogenny związany jest z proteolizą białka APP przez β -sekretagę. Generuje ona N-końcową domenę sAPP β , uwalnianą zewnątrzkomórkowo, oraz dłuższy, 99-aminokwasowy C-końcowy fragment transbłonowy. W wyniku aktywności γ -sekretyazy, fragment zakotwiczony w błonie jest hydrolizowany do 40-42-aminokwasowego nierozpuszczalnego, fibrylarnego peptydu $A\beta$, będącego głównym składnikiem złogów amyloidowych i 59-aminokwasowej, cytozolowej reszty (AICD, ang. *beta-APP intracellular domain*). $A\beta$ -42 jest formą najbardziej hydrofobową, co determinuje jej większe zdolności do tworzenia blaszek amyloidowych.

Mutacje w obrębie eksonów 16 i 17, kodujących peptyd $A\beta$, wpływają na jego metabolizm i stabilność, stanowiąc przyczynę pewnego odsetka rodzinnej postaci AD, dziedziczonej w sposób dominujący. Tzw. wariant londyński genu APP, zawierający mutację punktową G/A w kodonie 717, polegającą na zamianie waliny na izoleucynę (V717I), skutkuje wzmożoną produkcją formy $A\beta$ -42 w stosunku do $A\beta$ -40, co sugeruje istotną rolę waliny 717 w procesie proteolizy prowadzonej przez γ -sekretagę. Potwierdzeniem tego jest obserwacja, że dwie inne mutacje w obrębie kodonu 717, mianowicie V717F i V717G,

również skutkują wzrostem produkcji dłuższej formy A β -42 [176-179]). Wariant flamandzki genu APP, zawierający transwersję C/G w kodonie 692, skutkującą zamianą alaniny na glicynę, indukuje zmianę konformacyjną peptydu A β . Zwiększa ona jego rozpuszczalność, stabilizując agregujące oligomery, a jednocześnie ułatwia ich przyleganie do śródbłona naczyniowego, i tworzenie w tych miejscach nowych siedlisk agregatów [180, 181]. Wariant arktyczny genu APP zawierający transzycję A/G (E693G), charakteryzuje się szybkim tworzeniem protofibryl oraz wydłużonym czasem półtrwania w mózgu, z racji



Rysunek 6. Proteoliza nieamyloidogenna (I) i amyloidogenna (II) białka APP. Symbole nad strzałkami oznaczają typ sekretaz katalizujących reakcje, [168].

zwiększonej oporności na neprylizynę¹, i skutkuje agresywną postacią choroby [182, 183]. Warianty: londyński, flamandzki i arktyczny genu APP stanowiły obiekty badawcze w prezentowanej pracy.

6.2 Choroba Parkinsona

Zasadniczo, przyczyny choroby Parkinsona nie są znane, i w większości przypadków diagnozuje się postać idiopatyczną choroby. Jej skutkiem jest utrata kontroli ruchów mimowolnych i szybkich, następująca w wyniku śmierci neuronów dopaminergicznych istoty

¹ Błonowa metaloproteinaza, zależna od jonów cynku, odpowiedzialna za inaktywację wielu hormonów oraz degradację nieprawidłowo sfałdowanego β -amyloidu.

czarnej śródmózgowia. Choć przyczyny genetyczne jeszcze do niedawna uznawano za mało prawdopodobne, u około 10%-30% pacjentów zidentyfikowano chorobę w pierwszej linii pokrewieństwa [184]. Podobnie jak w przypadku choroby Alzheimera, szacuje się, że około 5-10% przypadków to zachorowania dziedziczne. Autosomalny dominujący wzorzec dziedziczenia choroby Parkinsona występuje w odniesieniu m.in. do genu SNCA, kodującego α -synukleinę. Funkcja tego białka jest słabo poznana. Wiadomo, że w dużych ilościach występuje w neuronach, przede wszystkim w jądrze komórkowym oraz, związane do lipidów, w błonie presynaptycznej, skąd nazwa – synukleina [185-187]. Sugerując rolę α -synukleiny w utylizacji pęcherzyków synaptycznych, zaproponowano, że nieprawidłowe gromadzenie neuroprzekaźników, wynikające z mutacji genu SNCA, może prowadzić akumulacji dopaminy w cytoplazmie i jej rozkładowi, generując stres oksydacyjny, upośledzający metabolizm w obrębie istoty czarnej [188, 189]. Ponadto dowiedziono, że α -synukleina wykazuje homologię do chaperonowych białek 14-3-3, wiążących hydroksylazę tyrozynową, enzym regulujący poziom syntezy dopaminy [190, 191]. Utrata aktywności α -synukleiny wskutek obniżenia ekspresji, czy agregacji, może zatem prowadzić do nadprodukcji dopaminy, zaburzeń w jej magazynowaniu i transporcie, prowadzących do stresu oksydacyjnego i degeneracji neuronu. Agregaty α -synukleiny są głównym, obok ubikwityny i białek neurofilamentów, komponentem ciał Lewy’ego, stanowiących obraz diagnostyczny choroby Parkinsona [192].

W obrębie genu SNCA zidentyfikowano 3 rzadkie mutacje punktowe: A53T (tranzycja G/A) [193], E46K (tranzycja G/A) [194], oraz A30P (transwersja G/C) [195] skutkujące u pacjentów wczesnymi objawami choroby Parkinsona [196]. Wszystkie wspomniane mutacje powodują zmiany w strukturze białka, prowadząc do jego agregacji i odkładania się w postaci ciał Lewy’ego. Znane są także przypadki podwojenia i potrojenia kopii genu SNCA, powodujące wcześniejszy i bardziej agresywny postęp choroby [197-199]. Obydwa przykłady tranzycji G/A, odpowiedzialne za tworzenie się nefunkcjonalnych agregatów α -synukleiny zostały wykorzystane jako obiekty badawcze w niniejszej pracy.

6.3 ALS (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, stwardnienie zanikowe boczne)

Stwardnienie zanikowe boczne, zwane także chorobą Lou Gehrig’a, czy rzadziej chorobą Charcota, polega na szybko postępującym procesie degeneracji neuronów ruchowych w mózgu i rdzeniu kręgowym. Zwykle choroba doprowadza do śmierci w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy, najczęściej wskutek niedotlenienia z powodu niewydolności

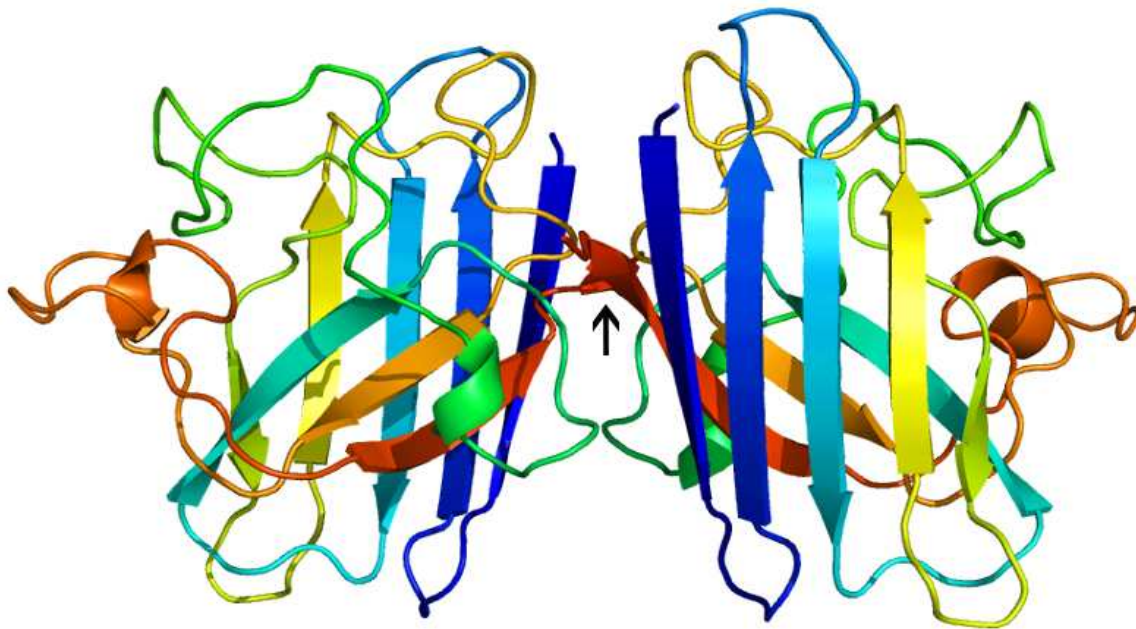
oddechowej. Istnieją dwie hipotezy tłumaczące rozwój ALS. Pierwsza z nich postuluje, że podobnie jak w przypadku AD i PD, występowanie choroby związane jest z odkładaniem się w postaci nierozpuszczalnych agregatów, nieprawidłowo ufałdowanych białek, powodujących zaburzenie funkcjonowania komórki nerwowej. Druga z nich, zakłada stres oksydacyjny powodowany toksycznością reakcji przeprowadzanych przez zmutowane enzymy [200]. Specyfika reakcji katalizowanych przez dysmutazę nadtlenkową, główny enzym zaangażowany w patogenezę ALS, znajduje wspólny mianownik dla obu prezentowanych hipotez, które mogą być swoim wzajemnym uzupełnieniem, zwłaszcza w świetle faktu, że utleniona, prawidłowa forma dysmutazy nadtlenkowej 1 (tzw. typ dziki, ang. *wild type*), fałduje do nieprawidłowej struktury, nabywając cech cytotoksycznych, analogicznie do mutantu, mimo że nie jest obciążona żadną mutacją [201].

Około 10% przypadków ALS stanowi postać dziedziczna, tzw. FALS (ang. *Familial ALS*), z czego 20% dotyczy mutacji w genie SOD1, kodującym dysmutazę nadtlenkową (ang. *SuperOxide Dismutase 1*) [202]. Jest to dimeryczny enzym, metaloproteina zależna od jonów miedzi i cynku, odpowiedzialna za reakcje utleniania i redukcji wolnych rodników tlenowych do tlenu cząsteczkowego i nadtlenku wodoru [203, 204]. Enzym ten jest kluczowym składnikiem systemu ochrony antyoksydacyjnej w komórce. Już pojedyncza kopia zmutowanego SOD1 może indukować rozwój ALS.

W obrębie genu dysmutazy zidentyfikowano ponad 100 mutacji punktowych, korespondujących z występowaniem ALS, różniących się częstością oraz agresywnością wywoływanych objawów. Najczęstszą zmianą, odpowiedzialną za połowę przypadków dziedzicznej postaci FALS w Stanach Zjednoczonych jest substytucja A4V, będąca efektem nukleotydowej tranzycji C/T [205, 206]. Zmiana ta jest praktycznie niespotykana poza populacją USA. Struktura krystalograficzna dysmutazy 1 dowodzi, że region białka, w którym występuje mutacja A4V, nie jest zaangażowany w tworzenie centrum aktywnego, natomiast zaburza formowanie się struktury beczki- β warunkującej tworzenie homodimeru - aktywnej formy dysmutazy (Rysunek 7). Monomer ma tendencję do agregacji i tworzenia toksycznych złogów, uszkadzających neuron. Im większa utrata stabilności struktury dimerycznej enzymu, tym szybciej postępuje degeneracja neuronów [207]. ALS powodowane substytucją A4V charakteryzuje się niezwykle agresywnym postępem, prowadząc do śmierci w ciągu półtora roku od zdiagnozowania (przy średnim czasie życia 3-5 lat w przypadku innych mutacji). Mutacja A4V stała się modelowym obiektem badawczym w niniejszej pracy.

Należy wspomnieć także o dwóch innych, często omawianych w literaturze, zmianach punktowych genu SOD1: najczęstszej w populacji japońskiej substytucji H46R (w sekwencji

nukleotydowej tranzykcja A/G, [208, 209], oraz najintensywniej studiowanym dla ALS modelu mysim zawierającym mutację G93A (transwersja G/C). Mutacja japońska występuje u 40% chorych pochodzących z tamtego regionu. Powoduje ona całkowitą utratę zdolności wiązania jonów miedzi w centrum aktywnym, generując białko zupełnie pozbawione funkcji katalitycznej. Choroba rozwija się niezwykle wolno, czas życia pacjentów od momentu diagnozy wynosi nawet do 15 lat [210]. Mysi model ALS, zawierający substytucję G93A, nie zaburzającą aktywności enzymu, jako pierwszy służył do testowania wielu potencjalnych miejsc oddziaływania, jak i mechanizmów toksyczności leków przeciw ALS [200, 211].



Rysunek 7. Struktura krystalograficzna homodimeru białka SOD1 (pdbID: 1azv). Mutacja A4V znajdująca się w obrębie zaznaczenia (czarna strzałka) uniemożliwia interakcję domen [212].

Skala, w jakiej RNA jest potrzebne w komórce, jest ogromna, podobnie jak możliwości oferowane, przez stale udoskonalaną chemicznie, strategię antysensową. Mechanizm wykorzystujący degradację RNA z udziałem rybonukleazy H w obecności antysensowych oligonukleotydów, choć wydawał się okresowo przyćmiony blaskiem RNAi, nie pozostaje zapomniany. Próby wzmocnienia jego, koncepcjonalnie słabszej od kompleksu RISC, specyficzności sekwencyjnej wobec destabilizacji mRNA trwają. Badania prezentowane w ramach niniejszej pracy stanowią poszukiwanie selektywności degradacji RNA z udziałem RNazy H, na podstawie cech strukturalnych i termodynamicznych, jakie

posiada ono w dupleksach z komplementarnymi i nie w pełni komplementarnymi, modyfikowanymi antysensowymi oligonukleotydami. Jak dotychczas nie próbowano uzyskać selektywnej hydrolizy wariantów RNA generowanych mutacjami punktowymi, wspomnianymi sposobami.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

1 Obiekty badawcze.

Dwie koncepcje alleloselektywnej hydrolizy RNA analizowano dla 6 przypadków substytucji nukleotydowych, w obrębie 3 różnych genów związanych z procesami neurodegeneracji. Typy badanych substytucji zostały zestawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka analizowanych substytucji nukleotydowych

Typ substytucji	Gen	Zmiana w kodonie	Zmiana aminokwasu	Analizowana sekwencja prawidłowego RNA (typ dziki), 5'-3'	Numer rs (dbSNP)	Nr sekwencji w bazie NCBI
C/G	APP	692 GCA-GGA	Ala-Gly	UUUGCAGAAGAUG	rs63750671	NM_000484.3
A/G	APP	693 GAA-GGA	Glu-Gln	UUUGCAGAGAUG	rs63750579	NM_000484.3
G/A	APP	717 GUC-AUC	Val-Ile	GUGAUCGUCAUCA	rs63750264	NM_000484.3
	SNCA	46 GAG-AAG	Glu-Lys	ACCAAGGAGGGAG	rs104893875	NM_000345.3
	SNCA	53 GCA-ACA	Ala-Thr	GGUGUGGCAACAG	rs104893877	NM_000345.3
C/T	SOD1	4 GCC-GUC	Ala-Val	CGAAGGCCGUGUG	rs121912442	NM_000454.4

Wyjściowymi cząsteczkami do badań *in vitro* były 13-mery RNA, dla których przeprowadzano pomiary parametrów termodynamicznych i test RNazy H. W przypadku analizy oligomerów antysensowych dłuższych niż 13-mery, wydłużano odpowiednio także docelowe dla nich cząsteczki RNA do 15-, 17- i 20-merów, o ich naturalny kontekst sekwencyjny.

Nazewnictwo modelowych RNA oraz antysensowych oligonukleotydów

Modelowe RNA w dwóch wariantach: dzikim i zmutowanym nazywano numerem kodonu z którego pochodzi mutacja oraz nukleotydem jaki występował w danej cząsteczce, np. 692C. Dla każdej analizowanej mutacji zsyntetyzowano pulę oligonukleotydów antysensowych, którą oznaczono literą serii. Oznakowanie to było następujące:

Seria **a** – tranzycja C/T, gen SOD1, 32 oligonukleotydy, RNA dziki 4C, mutant 4U

Seria **b** – transwersja C/G, gen APP, 49 oligonukleotydów, RNA dziki 692C, mutant 692G

Seria **d** – tranzycja G/A, gen APP, 29 oligonukleotydów, RNA dziki 717G, mutant 717A

Seria **e** – tranzycja A/G, gen APP, 7 oligonukleotydów, RNA dziki 693A, mutant 693G

Seria **h** – tranzycja G/A, gen SNCA (kodon 53), 17 oligonukleotydów, RNA dziki 53G, mutant 53A

Seria **k** – tranzycja G/A, gen SNCA (kodon 46), 13 oligonukleotydów, RNA dziki 46G, mutant 46A

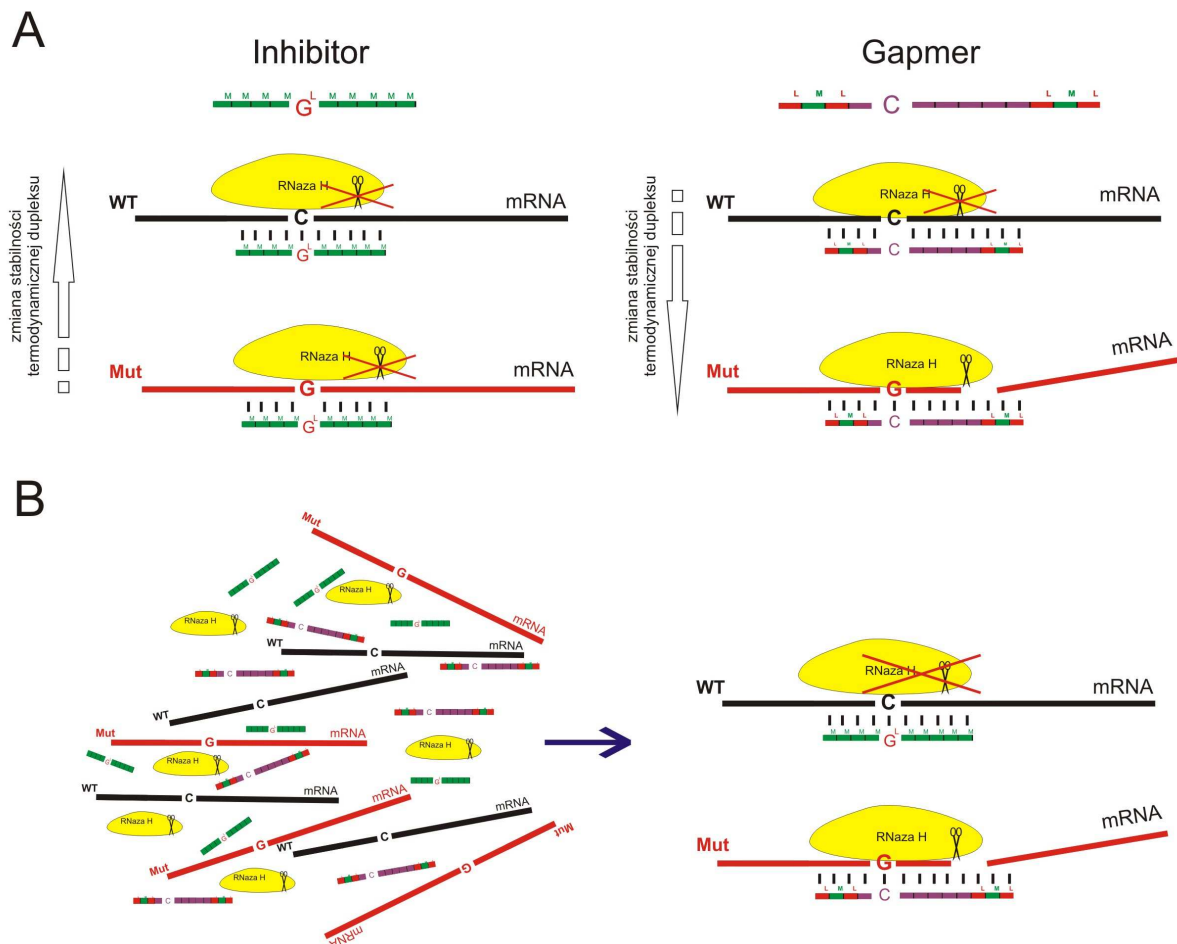
Wszystkie oligonukleotydy typu inhibitor swoją nazwę rozpoczynają od litery I, dalej literowe oznaczenie serii i kolejno numer oligonukleotydu. Wszystkie cząsteczki typu gapmer nazywane są literą serii i kolejno numerem oligonukleotydu. Oligomery w pełni komplementarne posiadają oznaczenie KW lub KM (komplementarny do typu dzikiego lub do mutantu). Przykładowo 7-nukleotydowy inhibitor do transwersji C/G jest oznaczony jako Ib1, a 10-nukleotydowy jako Ib2; gapmer komplementarny do typu dzikiego dla tej transwersji to bKW, a do mutantu- bKM.

2 Alleloselektywna hydroliza RNA zawierających substytucję nukleotydową (SNP), z wykorzystaniem tandemowych oligonukleotydów

Założeniem prezentowanego podejścia jest zastosowanie dwóch oligonukleotydów, które współdziałając ze sobą, prowadzą do selektywnej hydrolizy zmutowanej cząsteczki RNA. Pierwszy z oligonukleotydów, komplementarny do zmutowanego wariantu RNA, jest 13-nukleotydowym gapmerem, który, w dupleksie z docelowym RNA, prowadzi do jego hydrolizy z udziałem rybonukleazy H. Gapmer zawiera 7-nukleotydowy rdzeń DNA (ang. *gap*), otoczony na każdym z końców przez trzy flankujące nukleotydy modyfikowane w układzie LNA/2'-O-metylo-RNA/LNA. Może on jednak hybrydyzować także do cząsteczki typu dzikiego, co jest niepożądane, dlatego w celu jej osłony zaprojektowano drugi z oligonukleotydów, zwany inhibitorem. Jest to 7-nukleotydowy lub 10-nukleotydowy 2'-O-metylowany RNA, który w miejscu hybrydyzacji z SNP posiada nukleotyd LNA, i działa na zasadzie kompetycji z gapmerem. Konstrukcja inhibitora sprzyja jego hybrydyzacji z formą dziką RNA, w oparciu o reguły termodynamiczne [213]. Osłonięta w ten sposób, dzika cząsteczka RNA, pozostaje poza zasięgiem drugiego z oligonukleotydów (gapmeru), który preferencyjnie hybrydując z formą zmutowaną RNA, prowadzi do jej degradacji na drodze aktywacji rybonukleazy H (Rysunek 8).

Sukces prezentowanego podejścia jest, już od fazy projektu, częściowo zdeterminowany zarówno przez rodzaj substytucji, jak i jej kontekst sekwencyjny, ponieważ

obecność niekanonicznych par w duplesie w różny sposób może wpływać na jego stabilność termodynamiczną. W celu zweryfikowania prezentowanej strategii przeanalizowano 4 typy substytucji nukleotydowych na poziomie RNA: C/G, C/U, G/A oraz A/G.



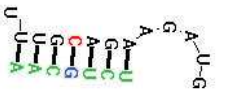
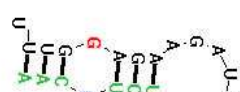
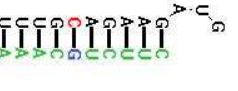
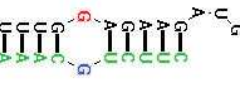
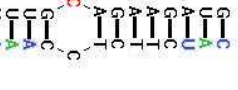
Rysunek 8. Schemat ideowy alleloselektywnej hydrolizy RNA z wykorzystaniem tandemowych oligonukleotydów. **(A)** możliwe do utworzenia duplesy, **(B)** duplesy preferowane termodynamicznie.

2.1 Transwersja C/G (APP, A692G)

Z termodynamicznego punktu widzenia, transwersja C/G jest zmianą korzystną dla różnicowania dwóch alleli, ponieważ wprowadza do duplesu typ dziki RNA/gapmer dosyć silnie destabilizujące niesparowanie C-C. Z kolei obecność modyfikowanych nukleotydów, wzmacniających duples na jego końcach, przeciwdziała tej destabilizacji. Zastanawiające było, czy efekt destabilizacyjny niesparowania C-C w obrębie analizowanej sekwencji jest na tyle mocny, by istotnie ograniczyć formowanie się duplesu z formą dziką RNA, nie tworząc substratu dla RNazy H, czy mimo wszystko, zarówno dzikie, jak i zmutowane RNA ulegną hydrolizie, i jeśli tak, to w jakim stopniu udział inhibitora pozwoli ją ograniczyć.

Pierwszym etapem badań było przeprowadzenie pomiarów termodynamicznych dupleksów obydwu form RNA z gapmerem komplementarnym do formy zmutowanej RNA, oraz z krótszym (7-nukleotydowym) i dłuższym (10-nukleotydowym) inhibitorem. Kluczowe parametry termodynamiczne zebrano w Tabeli 2. Kompleksowe wyniki pomiarów zestawiono w Tabeli 41 (Załączniki).

Tabela 2. Kluczowe parametry termodynamiczne dupleksów RNA z transwersją C/G, tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

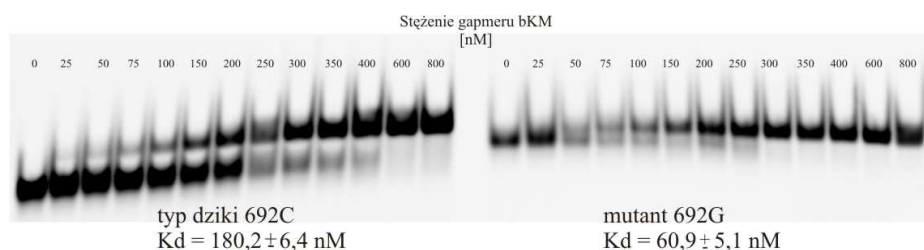
ASO	Typ dziki 692C			Mutant 692G		
	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
Ib1		$9,29 \pm 0,10$	53,1		$4,60 \pm 0,18$	22,8
Ib2		$12,60 \pm 0,07$	66,9		$8,64 \pm 0,03$	46,4
bKM		$9,81 \pm 0,08$	48,6		$17,92 \pm 0,59$	67,2

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 41, a – temperatura topnienia duplexu w stężeniu 10^{-4} M

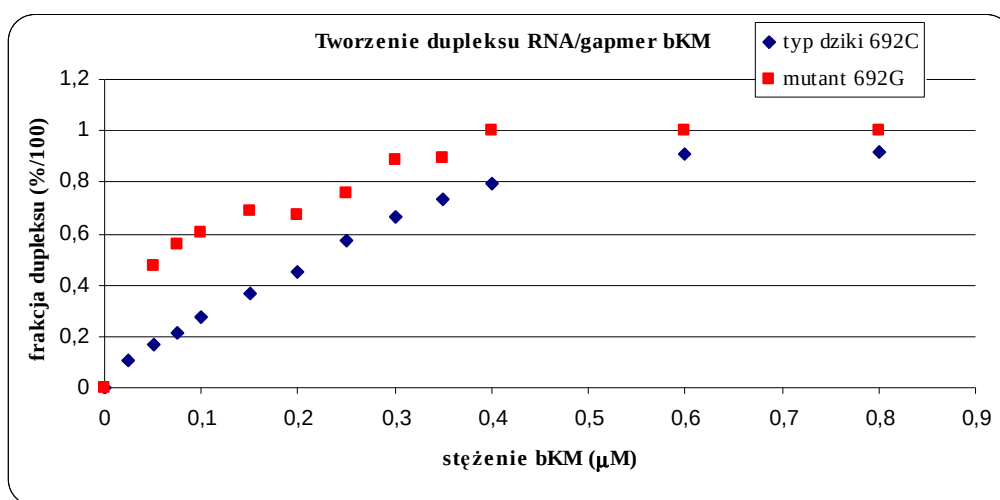
Istotnie, okazało się, że duplex typ dziki RNA 692C/gapmer bKM, zawierający niesparowanie C-C, jest dwukrotnie słabszy niż duplex komplementarny, z wariantem zmutowanym RNA 692G. Podobna różnica w trwałości termodynamicznej pojawiła się w przypadku dupleksów RNA z 7-nukleotydowym inhibitorem Ib1. Duplex komplementarny, tworzony z formą dziką RNA 692C jest w tym przypadku dwukrotnie bardziej stabilny, aniżeli duplex z formą zmutowaną RNA 692G, zawierający niesparowanie rG-G^L. W odniesieniu do wzajemnego powinowactwa RNA i oligonukleotydów antysensowych, energie swobodne (ΔG°_{37}) dupleksów sugerują, że forma dzika RNA nieznacznie silniej powinna wiązać się z gapmerem niż z inhibitorem 7-nukleotydowym, co może zdecydowanie ograniczyć funkcję Ib1. Wydłużenie inhibitora do 10-nukleotydów podniosło trwałość termodynamiczną obydwu jego dupleksów (z RNA typu dzikiego i zmutowanego) w równym stopniu, jednak zdecydowanie zdeterminowało powinowactwo RNA typu dzikiego, istotnie ograniczając jego hybrydyzację z gapmerem. Uzyskane dane

termodynamiczne sugerują także, że cząsteczki inhibitorów nie powinny w istotny sposób zaburzać hybrydyzacji zmutowanej formy RNA 692G z gapmerem, ponieważ duplex ten jest najbardziej uporządkowany z tworzonych przez zmutowane RNA, a jego energia jest niższa ponad dwukrotnie w stosunku do duplexu z inhibitorem dłuższym Ib2 i niespełna czterokrotnie w stosunku do duplexu z inhibitorem krótszym Ib1. Dla transwersji C/G, uzyskane parametry termodynamiczne potwierdzają zasadność założenia strategii wykorzystującej tandemowe oligonukleotydy.

W celu określenia różnicy w powinowactwie obydwu form RNA do tworzenia duplexu z antysensowym gapmerem bKM wyznaczono stałe wiązania duplexów metodą EMSA. Duplex z wariantem zmutowanym RNA 692G (komplementarny) tworzył się w niespełna trzykrotnie niższym stężeniu gapmeru, niż duplex z wariantem dzikim, co potwierdza silną termodynamiczną destabilizację wywołaną obecnością niesparowania C-C.



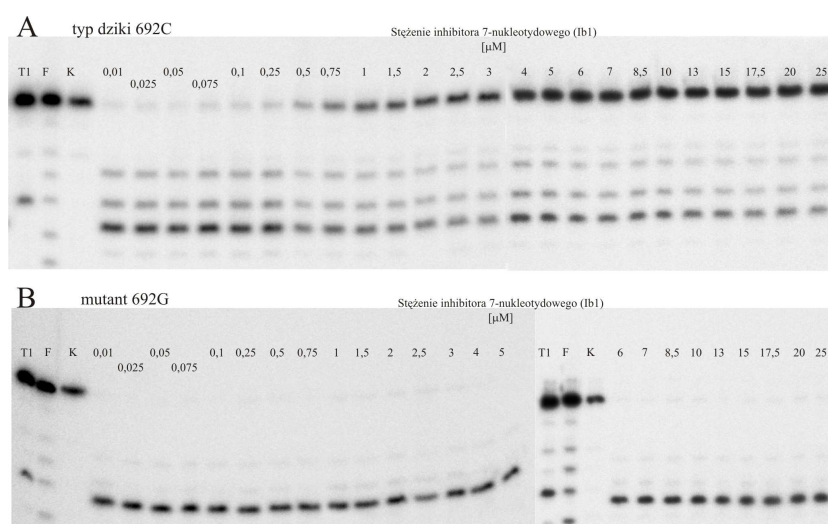
Rysunek 9. Tworzenie się duplexu RNA/gapmer bKM w warunkach niedenaturujących (8 mM MgCl₂)



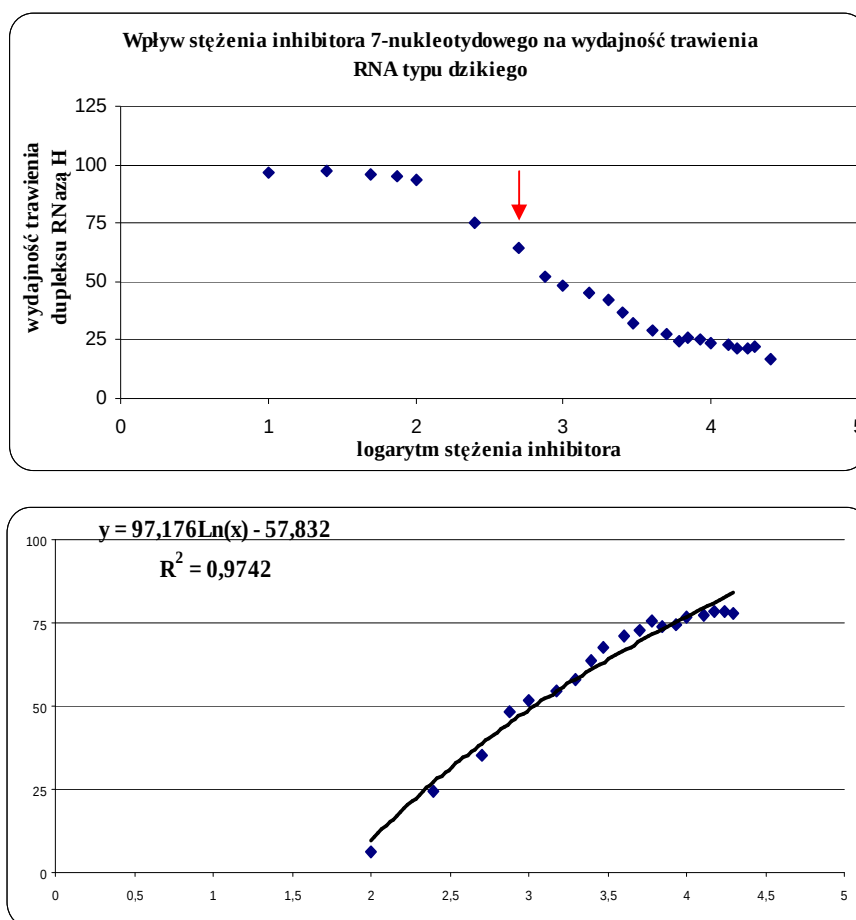
Wykres 1. Wiązanie się gapmeru bKM do wariantów RNA 692 w zależności od stężenia. Prezentowane dane reprezentują ilościowo obraz żelu. Linearyzacja uzyskanej zależności pozwoliła na obliczenie stałych wiązania duplexów.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie hybrydyzacji poszczególnych RNA z obydwoma oligonukleotydami w obecności rybonukleazy H. W tym celu dokonano

najpierw optymalizacji parametrów reakcji trawienia, której rezultaty miały zastosowanie do wszystkich dalszych eksperymentów w ramach testu RNazy H *in vitro*. Ustalono, że stężenie RNA w reakcji wynosi 100 nM. Badano stężenie gapmeru w zakresie 10-100 nM, czas trawienia w zakresie 5-120 minut, oraz stężenie rybonukleazy H (5x-50x rozcieńczony roztwór handlowy o stężeniu 10 U/ μ l). Na podstawie kilku odrębnych reakcji optymalizacyjnych i w oparciu o zalecenia producenta enzymu, wyznaczono następujące parametry trawień: stężenie gapmeru 10 nM, stężenie rybonukleazy H 0,04 U/ μ l, i czas trawienia 20 minut (Załączniki, Rysunek 65). Następnie, w obecności gapmeru optymalizowano efektywne stężenie cząsteczki 7-nukleotydowego inhibitora. Analizowano zakres stężeń 0,01-25 μ M. Na podstawie rozdzielonych elektroforetycznych produktów testu RNazy H w obecności tandemowych oligonukleotydów (Rysunek 10A), wyznaczono wartość indeksu IC_{50} inhibitora względem duplexu typ dziki RNA 692C/gapmer bKM, która wynosiła 599 nM. IC_{50} to parametr określający stężenie substancji, powodujące 50% zahamowanie danej funkcji biochemicznej/biologicznej. Wyznaczenie IC_{50} inhibitora względem duplexu mutant RNA 692G/gapmer nie było możliwe w badanym zakresie, ponieważ dla żadnego z zastosowanych stężeń nie obserwowano efektu inhibicji trawienia (Rysunek 10B). Wiążąc ten fakt z niską temperaturą topnienia wspomnianego duplexu, najprawdopodobniej w temperaturze fizjologicznej 37°C, która była temperaturą reakcji, duplex mutant RNA 692G/inhibitor Ib1 nie tworzy się.



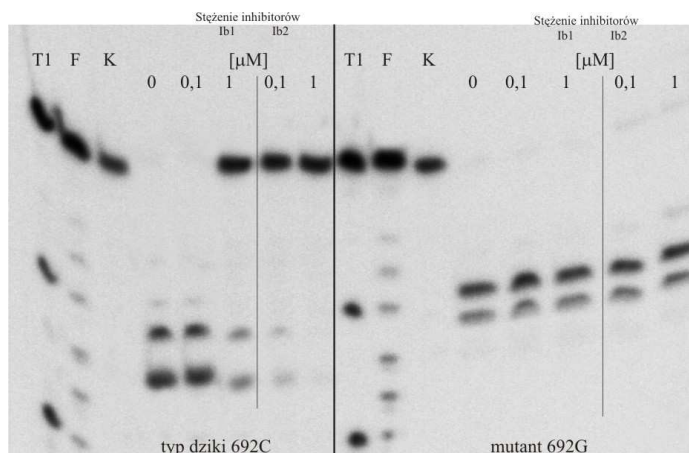
Rysunek 10. Wpływ stężenia 7-nukleotydowego inhibitora Ib1 na wydajność trawienia RNA typu dzikiego 692C (A) i mutantu 692G (B) rybonukleazą H w obecności gapmeru.



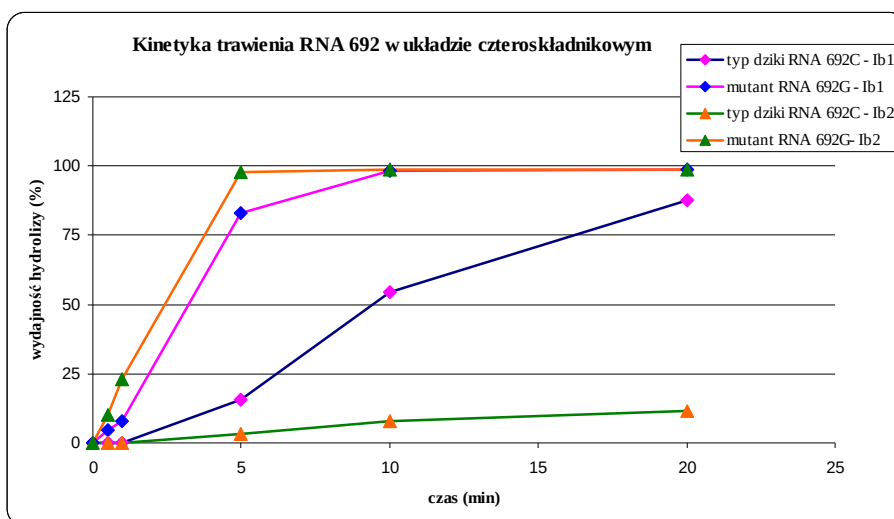
Wykres 2. Wyznaczanie parametru IC_{50} inhibitora Ib1 względem duplexu typ dziki RNA 692C/gapmer bKM. Czerwona strzałka na górnym wykresie ukazuje stężenie IC_{50} . Dolny wykres przedstawia zależność, z której obliczono wartość parametru.

Na podstawie wartości IC_{50} inhibitora względem duplexu typ dziki RNA/gapmer, przyjęto, że stężenie $1 \mu M$, stanowiące dziesięciokrotny nadmiar inhibitora w stosunku do RNA i stukrotny nadmiar w stosunku do gapmeru powinno być wystarczające dla uzyskania pożądanej inhibicji trawienia RNA typu dzikiego. Wartość tą potwierdzono eksperymentalnie, przeprowadzając hybrydyzację i trawienie najpierw osobno, dla każdego z RNA, z dwoma inhibitorami Ib1 i Ib2, każdy w dwóch stężeniach $0,1 \mu M$ i $1 \mu M$ (Rysunek 11). Końcowy eksperyment w układzie czteroskładnikowym, w obecności obydwu RNA, inhibitora i gapmeru, przeprowadzono w $1 \mu M$ stężeniu inhibitora, zarówno 7-nukleotydowego (Ib1, Rysunek 12A), jak i 10-nukleotydowego (Ib2, Rysunek 12B). Monitorowano kinetykę reakcji hydrolizy, pobierając próby w 5 punktach czasowych: 30", 1', 5', 10', 20'. Zastosowanie krótszego inhibitora Ib1 spowolniło hydrolizę RNA typu dzikiego, ale w efekcie końcowym nieznacznie ją ograniczyło (Wykres 3). Natomiast obecność dłuższego inhibitora Ib2 zdecydowanie ograniczyła trawienie wariantu dzikiego RNA 692C, pozostając jednocześnie bez wpływu na przebieg hydrolizy formy zmutowanej 692G.

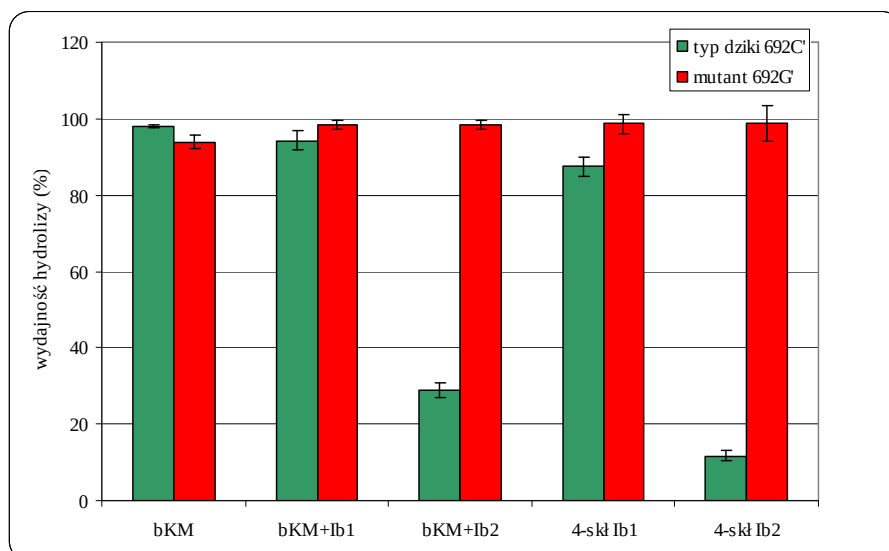
Rezultat ten potwierdził, że *in vitro* możliwa jest alleloselektywna hydroliza mutantu 692G genu APP według koncepcji tandemowych oligonukleotydów.



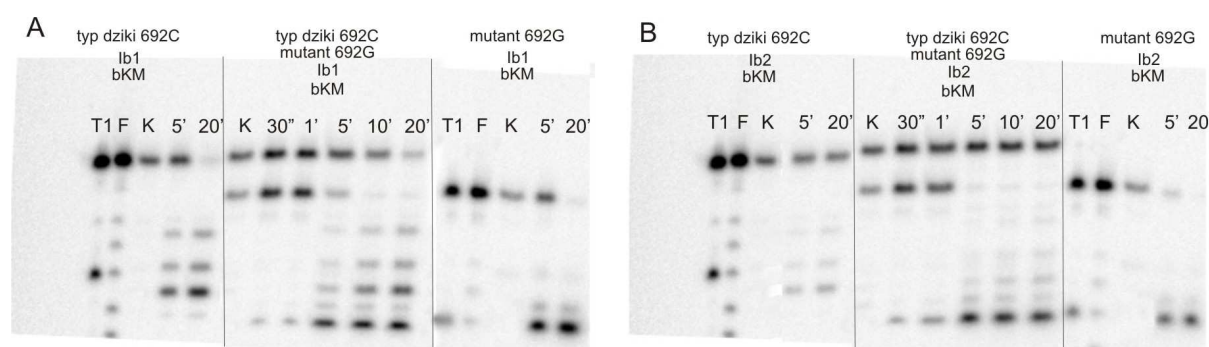
Rysunek 11. Test stężeń inhibitora osobno dla każdego z wariantów RNA. W stężeniu 1 μ M obydwa inhibitory skuteczniej limitują hydrolizę formy dzikiej RNA 692C, pozostając bez wpływu na hydrolizę mutant 692G.



Wykres 3. Kinetyka trawienia RNA w układzie czteroskładnikowym RNA 692C/G. Prezentowane dane reprezentują ilościowo obraz żelu (Rysunek 12). Inhibitor Ib1 spowalnia ale nie ogranicza hydrolizy RNA typu dzikiego, podczas gdy inhibitor Ib2 istotnie hamuje hydrolizę RNA typu dzikiego, nie zaburzając hydrolizy formy zmutowanej RNA



Wykres 4. Porównanie wydajności trawienia RNA w układzie dwuskładnikowym (z gapmerem bKM), trójskładnikowym (z gapmerem bKM i inhibitorem Ib1 lub Ib2) i czteroskładnikowym (obie formy RNA z gapmerem bKM i inhibitorem Ib1 lub Ib2).



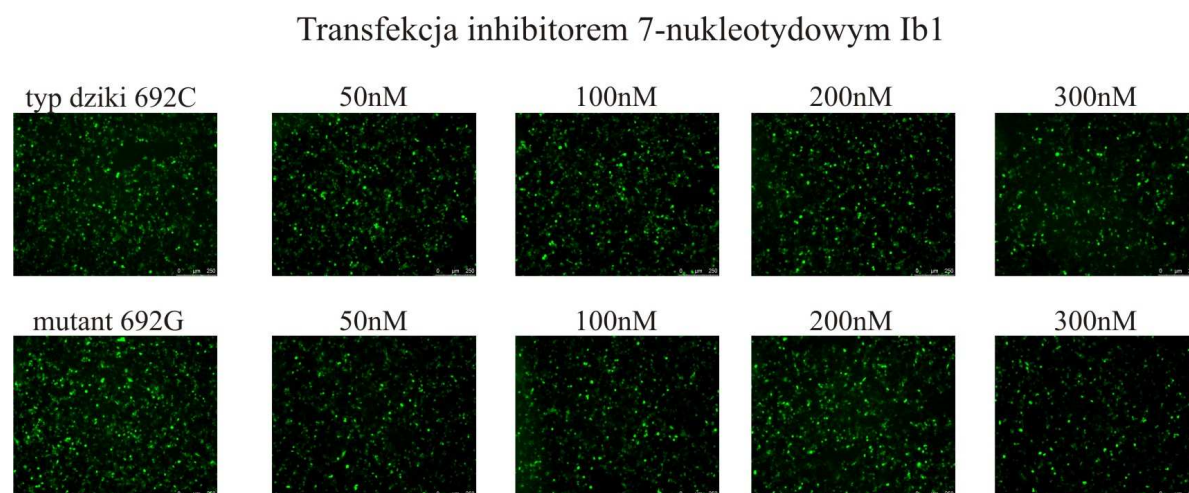
Rysunek 12. Wpływ inhibitora na trawienie dupletu RNA/gapmer w obecności obu wariantów RNA. Test RNazy H w obecności 7-nukleotydowego inhibitora Ib1 (A), i 10-nukleotydowego inhibitora Ib2 (B). Wydajniejsze ograniczenie hydrolizy RNA typu dzikiego występuje w obecności inhibitora Ib2.

Zestawienie wydajności hydrolizy w układach trójskładnikowym i czteroskładnikowym wskazuje, że jedynie dłuższy inhibitor Ib2 był w stanie skutecznie ograniczyć hydrolizę dzikiego wariantu RNA 692C, wypierając go z oddziaływań z gapmerem bKM, podczas gdy 7-nukleotydowy inhibitor Ib1 okazał się w tym celu za krótki.

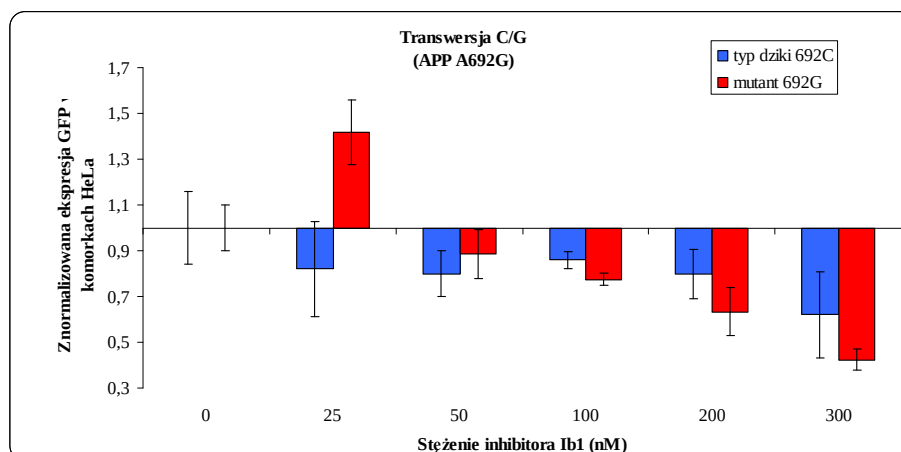
Uzyskany wynik postanowiono zweryfikować w liniach komórkowych. Wybrano nowotworową linię komórkową *HeLa*, wyprowadzoną z komórek raka szyjki macicy, z racji jej prostej hodowli, dużej stabilności i względnie szybkiego wzrostu. Przygotowane 100-nukleotydowe konstrukty, stanowiące fragment genu APP w obrębie którego występuje analizowana transwersja C/G, wprowadzano do komórek metodą lipofekcji, w wektorze ekspresyjnym, zawierającym gen reporterowy białka zielonej fluorescencji (GFP). Docelowa

100-nukleotydowa sekwencja została wklonowana bezpośrednio przed genem GFP, więc w efekcie jej hydrolizy z udziałem rybonukleazy H, nie dochodzi do ekspresji białka zielonej fluorescencji. Poziom ekspresji GFP był oznaczany w reakcji qPCR. Po 24-godzinnej transfekcji komórek, a przed rozpoczęciem procedury izolacji całkowitego RNA, wykonywano zdjęcia poszczególnych dołków transfekcyjnych, m.in. w celu kontroli wydajności transfekcji. Nie zawsze zmiana ekspresji transgenu pod wpływem stosowanych oligonukleotydów antysensowych była możliwa do zaobserwowania w mikroskopie fluorescencyjnym, stąd prezentowane zdjęcia mają raczej charakter poglądowy i nie stanowią podstawy do ilościowej oceny efektywności selektywnej hydrolizy RNA. W wielu przypadkach jednak dobrze obrazują efekt wzrastającego stężenia oligonukleotydu. Porównania poziomu ekspresji dokonywano w oparciu o wyniki uzyskane w reakcji ilościowego PCR (qPCR, *real-time* PCR).

Najpierw przeprowadzono transfekcje każdym z oligonukleotydów osobno. Żaden z inhibitorów nie wykazywał bezpośredniego, istotnego wpływu na poziom ekspresji alleli w zakresie stężeń do 100 nM; powyżej niego obserwowano silny wzrost efektu wyciszenia wraz ze wzrostem stosowanych stężeń, i niezależnie od allelu.

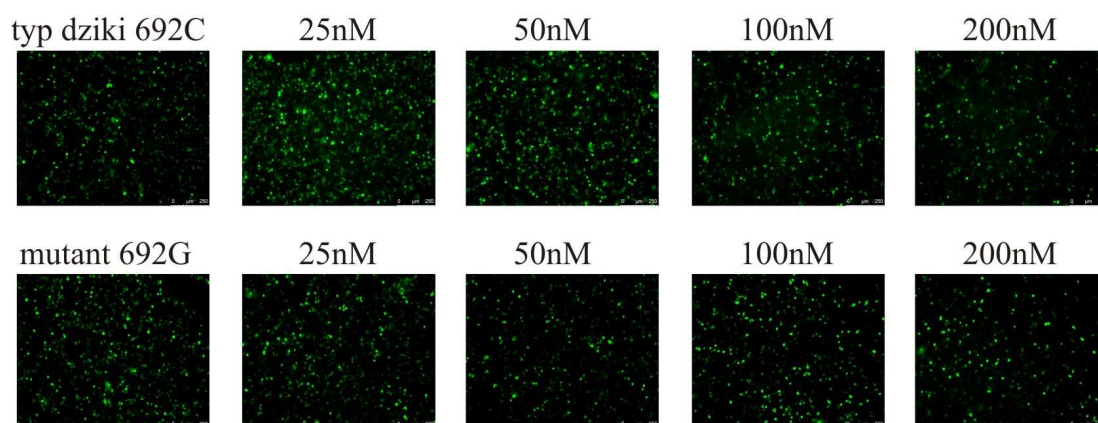


Rysunek 13. Komórki *HeLa* po 24-godzinnej transfekcji inhibitorem Ib1, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.

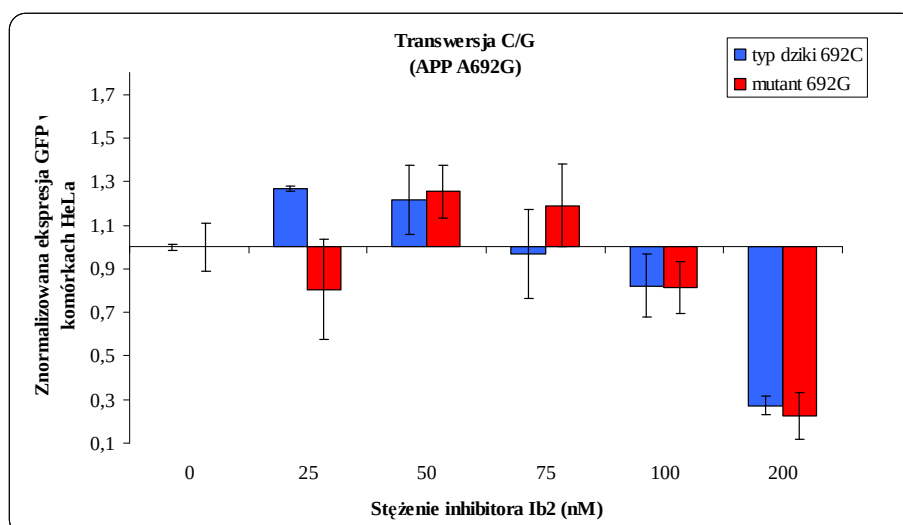


Wykres 5. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora Ib1. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Transfekcja inhibitorem 10-nukleotydowym Ib2

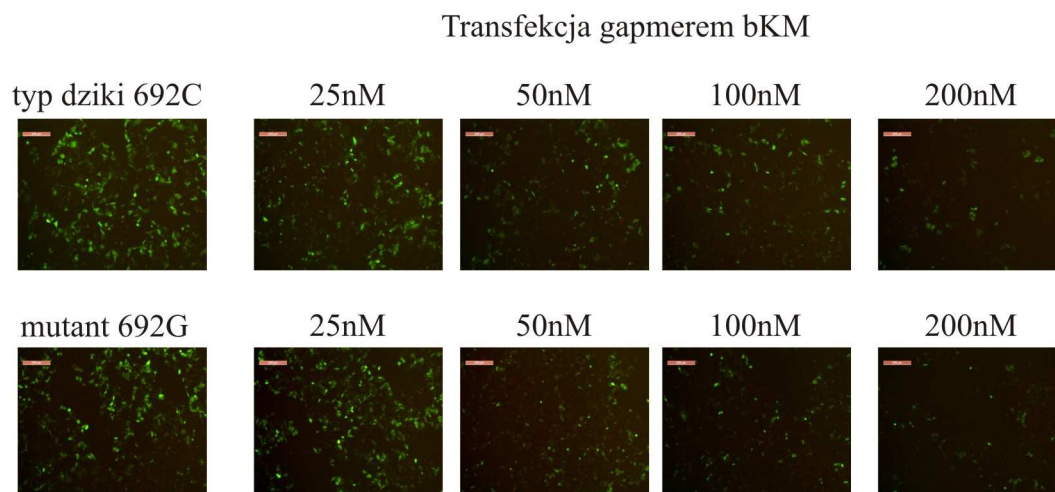


Rysunek 14. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Ib2, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.

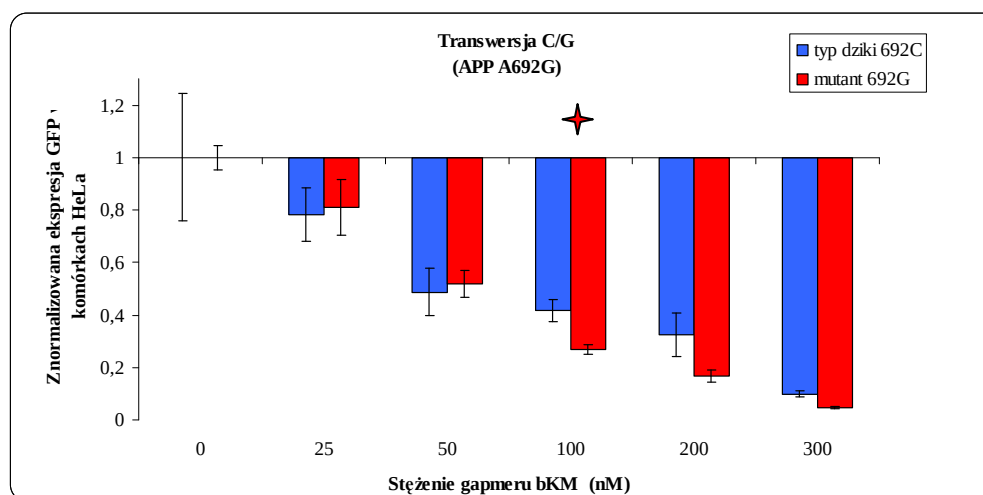


Wykres 6. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora Ib2. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Następnie przeprowadzono transfekcję gapmerem bKM, by przekonać się czy oligomer ten sam w sobie będzie różnicował poziom ekspresji dwóch alleli, wnosząc do jednego z dupleksów pojedyncze niesparowanie rC-dC. Okazało się ono jednak być niewystarczające dla osiągnięcia znaczącej selektywności hydrolizy.



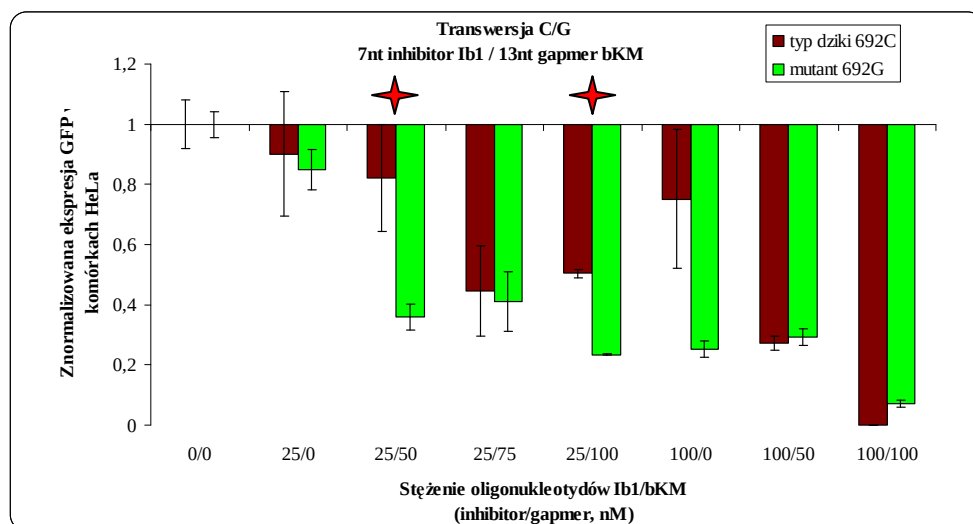
Rysunek 15. Komórki *HeLa* po transfekcji gapmerem bKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x



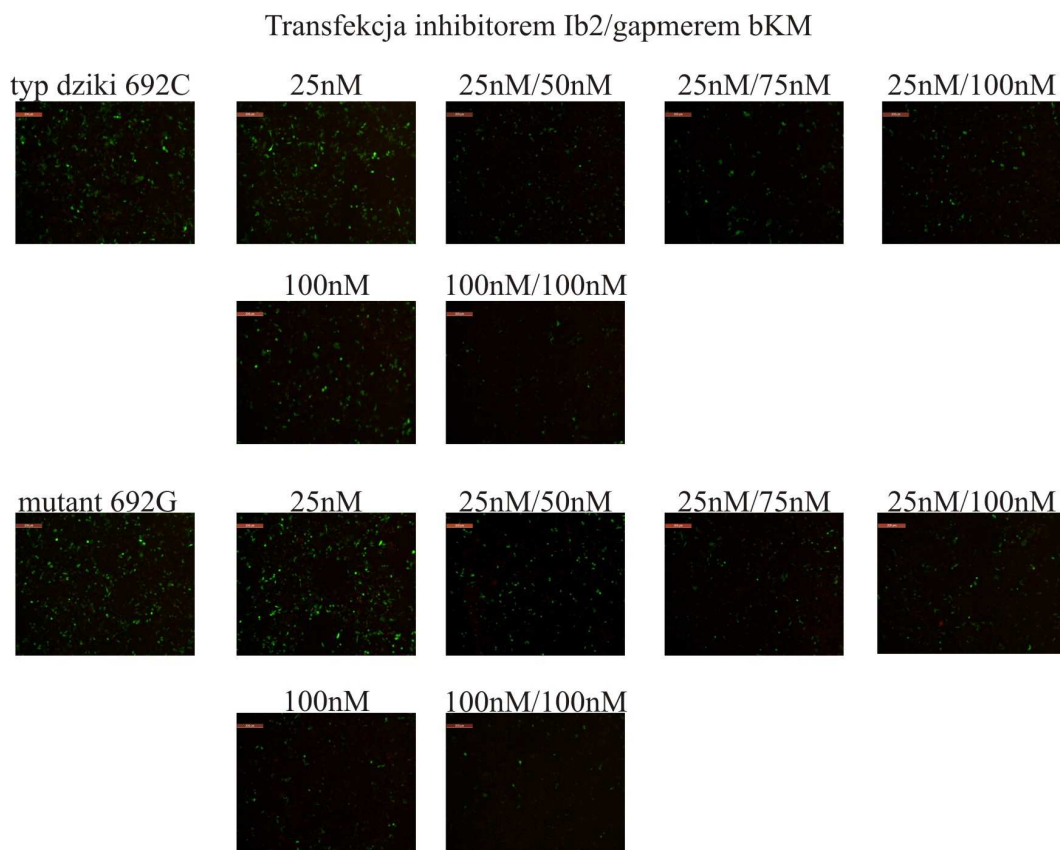
Wykres 7. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru bKM. Stężenia, w których obserwowano istotne statystycznie różnice w ekspresji obu form RNA, oznaczono gwiazdką.

Także w przypadku gapmeru obserwowano, mniej więcej równomierny wobec obu alleli, wzrost efektu wyciszenia wraz z rosnącym stężeniem gapmeru. Zależność tę widać w całym badanym zakresie stężeń. Różnice między ekspresją formy dzikiej i zmutowanej są zauważalne dla stężeń 100 nM i 200 nM, przy czym istotna statystycznie ($P < 0,05$) okazała się tylko różnica w ekspresji dla stężenia 100 nM, wynosząca 15%.

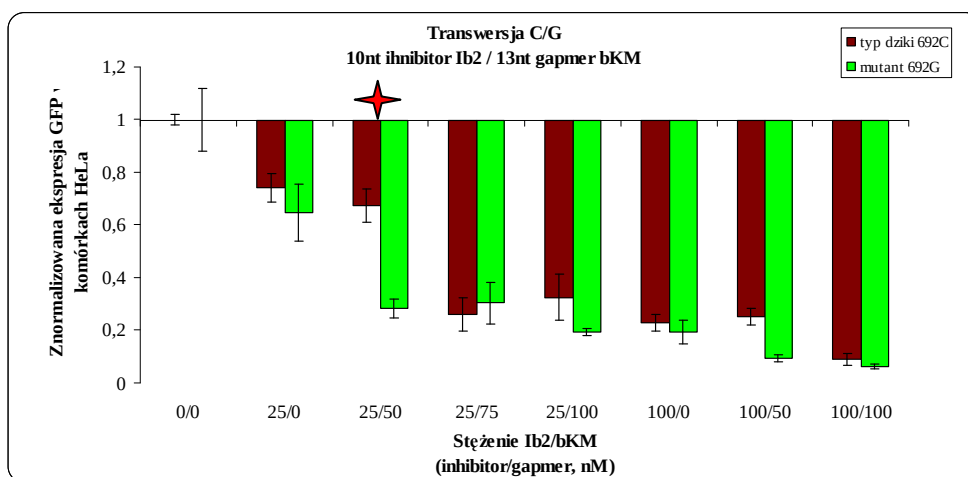
Na podstawie powyższych eksperymentów wyznaczono stężenia inhibitorów oraz gapmeru, do zastosowania w układzie tandemowym w komórkach *HeLa*. Dążono do wyznaczenia jak najmniejszych stężeń, w celu ograniczenia ewentualnej toksyczności oligonukleotydów i potencjalnych efektów niespecyficznych. Obydwa inhibitory postanowiono przetestować w układzie tandemowym w stężeniu 25 nM, z racji obserwowanych największych wahań ekspresji, oraz 100 nM, jako górną granicę przedziału stężeń generujących względną selektywność, ponieważ dla cząsteczek inhibitora obserwowano, że przekroczenie stężenia oligonukleotydu 100 nM powodowało wzrastające, porównywalne wyciszenie obydwu wariantów RNA. Gapmer testowano w stężeniach 50, 75 i 100 nM. W efekcie 24-godzinnej transfekcji komórek układem tandemowym (inhibitor i gapmer), uzyskano różnicowanie poziomu ekspresji allelu dzikiego i zmutowanego w określonych stężeniach (Wykres 8 i 9). Krótszy inhibitor Ib1 ograniczał degradację formy dzikiej RNA istotnie w stosunku do mutanta, w dwóch kombinacjach stężeń Ib1/bKM, odpowiednio 25 nM/50 nM z różnicą 46% oraz 25 nM/100 nM z różnicą 27% (Wykres 8). Zastosowanie w układzie tandemowym dłuższego inhibitora Ib2 skutecznie różnicowało poziom ekspresji formy dzikiej i zmutowanej RNA tylko w stężeniu Ib2/bKM 25 nM/50 nM, o 39% (Wykres 9). Zastosowanie układów wyższych stężeń znosiło efekt selektywności, wyciszając obydwa warianty RNA w podobnym stopniu.



Wykres 8. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ib1/bKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.



Rysunek 16. Komórki *HeLa* po transfekcji oligonukleotydami tandemowymi Ib2/bKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.



Wykres 9. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ib2/bKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA, zostały oznaczone gwiazdką.

Konfrontując wyniki uzyskane *in vitro* z rezultatem badań w linii komórkowej *HeLa* zaobserwowano, że krótszy inhibitor 7-nukleotydowy, który *in vitro* nie przejawiał większych możliwości w układzie z gapmerem, *in vivo* w stężeniu 25 nM był zdolny ukierunkować

hydrolizę RNazą H względem RNA zmutowanego, wobec dwóch stężeń gapmeru bKM: 50 nM i 100 nM. Dłuższy inhibitor 10-nukleotydowy powodował w komórkach efekt selektywnej hydrolizy mutantu 692G tylko w jednym układzie stężeń z gapmerem bKM - 25 nM/50 nM. Niestety nie udało się zróżnicować poziomu ekspresji obydwu wariantów RNA z efektem wszystko i nic (całkowicie strawiony mutant i nietknięty typ dziki RNA), co teoretycznie zakładał rezultat *in vitro* dla układu Ib2/bKM. Być może większe zgłębienie zakresu stężeń inhibitora i gapmeru wokół analizowanych wartości pozwoliłoby na uzyskanie lepszej selektywności w regulacji poziomu ekspresji obydwu wariantów RNA. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów bowiem, można wnioskować że wydajność selektywnej hydrolizy w dużym stopniu zależy od odpowiednio dobranego układu stężeń inhibitor/gapmer.

2.2 Tranzycja G/A

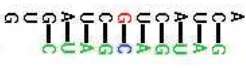
W odniesieniu do zastosowania koncepcji tandemowych oligonukleotydów, substytucja nukleotydowa G/A rokuje układ dużo gorzej zróżnicowany termodynamicznie niż omawiana powyżej transwersja C/G. W przypadku heterodupleksu typ dziki RNA/gapmer pojawia się niekanoniczna para rG-dT, która będąc nieznacznie słabsza od kanonicznej pary rA-dT, prawdopodobnie nie będzie istotnie destabilizować dupleksu, w obrębie którego występuje. Jednak efekt destabilizacyjny niesparowania zależy też od jego bezpośredniego sąsiedztwa nukleotydowego, dlatego badając możliwość zróżnicowania wariantów RNA posiadających tranzycję G/A z zastosowaniem antysensowych tandemowych oligonukleotydów, przeanalizowano trzy różne sekwencje obarczone tą zmianą, jedną pochodzącą z eksonu 17 genu APP, oraz dwie z eksonu 2 genu SNCA.

2.2.1 APP V717I

Tak jak się spodziewano, pomiary parametrów termodynamicznych dupleksów RNA 717/gapmer dKM nie wykazały znaczących różnic w ich trwałości. Niekanoniczna para rG-dT destabilizuje dupleks zaledwie o 0,5 kcal/mol, co jest niekorzystne dla testowanej strategii, gdyż tak subtelna preferencja termodynamiczna utworzenia dupleksu komplementarnego może być nieistotna podczas konkurencji obydwu wariantów RNA o hybrydyzację z gapmerem (Tabela 3). W związku z tym, ukierunkowanie degradacji w stronę mutantu RNA 717A zależeć będzie w tym przypadku przede wszystkim od działania inhibitora. Dupleks mutantu RNA 717A zarówno z 7-nukleotydowym (Id1), jak i z 10-nukleotydowym (Id2)

inhibitorem jest destabilizowany przez niesparowanie rA-C^L, co jest czynnikiem sprzyjającym hybrydyzacji inhibitora z wariantem dzikim RNA 717G. Destabilizacja ta jest znacznie większa w przypadku dłuższego inhibitora Id2 (+4,65 kcal/mol, w porównaniu do +1,6 kcal/mol w przypadku krótszego inhibitora Id1). Ponadto 10-nukleotydowy inhibitor Id2, dzięki modyfikowanym resztom 2'-O-metylo-RNA i LNA, wiąże się zdecydowanie silniej do formy dzikiej RNA niż 13-nukleotydowy gapmer dKM (-4,53kcal/mol), co sugeruje, że może silniej ograniczać hybrydyzację RNA 717G/gapmer dKM niż krótszy inhibitor Id1. 7-nukleotydowy Id1, mimo obecności modyfikacji, tworzy mniej stabilny duplex z formą dziką RNA niż 13-nukleotydowy gapmer dKM (+ 1,17 kcal/mol), co może limitować jego potencjał ochronny względem dzikiej formy RNA.

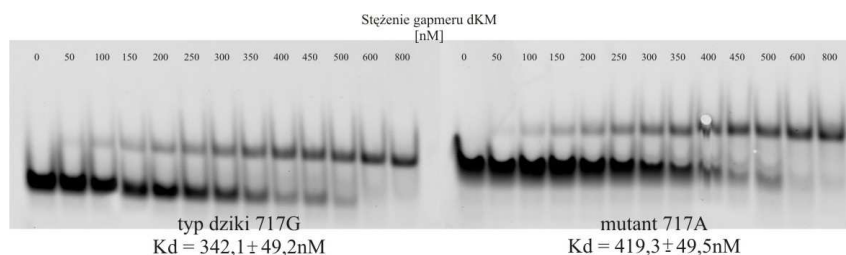
Tabela 3. Kluczowe parametry termodynamiczne duplexów RNA z tranzycją G/A (APP, V717I), tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

ASO	Typ dziki 717G			Mutant 717A		
	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
Id1		9,31 ± 0,03	56,1		7,71 ± 0,04	44,4
Id2		15,01 ± 0,15	72,9		10,36 ± 0,10	53,5
dKM		10,48 ± 0,05	57,3		10,98 ± 0,09	61,3

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensownych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie duplexów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 43, a – temperatura topnienia duplexu w stężeniu 10⁻⁴M

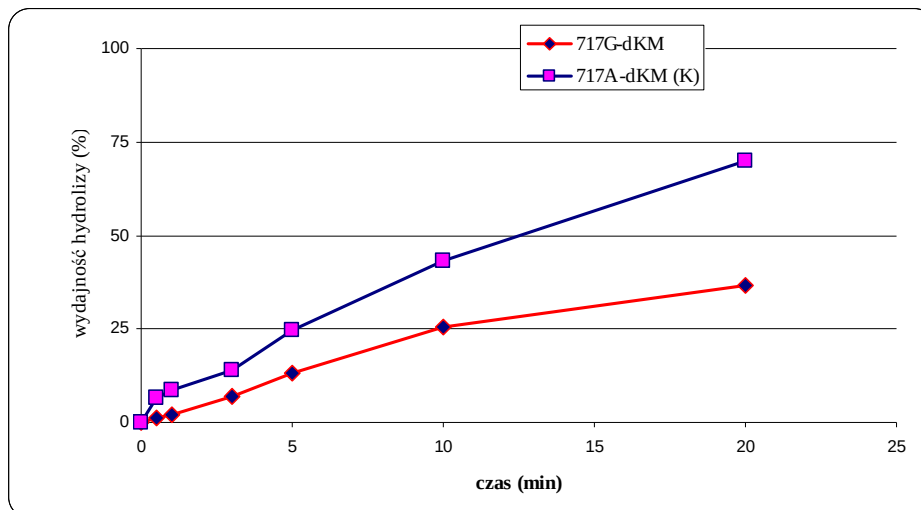
W celu potwierdzenia, omawianego na podstawie termodynamiki duplexów, wzajemnego powinowactwa obydwu form RNA względem gapmeru dKM, przeprowadzono pomiary stałej wiązania ich duplexów. Okazało się, że duplex typ dziki RNA717G /gapmer dKM zawierający niekanoniczną parę rG-dT charakteryzuje się nieznacznie niższą stałą wiązania od duplexu komplementarnego mutant RNA/gapmer, co oznacza że połowa cząsteczek typ dziki RNA 717G będzie tworzyć duplex w niższym stężeniu gapmeru dKM, niż połowa cząsteczek mutantu RNA 717A. Uwzględniając błąd pomiarowy można przyjąć, że wyznaczone dla obydwu duplexów wartości Kd są równe (Rysunek 17). Rezultat ten potwierdził przypuszczenia, że zróżnicowanie poziomu hydrolizy wariantów RNA 717

jedynie poprzez termodynamiczne ograniczenie tworzenia się dupleksu z niekanoniczną parą nie ma szans powodzenia, tak jak przypuszczano dla tego typu substytucji.



Rysunek 17. Tworzenie się dupleksu RNA/gapmer dKM w warunkach niedenaturujących (8 mM MgCl₂)

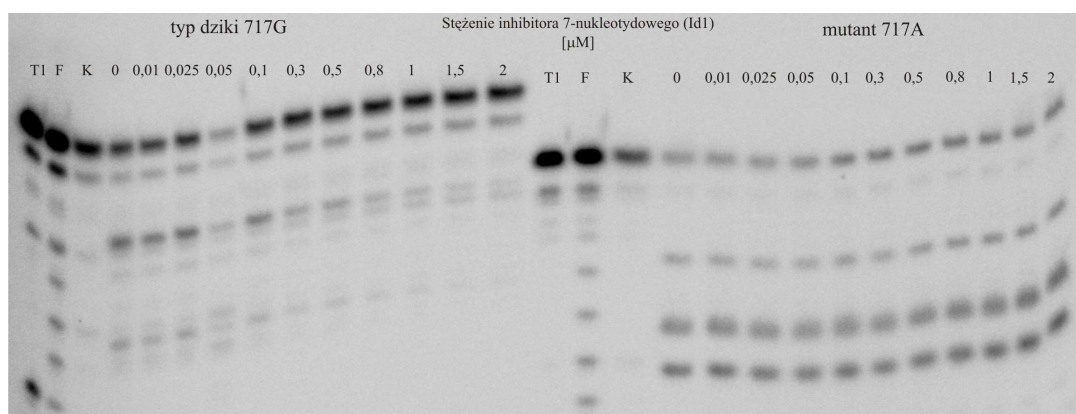
Wykonano pomiar kinetyki trawienia dupleksów RNA/gapmer (test RNazy H z analizą w różnych punktach czasowych), który wykazał nieoczekiwanie, że mimo równego powinowactwa podczas tworzenia dupleksów, typ dziki RNA 717G w dupleksie z gapmerem dKM jest trawiony niespełna dwukrotnie wolniej, niż dupleks komplementarny mutant 717A/gapmer dKM. Ponadto, zauważono, że obydwa omawiane warianty RNA 717 generalnie są hydrolizowane wolniej w stosunku do innych analizowanych sekwencji, gdzie w większości przypadków, całkowitą degradację substratu można było obserwować już po 10 minutach reakcji (por. rozdział Załączniki, Wykres 1). Wolniejsza hydroliza formy dzikiej 717G RNA sprzyja ukierunkowaniu hydrolizy na wariant zmutowany 717A.



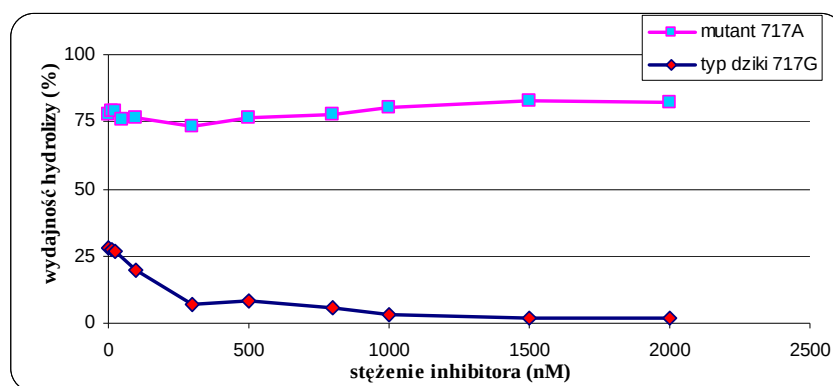
Wykres 10. Kinetyka trawienia rybonukleazą H wariantów RNA dupleksie z gapmerem dKM, K-komplementarny dupleks. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Załączniki, Rysunek 66)

Następnie przeprowadzono hydrolizę obydwu form RNA w obecności inhibitora 7-nukleotydowego Id1, w celu wyznaczenia parametru IC₅₀ i ustalenia stężenia do

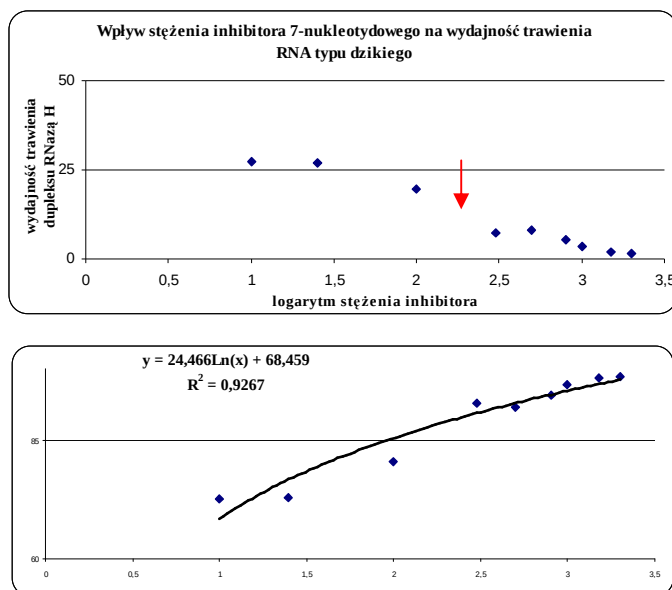
zastosowania w układzie tandemowym. Ponieważ hydroliza wariantów RNA 717 bez udziału inhibitora w ustalonym czasie eksperymentu (20 minut) nie przebiegała do końca, a jedynie w około 60%, wartość stężenia wyznaczona jako umowne IC_{50} nie jest bezpośrednio porównywalna względem wartości uzyskanej w poprzednim przypadku (transwersja C/G). Dla inhibitora 7-nukleotydowego Id1 uzyskano umowne IC_{50} względem dupleksu typ dziki 717G/gapmer dKM wynoszące 107 nM, co oznacza że stosując takie stężenie inhibitora można zredukować wydajność trawienia dupleksu z formą dziką RNA z około 60% do 30% . Cząsteczka mutantu RNA 717A, podobnie jak typ dziki 717G, bez zastosowania inhibitora była hydrolizowana jedynie w ok. 60%. Obecność inhibitora Id1 nie wskazywała natomiast na ograniczenie wydajności hydrolizy RNA 717A w dupleksie z gapmerem dKM, w żadnym z badanych stężeń inhibitora z zakresu 0,01-2 μ M. W związku z brakiem zależności stopnia inhibicji od stężenia inhibitora, nie udało się wyznaczyć wartości IC_{50} inhibitora Id1 wobec dupleksu mutant RNA 717A/gapmer dKM (Rysunek18, Wykres 11).



Rysunek 18. Wpływ stężenia 7-nukleotydowego inhibitora Id1 na wydajność trawienia RNA typu dzikiego 717G i mutantu 717A, rybonukleazą H w obecności gapmeru dKM.

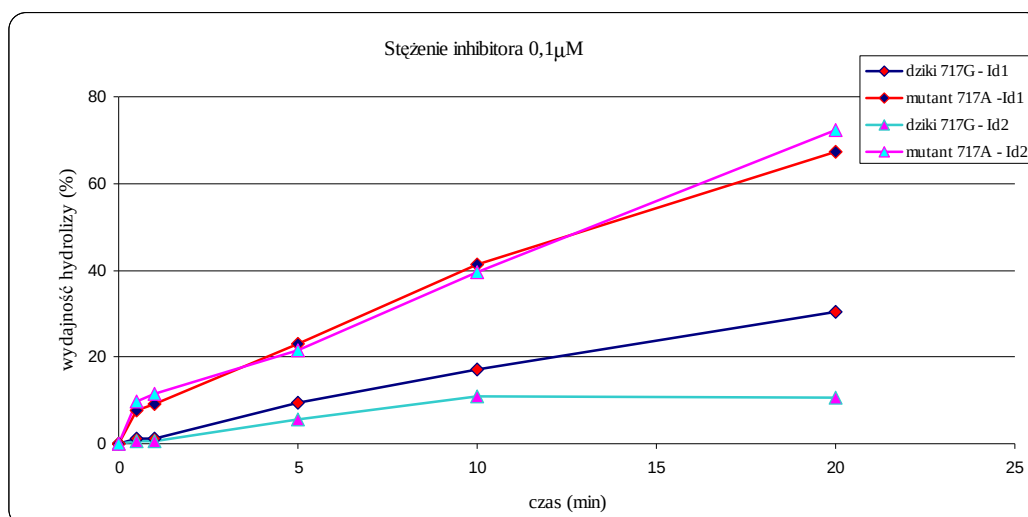


Wykres 11. Wpływ stężenia inhibitora na trawienie RNA 717. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Rysunek 18)

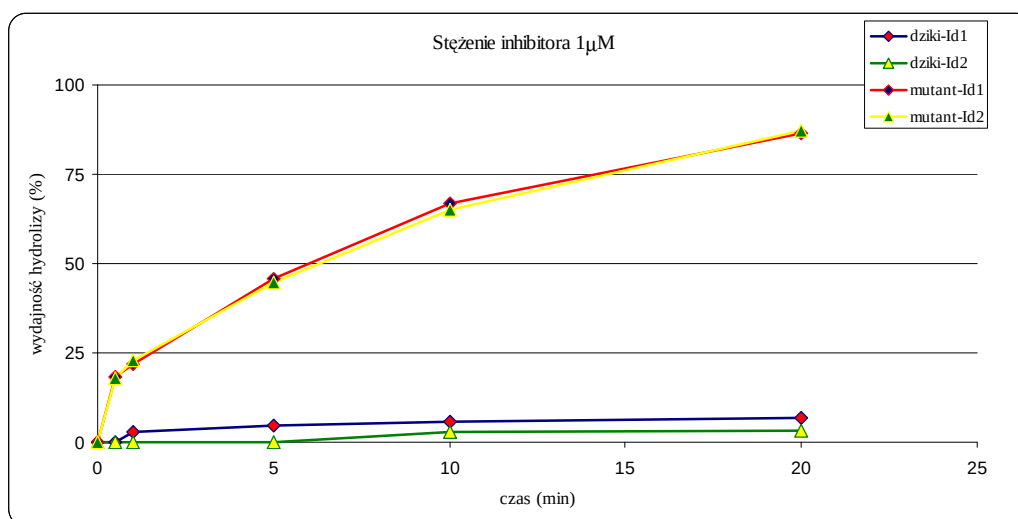


Wykres 12. Wyznaczanie parametru IC₅₀ inhibitora Id1 względem dupleksu typ dziki RNA/gapmer. Czerwona strzałka na górnym wykresie ukazuje umowne stężenie IC₅₀. Dolny wykres przedstawia zależność, z której obliczono wartość parametru.

Wyznaczone stężenie IC₅₀ inhibitora Id1 wobec dupleksu typ dziki RNA 717G/gapmer dKM oraz jego dziesięciokrotność, przetestowano w układzie czteroskładnikowym, w obecności obydwu wariantów RNA jednocześnie. Porównanie rezultatów dla obu stężeń wykazało, że w przypadku inhibitora 7-nukleotydowego Id1 zwiększenie jego stężenia z 0,1 do 1 μM znacząco ograniczyło hydrolizę formy dzikiej RNA 717G (z 30% do 6%) pozostając bez wpływu na hydrolizę mutantu RNA (Wykres 13). Dłuższy inhibitor Id2 także wydajniej hamował hydrolizę formy dzikiej RNA w stężeniu 1 μM, przy czym ta różnica była około 3-krotnie mniejsza (z 10% do 3%). Oznacza to, że Id2 znacznie silniej wiąże się do RNA typu dzikiego niż inhibitor krótszy Id1 i gapmer dKM, tak jak to wynika z pomiarów termodynamicznych. Zastosowanie dłuższego inhibitora wydaje się być bez wpływu na hydrolizę mutantu RNA 717A w układzie czteroskładnikowym, natomiast w nieobecności RNA typu dzikiego (układ trójskładnikowy) obserwowano znacznie silniejsze zahamowanie hydrolizy mutantu RNA przez inhibitor Id2 niż w przypadku krótszego inhibitora Id1. Efekt ten jest porównywalny dla obydwu zastosowanych stężeń i wynosi 47% dla stężenia 0,1 μM i 58% dla stężenia 1 μM (Wykres 14 i 15). Oznacza to występowanie silnej kompetycji między gapmerem a inhibitorem o wiązanie się do RNA i dowodzi istnieniu termodynamicznej preferencji w hybrydyzacji każdego z tandemowych oligonukleotydów do poszczególnych komplementarnych wariantów RNA.

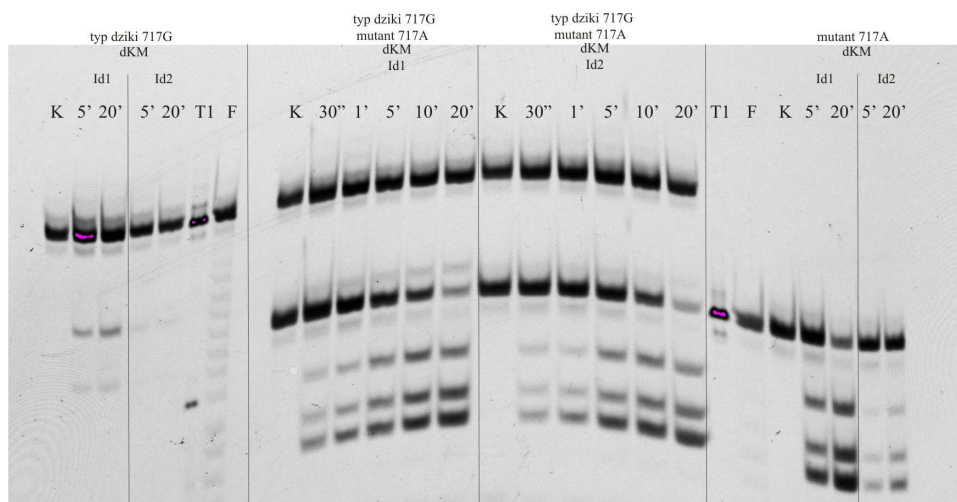


Wykres 13. Kinetyka trawienia RNA 717 w układzie czteroskładnikowym w stężeniu inhibitora 0,1 μM. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Rysunek 19)

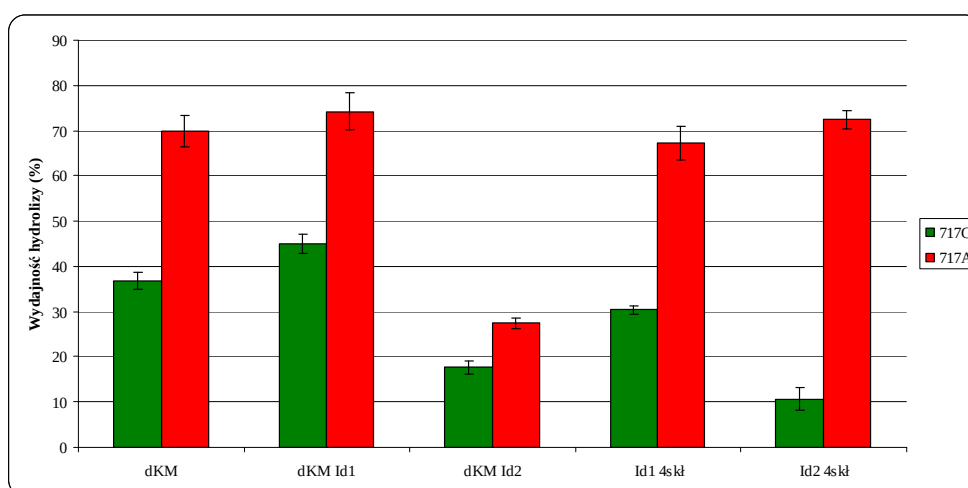


Wykres 14. Kinetyka trawienia RNA 717 w układzie czteroskładnikowym w stężeniu inhibitora 1 μM. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Rysunek 19)

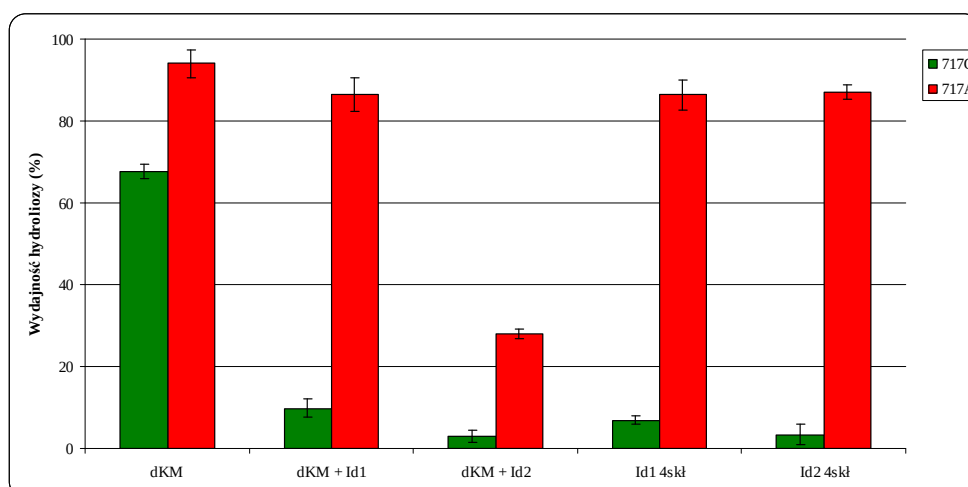
W przypadku obydwu inhibitorów, ich stężenie 1 μM dużo silniej różnicuje wydajność trawienia RNA 717G i 717A, zarówno w układzie trójskładnikowym jak i czteroskładnikowym. Ze względu na pewne ograniczenia wydajności hydrolizy 717A przez Id2 w układzie trójskładnikowym oraz brak większej różnicy między efektem krótszego i dłuższego inhibitora w stężeniu 1 μM wobec RNA typu dzikiego 717G, korzystniejsze dla uzyskania jak najwyższej selektywności hydrolizy względem mutantu 717A wydaje się zastosowanie krótszego inhibitora 7-nukloetydowego Id1 (Rysunek 19, Wykres 15 i 16). Limitował on wydajność trawienia RNA typu dzikiego *in vitro* o około 60% , a tylko o 7% wydajność trawienia mutantu 717A (Wykres 16).



Rysunek 19. Wpływ inhibitora na trawienie dupletu RNA/gapmer w obecności obu wariantów RNA (układ czterokładnikowy). Dłuższy inhibitor Id2 znacznie silniej ogranicza hydrolizę mutantu 717A niż Id1.

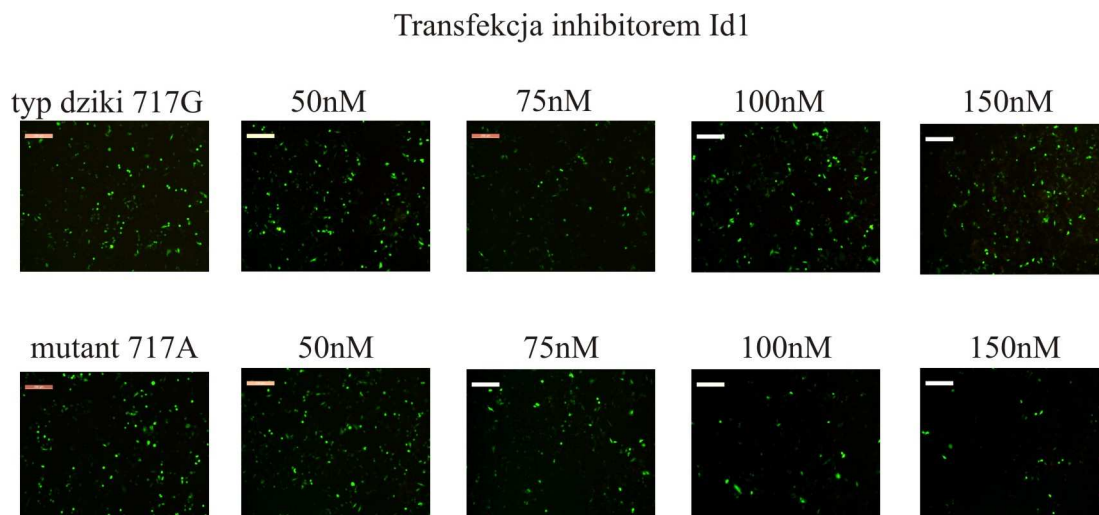


Wykres 15. Porównanie wydajności trawienia RNA 717 w układzie dwuskładnikowym (z gapmerem dKM), trójskładnikowym (z gapmerem dKM i inhibitorem Id1 lub Id2) i czterokładnikowym (obie formy RNA z gapmerem dKM i inhibitorem Id1 lub Id2 w stężeniu 0,1 μ M).

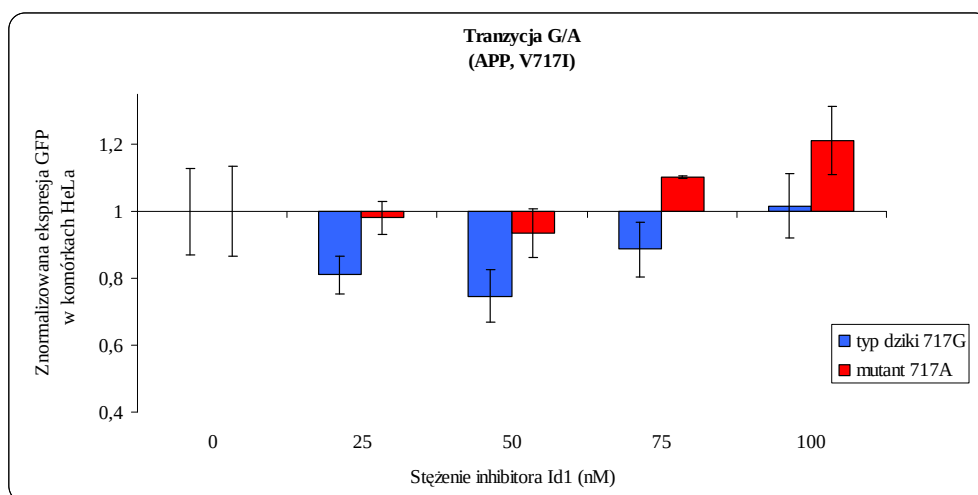


Wykres 16. Porównanie wydajności trawienia RNA 717 w układzie dwuskładnikowym (z gapmerem dKM), trójskładnikowym (z gapmerem dKM i inhibitorem Id1 lub Id2) i czterokładnikowym (obie formy RNA z gapmerem dKM i inhibitorem Id1 lub Id2 w stężeniu 1 μ M).

Weryfikację działania omawianych oligonukleotydów w układzie tandemowym przeprowadzono w komórkach *HeLa*, analogicznie jak w przypadku poprzednio omawianej substytucji C/G. Kontrolnie transfekowano komórki każdym z oligonukleotydów osobno, by wyznaczyć stężenia optymalne w kombinacji tandemowej.



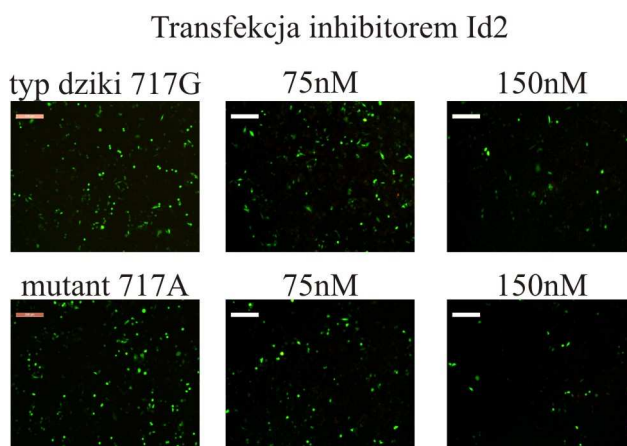
Rysunek 20. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Id1, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



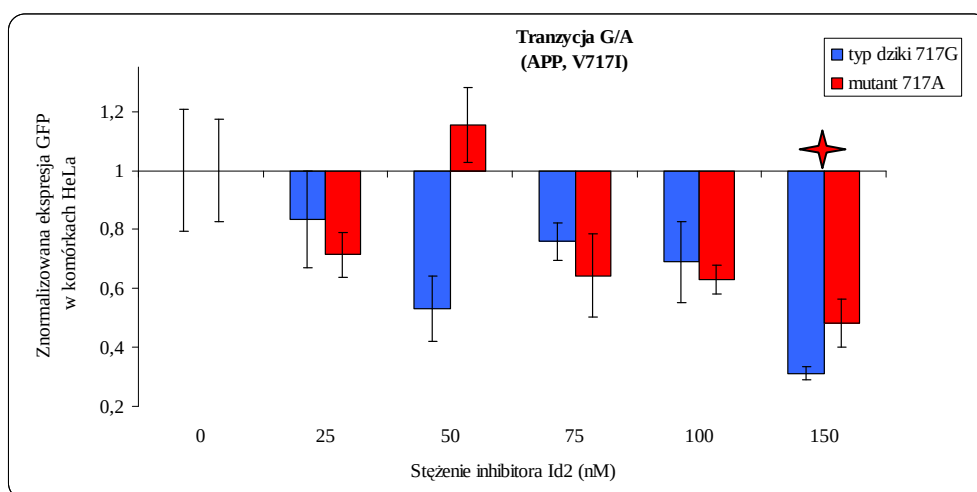
Wykres 17. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora Id1. Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

W przypadku wprowadzenia do komórek 7-nukleotydowego inhibitora Id1 nie obserwowano istotnego statystycznie efektu wyciszenia względem żadnego z wariantów RNA 717, w żadnym testowanym stężeniu z zakresu 25-100 nM. Co ciekawe jednak, obserwowano, że RNA typu dzikiego 717G był nieco silniej wyciszany w stosunku do mutantu, w niższych stężeniach inhibitora. W miarę wzrostu stężenia Id1, poziom ekspresji

obydwu RNA 717 nieznacznie ale systematycznie wzrastał, jednak wszystkie te odchylenia oscylują w obrębie błędu kontroli. Dla 10-nukleotydowego inhibitora Id2 uzyskano statystycznie istotną ($P < 0,05$) różnicę w wyciszeniu, wynoszącą 17% w stężeniu 150 nM, jednak silniej wyciszany był allel dziki, co jest efektem przeciwnym do zamierzanego (Wykres 17). Z drugiej strony wydaje się to jednak sensowny wynik. Inhibitor Id2, silniej wiążący się do formy dzikiej RNA, może wyciszać ekspresję docelowego RNA na drodze jego blokady sterycznej, a nie hydrolizy z udziałem RNazy H. Stężenie 150 nM, dla którego uzyskano tę niewielką choć istotną statystycznie różnicę, okazało się wystarczające dla ujawnienia przewagi termodynamicznej stabilności pary rG-C^L względem nisparowania rA-C^L, w kontekście 10-nukleotydowego dupleksu.



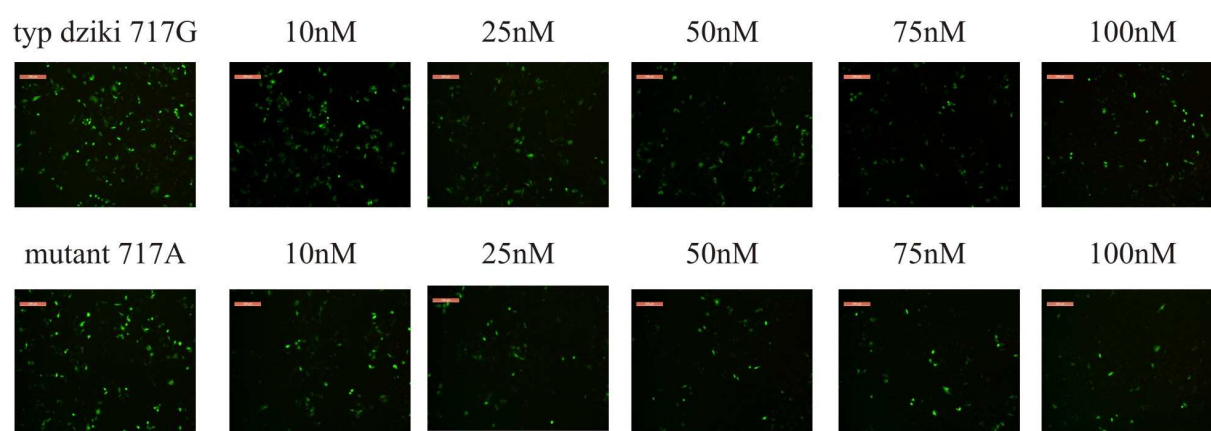
Rysunek 21. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Id2, obserwowana fluorascencja GFP. Powiększenie 10x.



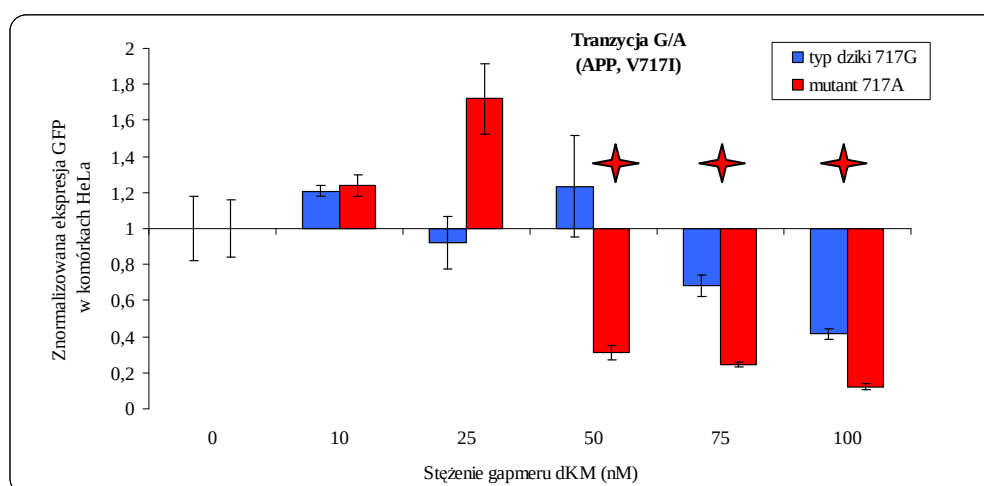
Wykres 18 Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora Id2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha = 0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Silniejsze, i co ważne istotnie statystycznie, zróżnicowanie w zakładanym kierunku wykazał gapmer dKM w trzech stężeniach 50 nM, 75 nM oraz 100 nM. Wraz ze wzrostem stężenia obserwowano zmniejszanie się różnicy w poziomie ekspresji obydwu wariantów RNA, z 92% do około 30%. Rezultat ten wydaje się uzasadniony generalnym spadkiem specyficzności na skutek zbyt dużej koncentracji molekuł. Obiecujące i w pewnym stopniu zaskakujące jest tak silne zróżnicowanie poziomu ekspresji obu RNA *in vivo* w oparciu jedynie o pary rG-dT i rA-dT, bez udziału cząsteczki inhibitora. Jednakże kinetyka trawień *in vitro* dupleksów RNA z gapmerem dKM wykazała, że obecność niekanonicznej pary rG-dT w duplesie z wariantem dzikim RNA 717G skutkuje jego obniżoną hydrolizą.

Transfekcja gapmerem dKM



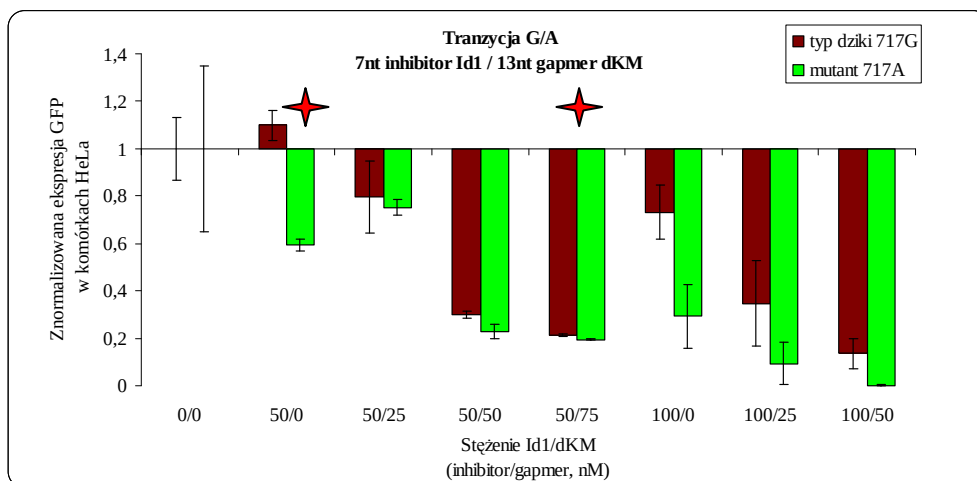
Rysunek 22. Komórki *HeLa* po transfekcji gapmerem dKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.



Wykres 19. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru dKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

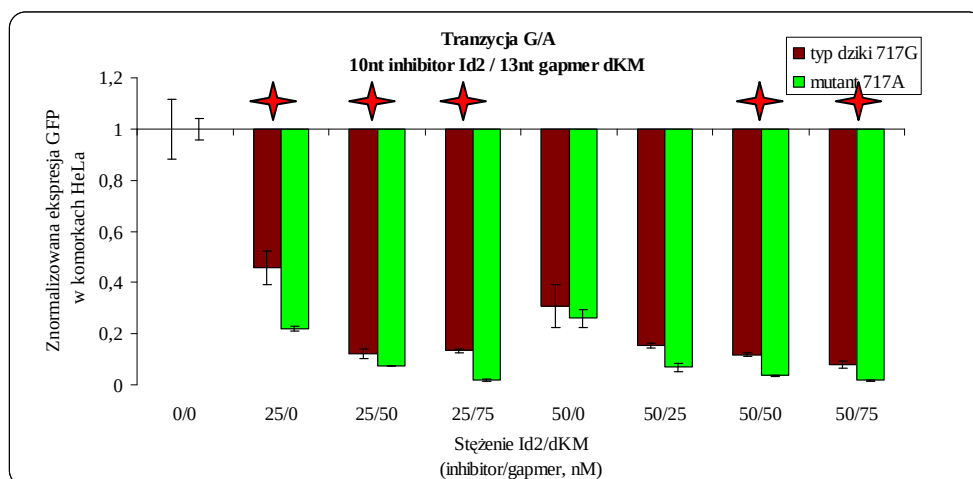
Na podstawie wyników z transfekcji pojedynczymi oligonukleotydami antysensowymi, w układzie tandemowym postanowiono przetestować inhibitor Id1

w stężeniu 50 nM i 100 nM, i inhibitor Id2 w stężeniu 25 nM i 50 nM, współdziałające z gapmerem w stężeniu 25, 50 i 75 nM. Wśród analizowanych stężeń każdego z oligomerów znajduje się zawsze jedno, dla którego pojedynczo nie obserwowano żadnego (istotnego ani nieistotnego statystycznie) efektu wyciszenia.



Wykres 20. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Id1/dKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Stosując układ tandemowy z inhibitorem 7-nukleotydowym Id1, jednoczynnikowa analiza wariancji w dwóch przypadkach potwierdziła, że średni poziom ekspresji analizowanych wariantów RNA różni się istotnie względem siebie. W pierwszym przypadku stosowano sam inhibitor Id1 w stężeniu 50 nM i ekspresja mutanta RNA była o około 50% niższa niż ekspresja RNA typu dzikiego, przy czym nie była to różnica istotna względem kontroli. W drugim przypadku wskazanym przez analizę wariancji, różnica była istotna względem kontroli, natomiast wynosiła jedynie 2% między wariantem dzikim i zmutowanym. W związku z powyższym, nie uzyskano satysfakcjonującego wyniku, potwierdzającego możliwość alleloselektywnej degradacji zmutowanego RNA 717 w układzie tandemowym z 7-nukleotydowym inhibitorem, w badanym zestawie stężeń (Wykres 20).



Wykres 21. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Id2/dKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

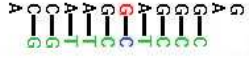
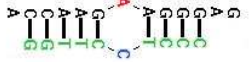
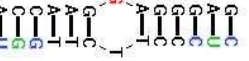
W przypadku transfekcji układem tandemowym zawierającym 10-nukleotydowy inhibitor, jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała 5 przypadków istotnego statystycznie zróżnicowania poziomu ekspresji między allele dzikim i zmutowanym RNA 717. Podczas gdy obserwowany spadek ekspresji względem kontroli był rzeczywiście wyraźny, to jednak uzyskane różnice w poziomie ekspresji obydwu wariantów RNA w stosunku do siebie były niewielkie i wynosiły od 5% do 11%. Największą różnicę 24% obserwowano dla stężenia Id2 25 nM i w nieobecności gapmeru (Wykres 21). Uzyskane rezultaty nie przekonują, że hydroliza RNA w zastosowanych układach stężeń oligonukleotydów tandemowych zachodziła znacząco selektywnie względem mutantu RNA 717A.

2.2.2 SNCA E46K

Chcąc sprawdzić, czy osiągany rezultat ma charakter uniwersalny dla typu analizowanej substytucji, czy zależy także od kontekstu sekwencyjnego, przeanalizowano inny przykład tranzycji G/A, występującej w 46 kodonie genu SNCA i związanej z niewielkim odsetkiem zachorowań na chorobę Parkinsona. Analiza parametrów termodynamicznych dla badanych wariantów RNA 46 w duplesie z gapmerem kKM wykazała większą destabilizację wnoszoną przez parę rG-dT (+3,36 kcal/mol) w stosunku do wcześniej analizowanej tranzycji G/A RNA 717 (+0,5 kcal/mol). Większe były również efekty destabilizacyjne niesparowania rA-C^L w odniesieniu do duplesów RNA z inhibitorami, odpowiednio +4,07 kcal/mol dla inhibitora 7-nukleotydowego Ik2 (względem +1,6 dla Id1), i +7,53 kcal/mol dla inhibitora 10-nukleotydowego Ik1 (względem +4,65 dla Id2). W przypadku formy dzikiej RNA 46G, różnica w powinowactwie do dłuższego

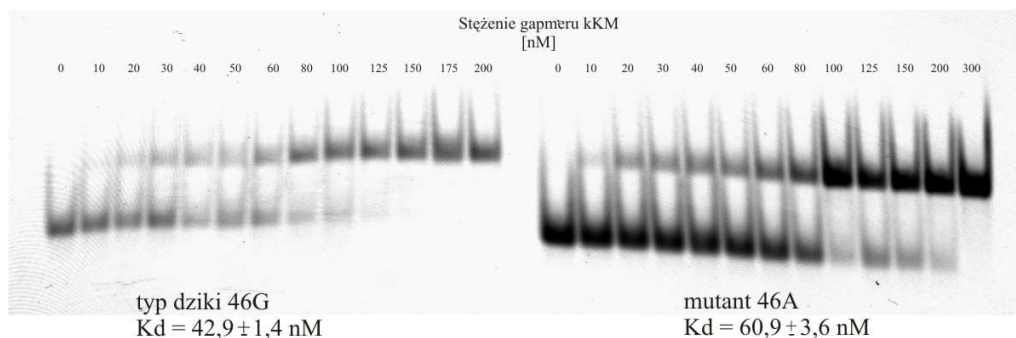
inhibitora Ik1 i gapmeru kKM jest w zasadzie nieistotna, w związku z czym, można się spodziewać, że obydwu cząsteczkom inhibitora bardzo trudno będzie ograniczyć hybrydyzację wariantu dzikiego RNA 46G z gapmerem kKM. Z kolei znaczące różnice stabilności dupleksów wariantu zmutowanego RNA 46A z inhibitorami Ik2 (krótszy) i Ik1 (dłuższy) względem jego duplexu z komplementarnym gapmerem (odpowiednio +16,2 kcal/mol i +10,5 kcal/mol) wskazują, że żaden z inhibitorów nie powinien w sposób znaczący wpływać na hydrolizę wariantu zmutowanego RNA 46A.

Tabela 4. Kluczowe parametry termodynamiczne dupleksów RNA z tranzycją G/A (E46K), tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

	Typ dziki 46G			Mutant 46A		
ASO	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
Ik2		11,83 ± 0,10	67,9		7,76 ± 0,02	63,4
Ik1		20,98 ± 0,58	82,8		13,45 ± 0,17	63,5
kKM		20,59 ± 0,50	78,8		23,95 ± 0,43	81,3

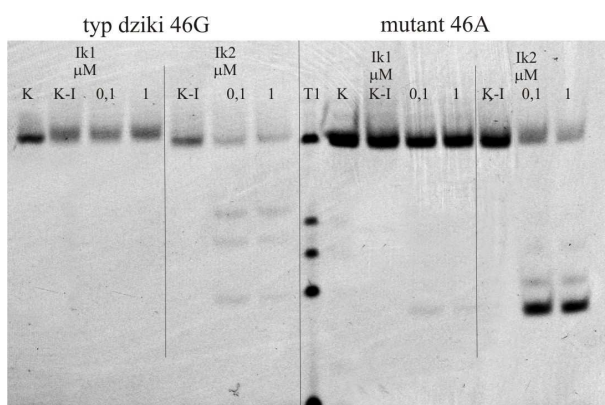
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.1. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 39, a – temperatura topnienia duplexu w stężeniu 10⁻⁴M

Bardzo zbliżone powinowactwo obydwu RNA 46 do gapmeru kKM wyraża także stała dysocjacji wyznaczona metodą EMSA. Podobnie jak w przypadku tranzycji G/A w RNA 717, zaobserwowano większe powinowactwo hybrydyzcyjne gapmeru kKM z wariantem dzikim RNA, co sugerowałoby że obecność niekanonicznej pary rG-dT sprzyja tworzeniu heterodupleksu bardziej niż obecność pary rA-dT. Różnica w stężeniu gapmeru wiążącym połowę RNA dzikiego i zmutowanego wynosiła 42%. Ponadto, porównując ze sobą tworzenie dupleksów dla sekwencji 717 i 46, zarówno pomiary termodynamiczne jak i pomiary stałej wiązania wykazały że sekwencja RNA 46 tworzy znacznie trwalsze duplekisy niż sekwencja 717, a ten sam typ niesparowania destabilizuje ją silniej niż sekwencję 717.



Rysunek 23. Tworzenie dupleksów wariantów RNA 46 z gapmerem kKM.

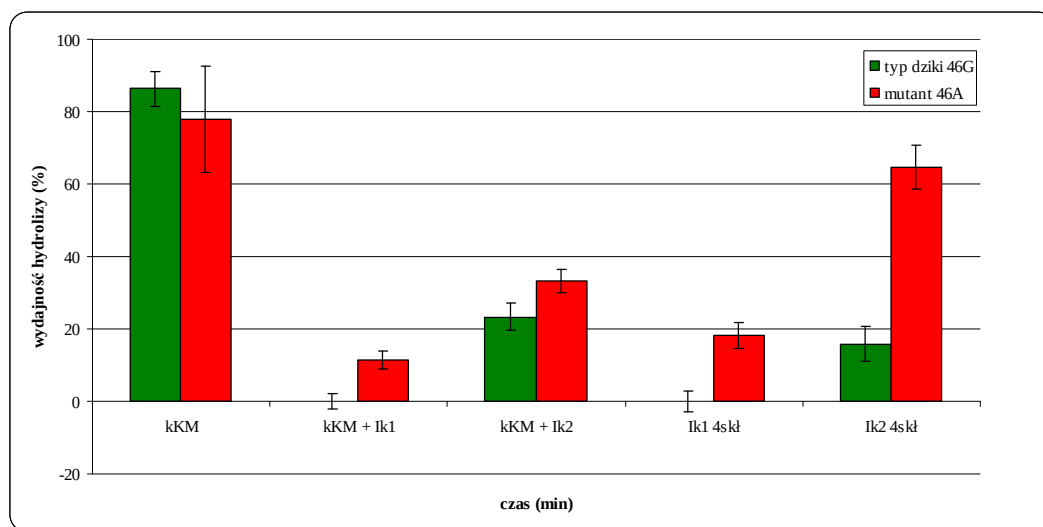
Dla obydwu wariantów RNA 46 przeprowadzono reakcje hydrolizy z udziałem rybonukleazy H w układzie dwuskładnikowym (wariant RNA i gapmer), oraz trójskładnikowym (wariant RNA, gapmer i inhibitor Ik1 lub Ik2). W celu stworzenia układów czteroskładnikowych (obydwa warianty RNA, gapmer i inhibitor Ik1 lub Ik2), bazując na poprzednich przykładach, przetestowano dwa stężenia inhibitorów: równomolowe w stosunku do RNA (0,1 μ M) oraz 10-krotny nadmiar w stosunku do RNA (1 μ M). Test RNazy H inhibitorów wykazał, że inhibitor 10-nukleotydowy Ik1 w układzie trójskładnikowym całkowicie hamuje hydrolizę zarówno formy dzikiej jak i zmutowanej RNA 46 i w takim samym stopniu, niezależnie od zastosowanego stężenia. Krótszy inhibitor Ik2 nie ogranicza istotnie hydrolizy mutantu 46A, jednak nie jest w stanie całkowicie zapobiec trawieniu formy dzikiej RNA 46G (Wykres 22), niezależnie od stężenia, podobnie jak Ik1. Stąd w układzie 4-składnikowym zastosowano 1 μ M stężenie inhibitora.



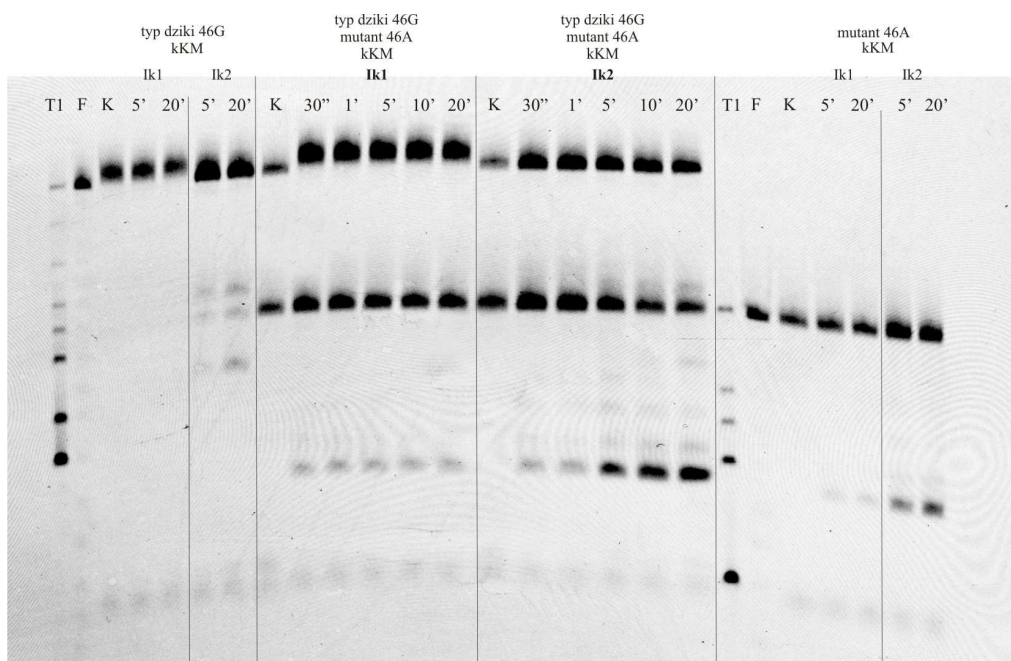
Rysunek 24. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia pojedynczych wariantów RNA w zależności od stężeń inhibitorów. K- samo RNA w obecności RNazy H, K-I RNA z cząsteczką inhibitora, wartości stężeń inhibitora w układzie trójskładnikowym (RNA, inhibitor, gapmer)

Eksperyment w układzie 4-składnikowym wykazał, że podobnie jak w przypadku substytucji G/A w RNA 717, 10-nukleotydowy inhibitor jest zbyt silną konkurencją dla gapmeru kKM, gdyż istotnie obniżał także poziom hydrolizy mutantu RNA 46A. Z kolei

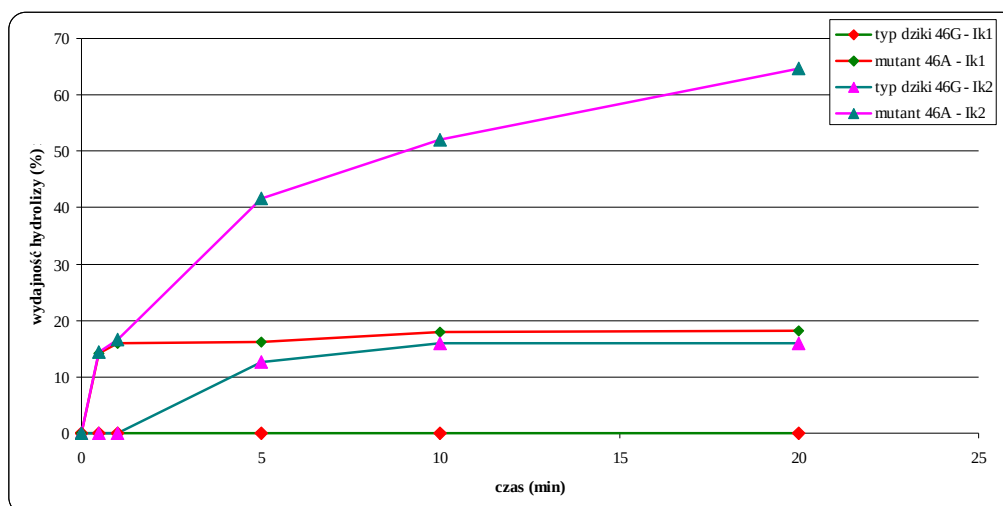
zastosowanie krótszego inhibitora Ik2 pozwoliło na uzyskanie selektywnej hydrolizy, ograniczając wydajność trawienia formy dzikiej RNA 46G o około 70%, natomiast formy zmutowanej 46A jedynie o 13% (Wykres 22, Rysunek 25).



Wykres 22. Porównanie wydajności trawienia RNA 46 w układzie dwuskładnikowym (z gapmerem kKM), trójskładnikowym (z gapmerem kKM i inhibitorem Ik1 lub Ik2) i czteroskładnikowym (obie formy RNA z gapmerem kKM i inhibitorem Ik1 lub Ik2 w stężeniu 1 μ M).

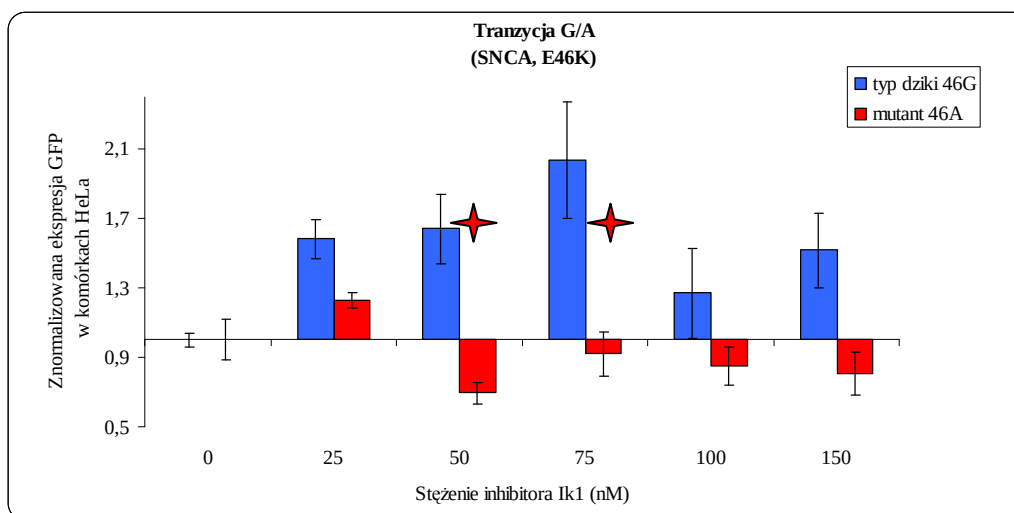


Rysunek 25. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia dupleksów RNA 46/gapmer kKM w układach trój- i czteroskładnikowych.



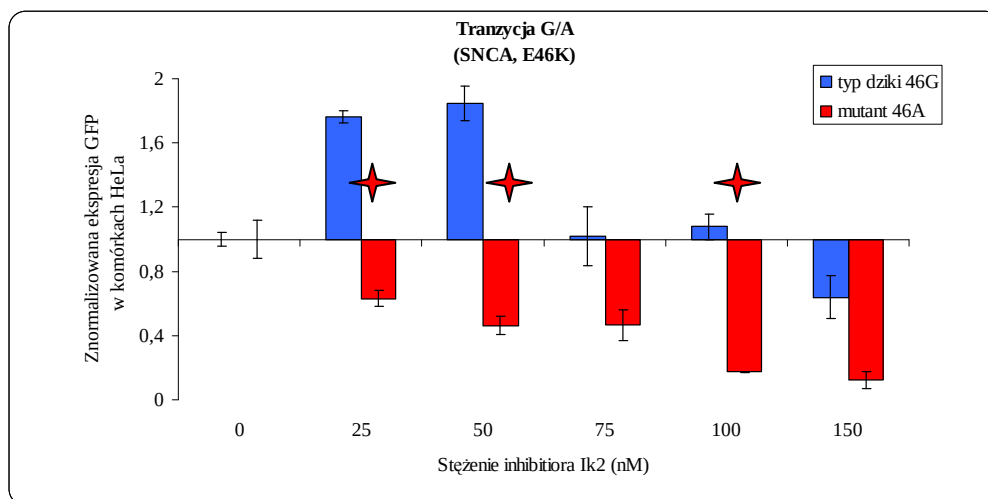
Wykres 23. Kinetyka hydrolizy RNA 46 w układzie czteroskładnikowym, w stężeniu inhibitorów 1 μ M. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Rysunek 25)

Testowany w komórkach *HeLa* inhibitor 10-nukleotydowy Ik1 okazał się wzmacniać ekspresję wariantu dzikiego RNA 46G nawet dwukrotnie, natomiast zasadniczo pozostawał bez wpływu na ekspresję mutantu 46A. Różnica w poziomie ekspresji między allelem dzikim i zmutowanym okazała się istotna statystycznie dla dwóch stężeń Ik1: 50 nM i 75 nM. Wzrost ekspresji może być wynikiem niezwykle silnego oddziaływania Ik1 z typem dzikim RNA (komplementarny dupleks zakończony podwójną parą G-C z końca 5' i potrójną parą G-C z końca 3', dodatkowo wzmocniony obecnością 2'-O-Me-RNA i LNA, temperatura topnienia 82,8°C), które sterycznie blokując translację, powodowało zwiększanie się puli RNA 46G. Nie obserwowano istotnej zależności między wzrostem poziomu RNA 46G a wzrostem stężenia Ik1. Natomiast w przypadku wariantu zmutowanego RNA 46A, silna destabilizacja jego dupleksu z Ik1 przez niesparowanie rA-C^L, sprzyjała rozplataniu tworzącej się ewentualnie blokady sterycznej cząsteczki mRNA mutantu (Wykres 24). Spośród analizowanych stężeń Ik1, do transfekcji w układzie tandemowym wybrano stężenie 25 nM i 75 nM.



Wykres 24. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora 10-nukleotydowego Ik1. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

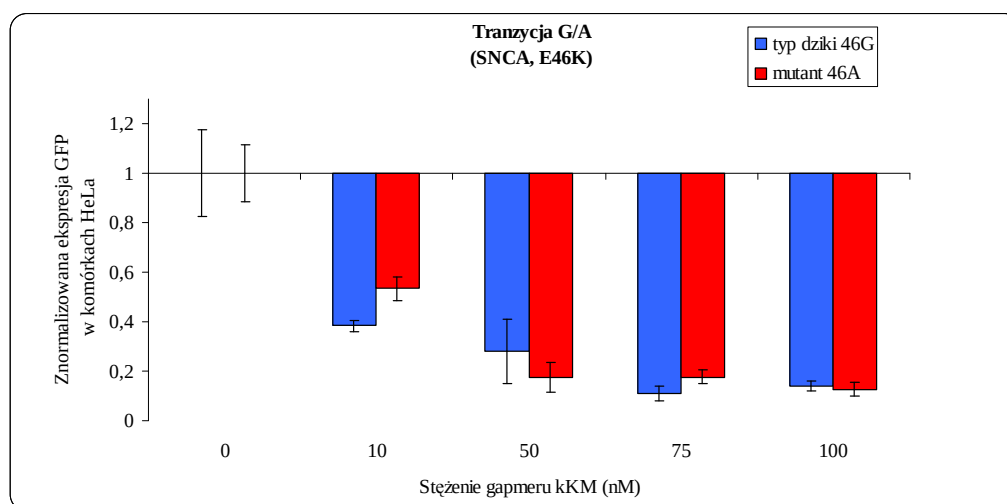
W przypadku transfekcji krótszym z inhibitorów, 7-nukleotydowym Ik2 (Wykres 25), wraz ze wzrostem stężenia obserwowano spadek poziomu ekspresji mutantu RNA, natomiast istotnie zwiększona względem kontroli ekspresja wariantu dzikiego RNA 46G w dwóch najniższych testowanych stężeniach Ik2 - 25 nM i 50 nM, powróciła do poziomu kontroli w stężeniu 75 nM, i z jego wzrostem stopniowo malała. W trzech stężeniach Ik2 ekspresja wariantów RNA 46 różniła się istotnie, przy czym do eksperymentu w układzie tandemowym wybrano stężenia 25 nM i 75 nM.



Wykres 25. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora 7-nukleotydowego Ik2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

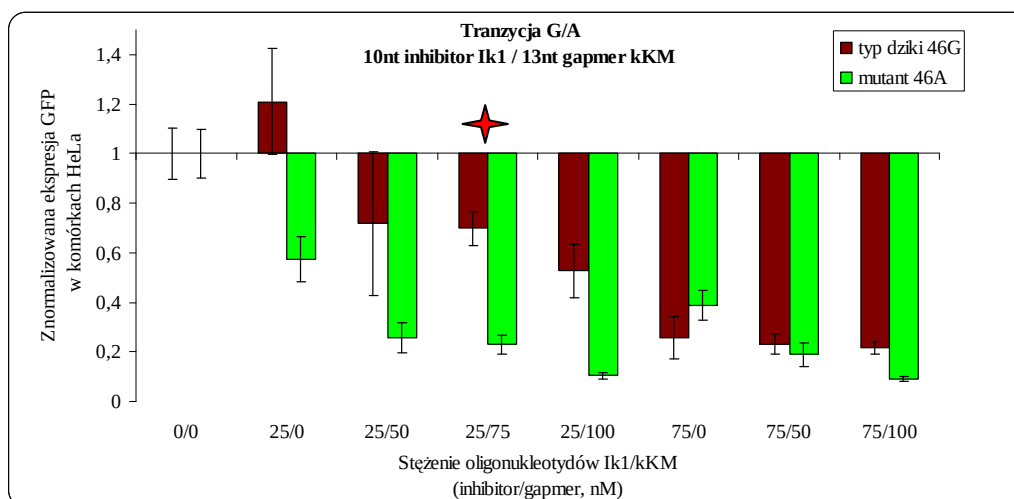
Gapmer kKM nie różnicował istotnie wydajności ekspresji obydwu wariantów RNA, w żadnym z zastosowanych stężeń. Już najmniejsze 10 nM stężenie powodowało silne około

50% zahamowanie ekspresji w obydwu przypadkach. Wraz ze wzrostem koncentracji wprowadzanego oligonukleotydu obserwowano niewielki, stopniowy spadek wydajności ekspresji do około 20% w najwyższym stosowanym stężeniu 100 nM (Wykres 26). Choć w zakresie stężeń 50-100 nM wpływ gapmeru różnił się niewiele, stężenia 50, 75 i 100 nM wybrano do przeanalizowania w układzie tandemowym w liniach komórkowych.



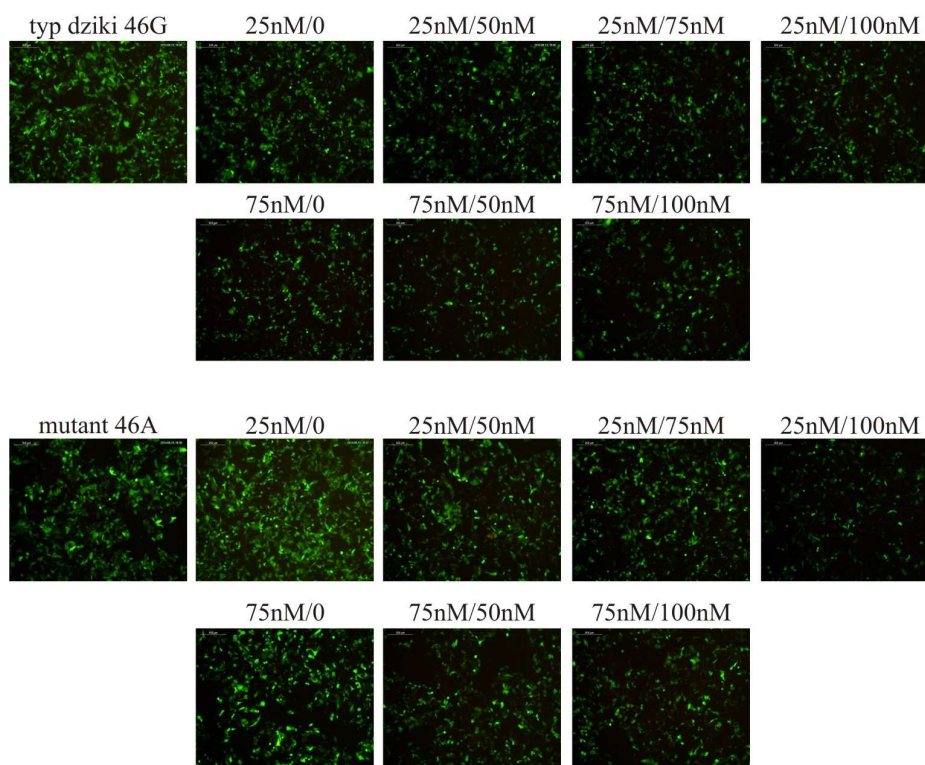
Wykres 26. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością gapmeru kKM. Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Rezultaty transfekcji układem Ik1/kKM okazały się interesujące, gdyż dla trzech kombinacji stężeń udało się uzyskać znaczące zróżnicowanie wydajności ekspresji obydwu RNA – 46% dla układu 25 nM Ik1/50 nM kKM, 47% dla układu 25 nM Ik1/75 nM kKM i 40% dla układu 25 nM/100 nM. Istotna statystycznie okazała się być jedynie różnica w stężeniu 25 nM/75 nM, głównie ze względu na większe błędy pomiarowe w dwóch pozostałych przypadkach.



Wykres 27. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ik1/kKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

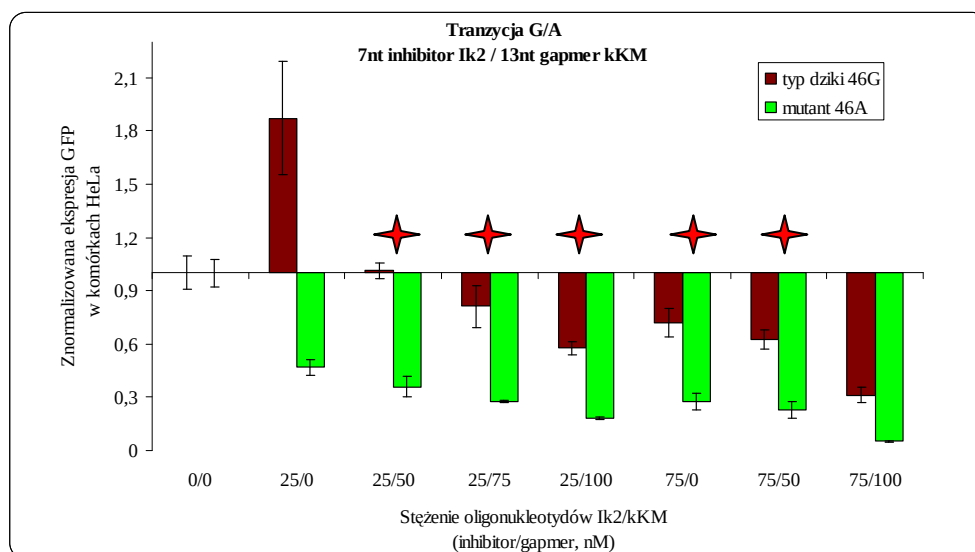
Transfekcja inhibitorem Ik1/gapmerem kKM



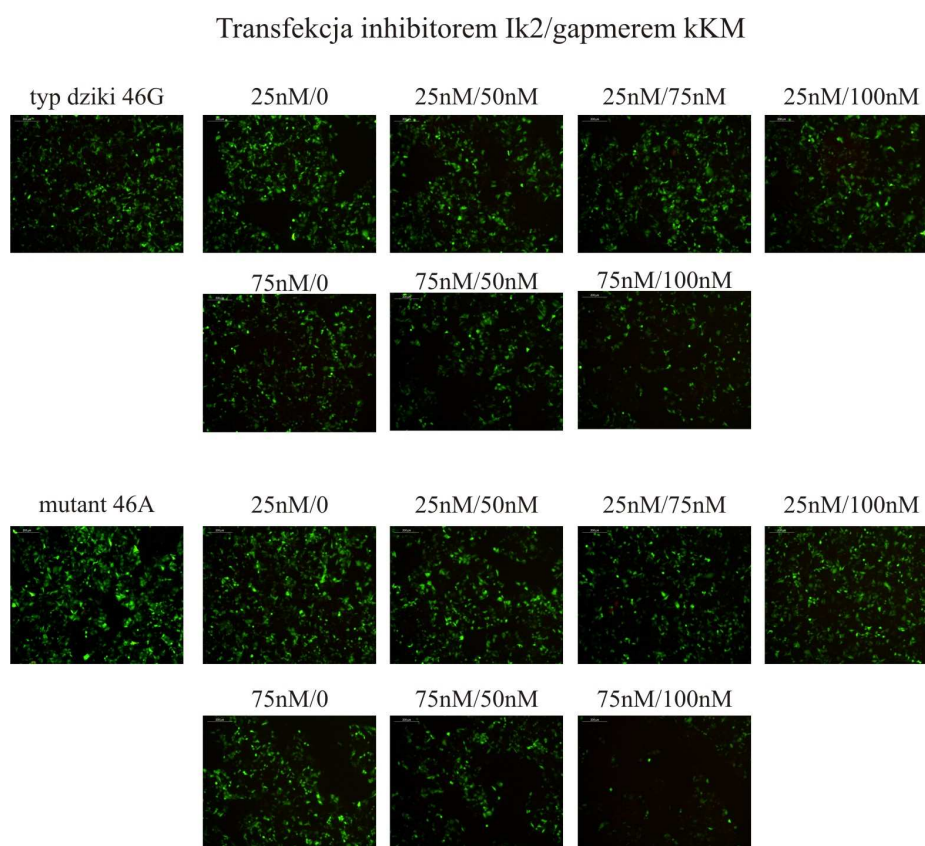
Rysunek 26. Komórki *HeLa* po transfekcji oligonukleotydami tandemowymi Ik1/kKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.

Dużo korzystniejsze okazało się zastosowanie w komórkach układu tandemowego z krótszym inhibitorem Ik2, który powodował różnice w poziomie ekspresji poszczególnych wariantów RNA praktycznie w każdym z analizowanych stężeń (Wykres 28). Podczas gdy

spadek ekspresji formy zmutowanej RNA 46A jest znaczny już przy najniższej zastosowanej



Wykres 28. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ik2/kKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.



Rysunek 27. Komórki *HeLa* po transfekcji oligonukleotydami tandemowymi Ik2/kKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.

kombinacji stężeń, poziom RNA wariantu dzikiego 46G zmniejsza się stopniowo, lecz nie dorównuje obniżeniu ekspresji formy zmutowanej nawet w najwyższej stosowanej

kombinacji stężeń Ik2/kKM. Największą różnicę w ekspresji obserwowano stosując układ stężeń 25 nM Ik2/50 nM kKM, wynosiła ona 65% i była istotna statystycznie, najmniejszą zaś dla układu 75 nM Ik2/100 nM kKM, wynosiła ona 26% i nie była istotna statystycznie na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

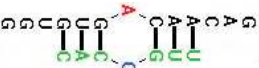
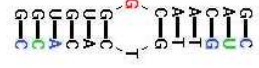
Porównując rezultaty uzyskane w komórkach *HeLa* dla obydwu inhibitorów w układzie tandemowym, 7-nukleotydowy Ik2 indukuje bardziej selektywne wyciszenie wariantu zmutowanego RNA 46A niż 10-nukleotydowy Ik1, głównie poprzez bardziej specyficzną hydrydyzację z formą dziką RNA 46G. Efekt ten obserwowano także w eksperymentach *in vitro*. Wyniki uzyskane dla sekwencji RNA 46, sugerują że możliwe jest uzyskanie alleloselektywnej hydrolizy formy zmutowanej RNA w przypadku tranzycji G/A. Dupleksy tworzone przez warianty RNA 46 z tandemowymi oligonukleotydami wykazywały między sobą większe różnice w trwałości termodynamicznej niż dupleksy formowane przez RNA 717, co z pewnością pomagało osiągnąć alleloselektywność.

2.2.3 SNCA A53T

Trzecia z analizowanych sekwencji RNA z tranzycją G/A plasuje się pomiędzy RNA 717 i RNA 46 jeśli chodzi o różnice w trwałości termodynamicznej poszczególnych dupleksów, utrzymując jeden schemat porównań². Zakładając, że w przypadku dupleksów RNA 717 występowały bardzo subtelne różnice, a w RNA 46 były one duże, to sekwencja RNA 53 dostarcza różnic pośrednich. Na podstawie uzyskanych parametrów termodynamicznych dla dupleksów RNA 53 wydaje się, że, podobnie jak w przypadku RNA 46, inhibitory nie zdołają wyprzeć wariantu dzikiego RNA 53G z dupleksów z gapmerem hKM, natomiast nie powinny zaburzać hydrydyzacji gapmeru z wariantem zmutowanym RNA 53A.

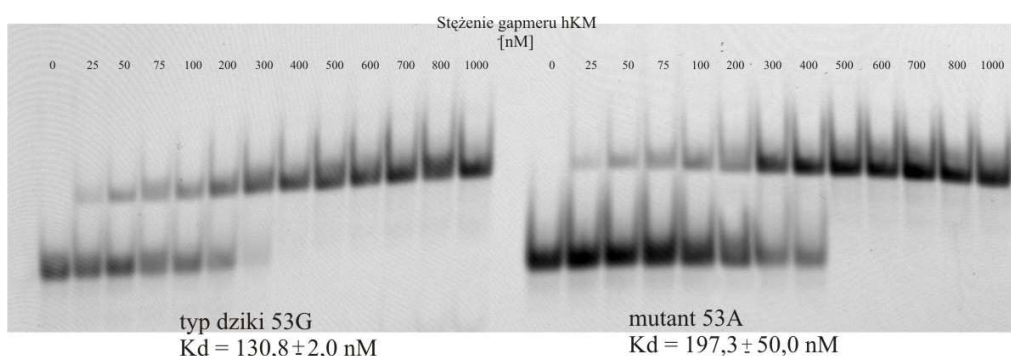
² np. porównanie stabilności dupleksów z gapmerem obydwu wariantów RNA 717, RNA 46 i RNA 53 daje różnice odpowiednio +0,5 kcal/mol, +3,36 kcal/mol i +1,7 kcal/mol (RNA dziki w stosunku do mutanta); porównanie stabilności dupleksów z inhibitorem 10-nukleotydowym daje różnice odpowiednio: -4,65 kcal/mol, -7,53 kcal/mol i -5,54 kcal/mol (RNA dziki w stosunku do mutanta); porównanie trwałości mutanta z gapmerem i z inhibitorem 10-nukleotydowym daje różnice odpowiednio: +0,6 kcal/mol, +10,5 kcal/mol, +8,4 kcal/mol w stosunku do gapmeru

Tabela 5. Kluczowe parametry termodynamiczne dupleksów RNA z tranzycją G/A (A53T), tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

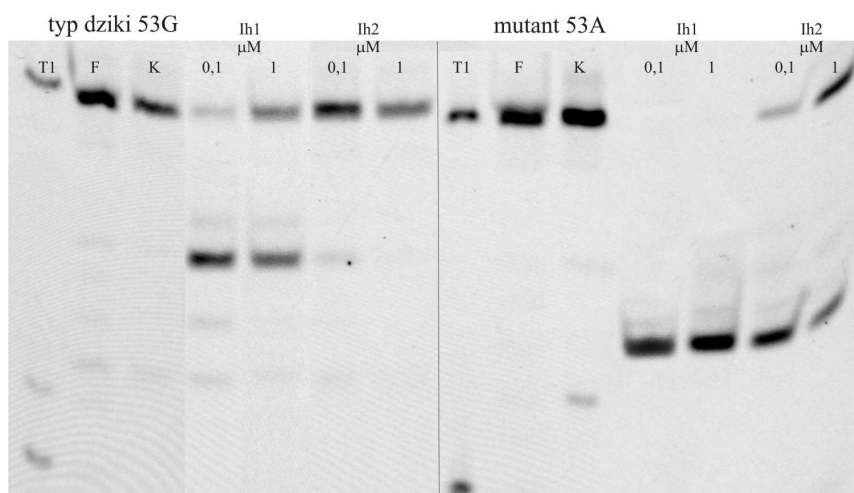
ASO	Typ dziki 53G			Mutant 53A		
	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
lh1		$10,33 \pm 0,07$	60,4		$6,22 \pm 0,05$	34,2
lh2		$16,12 \pm 0,13$	75,1		$10,58 \pm 0,06$	54,1
hKM		$16,29 \pm 0,09$	72,9		$18,99 \pm 0,34$	73,8

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 40; a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu $10^{-4}M$

Wyznaczone stałe wiązania wariantów RNA 53 z gapmerem hKM potwierdzają tendencję do silniejszego powinowactwa gapmeru względem typu dzikiego RNA 53G. Dla sekwencji RNA 53, stężenie gapmeru wiążące połowę RNA typu dzikiego i połowę formy zmutowanej RNA różni się najbardziej w porównaniu z innymi analizowanymi przypadkami tranzycji G/A, aż o 52,5%. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku stałej wiązania dupleksu komplementarnego otrzymano dość duży błąd, który z pewnością rzutuje także na tak dużą różnicę. Nie zmienia to jednak faktu, że w obrębie trzeciej analizowanej sekwencji z tranzycją G/A, występowanie pary rG-dT w heteroduplesie RNA/gapmer sprzyja jego formowaniu się, bardziej niż obecność kanonicznej pary rA-dT.

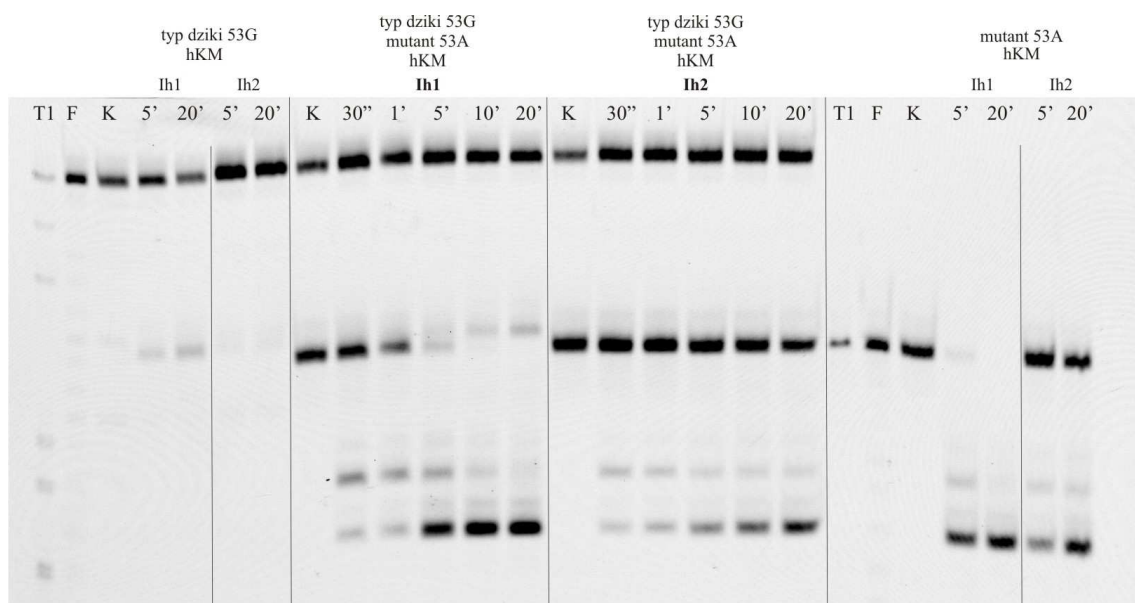


Rysunek 28. Tworzenie się dupleksów wariantów RNA 53/gapmer hKM w warunkach niedenaturujących (8 mM MgCl₂)



Rysunek 29. Hydroliza w układzie trójskładnikowym RNA 53 w różnych stężeniach inhibitora.

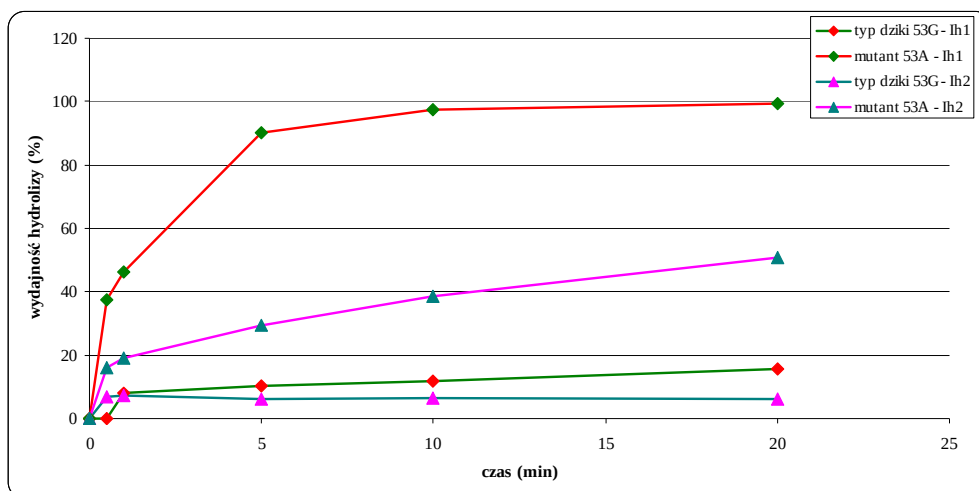
Analogicznie do poprzednich przypadków tranzykcji G/A, hydrolizę dupleksów RNA 53 w układzie trójskładnikowym przeprowadzono w dwóch stężeniach inhibitora: równomolowo w stosunku do RNA oraz w dziesięciokrotnym nadmiarze molowym w stosunku do RNA. Analiza rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia w obecności inhibitorów wykazała, że zadowalającą selektywność pozwala uzyskać stężenie 1 μ M inhibitora 7-nukleotydowego, oraz 0,1 μ M stężenie 10-nukleotydowego inhibitora Ih2, które jednak w niewielkim stopniu ogranicza także hydrolizę formy zmutowanej RNA 46A.



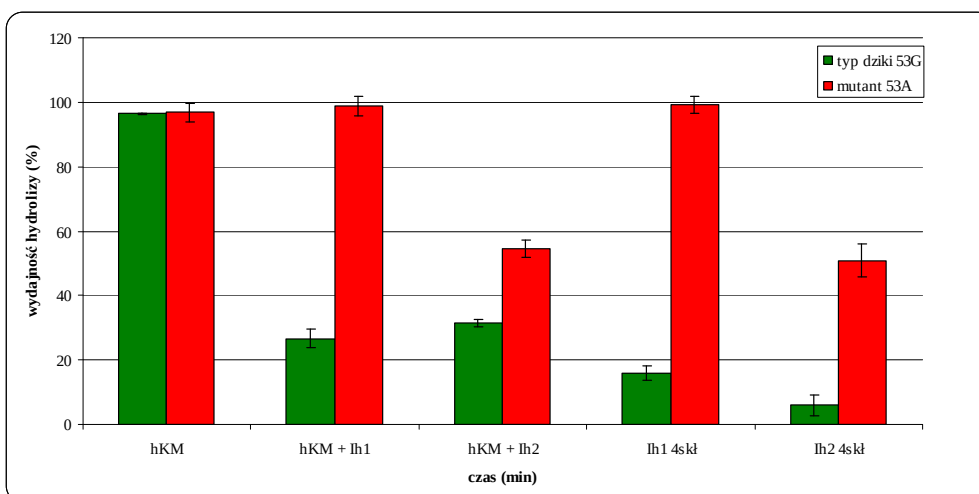
Rysunek 30. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia dupleksów RNA 53/gapmer hKM RNazą H w układzie trój- i czteroskładnikowym.

W układzie czteroskładnikowym postanowiono zastosować obydwa inhibitory w stężeniu 1 μ M. Tak jak się spodziewano, inhibitor 7-nukleotydowy selektywnie zatrzymał

hydrolizę formy dzikiej RNA 53G bez ograniczenia jej wydajności dla formy zmutowanej, natomiast dłuższy inhibitor lh2 powodował spadek wydajności trawienia formy zmutowanej RNA 53A o około 50% (Rysunek 30, Wykres 29-30).



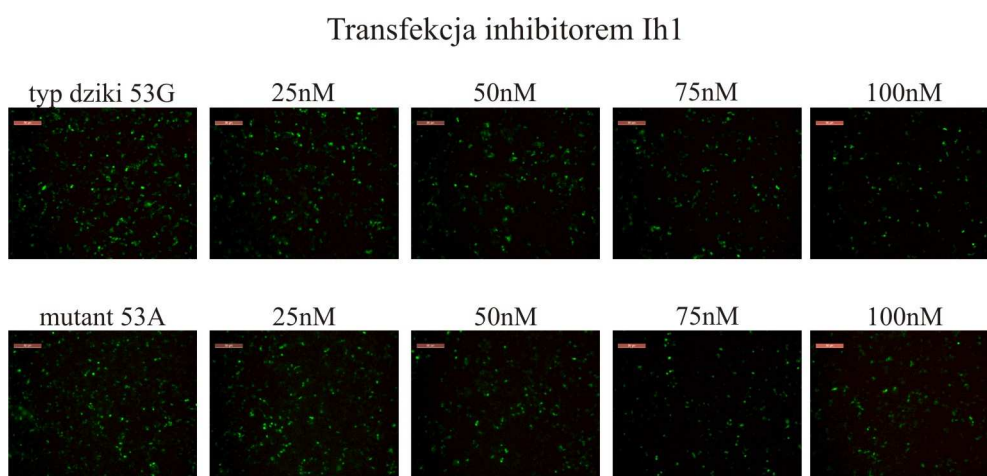
Wykres 29. Kinetyka hydrolizy w układzie czteroskładnikowym dla stężenia inhibitorów 1 μ M. Wykres reprezentuje ilościowo obraz żelu (Rysunek 30).



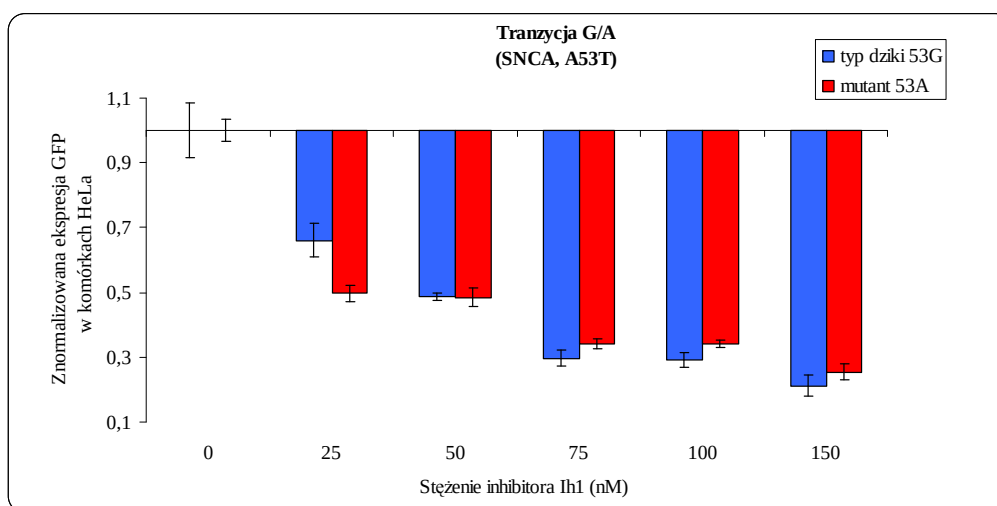
Wykres 30. Porównanie wydajności hydrolizy RNA 53 w układzie dwuskładnikowym (hKM), trójskładnikowym (hKM + Inh) i czteroskładnikowym.

Analizy aktywności inhibitorów w komórkach *HeLa* wykazały, że obydwa oligonukleotydy znacząco obniżają poziom obydwu wariantów RNA względem kontroli, natomiast bez wyraźnej selektywności w analizowanym zakresie stężeń. Niewielką, choć istotną statystycznie różnicę wynoszącą 16% obserwowano dla najniższego stosowanego stężenia lh1 25 nM. Dla dłuższego inhibitora lh2 obserwowano różnicę w wydajności ekspresji około 40% w jego stężeniu 50 nM, natomiast w stosunku do ogólnej tendencji spadkowej wydajności ekspresji w analizowanym zakresie stężeń dla RNA typu dzikiego 53G, uzyskany rezultat wydaje się być obarczony nieco większym błędem niż ten

prezentowany na poniższym wykresie, a obliczony na podstawie trzech powtórzeń transfekcji. Zastanawiające jest, na ile obserwowany spadek ekspresji jest wynikiem specyficznej hybrydyzacji do miejsca temu dedykowanego w obrębie RNA 53, jako że w sekwencji białka GFP sprzężonej z analizowanym fragmentem RNA, znaleziono 4 przypadki sekwencji komplementarnych do 7-nukleotydowego inhibitora Ih1 na odcinku pięciu nukleotydów. W świetle faktu, że jest to oligorybonukleotyd całkowicie 2'-O-metylowany, niespecyficzna hybrydyzacja do tych fragmentów z pewnością ma miejsce i silnie zaburza rzeczywisty wpływ krótszego inhibitora na ekspresję badanego RNA 53.



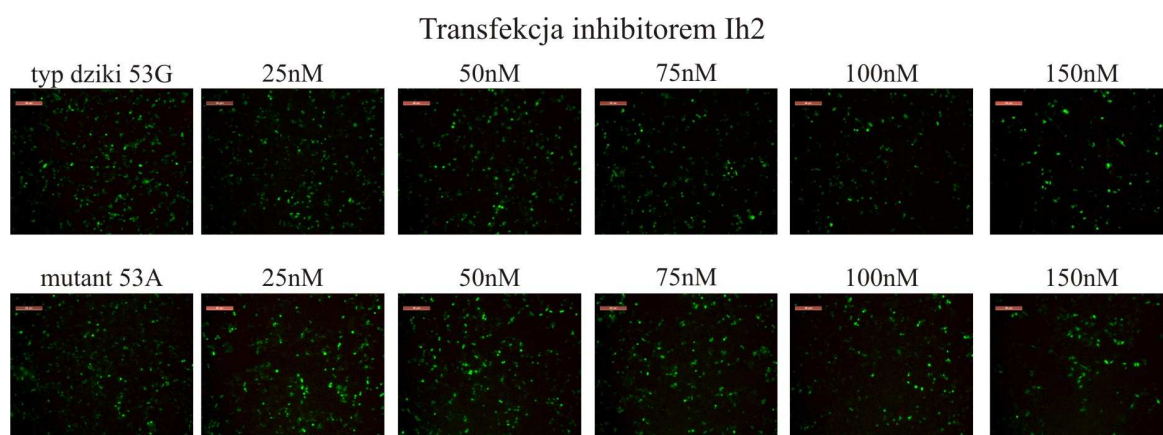
Rysunek 31. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Ih1, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



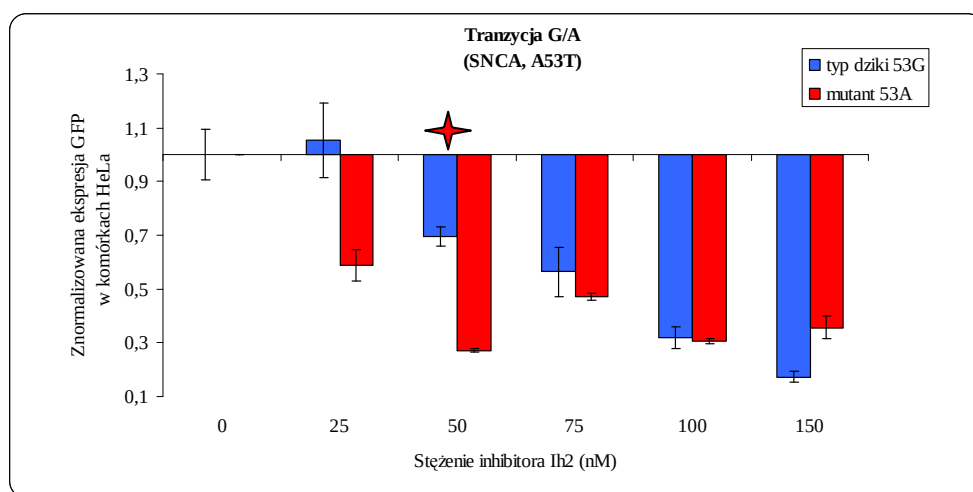
Wykres 31. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora 7-nukleotydowego Ih1. Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Dłuższy inhibitor 10-nukleotydowy Ih2, w niższych stężeniach badanego zakresu, w nieco mniejszym stopniu wycisza ekspresję analizowanego konstruktu niż krótszy inhibitor

Ih1, różnicując nawet jej poziom względem obydwu wariantów, w jednym przypadku nawet statystycznie istotnie, natomiast w wyższych stężeniach osiąga podobny stopień wyciszenia, co jego krótszy odpowiednik (około 75%, Wykresy 31-32). Kontrola transfekcyjna, w postaci plazmidu bez insertu stanowiącego sekwencję zainteresowania i stosownych inhibitorów, wykazała wyciszenie pustego plazmidu w przypadku zastosowania 100 nM Ih1 o około 65%, natomiast w przypadku zastosowania 100 nM Ih2 o około 50% (Załączniki, Wykres 83), co potwierdza występowanie regionów niespecyficznych oddziaływań w sekwencji samego białka GFP. Z drugiej strony, kontrolę transfekcyjną wykonywano w dość dużym stężeniu inhibitorów, które mogło dodatkowo potęgować efekt niespecyficzny.



Rysunek 32. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Ih1, obserwowana fluorescencja GFP. Powiększenie 10x.

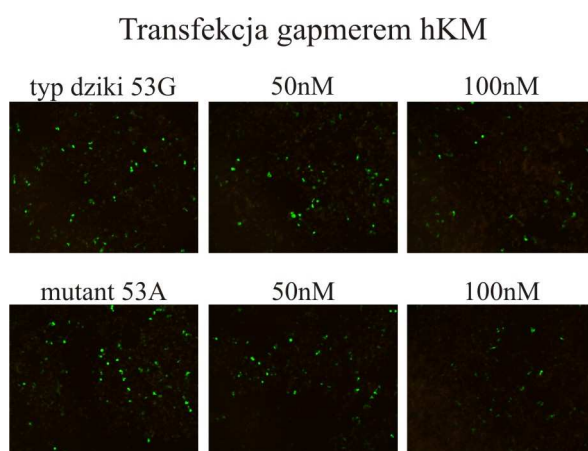


Wykres 32. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora 10-nukloetydowego Ih2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0.05$) różnicę w ekspresji obydwu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

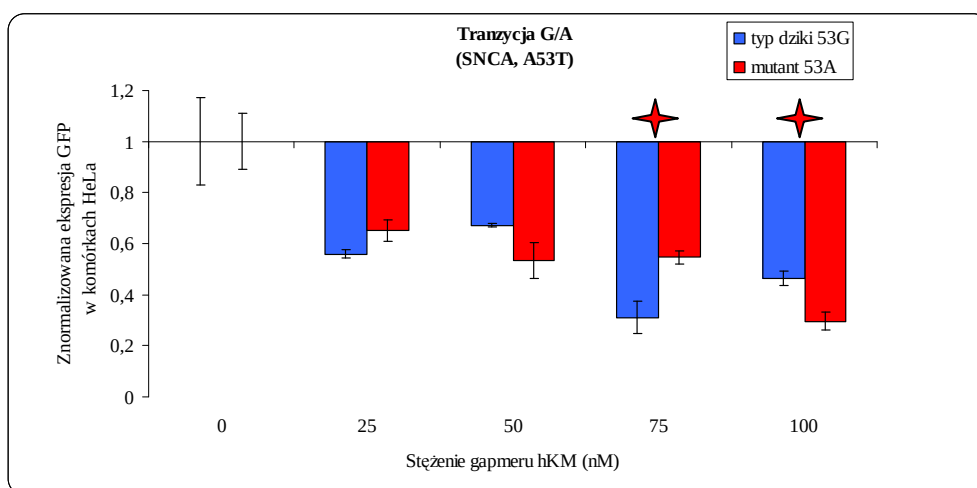
Do przetestowania w układzie tandemowym wybrano najniższe (25 nM) i wysokie (100 nM) stężenia krótszego inhibitora Ih1, w celu sprawdzenia, czy i w jakim stopniu udział

drugiego z oligonukleotydów wpłynie na ekspresję analizowanego konstruktu, oraz 25 nM i 50 nM stężenia inhibitora Ih2, w których był on sam w sobie selektywny.

W rezultacie transfekcji jedynie gapmerem hKM, w komórkach *HeLa* nie uzyskano selektywnego wyciszenia wariantu zmutowanego RNA, co jest zgodne z wynikiem uzyskanym w warunkach *in vitro*. Efekt obniżenia ekspresji jest nieco mniejszy niż efekt powodowany obecnością inhibitorów, a średni jej poziom różni się w sposób istotny dla dwóch najwyższych testowanych stężeń, przy czym dla każdego z odwrotną selektywnością. Fakt ten podważa więc istnienie takiej różnicy w ogóle, co można stwierdzić także obserwując generalny trend spadkowy ekspresji obydwu wariantów RNA (Wykres 33).



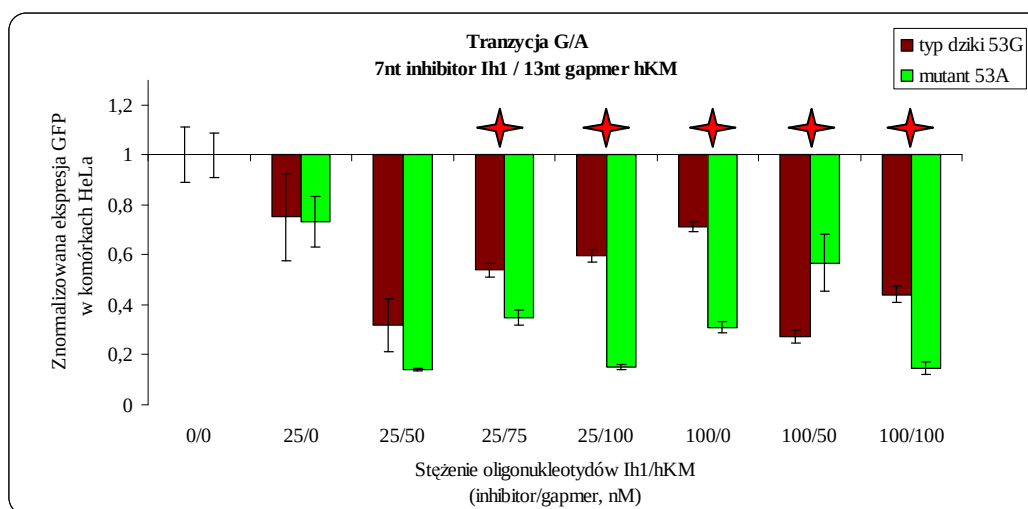
Rysunek 33. Komórki *HeLa* po transfekcji gapmerem hKM, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.



Wykres 33. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru hKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

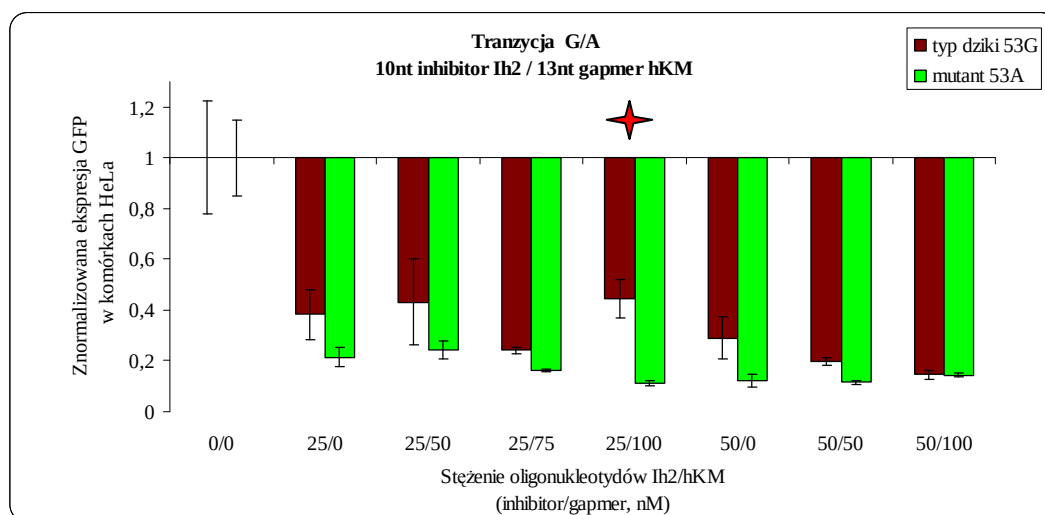
Eksperyment z udziałem tandemowych oligonukleotydów przeprowadzono stosując stężenia inhibitorów 25 nM i 100 nM oraz stężenia gapmeru 50 nM, 75 nM i 100 nM.

W przypadku układu z krótszym inhibitorem Ih1, uzyskano istotne różnice w poziomie ekspresji obydwu wariantów RNA 53 dla kilku kombinacji stężeń Ih1/hKM, natomiast nie wszystkie otrzymane wyniki można przyjąć bezkrytycznie. Zastosowanie inhibitora w stężeniu 100 nM daje sprzeczne rezultaty w zależności od koncentracji gapmeru, co oznacza, że prawdopodobnie brak selektywności w tym zakresie stężeń. Najbardziej wiarygodny wydaje się układ Ih1/hKM 25 nM/100 nM, w którym stężenie gapmeru przełamuje efekty (także niespecyficzne) inhibitora. Dla tej kombinacji różnica w wydajności ekspresji formy dzikiej i zmutowanej RNA 53 wynosi 45% i jest istotna statystycznie (Wykres 34).



Wykres 34. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ih1/hKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Stosując w układzie tandemowym dłuższy inhibitor nie uzyskano większej selektywności, dla żadnej z testowanych kombinacji stężeń. Największą różnicę w poziomie ekspresji między wariantem dzikim a zmutowanym RNA 53 obserwowano, analogicznie jak w przypadku zastosowania krótszego inhibitora, dla kombinacji Ih2/hKM 25 nM/ 100 nM. Jako istotna statystycznie, była ona mniejsza i wynosiła 33%. Jednak odnosząc ten wynik do ogółu wyników uzyskanych dla analizowanych kombinacji stężeń Ih2/hKM, można stwierdzić, że to zestawienie oligonukleotydów działa z podobnym efektem w zasadzie niezależnie od stężenia. Oznacza to, że różnica której szukano, została zatarta zbyt dużą stabilnością dupleksów tworzonych przez cząsteczkę inhibitora w połączeniu z możliwością jego niespecyficznych oddziaływań, choć, co wykazano, dłuższy inhibitor wydawał się generować mniej efektów niespecyficznych, przynajmniej w niższych stężeniach z badanego zakresu (por. wykresy 31-32).



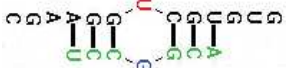
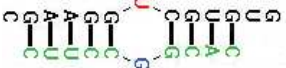
Wykres 35. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ih1/hKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Przykład sekwencji RNA 53 uwydatnił, jak znaczny może być udział efektów niespecyficznych w uzyskiwanym ogólnym rezultacie, których ryzyko pojawienia się jest tym większe im krótszy stosowany oligonukleotyd. Za ich uznaniem przemawia duży spadek ekspresji obydwu form RNA w wyniku transfekcji inhibitorów, i zasadniczo w niewielkiej zależności od stężenia. Dla innych omawianych w niniejszej pracy przykładów tranzycji G/A, czy także dla transwersji C/G nie obserwowano, aby stosowanie inhibitorów w komórkach *HeLa* przynosiło tak znaczny spadek wydajności ekspresji analizowanych konstruktów.

2.3 Tranzycja C/T (SOD1, A4V)

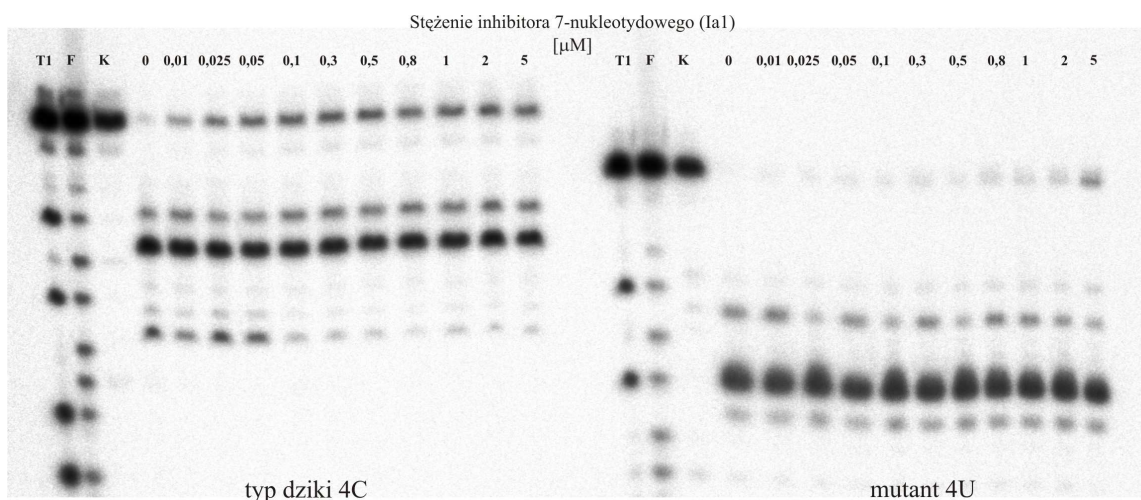
Substytucja C/T, w RNA występująca jako zmiana C/U, termodynamicznie nie rokuje większych możliwości dyskryminacji tworzonych dupleksów ze względu na pojawiające się w takim układzie niekanoniczne pary. Różnica w stabilności dupleksów RNA 4/gapmer aKM polegająca na obecności kanonicznej pary rU-dA lub niekanonicznej pary rC-dA wynosi zaledwie 2,7 kcal/mol na odcinku 13 par zasad. Natomiast dla dupleksów RNA 4 z inhibitorami różnica polegająca na obecności kanonicznej pary rC-dG, lub niekanonicznej pary rU-dG wynosi 2,3 kcal/mol na odcinku 7 par zasad (Ia1) i 0,48 kcal/mol na odcinku 10 par zasad. Są to wartości zbyt niskie by skutecznie zaburzać tworzenie się niekomplementarnych dupleksów. Stąd ograniczenie tworzenia się dupleksu wariant dziki RNA 4C/gapmer aKM może być utrudnione, w większym stopniu dla krótszego, a w mniejszym dla dłuższego z inhibitorów.

Tabela 6. Kluczowe parametry termodynamiczne dupleksów RNA z tranżycją C/T (A4V), tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

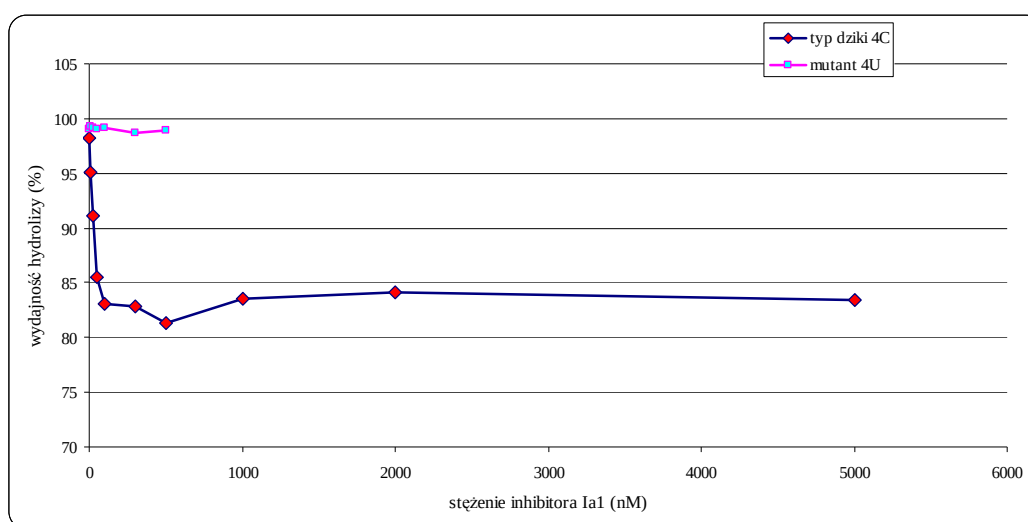
	Typ dziki 4C			Mutant 4U		
ASO	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
Ia1		12,41 ± 0,12	71,8		10,12 ± 0,19	56,1
Ia2		17,04 ± 0,65	80,1		16,56 ± 0,09	69,5
aKM		17,62 ± 0,34	71,2		20,24 ± 0,15	78,7

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 38, a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10^{-4} M

W celu weryfikacji realnych możliwości inhibitora Ia1, przeprowadzono reakcję w układzie trojskładnikowym, gdzie testowano stopień inhibicji reakcji trawienia wariantów RNA 4 w dupleksie z gapmerem aKM, z udziałem RNazy H, w zależności od różnych stężeń inhibitora. W stosowanym zakresie stężeń 0,01-5 μ M zaobserwowano, że maksymalną inhibicję trawienia wariantu dzikiego RNA 4 osiągnięto w stężeniu inhibitora 0,1 μ M i wynosiła ona zaledwie 17%. Dla wyższych stosowanych stężeń nie obserwowano wzrastającego efektu inhibicji. W przypadku wariantu zmutowanego RNA 4U maksymalna inhibicja 8% została uzyskana dopiero w stężeniu 5 μ M. Testowany układ trójskładnikowy z krótszym inhibitorem Ia1 pokazał, że oligonukleotyd tworzy z RNA dupleks zbyt słaby termodynamicznie, aby konkurować z gapmerem aKM. Jednak na podstawie obserwacji innych przykładów substytucji wiadomo, że w sytuacji gdy pojawiają się w reakcji obydwie warianty RNA, termodynamiczna preferencja poszczególnych oligonukleotydów względem siebie działa. Stąd, w układzie 4-składnikowym zastosowano obydwie inhibitory w niższym 0,1 μ M stężeniu (równomolowo do RNA). W analizowanym przypadku zakładano, że lepiej wydłużyć inhibitor mając na uwadze fakt, że zwiększanie jego stężenia nie poprawiało wydajności inhibicji hydrolizy względem RNA typu dzikiego (Rysunek 34, Wykres 36).

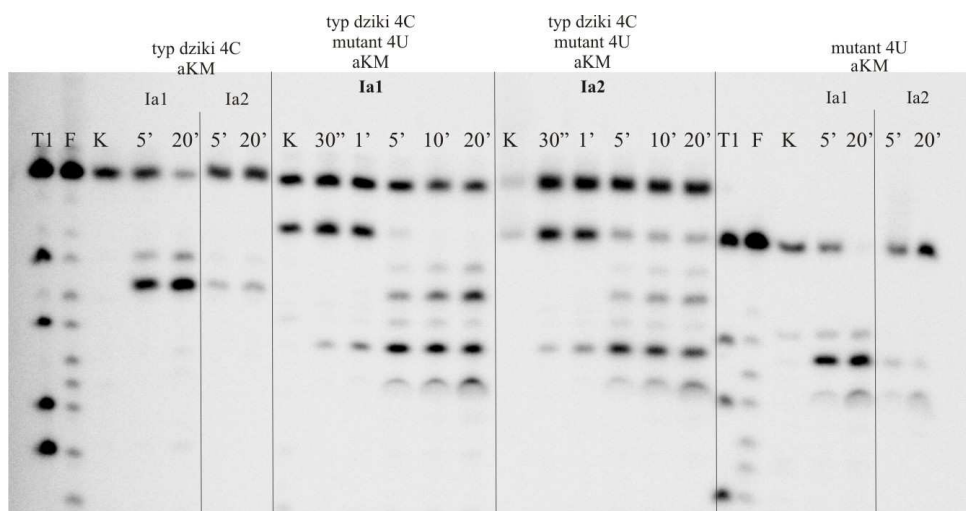


Rysunek 34. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia dupleksów RNA 4/gapmer aKM w zależności od stężenia inhibitora.

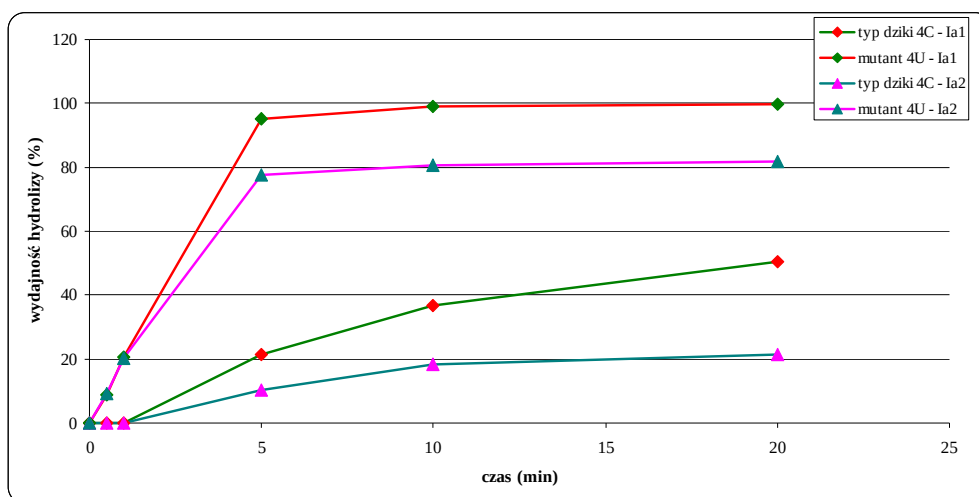


Wykres 36. Wpływ stężenia inhibitora Ia1 na wydajność hydrolizy RNA 4. Wykres reprezentuje obraz żelu (Rysunek 29) i jego powtórzenie w zwiększonym zakresie

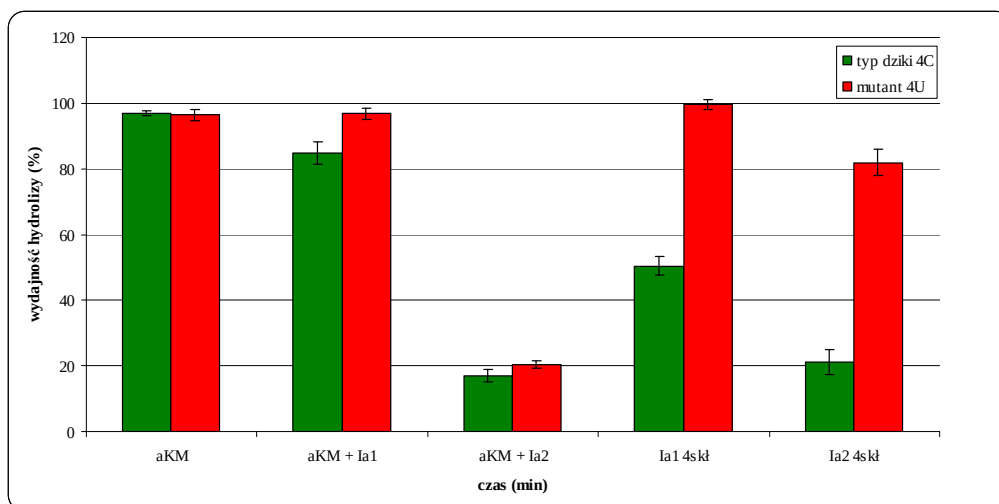
Hydroliza RNA 4 w układzie czteroskładnikowym, wykazała, że niewiele większą selektywność można uzyskać stosując dłuższy inhibitor Ia2 (różnica w wydajności trawienia obydwu wariantów RNA wynosiła 60%), przy jednoczesnej 19% inhibicji hydrolizy formy zmutowanej 4U. Stosując krótszy z inhibitorów, trawienie formy dzikiej RNA 4C jest ograniczone w około 50%, natomiast nie ma tego efektu względem wariantu zmutowanego RNA 4U (Rysunek 35, Wykresy 37 i 38).



Rysunek 35. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia dupleksów RNA 4/gapmer aKM RNazą H *in vitro*.



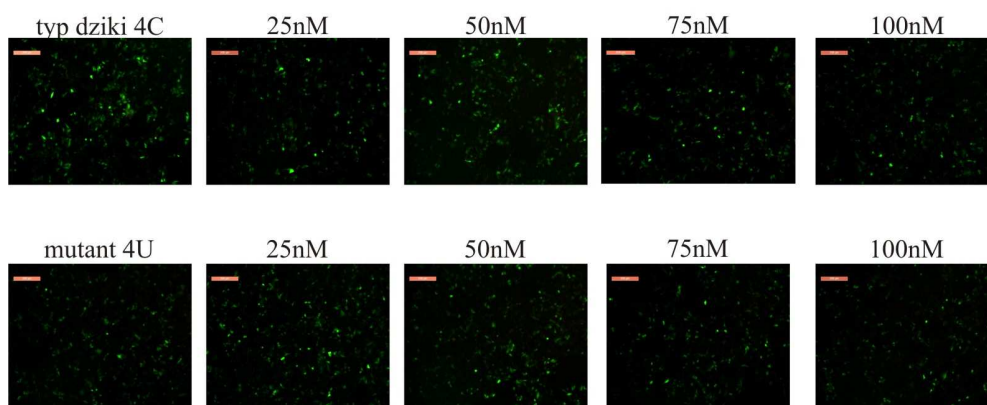
Wykres 37. Kinetyka trawienia dupleksów RNA 4 w układzie czteroskładnikowym, w 0,1 μM stężeniu inhibitorów. Wykres reprezentuje przebieg reakcji z RNazą H na podstawie obrazu żelu (Rysunek 30)



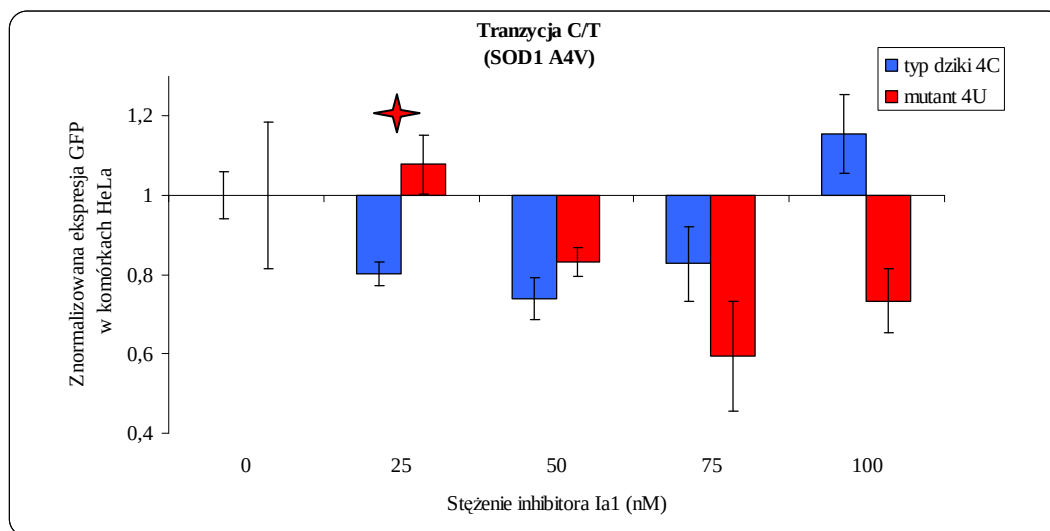
Wykres 38. Porównanie wydajności hydrolizy RNA 4 w układzie dwuskładnikowym (aKM), trójskładnikowym (aKM + Inh) i czteroskładnikowym.

Transfekcja linii komórkowej *HeLa* krótszym z inhibitorów Ia1 nie wykazała jego istotnego działania względem żadnego z wariantów RNA, w którymkolwiek z analizowanych stężeń. Uzyskany poziom ekspresji nie wykazywał zależności względem zastosowanego stężenia inhibitora i oscylował zwykle w granicach błędu kontroli (Wykres 39).

Transfekcja inhibitorem 7-nukleotydowym Ia1



Rysunek 36. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Ia1, obserwowana fluorescencja białka GFP. Powiększenie 10x.

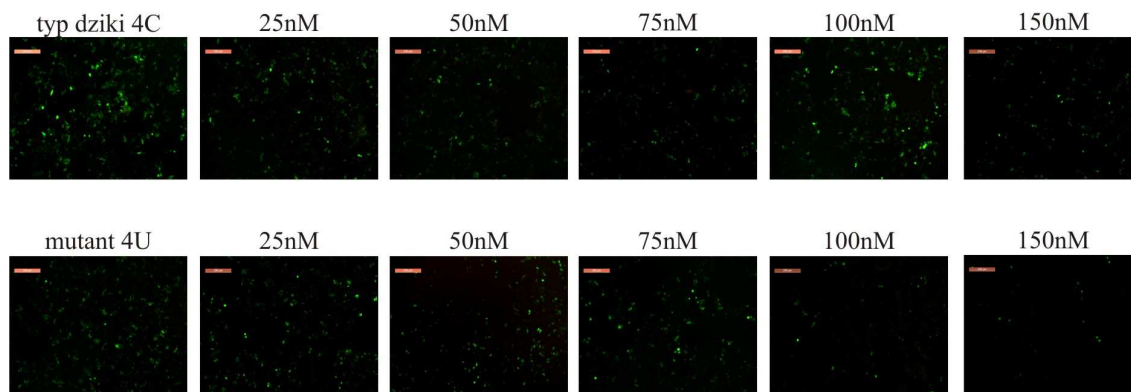


Wykres 39. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora 7-nukleotydowego Ia1. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

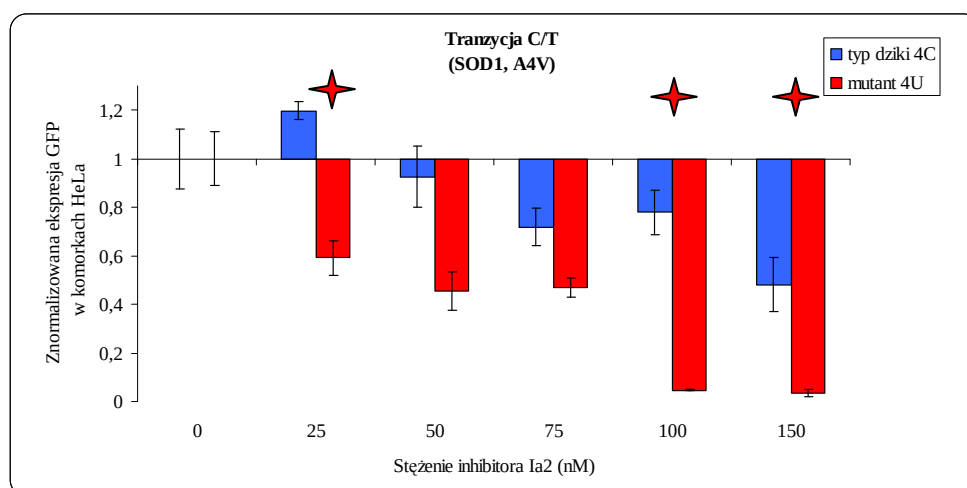
Z kolei zastosowanie inhibitora Ia2, już od najniższego stężenia skutkowało zdecydowanym obniżeniem ekspresji wariantu zmutowanego 4U względem dzikiego 4C, obserwowano ujemną korelację między poziomem ekspresji a rosnącym stężeniem, a najniższego stężenia 25 nM oraz dla dwóch najwyższych stężeń 100 nM i 150 nM, różnica w wydajności ekspresji między wariantem dzikim i zmutowanym RNA 4 okazała się istotna

statystycznie. Dla stężenia 25 nM wynosiła ona 60%, dla 100 nM - 74%, a dla 150 nM – 45%. Widać, że zróżnicowanie ekspresji utrzymuje się na zbliżonym poziomie niezależnie od stężenia Ia2 (Wykres 40).

Transfekcja inhibitorem 10-nukleotydowym Ia2



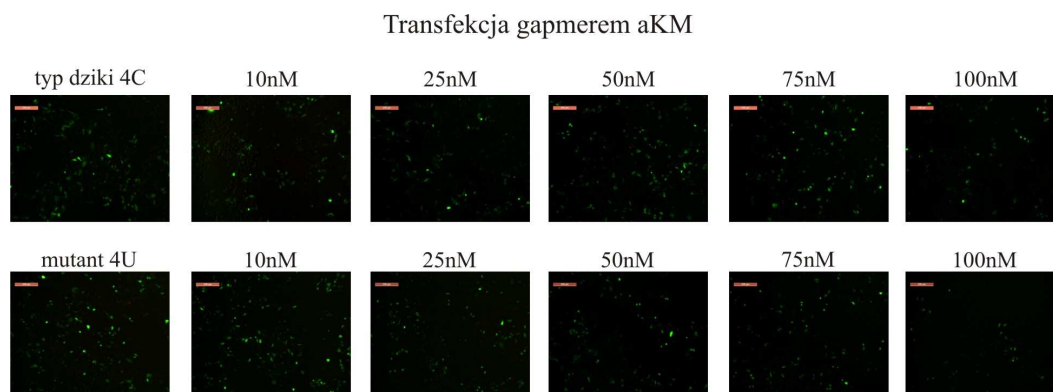
Rysunek 37. Komórki *HeLa* po transfekcji inhibitorem Ia2, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



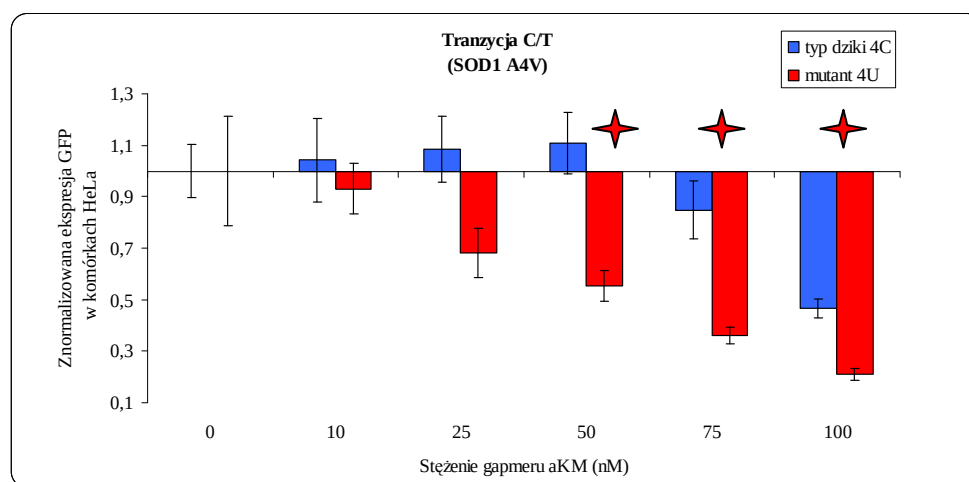
Wykres 40. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora 10-nukleotydowego Ia2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Gapmer aKM okazał się działać w komórkach dość selektywnie, na co nie wskazywały wyniki uzyskane *in vitro*. Istotnie statystycznie różnice w poziomie ekspresji między RNA dzikim 4C a mutantem 4U zaobserwowano dla stężeń 50 nM, 75 nM i 100 nM, przy czym największą różnicę uzyskano w stężeniu 50 nM i wynosiła ona 55% (Wykres 41). Zauważono ujemną korelację poziomu ekspresji względem stężenia dla obydwu wariantów RNA.

Po przeanalizowaniu powyższych rezultatów, uzyskanych w komórkach dla każdego z oligonukleotydów osobno, zdecydowano w układzie tandemowym zastosować 25 nM i 75 nM stężenie inhibitorów oraz 25 nM, 50 nM i 75 nM stężenie gapmeru aKM.



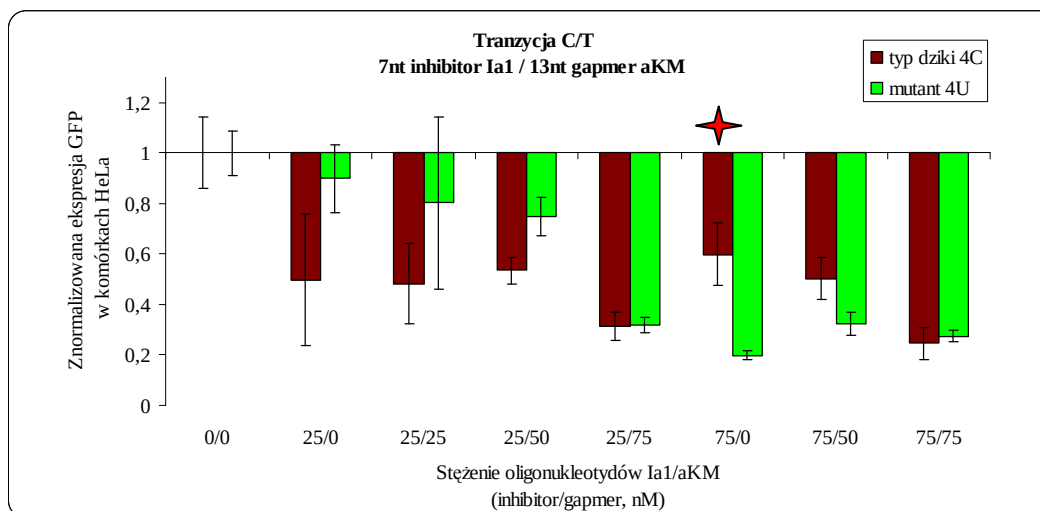
Rysunek 38. Komórki *HeLa* po transfekcji gapmerem aKM, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



Wykres 41. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru aKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

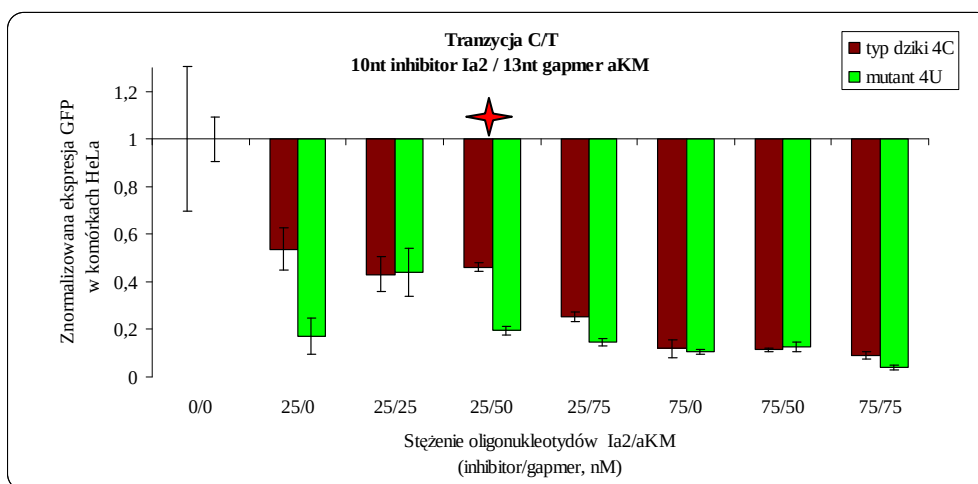
Układ tandemowy z krótszym inhibitorem Ia1 nie zaowocował selektywnym wyciszeniem ekspresji zmutowanego wariantu RNA 4U w komórkach *HeLa*. W serii powtórzeń uzyskiwano dość rozbieżne rezultaty w przypadku niskich stężeń gapmeru i inhibitora, zwłaszcza dla układu równomolowego Ia1/aKM (Wykres 42). Obserwowano zdecydowanie większą ujemną korelację wydajności ekspresji i stężenia aKM dla wariantu zmutowanego RNA 4U. W przypadku typu dzikiego RNA 4C, poziom RNA w stężeniu Ia1 25 nM był mniej więcej stały, natomiast w przypadku stężenia 75 nM spadał w miarę wzrostu stężenia gapmeru. Z kolei wydajność ekspresji wariantu zmutowanego RNA w tych warunkach była obniżona mniej więcej równo, niezależnie od stężenia aKM. Inhibitor w tym przypadku powoduje jednak zauważalne obniżenie ekspresji typu dzikiego RNA, pomimo że teoretycznie nie jest zdolny do uruchomienia szlaków jego degradacji. Układ dla którego

uzyskano istotną statystycznie selektywność wyciszenia, nie zawiera gapmeru (stanowi jedną z kontroli).



Wykres 42. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ia1/aKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Stosując w układzie tandemowym inhibitor 10-nukleotydowy Ia2 w przyjętych kombinacjach stężeń, tylko dla stężenia 25 nM/50 nM uzyskano istotną statystycznie różnicę wydajności ekspresji, wynoszącą 26% (Wykres 43). Jest to jednak wartość dość niska, i pozostaje dyskusyjne, czy wystarczająca, by móc określić sukcesem zastosowanie strategii oligonukleotydów tandemowych w przypadku tranzycji C/T (C/U).

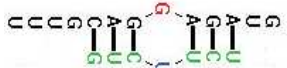


Wykres 43. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ia2/aKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

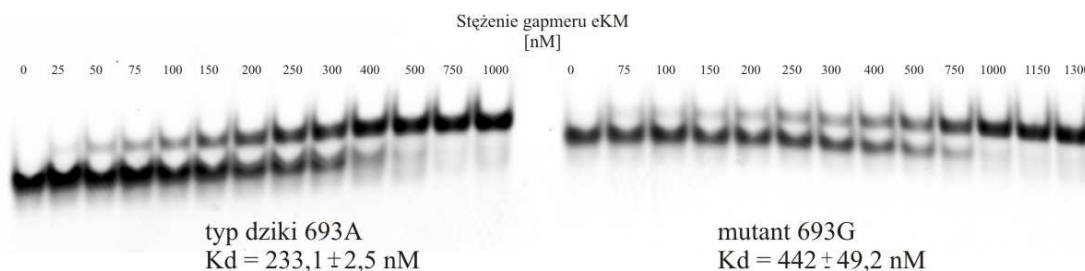
2.4 Tranzycja A/G (APP, E693G)

Przypadek tranzycji A/G wnosi do dupleksu typ dziki RNA 693A/gapmer eKM całkiem silnie destabilizujące niesparownie rA-dC (+5,31kcal/mol), natomiast druga niekanoniczna para tworząca się w duplesie mutant RNA 693G/inhibitor, rG-U^M, skutkuje tylko niewielką zmianą trwałości (+1,64 kcal/mol z 7-nukleotydowym inhibitorem Ie1, +1,44 kcal/mol z 9-nukleotydowym inhibitorem Ie2), nieznacznie zaburzając jego strukturę. Oznacza to, że przy nieco obniżonym powinowactwie RNA typu dzikiego do gapmeru, jednocześnie można się spodziewać, że cząsteczka inhibitora będzie hybrydyzować w podobnym stopniu do obydwu wariantów RNA. W tym kontekście dość zaskakujące okazały się wartości stałej wiązania obydwu wariantów RNA z gapmerem, uzyskane metodą EMSA. Podobnie jak w przypadku tranzycji odwrotnego typu G/A, stała wiązania dupleksu z niesparowaniem jest mniej więcej o połowę mniejsza od wartości stałej wiązania dupleksu komplementarnego (Rysunek 39). Wynik ten jest zastanawiający, ponieważ bazując na danych termodynamicznych spodziewano się raczej tendencji odwrotnej. Zapewne by móc w pełni porównywać dane termodynamiczne ze stałą wiązania, należałoby przeprowadzić obydwa eksperymenty w identycznych warunkach buforowych, wiadomo bowiem, iż obecność magnezu w roztworze znacząco podnosi stabilność dupleksów.

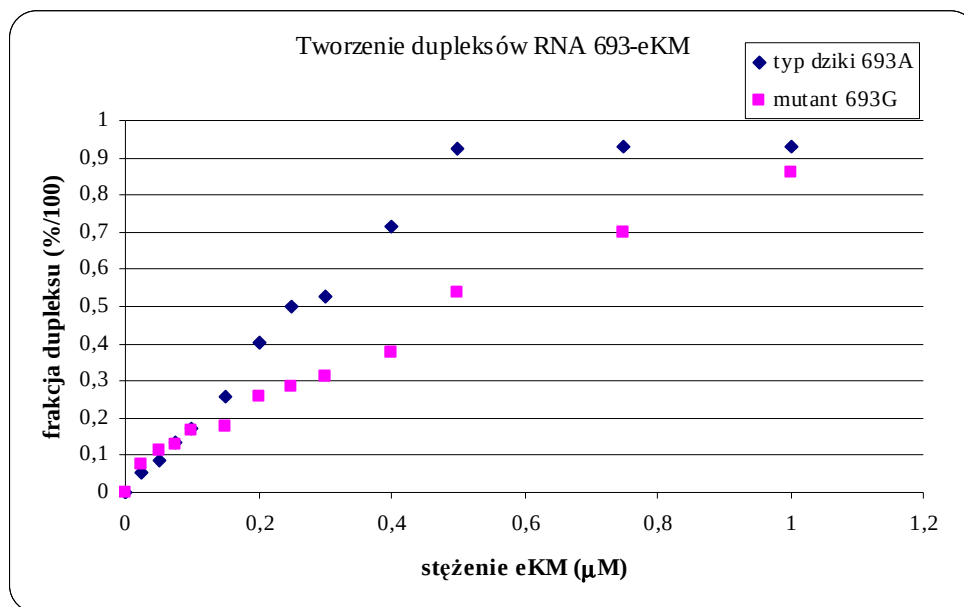
Tabela 7. Kluczowe parametry termodynamiczne dupleksów RNA z tranzycją A/G (E693G), tworzących się w obecności tandemowych oligonukleotydów.

	Typ dziki 693A			Mutant 639G		
ASO	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	Sekwencja/Struktura	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
Ie1		9,24 ± 0,04	51,6		7,52 ± 0,01	43,0
Ie2		11,88 ± 0,09	58,7		10,44 ± 0,06	52,0
eKM		11,69 ± 0,15	57,3		17,00 ± 0,48	73,2

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensownych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 42, a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10⁻⁴M



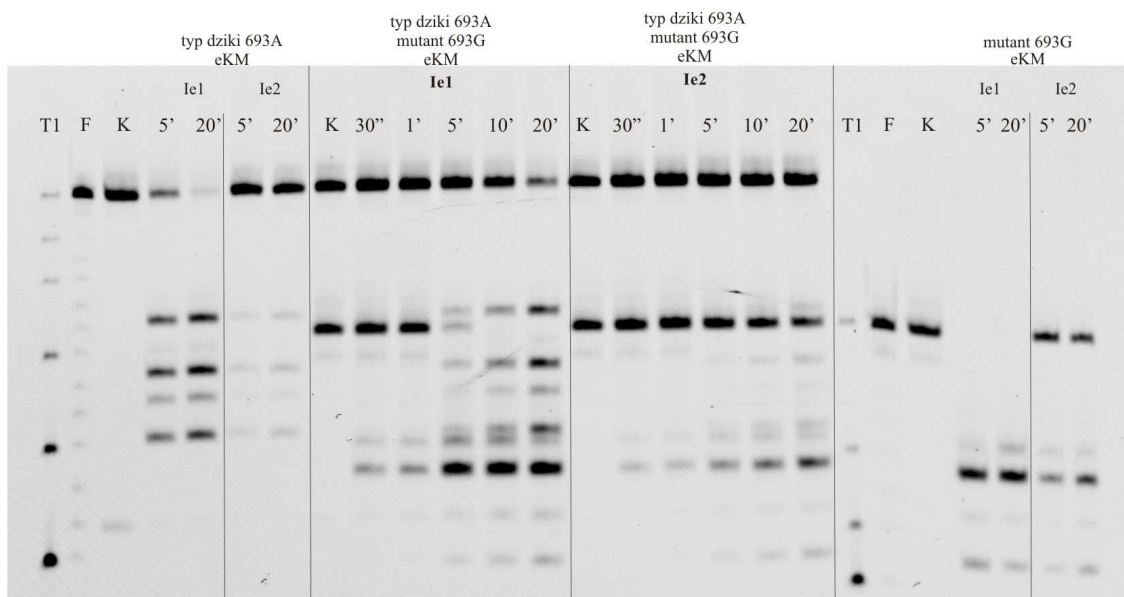
Rysunek 39. Tworzenie się duplexu RNA/gapmer eKM w warunkach niedenaturujących (8 mM MgCl₂)



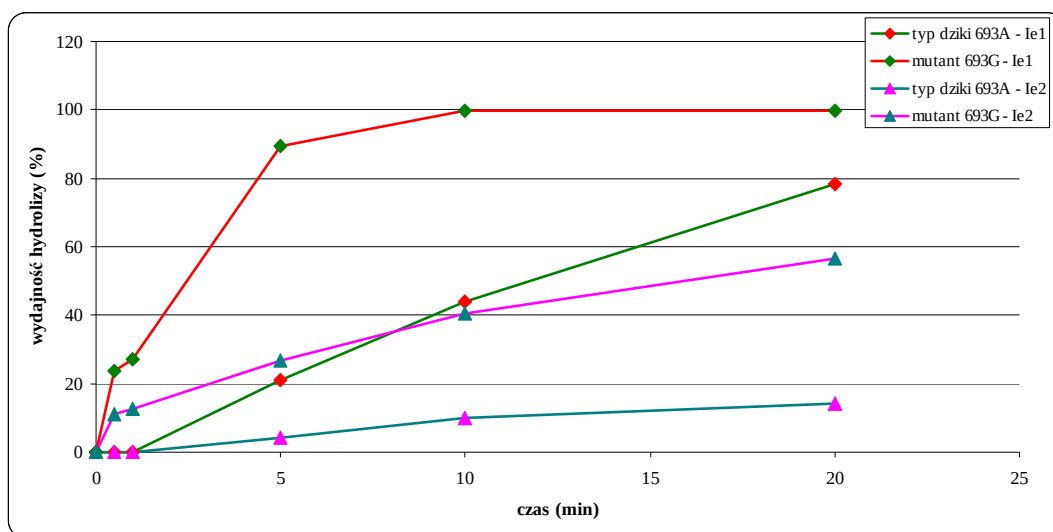
Wykres 44. Tworzenie duplexów RNA 693/gapmer eKM. Na podstawie odwrotności prezentowanej zależności wyznaczano stałe wiązania duplexów. Wykres reprezentuje proces tworzenia się duplexu na podstawie rozdziału w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym (Rysunek 39).

W oparciu o posiadane już doświadczenie optymalizacyjne wartości stężeń inhibitora, i pewną badawczą intuicję, przeprowadzono eksperyment w układzie trój- i czteroskładnikowym, w stężeniu inhibitorów 1 μM. W nieobecności drugiego z wariantów RNA, typ dziki 693A był prawie doszczętnie hydrolizowany gdy stosowano inhibitor 7-nukleotydowy Ie1, natomiast wydłużona do 9-nukleotydów, cząsteczka inhibitora Ie2, bardzo skutecznie ograniczała tę hydrolizę. Forma zmutowana RNA 693G była bez przeszkód trawiona w obecności krótszego z inhibitorów, natomiast w obecności cząsteczki 9-nukleotydowej obserwowano inhibicję hydrolizy na poziomie 40%. Układ trójskładnikowy wykazał maksymalną selektywność na poziomie około 40%, w obecności dłuższego wariantu inhibitora. Układ czteroskładnikowy nie zmienił istotnie profilu hydrolizy, powtarzając rezultat osiągnięty w nieobecności drugiego z wariantów RNA (Rysunek 40, Wykresy 45 i 46). Być może zastosowanie niższego stężenia inhibitora Ie2 nie powodowałoby tak znacznego obniżenia poziomu hydrolizy formy zmutowanej RNA 693G, choć z drugiej strony

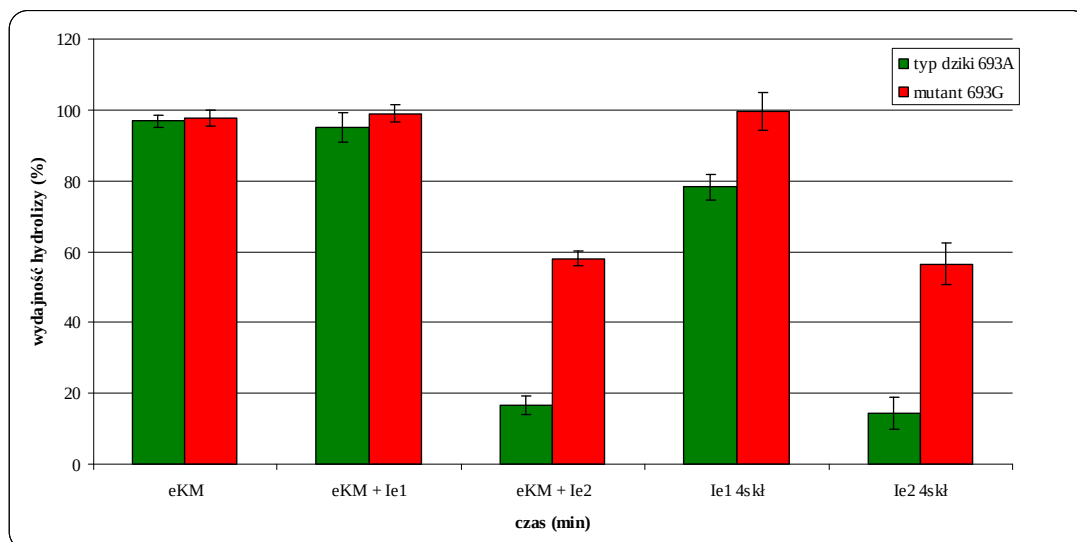
uzyskane dane termodynamiczne pozwoliły przewidzieć, że cząsteczka inhibitora, w analizowanej konfiguracji niesparowań, może nie wykazywać selektywności hybrydyzacji.



Rysunek 40. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia dupleksów RNA 693/gapmer eKM w układzie trój- i czteroskładnikowym.

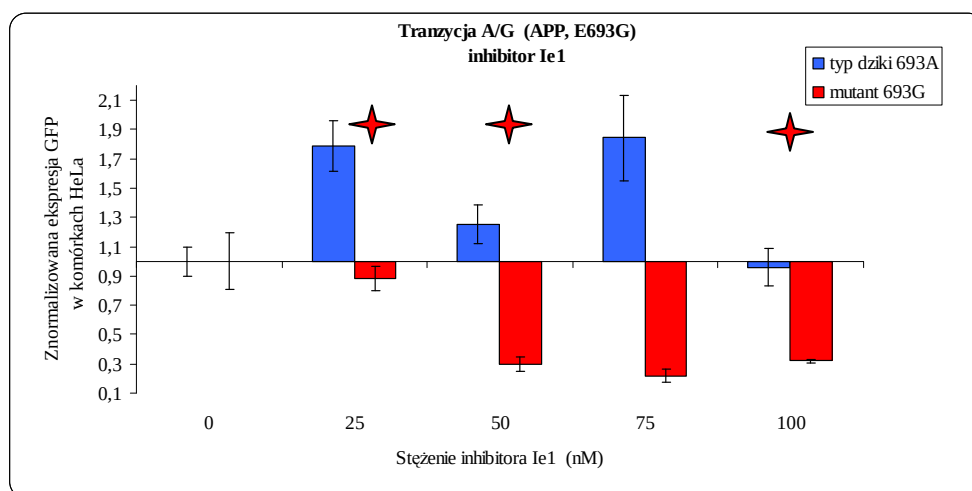


Wykres 45. Kinetyka hydrolizy RNA 693 w układzie czteroskładnikowym w stężeniu inhibitorów $1\mu\text{M}$. Wykres reprezentuje ilościowo przebieg reakcji z RNazą H na podstawie rozdziału produktów w żelu poliakrylamidowym (Rysunek 40)

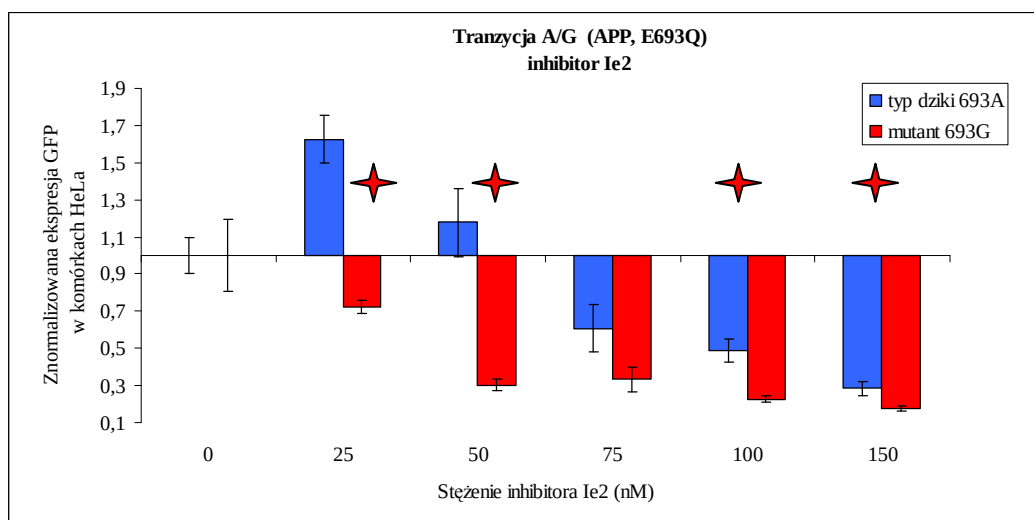


Wykres 46. Porównanie wydajności hydrolizy RNA 693 w układzie dwuskładnikowym (eKM), trójskładnikowym (eKM + Inh) i czteroskładnikowym.

Eksperymenty w linii komórkowej wykazały znaczące różnice w wydajności ekspresji, powodowane obecnością krótszego inhibitora Ie1, który stymulował wzrost poziomu RNA typu dzikiego 693A przy jednoczesnym spadku wydajności ekspresji wariantu zmutowanego RNA 693G. Efekty te wydają się być w korelacji ze stężeniem inhibitora (Wykres 47). Dłuższy inhibitor w wyższych stężeniach (>75 nM) spotęgował efekt wyciszenia przede wszystkim wariantu dzikiego RNA 693A (Wykres 48). W układzie tandemowym postanowiono przetestować inhibitor Ie1 w stężeniach 25 nM i 75 nM, a inhibitor Ie2 w stężeniach 25 nM i 50 nM. Każde z nich skutkowało dość znaczną różnicą w poziomie ekspresji między dwoma wariantami RNA 693.

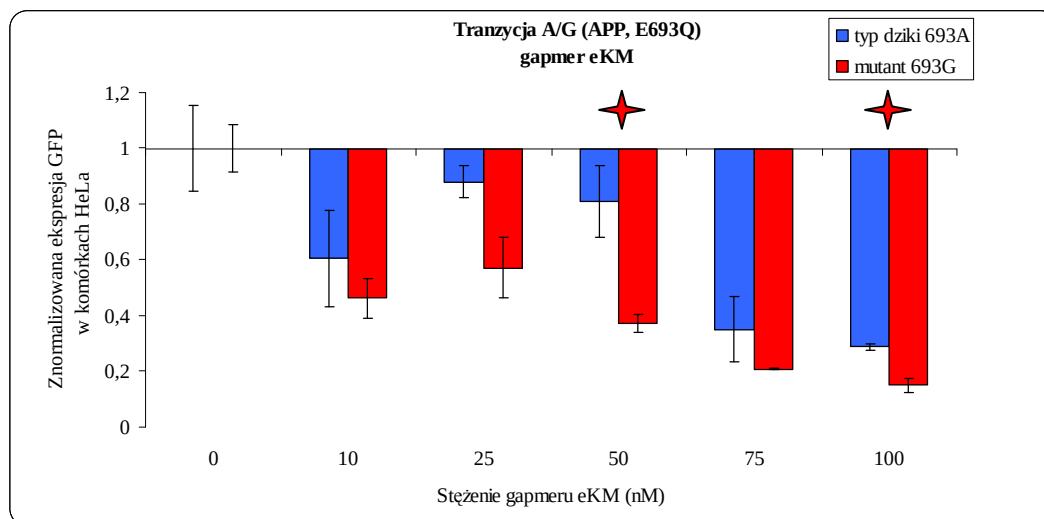


Wykres 47. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora Ie1. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice w ekspresji oznaczono gwiazdką.



Wykres 48. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem inhibitora Ie2. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice w ekspresji oznaczono gwiazdką.

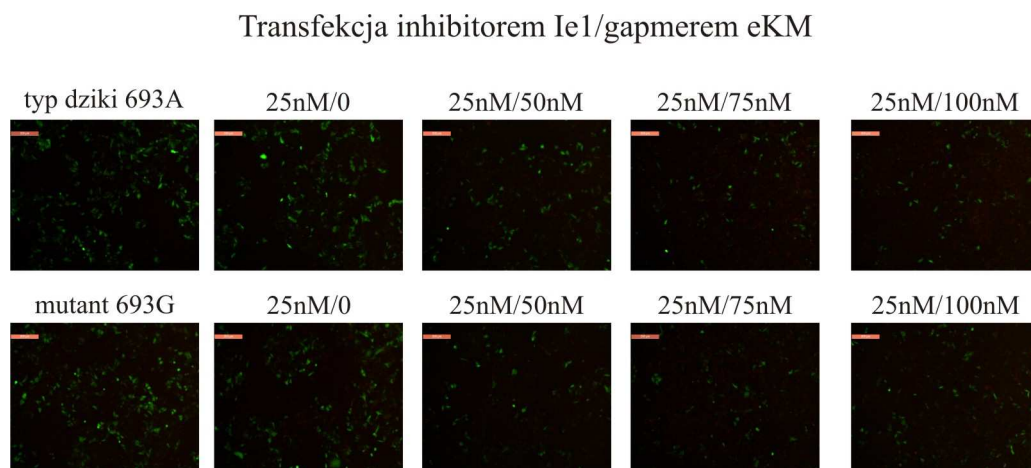
Cząsteczka gapmeru eKM, przede wszystkim w porównaniu z inhibitorem Ie2, powodowała nieco większy efekt wyciszenia w niższych stężeniach, który jednak wyrównywał się w wyższych stężeniach z badanego zakresu. Osiągnięto całkiem interesujące zróżnicowanie ekspresji w stężeniu 25 nM (30%) i 50 nM (43%). W wyższych stężeniach ekspresja ulegała obniżeniu w podobnym stopniu dla obydwu wariantów RNA (Wykres 49). Do transfekcji w układzie tandemowym wybrano stężenia gapmeru 50 nM, 75 nM i 100 nM.



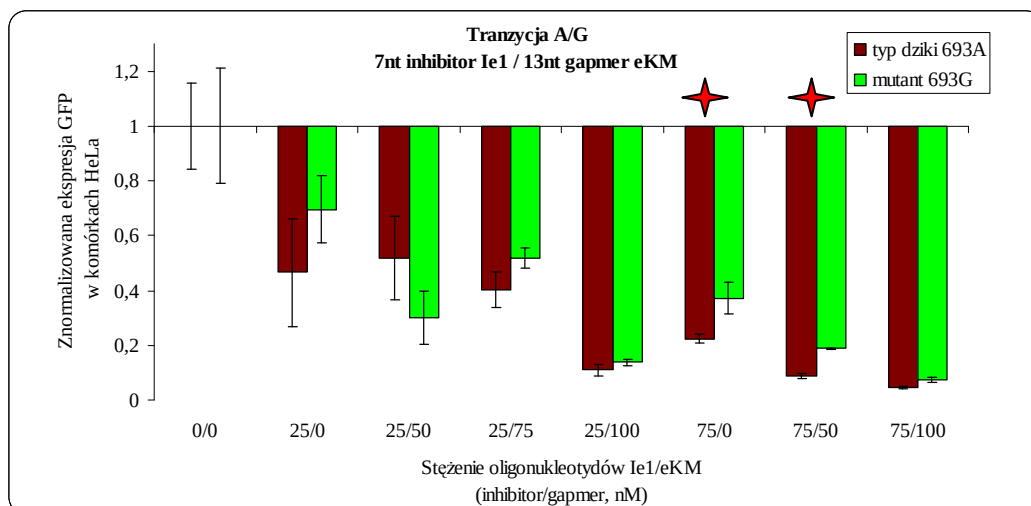
Wykres 49. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru eKM. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Obecność czerwonej gwiazdki nad poziomem ekspresji w danym stężeniu oznacza różnicę istotną statystycznie.

Pierwszy z zastosowanych układów tandemowych, z krótszym inhibitorem Ie1, nie powodował selektywnego wyciszenia wariantu zmutowanego RNA w żadnej z testowanych

kombinacji stężeń. Dla kilku konfiguracji obserwowano raczej większą tendencję do wyciszania ekspresji RNA typu dzikiego, choć były to różnice niewielkie (około 10-15%) i tylko w jednym przypadku istotne statystycznie (Wykres 50). Najprawdopodobniej inhibitor Ie1 tworzył z RNA dupleks zbytnie słaby termodynamicznie, by ograniczyć wiązanie się gapmeru do RNA typu dzikiego, na co wyraźnie wskazują rezultaty uzyskane w warunkach *in vitro*.



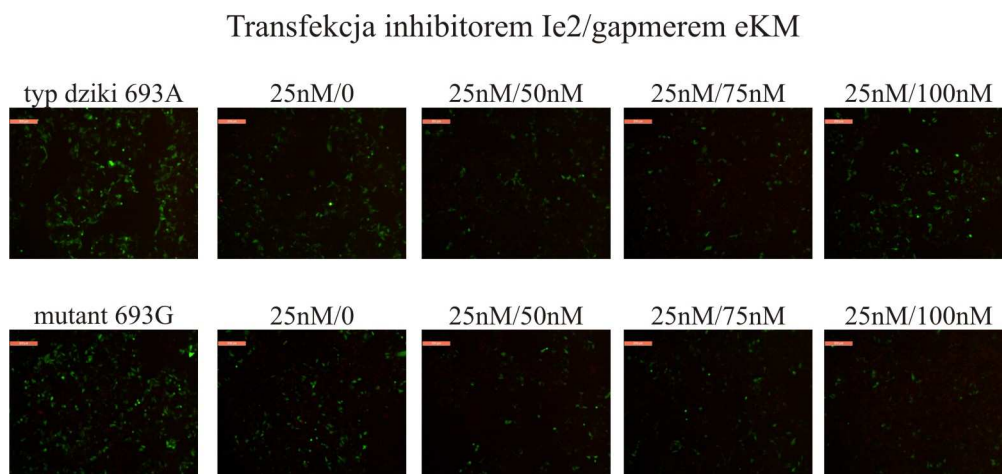
Rysunek 41. Komórki *HeLa* po transfekcji oligonukleotydami tandemowymi Ie1/eKM, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x



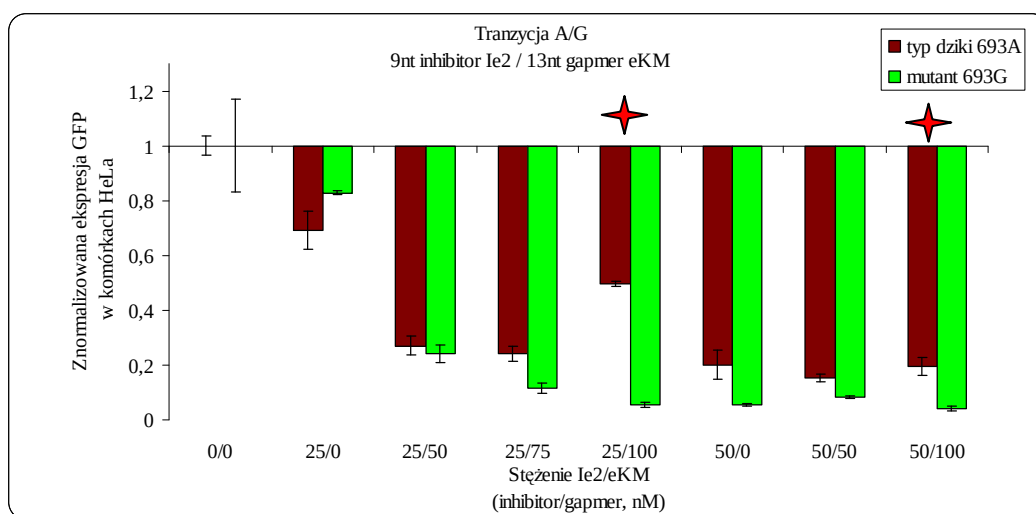
Wykres 50. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensowych oligonukleotydów tandemowych Ie1/eKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Drugi z układów tandemowych, z dłuższym inhibitorem Ie2, wykazał interesujące, i istotne statystycznie, różnicowanie poziomu ekspresji o 45%, w konfiguracji stężeń Ie2/eKM 25 nM/100 nM. Był to najlepszy z uzyskanych rezultatów dla analizowanej tranzycji A/G, choć może on budzić wątpliwość w odniesieniu do ogólnej tendencji obserwowanej dla

obydwu wariantów RNA (Wykres 51). Należy jednak pamiętać, że efekty obserwowane w komórce są wypadkową wielu czynników, które często, z różnych powodów, pozostają niezdefiniowane.



Rysunek 42. Komórki *HeLa* po transfekcji oligonukleotydami tandemowymi Ie2/eKM, obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



Wykres 51. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością antysensownych oligonukleotydów tandemowych Ie2/eKM. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

2.5 Podsumowanie

Na podstawie powyższych eksperymentów, przeprowadzonych dla 4 różnych typów substytucji nukleotydowych, uzyskano wiele ciekawych wniosków, które pozwalają realnie ocenić szanse powodzenia alleloselektywnej hydrolizy RNA z wykorzystaniem tandemowych oligonukleotydów. Dobrze rokującą przesłanką dla powodzenia analizowanej strategii były dane termodynamiczne dla badanych sekwencji, obejmujące różne konfiguracje niesparowań.

Stanowiły one pierwsze otrzymane wyniki i sugerują możliwość dyskryminacji pewnych dupleksów niekomplementarnych przez silniejsze ich warianty komplementarne (Tabela 8). Potwierdziły się jednak przypuszczenia, że same reguły trwałości termodynamicznej nie wystarczą do zdefiniowania aktywności biologicznej antysensowych oligonukleotydów.

Tabela 8. Zestawienie energii swobodnych ($-\Delta G_{37}^{\circ}$, kcal/mol) dupleksów RNA z określonymi oligonukleotydami antysensowymi w ramach koncepcji tandemowych oligonukleotydów. Znaczące dla koncepcji różnice w stabilności termodynamicznej dupleksów podświetlono na żółto.

konsep: różnice w stabilności termicznej dynamicznej duplikacji podświetlono na żółto.

	SOD1		SNCA		SNCA		APP	
			46G/A		53G/A		717G/A	
	dziki	mutant	dziki	mutant	Dziki	mutant	dziki	mutant
Inh1			11,83	7,76	10,33	6,22	9,31	7,71
Inh2			20,98	13,45	16,12	10,58	15,01	10,36
gapmer			20,59	23,95	16,29	18,99	10,48	10,98
	4C/T						692C/G	
Inh1	12,41	10,12					9,29	4,6
Inh2	17,04	16,56					12,6	8,64
gapmer	17,62	20,24					9,81	17,52

Podsumowując uzyskane rezultaty można sformułować następujące konkluzje:

- 1) W przypadku transwersji C/G udało się uzyskać zdecydowane zróżnicowanie poziomu hydrolizy formy dzikiej i zmutowanej RNA w układzie czteroskładnikowym *in vitro*. Z zastosowaniem dłuższego 10-nukleotydowego inhibitora (Ib2), w równomolowym stężeniu z RNA, ograniczono trawienie RNA typu dzikiego o 86% bez wpływu na hydrolizę formy zmutowanej. Krótszy inhibitor nie umożliwiał selektywnej hydrolizy. W linii komórkowej *HeLa* żaden z inhibitorów samodzielnie nie wpływał na poziom RNA 692. W układzie z gapmerem, krótszy z inhibitorów Ib1 istotnie różnicował poziom ekspresji wariantu dzikiego i zmutowanego RNA, w konfiguracji stężeń Ib1/bKM 25 nM/50

nM na poziomie 46%, oraz w stężeniach 25 nM/ 100 nM na poziomie 27%. Dłuższy inhibitor w układzie z gapmerem indukował selektywne wyciszenie formy zmutowanej 692G na poziomie 39% w układzie stężeń Ib2/bKM 25 nM/50 nM.

- 2) Eksperymenty *in vitro* przeprowadzone dla wszystkich trzech sekwencji RNA (717, 46 i 53) obarczonych tranzycją G/A wykazały, że krótszy inhibitor 7-nukleotydowy, w dziesięciokrotnym nadmiarze w stosunku do RNA, skutecznie hamuje hydrolizę formy dzikiej RNA, pozostając bez większego wpływu na trawienie wariantu zmutowanego. Dłuższy inhibitor 10-nukleotydowy działał efektywnie jedynie dla sekwencji RNA 717, w pozostałych przypadkach powodował także znaczny spadek wydajności hydrolizy formy zmutowanej, od 50 % (RNA 53) do 70% (RNA 46). W linii komórkowej *HeLa*, wobec sekwencji RNA 717 nie uzyskano selektywnego wyciszenia formy zmutowanej RNA z żadnym z inhibitorów (maksymalna uzyskana różnica w poziomie ekspresji dziki/mutant wynosiła 11 % dla układu Id2/dKM 25 nM/ 75 nM). Względem sekwencji RNA 46, krótszy inhibitor Ik2 działał mniej lub bardziej selektywnie w większości zastosowanych układów stężeń Ik2/kKM. Największe zróżnicowanie ekspresji obydwu wariantów RNA na poziomie 65% uzyskano w konfiguracji stężeń 25 nM/ 50 nM. Dłuższy inhibitor Ik1 najskuteczniej działał w układzie stężeń Ik1/kKM 25 nM/ 75 nM, dając różnicę w ekspresji obu RNA na poziomie 47%. Dla sekwencji RNA 53 osiągnięto w komórkach różnicę w wydajności ekspresji formy dzikiej i zmutowanej RNA na poziomie 45% w układzie krótszy inhibitor Ih1/hKM 25 nM/100 nM, oraz w układzie dłuższy inhibitor Ih2/hKM 25 nM/100 nM na poziomie 33%. Rezultaty uzyskane w ramach badań *in vitro* udało się więc powtórzyć w linii komórkowej *HeLa* dla RNA 46 i RNA 53.
- 3) W układzie tranzycji C/T (C/U), *in vitro* krótszy inhibitor 7-nukleotydowy obniżył poziom hydrolizy wariantu dzikiego RNA o 46% bez wpływu na wariant zmutowany, natomiast dłuższy inhibitor 10-nukleotydowy ograniczył trawienie RNA typu dzikiego o 75%, a mutanta o 15%. W komórkach *HeLa* transfekowanych układem tandemowym z krótszym inhibitorem nie obserwowano istotnej statystycznie selektywności wyciszenia. Zastosowanie dłuższego inhibitora pozwoliło uzyskać różnicę w ekspresji wariantów dzikiego i zmutowanego na poziomie 26%.

- 4) Dla tranzykcji A/G, w warunkach *in vitro* nie obserwowano spadku wydajności hydrolizy formy dzikiej RNA w obecności krótszego 7-nukleotydowego inhibitora. Z kolei dłuższy 9-nukleotydowy inhibitor ograniczał hydrolizę wariantu dzikiego o 80% a hydrolizę mutanta RNA o 40%. W komórkach w obecności krótszego inhibitora w układzie tandemowym obserwowano większe obniżenie ekspresji formy dzikiej RNA, natomiast dłuższy inhibitor istotnie ograniczył hydrolizę formy dzikiej w stosunku do formy zmutowanej o 45%, w układzie stężeń Ie2/eKM 25 nM/100 nM.

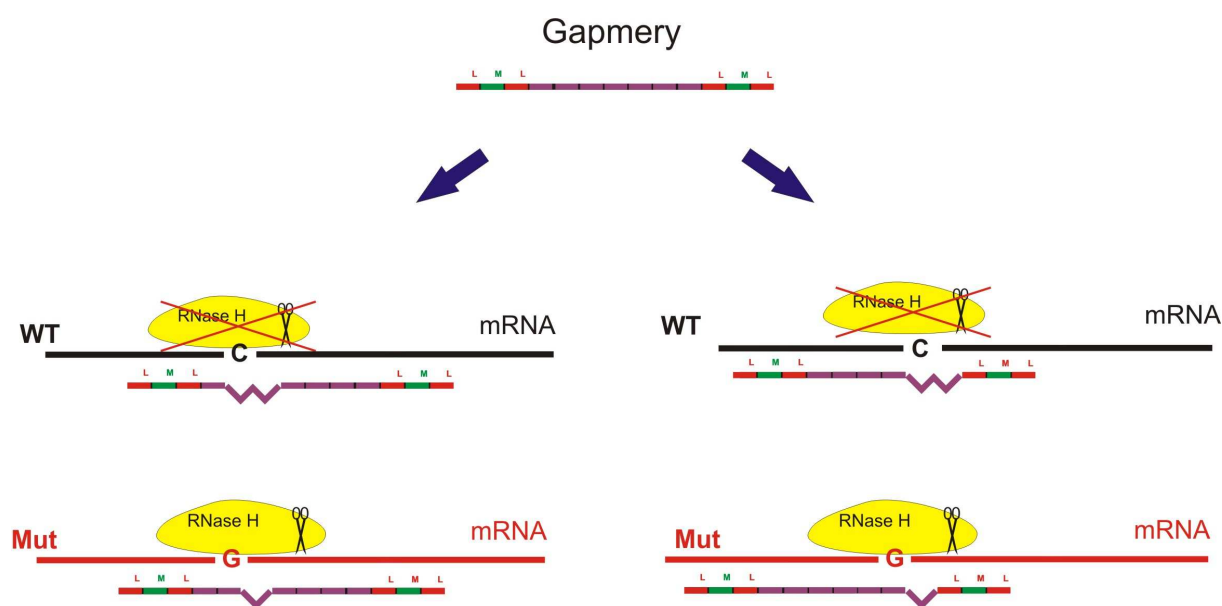
Tabela 9. Zestawienie najlepszych rezultatów alleloselektywnej hydrolizy RNA zawierających SNP, uzyskanych w warunkach trawień *in vitro* oraz w liniach komórkowych. Uwzględniano różnice powyżej 15%. Na niebiesko podświetlono najlepsze zróżnicowanie, na żółto rezultaty zbliżone w warunkach *in vitro* i w komórkach *HeLa*

Typ substytucji nukleotydowej (SNP)	Rezultat w warunkach <i>in vitro</i>		Rezultat w linii komórkowej <i>HeLa</i>	
	inhibitor	różnica	Stężenie inhibitor/gapmer	różnica
C/G (A692G)	7 nt	-	25 nM/50 nM 25 nM/ 100 nM	46% 27%
	10 nt	86%	25 nM/50 nM	39%
G/A (V717I)	7 nt	80%	-	-
	10 nt	84%	-	-
G/A (E46K)	7 nt	-	25 nM/ 50 nM	65%
	10 nt	49%	25 nM/ 75 nM	47%
G/A (A53T)	7 nt	83%	25 nM/ 100 nM	45%
	10 nt	45%	25 nM/ 100 nM	33%
C/T (C/U) (A4V)	7 nt	50%	-	-
	10 nt	60%	25 nM/ 50 nM	26%
A/G (E693G)	7 nt	22%	-	-
	9 nt	42%	25 nM/ 100 nM	45%

3 Zastosowanie motywów strukturalnych zaburzających helikalność duplexu RNA/ASO, w celu alleloselektywnej hydrolizy RNA zawierających SNP

Proponowane w niniejszym rozdziale podejście zakłada wykorzystanie antysensowych oligonukleotydów typu gapmer, których sekwencja została zaprojektowana tak, by z docelowym RNA tworzyły duplex zawierający w części RNA/DNA różnego rodzaju

motywy strukturalne, przede wszystkim pojedyncze i podwójne niesparowania rozmieszczone w różnych rejonach heterodupleksu oraz symetryczne pętle i jednostronne wybrzuszenia nukleotydowe. Gapmer jest konstruowany w taki sposób, by mimo niepełnej komplementarności, z wariantem zmutowanym RNA zawsze tworzyć dupleks bardziej stabilny termodynamicznie, niż z wariantem dzikim. Większe zaburzenia helikalnej struktury dupleksu w przypadku formy dzikiej RNA mogą ograniczać jego hydrolizę z udziałem rybonukleazy H.



Rysunek 43. Schemat ideowy alleloselektywnej hydrolizy RNA z wykorzystaniem motywów strukturalnych zaburzających helikalność dupleksu.

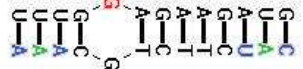
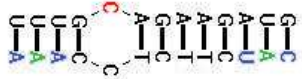
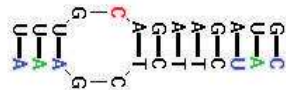
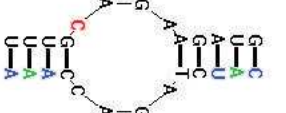
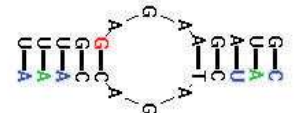
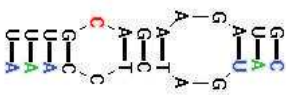
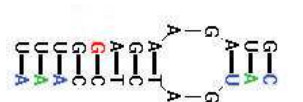
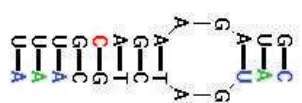
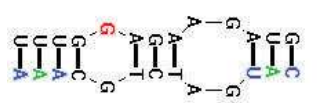
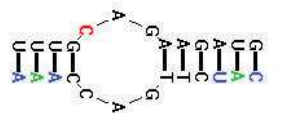
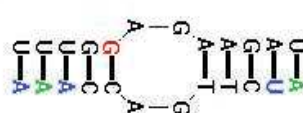
Hydroliza heterodupleksów z udziałem RNazy H przebiega zwykle w okolicy 4-5 nukleotydów RNA począwszy od jego 5' końca. Bazując na chimerowych oligonukleotydach, w których gap zawierał 7 nukleotydów DNA, postanowiono poszczególne motywy strukturalne zlokalizować w 3 regionach heterodupleksu: przy końcu 5' fragmentu DNA, w środku, oraz przy końcu 3' fragmentu DNA.

3.1 Transwersja C/G (APP A692G)

W serii b, dedykowanej transwersji C/G, zaprojektowano 47 oligonukleotydów antysensowych typu gapmer. Wstępnie dla wszystkich przeprowadzono test RNazy H, w celu wytypowania oligonukleotydów aktywujących enzym selektywnie względem dupleksów z wariantem zmutowanym RNA. Oligonukleotydy projektowano z zamysłem wprowadzenia w określone miejsca dupleksu takich motywów strukturalnych jak pojedyncze i podwójne

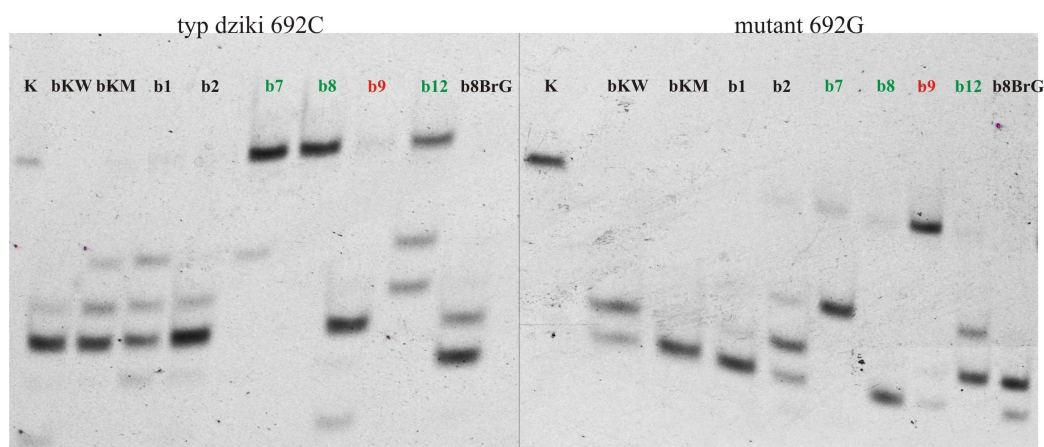
niesparowania, jednostronne wybrzuszenia nukleotydowe oraz trójnukleotydowe, rzadziej czteronukleotydowe pętle wewnętrzne. Wszystkie przeanalizowane typy motywów strukturalnych dla transwersji C/G APP A692G, wraz z rezultatem testu RNAzy H, zostały zaprezentowane w tabelach 10-12 i 14-16.

Tabela 10. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od zaplanowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery bKW-b8BrG.

ASO	Dziki 692C		Mutant 692G	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
bKW		97,0 ± 3,8		96,1 ± 1,9
bKM		97,9 ± 0,4		94,0 ± 5,7
b1		92,7 ± 2,4		90,3 ± 9,6
b2		92,2 ± 8,1		92,5 ± 1,1
b7		4,2 ± 2,5		43,2 ± 30,1
b8		1,1 ± 1,9		88,1 ± 8,6
b9		74,5 ± 10,1		18,1 ± 1,2
b12		4,4 ± 6,2		90,1 ± 4,6
bWBr G		97,9 ± 2,3		96,5 ± 2,4

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony), 8-bromodeoksyguanozynę (czerwona kropka) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, kolorem niebieskim częściową dyskryminację, a kolorem czerwonym – różnicowanie w niepożądanym kierunku.

Już podczas testowania koncepcji tandemowych oligonukleotydów zauważono, że pojedyncze niesparowanie w duplekcie typ dziki RNA/gapmer nie ma wpływu na poziom hydrolizy RNA. Dlatego w pierwszej kolejności postanowiono zweryfikować, czy zwiększenie obszaru niehelikalnych oddziaływań w obrębie fragmentu gapu zmieni wydajność trawienia któregośkolwiek z dupleksów. Zaobserwowano, że w miarę powiększania liczby niesparowań w obrębie gapu, dupleks był coraz słabszym substratem dla RNazy H. Podwójne niesparowanie umiejscowione zarówno przy 5' końcu, w środku, jak i przy 3' końcu regionu gapu nie powodowało obniżenia wydajności trawienia żadnego z wariantów RNA (oligonukleotydy b1, b2 w obydwu dupleksach, oraz b8 i b12 w duplekcie z mutantem RNA). Natomiast gdy dodano trzecie niesparowanie, w taki sposób że występowało ono tylko w duplekcie z formą dziką RNA (oligonukleotydy b8 i b12) lub w duplekcie z wariantem zmutowanym (b9), obserwowano bardzo wysoką selektywność hydrolizy. Trawieniu praktycznie w całości ulegał dupleks zawierający podwójne niesparowanie, natomiast



Rysunek 44. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy wariantów RNA 692 w dupleksach z gapmerami bKW-b8BrG, K-kontrola (RNA bez ASO), bKW-b8BrG - testowane oligonukleotydy antysensowe).

hydroliza dupleksu z trzema niesparowaniami była ograniczona do minimum. Zmierzono parametry termodynamiczne dupleksów, dla których obserwowano różnicowanie poziomu hydrolizy (Tabela 13). Ich porównanie wykazało, że trzecie niesparowanie wynikające z występowania SNP, destabilizuje dupleks w stopniu uniemożliwiającym jego tworzenie się w temperaturze 37°C. Dzięki temu jeden z wariantów RNA jest chroniony przed hydrolizą. By potwierdzić słuszność takiego wnioskowania, postanowiono wydłużyć docelowe RNA, jak i antysensowe gapmery z 13 do 15 i 17 nukleotydów, zachowując analizowane motywy w

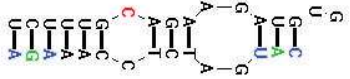
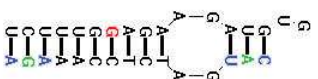
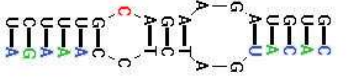
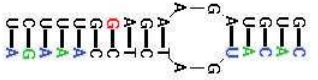
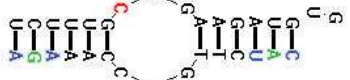
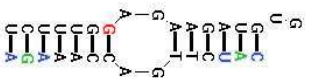
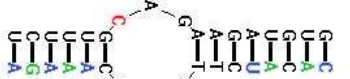
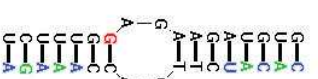
miejscu dotychczasowego występowania w obrębie sekwencji³ (seria bis – 15 mery, seria prim 17-mery). W serii bis zachowano charakterystyczny dla 13-merów układ fragmentów okalających gap DNA (trójnukleotydowa sekwencja LNA/OMe/LNA), a sam gap wydłużono do 9-nukleotydów. W serii prim zastosowano pięcionukleotydowe sekwencje okalające gap w układzie LNA/OMe/LNA/OMe/LNA, pozostawiając 7-nukleotydowy gap. Jak się okazało, w serii bis różnice termodynamiczne, występujące dla dupleksów 13-nukleotydowych wyrównały się, natomiast selektywność hydrolizy pozostała nie zmieniona. W tym kontekście można stwierdzić, że nie stabilność termodynamiczna dupleksu, a lokalne zaburzenie jego struktury helikalnej, powodowane obecnością niesparowania rC-dC sprawia, że zawierający je dupleks nie pasuje do miejsca aktywnego enzymu. Wniosek ten potwierdza się w przypadku serii prim, gdzie różnice termodynamiczne pozostały (zwłaszcza dla dupleksu z gapmerem b8', dla dupleksu z gapmerem b12' różnica jest niewielka), natomiast zatracono selektywność hydrolizy (Tabele 11 i 13). Bardzo silne wzmocnienie końców dupleksu przez pięcionukleotydowe sekwencje okalające gap prawdopodobnie dużo skuteczniej pomaga utrzymać strukturę helikalną, niż w przypadku obecności sekwencji trójnukleotydowych. Uzyskany rezultat wskazuje, że nie ma bezpośredniej zależności między stabilnością termodynamiczną dupleksu, a jego podatnością na hydrolizę rybonukleazą H, dopóki destabilizacja całkowicie nie ogranicza tworzenia dupleksu. Obecność niesparowań zaburza jednak konformację helisy, co prawdopodobnie ma w tym przypadku decydujący wpływ na wydajność hydrolizy RNA w dupleksie, z racji jego niedopasowania do centrum aktywnego enzymu.

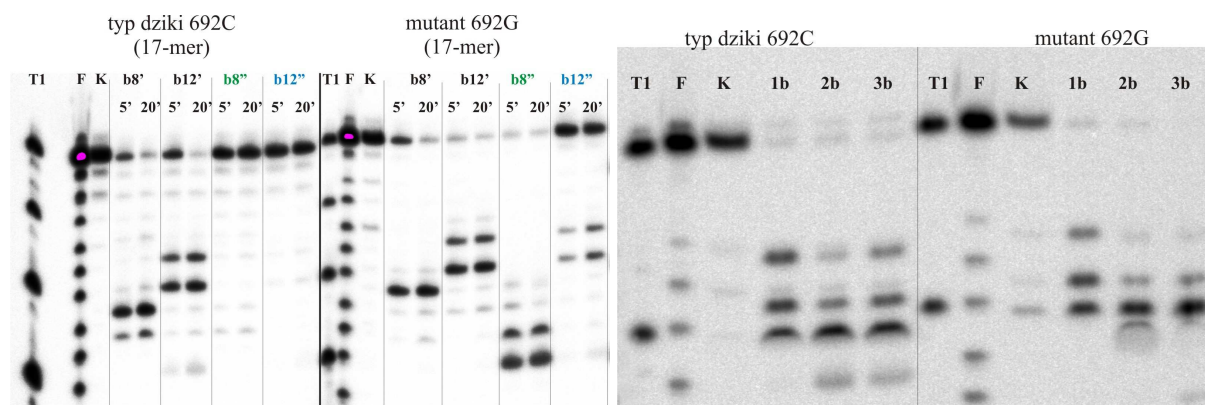
Inną ścieżką osiągnięcia selektywnej hydrolizy RNA było wprowadzenie do antysensowego gapmeru 8-bromodeoksyguanozyny w miejscu parowania się z SNP, jako czynnika potencjalnie różnicującego dupleksy pod względem termodynamicznym. Pomysł ten pojawił się pod wpływem doniesień literaturowych, że modyfikacja ta narzucając guanozynie konformację *syn*, w homodupleksach RNA zdecydowanie wzmacnia trwałość niekanonicznej pary rG-rG [214, 215], nawet o około 10 kcal/mol. Oczywiście tak silny efekt niewątpliwie zależał także od nukleotydowego sąsiedztwa modyfikowanej pary, którym we wspomnianym przypadku był 7-nukleotydowy fragment powtórzeń trójnukleotydowych CGG. Natomiast bardzo atrakcyjna była możliwość wzmocnienia dupleksu, w którym RNA ma być degradowane. W analizowanych w niniejszej pracy dupleksach z wariantami RNA

³ nie zmieniono niekanonicznych par, natomiast przesunięciu do środka uległo fizyczne miejsce ich występowania

692, obecność 8-bromodeoksyguanozyny w kanonicznej parze z cytydyną (typ dziki) rzeczywiście destabilizowała trwałość (ΔG_{37}^0) tak modyfikowanego dupleksu (+1,98 kcal/mol), podczas gdy w niekanonicznej parze z guanozyną (forma zmutowana) stabilizacja względem dupleksu niemodyfikowanego wynosiła -0,36 kcal/mol. Termodynamicznie więc, dupleks RNA typu dzikiego z gapmerem komplementarnym b8BrG nadal pozostawał trwalszy od dupleksu z mutantem RNA, zawierającym niesparowanie rG-d8BrG, aczkolwiek różnica w trwałości zmniejszyła się względem dupleksów niemodyfikowanych z 3,92 do 1,58 kcal/mol (Tabela 13). Rezultaty trawień z udziałem RNazy H pokazały, że obecność 8-bromoguanozyny nie wpływa na wydajność hydrolizy w warunkach *in vitro*.

Tabela 11. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym; gapmery b8"-b12'.

AS O	Dziki 692C		Mutant 692G	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
b8"		4,9 ± 4,3		96,4 ± 1,2
b8'		93,6 ± 1,3		91,8 ± 1,0
b12"		2,8 ± 3,9		45,4 ± 11,3
b12'		93,3 ± 1,6		95,9 ± 0,4
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony), oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, a kolorem niebieskim - częściową dyskryminację.				



Rysunek 45. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia RNazą H dupleksów RNA 692 z wybranymi oligonukleotydami antysensowymi. Rysunek lewy: gapmery b8 i b12 wydłużone do 15-merów (seria bis) i 17-merów (seria prim); rysunek prawy: trawienie z udziałem gapmerów wnoszących do dupleksów jednostronne wybrzuszenia nie było selektywne; T1-trawienie RNA rybonukleazą T1, F- hydroliza alkaliczna RNA, K-kontrola.

Następnym etapem było przetestowanie wpływu jednonukleotydowych wybrzuszeń. Oligonukleotydy typu gapmer zaprojektowano tak, by móc ocenić wpływ wybrzuszenia występującego w obrębie miejsca SNP, zarówno po stronie RNA, jak i po stronie gapmeru. Trawienie rybonukleazą H nie wykazało znaczących różnic w wydajności hydrolizy któregośkolwiek z dupleksów, skąd płynie wniosek, że obecność jednonukleotydowych wybrzuszeń w dupleksach RNA/ASO nie wpływa na wydajność ich trawienia z udziałem RNazy H.

Tabela 12. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym; gapmery 1b-3b, wnoszące do dupleksów wybrzuszenia jednostronne.

ASO	Dziki 692C		Mutant 692G	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
1b		97,6 ± 0,7		97,3 ± 1,3
2b		97,1 ± 1,2		97,7 ± 2,1
3b		97,6 ± 1,6		97,5 ± 0,9

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony), oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0.

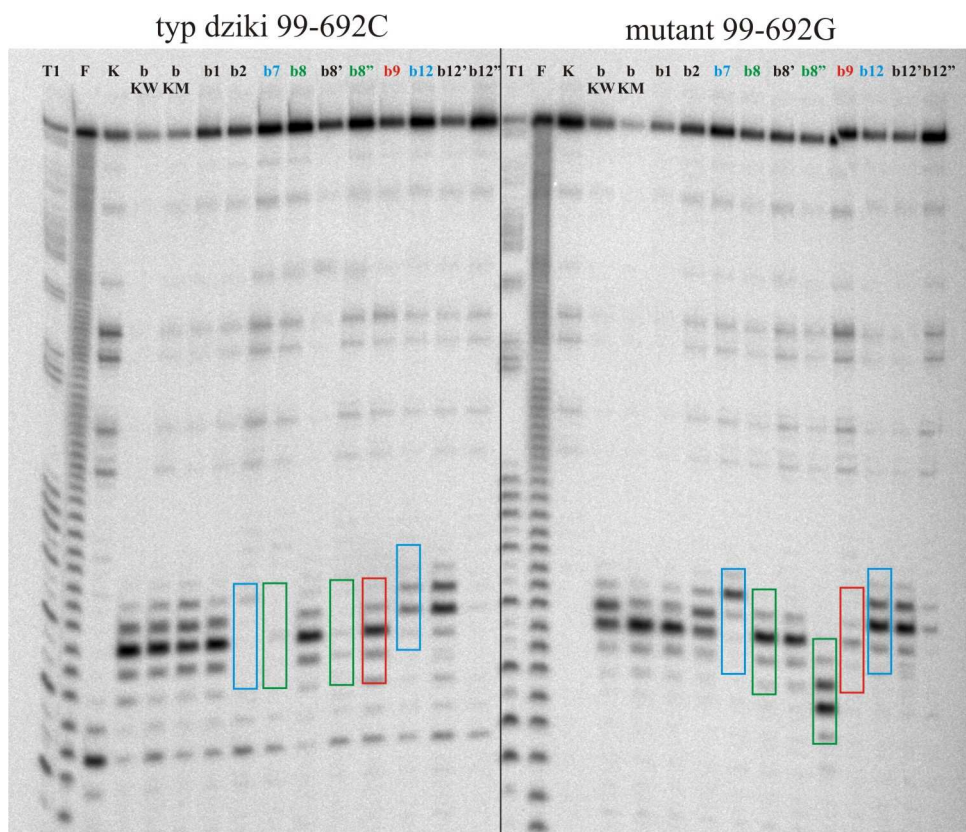
Tabela 13. Zestawienie parametrów termodynamicznych dupleksów RNA 692 z gapmerami istotnie różnicującymi poziom hydrolizy.

Typ dziki 692C			Mutant 692G		
ASO	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	ASO	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)
bKW	16,35 ± 0,39	65,8	bKW	12,43 ± 0,12	54,4
bKM	9,81 ± 0,08	48,6	bKM	17,92 ± 0,59	67,2
b8	4,92 ± 0,14	28,7	b8	8,31 ± 0,01	43,4
b12	5,05 ± 0,13	30,1	b12	8,79 ± 0,03	45,2
b8BrG	14,37 ± 0,18	61,4	b8BrG	12,79 ± 0,06	56,0
b8''	8,84 ± 0,04	52,5	b8''	9,14 ± 0,02	48,7
b12''	7,32 ± 0,02	44,8	b12''	7,58 ± 0,03	42,3
b8'	10,52 ± 0,07	48,8	b8'	18,00 ± 0,21	63,5
b12'	10,42 ± 0,09	51,9	b12'	12,65 ± 0,18	63,8
b13	8,19 ± 0,01	47,3	b13	8,14 ± 0,02	45,1
b14	8,01 ± 0,02	47,1	b14	7,60 ± 0,02	44,1
bUN1	5,36 ± 0,04	31,0	bUN1	9,85 ± 0,05	48,8
bUN2	4,51 ± 0,07	28,1	bUN2	8,00 ± 0,04	43,4
ba15	9,50 ± 0,08	58,2	ba15	7,03 ± 0,04	38,9
ba16	10,08 ± 0,09	57,0	ba16	8,13 ± 0,01	46,6
ba17	10,13 ± 0,06	54,6	ba17	8,57 ± 0,02	45,2

Kolorem zielonym oznaczono oligonukleotydy, które w dupleksach dobrze różnicowały poziom hydrolizy selektywnie względem mutantu RNA, kolorem niebieskim oligonukleotydy które różnicowały hydrolizę w mniejszym stopniu. Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) termodynamiczna w dupleksach z typem dzikim i z mutantem RNA.

Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 41, a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu $10^{-4}M$

Dla potwierdzenia selektywności, obserwowanej dla dotychczas analizowanych oligonukleotydów, względem dłuższych RNA, przeprowadzono test RNazy H, wykorzystując jako docelowe cząsteczki 99-nukleotydowe RNA, zawierające analizowany typ substytucji – transwersję C/G w jej naturalnym kontekście sekwencyjnym. Cząsteczki uzyskano w reakcji transkrypcji *in vitro*. Wyniki eksperymentu z substratami w postaci 99-nukleotydowych RNA potwierdziły rezultaty uzyskane dla RNA o długości 13-, 15- i 17-nukleotydów. Gapmery, które selektywnie promowały hydrolizę wariantu zmutowanego RNA 692G to b8, b8'' i b12, oraz w mniejszym stopniu także b7. Natomiast gapmer b9 działał przeciwnie do zakładanego celu, promując hydrolizę wariantu dzikiego RNA 692C. Powtórzenie efektów obserwowanych dla krótkich dupleksów na długich 99-nukleotydowych docelowych RNA utwierdziło w przekonaniu o selektywności poszczególnych gapmerów także względem cząsteczek potencjalnie ustrukturalizowanych.



Rysunek 46. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 99-nukleotydowych wariantów RNA 692 z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami.

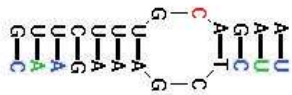
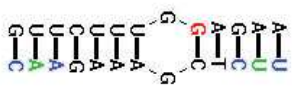
Kolejne oligonukleotydy postanowiono projektować możliwie najsilniej ograniczając liczbę wprowadzanych niesparowań. Z tego względu zdecydowano ulokować miejsce SNP w rejonie 5' końca gapu DNA, w potencjalnym miejscu hydrolizy. Założono, że jeśli struktura tego regionu dupleksu jest kluczowa dla wydajności procesu hydrolizy z udziałem rybonukleazy H, to być może już pojedyncze niesparowanie będzie miało znaczenie w uzyskaniu pożądanej selektywności. Podejrzewano także, że typ niesparowania może mieć w tej kwestii istotny wpływ, z racji wprowadzania większych lub mniejszych lokalnych zaburzeń helikalności dupleksu RNA/ASO. Z tego względu zaprojektowano 2 kolejne oligonukleotydy (b13, b14), wprowadzające niesparowanie rC-dC, w miejscu SNP zlokalizowanym jako przedostatni nukleotyd fragmentu DNA (gap). Było ono jedynym czynnikiem różnicującym duplekсы obu wariantów RNA 692 z tym samym gapmerem, i drugim niesparowaniem w obrębie dupleksu, usytuowanym w bezpośrednim sąsiedztwie pierwszego. Obydwa gapmery okazały się niezwykle skuteczne *in vitro*, selektywnie ukierunkowując hydrolizę na wariant zmutowany RNA 692G. Nie obserwowano istotnych różnic w trwałości termodynamicznej dupleksów RNA typu dzikiego (jedno niesparowanie)

i mutantu (dwa niesparowania), co potwierdziło brak korelacji wydajności hydrolizy RNA z udziałem RNazy H z trwałością termodynamiczną duplexu.

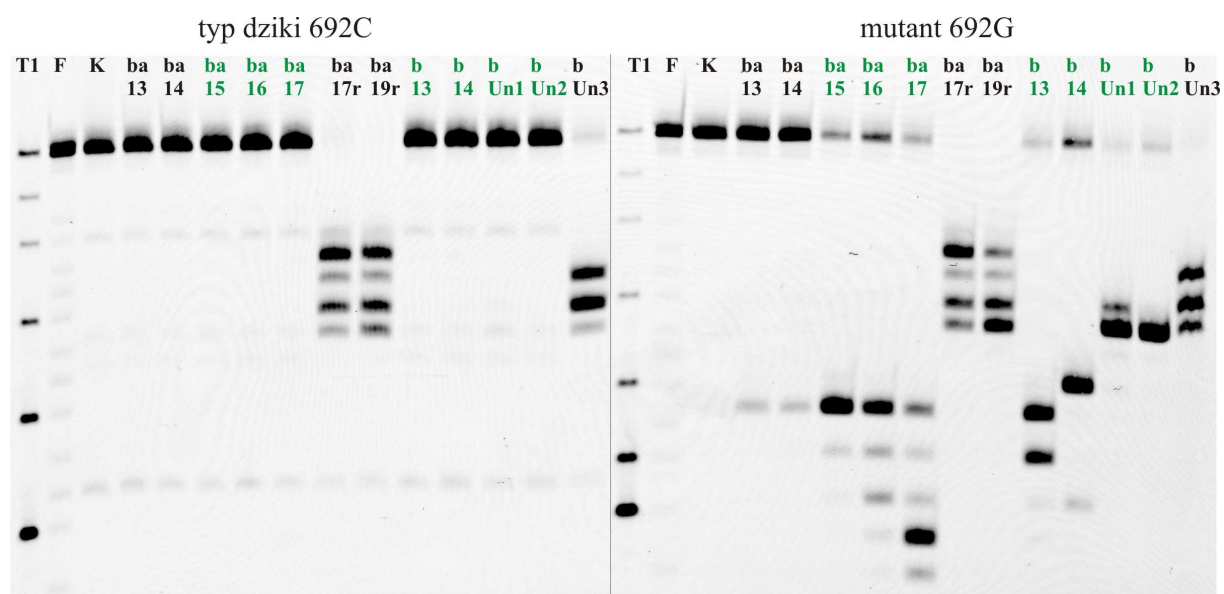
Podążając tropem, że ukierunkowanie destabilizacji na region duplexu może być kluczem do uzyskania pożądanego efektu, postanowiono zamienić niesparowania przy końcach regionu gapu w duplexie, na komplementarne pary, osłabione obecnością nukleotydów modyfikowanych UNA (ang. *Unlocked Nucleic Acids*). Działanie to jest uzasadnione przede wszystkim zwiększeniem specyficzności względem docelowej sekwencji RNA w środowisku komórkowym. Obecność niesparowań w duplexie z docelową cząsteczką RNA wnosi bowiem ryzyko, że gapmer potencjalnie może znaleźć w komórce taką sekwencję RNA, do której będzie komplementarny na całej długości, co byłoby wysoce niepożądanym efektem niespecyficznym. Znając destabilizujący wpływ UNA w parach komplementarnych duplexu, i jego jeszcze bardziej destabilizujący wpływ w parach niekanonicznych [115], stwierdzono, że wprowadzając nukleotydy UNA w miejsca generujące niesparowania z gapmerów b8 i b12 (5' koniec regionu gapu DNA duplexu), można by utrzymać efekt alleloselektywności, zachowując większą specyficzność względem sekwencji docelowej. Przeanalizowano wpływ obecności pojedynczej (gapmery bUN1, bUN3) jak i podwójnej (gapmer bUN2) modyfikacji UNA. Uzyskano w pełni satysfakcjonujące rezultaty, świadczące o tym, że niesparowanie rC-dC, w obecności destabilizowanego końca 5' gapu uniemożliwia utworzenie się duplexu RNA typu dziki/gapmer w temperaturze 37°C (Tabela 13 i 14, Rysunek 47). Odtworzono więc efekt gapmerów b8 i b12, zachowując przy tym większą specyficzność względem docelowej sekwencji RNA. Wprowadzenie reszty UNA w bezpośrednie sąsiedztwo SNP (zwiększona destabilizacja od strony 3' gapu DNA duplexu, gapmer bUN3) nie indukowało selektywnej hydrolizy.

Tabela 14. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury duplexu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery b13-bUN3.

ASO	Dziki 692C		Mutant 692G	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
b13		0		92,0 ± 1,0

b14		0		79,5 ± 4,5
bUN1		0		95,9 ± 1,2
bUN2		0		93,1 ± 0,1
bUN3		93,9 ± 0,8		97,3 ± 0,2
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metyloRNA – zielony, UNA – brązowy N ^U), oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA.				

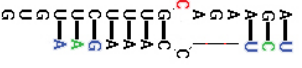
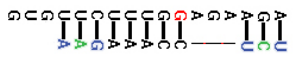
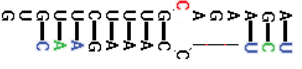
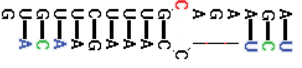
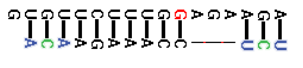
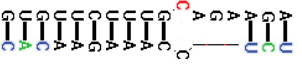
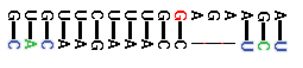
Inną próbą uzyskania selektywnej hydrolizy wariantu zmutowanego RNA 692 było zastosowanie gapmerów zawierających fragmenty nienukleotydowe. Były to handlowo dostępne alkilowe łączniki SP3 i SP18 wstawione w szkielet fosfocukrowy, zajmujące przestrzennie miejsce jednego (SP3) lub trzech (SP18) nukleotydów. Zdecydowano się umieścić je w regionie ulegającym hydrolizie (5' koniec gapu), zaraz obok niesparowania determinowanego występowaniem SNP. Jednocześnie zwiększając długość gapu (4-8 nukleotydów) próbowano zdefiniować układ, w którym występowałyby największe zróżnicowanie poziomu hydrolizy dla wariantów RNA 692. Zastosowano więc jednocześnie trzy czynniki potencjalnie determinujące poziom hydrolizy: obecność pojedynczego niesparowania rC-dC i obecność alkilowego łącznika w rejonie hydrolizowanym, oraz długość gapu. Zaprojektowano także dwa oligonukleotydy, w których umieszczono alkilowy łącznik SP 18, w miejscu wiązania się enzymu do dupleksu (3' koniec gapu DNA). Jak się okazało, gapmery posiadające nienukleotydowe fragmenty zlokalizowane w miejscu wiązania się enzymu (3' koniec gapu DNA) niezależnie od długości gapu (6 czy 8 nukleotydów) jednakowo wydajnie indukowały trawienie dupleksów obydwu wariantów RNA z udziałem RNazy H (ba17r, ba19r). Z kolei, gdy nienukleotydowy fragment znajdował się od strony 5' końca gapu, wówczas, w zależności od wzrastającej długości gapu, obserwowano coraz silniejsze zróżnicowanie poziomu hydrolizy obydwu dupleksów RNA 692. Podczas gdy typ dziki RNA 692C nie był hydrolizowany w żadnym przypadku, wydajność hydrolizy wariantu



Rysunek 47. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 20-nukleotydowych wariantów RNA 692 z wybranymi gapmerami (ba13-ba19r, b13-bUn3).

Tabela 15. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gamperry ba13-ba19r

[illegible]

ba14		0		$8,6 \pm 3,1$
ba15		0		$81,3 \pm 0,6$
ba16		0		$78,0 \pm 5,0$
ba17		0		$89,1 \pm 2,7$
ba17r		$96,7 \pm 1,3$		$99,1 \pm 0,5$
ba19r		$98,4 \pm 0,4$		$99,2 \pm 0,6$

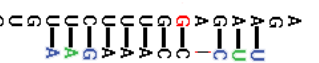
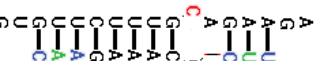
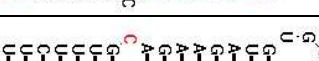
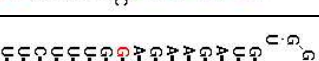
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metyloRNA – zielony), modyfikacje nienukleotydowe (długa pozioma linia – alkilowy łącznik SP18), oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA.

W sytuacji, gdy w sekwencji gapmeru, odpowiadającej miejscu hydrolizy RNA w dupleksie, umieszczono krótszy łącznik alkilowy SP3, obserwowano zdecydowane ilościowe zróżnicowanie wydajności hydrolizy obydwu wariantów RNA 692, niezależnie od długości gapu. Dupleks typu dzikiego RNA692C z żadnym z gapmerów zawierających SP3 nie stanowił substratu dla RNazy H. Wariant zmutowany RNA 692G ulegał hydrolizie w niespełna 77% już przy 4-nukleotydowej długości gapu (gapmer ba21), i w około 94% w przypadku 8-nukleotydowego gapu (Tabela 16, Rysunek 48, Wykres 52). Tak silna selektywność hydrolizy, podobnie jak w przypadku SP18, wydaje się być powodowana inhibującym wpływem niesparowania rC-dC. Prawdopodobnie, generowane przez nie, lokalne zaburzenie helikalnej struktury dupleksu w regionie istotnym dla hydrolizy uniemożliwia jej przebieg. Rozwiązanie struktury dupleksów z niesparowaniem rC-dC w rejonie hydrolizowanym RNA i bez niego, np. metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), pozwoliłoby jednoznacznie potwierdzić formułowane wnioski.

Układ z łącznikiem SP3, w obecności lub braku sąsiadującego niesparowania rC-dC, powtórzono stosując 17-nukleotydowe gapmery, posiadające zmiennej długości gap

i fragmenty okalające⁴ zbudowane jedynie z nukleotydów 2'-O-metylo-RNA (oligonukleotydy bb5-bb8). Obserwowano, że wraz ze wzrostem długości gapu (od 4 do 7 nukleotydów) zwiększała się wydajność hydrolizy typu dzikiego RNA 692C w zakresie od 0-43%, natomiast wariant zmutowany RNA 692G ulegał całkowitej hydrolizie niezależnie od długości gapu. Gapmery pozbawione łącznika SP3, a w obecności lub braku sąsiadującego niesparowania rC-dC (bb1-bb4), dawały efekt podobny. W miarę powiększania gapu (od 4 do 7 nukleotydów), selektywność hydrolizy mutanta RNA względem typu dzikiego spadała około dwukrotnie silniej niż w obecności SP3. Oznacza to, że alkilowy łącznik SP3 wzmacniał efekt, w gruncie rzeczy powodowany obecnością niesparowania rC-dC.

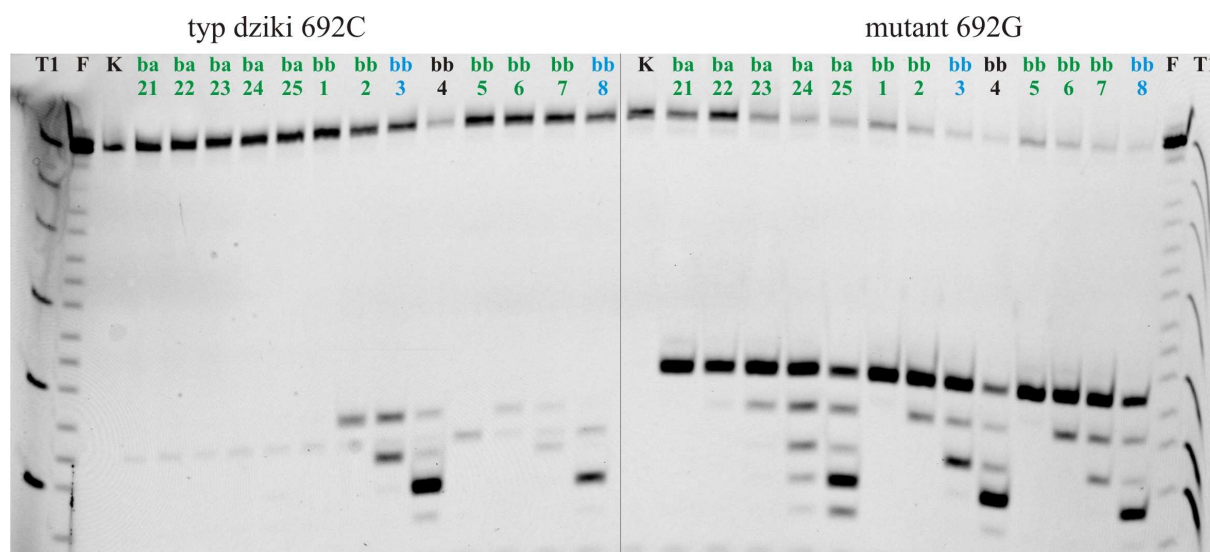
Tabela 16. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 692 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury duplexu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery ba21-bb8.

	Dziki 692C		Mutant 692G	
ASO	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
ba21		0		76,5 ± 6,6
ba22		0		53,7 ± 12,0
ba23		0		89,6 ± 0,5
ba24		0		94,7 ± 0,3
ba25		0		93,6 ± 1,0
bb1		0		86,6 ± 5,7
bb2		23,8 ± 2,4		90,9 ± 6,5
bb3		49,7 ± 2,8		95,8 ± 2,4
bb4		94,2 ± 1,6		97,6 ± 1,2
bb5		0		92,6 ± 2,5

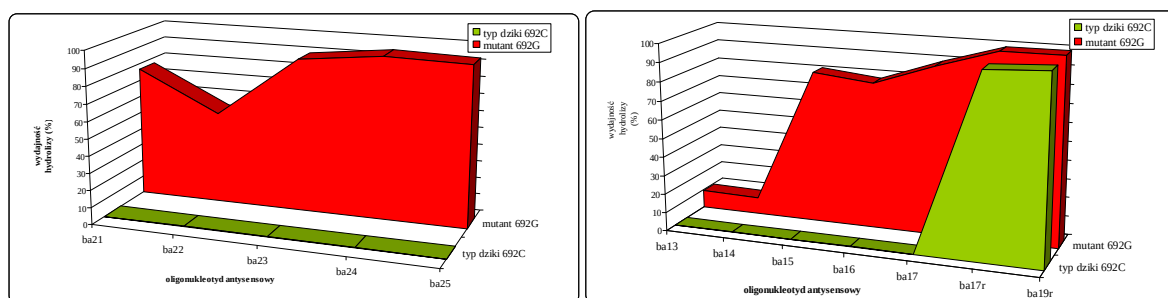
⁴ Zmieniała się długość sekwencji gapu i sekwencji od 3' końca okalającej gap począwszy od konfiguracji 3'/gap/5' – 5nt/4nt/8nt do 2nt/7nt/8nt

bb6		6,2 ± 1,0		95,9 ± 1,1
bb7		9,4 ± 0,8		96,3 ± 0,7
bb8		43,8 ± 8,7		97,0 ± 0,2

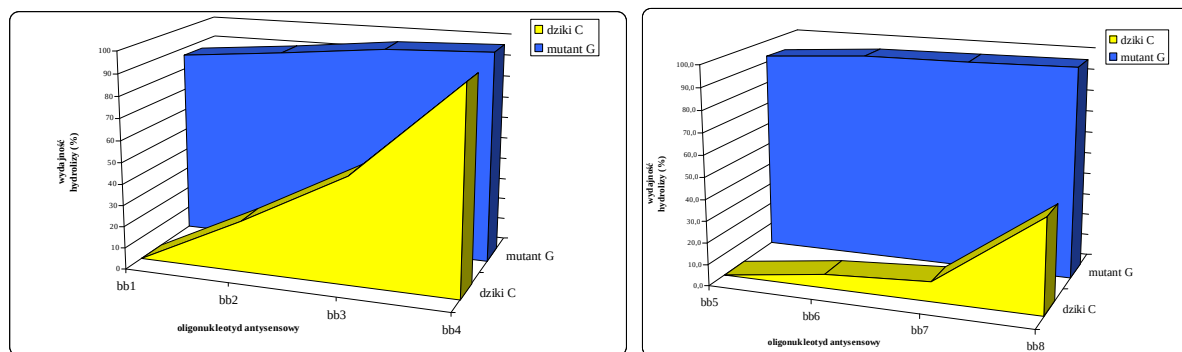
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony), modyfikacje nienukleotydowe (krótka pozioma linia – alkilowy łącznik SP3) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, a kolorem niebieskim częściową dyskryminację.



Rysunek 48. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 20-nukleotydowych wariantów RNA 692 z wybranymi gapmerami (ba21-bb8).



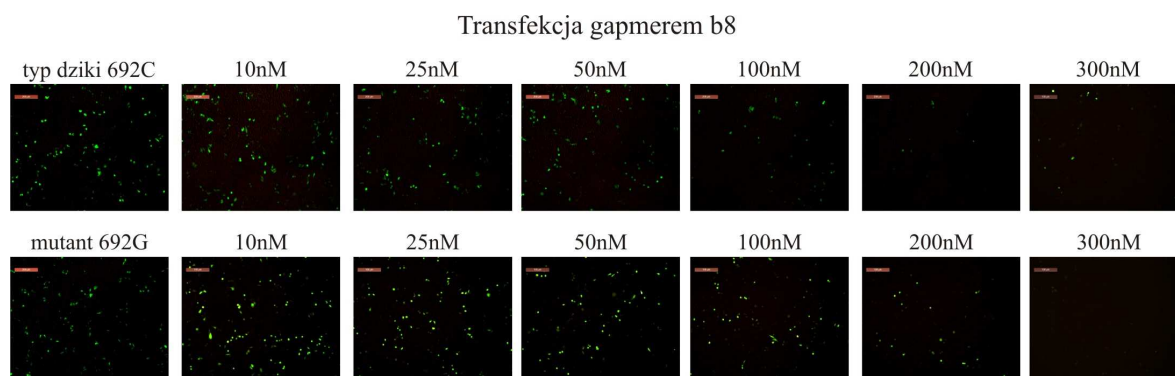
Wykres 52. Wydajność trawienia wariantów RNA 692 w dupleksach z gapmerami zawierającymi łącznik alkilowy SP3 (ba21-ba25, wykres lewy), oraz SP18 (ba13-ba19r, wykres prawy).



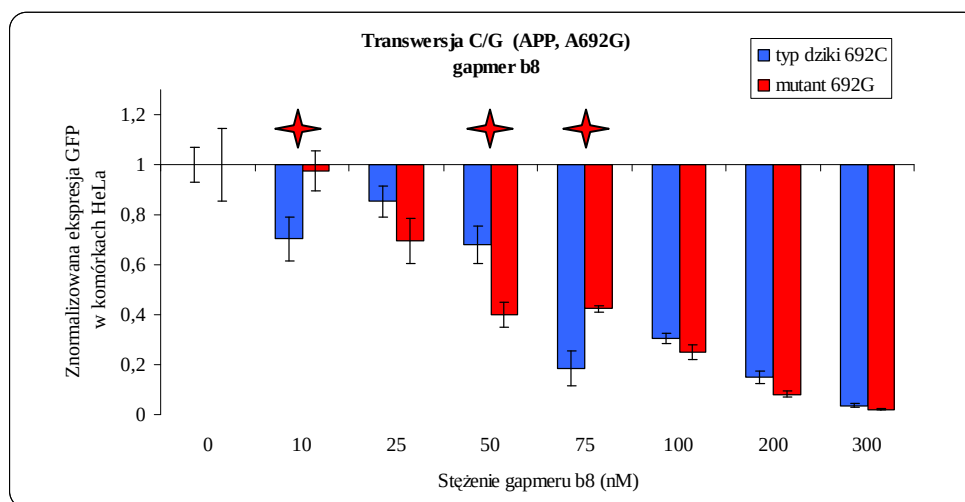
Wykres 53. Wydajność trawienia wariantów RNA 692 w dupleksach z gapmerami zawierającymi zmienną długość gapu (bb1-bb4, wykres lewy), oraz zmienną długość gapu i łącznik SP3 (bb5-bb8, wykres prawy).

W oparciu o powyższe rezultaty, alleloselektywny potencjał wybranych oligonukleotydów testowano w linii komórkowej *HeLa*. Działanie gapmerów analizowano z reguły w zakresie stężeń 0-100 nM, w nielicznych przypadkach w stężeniach do 300 nM. Jeżeli oligonukleotyd wykazywał selektywność, to zwykle następowało to w przedziale stężeń 25-100 nM. Powyżej stężenia 100 nM zasadniczo obserwowano zanik selektywności i znaczące wyciszenie ekspresji obydwu wariantów RNA.

W rezultacie transfekcji komórek gapmerem b8, powodującym niezwykle selektywną hydrolizę w warunkach *in vitro*, dla obydwu wariantów RNA 692 obserwowano ujemną korelację poziomu ekspresji i stężenia. Najlepszy efekt, istotny statystycznie na poziomie $\alpha=0,05$ uzyskano w stężeniu 50 nM, w którym wyciszenie formy zmutowanej wynosiło 60% natomiast formy dzikiej 32%. Osiągnięto zatem zróżnicowanie ekspresji o 28% (Wykres 54). Jednak obserwując zmianę poziomu ekspresji obydwu wariantów RNA w zależności od stężenia b8, zauważyć można, że oligonukleotyd ten nie działa tak, jak w warunkach *in vitro*, czyli z efektem hydrolizy „wszystko i nic”.

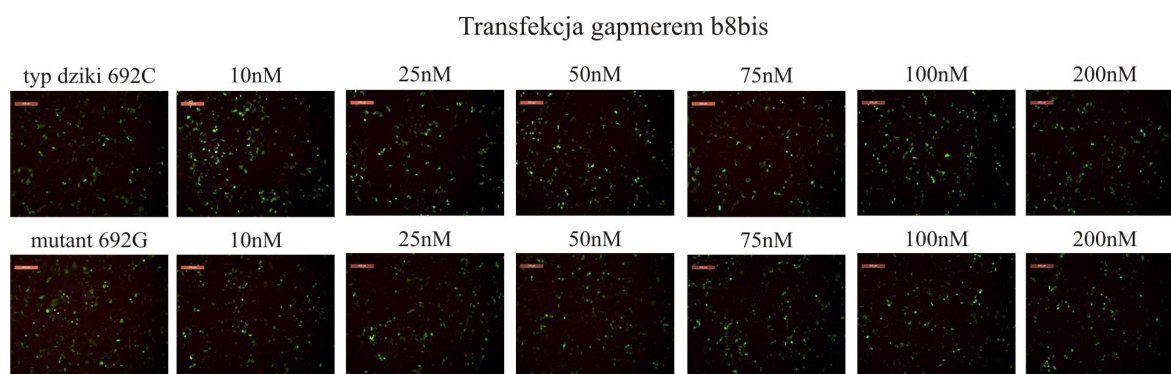


Rysunek 49. Komórki *HeLa* po 24-godzinnej transfekcji gapmerem b8; obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.

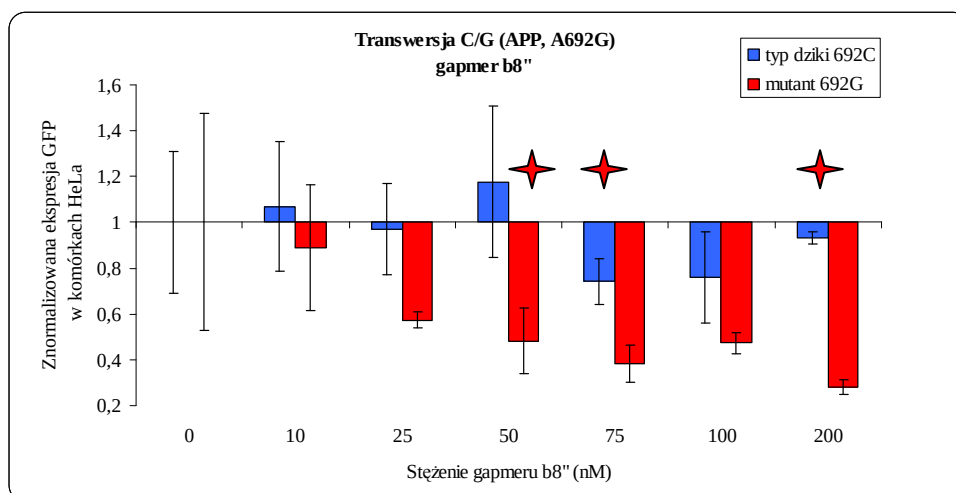


Wykres 54. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b8. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia b8 poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotnie statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

W przypadku gapmeru b8", wnoszącego ten sam układ niesparowań co oligonukleotyd b8, ale w kontekście gapu wydłużonego z 7 do 9 nukleotydów, obserwowano znacznie większy potencjał selektywności w kilku analizowanych stężeniach. Istotne statystycznie różnicowanie poziomu ekspresji we właściwym kierunku (selektywne względem mutantu RNA 692G) otrzymano w stężeniu 50 nM, 75 nM i 200 nM, przy czym prawidłowa tendencja utrzymywała się w całym zakresie stężeń. Obserwowano niestety dość duże błędy, zwłaszcza w przypadku kontroli (prawdopodobnie ze względu na zmienną wydajność transfekcji). Dla poszczególnych stężeń, błędy te wydają się być mniejsze, jednak rzutują one na istotność statystyczną uzyskiwanych różnic. Najlepszy efekt zróżnicowania ekspresji o 70% uzyskano w stężeniu b8" 50 nM, nieco mniejszy - 65% w stężeniu 200 nM. Gapmer b8", jako jeden z nielicznych, nie tracił selektywności wraz ze wzrostem stężenia (Wykres 55).

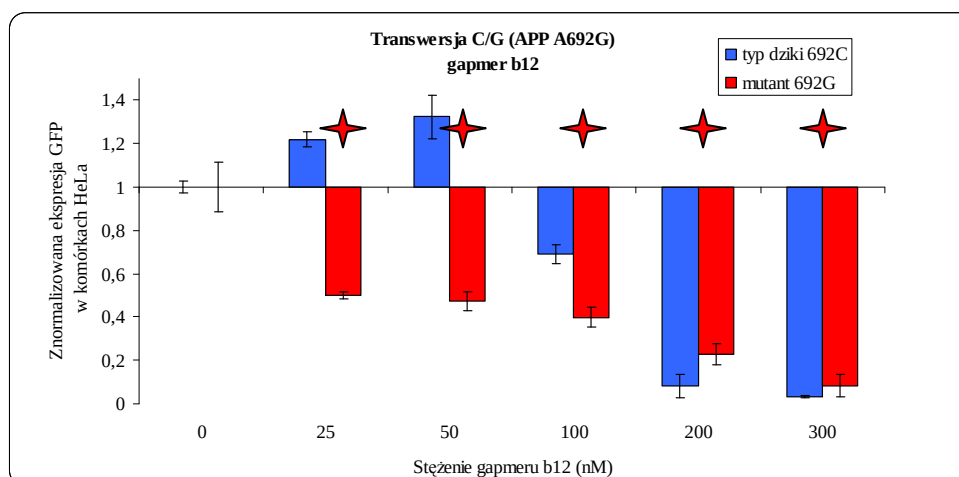


Rysunek 50. Komórki *HeLa* po 24-godzinnej transfekcji gapmerem b8", obserwowana fluorescencja białka GFP, powiększenie 10x.



Wykres 55. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b8''. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotnie statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

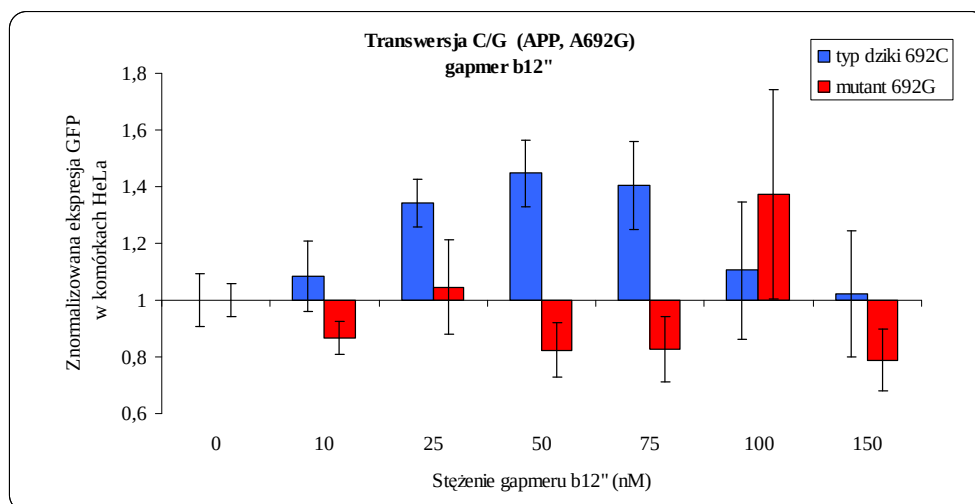
Transfekcja gapmerem b12, dobrze różnicującym wydajność hydrolizy w warunkach *in vitro*, wykazała niezwykle wydajny, selektywny spadek ekspresji wariantu RNA 692G w stężeniu 25 nM o (72%) i 50 nM (o 85%). Obserwowano charakterystyczną korelację poziomu RNA i stężenia gapmeru. Uzyskane rezultaty były obarczone małym błędem, przez co istotnie statystycznie w całym badanym zakresie stężeń (Wykres 56).



Wykres 56. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b12. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotnie statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

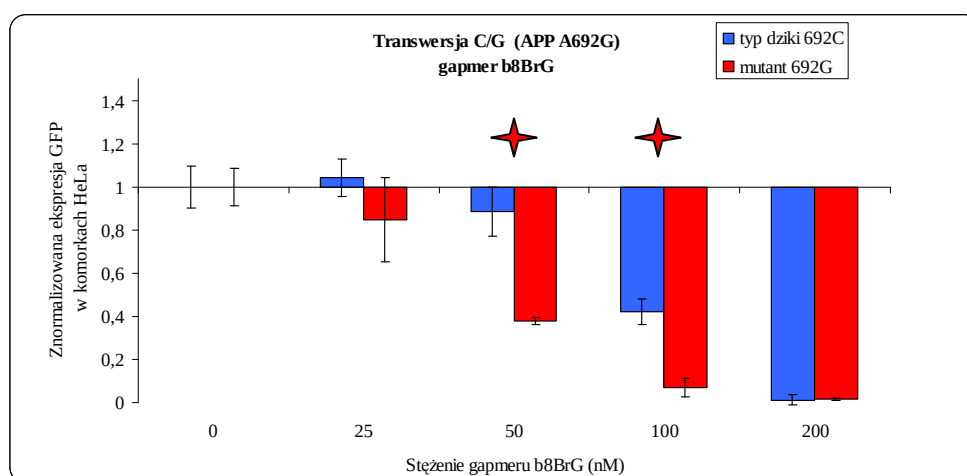
Z kolei wydłużenie cząsteczki b12 do 15-meru b12'' w analogiczny sposób jak to miało miejsce w przypadku b8 i b8'' (wydłużenie gapu o 2 nukleotydy), powodowało znaczący wzrost ekspresji typu dzikiego RNA, przy jednoczesnym niewielkim spadku, lub pozostając bez wpływu na ekspresję formy zmutowanej RNA 692G. Duże błędy analizy

świadczą o niejednorodnym ilościowo, a mimo to dość spójnym jakościowo efekcie działania oligonukleotydu b12” w ramach powtórzeń biologicznych, co jednak skutkowało brakiem istotności statystycznej obserwowanych różnic w analizowanym zakresie stężeń (Wykres 57).



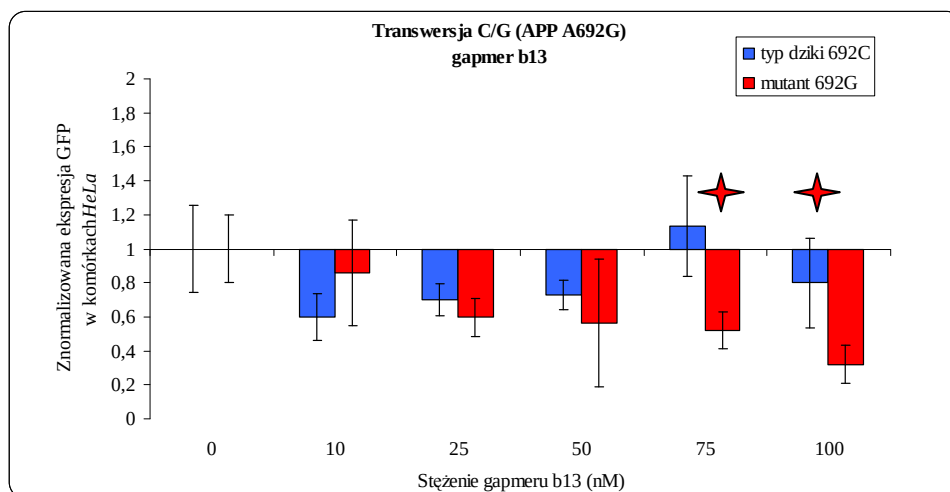
Wykres 57. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b12”. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Zaskakujący, bo wykazujący selektywność w komórkach *HeLa*, w przeciwieństwie do rezultatów uzyskanych w warunkach *in vitro* był natomiast efekt działania gapmeru b8BrG. Oligonukleotyd ten różnicował poziom ekspresji wariantów RNA 692 w dwóch stężeniach: 50 nM o 50%, i 100 nM o 35%; obydwie różnice były istotne pod względem statystycznym. Dla obydwu form RNA obserwowano ujemną korelację między poziomem ekspresji a stężeniem gapmeru b8BrG (Wykres 58).



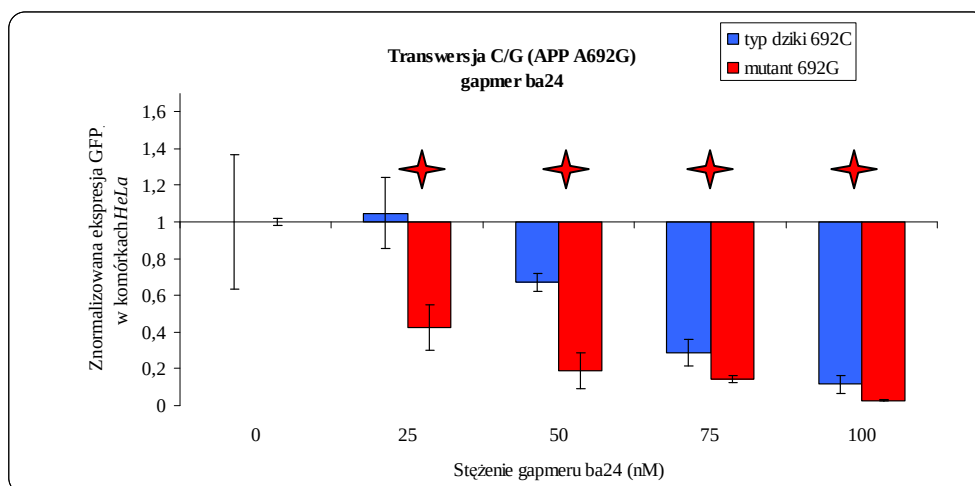
Wykres 58. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b8BrG. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

Selektywność w środowisku komórki wykazywał także oligonukleotyd b13, który bardzo efektywnie działał w układzie *in vitro*. Wnosił on w przypadku obydwu dupleksów niesparowanie rA-dA jako pierwsze od 5' końca gapu, czyli w okolicy potencjalnego miejsca cięcia. Drugie niesparowanie rC-dC występowało tylko w przypadku dupleksu z formą dziką RNA 692C. Gapmer ten w komórkach wykazywał selektywność istotną statystycznie na poziomie 61% w stężeniu 75 nM, oraz 48% w stężeniu 100 nM (Wykres 59).



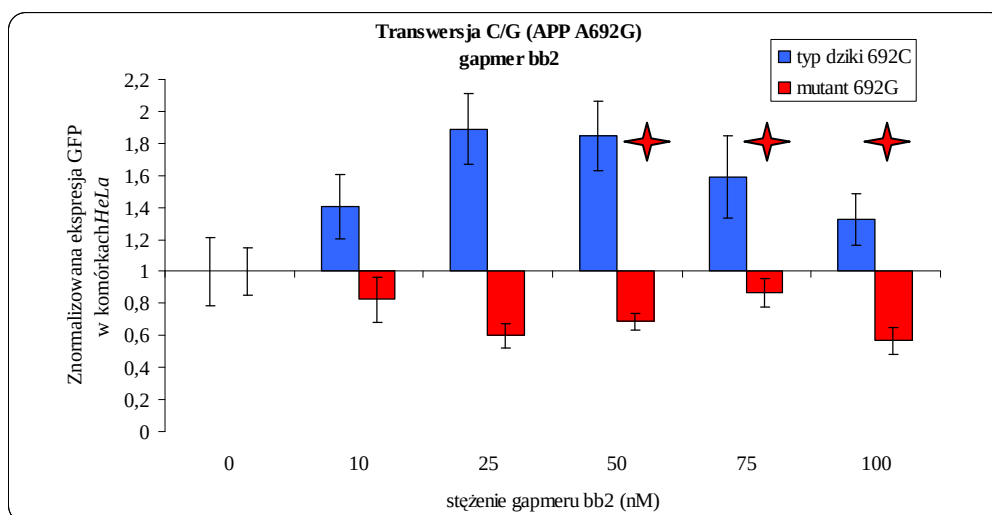
Wykres 59. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru b13. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

W większości przypadków, niezadowalające były rezultaty transfekcji oligonukleotydami zawierającymi alkilowe łączniki SP3 i SP18. Spośród tradycyjnych gapmerów (układ 3' koniec/gap/5' koniec – 3nt/7nt/3nt), tylko jeden z łącznikiem SP3 (ba24) okazał się selektywny w stężeniu 25 nM (różnica w ekspresji RNA 692C i 692G – 62%) i 50 nM (różnica 48%). Wykazano wzmożony efekt wyciszenia typu dzikiego RNA w zależności od wzrastającego stężenia gapmeru ba24 (od +5% do -90%), przy czym ekspresja mutantu wyciszona w najmniejszym stężeniu 25 nM do około 43%, spadła do poziomu 3% w stężeniu ba24 100 nM (Wykres 60).



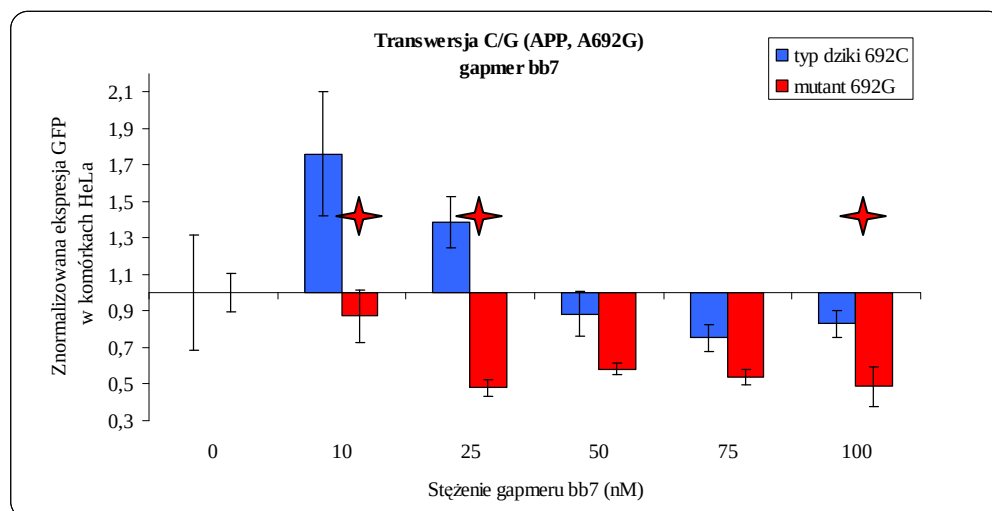
Wykres 60. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru ba24. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

Spośród 17-nukleotydowych gapmerów z serii bb (o zmiennej długości gapu względem sekwencji okalającej gap od 3' końca), zarówno zawierających łącznik SP3 jak i go nie posiadających, tylko jeden oligonukleotyd z każdej grupy prezentował selektywność zgodną z ogólną tendencją, obserwowaną w badanym zakresie stężeń. Był to odpowiednio bb2, nieposiadający łącznika, o długości gapu 5 nukleotydów, oraz bb7, posiadający łącznik SP3 i gap długości 6 nukleotydów. Oligonukleotyd bb2 wzmacniał ekspresję typu dzikiego RNA 692C w całym analizowanym zakresie stężeń, przy jednoczesnym ograniczaniu poziomu RNA wariantu zmutowanego 692G. Zróżnicowanie poziomu ekspresji RNA istotne statystycznie uzyskano dla trzech stężeń: najlepszy efekt w stężeniu 50 nM wynosił 115%. W stężeniu 75 nM różnica w ekspresji obydwu wariantów RNA wynosiła 72%, natomiast w stężeniu 100 nM 75% (Wykres 61). Oligonukleotyd bb2 tworzył z obydwojema wariantami RNA duplekisy różniące się tylko obecnością (typ dziki 692C) lub brakiem (mutant 692) pojedynczego niesparowania rC-dC.



Wykres 61. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru bb2. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

Gapmer bb7, oprócz różnicującego niesparowania rC-dC posiadający sześciopukleotydowy gap i łącznik SP3, największą selektywność prezentował w niższych stężeniach, w których działał stymulująco na ekspresję formy dzikiej. Różnica w poziomie ekspresji wynosiła 89% dla stężenia 10 nM, oraz 90% dla stężenia 25 nM. Wraz ze wzrostem stężenia pogarszało się zróżnicowanie, ale było ono obserwowane do końca badanego zakresu stężeń – w 100 nM oscylowało na poziomie 34%.

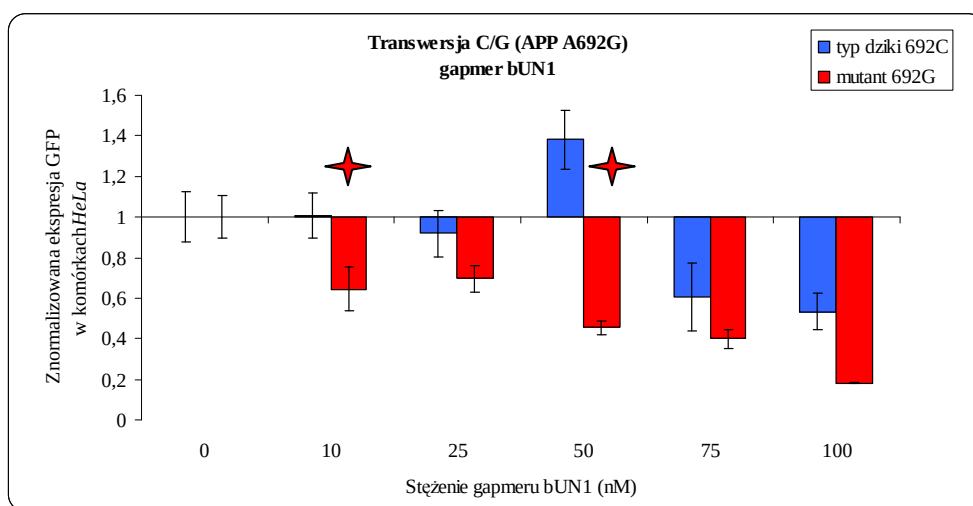


Wykres 62. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru bb7. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

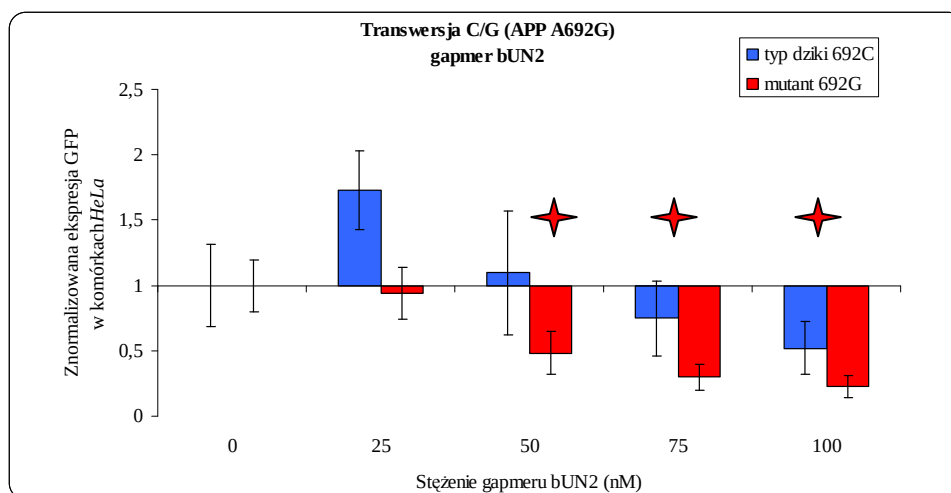
Żaden z wytypowanych na podstawie badań *in vitro* oligonukleotydów z łącznikiem SP18 nie działał selektywnie w komórkach *HeLa*. Co ciekawe gapmery ba15 i ba17

w niewiele większym stopniu (około 15%), ale jednak obniżały poziom wariantu dzikiego RNA 692C, zamiast mutantu 692G (Załączniki, Wykresy 81-82).

Interesujące rezultaty uzyskano dla gapmerów, w których zastosowano nukleotydy UNA w miejscu generowanych w duplesie niesparowań (bUN1, bUN2). W obecności jednego UNA występującego jako pierwszy nukleotyd od 5' końca gapu (bUN1) obserwowano selektywność w całym zakresie stężeń, jednak istotna statystycznie okazała się ona w stężeniu 10 nM, wynosząc 35% oraz w stężeniu 50 nM wynosząc 92%. W wyższych stężeniach różnica stopniowo się zacierała (Wykres 63). Z kolei w wyniku transfekcji komórek *HeLa* gapmerem bUN2, posiadającym 2 nukleotydy UNA od 5' końca gapu obserwowano maksymalną różnicę 62% w stężeniu 50 nM bUN2. Także wyższe stężenia generowały statystycznie istotne różnice: 45% w stężeniu 75 nM i 30% w stężeniu 100 nM (Wykres 64). Działanie wykazane w warunkach *in vitro* zostało więc potwierdzone w linii komórkowej.



Wykres 63. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru bUN1. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotne statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.



Wykres 64. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru bUN2. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotnie statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.

Na podstawie wyników uzyskanych w linii komórkowej *HeLa*, dla każdego testowanego oligonukleotydu antysensowego wyznaczono wartość parametru IC_{50} , która umożliwiła obiektywne porównanie efektywności działania poszczególnych oligonukleotydów między sobą (Tabele 17-18). Wartość IC_{50} określa stężenie gapmeru, które prowadzi do 50% inhibicji ekspresji poszczególnych wariantów RNA. Najbardziej pożądane dla prezentowanej strategii są oligonukleotydy posiadające jak najmniejszą wartość IC_{50} w dupleksach z formą zmutowaną RNA 692G, przy jednocześnie jak największej wartości IC_{50} w dupleksach z formą dziką RNA 692C. Parametr ten wyznaczono wykorzystując zależność:

$$IC_{50} = \max - 0,5(\max - \min)$$

gdzie: max - maksymalna uzyskana inhibicja, min - minimalna uzyskana inhibicja ekspresji.

Dla niektórych oligonukleotydów niemożliwe było obliczenie IC_{50} , ze względu na brak efektu inhibicji (b/i), brak zależności poziomu ekspresji od stężenia (n/a), lub maksymalny efekt inhibicji obserwowany już w najniższym stężeniu (<10). Największą, 4,4-krotną różnicę wartości stężenia IC_{50} względem RNA typu dzikiego i mutantu wykazywał gapmer b12. Znaczny efekt obserwowano także dla oligomerów ba24 (3,16-krotna różnica IC_{50}), oraz bUN2 (1,85x) i b8BrG (1,84x). Na podstawie ogólnej tendencji zmian ekspresji, wyrażanej ilościowo przez porównanie wartości IC_{50} , niektóre oligonukleotydy okazały się działać

przeciwnie w stosunku do efektów obserwowanych *in vitro*. W rezultacie eksperymentów w linii komórkowej *HeLa*, nie zaobserwowano także zależności wydajności trawienia od długości gapu (seria ba i bb), która była wyraźnie zarysowana w układzie izolowanym.

Tabela 17. Porównanie parametrów IC_{50} gapmerów bKM-bUN2 względem wariantów RNA 692.

ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 692C	RNA mutant 692G
bKM	51,3	51,3
b8	54,6	38,9
b12	121,5	27,6
b8brG	78,0	42,4
b12''	n/a	n/a
b8'	48,5	39,5
b8''	n/a	31,0
ba15	<10	<10
ba16	<10	<10
ba17	24,6	43,7
bUN1	32,5	34,1
bUN2	73,8	39,8

Tabela 18. Porównanie parametrów IC_{50} gapmerów b13-bb7 względem wariantów RNA 692.

ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 692C	RNA mutant 692G
b13	37,2	21,4
b14	61,1	82,7
ba21	16,0	51,0
ba22	<10	<10
ba23	<10	<10
ba24	45,8	14,5
ba25	17,3	21,0
bb1	36,9	26,5
bb2	b/i	81,2
bb5	53,3	30,2
bb6	22,9	14,7
bb7	73,6	18,5

Oligonukleotydy podświetlone na: zielono prezentują silną dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 692G, żółto – niewielką dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 692G, czerwono – niepożądaną dyskryminację ekspresji typu dzikiego RNA.

3.2 Tranzycja G/A

3.2.1 APP V717I

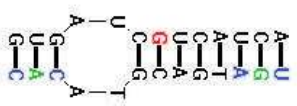
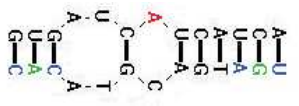
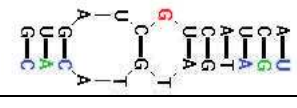
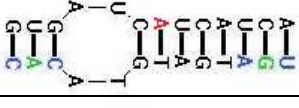
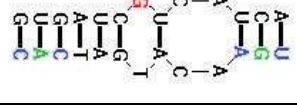
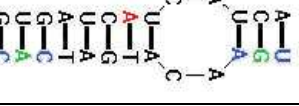
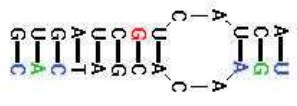
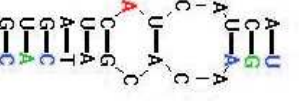
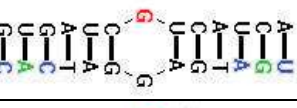
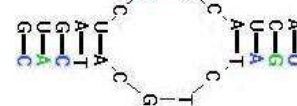
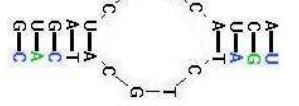
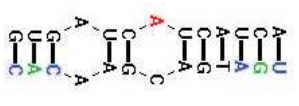
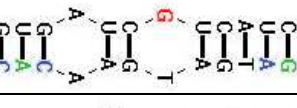
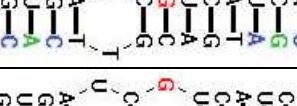
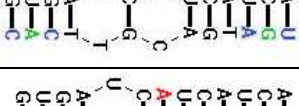
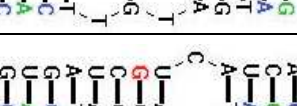
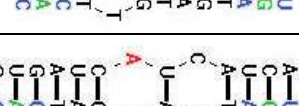
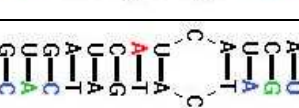
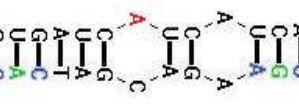
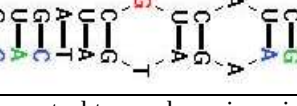
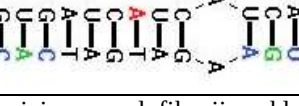
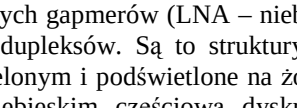
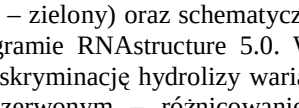
Dla sekwencji RNA 717 zaprojektowano 27 oligonukleotydów typu gapmer (Tabele 19 i 21), wnoszących niesparowania i modyfikacje w sposób analogiczny jak w poprzednim przypadku SNP C/G. Rozpoczęto od analizowania wpływu pojedynczego i podwójnego niesparowania. Z obserwacji dupleksów tworzonych przez gapmer dKM, analizowanych jako kontrola w przypadku układu tandemowego, wiadomo było, że wykazuje on pewną choć niewielką selektywność wobec mutanta. Jest to efekt jak najbardziej pożądaný, jednak nieoczekiwany, nie sądzono bowiem, że dość subtelna zmiana pary rA-dT na rG-dT może mieć w tym przypadku znaczenie, zwłaszcza porównując dane termodynamiczne i stałe wiązania obu dupleksów (por. rozdział 2.2.1). Z drugiej strony zaobserwowano, że gapmer dKW, komplementarny do formy dzikiej RNA, dużo skuteczniej promował jej hydrolizę niż trawienie zmutowanego wariantu RNA 717G (niesparowanie rA-dC). Fakt ten sygnalizuje, że w analizowanym kontekście sekwencyjnym pojedyncze niesparowanie może ograniczać

wydajność hydrolizy. Niesparowanie rA-dC znacznie silniej destabilizuje dupleks (+3,65 kcal/mol, Tabela 20) niż rG-dT (+0,5 kcal/mol), wnosząc tym samym większe lokalne zaburzenie struktury dupleksu, przeszkadzające RNazie H w wydajniej hydrolizie.

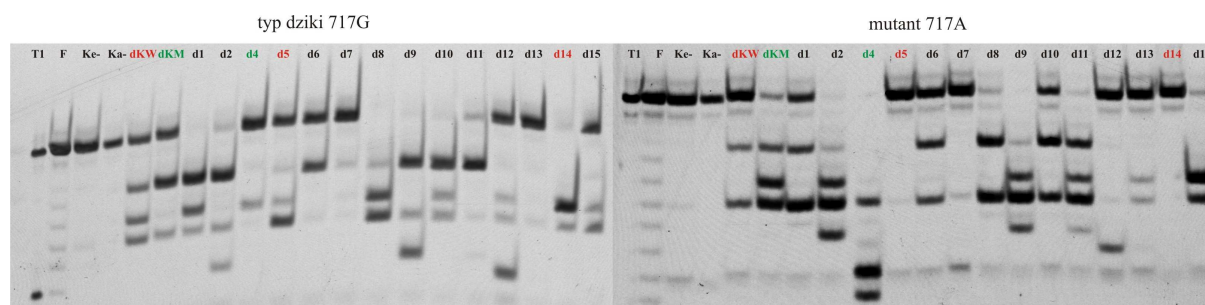
Analizując podwójne niesparowania w różnych regionach dupleksów RNA 717 z kolejnymi gapmerami zaobserwowano, że gdy jest ono ulokowane przy 3' końcu gapu to wzmagają wydajność hydrolizy, niezależnie obecności centralnego niesparowania powodowanego występowaniem SNP. Co ciekawe, podwójne niesparowanie wprowadzone od końca 5' gapu obniżało wydajność hydrolizy, zwłaszcza w obecności dodatkowego niesparowania generowanego przez SNP. Analizując znaczenie rodzaju niesparowania dla poziomu hydrolizy, zauważono najsilniejszą inhibicję wydajności trawienia podczas obecności naprzeciw siebie nukleotydów rC-dC od 5' końca gapu (w rejonie cięcia). Z kolei niesparowanie rA-dA ulokowane zarówno przy 5' jak i przy 3' końcu gapu nie wywierało żadnego wpływu na poziom hydrolizy. Centralnie ulokowane niesparowanie powodowało obniżenie wydajności trawienia, zależnie od typu niesparowania. Najsilniej inhibujące okazały się być niekanoniczne pary rA-dC oraz rA-dG, nieco mniejszy efekt powodowała niekanoniczna para rG-dG, a najmniejszy z obserwowanych para rG-dT. Efekt obecności trzeciego niesparowania zależał głównie od ich typów i układu w dupleksie. Dla przykładu, centralne niesparowanie rA-dC w połączeniu z podwójnym niesparowaniem rA-dA/rU-dT od 3' końca gapu (dupleks 717A-d1) nawet nieznacznie wzmagają poziom hydrolizy. Natomiast gdy podwójne niesparowanie przesunięto na 5' koniec gapu, gdzie przyjęło postać rA-dA/rC-dC (dupleks 717A-d5) wydajność trawienia spadła praktycznie do zera. Formowanie czternukleotydu pętli wewnętrznej w wyniku dodania kolejnego niesparowania w obrębie gapu, praktycznie całkowicie znosiło helikalność fragmentu RNA/DNA dupleksu, skutkując całkowitym zahamowaniem hydrolizy (gapmer d7).

Tabela 19. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 717 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmer dKW-d15.

ASO	Dziki 717G		Mutant 717A	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
dKW		60,8 ± 7,7		16,1 ± 2,9
dKM		57,7 ± 15,8		83,6 ± 12,6

d1		91,9 ± 35,0		90,8 ± 5,9
d2		78,6 ± 22,8		93,8 ± 8,8
d4		5,3 ± 11,1		81,4 ± 26,3
d5		48,4 ± 11,5		1,1 ± 0,9
d6		37,3 ± 3,3		12,9 ± 16,4
d7		4,7 ± 6,2		0,6 ± 1,2
d8		96,7 ± 3,3		91,7 ± 7,4
d9		95,9 ± 3,8		94,1 ± 9,7
d10		92,4 ± 5,7		78,3 ± 29,8
d11		93,1 ± 6,6		90,7 ± 11,6
d12		40,4 ± 8,1		46,1 ± 0,8
d13		16,8 ± 11,7		16,6 ± 1,5
d14		79,4 ± 29,6		5,1 ± 6,5
d15		50,5 ± 13,9		75,4 ± 4,7

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensownych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, kolorem niebieskim częściową dyskryminację, a kolorem czerwonym – różnicowanie w niepożądanym kierunku.



Rysunek 51. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy RNA 717 w dupleksach z wybranymi gapmerami (dKW-d15); Ke- reakcja bez RNazy H, Ka- reakcja bez oligonukleotydu antysensowego.

Analizując parametry termodynamiczne określone dla najciekawszych dupleksów, znaczące różnice w trwałości (około 4 kcal/mol) zaobserwowano dla dupleksów z gapmerem dKW oraz d14. Obydwa gapmery w dupleksach z RNA, stymulowały hydrolizę typu dzikiego, działając odwrotnie do planowanego efektu. Rezultat ten zatem ma termodynamiczne potwierdzenie, podobnie jak efekt oligonukleotydu d4, dla którego znaczącą różnicę obserwuje się nie tyle w energii swobodnej obydwu dupleksów, co w temperaturze topnienia. Jest bowiem mało prawdopodobne istnienie duplexu o temperaturze topnienia 32,8°C (typ dziki RNA 717G-d4, dla stężenia duplexu stosowanego podczas hydrolizy zapewne temperatura ta jest jeszcze niższa) w temperaturze reakcji równej 37°C.

Tabela 20. Zestawienie kluczowych parametrów termodynamicznych duplesów RNA 717 z gapmerami istotnie różniącymi poziom hydrolizy.

Typ dziki 717G			Mutant 717A		
ASO	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	ASO	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
dKW	12,00 ± 0,07	64,5	dKW	8,35 ± 0,02	42,7
dKM	10,48 ± 0,05	57,3	dKM	10,98 ± 0,09	61,3
d1	9,80 ± 0,05	51,7	d1	7,10 ± 0,04	40,5
d2	7,79 ± 0,01	44,3	d2	8,67 ± 0,08	47,2
d4	6,28 ± 0,05	32,8	d4	7,03 ± 0,01	41,1
d5	7,45 ± 0,05	45,8	d5	6,94 ± 0,03	39,7
d7	6,00 ± 0,07	31,8	d7	7,34 ± 0,04	41,1
d14	10,89 ± 0,05	56,3	d14	6,88 ± 0,03	39,7

Kolorem zielonym oznaczono oligonukleotydy, które w dupleksach dobrze różnicowały poziom hydrolizy selektywnie względem mutantu RNA, kolorem niebieskim oligonukleotydy które różnicowały hydrolizę w mniejszym stopniu, kolorem czerwonym oligonukleotydy które selektywnie indukowały hydrolizę typu dzikiego RNA (niepożądane). Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica termodynamiczna ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) w dupleksach z typem dzikim i z mutantem RNA.

Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 43, a – temperatura topnienia duplexu w stężeniu 10⁻⁴M

Testując gapmery wprowadzające niesparowanie (związane z występowaniem SNP) w region hydrolizowany duplexu, od 5' końca gapu, w żadnym przypadku nie

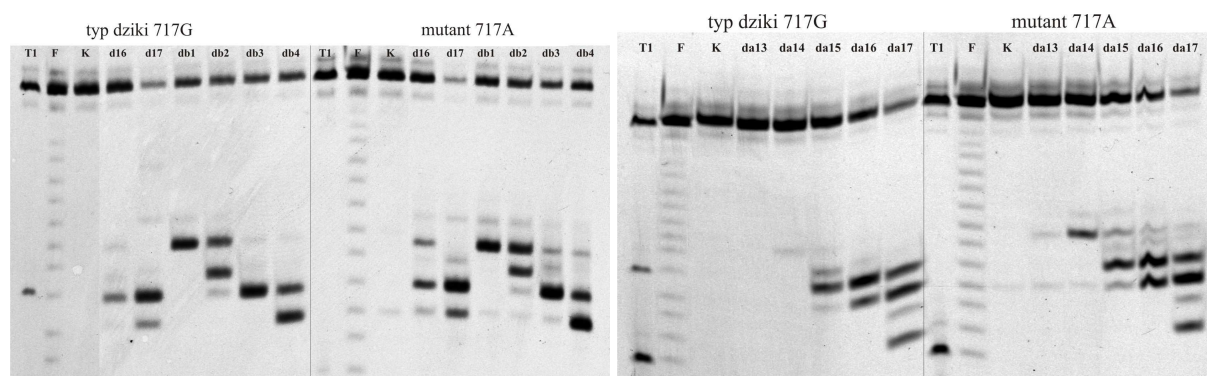
zaobserwowano istotnej selektywności hydrolizy. Pojedyncze niesparowanie rC-dC nie ograniczało poziomu trawienia dupleksu z udziałem RNazy H, efekt ten obserwowano natomiast dla niesparowania rU-dT przy pierwszym nukleotydzie od 5' końca gapu. Dodatkowe niesparowanie rG-dT obecne zawsze w duplesie z typem dzikim RNA, powodowało niewielki około 10% spadek poziomu hydrolizy względem wariantu zmutowanego RNA, co jest niewystarczające by móc uznać różnicę za efektywną. Także wzrastająca długość gapu i obecność alkilowego łącznika nie spowodowały wyraźnego obniżenia hydrolizy któregośkolwiek z wariantów RNA 717 (Tabela 21, Rysunek 52). Niekanoniczna para rG-dT jako jedyny czynnik różniący duplekisy wariantów RNA z poszczególnymi gapmerami, nie wnosi lokalnego zaburzenia struktury dupleksu RNA/ASO w stopniu umożliwiającym wydajną dyskryminację hydrolizy RNA typu dzikiego. Widać natomiast że w miarę wzrostu długości fragmentu gapu hydroliza w przypadku każdego z wariantów RNA jest wydajniejsza (Wykres 65). Jest to efekt dobrze opisany w literaturze i próbowano go zastosować w prezentowanej strategii, zakładając że niesparowanie występujące w duplesie z typem dzikim będzie niestabilne na tyle, by nie być traktowane przez RNazę H jako helikalny fragment dupleksu RNA/DNA. Podejście to skuteczne w przypadku RNA 692 z transwersją C/G, okazało się niemożliwe do zrealizowania w przypadku tranzykcji G/A dla RNA 717 (Tabela 21).

Tabela 21. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 717 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery d16-db4.

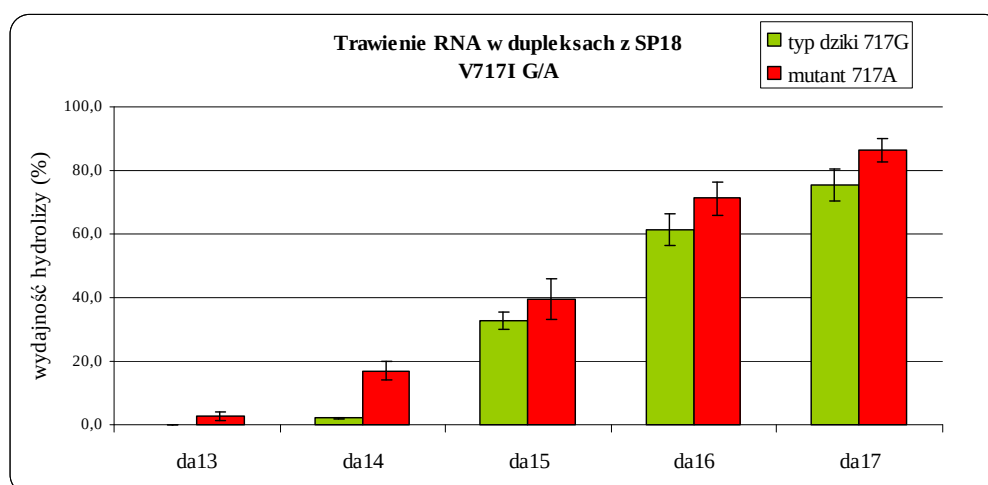
ASO	Dziki 717G		Mutant 717A	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
d16		24,3 ± 1,5		38,2 ± 1,1
d17		84,2 ± 0,8		91,8 ± 2,3
da13		0		2,8 ± 1,3
da14		2,3 ± 0,2		17,0 ± 2,8
da15		32,8 ± 2,9		39,5 ± 6,3
da16		61,2 ± 4,9		71,2 ± 5,1

da17		$75,7 \pm 5,0$		$86,2 \pm 3,7$
db1		$62,7 \pm 2,1$		$61,1 \pm 0,6$
db2		$69,2 \pm 1,3$		$69,9 \pm 2,3$
db3		$73,2 \pm 1,6$		$81,9 \pm 2,4$
db4		$74,5 \pm 1,0$		$78,9 \pm 0,8$

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensownych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0.



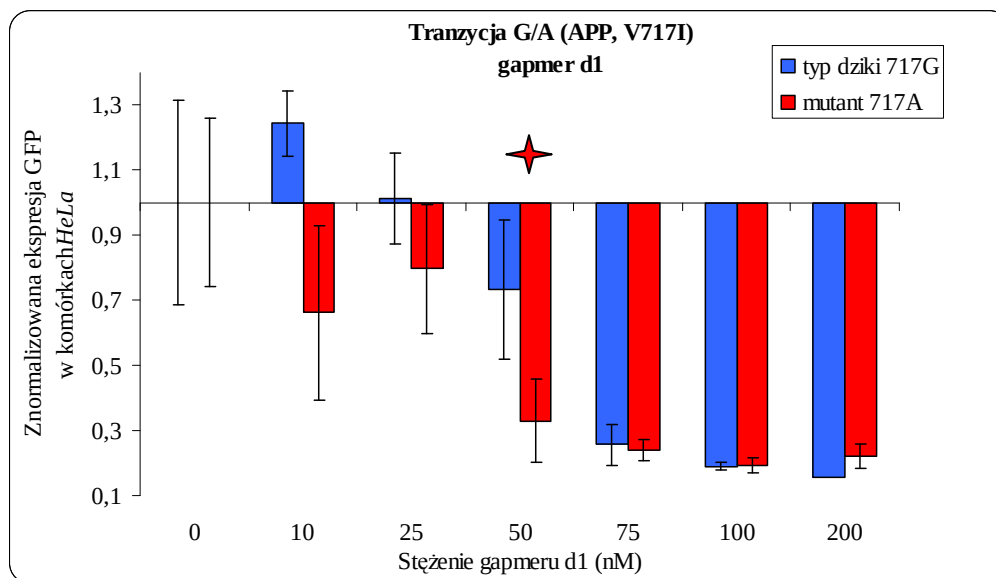
Rysunek 52. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy RNA 717 w dupleksach z wybranymi gapmerami (db1-db4 - rysunek lewy, da13-da17 – rysunek prawy).



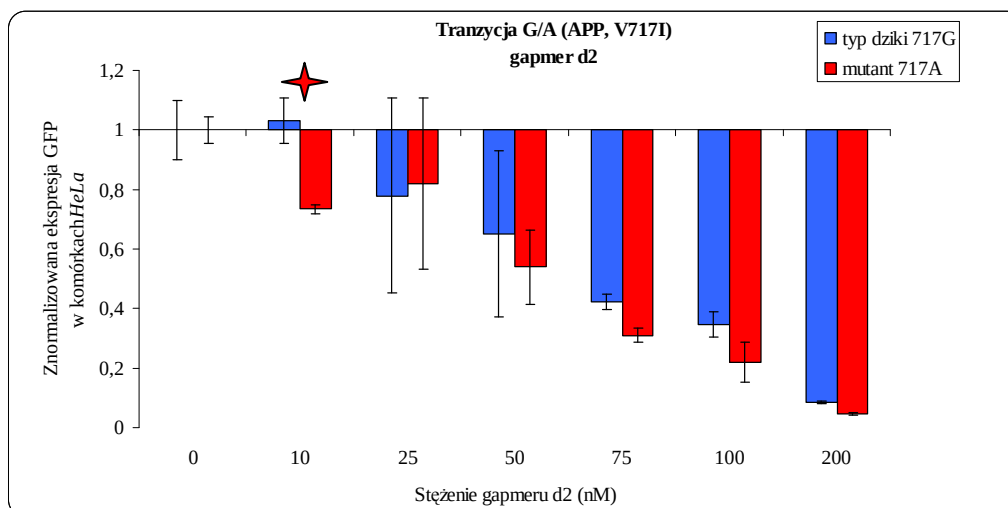
Wykres 65. Wydajność hydrolizy wariantów RNA 717 w dupleksach z gapmerami zawierającymi alikilowy łącznik SP18, w zależności od długości gapu (da13 – gap 4-nukleotydowy, da17 – gap 8-nukleotydowy).

Wśród testowanych *in vitro* oligonukleotydów, jedynie gapmery dKM i d4 dyskryminowały hydrolizę w duplesie z typem dzikim RNA. W komórkach *HeLa*, obok nich

postanowiono przetestować także oligonukleotyd wykazujący działanie odwrotne (d14) oraz gapmery d1 i d2, dla których podczas hydrolizy *in vitro* uzyskano niepewne wyniki dotyczące trawień w dupleksach z formą dziką (duże błędy). Gapmer d1 wykazywał umiarkowaną selektywność w niskich stężeniach z przedziału 10-50 nM. Istotna statystycznie okazała się jedynie różnica w poziomie ekspresji uzyskana w stężeniu 50 nM i wynosiła ona 40% (Wykres 66). Wyższe stężenia d1 nie działały selektywnie.



Wykres 66. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru d1. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

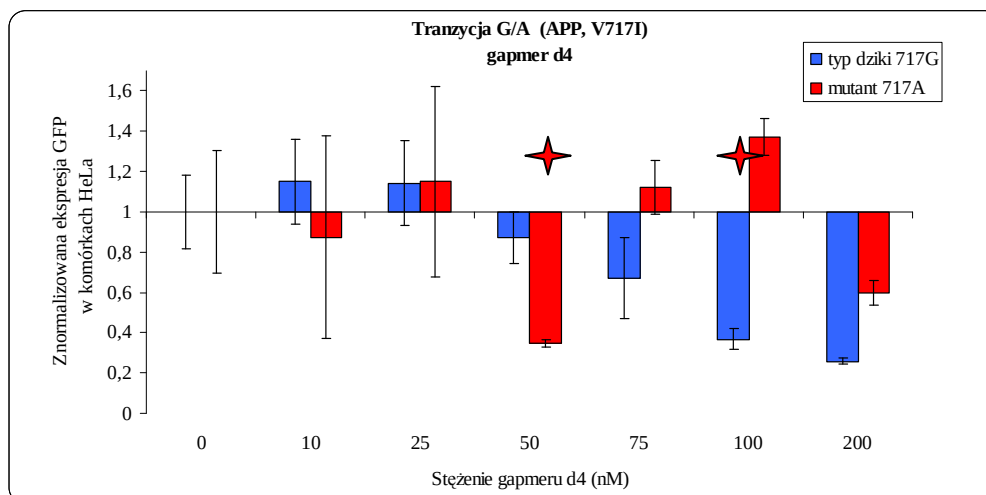


Wykres 67. Zmiana ekspresji GFP powodowana obecnością inhibitora Id2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

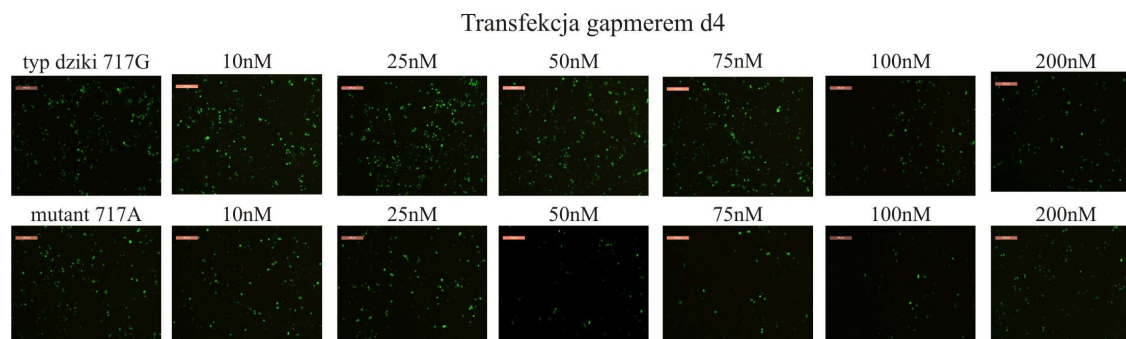
W przypadku transfekcji gapmerem d2 uzyskano istotnie statystyczny efekt selektywnego wyciszenia w najniższym testowanym stężeniu 10 nM, na poziomie 30%.

W miarę wzrostu stężenia efekt zacierał się. Dla obydwu wariantów RNA 717 obserwowano ujemną korelację poziomu ekspresji i stężenia (Wykres 67).

Weryfikacja działania oligonukleotydu d4 w komórkach *HeLa* ostatecznie nie przyniosła rozstrzygającego rezultatu. Podczas gdy dla duplexu z typem dzikim RNA obserwowano zależność poziomu ekspresji od stężenia, tak dla wariantu zmutowanego obserwowano rezultaty nie wykazujące ze sobą korelacji. Dla 50 nM stężenia d4 uzyskano istotną statystycznie selektywność działania względem mutanta na poziomie 52%, która jednak nie wygląda wiarygodnie na tle całego zakresu stężeń. Od stężenia 75 nM obserwowano wzrost wyciszenia ekspresji RNA typu dzikiego znaczny względem kontroli (Wykres 68). Brak obserwowanej dla wariantu zmutowanego RNA 717A korelacji ekspresja/stężenie gapmeru, nie daje podstaw do uznania oligonukleotydu d4 za selektywnie różnicujący wydajność ekspresji wariantów RNA 717.

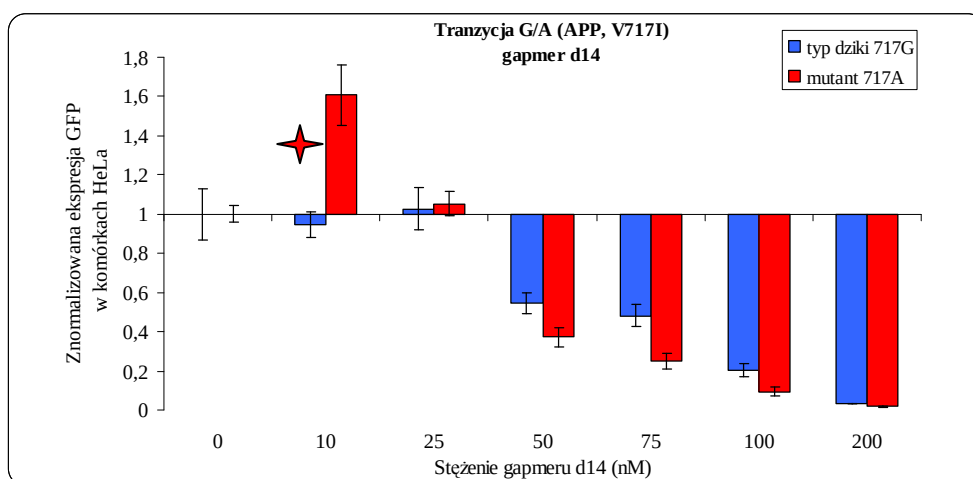


Wykres 68. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru d4. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.



Rysunek 53. Komórki *HeLa* po 24-godzinnej transfekcji gapmerem d4; obserwowana fluorescencja GFP, powiększenie 10x.

Z kolei gapmer d14 potwierdził swoje działanie różnicujące poziom ekspresji RNA na korzyść wariantu zmutowanego, wykazane w warunkach *in vitro*, jedynie w najniższym analizowanym stężeniu 10 nM. Jednak, co ciekawe, efekt selektywności uzyskano nie przez zahamowanie ekspresji RNA typu dzikiego (jak ograniczenie jego hydrolizy w warunkach *in vitro*), a przez wzmożenie ekspresji wariantu zmutowanego 717A. W badanym zakresie stężeń obserwowano ujemną korelację poziomu ekspresji i stężenia dla obydwu wariantów RNA 717 (Wykres 69).



Wykres 69. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru d14. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Podsumowując transfekcje przeprowadzone dla tranzycji G/A w obrębie sekwencji RNA 717, najlepsze działanie w komórkach *HeLa* w ramach prezentowanej strategii udało się osiągnąć z gapmerem d1 (Tabela 22). Wartości IC_{50} , uzyskane dla jego dupleksów z obydwoma wariantami, różniąc się ponad 4,5-krotnie, pozwalają potwierdzić selektywne wyciszenie wariantu zmutowanego w badanym przedziale stężeń. Nieco mniejszą selektywność (1,4-krotna różnica w IC_{50}) wykazywał gapmer dKM komplementarny do formy zmutowanej 717G, który podobną różnicę wykazywał w warunkach *in vitro*. Nie uzyskano natomiast potwierdzenia dla różnicowania poziomu ekspresji w komórkach *HeLa*, sugerowanego przez rezultaty eksperymentów *in vitro* z oligonukleotydami d4 i d14.

Tabela 22. Porównanie parametrów IC_{50} wybranych gapmerów względem wariantów RNA 717. Wartości podświetlone na zielono prezentują silną dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 717A, żółto – niewielką dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 717A.

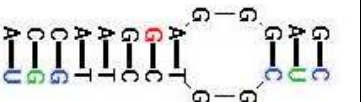
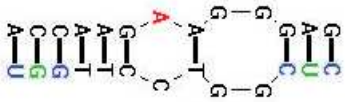
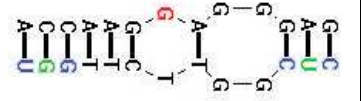
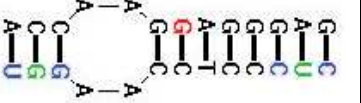
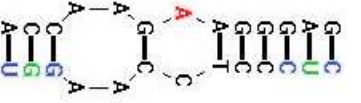
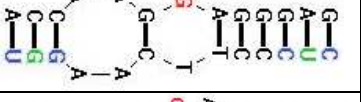
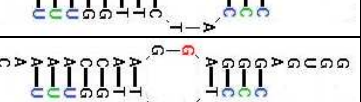
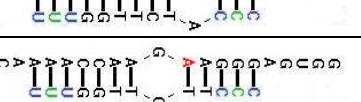
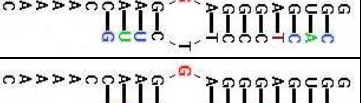
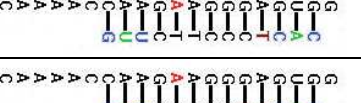
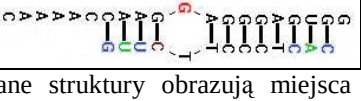
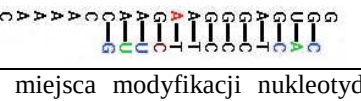
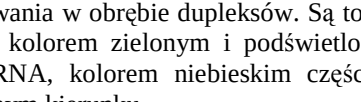
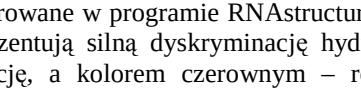
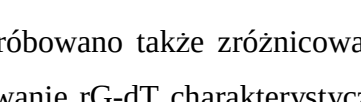
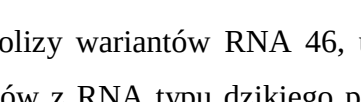
ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 717G	RNA mutant 717A
dKM	46,5	32,4
d4	72,8	n/a
d14	59,8	50,1
d1	53,7	11,4
d2	52,8	47,9

3.2.2 SNCA E46K

Dla tranzykcji G/A w obrębie sekwencji RNA 46, w warunkach *in vitro* przetestowano 11 oligonukleotydów. Skupiono się na układach niesparowań skutecznych we wcześniejszych przypadkach. Przeanalizowano także potencjał oligonukleotydów zawierających modyfikowane nukleotydy typu UNA. Centralnie zlokalizowane niesparowania, obecne w przypadku hydrolizacji gapmeru kKW do mutantu RNA 46A (rA-dC) oraz gapmeru kKM do formy dzikiej RNA 46G (rG-dT), inaczej niż w przypadku RNA 717 z tranzycją G/A, nieznacznie różnicowały poziom hydrolizy między dupleksami obydwu form RNA. Podwójne niesparowanie rA-dA umieszczone przy 3' końcu gapu zasadniczo nie wpływało na wydajność hydrolizy (Tabela 23). Natomiast obecność w jednym z dupleksów trzeciego, centralnego niesparowania powodowanego przez niekanoniczne oddziaływania w miejscu SNP, dawała niespójne wyniki. W przypadku gdy niesparowaniem tym było rA-dC, poziom hydrolizy obniżył się o około 25%, natomiast w przypadku dodatkowej niekanonicznej pary rG-dT, wydajność hydrolizy z udziałem rybonukleazy H wzrosła o niespełna 20%. Jest to zastanawiające, chociaż niekanoniczna para rG-dT nie poraz pierwszy zaskakuje w ten sposób. Zasadniczo jest ona termodynamicznie bardzo podobna do pary rA-dT, jednak zarówno na podstawie trawień dupleksów z gapmerem kKM jak i k4 wypływają wnioski, że jej obecność sprzyja hydrolizie bardziej niż obecność pary kanonicznej rA-dT. Zupełnie inaczej zachowuje się natomiast wspomniana niekanoniczna para, gdy współwystępuje w duplesie z podwójnym niesparowaniem rG-dG od 5' końca gapu (gapmer k2). W tym przypadku jej obecność znacznie obniża wydajność hydrolizy dupleksu typu dzikiego RNA 717G, czym powoduje ukierunkowanie hydrolizy z udziałem RNazy H na formę zmutowaną RNA 717A. Na przykładzie obecności podwójnego niesparowania od 5' końca gapu (gapмеры k1 i k2) widać, że obecność dodatkowego trzeciego, centralnie ulokowanego

niesparowania dupleksu dyskryminuje hydrolizę określonego wariantu RNA, generując selektywność względem drugiej z form (Tabela 23, Rysunek 54).

Tabela 23. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 46 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery kKW-kUN3.

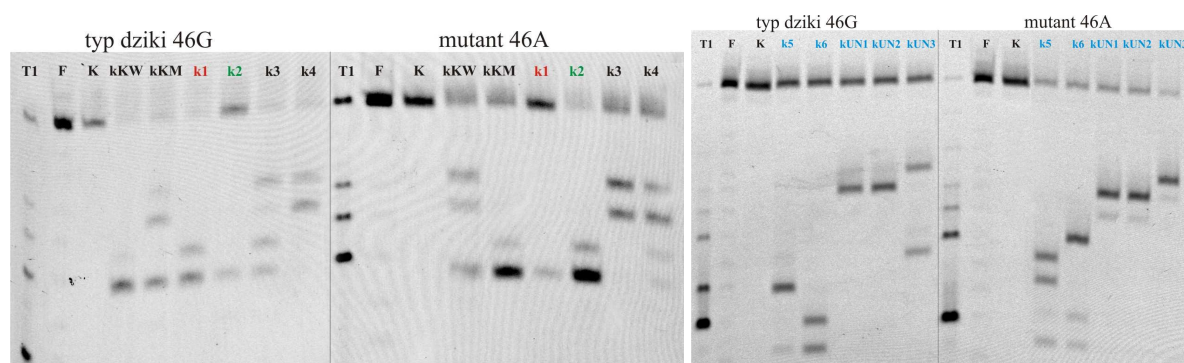
	Dziki 46G		Mutant 46A	
ASO	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
kKW		88,1 ± 4,8		61,2 ± 7,5
kKM		86,3 ± 4,8		77,8 ± 14,6
k1		78,8 ± 20,6		26,2 ± 20,5
k2		31,3 ± 23,9		81,7 ± 4,9
k3		84,1 ± 10,3		59,1 ± 7,2
k4		80,5 ± 11,2		61,7 ± 7,3
k5		45,7 ± 1,2		78,5 ± 2,6
k6		49,5 ± 3,6		76,1 ± 3,1
kUN1		50,2 ± 4,1		75,0 ± 2,8
kUN2		53,5 ± 3,1		77,5 ± 1,8
kUN3		49,7 ± 1,7		82,8 ± 3,9

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony, UNA -brązowy) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, kolorem niebieskim częściową dyskryminację, a kolorem czerwonym – różnicowanie w niepożądanym kierunku.

Próbowano także zróżnicować poziom hydrolizy wariantów RNA 46, umieszczając niesparowanie rG-dT charakterystyczne dla dupleksów z RNA typu dzikiego przy 5' końcu

gapu, w miejscu cięcia przez rybonukleazę H (gapmery k5 i k6). Osiągnięto selektywność hydrolizy względem mutanta na poziomie około 30%. Pojedyncze niesparowania rA-dA i rG-dG w tym rejonie nie wpływały znacząco na poziom hydrolizy, natomiast pojawienie się dodatkowo niekanonicznej pary rG-dT wyraźnie osłabiało wydajność trawienia.

Podobny efekt osiągnięto z zastosowaniem nukleotydów UNA w miejscach pierwotnych niesparowań w dupleksach RNA 46 – k1/k2. Dyskryminacja dupleksu przez jego destabilizację w ramach par komplementarnych na pewno stanowi mniejsze źródło potencjalnych efektów niespecyficznych w komórce, niż zastosowanie w tym celu niesparowań, co ma znaczenie w przypadku wykorzystania testowanych oligonukleotydów w komórkach.



Rysunek 54. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy RNA 46 w dupleksach z gapmerami kKW-k4 (rysunek lewy) i k5-kUN3 (rysunek prawy).

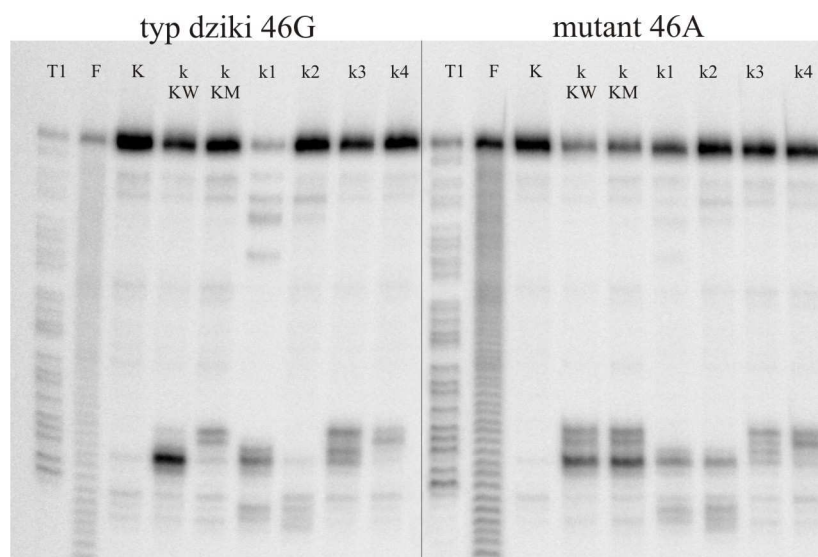
Uzyskane dla wybranych dupleksów parametry termodynamiczne wykazują, że wariant dziki RNA 46G, silniej hydrolizowany w dupleksie z oligonukleotydem k1 (o 52%), tworzy trwalszy termodynamicznie o 4,13 kcal/mol dupleks niż wariant zmutowany 46A. Z kolei z gapmerem k2 wariant dziki RNA 46G tworzy słabszy dupleks niż wariant zmutowany RNA 46A, i różnica ta choć wynosi tylko 1,64 kcal/mol, to przekłada się na znaczne zróżnicowanie poziomu hydrolizy, promując trawienie wariantu zmutowanego RNA 46A również o około 50%. Odnotowano też duże różnice w trwałości termodynamicznej dupleksów ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) z gapmerami kKW (8,98 kcal/mol) i k3 (4,28 kcal/mol), które jednak nie ukierunkowywały hydrolizy z udziałem RNazy H względem żadnego z wariantów RNA 46.

Tabela 24. Zestawienie kluczowych parametrów termodynamicznych dupleksów RNA 46 z wybranymi gapmerami.

Typ dziki 46G			Mutant 46A		
ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)
kKW	26,69 ± 1,14	86,8	kKW	17,71 ± 0,16	71,8
kKM	20,59 ± 0,50	78,8	kKM	23,95 ± 0,43	81,3
k1	12,41 ± 0,16	61,5	k1	8,28 ± 0,03	45,2
k2	10,46 ± 0,08	54,6	k2	12,11 ± 0,13	56,5
k3	13,39 ± 0,07	73,3	k3	9,11 ± 0,04	50,7

Kolorem zielonym oznaczono oligonukleotydy, które w dupleksach dobrze różnicowały poziom hydrolizy selektywnie względem mutantu RNA, kolorem niebieskim oligonukleotydy które różnicowały hydrolizę w mniejszym stopniu, kolorem czerwonym oligonukleotydy które selektywnie indukowały hydrolizę typu dzikiego RNA (niepożądane). Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica termodynamiczna ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) w dupleksach z typem dzikim i z mutantem RNA.

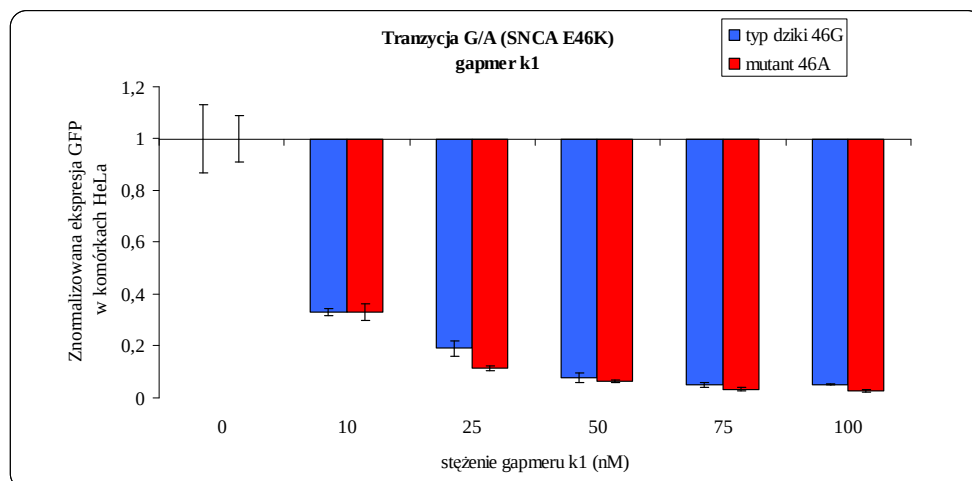
Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 39, a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu $10^{-4}M$

**Rysunek 55.** Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 99-nukleotydowych wariantów RNA 46 z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami (kKW-k4).

Działanie niektórych oligonukleotydów sprawdzono względem potencjalnie ustrukturalizowanych 99-nukleotydowych wariantów RNA 46. Potwierdzono kierunek selektywności działania gapmerów k1 i k2, natomiast uzyskano nieco niższy poziom zróżnicowania (Rysunek 55; Załączniki, Tabela 44). Obserwowano także interesujące różnice w wydajności trawienia poszczególnych wariantów RNA 46 w obecności gapmerów kKW i kKM, występujące na niższym poziomie w przypadku trawień krótkich 13-nukleotydowych RNA 46.

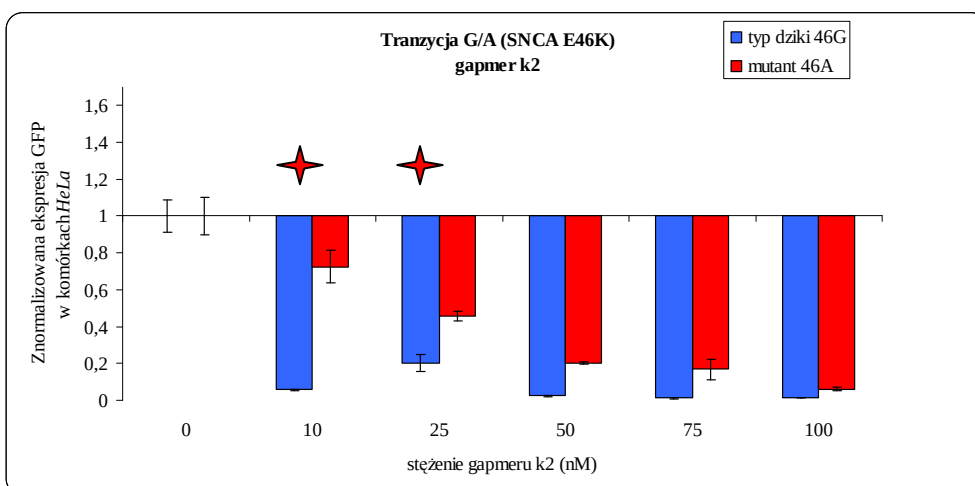
W linii komórkowej *HeLa* niestety nie udowodniono selektywnego działania w pożądanym kierunku dla żadnego z omawianych oligonukleotydów. Efekt gapmeru kKM

omówiono w rozdziale 2.2.2. Gapmer k1, w równym stopniu bardzo silnie (o ponad 60%) hamował ekspresję obydwu wariantów RNA 46 już w najniższym badanym stężeniu 10 nM. Od stężenia 50 nM obserwowano całkowite zatrzymanie ekspresji dla obydwu wariantów RNA 46. (Wykres 70).



Wykres 70. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru k1. Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Gapmer k2 wykazywał natomiast działanie selektywne w najniższym stężeniu 10 nM, jednak przeciwnie niż w warunkach *in vitro*, względem wariantu dzikiego RNA 46G. Preferencja ta wykazywała tendencję spadkową utrzymując się do stężenia 75 nM. Ujemną korelację wydajności ekspresji i stężenia obserwowano jedynie dla wariantu zmutowanego RNA 46A (Wykres 71).



Wykres 71. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru k2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką, różnicowanie ekspresji przebiegało jednak w niepożądanym kierunku.

Porównanie testowanych oligonukleotydów na podstawie wartości IC_{50} wykazało słabą selektywność dwóch gapmerów kKM i k2 względem wariantu dzikiego 46G, potwierdzając brak zależności wydajności hydrolizy od parametrów termodynamicznych dupleksu. Rezultaty uzyskane *in vitro* dla gapmeru kKM wskazywały nieznacznie wydajniejszą hydrolizę wariantu dzikiego RNA (9%), jakkolwiek różnica ta wydawała się nieistotna w obliczu błędu pomiarowego wyznaczonego dla trawień dupleksu wariant zmutowany 46A-kKM. Natomiast nie potwierdziły się rezultaty uzyskane *in vitro* dla gapmeru k2.

Tabela 25. Porównanie parametrów IC_{50} wybranych gapmerów względem wariantów RNA 46. Wartości podświetlone na czerwono prezentują niepożądaną selektywność względem typu dzikiego RNA.

ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 46G	RNA mutant 46A
kKM	4,1	9,7
k1	4,6	4,2
k2	<10	17,5

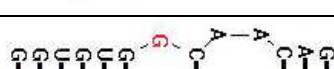
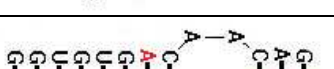
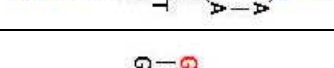
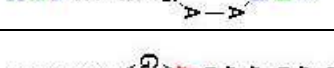
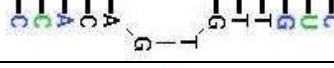
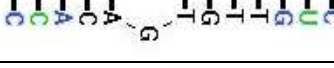
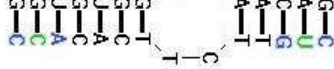
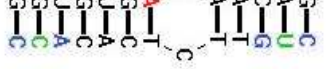
3.2.3 SNCA A53T

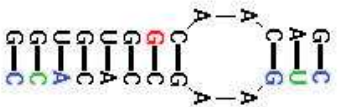
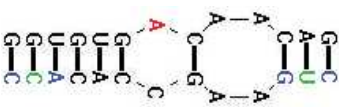
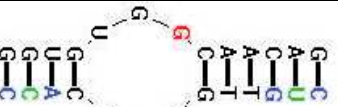
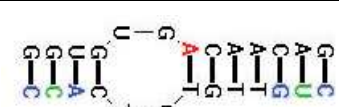
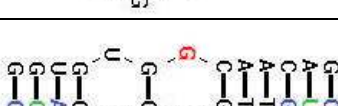
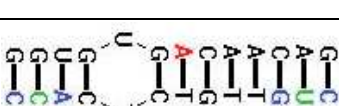
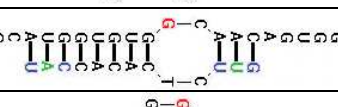
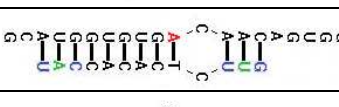
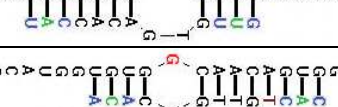
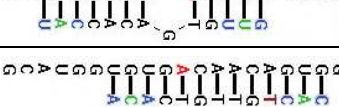
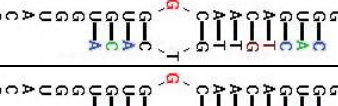
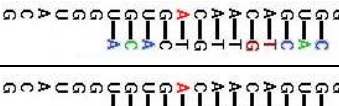
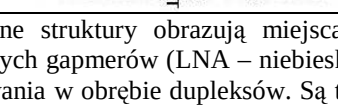
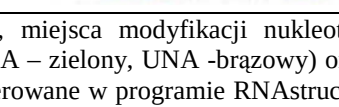
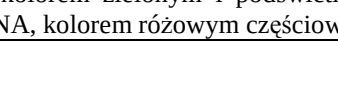
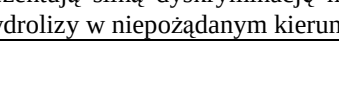
W przypadku sekwencji z tranzycją G/A RNA 53 zaprojektowano 15 gapmerów, które służyły przede wszystkim określeniu wpływu pojedynczych i podwójnych niesparowań, ulokowanych centralnie jak i przy obu końcach gapu DNA. Analizowano także działanie oligonukleotydów, wprowadzających zamiast niesparowań destabilizujące dupleks nukleotydy UNA.

Dla sekwencji RNA 53 nie zaobserwowano żadnego wpływu pojedynczego niesparowania rG-dT (gapmer hKM), ani też rA-dC (gapmer hKW), na wydajność hydrolizy z udziałem rybonukleazy H. Praktycznie całkowite trawienie uzyskiwano także, gdy w dupleksie występowało podwójne niesparowanie rG-dG/rU-dT przy końcu 3' gapu DNA. Nawet połączenie obydwu tych motywów w ramach jednego dupleksu nie powodowało spadku efektywności jego hydrolizy (gapmery h1 i h5). Nieskuteczne było także umieszczenie podwójnego niesparowania w centrum dupleksu (gapmery h3 i h4), nie zaburzając trawienia żadnego z wariantów RNA 53 w najmniejszym stopniu. Jedynym układem niesparowań w którym uzyskano różnicę w wydajności trawienia obydwu wariantów RNA 53 było podwójne niesparowanie rA-dA, umieszczone przy 5' końcu gapu w sekwencji komplementarnej do wariantu zmutowanego. Oznaczało to że dupleks z sekwencją dziką

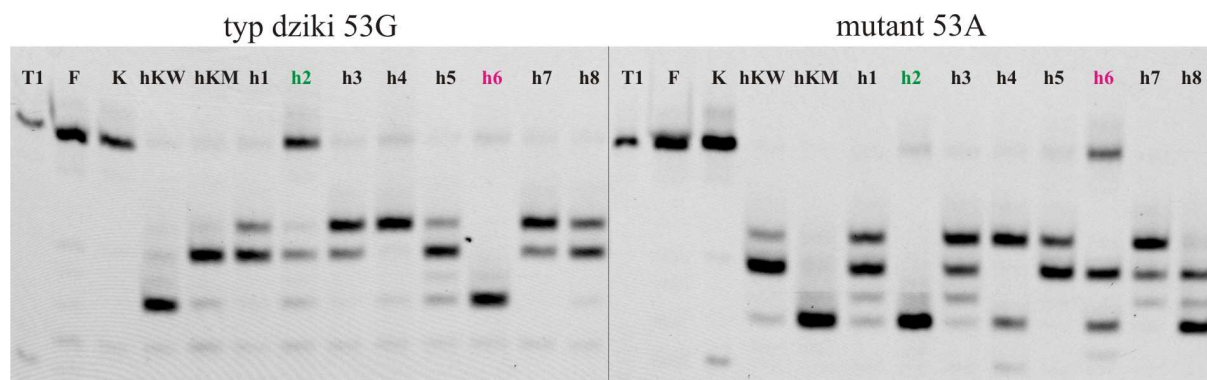
posiadał trzecie, centralnie umiejscowione niesparowanie rG-dT (gapmer h2). Uzyskana różnica w efektywności trawienia dupleksów formy zmutowanej RNA 53A i dzięki RNA 53G z gapmerem h2 była znacząca i wynosiła około 60%. Gdy podwójne niesparowanie rA-dA, umieszczone przy 5' końcu gapu występowało w sekwencji komplementarnej do typu dzikiego (oligonukleotyd h6, jego dupleks z mutantem 53A posiadał trzecie centralne niesparowanie rA-dC), wówczas obserwowano nieco mniejsze bo niespełna 30% obniżenie poziomu hydrolizy wariantu zmutowanego RNA. Żadna inna analizowana kombinacja nie powodowała zróżnicowania wydajności hydrolizy z udziałem rybonukleazy H dla wariantów sekwencji RNA 53 (Tabela 26, Rysunek 56 i 57). Co zaskakujące, wprowadzenie nukleotydów UNA w miejsce niesparowań przy końcu 5' gapu DNA (pary rA-T^U zamiast niesparowań rA-dA) nie wykazało najmniejszego inhibującego wpływu na hydrolizę, w przeciwieństwie do częściowej inhibicji w przypadku RNA 46 i całkowitej dla RNA 692 z transwersją C/G.

Tabela 26. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 53 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym; gapmery hKW-hUN3.

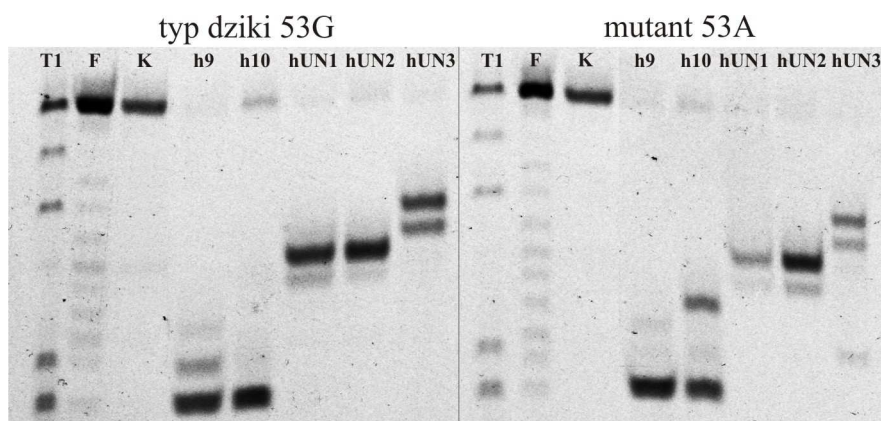
	Dziki 53G		Mutant 53A	
ASO	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
hKW		97,1 ± 2,0		98,8 ± 0,6
hKM		96,9 ± 2,1		99,1 ± 0,3
h1		97,0 ± 1,6		98,9 ± 0,3
h2		36,8 ± 4,4		96,6 ± 1,5
h3		96,2 ± 1,3		98,2 ± 0,2
h4		95,9 ± 2,4		98,2 ± 0,5
h5		97,7 ± 0,8		96,5 ± 1,3

h6		95,3 ± 3,1		68,5 ± 5,0
h7		97,3 ± 1,4		98,9 ± 0,1
h8		98,0 ± 0,9		99,3 ± 0,2
h9		95,6 ± 0,8		95,7 ± 0,8
h10		89,4 ± 0,1		92,4 ± 1,3
hUN1		94,8 ± 1,8		92,6 ± 4,7
hUN2		93,8 ± 0,8		94,1 ± 0,4
hUN3		95,6 ± 0,4		96,4 ± 0,6

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony, UNA -brązowy) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem zielonym i podświetlone na żółto reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, kolorem różowym częściową dyskryminację hydrolizy w niepożądanym kierunku.



Rysunek 56. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia wariantów RNA 53 w dupleksach z gapmerami h9-hUN3 (T1-trawienie RNA rybonukleazą T1, F- hydroliza alkaliczna RNA, K- kontrola, hKW-h8 - testowane oligonukleotydy antysensowe)



Rysunek 57. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia wariantów RNA 53 w dupleksach z gapmerami h9-hUN3 (T1-trawienie RNA rybonukleazą T1, F- hydroliza alkaliczna RNA, K- kontrola, h9-hUN3 - testowane oligonukleotydy antysensowe)

Parametry termodynamiczne duplesów obydwu wariantów RNA z wybranymi oligonukleotydami, nie wykazały dużych różnic w ich stabilności termodynamicznej (Tabela 27). Dupleksy wariantów RNA 53 z najlepiej działającym w teście RNazy H gapmerem h2 różniły się trwałością zaledwie o 1,45 kcal/mol. Z kolei dużo słabiej różnicujący gapmer h6 powodował różnicę w trwałości wynoszącą 3,93 kcal/mol. Różnica 3 kcal/mol była obserwowana w przypadku gapmeru hKW wnoszącego niesparowanie rA-dC do duplesu z mutantem RNA 53A, natomiast nie wpływała ona na wydajność hydrolizy. Uzyskane dane ponownie świadczą o braku korelacji między poziomem hydrolizy duplesu a jego trwałością termodynamiczną, dopóki dany dupleks tworzy się w warunkach reakcji.

Tabela 27. Zestawienie kluczowych parametrów termodynamicznych duplesów RNA 53 z wybranymi gapmerami.

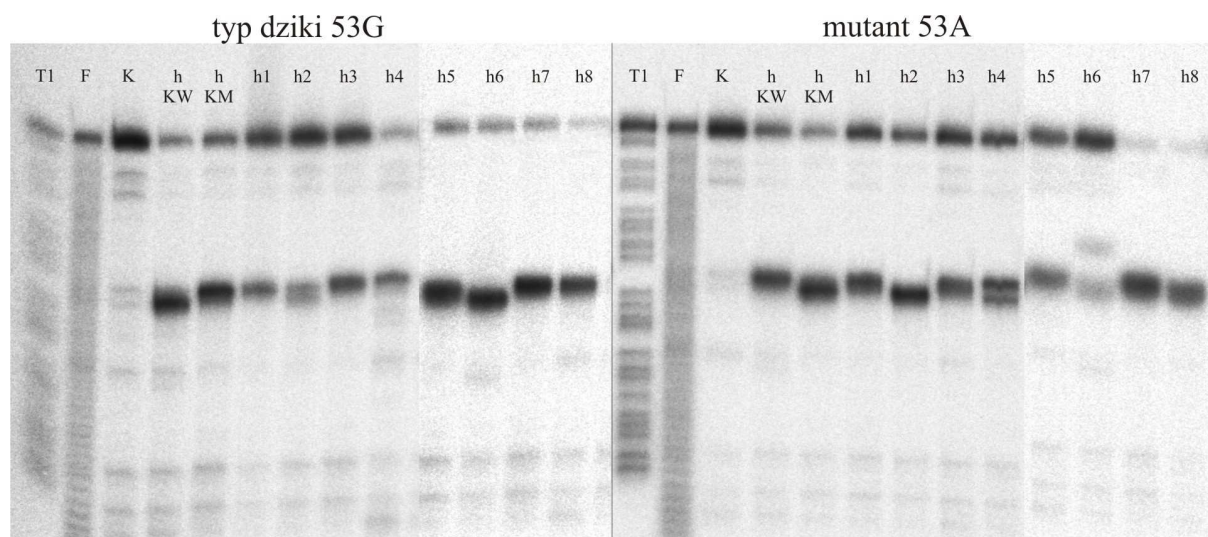
Typ dziki 53G			Mutant 53A		
ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)
hKW	18,37 ± 0,31	79,0	hKW	15,36 ± 0,14	66,0
hKM	16,29 ± 0,09	72,9	hKM	18,99 ± 0,34	73,8
h2	10,97 ± 0,08	54,3	h2	12,41 ± 0,20	56,3
h6	13,46 ± 0,22	62,6	h6	9,53 ± 0,07	49,4

Kolorem zielonym oznaczono oligonukleotydy, które w duplesach dobrze różnicowały poziom hydrolizy selektywnie względem mutantu RNA, kolorem różowym oligonukleotydy, które wykazywały niewielką selektywność hydrolizy względem typu dzikiego RNA (niepożądane). Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica termodynamiczna ($\Delta \Delta G_{37}^{\circ}$) w duplesach z typem dzikim i z mutantem RNA.

Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 40, a – temperatura topnienia duplesu w stężeniu $10^{-4}M$

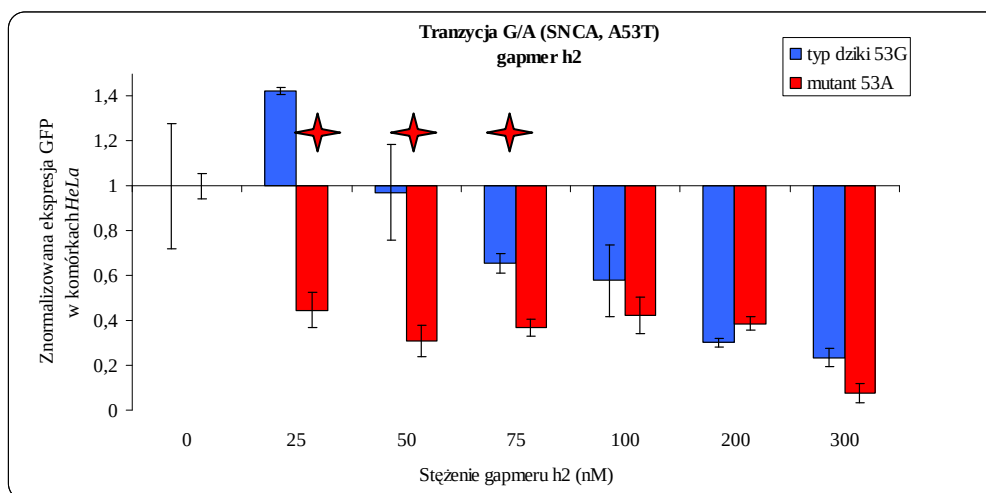
Test RNazy H z wybranymi oligonukleotydami, względem 99-nukleotydowych substratów RNA 53, potwierdził obserwacje uzyskane w reakcji z krótszymi RNA. Jedyne

różnice w wydajności trawienia RNA 53 występowały, gdy zastosowano gapmer h2 (wariant zmutowany był hydrolizowany o 48% silniej niż wariant dziki) oraz h6 (wariant dziki był hydrolizowany o 60% silniej niż wariant zmutowany (Rysunek 58; Załączniki, Tabela 45). Oligonukleotydy te wybrano do badań w komórkach *HeLa*.



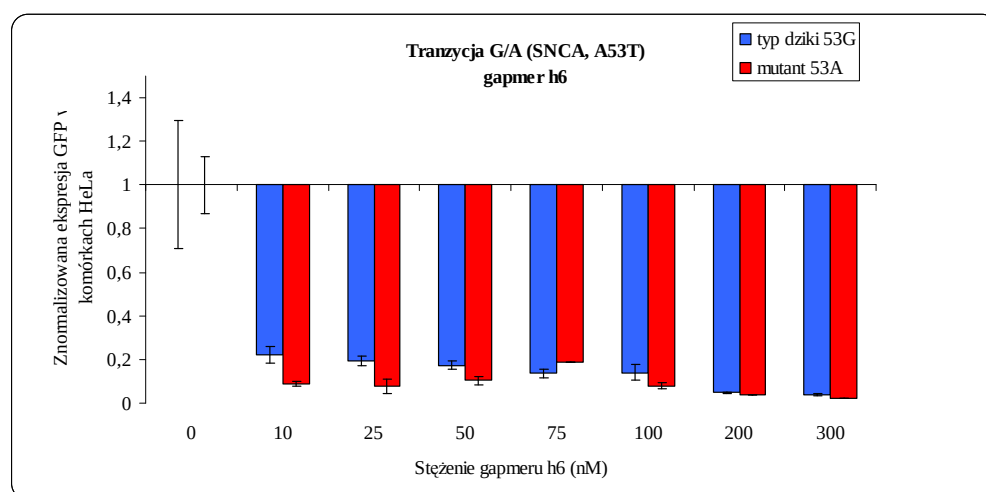
Rysunek 58. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 99-nukleotydowych wariantów RNA z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami (hKW-h8).

Gapmer h2 dawał obiecujące, bardzo wyraźne zróżnicowanie poziomu ekspresji wariantów RNA 53 w niższych stężeniach badanego zakresu. W stężeniu 25 nM uzyskano najsilniejszy efekt selektywności wynoszący 98%. Obserwowano w tym przypadku stymulację ekspresji wariantu dzikiego RNA 53G o około 42% przy jednoczesnym obniżeniu poziomu RNA zmutowanego 53A o około 56%. W stężeniu 50 nM różnica w poziomie ekspresji wynosiła 66%, natomiast w stężeniu 75 nM już tylko 29%. Średnie poziomy ekspresji w powyższych przypadkach różniły się istotnie. W całym badanym zakresie stężeń obserwowano ujemną korelację poziomu ekspresji ze stężeniem gapmeru dla obydwu wariantów RNA 53 (Wykres 72).



Wykres 72. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru h2. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Rezultaty transfekcji gapmerem h6 nie wykazały działania selektywnie obniżającego ekspresję wariantu dzikiego RNA 53G, czego spodziewano się na podstawie wyników uzyskanych w trawieniach *in vitro*. Oligonukleotyd ten już od najniższych stosowanych stężeń bardzo silnie hamował ekspresję obydwu wariantów RNA (Wykres 73).



Wykres 73. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru h6. Uzyskane różnice w ekspresji okazały się nieistotne statystycznie.

Podsumowując efekty działania oligonukleotydów skierowanych przeciw wariantom sekwencji RNA 53 z tranzycją G/A, udało się uzyskać jeden oligonukleotyd (h2), selektywnie promujący ekspresję formy dzikiej RNA 53G, co potwierdzono w linii komórkowej *HeLa* dla trzech stężeń. Gapmer ten różnicował ekspresję w oparciu o 2 niesparowania rA-dA, wnoszone w rejon hydrolizy RNA w obrębie dupleksu. Najbardziej jednak zaskakuje fakt, że

efektu nie udało się powtórzyć, gdy niesparowania zastąpiono destabilizującymi parami rA-T^U, co obserwowano w innych przypadkach.

Tabela 28. Porównanie parametrów IC₅₀ wybranych gapmerów względem wariantów RNA 53. Wartości podświetlone na zielono prezentują silną dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 53A.

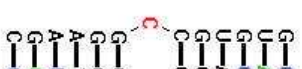
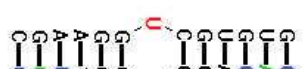
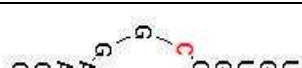
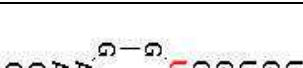
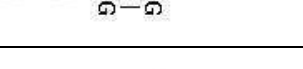
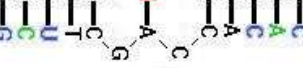
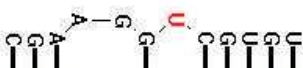
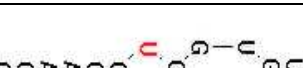
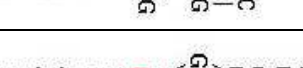
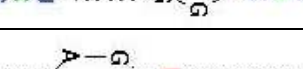
ASO	IC ₅₀ (nM)	
	RNA dziki 53G	RNA mutant 53A
hKM	n/a	28,1
h2	99,0	22,7
h6	<10	<10

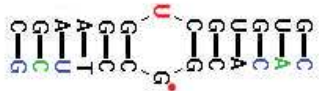
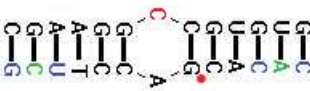
3.3 Tranzycja C/T (SOD1 A4V)

W celu zróżnicowania substytucji C/U na poziomie RNA zsyntetyzowano 30 gapmerów, o długości 13-20 nukleotydów, testujących różne typy oraz konfiguracje niesparowań. Niestety w przypadku analizowanej sekwencji RNA 4, żaden z badanych gapmerów nie wykazywał istotnej selektywności hydrolizy *in vitro* względem wariantu zmutowanego. W przypadku wprowadzenia, najskuteczniej jak dotychczas działającej konfiguracji podwójnego niesparowania przy 5' końcu gapu⁵, w wersji komplementarnej do wariantu dzikiego obserwowano duży spadek poziomu hydrolizy, jednak zbliżony dla obydwu wariantów RNA 4 (gapmer a13). Obecność trzeciego niesparowania rU-dG stymulowała poziom hydrolizy, dając niewielkie około 15% zróżnicowanie hydrolizy we właściwym kierunku, promowanej w duplesie z formą zmutowaną 4U. Z kolei gdy we wspomnianym układzie pojawiła się sekwencja komplementarna do formy zmutowanej RNA 4U (gapmer a16), obserwowano około 2-krotnie silniejszą hydrolizę typu dzikiego RNA 4C, posiadającego dodatkowe, trzecie niesparowanie rC-dA w miejscu występowania SNP. Rezultat ten jest ciekawy, gdyż dupleks silniej zaburzony strukturalnie był trawiony wydajniej.

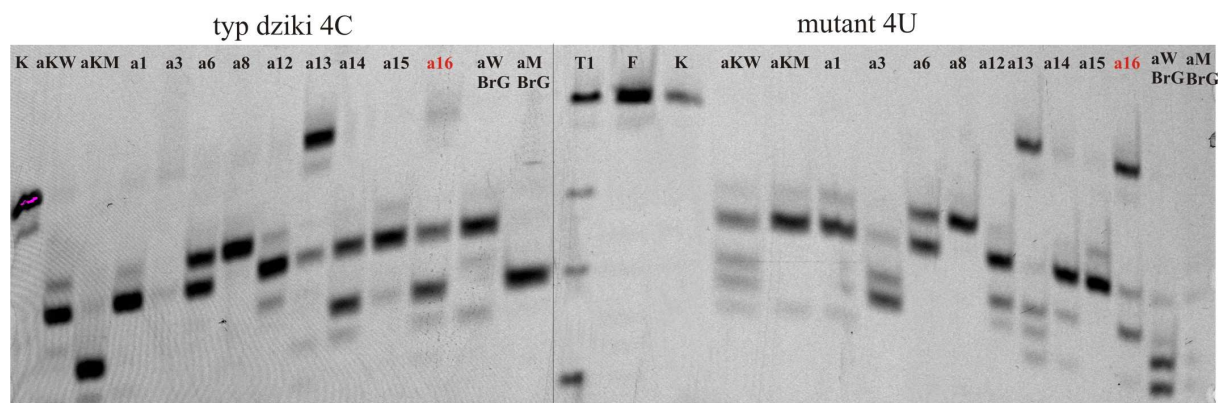
⁵ Typ niesparowania jest przede wszystkim determinowany sekwencją docelową RNA. W tym konkretnym przypadku miał postać rG-dG/rU-dC

Tabela 29. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 46 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym; gapmery aKW-aMBrG.

ASO	Dziki 4C		Mutant 4U	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
aKW		94,6 ± 3,8		79,3 ± 17,0
aKM		96,3 ± 3,3		93,9 ± 7,4
a1		88,3 ± 8,8		88,5 ± 15,1
a3		84,4 ± 16,9		87,6 ± 15,4
a6		91,5 ± 10,5		81,1 ± 14,0
a8		90,4 ± 12,2		82,5 ± 17,3
a12		94,9 ± 4,2		85,5 ± 20,8
a13		32,1 ± 10,5		47,7 ± 5,2
a14		78,1 ± 17,1		42,8 ± 22,7
a15		98,1 ± 0,1		97,5 ± 2,3
a16		88,0 ± 5,4		40,1 ± 13,3

aWBr G		$98,9 \pm 0,3$		$97,4 \pm 1,8$
aMBr G		$98,1 \pm 1,9$		$89,8 \pm 11,7$
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony, czerwona kropka – 8-bromodeoksyguanozyna) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem niebieskim prezentują nieznaczne różnicowanie, a kolorem czerwonym - różnicowanie w niepożądanym kierunku.				

Dla analizowanego typu substitucji C/U przetestowano także wpływ 8-bromodeoksyguanozyny na oddziaływanie w miejscu SNP, oraz w kanonicznej parze rC-8Br-dG w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca SNP. Niestety, nie zaobserwowano żadnej zmiany w wydajności trawienia wariantów RNA 4 wskutek obecności 8-bromodeoksyguanozyny w komplementarnym do RNA oligonukleotydzie (Tabela 29, Rysunek 59).



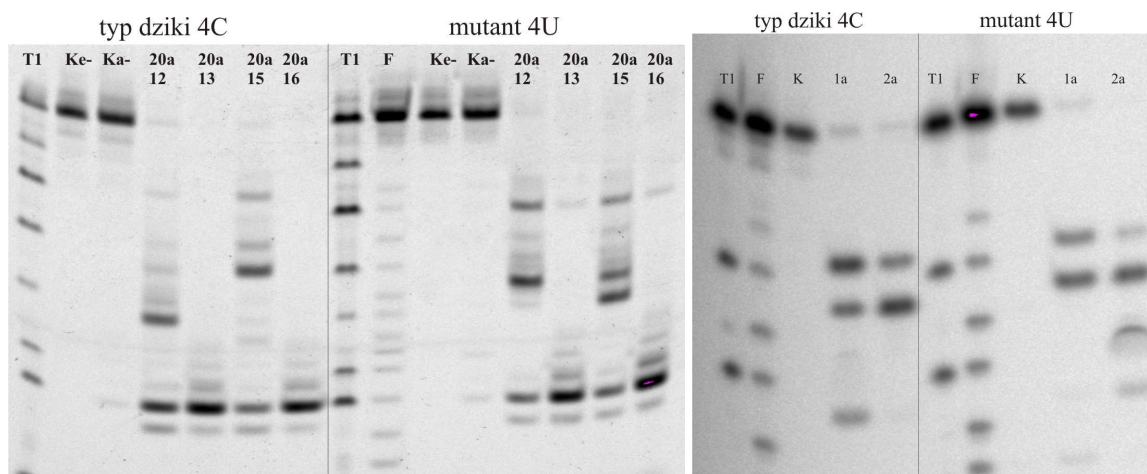
Rysunek 59. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy wariantów RNA 4, z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami (aKW-aM8BrG).

Wydłużenie oligonukleotydów a12, a13, a15 i a16 do sekwencji 20-nukleotydowych, z zachowaniem wprowadzanych niesparowań w ich pierwotnych pozycjach, również nie przyniosło efektu różnicującego. Hydroliza RNA 4 przebiegała bardzo wydajnie dla obydwu wariantów, także w obecności jednonukleotydowych wybrzuszeń i niesymetrycznej pętli, wprowadzonych do dupleksu przez gapmery o jeden nukleotyd krótsze (gapmer 1a) lub dłuższe (gapmer 2a) od docelowego RNA (Tabela 30, Rysunek 60).

Tabela 30. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 4 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym; 20-nukleotydowe gapmery 20a12-20a16, gapmery 1a-2a, wnoszące do dupleksów wyrzuszenia jednostronne.

ASO	Dziki 4C		Mutant 4U	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
20a12		98,3		98,3
20a13		99,2		99,2
20a15		98,5		99,3
20a16		99,6		99,9
1a		96,3		97
2a		98,3		99,3

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0.



Rysunek 60. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy wariantów RNA 4, z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami; rysunek lewy – gapmery 20-nukleotydowe, rysunek prawy – gapmery wnoszące jednostronne wyrzuszenia.

Porównanie parametrów termodynamicznych analizowanych dupleksów (Tabela 31) wykazało największą różnicę w stabilności dupleksów tworzonych przez warianty RNA 4 z gapmerami aMBrG (4,94 kcal/mol) i a14 (3,43 kcal/mol). Różnice te jednak nie przekładały się bezpośrednio na selektywność hydrolizy względem stabilniejszego z dupleksów. Dla

gapmeru a14 zaobserwowano działanie przeciwne, mianowicie indukował on silniejsze trawienia w duplesie mniej stabilnym termodynamicznie. Obecność 8-bromodeoksyguanozyny w obydwu przypadkach gapmerów, znacząco wzmocniła trwałość dupleksów z każdym z wariantów RNA 4. Gapmer aW8BrG posiadający 8-bromodeoksyguanozynę w miejscu komplementarnym do SNP, tworzył dupleks słabszy termodynamicznie o około 1 kcal/mol zawierając parę rC-^{8Br}dG z wariantem dzikim RNA 4C, niż parę rU-^{8Br}dG z wariantem zmutowanym 4U. Z kolei przesunięcie 8-bromodeoksyguanozyny w bezpośrednie sąsiedztwo SNP, by tworzyła parę rC-^{8Br}dG obok niesparowania rC-dA (typ dziki RNA) lub kanonicznej pary rA-dT (wariant zmutowany 4U), pozwoliło na silniejszą dyskryminację termodynamiczną duplesu z typem dzikim RNA (+4,94 kcal/mol względem + 2,62 kcal/mol gdy z miejscem SNP sąsiadowała tradycyjna para rC-dG, Tabela 31). Niestety jednak te bardzo obiecujące zależności termodynamiczne nie przełożyły się na różnicowanie poziomu hydrolizy w obecności rybonukleazy H.

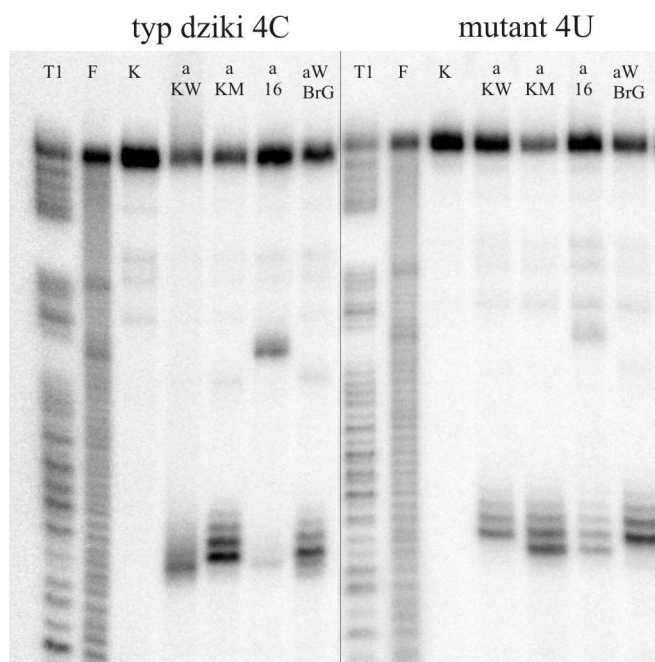
Tabela 31. Zestawienie kluczowych parametrów termodynamicznych dupleksów RNA 4 z wybranymi gapmerami.

Typ dziki 4C			Mutant 4U		
ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)
aKW	14,47 ± 0,10	73,0	aKW	13,46 ± 0,12	61,9
aKM	17,62 ± 0,34	71,2	aKM	20,24 ± 0,15	78,7
a13	15,14 ± 0,18	70,5	a13	12,71 ± 0,13	60,0
a14	13,21 ± 0,18	64,4	a14	16,64 ± 0,18	68,9
a16	12,53 ± 0,15	62,8	a16	14,01 ± 0,14	63,8
aWBrG	20,60 ± 0,42	79,7	aWBrG	21,66 ± 0,39	72,0
aMBrG	16,82 ± 0,10	68,7	aMBrG	21,76 ± 0,28	76,1

Kolorem czerwonym oznaczono oligonukleotydy, które w duplesach z RNA selektywnie indukowały hydrolizę typu dzikiego RNA (niepożądane). Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica termodynamiczna ($\Delta \Delta G_{37}^{\circ}$) w duplesach z typem dzikim i z mutantem RNA.

Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 38; a – temperatura topnienia duplesu w stężeniu 10⁻⁴M

Sprawdzono także działanie wybranych oligonukleotydów względem 99-nukleotydowych cząsteczek RNA 4. Eksperyment potwierdził brak selektywności, obserwowany także dla krótszych substratów (Rysunek 61).

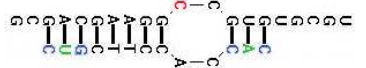
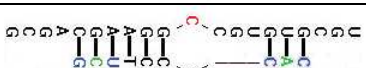
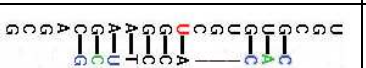
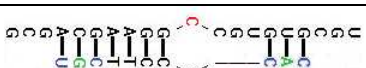
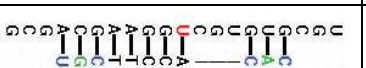
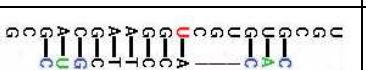
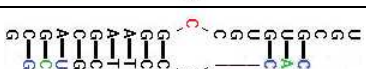
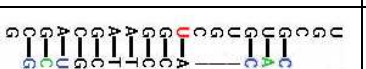
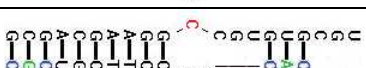
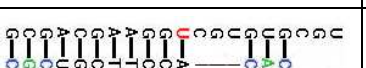
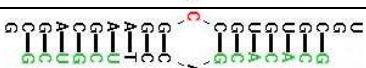
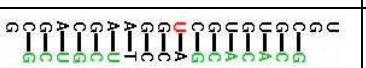
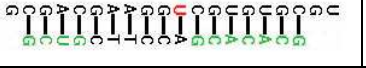
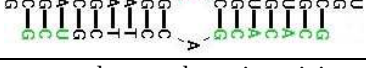
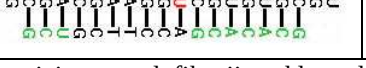


Rysunek 61. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy 99-nukleotydowych wariantów RNA 4, z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami.

Ostatnią grupą oligonukleotydów testowanych dla tranzycji C/T były gapmery zawierające SNP przy 5' końcu gapu DNA w obrębie duplesu, w sąsiedztwie dodatkowych niesparowań rG-dG lub rC-dC, a także gapmery zawierające w tejże pozycji alkilowy łącznik SP18 i posiadające zmienną długość gapu względem sekwencji okalającej od 3' końca gapmeru.

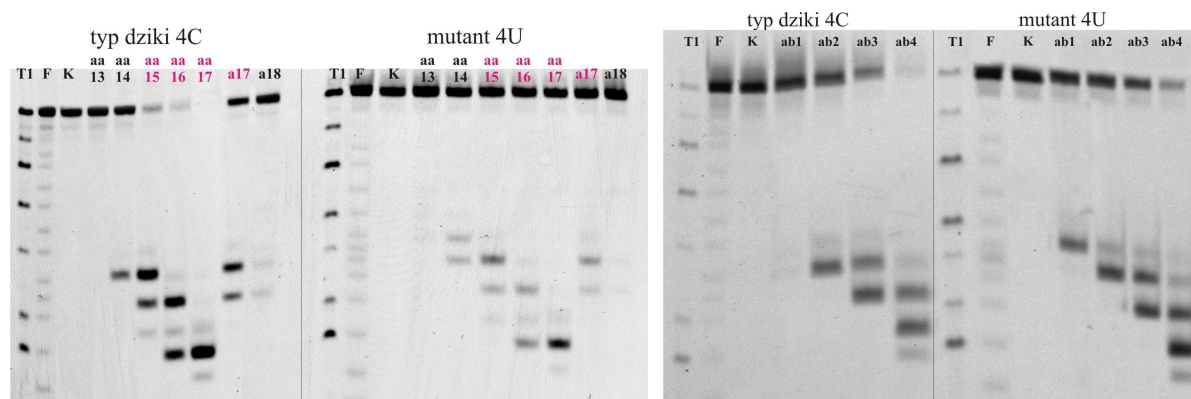
Wykazano, że obecność w duplesie pojedynczego niesparowania rC-dC przy 5' końcu gapu DNA duplesu silnie ograniczała wydajność hydrolizy (mutant RNA 4U-gapmer a17). W sytuacji współwystępowania w jej sąsiedztwie drugiego niesparowania rC-dA, inhibicja hydrolizy była o 30% mniejsza (dziki RNA 4C-a17). Niestety różnicowało to hydrolizę w niewłaściwym kierunku (bardziej wydajnie trawiona była forma dzika RNA, Tabela 32, Rysunek 62). Silną inhibicję obydwu wariantów powodowała także obecność pojedynczego niesparowania rG-dG, przesuniętego w środek duplesu (mutant RNA 4U-gapmer a18). Pojawienie się w jego sąsiedztwie drugiego niesparowania rC-dA łagodziło efekt inhibicji powodując 3-krotnie wydajniejsze trawienie formy dzikiej RNA 4C niż zmutowanej 4U.

Tabela 32. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 4 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery a17-ab4.

ASO	Dziki 4C		Mutant 4U	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
a17		54,7 ± 3,0		19,8 ± 3,8
a18		15,3 ± 3,0		5,1 ± 0,4
aa13		0		1,4 ± 2,0
aa14		23,7 ± 1,0		18,7 ± 1,7
aa15		83,6 ± 0,3		31,9 ± 0,2
aa16		90,7 ± 1,1		31,9 ± 3,8
aa17		96,7 ± 1,8		38,2 ± 2,1
ab1		0		19,0 ± 0,3
ab2		39,8 ± 1,9		37,5 ± 3,0
ab3		71,1 ± 3,4		63,0 ± 1,3
ab4		94,5 ± 1,1		89,3 ± 0,1
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości oznaczone kolorem różowym prezentują różnicowanie w niepożądanym kierunku.				

W obecności alkilowego łącznika SP18, wraz z wydłużaniem gapu wzrastała selektywność hydrolizy względem cząsteczki dzikiej RNA. Oligonukleotyd posiadający gap o długości 6 nukleotydów (aa15), z czego pierwszy nukleotyd od jego 5' końca był uwikłany w interakcję z miejscem SNP i w zależności od wariantu RNA tworzył kanoniczną parę rU-dA (mutant 4U) lub niesparowanie rC-dA (dziki 4C), różnicował poziom trawienia o około 52%. Promował on jednak hydrolizę formy dzikiej, działając w niepożądanym kierunku. Jak widać, obecność niekanonicznej pary rC-dA w tym konkretnym miejscu, w sąsiedztwie łącznika SP18, kształtowała dupleks bardziej podatny na hydrolizę, niż kanoniczna para rU-dA (Tabela 32, Rysunek 62). W sytuacji gdy oligonukleotyd zawierał jedynie zmienną długość gapu, bez obecności łącznika SP18, obserwowano dużo niższą różnicę w wydajności

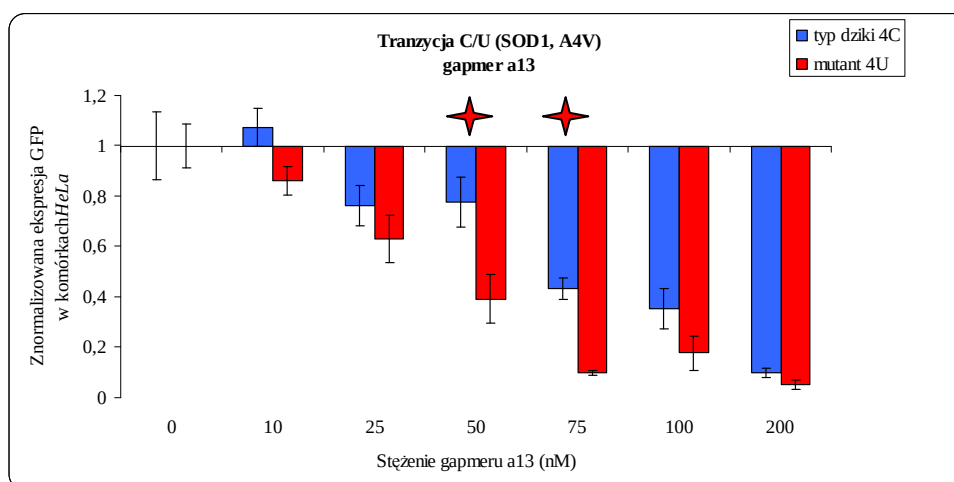
trawienia. Poziom hydrolizy zwiększał się w miarę wzrostu długości gapu, lecz równomiernie w przypadku obu wariantów RNA. Obserwowano niewielką 2-8% selektywność hydrolizy względem wariantu dzikiego RNA 4C.



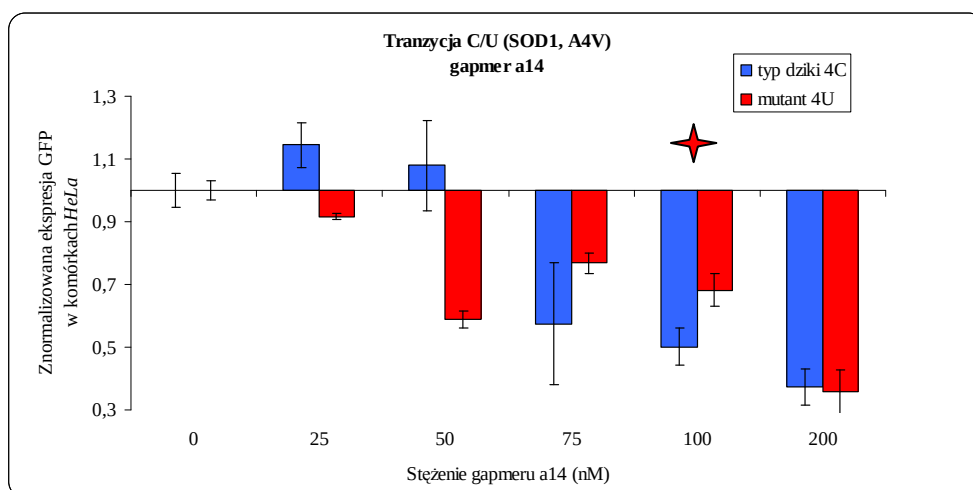
Rysunek 62. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy wariantów RNA 4, z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami (aa13-aa18 – gapmery zawierające łącznik SP18).

Do transfekcji komórek *HeLa* wybrano oligonukleotydy wykazujące każdy potencjał obniżania poziomu hydrolizy, jako że nie wyłoniono gapmerów istotnie selekcjonujących trawienie względem formy zmutowanej RNA 4U.

Gapmer a13 wykazał całkiem zadowalający rezultat, powodując silniejsze wyciszenie formy zmutowanej RNA 4U w stosunku do formy dzikiej RNA 4C, w stężeniach 50 nM i 75 nM. Różnice te były istotne statystycznie i wynosiły odpowiednio 38% i 33%. W całym badanym zakresie stężeń obserwowano ujemną korelację poziomu ekspresji i stężenia oligonukleotydu antysensownego dla obydwu wariantów RNA 4 (Wykres 74). Rezultaty uzyskane na podstawie transfekcji świadczyły o większej zdolności selekcyjnej gapmeru a13 niż sugerowały to wyniki uzyskane w trawieniach *in vitro*.



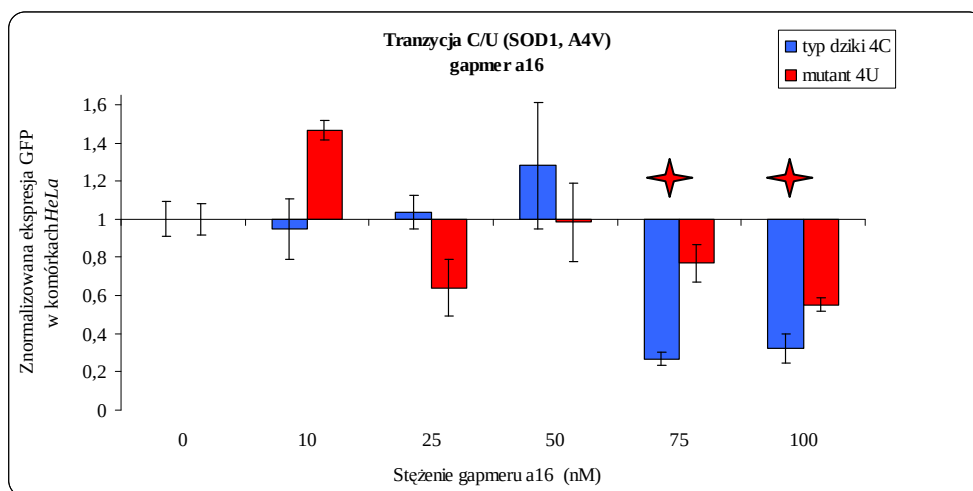
Wykres 74. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru a13. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.



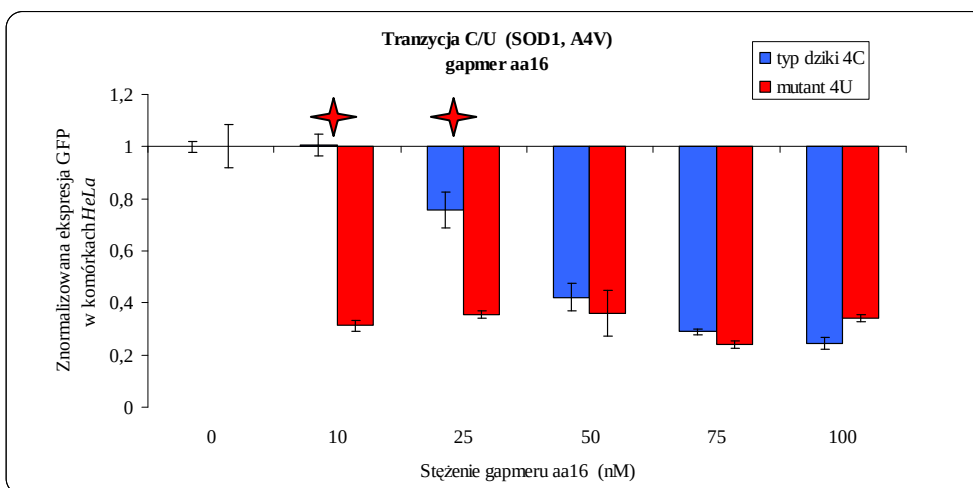
Wykres 75. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru a14. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

W przypadku gapmeru a14, który *in vitro* promował hydrolizę wariantu dzikiego RNA 4C, transfekcja z udziałem niższych stężeń badanego zakresu skutkowała rezultatem odwrotnym. W miarę wzrostu stężenia tendencja ta zmieniała się, potwierdzając efekt obserwowany podczas trawień *in vitro*, w stężeniu 75 nM i 100 nM. Analiza wariancji wykazała że istotna statystycznie była jedynie różnica w ekspresji uzyskana w stężeniu 100 nM i wynosząca zaledwie 18%. W badanym zakresie stężeń obserwowano korelację poziomu ekspresji i stężenia gapmeru, co odpira argument przypadkowego działania oligonukleotydu (Wykres 75).

Oligonukleotyd a16 w komórkach *HeLa* potwierdził swoje działanie prezentowane *in vitro*, dopiero jednak w stężeniu 75 nM i 100 nM. Powodował on silniejsze wyciszenie wariantu dzikiego RNA 4C w stosunku do mutantu 4U odpowiednio o około 50% i 23%. Obydwie różnice były istotne statystycznie na poziomie $\alpha=0,05$. Dla niższych stężeń nie obserwowano spójnej zależności poziomu ekspresji od stężenia gapmeru (Wykres 76).



Wykres 76. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru a16. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

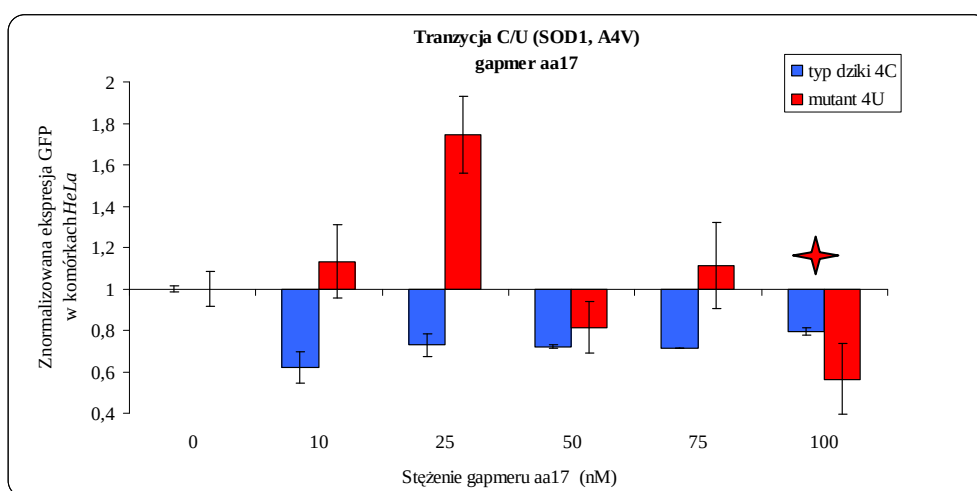


Wykres 77. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru aa16. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Odmienne od warunków *in vitro* selektywność prezentował w komórkach *HeLa* gapmer aa16, zawierający alkilowy łącznik SP18 w połączeniu z 7 nukleotydowym gapem. Pierwszy nukleotyd gapu, w bezpośrednim sąsiedztwie łącznika SP18, oddziaływał z miejscem SNP. W przypadku dupletu z formą dziką w pozycji tej występowało niesparowanie rC-dA; w duplekcie z formą zmutowaną 4U pozycję tę zajmowała kanoniczna para rU-dA. Na podstawie rezultatów transfekcji okazało się, że w niskich stężeniach gapmer ten selektywnie wycisza formę zmutowaną, dając zróżnicowanie na poziomie 69% w stężeniu 10 nM i 40% w stężeniu 25 nM. W miarę wzrostu stężenia różnica ta zaciera się (Wykres 77). Ciekawą obserwacją jest, że w przypadku mutantu RNA 4U, poziom ekspresji jest praktycznie niezależny od stężenia gapmeru (o około 70% niższy w stosunku do kontroli).

Dla RNA typu dzikiego 4C zauważalna jest ujemna korelacja poziomu ekspresji i stężenia aa16.

Stosując gapmer aa17, w komórkach *HeLa* obserwowano w miarę stały poziom ekspresji RNA typu dzikiego, niezależny od stężenia oligonukleotydu, zredukowany o około 30% w stosunku do kontroli. Z kolei poziom ekspresji wariantu zmutowanego RNA nie wykazywał zależności od zastosowanego stężenia oligonukleotydu antysensowego aa17. Istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji wariantów RNA 4 uzyskano w stężeniu 100 nM i wynosiła ona 24%.



Wykres 78. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru aa17. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Obserwacje uzyskane na podstawie transfekcji komórek *HeLa* wariantami sekwencji RNA 4 i poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi pokazują, że wbrew результатам uzyskanym *in vitro*, analizując ich działanie w całym badanym zakresie stężeń udało się wyłonić 3 gapmery wykazujące selektywne wyciszenie formy zmutowanej RNA 4U. Największą różnicę uzyskano z zastosowaniem najprostszego z możliwych układów, gapmeru komplementarnego do formy zmutowanej. Jego wartość IC_{50} względem formy zmutowanej była 2,7-krotnie niższa niż względem formy dzikiej. Nieco gorzej działał gapmer a13, dla którego stężenie IC_{50} względem mutantu było 2,2-krotnie niższe niż względem formy dzikiej. Odmienne niż w warunkach *in vitro*, jednak nie mniej selektywne działanie wykazał oligonukleotyd aa16.

Tabela 33. Porównanie parametrów IC_{50} wybranych gapmerów względem wariantów RNA 4. Wartości podświetlone na zielono prezentują silną dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 4U.

ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 4C	RNA mutant 4U
aKM	77,7	28,8
a13	59,2	26,5
a14	66,0	74,0
a16	n/a	n/a
aa16	28,0	<10
aa17	n/a	91,7

3.4 Tranzycja A/G (APP E693G)

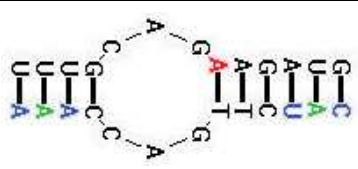
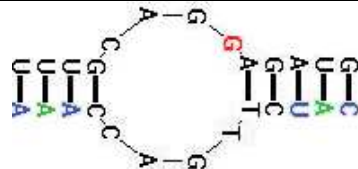
Dla różnicowania hydrolizy sekwencji RNA 693, zawierającej tranzycję A/G zsyntetyzowano 5 gapmerów, zaprojektowanych tak, by ukierunkować występowanie niesparowań na regiony sprawdzone na podstawie wcześniejszych przykładów, tj. głównie przy 5' końcu a także przy 3' końcu gapu DNA. Ponadto, jako że substytucja A/G występuje w bliskim sąsiedztwie wcześniej analizowanej transwersji C/G, postanowiono wykorzystać do badań ten sam kontekst 13-nukleotydowy, co pozwoliło także przetestować część oligonukleotydów z serii b.

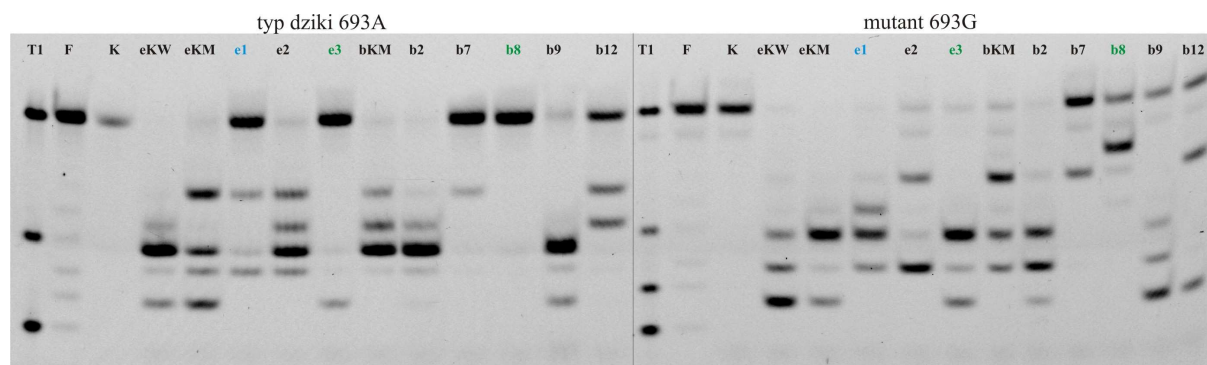
Ostatecznie spośród 11 oligonukleotydów przeanalizowanych w dupleksach z sekwencją RNA 693, wytypowano 2 gapmery wykazujące znaczną selektywność hydrolizy względem formy zmutowanej RNA 693G w warunkach *in vitro* (e3, b8) i jeden oligonukleotyd różnicujący w tym kierunku nieco słabiej (e1, Tabela 34). Jak się okazało, ponownie najlepsze efekty dało umiejscowienie podwójnego niesparowania (rA-dA/rG-dG) przy 5' końcu gapu DNA w obrębie dupleksu (Tabela 34, Rysunek 63). Obecność trzeciego niesparowania rA-dC w przypadku dupleksu formy dzikiej RNA 693A-e3, skutkowałą dyskryminacją hydrolizy na poziomie 73%. Porównywalny ilościowo rezultat dał oligonukleotyd b8, który wносił układ trzech niesparowań do dupleksu z formą dziką i czterech niesparowań do dupleksu z formą zmutowaną. Mimo, jak się wydaje, większej destabilizacji struktury tym układem w przypadku wariantu zmutowanego RNA, uzyskano dla niego wydajniejsze trawienie z udziałem rybonukleazy H. Co ciekawe, jako czwarte niesparowanie występuje tu rG-dT, które bardziej sprzyja ogólnej konformacji dupleksu będącego substratem dla RNAzy H, niż kanoniczna para rA-dT. Zaobserwowano również,

że podwójne niesparowanie występujące przy 3' końcu gapu DNA dupleksu ma potencjał ukierunkowujący hydrolizę na wariant zmutowany RNA 693G (oligonukleotyd e1). W tym przypadku trzecie niesparowanie rA-dC dyskryminuje trawienie wariantu dzikiego RNA 693A jedynie o połowę.

Tabela 34. Zestawienie rezultatów trawień wariantów RNA 46 z udziałem rybonukleazy H *in vitro* w zależności od planowanej struktury dupleksu z oligonukleotydem antysensowym, gapmery eKW-b12.

ASO	Dziki 4C		Mutant 4U	
	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)	Sekwencja/Struktura	Wydajność hydrolizy (%)
eKW		98,8 ± 0,7		97,1 ± 1,2
eKM		96,9 ± 1,7		97,7 ± 2,3
e1		41,1 ± 12,6		97,6 ± 1,4
e2		93,9 ± 4,7		92,2 ± 1,0
e3		21,6 ± 10,7		94,4 ± 3,4
bKM		96,5 ± 0,9		92,8 ± 4,4
b2		98,5 ± 0,3		97,0 ± 8,0
b7		7,9 ± 2,4		31,2 ± 3,1
b8		3,5 ± 1,5		72,1 ± 4,6
b9		90,3 ± 1,9		72,3 ± 7,7

b12		$50,3 \pm 4,6$		$66,8 \pm 3,6$
Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensownych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury teoretyczne, wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości podświetlone na żółto i oznaczone kolorem zielonym reprezentują silną dyskryminację hydrolizy wariantu dzikiego RNA, kolorem niebieskim częściową jego dyskryminację.				



Rysunek 63. Rozdział elektroforetyczny produktów hydrolizy wariantów RNA 693, z udziałem RNazy H, w dupleksach z wybranymi gapmerami (eKW-b12).

Analiza parametrów termodynamicznych dupleksów z wybranymi oligonukleotydami antysensownymi wykazała znaczące różnice w trwałości termodynamicznej dla trzech z czterech analizowanych par dupleksów. W przypadku dobrze różnicujących poziom hydrolizy gapmerów e1 i e3, dane termodynamiczne sugerują, że nie dochodzi do tworzenia się ich dupleksów z formą dziką RNA 693A z racji zbyt niskiej temperatury topnienia duplesu (poniżej 37°C). Z kolei dla dupleksów wariantów RNA 693 z gapmerem komplementarnym do mutantu, obserwowano silny efekt destabilizujący niesparowania rA-dC (+5,31 kcal/mol), co nie miało wpływu na poziom hydrolizy duplesu obciążonego tą destabilizacją (Tabela 35).

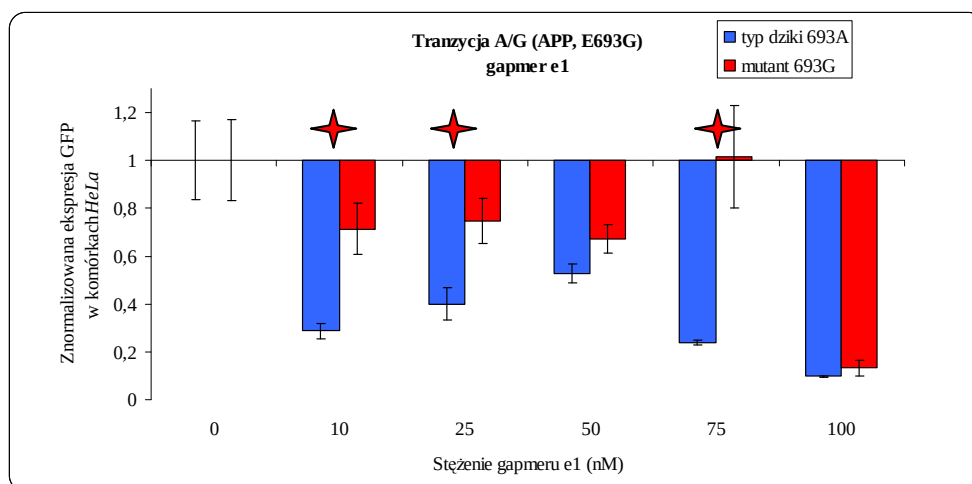
Tabela 35. Zestawienie kluczowych parametrów termodynamicznych dupleksów RNA 693 z wybranymi gapmerami.

Typ dziki 693A			Mutant 693G		
ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a	ASO	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal/mol)	T_M (°C) ^a
eKW	16,35 ± 0,39	65,8	eKW	15,15 ± 0,11	64,2
eKM	11,69 ± 0,15	57,3	eKM	17,00 ± 0,48	73,2
e1	6,26 ± 0,05	35,7	e1	10,80 ± 0,09	57,3
e3	6,35 ± 0,05	36,2	e3	9,57 ± 0,07	49,0

Kolorem zielonym oznaczono oligonukleotydy, które w dupleksach dobrze różnicowały poziom hydrolizy selektywnie względem mutantu RNA, kolorem niebieskim oligonukleotydy które różnicowały hydrolizę w mniejszym stopniu. Komórki tabeli podświetlone na szaro wskazują oligonukleotydy, dla których występuje znacząca różnica termodynamiczna ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) w dupleksach z typem dzikim i z mutantem RNA.

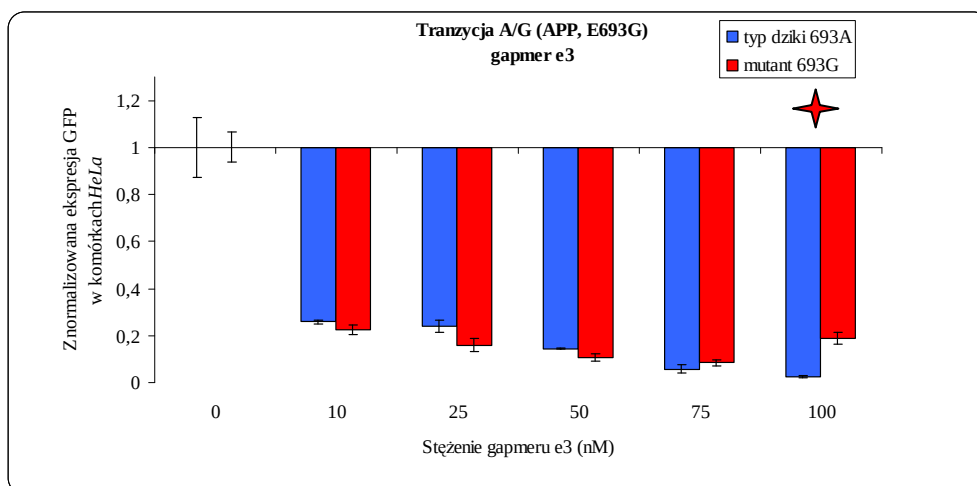
Pełne zestawienie uzyskanych danych termodynamicznych w rozdziale Załączniki, Tabela 42, a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu $10^{-4}M$

Transfekcja komórek *HeLa* gapmerem e1 przyniosła efekt zupełnie odwrotny do prezentowanego podczas trawień *in vitro*. Obserwowano silniejsze wyciszenie formy dzikiej RNA 693A w całym analizowanym zakresie stężeń, istotne statystycznie w trzech stężeniach 10 nM, 25 nM i 75 nM (Wykres 79). Różnice w poziomie ekspresji, tym razem na korzyść wariantu zmutowanego, wynosiły 44%, 34% i 78%. Kierunek dyskryminacji ekspresji potwierdzał się w większości badanych stężeń zakresu.



Wykres 79. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru e1. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Z kolei dobrze rokujący *in vitro* gapmer e3 nie wykazywał w komórkach *HeLa* żadnych preferencji względem wariantów RNA 693, wyciszając je bardzo silnie w równym stopniu już od najniższego stężenia 10 nM.



Rysunek 64. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru e3. Stężenia, w których obserwowano statystycznie istotną ($\alpha=0,05$) różnicę w ekspresji obu form RNA zostały oznaczone gwiazdką.

Włączając do analiz gapmer eKM, dla którego rezultaty opisano przy koncepcji tandemowych oligonukleotydów (rozdział 2.6), okazuje się, że w komórkach działał on najefektywniej. Porównanie efektów trzech analizowanych w komórkach *HeLa* oligonukleotydów na podstawie wyznaczonych wartości IC_{50} , względem badanych dla nich zakresów stężeń, ukazuje, że 50% wyciszenie wariantu zmutowanego RNA 693G można uzyskać w stężeniu niespełna 2-krotnie niższym (1,83x) aniżeli 50% wyciszenie wariantu dzikiego 693A (Tabela 36). Dla pozostałych gapmerów dedykowanych różnicowaniu sekwencji RNA 693 nie osiągnięto zadowalających rezultatów w komórkach *HeLa*, sugerowanych przez wyniki trawień *in vitro*.

Tabela 36. Porównanie parametrów IC_{50} wybranych gapmerów względem wariantów RNA 693. Wartości podświetlone na zielono prezentują silną dyskryminację ekspresji wariantu zmutowanego RNA 693A.

ASO	IC_{50} (nM)	
	RNA dziki 693A	RNA mutant 693G
eKM	46,5	25,4
e1	48,0	42,8
e3	<10	<10

3.5 Podsumowanie

Założeniem prezentowanej strategii było różnicowanie poziomu hydrolizy dwóch heterodupleksów RNA/ASO, z udziałem RNazy H, w oparciu o zmiany konformacyjne helisy powodowane obecnością różnych motywów strukturalnych, oraz nukleotydowych i nienukleotydowych modyfikacji sekwencji gapmeru. Ich występowanie związane jest

również z efektem termodynamicznym określającym stabilność dupleksu, którego wpływ także próbowano określić.

Pierwszym i najprostszy testowanym motywem było pojedyncze niesparowanie wynikające z obecności SNP. Ponieważ założeniem była dyskryminacja hydrolizy formy dzikiej RNA, oryginalnie sekwencja gapmeru była komplementarna do wariantu zmutowanego RNA. Jednak gdy w trakcie eksperymentów okazywało się, że dany motyw może być kluczowy w określonym układzie niesparowań, wówczas testowano również sekwencję komplementarną do typu dzikiego. Początkowo pojedyncze niesparowanie umieszczano centralnie w obrębie dupleksu, ponieważ w tej pozycji z reguły powoduje ono największą jego destabilizację [115, 213]. Następnie przeanalizowano jego wpływ w innych miejscach w obrębie dupleksu, porównując jednocześnie znaczenie określonego typu niesparowania. Zbadano także wydajność hydrolizy względem zwiększonej liczby niesparowań i ich miejsca w dupleksie, obecności 8-bromodeoksyguanozyny i alkilowych łączników zastępujących nukleotydy komplementarne do RNA w miejscu potencjalnej hydrolizy.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów *in vitro* uzyskano następujące wnioski:

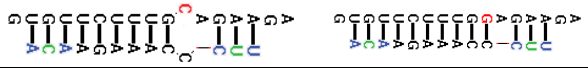
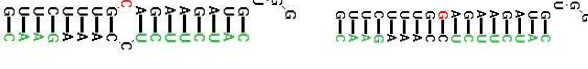
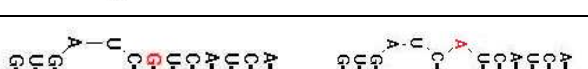
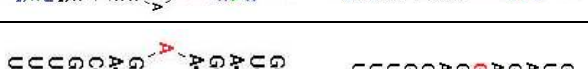
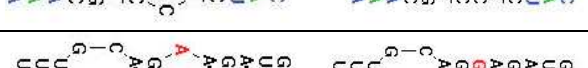
- 1) Wpływ pojedynczego niesparowania zależy w dużej mierze od jego typu i od miejsca zajmowanego w dupleksie.
- 2) Nie obserwowano zależności wydajności hydrolizy dupleksu od jego trwałości termodynamicznej, chyba, że wnoszona niesparowaniami destabilizacja uniemożliwiała utworzenie się dupleksu w 37°C.
- 3) Dla większości analizowanych przypadków, rezultaty testu RNazy H nie potwierdziły, by pojedyncze niesparowanie ułożone centralnie w obrębie dupleksu prowadziło do selektywnej hydrolizy określonego wariantu RNA. Dotyczyło to niesparowań rG-dT, rG-dG, rC-dC, rC-dA i rU-dG. W warunkach *in vitro* uzyskano znaczącą inhibicję hydrolizy względem kontrolnego dupleksu komplementarnego (70%) w 1 przypadku niesparowania rA-dC, w sekwencji RNA 717 (gapmer dKW). W analogicznych 2 przypadkach (RNA 46 i 53) niesparowanie to nie wpływało na wydajność hydrolizy. W kontekście tej samej sekwencji (RNA 717), gdy centralnym niesparowaniem było rA-dG (gapmer d6), także obserwowano inhibicję hydrolizy wariantu zmutowanego na poziomie 70%. Poza dwoma powyżej wspomnianymi przypadkami, nie obserwowano, by pojedyncze

- niesparowanie zaburzał wydajność hydrolizy RNA z udziałem rybonukleazy H. Postuluje się, że wnosi ono zbyt małą, lokalną zmianę konformacji.
- 4) Pojedyncze niesparowanie rC-dC umieszczone przy 5' końcu gapu dupleksu obniżało wydajność hydrolizy w każdym z 20 przypadków takiego umiejscowienia, głównie, gdy było niesparowaniem różnicującym dupleks w przypadku transwersji C/G (w 17 gapmerach na 20).
 - 5) Podwójne niesparowanie umieszczone przy 3' końcu gapu, w jego centrum, oraz przy 5' końcu gapu nie limitowało poziomu hydrolizy. Nie obserwowano także zależności stopnia inhibicji hydrolizy od typu podwójnego niesparowania,
 - 6) Podwójne niesparowanie przy 5' końcu gapu różnicowało poziom hydrolizy wariantów RNA *in vitro* względem pojedynczego niesparowania w tym miejscu w przypadku transwersji C/G (gapmery b13 i b14). Nie obserwowano znaczącej różnicy w trawności termodynamicznej obydwu dupleksów. Lokalna zmiana konformacji dupleksu w obrębie miejsca hydrolizy ograniczała trawienie w obecności dwóch sąsiadujących niesparowań, ale nie w obecności pojedynczego niesparowania.
 - 7) Układ trzech niesparowań, w którym obok centralnego niesparowania w miejscu SNP występowało podwójne niesparowanie przy 5' końcu gapu DNA, różnicował poziom hydrolizy *in vitro* w większości analizowanych przypadków. Rezultat ten wynikał głównie, choć nie zawsze z silnej destabilizacji dupleksu przez trzecie niesparowanie, uniemożliwiające tworzenie się dupleksu w temperaturze 37 °C.
 - 8) Obecność 8-bromodeoksyguanozyny w analizowanych gapmerach polepszała termodynamiczną dyskryminację ich dupleksów z formą dziką RNA, nie wpływała jednak na poziom ich hydrolizy z udziałem RNazy H.
 - 9) Modyfikacje UNA wprowadzone zamiast niesparowań przy 5' końcu gapu DNA dupleksów, w celu poprawy specyficzności sekwencyjnej oligonukleotydów w środowisku komórkowym, bardzo dobrze sprawdziły się w przypadku transwersji C/G w sekwencji RNA 692. Częściową selektywność w efekcie ich obecności obserwowano względem sekwencji RNA 46 z tranzycją G/A, nie działały natomiast w kontekście sekwencji RNA 53 z tranzycją G/A. Gdy nukleotyd UNA wprowadzono w bezpośrednie sąsiedztwo miejsca SNP (koniec 3' gapu DNA) nie zaburzał on wydajności hydrolizy żadnego z wariantów RNA.
 - 10) Obecność alkilowych łączników wykazywała działanie zależne od kontekstu sekwencyjnego i typu różnicującego niesparowania. W przypadku transwersji C/G

Rezultaty uzyskane w warunkach *in vitro* nie zawsze miały potwierdzenie w komórkach *HeLa*. W środowisku komórkowym zdecydowanie nadrzędna rolę dla selektywności miało stężenie testowanego oligonukleotydu. Im było większe, tym niższą selektywność obserwowano, niezależnie od kierunku dyskryminacji. Ponadto, występowanie korelacji stężenia gapmeru i poziomu ekspresji zwiększało wiarygodność obserwowanych efektów, pomagając ocenić rzeczywistą wartość danego oligonukleotydu.

Tabela 37. Zestawienie oligonukleotydów wykazujących selektywne działanie w komórkach *HeLa*

167

G/A	ba24		25 nM 50 nM	62% 48%
	bb2		50 nM 75 nM 100 nM	115% 72% 75%
	bb7		10 nM 25 nM	89% 90%
	bUN1		50 nM	92%
	bUN2		50 nM 75 nM	62% 45%
	d1		50 nM	40%
	dKM		50 nM 75 nM	92% 45%
	d4		50 nM	52%
	h2		25 nM 50 nM	98% 66%
	aKM		50 nM 75 nM	55% 48%
C/T (C/U)	a13		50 nM	38%
	a16		75 nM	50%
	aa16		10 nM 25 nM	69% 40%
A/G	eKM		50 nM	43%
	e1		10 nM	44%

Prezentowane struktury obrazują miejsca SNP (czerwony), miejsca modyfikacji nukleotydów w obrębie antysensowych gapmerów (LNA – niebieski, 2'-O-metylo-RNA – zielony, UNA – brązowy, linia pozioma – alkilowy łącznik SP3 (krótsza) lub SP18 (dłuższa)) oraz schematycznie - niesparowania w obrębie dupleksów. Są to struktury wygenerowane w programie RNAstructure 5.0. Wartości podświetlone na szaro prezentują gapmery o niższym IC₅₀ względem wariantu zmutowanego RNA, a oznaczone kolorem czerwonym - różnicowanie w niepożądanym kierunku.

Weryfikacja działania gapmerów w środowisku komórkowym pozwoliła wyłonić oligonukleotydy o rzeczywistym potencjale dyskryminacji ekspresji wariantu zmutowanego RNA, różniącego się od typu dzikiego pojedynczą substytucją nukleotydową. Najbardziej zadowalające rezultaty uzyskano w przypadku sekwencji RNA 692, stanowiącej fragment genu APP i obarczonej transwersją C/G. Spośród 47 testowanych gapmerów, w badaniach *in vitro* wyłoniono 20, z których 10 wykazało w określonych stężeniach skuteczność w komórkach *HeLa*. Wydaje się, że typ substytucji, determinujący rodzaj niesparowania różnicującego dupleksy wariantów RNA, miał w tym przypadku kluczowe znaczenie.

Dla pozostałych analizowanych SNP uzyskiwano znacznie mniej przykładów pozytywnej selektywności mimo zastosowania tych samych układów testowanych motywów:

- Dla tranzykcji G/A w sekwencji RNA 717, spośród 27 przeanalizowanych oligonukleotydów, w trawieniach *in vitro* wyłoniono dwa, promujące hydrolizę wariantu zmutowanego RNA; w komórkach *HeLa*, w określonym stężeniu skutecznie działały 3.
- Dla tranzykcji G/A w sekwencji RNA 46, spośród 13 przeanalizowanych oligonukleotydów, w trawieniach *in vitro* wyłoniono jeden silnie dyskryminujący hydrolizę wariantu dzikiego RNA gapmer, który okazał się nieskuteczny w komórkach *HeLa*. Pięć innych, które w warunkach *in vitro* wykazywały selektywność na poziomie poniżej 40%, nie testowano w linii komórkowej.
- Dla tranzykcji G/A w sekwencji RNA 53, spośród 17 przeanalizowanych oligonukleotydów, w trawieniach *in vitro* wyłoniono jeden (h2), promujący hydrolizę wariantu zmutowanego, który potwierdził swoje działanie w komórkach *HeLa*. Wyłoniono także gapmer promujący, nieco mniej selektywnie, hydrolizę formy dzikiej (h6), który jednak nie potwierdził tego działania w linii komórkowej *HeLa*.
- Dla tranzykcji C/T (C/U), spośród 30 przeanalizowanych w badaniach *in vitro* wytypowano jeden oligonukleotyd (a13), słabo promujący hydrolizę wariantu zmutowanego (15% różnicy w wydajności hydrolizy), który jednak całkiem selektywnie wyciszał ekspresję mutanta w komórkach *HeLa*. Wytypowano także 6 gapmerów, *in vitro* dyskryminujących wydajność hydrolizy mutanta RNA, z których dwa w komórkach *HeLa*, w określonych stężeniach, jednak promowały jego degradację.

- Dla tranzycji A/G, spośród 11 oligonukleotydów przeanalizowanych w badaniach *in vitro*, wyłoniono 3 wykazujące dyskryminację hydrolizy formy dzikiej RNA, z których w komórkach przetestowano dwa. W przypadku tej sekwencji RNA, żaden z gapmerów nie wykazał jednak pożądanej aktywności w linii komórkowej *HeLa*.

4 Dyskusja i wnioski

Strategia umożliwiająca selektywne wyciszanie patogennych wariantów genów byłaby niezwykle cennym narzędziem w terapii wielu chorób, jednak tylko w przypadku, gdy komórka będzie posiadać możliwość uruchomienia ekspresji z ich prawidłowych alleli. Pozbawienie komórki także prawidłowych form genu może prowadzić do toksyczności wywołanej zaburzeniem określonych szlaków metabolicznych, w które potencjalnie zaangażowany jest produkt danego genu na każdym etapie swojej ekspresji. Stąd tak ważna jest specyficzność działania względem określonych form genu. Niezwykle istotny jest w tym przypadku czynnik różnicujący warianty genu. Na poziomie RNA, dla którego projektowana jest większość rozwiązań z wykorzystaniem mechanizmów antysensowych, czynnikiem tym mogą być bezpośrednio związane z określoną chorobą mutacje punktowe: substytucje oraz jedno- lub wielonukleotydowe insercje i delecje. Poza zmianą kontekstu sekwencyjnego, mogą one wpływać również na strukturę docelowego RNA. W przypadku, gdy zmiana różnicująca allel prawidłowy i zmutowany nie stanowi celu sama w sobie (np. ze względu na zbyt rozległy charakter delecji czy powtórzeń), najczęściej wybiera się SNP korespondujące z występowaniem danej zmiany (obecne w układzie cis i jednakowo segregujące).

Z założenia, bardziej prawdopodobne jest, że wyciszanie ekspresji w oparciu o sekwencję kwasów nukleinowych jest genowo-specyficzne niż allelo-specyficzne. Zdecydowanie łatwiej bowiem odróżnić między sobą całkowicie inne sekwencje od takich samych sekwencji zawierających punktowe zmiany. Opracowanie alleloselektywnej koncepcji wyciszania genów jest dużym wyzwaniem, podejmowanym przez wiele zespołów badawczych na świecie. Z doniesień literaturowych wynika, że najczęstszym celem tej strategii są, jak dotychczas nieuleczalne, dzielące dominujący wzorzec dziedziczenia choroby neurodegeneracyjne powodowane zmienną ilością trójnukleotydowych powtórzeń (ataksje rdzeniowo-mózdkowe różnych typów, choroba Huntingtona), ale także miopatie mięśni

szkieletowych, choroba Alzheimer, Parkinsona czy ALS. Najpowszechniej wykorzystywanym sposobem uzyskania allelospecyficzności jest zjawisko interferencji RNA.

Białko Argonaute, rekrutowane do kompleksu RISC w obecności dwuniciowego RNA w komórce, potrzebuje do swojej aktywności hydrolitycznej pełnej komplementarności dupleksów stanowiących substrat, zwłaszcza w pozycji centralnej, w której następuje hydroliza, a także w tzw. rejonie *seed*, odpowiadającym za specyficzność siRNA. W obecności niesparowań w tych regionach, degradacja docelowego RNA jest znacznie utrudniona, a siRNA działa jak miRNA, blokując jedynie proces translacji [216].

Alleloselektywne wyciszanie ekspresji na poziomie RNA, w oparciu o występowanie substytucji nukleotydowej (SNP), zaprezentowano względem wielu genów dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, w większości przypadków z wykorzystaniem siRNA [217]. Zastosowanie w tym celu antysensowych oligonukleotydów jest trudniejsze z racji mniej specyficznego mechanizmu działania. Wielokrotnie wykazano, że w obrębie dupleksu hydrolizowanego przez białko Ago-2, w obecności centralnie ułożonego niesparowania różnicującego dwa dupleksy siRNA, można uzyskać selektywną degradację komplementarnego RNA [153, 218, 219]. Efekt ten obserwowano z różną wydajnością m.in. w przypadku genów APP [156, 219-221], SOD1 [222, 223] i SNCA [224, 225], analizowanych także w niniejszej pracy. Jako jeden z pierwszych zróżnicowany został szwedzki wariant genu APP, zawierający podwójną mutację K670N/M671L, na poziomie nukleotydowym odpowiadającą zmianom G/T i A/C. Sелеktywną degradację wariantu zmutowanego uzyskano projektując siRNA posiadające względem typu dzikiego centralnie umieszczone podwójne niesparowanie G-A/A-G [219]. Występowanie niesparowań w układzie tandemowym sprzyjało efektywnemu różnicowaniu poziomu ekspresji obydwu alleli. Autorzy zauważyli także, że choć niezaburzona komplementarność jest optymalna dla hydrolizy RNA z udziałem Ago-2, to typ niesparowania ma wpływ na wydajność dyskryminacji. W tej samej pracy, na podstawie próby różnicowania poziomu degradacji RNA genu MAPT zawierającego substytucję G/A (V337M), autorzy obserwują, że oddziaływanie między nukleotydami G i U tworzącymi niekanoniczną parę typu wobble dyskryminuje degradację RNA typu dzikiego dużo słabiej. Z kolei niesparowanie G-G występujące w przypadku siRNA dedykowanemu RNA ataksyny 1 [153] silnie ograniczało wyciszanie formy dzikiej RNA przy jednoczesnej wydajnej degradacji allelu zmutowanego. Podobnie rezultaty uzyskał Schwarz i wsp. dla transwersji G/C w genie SOD1 (G85R, [223]). Natomiast częściową selektywność obserwowano dla innej substytucji G/A, charakterystycznej dla mutacji londyńskiej APP V717I, która różnicowana była na podstawie

jednej niekanonicznej pary G-U w obrębie dupleksu siRNA [220]. Najlepsze rezultaty uzyskano umieszczając niesparowanie w pozycji 9 dupleksu siRNA, a nie w ścisłym jego centrum (10/11 pozycja). Ekspresja londyńskiego wariantu APP została ograniczona o niespełną połowę. Szukając większej selektywności wprowadzano dodatkowe modyfikacje dupleksu siRNA takie, jak obecność wolnej guanozyny przy 5' końcu nici antysensowej czy wprowadzanie dodatkowych niesparowań w różnych pozycjach. Wydajność różnicowania nieznacznie poprawiono stosując dodatkowe niesparowanie w pozycji 7, a także w pozycji 4.

Wykorzystując mechanizm RNAi, problem z różnicowaniem londyńskiego wariantu APP z tranżycją G/A, miała także inna grupa badaczy [221]. Sformułowali oni podobne wnioski stwierdzając, że obecność pary typu wobble w dupleksie siRNA - typ dziki APP, oraz wysoka zawartość par G-C w sekwencji docelowej minimalizuje efekt dyskryminacji degradacji niekomplementarnego RNA. Rezultaty uzyskane w ramach niniejszej pracy nie potwierdziły możliwości selektywnej degradacji londyńskiego wariantu genu APP (V717I), z udziałem rybonukleazy H i z zastosowaniem tandemowych oligonukleotydów. Selektywność na poziomie około 40% uzyskano dla oligonukleotydów wprowadzających podwójne niesparowania w regionie 5' gapu DNA. W linii komórkowej najefektywniej działał gapmer posiadający w dupleksie z typem dzikim RNA niekanoniczną parę rG-dT, wykazując w komórkach maksymalną selektywność 92% w stężeniu 50 nM. Takiego różnicowania nie obserwowano jednak w warunkach *in vitro*.

Analiza wpływu typu niesparowania w obrębie dupleksu siRNA wykazała, że siła oddziaływań między zasadami azotowymi, oraz kompatybilność z konformacją helisy typu A przekłada się na efektywność wyciszania z zastosowanie mechanizmu RNAi [223]. Do przecięcia docelowego RNA wymagany jest przynajmniej jeden pełny skręt helisy typu A. Najwydajniejsze w tym przypadku okazały się naturalnie kanoniczne pary zasad. Niesparowania typu puryna-puryna powodowały największą destabilizację helisy typu A, indukując najsilniejszą inhibicję degradacji RNA.

Różnicowanie alleli na podstawie centralnie umieszczonego niesparowania w obrębie dupleksu siRNA, w obecności ewentualnych dodatkowych niesparowań, jest częstym w literaturze sposobem generowania alleloselektywności z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA. Próby takie podejmowano także względem zmutowanego wariantu genu SCA3 (choroba Machado-Josepha) zawierającego zwiększoną liczbę powtórzeń trójnukleotydowych, w oparciu o SNP G/C występujący za powtórzeniami, genu SOD1 zawierającego mutację punktową G/C (G93A, [222, 226], czy genu SNCA zawierającego tranżycję G/A A53T [224]. Zarówno w przypadku transwersji G/C, jak i tranżycji G/A

autorom udało się osiągnąć allelospecyficzność wyciszenia zmutowanych wariantów genów. Alternatywą dla stosowania niesparowań może być umieszczenie w nici antysensowej siRNA jednostek nukleotydowych pozbawionych zasady azotowej (ang. *abasic substitution*). Podejście takie zastosowała grupa Corey'a [227], wprowadzając do nici antysensowej siRNA nie zawierające pierścienia heterocyklicznego, modyfikowane jednostki fosforo-cukrowe (np. posiadające pierścień piranozowy czy 2'-O-metylowaną rybozę) w jednej lub wielu pozycjach dupleksu siRNA. Uzyskano w ten sposób wydajne wyciszenie zmutowanej formy huntingtyny oraz ataksyny 3, jednak nie przez obniżenie poziomu jej mRNA (który nie zmienił się w efekcie stosowania siRNA), a przez zahamowanie jego translacji. Projektowane siRNA ukierunkowane były na region powtórzeń, a nie na nukleotydową zmianę w sekwencji. Jest to cel trudny do zróżnicowania, gdyż jego sekwencja jest identyczna w przypadku obydwu alleli, a wariant zmutowany posiada jedynie więcej miejsc potencjalnego przyłączenia siRNA, niż wariant dziki. Ponadto, ekspansja trójnukleotydowych powtórzeń w przypadku powyższych genów ma miejsce w różnych ich regionach. W genie huntingtyny występuje ona w pierwszym eksonie, natomiast w genie ataksyny 3 w pobliżu regionu 3' UTR. Obrazuje to możliwość skutecznego działania względem różnych miejsc w obrębie RNA. Fiszer i wsp. zaproponowali wykorzystanie samokomplementarnych dupleksów siRNA, tworzonych przez powtórzone sekwencje CUG, do alleloselektywnej inhibicji ekspresji zmutowanego wariantu HTT [228]. Autorzy próbowali zastosować pojedynczą nić wiodącą siRNA (ss-siRNA, ang. *single stranded siRNA*) zawierającą powtórzenia CUG, jednak strategia ta okazała się dużo mniej wydajna od stosowania dupleksów siRNA. Stąd sugerują oni, że zastosowanie samokomplementarnych dupleksów CUG, modyfikowanych w nielicznych określonych pozycjach, gdzie zamiast niesparowań U-U wprowadzono pary U-A, wzmacnia genowo specyficzne efekty względem powtórzeń CAG (eliminując potencjalne efekty działania sensowej nici względem genów zawierających powtórzenia CTG), pozwalając przy okazji na alleloselektywne wyciszenie zmutowanej huntingtyny poprzez degradację jej mRNA z udziałem Ago-2.

Różnicowanie alleli na podstawie liczby powtórzeń trójnukleotydowych zaprezentowano także stosując modyfikacje LNA oraz UNA w obrębie dupleksów siRNA, jak i antysensowych oligonukleotydów typu miksmer. Mechanizm działania opierał się nie na selektywnej degradacji zmutowanego allelu, a na inhibicji jego translacji, uniemożliwiając hydrolizę z udziałem Ago-2 czy RNazy H [160, 229]. W oparciu o liczbę powtórzeń, zaproponowano także wyciszanie zmutowanego wariantu genu HTT i SCA3 z udziałem oligonukleotydów PNA, nakierowanych na, tworzone przez powtórzenia trójnukleotydowe,

struktury typu spinki [160]. Podczas gdy dla oligonukleotydów PNA obserwowano wydajną inhibicję ekspresji wariantu zmutowanego, zastosowanie siRNA względem tych samych celów, skutkowało inhibicją poziomu białka ataksyny 3, jednak mniej selektywną względem wariantu zmutowanego. Ciekawy przykład wyciszania genu zmutowanej huntingtyny zaprezentowano także ukierunkowując siRNA na delecję jednego z czterech powtórzeń GAG w obrębie eksonu 58 HTT [155]. Polimorfizm ten znaleziono u 38% pacjentów posiadających zmutowany wariant HTT i zaledwie u 7% pacjentów zdrowych. Okazał się on bardzo wydajnym czynnikiem różnicującym dwa warianty mRNA HTT. Wprowadzenie dodatkowych niesparowań poza regionem seed, między 13 a 19 nukleotydem nici wiodącej zwiększało różnicowanie ekspresji w komórkach neuroblastomy, a także w fibroblastach izolowanych od pacjentów z chorobą Huntingtona.

Ukierunkowanie oligonukleotydów antysensowych na określony polimorfizm, w przypadku gdy nie jest on bezpośrednio przyczyną choroby, a tylko koresponduje z jej występowaniem, nie jest rozwiązaniem uniwersalnym. Wiadomo bowiem że nie wszyscy chorzy będą jego nosicielami, tak jak nie zawsze będzie on segregował z wariantem genu, którego ekspresja ma być wyciszona. Odbiorcą tak zaprojektowanej terapii jest zatem ograniczona grupa chorych, podobnie jak w przypadku występowania rzadkich mutacji. Stale poszukuje się też nowych polimorfizmów stanowiących podstawę do alleloselektywności. Innym czynnikiem, decydującym o efektywności strategii, który jednak pozostaje poza zasięgiem wpływów badacza, jest umiejscowienie docelowej zmiany w ściśle zdefiniowanym kontekście sekwencyjnym, w określonym regionie genu. Wiadomo, że z różnych przyczyn, siRNA jak i oligonukleotydy antysensowe, ukierunkowane na określone obszary mRNA działają w nich lepiej niż w innych (np. dostępność regionu RNA uwarunkowana jego strukturą, oddziaływaniami z innymi molekułami w komórce itp.). Stąd nawet efektywne działanie strategii w jednym przypadku substytucji określonego typu nie gwarantuje skuteczności względem innych celów.

Wobec genu huntingtyny przeprowadzono także identyfikację SNP, możliwych do wykorzystania jako potencjalny cel antysensowych oligonukleotydów, alleloselektywnie promujących degradację wariantu zmutowanego mRNA z udziałem RNazy H [230]. Wytypowano 50 różnych SNP, stanowiących efektywny cel w przypadku mRNA HTT, na podstawie których testowano chimerowe oligonukleotydy zawierające 9-nukleotydowy fragment gap zbudowany z tiofosforanów DNA, otoczony 5-nukleotydowymi odcinkami 2'-MOE lub cET (ang. *S-constrained ethyl-RNA*). Docelowe SNP występowało w regionie gapu. Dowiedziono, że obydwa typy oligonukleotydów selektywnie wyciszały zmutowany wariant

mRNA HTT, jednak modyfikacja cET obecna we fragmentach okalających powodowała 5-krotnie większą skuteczność wyciszania z zachowaniem alleloselektywności, w porównaniu do modyfikacji 2'-MOE.

Nowe strategie alleloselektywnej degradacji RNA zaproponowane w niniejszej pracy posiadają znaczny potencjał działania, zależny jednak w dużej mierze od typu substytucji nukleotydowej. Z tego względu nie mają charakteru uniwersalnego, mogą natomiast wzajemnie się uzupełniać. Jak dotychczas, w literaturze nie analizowano wpływu poszczególnych typów niesparowań, ani ich rozlokowania w duplesie na wydajność hydrolizy z udziałem rybonukleazy H.

Koncepcja tandemowych oligonukleotydów jest interesująca i posiada zdefiniowane uzasadnienie, jednak jej zastosowanie w terapii budzi pewne wątpliwości jeśli chodzi o funkcję inhibitora. Częsteczką ta prezentuje bowiem potencjał wyciszający ekspresję zgodnie z mechanizmem sterycznej blokady. Jeśli więc, nawet selektywnie, hybrydyzuje do wariantu dzikiego RNA w celu jego osłony przed degradacją z udziałem RNazy H, to jednocześnie potencjalnie może blokować jego dalszą ekspresję, pozbawiając komórkę także produktów prawidłowej formy genu. Analiza wyników uzyskanych w ramach prezentowanej koncepcji miała na celu m.in. określenie, czy możliwe jest zaobserwowanie pewnych korelacji, wiążących rezultaty eksperymentów *in vitro*, z wynikami badań otrzymanymi z naturalnego układu jakim jest żywa komórka. Mnogość potencjalnych oddziaływań docelowych RNA w komórce najlepiej bowiem weryfikuje ich rzeczywiste interakcje z badanymi oligonukleotydami. Dyskutując determinanty termodynamiczne założonej koncepcji można stwierdzić, że pojedyncze niesparowanie w duplesie RNA typu dzikiego z gapmerem nie ma potencjału różnicującego hydrolizę z udziałem RNazy H, chyba, że prowadzi do całkowitego ograniczenia formowania się takiego duplesu, czego nie zaobserwowano w żadnym z analizowanych przypadków. W położeniu w jakim znajdowało się niesparowanie, czyli centralnie w obrębie deoksyrybonukleotydowego gapu, nie stanowiło ono dla rybonukleazy H żadnej przeszkody w wiązaniu się, jak i w samej hydrolizie, co wynika z wysokich wydajności trawień dla obydwu RNA w układach dwuskładnikowych. Zasadniczą więc rolę w ukierunkowaniu selektywności odgrywała krótsza od gapmeru i w pełni modyfikowana częsteczka inhibitora. Zaobserwowano, że im krótszy jest analizowany duples, tym większe znaczenie dla jego trwałości mają pojedyncze pary/niesparowania, co jest w pełni uzasadnione. Trend ten jest zauważalny przy porównaniu trwałości duplesów poszczególnych wariantów RNA z 7- i 10-nukleotydowymi inhibitorami. Pojedyncze

niesparowanie zwykle silniej osłabiało dupleks 7-nukleotydowy niż 10-nukleotydowy; ponadto krótszy oligonukleotyd oddysocjowuje łatwiej, uwalniając RNA dla innych procesów komórkowych. Z drugiej strony jednak, zbyt krótki inhibitor nie ma realnych szans konkurować z dłuższym gapmerem o związanie się do RNA. Ponadto w środowisku komórkowym, potencjalnie posiadałby więcej miejsc alternatywnego wiązania, generujących działania niespecyficzne, niż jego dłuższy odpowiednik. Dlatego też odrębna optymalizacja działania inhibitorów, polegająca na rozstrzygnięciu między jego długością a stężeniem, była wymagana dla każdego analizowanego przypadku. Duże znaczenie dla powodzenia prezentowanej strategii ma także typ SNP, który determinuje charakter tworzonych niesparowań. Zasadniczo transwersje odwracające silne pary (np. GC na CG lub odwrotnie) generują większe różnice w termodynamicznej stabilności dupleksów RNA-gapmer zawierających pojedyncze niesparowanie, ponieważ niesparowania z udziałem reszt cytydynowych były zwykle najsilniej destabilizujące dupleks. Z drugiej strony, ich obecność w dupleksie RNA-inhibitor termodynamicznie silnie dyskryminowała jego tworzenie wobec znajdującego się w pobliżu gapmeru. Z punktu widzenia koncepcji tandemowych oligonukleotydów, była ona korzystniejsza dla selektywnej hydrolizy, wykorzystując potencjał pojedynczego niesparowania tam, gdzie rzeczywiście miał on znaczenie. Silne osłabienie oddziaływań inhibitora z wariantem zmutowanym bardziej wpływało na kierunek hydrolizy, niż niesparowanie w przypadku dupleksu RNA-gapmer, nie ograniczające wydajności trawienia z udziałem RNazy H.

Obserwowane wyciszenie ekspresji GFP, sprzężonego z fragmentami genów zawierających analizowane substytucje nukleotydowe, teoretycznie może odbywać się zarówno według mechanizmu sterycznej blokady, wykorzystywanego przez stosowane w badaniach inhibitory, jak i mechanizmu degradacji RNA z udziałem rybonukleazy H, indukowanego przez gapmery. Obiektem zainteresowania nie jest jednak sam poziom białka GFP, lecz poziom jego RNA, a wiadomo, że w komórce nie zawsze są one ze sobą skorelowane [231]. Założono, że jeśli RNA nie ulegnie hydrolizie na skutek oddziaływań z gapmerem, to w przypadku koncepcji tandemowych oligonukleotydów, inhibitor nie powinien wpływać na jego poziom, określany metodą qPCR, gdyż docelowe RNA powinno znajdować się cały czas w komórce. Stąd zastanawiający jest rezultat obniżenia ekspresji RNA przez inhibitory. Zazwyczaj spadek ten jest niewielki i oscyluje w granicach błędów kontroli, jednak zdarzało się, że przekraczał te wartości, najczęściej w przypadku zwiększania stężeń inhibitora. Generalnie wzrasta wówczas prawdopodobieństwo wystąpienia efektów niespecyficznych, czym też można tłumaczyć spadek samego poziomu GFP. Ekspresja jego

RNA jest bowiem uzależniona od ekspresji m.in. genów podstawowego metabolizmu. Oligonukleotydy 7- czy 10-nukleotydowe, zawierające modyfikacje silnie wzmacniające oddziaływania z komplementarnymi fragmentami, mogą być związane z efektami niespecyficznymi, w związku z hybrydyzacją do innych, nawet częściowo komplementarnych, sekwencji w komórce. Wydaje się, że domniemane efekty niespecyficzne były najlepiej widoczne w przypadku sekwencji inhibitora Ih1 dedykowanego RNA 53, dla którego zidentyfikowano w obrębie samego białka GFP 4 potencjalne, silne miejsca alternatywnego wiązania się. Jak widać, wybór docelowej sekwencji także ma wpływ na ilość potencjalnych niespecyficznych oddziaływań.

Porównując dane uzyskane *in vitro* i w linii komórkowej dla koncepcji tandemowych oligonukleotydów, obserwowano zwykle mniej więcej o połowę słabsze różnicowanie alleli w komórkach *HeLa*, niż w układzie izolowanym. Dość efektywnie działała ona w przypadku transwersji C/G, ukierunkowując wyciszenie ekspresji RNA na wariant zmutowany, zarówno *in vitro*, jak i w określonych warunkach w liniach komórkowych. Jest to zgodne z przesłankami wynikającymi z danych termodynamicznych, zestawionych w Tabeli 8. Wydaje się, że skuteczne działanie inhibitora jest warunkowane termodynamicznie, bowiem lepsze efekty różnicowania uzyskiwano, gdy występowała silniejsza destabilizacja dupletu mutant-inhibitor, niż dupletu typ dziki RNA - gapmer. W układzie, w którym dzięki obecności silnie destabilizującego niesparowania (np. rA-dC) oddziaływanie cząsteczki inhibitora z wariantem zmutowanym RNA było znacznie ograniczone, wzrastała selektywność wyciszania formy zmutowanej. Sytuacja taka miała miejsce w przypadku tranzykcji G/A, której skutki próbowano niwelować w obrębie trzech różnych sekwencji. Właściwe ukierunkowanie hydrolizy obserwowano w dwóch przypadkach na trzy. Dla sekwencji RNA 717 nie uzyskano zadowalających efektów w komórkach *HeLa* w żadnym z testowanych układów, pomimo obiecujących rezultatów *in vitro*. W przypadku sekwencji RNA 46, korzystniejsze dla osiągnięcia możliwie najwydajniejszej selektywności hydrolizy *in vitro* było zastosowanie krótszego, 7-nukleotydowego inhibitora, który mimo niepełnej ochrony dla formy typu dzikiego RNA nie wpływał na wydajność hydrolizy formy zmutowanej. W tym miejscu należy wyważyć co jest istotniejsze – utrata pewnego, docelowo jak najmniejszego odsetka kopii prawidłowego wariantu mRNA genu, czy pozostawienie pewnej liczby kopii zmienionego, patogenego wariantu mRNA. W sytuacjach, w których dla rozwoju stanu chorobowego wystarczy już niewielka liczba kopii zmienionych RNA (jak ALS powodowane mutacją A4V - substytucja C/U), pożądane wydaje się całkowite wyciszenie formy zmutowanej. Dyskusyjne są oczywiście możliwe i niepożądane efekty niespecyficzne, które

wydają się być większe, im krótszy, bardziej modyfikowany i wzmacniający trwałość formowanych dupleksów jest stosowany oligonukleotyd. Inhibitor 7-nukleotydowy generował także większą selektywność degradacji w przypadku RNA 53. Generalnie najsłabsze różnicowanie w ramach strategii tandemowych oligonukleotydów otrzymano dla tranzycji C/T i A/G.

W odniesieniu do obydwu prezentowanych koncepcji, zastosowana w pracy metoda transfekcji przejściowej, podobnie jak potencjalne efekty niespecyficzne, może być elementem w pewnym stopniu zaburzającym uzyskiwane wyniki, z racji możliwych różnic w wydajności dostarczania samego plazmidu do komórek. Stanowi on źródło cząsteczek RNA, których ekspresja jest badana. W obliczu różnych wydajności kolejnych czy powtarzanych transfekcji, wyjściowy poziom RNA może być różny, co może generować duże błędy. Na pewno zastosowanie stabilnej linii komórkowej o stałym poziomie ekspresji badanych sekwencji byłoby dużo wiarygodniejszym rozwiązaniem, jednak wyprowadzenie takiej linii jest czasochłonne i wymaga dużego doświadczenia.

Koncepcja motywów strukturalnych, bazująca na zaburzeniu helikalności dupleksu RNA/ASO w obecności niesparowań, jest dyskusyjna pod względem specyficzności w środowisku komórki. Dąży ona do alleloselektywności w oparciu o sekwencję, generując w dupleksach niekanoniczne pary. Jest to ryzykowne w przypadku niesparowań, liczniejszych niż jedno różnicujące w dupleksach wariant dziki i zmutowany, ze względu na wysokie prawdopodobieństwo efektów niespecyficznych w otoczeniu innych komórkowych RNA. Efekty te nie istnieją w układzie izolowanym, w którym weryfikowano termodynamiczno-strukturalne uwarunkowania tej koncepcji. Stąd początkowo zidentyfikowano motywy potencjalnie różnicujące poziom degradacji wariantów RNA, by następnie móc zminimalizować ich wielkość względem dupleksu. Trójnukleotydowe fragmenty gapmeru, okalające region gapu, wzmacniały jego specyficzność. Obserwowano, że ich wydłużenie znosiło selektywność względem alleli, pomimo pozostawienia w dupleksie motywów różnicujących. Najprawdopodobniej następowało to w wyniku utrzymywania zwartej helikalnej struktury przez silnie wiążące końcowe pary nukleotydów. Zastosowanie nukleotydowych i nienukleotydowych modyfikacji w miejscu niesparowań zdecydowanie poprawia genową specyficzność. Dla 13-nukleotydowych dupleksów, zawierających motyw podwójnego niesparowania w regionie 5' gapu, bardzo dobrym rozwiązaniem okazało się wprowadzenie w tych miejscach par RNA-UNA. Modyfikacja UNA dodatkowo termodynamicznie zwiększa dyskryminację hybrydyzacji z niekomplementarnymi nukleotydami, co poprawiło genową specyficzność zawierających ją gapmerów.

Alleloselektywność degradacji RNA *in vitro* zachowano w dwóch przypadkach (APP A692G i SNCA E46K) na trzy analizowane SNP. W komórkach potwierdzono skuteczność tej koncepcji dla transwersji C/G APP A692G. Dobrym tropem, niestety nie dla wszystkich analizowanych przykładów substytucji nukleotydowych, okazało się także umiejscowienie niesparowania, różnicującego dupleks z wariantem dzikim i zmutowanym, w regionie hydrolizy RNA. Przy takim umiejscowieniu, kluczowy okazał się typ substytucji, wpływający na kształt helisy dupleksu RNA/ASO. Rozwiązanie to najefektywniej działało dla najsilniej różnicującej warianty RNA transwersji C/G. Także długość gapu w obecności różnicującego niesparowania C-C okazała się wydajnym sposobem na ukierunkowanie hydrolizy z udziałem RNazy H. Wiadomo, że wydajne trawienie zachodzi w obecności 4-5 nukleotydów DNA w dupleksie z docelowym RNA [58]. Eksperyment analizujący wpływ długości gapu przeprowadzono dla trzech typów substytucji: C/G (A692G), G/A (V717I) oraz C/U (A4V). Skuteczne różnicowanie uzyskano jedynie w przypadku transwersji C/G, gdzie obecność niesparowania rC-dC w sąsiedztwie czteronukleotydowego, komplementarnego do RNA gapu, niezwykle wydajnie inhibowała degradację RNA (gapmer bb2). Dla pięcionukleotydowego komplementarnego gapu w sąsiedztwie niesparowania rC-dC efektu tego już nie uzyskano (gapmer bb3). W przypadku dwóch analizowanych tranzycji różnice obserwowane w warunkach *in vitro* oscylowały zwykle w granicach błędu, nie przekraczając 10%. Zastosowanie alkilowego łącznika, w miejscu nukleotydów sąsiadujących z niesparowaniem, poprawiło różnicowanie w przypadku transwersji C/G (SP3, gapmer bb7) oraz tranzycji C/U (SP18 gapmer aa16).

Rozwiązana struktura krystaliczna domeny katalitycznej ludzkiej rybonukleazy H1 obrazuje jej bardzo wysokie podobieństwo do struktury trzeciorzędowej RNazy HI z *E.coli*, pomimo zaledwie 34% identyczności sekwencji aminokwasowej [63]. Na podstawie oddziaływań z dupleksem RNA/DNA o długości 18 par zasad, Nowotny i wsp. ustalili, że domena katalityczna oddziałuje z 11 parami zasad na 18, z czego większość oddziaływań enzym-substrat występuje w mniejszej bruździe dupleksu. Miejsce aktywne zlokalizowane jest w przestrzeni wiążącej RNA, w której bezpośrednio oddziałują cztery kolejne grupy 2'-hydroksylowe rybonukleotydu. Podstawą rozpoznania nici DNA jest brak grup 2'-hydroksylowych w przestrzeni wiążącej DNA (Rysunek 1C, str. 18) oraz przyjęcie elastycznej konformacji B łańcucha oligodeoksyrybonukleotydu, narzucanej przez kieszeń wiążącą fosforan. Modyfikacja pojedynczego deoksyrybonukleotydu, skutkująca konformacją łańcucha DNA inną niż B, zapobiega rozcięciu wiązania przy naprzeciwnym rybonukleotydzie i dwóch kolejnych znajdujących się za domeną katalityczną. Fakt ten

tłumaczy wpływ zaburzeń struktury duplexu RNA/ASO wnoszonych przez modyfikacje UNA, a także obecność alkilowych łączników pozbawionych grupy cukrowej. Nie wiadomo do końca, jakie dokładnie zmiany w położeniu reszt cukrowych wnoszą niesparowanie rC-dC, najsilniej różnicujące wydajność hydrolizy. Rozwiązanie tego zagadnienia byłoby ciekawym uzupełnieniem niniejszej dyskusji, wymagałoby jednak ustalenia struktury tak zmienionego duplexu RNA/DNA.

Koncepcja tandemowych oligonukleotydów prezentuje całkiem nowy sposób ukierunkowania degradacji RNA z udziałem rybonukleazy H względem określonego allelu, z kolei strategia motywów strukturalnych wykorzystuje sposoby częściowo znane już w literaturze, jednak w kontekście innego mechanizmu (RNAi). Porównując rezultaty obydwu strategii (Tabele 9 i 37) widoczne jest, że zaburzenie helikalności duplexu w oparciu o wprowadzenie motywów strukturalnych do duplexu RNA/ASO, zwłaszcza w regionie hydrolizowanym, posiada nieco większy potencjał alleloselektywności. W przypadku tandemowych oligonukleotydów, uzyskano docelowo dyskryminację degradacji wariantu dzikiego RNA z udziałem RNazy H, jednak selektywność ta może być zaburzona na poziomie białka, z racji możliwej inhibicji translacji RNA typu dzikiego przez oligonukleotyd typu inhibitor. Z wykorzystaniem strategii motywów strukturalnych uzyskano większe zróżnicowanie poziomu ekspresji alleli w komórkach *HeLa*, niż w przypadku koncepcji tandemowych oligonukleotydów. Dla transwersji C/G wyłoniono 10 oligonukleotydów typu gapmer, które pozwoliły osiągnąć wydajną, selektywną degradację formy zmutowanej RNA w linii komórkowej *HeLa*. W przypadku analizowanych tranzycji, uzyskano zbliżoną selektywność degradacji stosując obydwie strategie. Najsłabsze rezultaty uzyskano dla tranzycji A/G, jednak dla niej przetestowano też najmniejszą liczbę gapmerów. Analiza wpływu poszczególnych typów substytucji na potencjał alleloselektywnej degradacji RNA z udziałem rybonukleazy H nie była jak dotąd opisana w literaturze.

Podsumowując obydwie, zaproponowane w niniejszej pracy koncepcje, wykazano, że mają one potencjał różnicujący poziom ekspresji dwóch wariantów RNA względem pojedynczego nukleotydu, natomiast nie są wolne od wad. W badaniach *in vitro* prezentują one większą alleloselektywność niż w komórkach *HeLa*. Zaobserwowano, że zastosowane stężenie oligonukleotydu ma decydujący wpływ na poziom selektywności. W przypadku tandemowych oligonukleotydów, krótszy inhibitor zwykle silniej różnicował poziom ekspresji RNA w komórkach, jako że w mniejszym stopniu hybrydyzował do wariantu zmutowanego niż dłuższy inhibitor. Pojedyncze niesparowanie zasadniczo nie stanowiło podstawy do różnicowania poziomu hydrolizy dwóch wariantów RNA z udziałem RNazy H,

stąd ważny był w tym przypadku udział inhibitora. Zastosowanie strategii motywów strukturalnych pokazało, że typ substytucji w dużej mierze determinuje potencjał selektywnej degradacji. Najsilniej różnicujące okazało się niesparowanie rC-dC. Z udziałem dodatkowych elementów takich jak miejsce występowania, obecność nukleotydów UNA czy nienukleotydowych łączników oraz długość gapu DNA, pozwoliło uzyskać zadowalającą, istotną selektywność degradacji wariantów RNA. Pozostałe analizowane typy substytucji nukleotydowych różnicowały warianty RNA w dupleksach z ASO znacznie gorzej.

Realnie oceniając szansę obydwu strategii, bardziej perspektywiczna wydaje się koncepcja motywów strukturalnych. Różnice w trwałości termodynamicznej duplexu zwykle nie korelowały bezpośrednio z wydajnością hydrolizy z udziałem rybonukleazy H. Warunkiem koniecznym dla zajścia hydrolizy wydaje się być utrzymanie struktury helisy odpowiadającej miejscu aktywnemu RNazy H. Szereg dostępnych modyfikowanych nukleotydów, w połączeniu z dobrze różnicującym typem substytucji, może dodatkowo zwiększyć potencjał tej koncepcji.

IV. MATERIAŁY I METODY

1 MATERIAŁY

1.1 Odczynniki

Izopropanol wolny od DNaz i RNaz	ACROS Organics
Agaroza, dietylopirowęglan (DEPC), dimetylosulfotlenek (DMSO), EDTA roztwór 0,5 M sterylny, fenol, kanamycyna, kwas borowy, PBS sterylny 10x stężony, tri(hydroksymetylo)aminometan (TRIS), Triton-X	Bioshop
Roti Aqua Phenol	Carl Roth
Amoniak 25%, kwas octowy, kwas solny, n-butanol	Chempur
Chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek sodu, diwodorofosforan sodu, dodecylsulfat sodu (SDS), formamid, octan sodu, sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na ₂ EDTA), węglan sodu, wodorofosforan sodu	Fluka
Płodowa surowica bydlęca inaktywowana termicznie (FBS), Opti-MEM	Gibco
Lipofektamina 2000	Invitrogen
Amoniak 32%, trihydroksyaceton (THAP)	Merck
Acetonitryl, dichlorometan, etanol, metanol, n-propanol,	POCH
Roztwory 5'-trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), wzorzec długości DNA O'Range Ruler 50-1000bp,	ThermoScientific
Agar, ekstrakt drożdżowy, mocznik, pepton	Serva
β-merkaptoetanol, błękit bromofenolowy, bromek etyldyny, chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), cyjanol ksylenowy, D-glukoza, ditiotreitol, fluorowodorek trójetyloamoniowy, glicerol, kakodylan sodu, N-laurylosarkozynian sodu, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), nadsiarazan amonu (APS), octan amonu, orange G, roztwór antybiotyków 100x stężony, roztwór trypsyna-EDTA 10x stężony, roztwór witamin MEM 100x stężony, RPMI1640 medium, tiocyjanian amonu, tiocyjanian guanidyny, wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu,	Sigma Aldrich

1.2 Enzymy

Taq DNA polimeraza, T4 kinaza polinukleotydowa, T4 DNA ligaza, nukleaza S1

– **ThermoScientific**

Taq DNA polimeraza – **EURx**

Trzustkowa alkaliczna fosfataza cielęca (CIAP) – **Invitrogen**

Rybonukleaza H – **Epicentre**

Rybonukleaza T1 – **Sigma-Aldrich**

DNaza I, rybonukleaza V1 – **Ambion**

Endonukleazy restrykcyjne NheI, BamHI – **Promega**

1.3 Roztwory i bufony

Bufor H (hybrydyzacyjny, do trawień RNazą H, 10x stężony)

200 mM	Tris-HCl pH 7.8
400 mM	KCl
80 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT

Bufor Storage (do rozcieńczeń RNazy H, 1x stężony):

50%	glicerol
50 mM	Tris-HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	TritonX-100

Bufor do trawień RNazą T1

50 mM	cytrynian sodu pH 5.0
1 mM	EDTA
7 M	mocznik/XC

1.5 OD tRNA

Bufor do hydrolizy alkalicznej RNA

40% (v/v) formamid

7.6 mM MgCl₂

Bufor ALM I do lizy alkalicznej komórek

50 mM D-glukoza

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl pH 8.0

40% (w/v) akrylamid/bis 29:1 (w/w)

386.7 g akrylamid 2x

13.3 g bis-akrylamid

Uzupełniono wodą do 1000 ml.

Bufor TBE (do rozdzielów elektroforetycznych w warunkach denaturujących, 10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy H₃BO₃

10 mM EDTA

Uzupełniono wodą do 1000 ml. Autoklawowano.

Bufor TBM (do rozdzielów elektroforetycznych w warunkach niedenaturujących, 10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy H₃BO₃

80 mM MgCl_2

Uzupełniono wodą do 1000 ml.

Bufor do topnień UV

100 mM NaCl

20 mM kakodylan sodu pH 7.0

0,5 mM EDTA

Fenol wysycony octanem sodu (pH 5.0)

50% (v/v) uwodniony fenol

50% (v/v) 100 mM octan sodu pH

Mieszano w ciemnej butelce, w temperaturze 4°C przez 4 h, po czym usunięto fazę wodną do grubości około 0,5 cm. Dodano β -merkaptioetanolu do końcowego stężenia 20% (v/v). Przechowywano w lodówce, w ciemnej butelce.

Trizol

38% (v/v) fenol wysycony 0,1 M octanem sodu pH 5.0

1 M tiocyjanian guanidyny

1 M tiocyjanian amonu

0,1 M octan sodu pH 5.0

5% (v/v) glicerol

5 mM EDTA

0,5% (v/v) N-laurylosarkozynian sodu

EDTA i N-laurylosarkozynian sodu dodawano bezpośrednio przed użyciem.

Matryca do analiz MALDI-ToF

0,3 g trihydroksyacetoftenon (THAP)

30 μ l roztwór v/v acetonitryl : woda (1:1) z 0,1 % (v/v) TFA

Roztwór obciążający do rozdzielania w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, 2x stężony

8 M mocznik
0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy
0,2% (w/v) Orange G

Roztwór obciążający do rozdzielania w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, 10x stężony

10 mM Tris-HCl pH 7.5
50% (w/v) glicerol
0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Roztwór obciążający do żelu agarozowego, 6x stężony

25 mM Tris-HCl pH 7.5
25% (w/v) glicerol
0,2% (w/v) błękit bromofenolowy
0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

1.4 Żele

Żele agarozowe

1% lub 1,5% roztwór agarozy w buforze 0,5x TBE (lub 0,5x TBE w wodzie DEPC) podgrzewano w kuchenie mikrofalowej; dodawano bromku etydy do końcowego stężenia 0,5 μ g/ml, wylewano do aparatu do elektroforezy, pozostawiano do zastygnięcia.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania w warunkach denaturujących

8, 10, 12 lub 16% (w/v)	akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)
1x	bufor TBE
8 M	mocznik
0,6% (w/v)	APS
0,04% (v/v)	TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania w warunkach niedenaturujących

12 lub 16% (w/v)	akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)
1x	bufor TBM
0,75% (w/v)	APS
0,05% (v/v)	TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

1.5 Pożywki i media**Pożywka płynna LB**

10 g	pepton
5 g	ekstrakt drożdżowy
5 g	NaCl

Uzupełniono wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie.

Pożywka płynna LB z kanamycyną

Do płynnej pożywki LB dodawano wodny roztwór kanamycyny o stężeniu 100 mg/ml, do stężenia końcowego 50 µg/ml.

Pożywka stała LB z kanamycyną

2,5 g	pepton
1,25 g	ekstrakt drożdżowy
1,25 g	NaCl
3,75 g	agar

Uzupełniono wodą do 250 ml i sterylizowano w autoklawie. Po schłodzeniu do temperatury około 55°C, dodawano roztwór kanamycyny do stężenia końcowego 100 µg/ml. Pożywkę wylewano na szalki Petriego w komorze z laminarnym przepływem powietrza i pozostawiano do zastygnięcia.

Medium hodowlane do komórek *HeLa*

Medium RPMI 1640

10%	FBS
1x	roztwór witamin
1x	roztwór antybiotyków

Medium do transfekcji komórek *HeLa*

Medium RPMI 1640

10%	FBS
1x	roztwór witamin

Medium do mrożenia komórek *HeLa*

Medium RPMI 1640

50% (v/v)	FBS
10% (v/v)	DMSO

1.6 Gotowe zestawy do reakcji enzymatycznych

Zestawy do transkrypcji <i>in vitro</i>	- MEGAscript [™] T7 Kit – Ambion - Ampliscribe T7 Transcription Kit – Epicentre
Zestaw do izolacji plazmidów	- QIAGEN Plasmid MidiKit – Qiagen
Zestaw do oczyszczania DNA	- QIAquick PCR Purification Kit - Qiagen
Zestaw do odwrotnej transkrypcji	- iScript [™] Reverse Transcription Supermix – Bio-rad
Zestawy do qPCR	- iTaq Universal SYBR [™] Green Supermix- Bio-rad - iQ [™] SYBR [™] Green Supermix – Bio-rad

1.7 Izotop promieniotwórczy

[γ -³²P] ATP 4000-5000 Ci/mmol – **Hartmann Analytic**

1.8 Plazmid

Ekspresyjny wektor plazmidowy pEGFP-N3 został udostępniony dzięki uprzejmości prof. dr hab. Elizy Wyszko, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN.

1.9 Komórki

Komórki kompetentne *E.coli* szczep DH5 α - **Invitrogen**

Nowotworowa linia komórkowa *HeLa* została udostępniona dzięki uprzejmości prof. dr hab. Elizy Wyszko, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN.

1.10 Oligonukleotydy

1.10.1 Oligonukleotydy DNA do konstrukcji matryc do transkrypcji *in vitro*:

Nazwa	Długość	Sekwencja w orientacji 5'-3'
DWWT	99	GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG ATC GTC ATC ACC TTG GTG
G692	99	GTG TTC TTT GGA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG ATC GTC ATC ACC TTG GTG
I717	99	GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG ATC ATC ATC ACC TTG GTG
T7Fwd	43	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TGT TCT TTG CAG AAG ATG TGG G
DWR	21	GGA TCC ACC AAG GTG ATG ACG
T7FwdMT	43	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TGT TCT TTG GAG AAG ATG TGG G
DWRMT	21	GGA TCC ACC AAG GTG ATG ATG
T7WA4C	32	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG GCG TGG CC
RevA4C	18	GGA TCC CTT TCC TTC TGC
T7W46	36	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA AAG AGG GTG TTC
Rev46	20	GGA TCC CAT TTG TCA CTT GC

1.10.2 Oligonukleotydy DNA do konstrukcji insertów:

Nazwa	Długość	Sekwencja w orientacji 5' -3'
pF_WA692	74	TCA AAA ATT GGC TAG CGT GTT CTT TGC AGA AGA TGT GGG TTC AAA CAA AGG TGC AAT CAT TGG ACT CAT GGT GG
pF_MG692	74	TCA AAA ATT GGC TAG CGT GTT CTT TGG AGA AGA TGT GGG TTC AAA CAA AGG TGC AAT CAT TGG ACT CAT GGT GG
pFM693	74	TCA AAA ATT GGC TAG CGT GTT CTT TGC AGG AGA TGT GGG TTC AAA CAA AGG TGC AAT CAT TGG ACT CAT

		GGT GG
pR_WV717	74	TCT TCA GCA TGG ATC CAC CAA GGT GAT GAC GAT CAC TGT CGC TAT GAC AAC ACC GCC CAC CAT GAG TCC AAT GA
pR_MI717	74	TCT TCA GCA TGG ATC CAC CAA GGT GAT GAT GAT CAC TGT CGC TAT GAC AAC ACC GCC CAC CAT GAG TCC AAT GA
pF_WA4C	74	TCA AAA ATT GGC TAG CCT CGG CGT GGC CTA GCG AGT TAT GGC GAC GAA GGC CGT GTG CGT GCT GAA GGG CGA CG
pF_MV4U	74	TCA AAA ATT GGC TAG CCT CGG CGT GGC CTA GCG AGT TAT GGC GAC GAA GGT CGT GTG CGT GCT GAA GGG CGA CG
pR_WA4C	74	TCT TCA GCA TGG ATC CCT TTC CTT CTG CTC GAA ATT GAT GAT GCC CTG CAC TGG GCC GTC GCC CTT CAG CAC
pF_W46	74	TCA AAA ATT GGC TAG CAC AAA AGA GGG TGT TCT CTA TGT AGG CTC CAA AAC CAA GGA GGG AGT GGT GCA TGG TG
pF_M46	74	TCA AAA ATT GGC TAG CAC AAA AGA GGG TGT TCT CTA TGT AGG CTC CAA AAC CAA GAA GGG AGT GGT GCA TGG TG
pR_W53	74	TCT TCA GCA TGG ATC CCA TTT GTC ACT TGC TCT TTG GTC TTC TCA GCC ACT GTT GCC ACA CCA TGC ACC ACT CC
pR_M53	74	TCT TCA GCA TGG ATC CCA TTT GTC ACT TGC TCT TTG GTC TTC TCA GCC ACT GTT GTC ACA CCA TGC ACC ACT CC

1.10.3 Oligonukleotydy RNA do badań *in vitro*

Nazwa	Długość	Sekwencja w orientacji 5'-3'	Współczynnik ekstynkcji ($M^{-1} cm^{-1}$)	Masa cząsteczkowa (Da)
692C/693A	13	UUUGCAGAAGAUG	140110	4165,6
692G	13	UUUGGAGAAGAUG	144530	4205,6
693G	13	UUUGCAGGAGAUG	138850	4181,6
717G	13	GUGAUCGUCAUCA	135260	4101,5

IV. MATERIAŁY I METODY

717A	13	GUGAUCAUCAUCA	137000	4085,5
4C	13	CGAAGGCCGUGUG	130900	4195,6
4U	13	CGAAGGUCGUGUG	134590	4196,6
53G	13	GGUGUGGCAACAG	136160	4219,6
53A	13	GGUGUGACAACAG	138920	4203,6
46G	13	ACCAAGGAGGGAG	144660	4265,7
46A	13	ACCAAGAAGGGAG	145920	4249,7
692C-1	13	GUUCUUUGCAGAA	135110	4102,5
692G-1	13	GUUCUUUGGAGAA	139530	4142,5
4C-1	13	GACGAAGGCCGUG	134790	4218,6
4U-1	13	GACGAAGGUCGUG	138480	4219,6
15-692C	15	UCUUUGCAGAAGAUG	156840	4776,9
15-4C	15	GACGAAGGCCGUGUG	155140	4870
15-717G	15	CAGUGAUCGUCAUCA	148980	4735,9
15-692G	15	UCUUUGGAGAAGAUG	161260	4816,9
15-717A	15	CAGUGAUCAUCAUCA	156420	4719,9
15-4U	15	GACGAAGGUCGUGUG	158830	4871
17-692C	17	UCUUUGCAGAAGAUGUG	177190	5428,3
17-692G	17	UCUUUGGAGAAGAUGUG	181610	5468,3
17-692C-1	17	GUGUUCUUUGCAGAAGA	179380	5428,3
17-692G-1	17	GUGUUCUUUGGAGAAGA	183800	5468,3
17-4C	17	GCGACGAAGGCCGUGUG	172540	5520,4
17-4U	17	GCGACGAAGGUCGUGUG	176230	5521,4
17-717G	17	GACAGUGAUCGUCAUCA	178920	5410,3
17-717A	17	GACAGUGAUCAUCAUCA	180660	5394,3
f-692C	13	6FAM -UUUGCAGAAGAUG	165300	4732,0
f-692G	13	6FAM -UUUGGAGAAGAUG	169000	4772,1
f-693G	13	6FAM -UUUGCAGGAGAUG	162400	4748,0
20f-692C	20	6FAM - GUUCUUUGCAGAAGAUGUGG	234200	4640,2

20f-692G	20	6FAM-GUUCUUUGGAGAAGAUGUGG	237900	4680,2
f-717G	13	6FAM-GUGAUCGUCAUCA	155000	4668,0
f-717A	13	6FAM-GUGAUCAUCAUCA	157900	4652,0
20f-717G	20	6FAM-GACAGUGAUCGUCAUCACCU	224300	6893,3
20f-717A	20	6FAM-GACAGUGAUCAUCAUCACCU	227200	6877,3
f-4C	13	6FAM-CGAAGGCCGUGUG	154100	4762,1
f-4U	13	6FAM-CGAAGGUCGUGUG	156800	4763,1
20f-4C	20	6FAM-GCGACGAAGGCCGUGUGCGU	224200	7043,4
20f-4U	20	6FAM-GCGACGAAGGUCGUGUGCGU	226900	7044,4
f-46G	13	6FAM-ACCAAGGAGGGAG	168500	4832,2
f-46A	13	6FAM-ACCAAGAAGGGAG	171400	4816,2
20f-46G	20	6FAM-CAAAACCAAGGAGGGAGUGG	248100	7121,6
20f-46A	20	6FAM-CAAAACCAAGAAGGGAGUGG	251000	7105,6
f-53G	13	6FAM-GGUGUGGCAACAG	160700	4786,1
f-53A	13	6FAM-GGUGUGACAACAG	163600	4770,1
20f-53G	20	6FAM-GCAUGGUGUGGCAACAGUGG	233500	7068,5
20f-53A	20	6FAM-GCAUGGUGUGACAACAGUGG	236400	7052,5

1.10.4 Oligonukleotydy antysensowe

Nazwa	Długość	Sekwencja w orientacji 5'-3'	Współczynnik ekstynkcji ($M^{-1}cm^{-1}$)	Masa cząsteczkowa (Da)
Ia1	7	$A^M C^M G^M G^L C^M C^M U^M$	63600	2275,5
Ia2	10	$C^M A^M C^M G^M G^L C^M C^M U^M U^M C^M$	89620	3234,2
aKW	13	$C^L A^M C^L \text{acggcct} U^L C^M G^L$	120920	4053,7
aKM	13	$C^L A^M C^L \text{acgacct} U^L C^M G^L$	123680	4037,7
a1	13	$C^L A^M C^L \text{acggcct} U^L C^M G^L$	117660	4013,7
a3	13	$C^L A^M C^L \text{acggcgt} U^L C^M G^L$	125220	4093,7
a6	13	$C^L A^M C^L \text{acgaggt} U^L C^M G^L$	131740	4117,8
a8	13	$C^L A^M C^L \text{accagct} U^L C^M G^L$	123020	4037,7
a12	13	$C^L A^M C^L \text{acggcga} U^L C^M G^L$	130620	4102,7
a13	13	$C^L A^M C^L \text{cgggcct} U^L C^M G^L$	117880	4069,7
a14	13	$C^L A^M C^L \text{aggacct} U^L C^M G^L$	121200	4077,7
a15	13	$C^L A^M C^L \text{acgacga} U^L C^M G^L$	127200	4086,8
a16	13	$C^L A^M C^L \text{tggacct} U^L C^M G^L$	115200	4068,7
aWBrG	13	$C^L A^M C^L \text{acg}^{8Br} \text{gcct} U^L C^M G^L$	120920	4132,5
aMBrG	13	$C^L A^M C^L \text{ac}^{8Br} \text{gacct} U^L C^M G^L$	123680	4116,5
a17	13	$C^L A^M C^L \text{caccttc} G^L U^M C^L$	115470	3986,5
a18	13	$C^L A^M C^L \text{gagcttc} G^L U^M C^L$	122990	4066,5
1a	12	$C^L A^M C^L \text{acgcct} U^L C^M G^L$	110220	3724,3
2a	14	$C^L A^M C^L \text{acgaacct} U^L C^M G^L$	135640	4350,7
aa13	10 (13)	$C^L A^M C^L \text{sp18acct} U^L C^M G^L$	92820	3450,2
aa14	11 (14)	$C^L A^M C^L \text{sp18acctt} C^L G^M U^L$	100900	3754,4
aa15	12 (15)	$C^L A^M C^L \text{sp18accttc} G^L U^M C^L$	109470	4043,8
aa16	13 (16)	$C^L A^M C^L \text{sp18accttcg} U^L C^M G^L$	120120	4372,8
aa17	14 (17)	$C^L A^M C^L \text{sp18accttcgt} C^L G^M C^L$	124420	4676,2
ab1	17	$G^M C^M A^M C^M A^M C^M G^M \text{acct} U^M C^M G^M U^M C^M$ G^M	163050	5493,7

ab2	17	$G^M C^M A^M C^M A^M C^M G^M \text{acctt} C^M G^M U^M C^M G^M$	161370	5477,7
ab3	17	$G^M C^M A^M C^M A^M C^M G^M \text{accttc} G^M U^M C^M G^M$	162350	5447,6
ab4	17	$G^M C^M A^M C^M A^M C^M G^M \text{accttcg} U^M C^M G^M$	161820	5417,6
20a13	20	$A^L C^M G^L \text{caccgggccttcgt} C^L G^M C^L$	181840	6227,1
20a12	20	$A^L C^M G^L \text{cacacggcgatcgt} C^L G^M C^L$	192120	6260,1
20a15	20	$A^L C^M G^L \text{cacacgacgatcgt} C^L G^M C^L$	194880	6244,1
20a16	20	$A^L C^M G^L \text{caccggaccttcgt} C^L G^M C^L$	184600	6211,1
Ib1	7	$U^M C^M U^M G^L C^M A^M A^M$	68000	2260,5
Ib2	10	$C^M U^M U^M C^M U^M G^L C^M A^M A^M A^M$	97950	3243,2
bKW	13	$C^L A^M U^L \text{cttctgc} A^L A^M A^L$	125620	4051,7
bKM	13	$C^L A^M U^L \text{cttctcc} A^L A^M A^L$	123740	4011,7
b1	13	$C^L A^M U^L \text{cttctcg} A^L A^M A^L$	127480	4051,7
b2	13	$C^L A^M U^L \text{cttctgg} A^L A^M A^L$	130100	4091,7
b7	13	$C^L A^M U^L \text{ctagacc} A^L A^M A^L$	137080	4069,7
b8	13	$C^L A^M U^L \text{gatctcc} A^L A^M A^L$	133240	4060,7
b9	13	$C^L A^M U^L \text{gatctgc} A^L A^M A^L$	135120	4100,7
b12	13	$C^L A^M U^L \text{cttgacc} A^L A^M A^L$	131200	4060,7
b8'	17	$C^L A^M C^L A^M U^L \text{gatctcc} A^L A^M A^L G^M A^L$	176900	5421,4
b12'	17	$C^L A^M C^L A^M U^L \text{cttgacc} A^L A^M A^L G^M A^L$	174860	5421,4
b8''	15	$C^L A^M U^L \text{gatctccaa} A^L G^M A^L$	158940	4702,9
b12''	15	$C^L A^M U^L \text{cttgaccaa} A^L G^M A^L$	156900	4702,9
bWBrG	13	$C^L A^M U^L \text{cttct}^{8Br} \text{gc} A^L A^M A^L$	125110	4130,5
b8BrG	13	$C^L A^M U^L \text{gatctcc}^{8Br} A^L A^M A^L$	132730	4139,5
1b	12	$C^L A^M U^L \text{cttctc} A^L A^M A^L$	116300	3722,3
2b	14	$C^L A^M U^L \text{cttctacc} A^L A^M A^L$	137000	4324,7
3b	14	$C^L A^M U^L \text{cttctccc} A^L A^M A^L$	131180	4300,7
ba13	10 (13)	$U^L C^M U^L \text{sp18ccaa} A^L G^M A^L$	106940	3484,0
ba14	11 (14)	$U^L C^M U^L \text{sp18ccaaa} G^L A^M A^L$	117440	3797,0

ba15	12 (15)	$U^L C^M U^L \text{sp18ccaaag} A^L A^M C^L$	123180	4086,4
ba16	13 (16)	$U^L C^M U^L \text{sp18ccaaag} A^L C^M A^L$	138640	4399,0
ba17	14 (17)	$U^L C^M U^L \text{sp18ccaaagaa} C^L A^M C^L$	142860	4716,5
ba17r	14 (17)	$C^L A^M C^L \text{atcttctcsp18} A^L G^M A^L$	136200	4699,2
ba19r	16 (19)	$C^L A^M C^L \text{atcttctcsp18ag} A^L A^M C^L$	154220	5301,6
ba21	10 (11)	$U^L U^M C^L \text{sp3ccaa} A^L G^M A^L$	107810	3277,9
ba22	11 (12)	$U^L U^M C^L \text{sp3ccaaa} G^L A^M A^L$	118310	3591,1
ba23	12 (13)	$U^L U^M C^L \text{sp3ccaaag} A^L A^M C^L$	124050	3880,3
ba24	13 (14)	$U^L U^M C^L \text{sp3ccaaaga} A^L C^M A^L$	139510	4193,5
ba25	14 (15)	$U^L U^M C^L \text{sp3ccaaagaa} C^L A^M C^L$	143730	4482,7
b13	13	$U^L U^M C^L \text{accaaag} A^L A^M C^L$	136190	4055,5
b14	13	$U^L U^M C^L \text{tcgaaag} A^L A^M C^L$	134830	4086,5
bUn1	13	$C^L A^M U^L \text{C}^U \text{ttctcc} A^L A^M A^L$	123230	4029,5
bUn2	13	$C^L A^M U^L \text{C}^U \text{T}^U \text{tctcc} A^L A^M A^L$	123230	4033,5
bUn3	13	$C^L A^M U^L \text{cttctc} \text{C}^U A^L A^M A^L$	123230	4029,5
bb1	17	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M U^M \text{ccaa} A^M G^M A^M A^M$ C^M	171710	5432,6
bb2	17	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M U^M \text{ccaaa} G^M A^M A^M C$ M	174750	5402,6
bb3	17	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M U^M \text{ccaaag} A^M A^M C^M$	169990	5372,6
bb4	17	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M U^M \text{ccaaaga} A^M C^M$	171710	5342,5
bb5	16 (17)	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M \text{sp3ccaa} A^M G^M A^M A$ $M C^M$	162570	5250,6
bb6	16 (17)	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M \text{sp3ccaaa} G^M A^M A^M C$ M	165610	5220,6
bb7	16 (17)	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M \text{sp3ccaaag} A^M A^M C^M$	160850	5190,6
bb8	16 (17)	$C^M A^M U^M C^M U^M U^M C^M \text{sp3ccaaaga} A^M C^M$	162570	5160,5
Ih1	7	$U^M U^M G^M C^L C^M A^M C^M$	64210	2236,5
Ih2	10	$U^M G^M U^M U^M G^M C^L C^M A^M C^M A^M$	98300	3259,2
hKW	13	$C^L U^M G^L \text{tgccac} A^L C^M C^L$	112600	4028,7

hKM	13	C ^L U ^M G ^L ttgtcac A ^L C ^M C ^L	115300	4043,7
h1	13	C ^L U ^M G ^L ttgtctg A ^L C ^M C ^L	113800	4074,7
h2	13	C ^L U ^M G ^L aagtcac A ^L C ^M C ^L	125200	4061,7
h3	13	C ^L U ^M G ^L ttgtgac A ^L C ^M C ^L	118000	4083,7
h4	13	C ^L U ^M G ^L ttctcac A ^L C ^M C ^L	111800	4003,7
h5	13	C ^L U ^M G ^L ttgcctg A ^L C ^M C ^L	116110	4059,7
h6	13	C ^L U ^M G ^L aagccac A ^L C ^M C ^L	127050	4046,7
h7	13	C ^L U ^M G ^L ttgtgtc A ^L C ^M C ^L	118890	4074,7
h8	13	C ^L U ^M G ^L ttgtctc A ^L C ^M C ^L	115230	4034,7
h9	13	G ^L U ^M U ^L ctcacac C ^L A ^M U ^L	124610	3999,3
h10	13	G ^L U ^M U ^L gtgacac C ^L A ^M U ^L	132770	4079,3
hUN1	13	C ^L A ^M C ^L T^Ugtgtc A ^L C ^M A ^L	125200	4100,7
hUN2	13	C ^L A ^M C ^L T^UG^Uttgtc A ^L C ^M A ^L	125200	4118,7
hUN3	13	C ^L A ^M C ^L tgttgtC^U A ^L C ^M A ^L	125200	4099,8
Id1	7	U ^M G ^M A ^M C ^L G ^M A ^M U ^M	72200	2300,6
Id2	10	G ^M A ^M U ^M G ^M A ^M C ^L G ^M A ^M U ^M C ^M	106440	3322,3
dKW	13	U ^L G ^M A ^L tgacgat C ^L A ^M C ^L	133260	4116,8
dKM	13	U ^L G ^M A ^L tgatgat C ^L A ^M C ^L	134280	4131,8
d1	13	U ^L G ^M A ^L tgacgta C ^L A ^M C ^L	135220	4116,8
d2	13	U ^L G ^M A ^L tgatgta C ^L A ^M C ^L	136240	4131,8
d4	13	U ^L G ^M A ^L acatgat C ^L A ^M C ^L	136280	4100,8
d5	13	U ^L G ^M A ^L acacgat C ^L A ^M C ^L	135260	4085,8
d6	13	U ^L G ^M A ^L tgaggat C ^L A ^M C ^L	137020	4156,8
d7	13	U ^L G ^M A ^L tctgcat C ^L A ^M C ^L	124000	4067,7
d8	13	U ^L G ^M A ^L tgacgaa C ^L A ^M C ^L	137720	4125,8
d9	13	U ^L G ^M A ^L tgatgaa C ^L A ^M C ^L	138740	4140,8
d10	13	U ^L G ^M A ^L tgacgtt C ^L A ^M C ^L	128880	4107,8
d11	13	U ^L G ^M A ^L tgatgtt C ^L A ^M C ^L	129900	4122,8

d12	13	$U^L G^M A^L \text{tcacgat} C^L A^M C^L$	130220	4076,7
d13	13	$U^L G^M A^L \text{tcatgat} C^L A^M C^L$	131240	4091,8
d14	13	$U^L G^M A^L \text{agacgat} C^L A^M C^L$	139440	4125,8
d15	13	$U^L G^M A^L \text{agatgat} C^L A^M C^L$	140460	4140,8
d16	13	$A^L U^M G^L \text{ttgatca} C^L U^M G^L$	132640	4108,7
d17	13	$A^L U^M G^L \text{atcatca} C^L U^M G^L$	135220	4077,7
1d	12	$U^L G^M A^L \text{tgagat} C^L A^M C^L$	126320	3827,4
2d	14	$U^L G^M A^L \text{tgaatgat} C^L A^M C^L$	146240	4444,8
da13	10 (13)	$U^L G^M A^L \text{sp18tgat} C^L A^M C^L$	102400	3529,3
da14	11 (14)	$U^L G^M A^L \text{sp18tgatca} C^L U^M G^L$	113140	3819,2
da15	12 (15)	$U^L G^M A^L \text{sp18tgatca} C^L U^M G^L$	123730	4148,6
da16	13 (16)	$U^L G^M A^L \text{sp18tgatcac} U^L G^M U^L$	132960	4438,4
da17	14 (17)	$U^L G^M A^L \text{sp18tgatcact} G^L U^M C^L$	139630	4742,0
db1	18	$G^M U^M G^M A^M U^M G^M A^M \text{tgat} C^M A^M C^M U^M G^M$ $U^M C^M$	184400	5893,9
db2	18	$G^M U^M G^M A^M U^M G^M A^M \text{tgatca} C^M U^M G^M U^M$ C^M	186000	5863,9
db3	18	$G^M U^M G^M A^M U^M G^M A^M \text{tgatca} C^M U^M G^M U^M$ C^M	186000	5833,9
db4	18	$G^M U^M G^M A^M U^M G^M A^M \text{tgatcac} U^M G^M U^M C^M$	185470	5803,8
20dKW	20	$A^L G^M G^L \text{tgatgacgatcact} G^L U^M C^L$	204170	6315,1
20dKM	20	$A^L G^M G^L \text{tgatgatgatcact} G^L U^M C^L$	205190	6330,2
20d1	20	$A^L G^M G^L \text{tgatgacgtacact} G^L U^M C^L$	204530	6315,1
20d2	20	$A^L G^M G^L \text{tgatgatgtacact} G^L U^M C^L$	205550	6330,2
20dx	20	$A^L G^M G^L \text{tgatgacgatcaga} G^L U^M C^L$	214370	6364,2
Ie1	7	$U^M C^M U^M U^L C^M U^M G^M$	52110	2214,3
Ie2	9	$C^M A^M U^M C^M U^M U^L C^M U^M G^M$	72180	2876,7
eKM	13	$C^L A^M U^L \text{ctcctgc} A^L A^M A^L$	124540	4036,5
e1	13	$C^L A^M U^L \text{ctcctcg} A^L A^M A^L$	126400	4036,5
e2	13	$C^L A^M U^L \text{cttctcg} A^L A^M A^L$	127480	4051,5

e3	13	C ^L A ^M U ^L gacctgc A ^L A ^M A ^L	133460	4085,5
Ik2	10	C ^M C ^M C ^M U ^M C ^L C ^M U ^M U ^M G ^M G ^M	87090	3211,2
Ik1	7	C ^M C ^M U ^M C ^L C ^M U ^M U ^M	58360	2173,5
kKW	13	C ^L U ^M C ^L cctcctt G ^L G ^M U ^L	110990	3996,4
kKM	13	C ^L U ^M C ^L ccttctt G ^L G ^M U ^L	112070	4011,5
k1	13	C ^L U ^M C ^L ggtcctt G ^L G ^M U ^L	119370	4076,5
k2	13	C ^L U ^M C ^L ggttctt G ^L G ^M U ^L	120450	4091,5
k3	13	C ^L U ^M C ^L cctccaa G ^L G ^M U ^L	120450	4014,5
k4	13	C ^L U ^M C ^L ccttcaa G ^L G ^M U ^L	121350	4029,5
k5	13	C ^L C ^M C ^L atcttgg U ^L U ^M U ^L	120790	4021,3
k6	13	C ^L C ^M C ^L ttgttgg U ^L U ^M U ^L	118830	4052,3
kUN1	13	C ^L A ^M C ^L T ^U cccttc U ^L U ^M G ^L	113170	3999,4
kUN2	13	C ^L A ^M C ^L T ^U C ^U ccttc U ^L U ^M G ^L	113170	4017,4
kUN3	13	C ^L A ^M C ^L tccctt C ^{Un} U ^L U ^M G ^L	113170	3998,5

1.10.5 Startery do reakcji PCR i qPCR

Nazwa	Długość	Sekwencja w orientacji 5' – 3'	Cel
SP	22	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	Sekwencjonowanie plazmidów
AKT F	18	AGGCACCAGGGCGTGATG	qPCR – gen referencyjny
AKT R	21	TGATCTGGGTCATCTTCTCGC	
GFP F	19	GCTGACCCTGAAGTTCATC	qPCR – gen badany
GFP R	19	GCTCCTGGACGTAGCCTTC	
pInsF	17	GCTAGCGTGTTCTTTGC	PCR kolonijny – weryfikacja klonów, gen APP
pInsR	17	GGATCCACCAAGGTGAT	
692MF	22	GTGTTCTTTGGAGAAGATGTGG	
692MR	22	ACCAAGGTGATGATGATCACTG	PCR kolonijny – weryfikacja
Ins4R	22	CCTTTCCTTCTGCTCGAAATTG	

Ins4F	16	CTCGGCGTGGCCTAGC	klonów, gen SOD1
Ins53F	23	CACAAAAGAGGGTGTTCTCTATG	PCR kolonijny – weryfikacja klonów, gen SNCA
Ins53R	22	CCATTGTGCACTTGCTCTTTGG	

1.11 Akcesoria dodatkowe

- Klisze fotograficzne X-Ray XBM 30x40 cm, **Retina**
- Osłona z plexi 10mm, do pracy z radioaktywnością
- 96-dołkowe płytki PCR, **Bio-rad**
- Plastik do hodowli komórkowej, **Greiner Bio-One**
- Płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ 0,25 mm (20x20 cm), **Merck**
- Kolumny z silanizowanym podłożem Sep-pak, **Waters**
- Kolumny illustra NAP-25, **GE Healthcare**
- Parafilm, **Sigma-Aldrich**
- Olej silikonowy, **Sigma-Aldrich**

1.12 Aparatura

- syntetyzer MerMade12, **BioAutomation Corporation**
- spektrofotometr UV-VIS NanoDrop 2000, **ThermoScientific**
- spektrofotometr UV-VIS z termoprogramatorem V-650, **Jasco**
- spektrofotometr UV-VIS z termoprogramatorem DU-640, **Beckmann**
- skaner radioaktywności i fluorescencji FLA-5100, **Fuji**
- licznik scyntylicyjny MicroBeta2, **PerkinElmer**
- spektrometr MALDI-ToF Autoflex, **Bruker**
- automatyczny licznik komórek TC20, **Bio-rad**
- termocykler C1000, **Bio-rad**
- termocykler C-1000 Touch CFX96 Real-TimeSystem, **Bio-rad**
- wirówka 5430R z wymiennymi rotorami, **Eppendorf**
- wirówka Universal320R z wymiennymi rotorami, **Hettich Zentrifugen**
- koncentrator próżniowy z wymrażaczem CentriVap, **Labconco**

- komora laminarna z wertykalnym przepływem powietrza Steril-BioBan, **Angelantoni LifeScience**
- inkubator z kontrolą stężenia CO₂, INCO 153, **Memmert**

1.13 Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe do analizy danych

- Meltwin 3.5 (termodynamika)
- RNA Structure 5.1
- Fuji Multi Gauge 3.0 (analiza żeli)
- Bio-rad CFX Manager 3.1 (real-time PCR)
- OriginPro 8 (statystyka)

2 METODY

2.1 Synteza oligonukleotydów

Wszystkie oligonukleotydy RNA, modyfikowane RNA oraz oligonukleotydy mieszane typu gapmer, a także startery do PCR i Real-Time PCR, były syntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, metodą amidofosforynową, na podłożu stałym, z wykorzystaniem syntetyzera MerMade12 firmy BioAutomation. Stosowano podłoże uniwersalne, synteza prowadzona była w skali 1 μM. Do syntezy wykorzystywano dostępne handlowo amidofosforyny RNA, DNA, 2'OMe RNA, LNA oraz 6-FAM. Amidofosforyn dla 8-bromodeoksyguanozyny został zsyntetyzowany w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych.

2.2 Odblokowanie oligonukleotydów nie zawierających naturalnego RNA (startery DNA, gapmery, oligonukleotydy antysensowe typu inhibitor)

Odblokowanie prowadzono w roztworze 32% amoniaku. Podłoże zalewano 1,5 ml wspomnianego roztworu i inkubowano przez około 16h (pozostawiano przez noc), w temperaturze 55°C. Oligonukleotydy zawierające 8-bromodeoksyguanozynę były odblokowywane w temperaturze pokojowej przez 24-36h. Po tym czasie ostrożnie zbierano płyn znad podłoża i przenoszono do czystej probówki, podłoże przepłukiwano wodą dwukrotnie po 500μl, w celu wymycia resztek oligonukleotydu, wodny roztwór znad podłoża łączono z wcześniej zebrany roztworem oligonukleotydu i odparowywano do sucha.

2.3 Odblokowanie oligorybonukleotydów

Odblokowanie prowadzono w roztworze 32% amoniak : 96% etanol, w stosunku 3:1. Podłoże zalewano 2 ml wspomnianego roztworu i inkubowano przez około 16h (pozostawiano przez noc), w temperaturze 55°C. Następnie płyn znad podłoża przenoszono do czystych probówek, podłoże przepłukiwano dwukrotnie po 500 µl wody, wodny roztwór znad podłoża łączono z wcześniej zebrany roztworem oligonukleotydu i odparowywano do sucha. Następnie w celu usunięcia blokad sililowych z grupy hydroksylowej przy węglu 2', osad po odparowaniu rozpuszczono w roztworze fluorku trójetyloamoniowego w DMF i inkubowano 2h w temperaturze 55°C. Po tym czasie strącano RNA z roztworu dwoma objętościami (4 ml) n-butanolu, przez godzinę w temperaturze -20°C, po czym wirowano 10 minut w temperaturze 4°C, z prędkością 5000 rpm, supernatant zlewano a osad odparowywano do sucha.

2.4 Oczyszczanie oligonukleotydów

Wszystkie stosowane w eksperymentach oligonukleotydy antysensowe, oraz cząsteczki RNA i DNA nie dłuższe niż 18 nukleotydów, oczyszczane były metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), na płytkach zawierających żel krzemionkowy 60 F₂₅₄. Stosowano układ rozwijający n-propanol/amoniak/woda w proporcji objętościowej 55:35:10 (v/v/v) dla oligomerów 13-nukleotydowych i krótszych. Pozostałe oligonukleotydy (14-18 –nukleotydowe) rozdzielały się przy zastosowaniu tej samej fazy rozwijającej, w proporcji objętościowej 54:36:10 (v/v/v). Na płytkę наносono zwykle całość materiału po syntezie, rozpuszczoną w 150-200 µl wody miliQ. Rozdział prowadzono 5-6h. Po tym czasie płytkę sprawdzano pod lampą UV ($\lambda = 260$ nm) i wydrapywano zwykle najintensywniejszy i najwolniej migrujący prążek. Oligonukleotydy eluowano z silikażelu, płuczac go 3-krotnie po 2 ml wody miliQ. Płukania łączono i wodny roztwór oligonukleotydu odparowywano pod próżnią. Otrzymany osad oligonukleotydu rozpuszczano w końcowej objętości 500 µl wody i mierzono stężenie, wykorzystując spektrofotometr NanoDrop.

Oligonukleotydy DNA i RNA o długości powyżej 18 nukleotydów oczyszczano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych 10% i 12% (w/v), w warunkach denaturujących. Następnie żel przenoszono na folię spożywczą, układano na płytce silikażelowej i analizowano pod lampą UV. Skalpelem wycinano fragment żelu, zawierający prążek odpowiadający oczyszczanemu oligonukleotydowi, przenoszono go do czystej probówki i zalewano 0,3 M roztworem octanu sodu, objętością całkowicie przykrywającą żel w probówce (około 2,5-3 ml), pozostawiając do elucji. Prowadzono dwukrotne wymywanie

z żelu w temperaturze 4°C, następnie próby strącano, odwirowywano, supernatant zlewano a osad suszono i rozpuszczano w 500 µl wody. Stężenie określano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm, wykorzystując spektrofotometr NanoDrop.

2.5 Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących

Technikę tę wykorzystywano do oczyszczania cząsteczek dłuższych niż 18 nukleotydów po syntezie chemicznej, oraz po reakcji transkrypcji in vitro (żel preparatywny o grubości 1mm), a także do rozdzielania produktów trawień rybonukleazą H i oczyszczania oligonukleotydów po znakowaniu radioizotopowym (żel analityczny o grubości 0,5mm). Stosowano żele poliakrylamidowe o usieciowaniu akrylamid/N'N'-metylenobisakrylamid 29:1 i procentowości wagowo-objętościowej 8, 10, 12 lub 16, w zależności od długości rozdzielanych cząsteczek. Żel zawierał 8M mocznik jako czynnik denaturujący. W zależności od typu żelu (preparatywny lub analityczny) i wielkości płyt, na jakich prowadzony był rozdział, odmierzano odpowiednią objętość płynnego żelu (60-150 ml) do zlewki i dodawano 10% nadsiarczan amonu w ilości 0,6% (v/v) oraz TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina) w ilości 0,04% (v/v). Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji (minimum 2h). Następnie płyty umieszczano w aparacie do elektroforezy, układ zalewano buforem 1xTBE i prowadzono pre-elektroforezę przez 15 minut. Po tym czasie nanoszono próby do kieszonek żelu i prowadzono właściwy rozdział przy stałej mocy prądu, ustawianej, w zależności od wielkości żelu, między 30-40W. Rozdział prowadzono 2-3h, kontrolując go w oparciu o migrację barwników OrangeG, BB i XC.

2.6 Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

Technikę tę wykorzystywano w metodzie EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) w celu wyznaczenia stałej wiązania dupleksów. Stosowano żele poliakrylamidowe o usieciowaniu akrylamid/N'N'-metylenobisakrylamid 29:1 i procentowości wagowo-objętościowej 12 i 16, oraz bufor zawierający chlorek magnezu w stężeniu 8 mM. Polimeryzację przeprowadzano w obecności 0,75% (v/v) nadsiarczanu amonu i 0,05% (v/v) TEMED-u. 15-minutowa pre-elektroforeza poprzedzała właściwy rozdział elektroforetyczny, prowadzony przy stałej mocy prądu 20W. Rozdział prowadzono 6-9h, kontrolując go w oparciu o migrację barwników BB i XC.

2.7 Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

Fragmenty żelu, zawierające kwasy nukleinowe, umieszczano w probówkach, zalewano 0,3 M octanem sodu o pH 5,5 (objętość zależała od wielkości wyciętego fragmentu żelu, który musiał być przykryty roztworem eluującym) i inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 4 °C, przez 2h. Następnie eluat zbierano do czystej probówki, a żel ponownie zalewano 0,3 M octanem sodu i pozostawiano przez noc (około 16h) do drugiej elucji. W zależności od objętości, eluaty z poszczególnych wymywań łączono ze sobą przed strącaniem, lub strącano osobno.

2.8 Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu, po elucji z żelu poliakrylamidowego

Strącanie przeprowadzano 2,5-3 objętościami 96% etanolu, w temperaturze -20°C przez minimum 2h. Następnie próby wirowano przez 30 min, w temperaturze 4°C, przy maksymalnej prędkości wirówki. Supernatant usuwano, a osad suszono pod próżnią, po czym rozpuszczano w wodzie jakości miliQ.

2.9 Elektroforeza w żelach agarozowych

Technikę tę wykorzystywano do rozdziłu produktów reakcji PCR, a także do kontroli jakości RNA po izolacji z komórek. Przygotowany żel agarozowy umieszczano w aparacie do elektroforezy, zalewano 0,5x stężonym roztworem TBE, umieszczano próby w kieszonkach żelu, po czym przykładano napięcie. Rozdział prowadzono przy napięciu 100 V przez 40-50 minut.

2.10 Ekstrakcja fenol-chloroform

Metodą tą oczyszczano produkty reakcji PCR, trawienia restrykcyjnego, defosforylacji i izolacji plazmidów, które miały służyć do dalszych eksperymentów. Roztwór poreakcyjny dopełniano do objętości 100 µl, dodawano 50 µl fenolu i 50 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v) i krótko wytrząsano. Mieszaninę wirowano przez 5 minut przy 5000 rpm, usuwano fazę organiczną, do fazy wodnej dodawano 100 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v) w celu usunięcia śladów fenolu, wytrząsano i wirowano. DNA obecne w fazie wodnej wytrącano przez dodanie 3M octanu sodu o pH 5,0 do końcowego stężenia 0,3 M i trzy objętości 96% etanolu schłodzonego do 4°C, przez minimum 2h w temperaturze -20°C. Następnie mieszaninę wirowano przy 12000 rpm przez

30 minut w temperaturze 4°C, supernatant usuwano, osad suszono pod próżnią, rozpuszczano w czystej wodzie i mierzono stężenie.

2.11 Analiza MALDI-ToF-MS

Weryfikację oligonukleotydów po syntezie przeprowadzano metodą spektrometrii mas, z wykorzystaniem spektrometru Bruker MALDI-TOF Autoflex. Wodny roztwór oczyszczonego oligonukleotydu, w ilości 0,5 µl, наносono na stalową płytkę mikrotitracyjną MTP 384, pokrywano identyczną objętością matrycy, którą był nasycony roztwór trihydroksyacetonu (THAP), i pozostawiano do współkrystalizacji w temperaturze pokojowej przez ok. 10-15 min. Następnie płytkę umieszczano w spektrometrze i przeprowadzano pomiar. W wyniku analizy otrzymywano widmo prezentujące stosunek masy do ładunku dla jonów powstałych w procesie jonizacji próbki. Widma potwierdzały masy syntezowanych oligonukleotydów i rozstrzygały wątpliwości w przypadku konieczności wyodrębnienia z żelu/ płytki TLC dwóch podobnie migrujących prążków.

2.12 Wyznaczanie parametrów termodynamicznych dupleksów metodą topień UV (*ang. UV melting*)

Metoda wykorzystuje efekt hiperchromowy występujący przy termicznej denaturacji kwasów nukleinowych. Dwa oligonukleotydy: RNA i oligonukleotyd antysensowy, mieszano ze sobą w stosunku równomolowym, do uzyskania stężeń, obliczonych na podstawie arkusza topień (Załączniki, Tabela 44), przygotowanego przez zespół prof. D. Turner'a z Uniwersytetu w Rochester (USA). Pomiar przeprowadzano z reguły dla 13-nukleotydowych RNA (sporadycznie dla 15-, i 17-merów), i tej samej długości oligonukleotydów antysensowych. Jedynie cząsteczki inhibitorów (podejście tandemowe) tworzyły z RNA dupлексы niepełnej długości. Powstałą mieszaninę odparowywano do sucha i rozpuszczano w buforze do topień, zawierającym chlorek sodu jako czynnik sprzyjający hybrydyzacji. Stężenie chlorku sodu w buforze dla danego dupлексу RNA/oligonukleotyd antysensowy zależało od długości dupлексу i zawartości par G-C – im dłuższy dupлекс i więcej zawierał par G-C, tym niższe stężenie chlorku sodu należało zastosować, by zaobserwować efekt hiperchromowy. Dla nowych dupлексов stężenie dobierano eksperymentalnie spośród trzech wartości 10 mM, 100 mM, 1 M. Dla wszystkich analizowanych w niniejszej pracy dupлексов, stosowano bufor zawierający 100 mM chlorek sodu. Roztwory dupлексов w buforze do topień umieszczano w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 0,1, 0,5 i 1 cm i przeprowadzano pomiary

wartości absorbancji w funkcji temperatury, w zakresie 4-93°C, przy długości fali 260 nm, jednocześnie dla trzech różnych stężeń. Kuwety zatykano olejem silikonowym, by roztwór nie odparowywał podczas ogrzewania. Szybkość zmiany temperatury wynosiła 1°C/minutę, odczyt absorbancji następował co 0,5 minuty. Po pomiarze roztwory dupleksu odzyskiwano na parafilmie (czyszczenie z oleju) i rozcieńczano zgodnie z arkuszem, do otrzymania trzech kolejnych stężeń. Cykl ten powtarzano 2 razy, uzyskując w efekcie pomiary dla 9 różnych stężeń dupleksu z zakresu 10^{-3} - 10^{-6} M. Pomiary przeprowadzano na dwóch spektrofotometrach UV-VIS z kontrolerami temperatury: Beckmann DU640 lub Jasco V-650. Dla każdego z analizowanych stężeń uzyskiwano krzywą topnienia. Na podstawie krzywych dla 9 stężeń danego dupleksu, wykorzystując oprogramowanie Meltwin 3.5, wyznaczano parametry termodynamiczne dwoma niezależnymi metodami: z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupleksu, oraz na podstawie średniego dopasowania krzywej do uzyskanych punktów pomiarowych. Kluczowe dla dalszych wniosków i porównań były energia swobodna Gibbsa w temperaturze 37°C (ΔG°_{37} , kcal/mol) oraz temperatura topnienia przeliczana dla stężenia 10^{-4} M (T, °C).

2.13 Znakowanie RNA izotopem ^{32}P

RNA znakowano na 5'-końcu, w reakcji przeniesienia grupy fosforanowej z γ - ^{32}P -ATP na wolną grupę 5'-hydroksylową RNA, katalizowanej przez rekombinowaną kinazę polinukleotydową T4. Oczyszczone RNA w ilości 50pM umieszczano w 1x stężonym buforze do znakowania (dołączonym przez producenta), w obecności 10-20 μCi [γ - ^{32}P] ATP o aktywności 4000-5000 Ci/mmol i 10 U kinazy T4. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C. Produkty znakowania rozdzielano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, dla pewności posiadania homogennego, jednakowej długości, znakowanego RNA. Wykonywano autoradiografię, po czym żądany prążek wycinano i eluowano z żelu, strącano, osuszano osad i rozpuszczano w 50 μl wody. Pomiar radioaktywności wyznakowanego kwasu nukleinowego wykonywano z wykorzystaniem licznika scyntylicyjnego MicroBeta2. Raz wyznakowaną cząsteczkę używano przez ok. 2-3 tygodnie, jeśli nie wykazywała oznak degradacji.

2.14 Znakowanie RNA 6-karboksyfluoresceiną (6-FAM)

Znakowanie RNA fluoresceiną odbywało się na etapie syntezy oligonukleotydu. Na maszynie umieszczano amidofosforyn 6-FAM i przyłączano go do podłoża jako pierwszy

„nukleotyd”. Odblokowanie i oczyszczanie tak znakowanego RNA przeprowadzano w standardowy sposób (jak zwykle RNA).

2.15 Hydroliza alkaliczna RNA

Znakowane radioizotopowo RNA w ilości 10 000 cpm, lub znakowane fluorescencyjnie RNA w ilości 1 pmola, umieszczano w buforze do hydrolizy alkalicznej i inkubowano przez 20 minut w temperaturze 95°C. Po tym czasie do prób dodawano roztwór obciążający do rozdzielu elektroforetycznego i umieszczano w suchym lodzie. Całość reakcji nanoszono na żel, stanowiła ona marker długości RNA.

2.16 Hydroliza RNA rybonukleazą T1

Znakowane radioizotopowo RNA w ilości 10 000 cpm, lub znakowane fluorescencyjnie RNA w ilości 1 pmola, umieszczano w buforze T1 i denaturowano w temperaturze 80°C, przez 3 minuty, a następnie dodawano 1U rybonukleazy T1 i inkubowano 10 minut w temperaturze 55°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie barwnika obciążającego zawierającego 25 mM EDTA i umieszczenie w suchym lodzie. Całość reakcji nanoszono na żel, stanowiła ona marker występowania guanozyny w badanym RNA.

2.17 Hydroliza dupleksów RNA/ASO rybonukleazą H

Wyznakowane radioizotopowo lub fluorescencyjnie cząsteczki RNA długości 13, 20 lub 99 nukleotydów mieszano z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi w ustalonej proporcji, w buforze H. Powstałą mieszaninę denaturowano termicznie przez 3 min w 80°C, w celu rozplecenia ewentualnych motywów struktury drugorzędowej pojedynczych nici. Następnie roztwór inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, w celu renaturacji i wytworzenia struktury dupleksu. Po tym czasie dodawano rybonukleazę H, w ilości 0.4 U/reakcję. Trawienie prowadzono w temperaturze 37°C, przez 20 minut, po czym próby umieszczano w suchym lodzie, w celu zatrzymania reakcji. Do prób, w proporcji 1:1 dodawano roztwór obciążający, a następnie nanoszono je na 16% żel poliakrylamidowy, w celu rozdzielania produktów reakcji. Elektroforezę prowadzono 2,5-3h przy mocy prądu 35W. Czas i dawka enzymu zostały zoptymalizowane w oddzielnym eksperymencie i zostały przyjęte jako wystarczające do całkowitej hydrolizy RNA w obecności w pełni komplementarnego oligonukleotydu antysensowego dla większości cząsteczek.

2.18 Wyznaczanie stałej wiązania dupleksów RNA/ASO metodą EMSA (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Do eksperymentu używano cząsteczek RNA wyznakowanych na końcu 5' radioizotopowo (10 000 cpm) lub fluorescencyjnie (10 μ M). Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l. Stałą stężenie RNA (1 μ M) i oligonukleotyd antysensowy w rosnącym stężeniu z przedziału 0,025 μ M -1 μ M, mieszano w buforze hybrydizacyjnym (bufor H), denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 80°C, po czym studzono w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie prowadzono hybrydizację przez 30 minut w temperaturze 37°C, po czym do próby dodawano roztwór obciążający z glicerolem (warunki niedenaturujące) i bezzwłocznie наносzono na żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w warunkach niedenaturujących, w 1x stężonym buforze TBM, przez 6-8h. Po zakończeniu elektroforezy żel wizualizowano używając ekranów odwzorowujących, jeśli RNA znakowane było radioizotopowo, lub bezpośrednio skanowano z wykorzystaniem skanera radioaktywności i fluorescencji Fuji FLA-5100. Obraz żelu analizowano w programie MultiGauge 3.0 (Fuji), określając procentowy udział monomeru RNA i duplexu RNA/ASO w zależności od stężenia ASO. Uzyskane dane posłużyły do wyznaczenia stałej wiązania duplexu.

2.19 Przygotowanie matryc do transkrypcji *in vitro*

Dwuniciowe DNA, służące do otrzymywania RNA w reakcji transkrypcji *in vitro*, przygotowano w reakcji PCR, w której matrycę stanowiły 99-nukleotydowe jednoniciowe DNA, zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, lub warianty plazmidu pEGFP zawierające wklonowane, 98-nukleotydowe fragmenty genów SOD1 i SNCA. Wykorzystano startery wprowadzające promotor dla polimerazy T7. Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała 100x rozcieńczone DNA matrycowe (jedno- lub dwuniciowe), 200 ng każdego ze starterów, 3 mM MgCl₂, mieszaninę czterech dNTP o stężeniu 0,2 mM każdy, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem oraz 5U Taq polimerazy. Szczegółowe kombinacje matryc i starterów potrzebnych do otrzymania poszczególnych cząsteczek przedstawia poniższa tabela.

Produkt PCR (matryca do transkrypcji)	Matryca w reakcji PCR (100x rozcieńczona)	Starter F	Starter R	Temperatura przyłączania starterów
WT119	ssDNA DWWT (99nt)	T7FWD	DWR	56°C
DMG692	ssDNA G692 (99nt)	T7FWDMt	DWR	
DMI717	ssDNA I717 (99nt)	T7FWD	DWRMt	54°C
DWA4C	Plazmid pDWA4C	T7WA4C	RevA4C	59°C
DMV4U	Plazmid pDMV4U			
DWA53G/DWE46G	Plazmid pDWA53G/DWE46G	T7W46	Rev46	54°C
DMT53A	Plazmid pDMT53A			
DMK46A	Plazmid pDMK46A			

Reakcja PCR przebiegała według następującego protokołu:

Predenaturacja	2 min	95°C
30 cykli:		
Denaturacja	1 min	95°C
Przyłączanie starterów	30 s	54 -59°C
Synteza	40 s	72°C
Synteza końcowa	7 min	72°C

Otrzymane produkty PCR oczyszczano metodą fenol-chloroform i przekazywano do sekwencjonowania, do Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu.

2.20 Transkrypcja *in vitro*

RNA długości 102 nukleotydy otrzymywano z wykorzystaniem gotowych zestawów do transkrypcji *in vitro* Ambion T7-MEGAscript™ i Epicentre T7-Ampliscribe™. Jako matryce stosowano dwuniciowe DNA otrzymane w reakcji PCR. Mieszaninę reakcyjną składano w temperaturze pokojowej, zawierała ona 1x stężony bufor standardowo dostarczony z enzymem, cztery rodzaje trójfosforanów nukleozydów (dNTP) w stężeniu 3,75 mM każdy, inhibitor RNaz, guanozynę w stężeniu 6 mM w celu otrzymania RNA z wolną grupą hydroksylową na 5' końcu, T7 polimerazę oraz 2-3 µg matrycowego DNA. Reakcję prowadzono w objętości 20 µl, w temperaturze 37°C, przez 16h (pozostawiano na noc). Po zakończeniu reakcji, w celu usunięcia matrycowego DNA, dodawano 2U DNazy I i inkubowano 15 minut w temperaturze 37 °C. Transkrypty oczyszczano metodą elektroforezy

w 8% denaturującym żelu poliakrylamidowym, wycinano z żelu wizualizując w świetle UV, wymywano z żelu 0,3 M octanem sodu pH 5.0 i strącano. RNA przechowywano w -20°C rozpuszczone w sterylnej wodzie.

2.21 Konstrukcja insertów

Inserty odpowiadające ok. 100-nukleotdowym sekwencjom analizowanych genów przygotowywano w reakcji PCR. W równomolowej proporcji mieszano ze sobą dwa 74-nukleotydowe startery zachodzące na siebie 18-nukleotydowym fragmentem i prowadzono ich wydłużanie według następującego programu:

Predenaturacja	95°C	2 minuty
12 cykli:		
Denaturacja	95°C	1 minuta
Przylączanie starterów	53°C	40 sekund
Synteza	72 C	2 minuty
Synteza końcowa	72°C	7 minut

Mieszanina reakcyjna (50 µl) zawierała 100 pmoli każdego ze starterów, 3mM MgCl₂, mieszaninę czterech dNTP o stężeniu 0,2 mM każdy, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem oraz 5U Taq polimerazy. Produkt PCR był kontrolowany na 1% żelu agarozowym, a następnie oczyszczany w ekstrakcji fenol-chloroform. Powstała w ten sposób 130-nukleotydowa cząsteczka dwuniciowego DNA była sprawdzana przez sekwencjonowanie, przeprowadzane w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Prawidłowe cząsteczki poddawano trawieniu restrykcyjnemu, lub stanowiły matrycę do reakcji transkrypcji *in vitro*.

2.22 Klonowanie do plazmidu ekspresyjnego

2.22.1 Trawienie restrykcyjne

Pusty plazmid pEGFP (5 µg) oraz inserty przygotowane w reakcji PCR (2 µg) poddawano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi NheI i BamHI, generującymi lepkie końce. Zastosowanie wspomnianych enzymów pozwoliło umieścić insert możliwie najbliżej przed sekwencją markerowego białka GFP, eliminując z plazmidu miejsce wielokrotnego klonowania. Reakcję prowadzono w obecności obydwu enzymów jednocześnie, w buforze MULTI-CORE™ 1x stężonym, załączonym przez producenta, zapewniającym wysoką aktywność obydwu enzymom. Bufor zawierał 25 mM Tris-CH₃COOH pH 7.5, 100 mM octan

potasu, 10 mM octan magnezu, 1 mM DTT. Reakcję prowadzono w objętości 50 μ l, w temperaturze 37°C, przez 16h (pozostawiano na noc). Produkty trawienia oczyszczano metodą ekstrakcji fenol-chloroform i kontrolowano na żelu agarozowym 1% i 2%.

2.22.2 Defosforylacja końców plazmidu po trawieniu restrykcyjnym

W celu uniknięcia autoligacji plazmidu, po trawieniu restrykcyjnym poddawano go defosforylacji z wykorzystaniem alkalicznej fosfatazy cielęcej, usuwającej grupy fosforanowe z 5'- i 3'-końca DNA. 1-2 μ g plazmidu umieszczano w buforze do defosforylacji, załączonym przez producenta enzymu, w obecności 2U alkalicznej fosfatazy i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30-40 minut. Następnie zatrzymywano reakcję przez inkubację w 65°C przez 15 minut, i oczyszczano plazmid metodą ekstrakcji fenol-chloroform.

2.22.3 Ligacja

Defosforylowany, trawiony restrykcyjnie plazmid oraz insert mieszano w trzech stosunkach molowych 1:3, 1:10 i 1:15 (molowy nadmiar insertu). Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l, w 1x stężonym buforze załączonym przez producenta, zawierającym 40mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT oraz 0,5 mM ATP, w obecności T4 ligazy DNA (~500U), w temperaturze 22 °C, przez 1h.

2.23 Transformacja komórek kompetentnych metodą szoku cieplnego

Porcję komórek kompetentnych *E.coli* DH5 α (50 μ l) rozmrażano w lodzie przez 10 minut. Do rozmrożonych komórek dodano 5 μ l produktu ligacji (mieszanina poreakcyjna) i inkubowano w lodzie przez 45 minut. Następnie umieszczono komórki w bloku grzeijnym o temperaturze 42°C i inkubowano 2 minuty, po czym z powrotem przeniesiono do lodu na 5 minut. Po tym czasie, transformowanymi komórkami zaszczepiano 2 ml pożywki LB bez antybiotyku i inkubowano przez 1-1,5h w temperaturze 37°C. Przygotowaną w ten sposób zaszczepkę wysiewano na szalki Petriego (pożywka LB z kanamycyną o stężeniu 100 μ g/ml) w ilości 100 μ l i 300 μ l, i hodowano przez noc w temperaturze 37°C.

2.24 Selekcja klonów

Z porośniętej szalki losowo wybierano pojedyncze kolonie (klony), które nakłuwano tipsem i przenoszono do probówek 1,5 ml, zawierających 10 μ l sterylnej wody. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 95°C, po czym przenoszono na lód. Zniszczone termicznie komórki stanowiły matrycę w reakcji PCR,

z wykorzystaniem starterów specyficznych dla insertu. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 200 ng każdego z dwóch starterów, 3 mM MgCl₂, mieszanina czterech dNTP o stężeniu 0,2 mM każdy, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem oraz 5U Taq polimerazy. Reakcja przebiegała w objętości 25 µl z czego 5 µl stanowiła matryca w postaci ekstraktu komórkowego. Produkty PCR kontrolowano na 1,5% żelu agarozowym.

2.25 Amplifikacja prawidłowych klonów

Klony dające, w wyniku reakcji PCR, wyraźny prążek na wysokości ok. 100 par zasad, przesiewano do hodowli w skali mini. W tym celu odpowiednią kolonią zaszczepiano 2 ml pożywki LB z kanamycyną o stężeniu 50 µg/ml i hodowano przez noc w temperaturze 37°C. Następnego dnia przeprowadzano izolację plazmidów metodą lizy alkalicznej. W tym celu pobierano 1,5 ml hodowli, odwirowywano przy maksymalnych obrotach przez 5 minut, supernatant odrzucano, a osad komórkowy zawieszano w 100 µl buforu do lizy ALM I, krótko wytrząsając. Próby przenoszono na lód, gdzie dodawano 200 µl świeżo przygotowanego roztworu 1% SDS/0,2M NaOH o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszano i inkubowano 5 minut. Następnie dodawano 150 µl 7,5 M roztworu octanu amonu, mieszano i inkubowano w lodzie przez 20 minut. Po tym czasie próby wirowano przy maksymalnych obrotach, przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Supernatant zbierano do nowych probówek, zalewano 2 objętościami zmrożonego 96% etanolu i strącano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie próby wirowano przy maksymalnych obrotach wirówki przez 15 minut, supernatant odrzucano, a osad suszono pod próżnią. Osad rozpuszczano w 50 µl wody zawierającej 200 µg RNazy A, wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, zawirowywano, a następnie oczyszczano metodą ekstrakcji fenol-chloroform.

2.26 Rozmrażanie komórek *HeLa*

Pożywkę hodowlaną o zwiększonej zawartości FBS (30% v/v) ogrzano do temperatury 37°C i umieszczono w plastikowej butelce do hodowli adherentnych. Fiolkę zawierającą zamrożone komórki *HeLa* wyjęto z par ciekłego azotu, i umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, do momentu całkowitego rozmrożenia. Następnie przeniesiono rozmrożone komórki do przygotowanej wcześniej butelki hodowlanej zawierającej pożywkę i umieszczono w inkubatorze do hodowli.

2.27 Hodowla linii komórkowej *HeLa*

Komórki hodowano w warunkach 95% wilgotności, w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂, w butelkach o powierzchni adhezji 75 cm², w monowarstwie, do momentu osiągnięcia konfluencji ok. 90%. Medium bazowym było RPMI 1640, wzbogacone standardowo 10% płodową surowicą bydlęcą, 1x stężonym roztworem witamin MEM, oraz 1x stężonym roztworem antybiotyków (10 000 U/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny, 25 µg/ml amfoterycyny B).

2.28 Pasażowanie komórek

Pasaż wykonywano gdy stopień konfluencji komórek (pokrycia powierzchni naczynia, w którym wzrastały komórki) wynosił ponad 90%. Starą pożywkę usunięto za pomocą szklanej pipety podłączonej do pompki. Komórki przepłukano ogrzanym do temperatury 37°C, 1x stężonym roztworem PBS. Następnie monowarstwę zalano 1 ml 1x stężonego roztworu trypsyny z EDTA i umieszczono w cieplarni na ok. 2-3 minuty. Po tym czasie, delikatnie pukając dłonią o boczne ściany butelki, odklejono komórki od podłoża i zalano świeżą, ogrzaną do 37°C pożywką zawierającą FBS, który inaktywował działanie trypsyny. Zasysając kilkakrotnie roztwór komórek do pipety i wypychając go z niej na ścianki butelki, rozbijano agregaty komórkowe, w celu uzyskania jak największej liczby pojedynczych komórek, które mają dużo większą szansę na przyczepienie się do nowego podłoża, niż pozlepiane skupiska komórek. Następnie, w zależności od wielkości pasażu, pobierano odpowiednią objętość komórkowej zawiesiny i przenoszono ją do świeżej pożywki. Najczęściej wykonywano pasaże redukujące liczbę komórek dziesięciokrotnie, zwykle co 2-3 dni.

2.29 Mrożenie komórek *HeLa* (Bankowanie)

Przygotowano bank komórek *HeLa* przechowywany w ciekłym azocie. Komórki we wczesnym pasażu (ok. 2-3 pasaż), w dobrej kondycji, przy konfluencji ok. 90%, bez objawów zakażenia, przepłukiwano roztworem 1x PBS, odklejano od podłoża przez trypsynizację, po czym dodawano świeżej pożywki z FBS i wirowano przez 3 minuty z prędkością 1000 rpm. Pożywkę zbierano, a osad komórkowy rozpuszczano w 2 ml medium do mrożenia, i porcjowano do krioprobówek po 1 ml. Stężenie komórek wynosiło zwykle 2-3 mln/ml. Krioprobówki umieszczano w łaźni izopropanolowej, którą następnie przechowywano w temperaturze -80°C przez 24-48h. Po tym czasie zamrożone komórki przenoszono do

dewarów z ciekłym azotem, gdzie przechowywano je bezterminowo, do czasu ponownego użycia.

2.30 Posiew na płytkę wielodołkową

Komórki gotowe do pasażu (konfluencja >90%) przepłukiwano sterylnym roztworem 1x PBS i odklejano od powierzchni wzrostu przez trypsynizację. Do odklejonych komórek dodawano 5 ml medium hodowlanego z FBS (inaktywacja trypsyny) i przez kilkukrotne pipetowanie rozbijano agregaty komórkowe. Następnie zawiesinę komórek przenoszono do probówki typu Falcon i odwirowywano przy 1000 rpm przez 3 minuty. Pożywkę zbierano a osad z komórek rozpuszczano w 5 ml świeżej pożywki hodowlanej. Komórki zliczano przy użyciu automatycznego licznika komórek Biorad TC-20. Do jednego dołka wysiewano 10^5 komórek *HeLa*, dodając zawiesinę komórek do 500 μ l umieszczonej wcześniej w dołku pożywki hodowlanej. Płytkę przenoszono do inkubatora, gdzie komórki wzrastały przez noc.

2.31 Kotransfekcja komórek *HeLa* plazmidem i oligonukleotydami antysensowymi

Transfekcję przeprowadzano, gdy konfluencja komórek w pojedynczym dołku wynosiła nie mniej niż 85-90%.

W probówkach o pojemności 1,5 ml przygotowywano mieszaninę do transfekcji: 1 μ g plazmidu i 6-240 pmoli oligomeru antysensowego, uzupełniano do 50 μ l medium OPTI-MEM. Do 2 μ l odczynnika do lipofekcji (Lipofectamine 2000) dodawano 48 μ l medium OPTI-MEM i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie łączono roztwór lipofektaminy z przygotowaną mieszaniną do transfekcji, mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 20 minut (tworzenie micel). W międzyczasie przygotowywano komórki: z każdego dołka zbierano starą pożywkę, komórki przepłukiwano sterylnym roztworem 1x PBS, po czym każdy dołek z komórkami zalewano 500 μ l medium do transfekcji o temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę transfekcyjną (100 μ l) zwirowywano i podawano na dołek. Płytkę umieszczano w inkubatorze do hodowli. Transfekcję prowadzono przez 24h. Po tym czasie usuwano medium transfekcyjne, komórki przepłukiwano sterylnym roztworem 1x PBS, i w tymże roztworze oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym, w celu wstępnej oceny wydajności transfekcji. Następnie usuwano roztwór PBS, a komórki zalewano 500 μ l trizolu i zamrażano w -20°C.

2.32 Izolacja całkowitego RNA z komórek *HeLa*

Całkowite RNA z komórek *HeLa* izolowano metodą Chomczyńskiego i Sacchi. Zawartość płytki wielodołkowej (500 μ l roztworu komórek w trizolu) rozmrażano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie roztwór przenoszono z dołków do probówek o pojemności 1,5ml. Do każdej probówki dodawano 200 μ l mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1, mieszano 3-4 razy, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym wirowano przy 13500 rpm, w temperaturze 4°C, przez 15 minut. Zbierano fazę wodną i umieszczano ją w nowej probówce, a następnie dodawano 250 μ l izopropanolu i strącano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Próby wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 13500 rpm, supernatant odrzucano, a osad przemywano 500 μ l 75% etanolu. Ponownie wirowano próby przez 5 minut, w temperaturze 4°C, przy 13500 rpm, supernatant odrzucano, a osad suszono w temperaturze 37°C przez 20 minut. Następnie rozpuszczano osad w 30 μ l wody DEPC, mieszano i zamrażano w temperaturze -20°C. Stężenie mierzono po rozmrożeniu następnego dnia.

W celu usunięcia ewentualnego DNA z izolatów RNA, 500 ng izolatu poddawano trawieniu DNazą I (Ambion). Reakcję przeprowadzano w buforze dołączonym do enzymu przez producenta, w objętości 10 μ l, przez 30 minut, w temperaturze 37°C. Po tym czasie reakcję zatrzymywano dodając 1 μ l 25mM EDTA i inkubując mieszaninę w 65°C przez 10 minut. Jakość RNA sprawdzano na 1,5% żelu agarozowym.

2.33 Odwrotna transkrypcja

Całkowite RNA przepisywano na cDNA z wykorzystaniem gotowego zestawu do odwrotnej transkrypcji iScript[™] firmy Bio-rad. Mieszanina reakcyjna, w objętości 10 μ l, zawierała 1x stężony bufor, oligo(dT) oraz losowe heksamery jako startery, odwrotną transkryptazę iScript z aktywnością RNazy H, oraz 40-80 ng całkowitego RNA komórkowego. Reakcję prowadzono w termocyklerze według poniższego protokołu:

Inkubacja	25°C	5 minut
Synteza	42°C	30 minut
Denaturacja	85°C	5 minut

Reakcję przechowywano w temperaturze -20°C. Stanowiła ona matrycę do ilościowego PCR.

2.34 PCR ilościowy (Real-Time PCR, qPCR)

Metodę wykorzystywano do ilościowej analizy poziomu ekspresji ok. 100-nukleotydowego fragmentu DNA, wprowadzonego w plazmidzie pEGFP, odpowiadającego sekwencji jednego z trzech analizowanych genów: APP, SOD1 i SNCA, wobec wybranych oligonukleotydów antysensowych. Jako że ekspresja insertów była sprzężona z ekspresją GFP, w reakcji qPCR badano ekspresję GFP, względem genu referencyjnego, którym była β -aktyna. Do reakcji wykorzystywano gotowe mieszaniny iTaq™ Sybr Green / iQ™ Sybr Green firmy Bio-rad, zawierające Sybr® Green I jako czynnik umożliwiający zliczanie amplifikowanego DNA. Poprzez silną i specyficzną interkalację dwuniciowego DNA, w miarę przyrostu cząsteczek DNA w roztworze wzrasta jego fluorescencja, dzięki czemu można określić wyjściową ilość DNA w próbce. Gotowe mieszaniny zawierały także iTaq/iQ DNA polimerazę, trójfosforany nukleozydów i chlorek magnezu, a także stabilizatory poprawiające wydajność reakcji i inne barwniki fluorescencyjne pełniące funkcje referencyjne.

Dla każdej próby, analizowanej w trzech powtórzeniach przygotowywano 2 osobne reakcje: dla genu badanego i dla genu referencyjnego. Pojedynczą reakcję prowadzono w objętości 10 μ l, w obecności starterów o stężeniu 400 nM każdy; jako matrycę stosowano 1/10 objętości reakcji odwrotnej transkrypcji (1 μ l). Po złożeniu, reakcje zwirowywano i umieszczano w termocyklerze zaprogramowanym wg następującego protokołu:

Predenaturacja	95°C	5 minut
40 cykli:		
Denaturacja	95°C	10 sekund
Przyłączanie starterów i wydłużanie	60°C	45 sekund
Pomiar krzywych topnienia	60-95°C	0,5°C/min

Wyniki reakcji opracowywano w programie CFX Manager 3.0, dołączonym przez producenta termocyklera, firmę Bio-rad. Stosowano dwie metody obliczeń poziomu ekspresji badanych genów, metodę bezpośrednią wykorzystującą krzywą standardową, oraz metodę pośrednią, obliczającą względny poziom ekspresji. Generowane obydwoma metodami wyniki porównywano, uśredniano i analizowano statystycznie na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

2.35 Analiza statystyczna wyników

Porównywano średnie wydajności trawienia rybonukleazą H oraz średnią ekspresję GFP dla cząsteczki dzikiej i mutantu RNA, przeprowadzając jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Tukeya na poziomie istotności $\alpha=0,05$. Testowanie wykonywano w programie OriginLab8.0.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
2. Guerrier-Takada, C., et al., *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. Cell, 1983. **35**(3 Pt 2): p. 849-57.
3. Hermann, T. and E. Westhof, *RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(1): p. 66-73.
4. Pearson, N.D. and C.D. Prescott, *RNA as a drug target*. Chem Biol, 1997. **4**(6): p. 409-14.
5. Stephenson, M.L. and P.C. Zamecnik, *Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(1): p. 285-8.
6. Frith, M.C., M. Pheasant, and J.S. Mattick, *The amazing complexity of the human transcriptome*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(8): p. 894-7.
7. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
8. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
9. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription*. Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
10. Taft, R.J., et al., *Non-coding RNAs: regulators of disease*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 126-39.
11. Werner, A., *Biological functions of natural antisense transcripts*. BMC Biol, 2013. **11**: p. 31.
12. Engstrom, P.G., et al., *Complex Loci in human and mouse genomes*. PLoS Genet, 2006. **2**(4): p. e47.
13. Beiter, T., et al., *Antisense transcription: a critical look in both directions*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(1): p. 94-112.
14. Su, W.Y., H. Xiong, and J.Y. Fang, *Natural antisense transcripts regulate gene expression in an epigenetic manner*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(2): p. 177-81.
15. Vanhee-Brossollet, C. and C. Vaquero, *Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes?* Gene, 1998. **211**(1): p. 1-9.
16. Hung, T. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms*. RNA Biol, 2010. **7**(5): p. 582-5.
17. Lavorgna, G., et al., *In search of antisense*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(2): p. 88-94.
18. Lapidot, M. and Y. Pilpel, *Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms*. EMBO Rep, 2006. **7**(12): p. 1216-22.
19. Werner, A., *Natural antisense transcripts*. RNA Biol, 2005. **2**(2): p. 53-62.
20. Sun, M., et al., *Evidence for a preferential targeting of 3'-UTRs by cis-encoded natural antisense transcripts*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. 5533-43.
21. Vagin, V.V., et al., *A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline*. Science, 2006. **313**(5785): p. 320-4.
22. Ghildiyal, M. and P.D. Zamore, *Small silencing RNAs: an expanding universe*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(2): p. 94-108.

23. Malone, C.D. and G.J. Hannon, *Small RNAs as guardians of the genome*. Cell, 2009. **136**(4): p. 656-68.
24. Gou, L.T., et al., *Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis*. Cell Res, 2014. **24**(6): p. 680-700.
25. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
26. Sontheimer, E.J. and R.W. Carthew, *Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs*. Cell, 2005. **122**(1): p. 9-12.
27. Ambros, V., et al., *MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 807-18.
28. Aravin, A.A., et al., *The small RNA profile during Drosophila melanogaster development*. Dev Cell, 2003. **5**(2): p. 337-50.
29. Xie, Z., et al., *Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants*. PLoS Biol, 2004. **2**(5): p. E104.
30. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
31. Rosenfeld, N., et al., *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 462-9.
32. Wang, V. and W. Wu, *MicroRNA-based therapeutics for cancer*. BioDrugs, 2009. **23**(1): p. 15-23.
33. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
34. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 721-6.
35. Lee, N.S., et al., *miR-302b maintains "stemness" of human embryonal carcinoma cells by post-transcriptional regulation of Cyclin D2 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 434-40.
36. Lin, S.L., et al., *Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state*. RNA, 2008. **14**(10): p. 2115-24.
37. Crooke, S.T., *Molecular mechanisms of action of antisense drugs*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1489**(1): p. 31-44.
38. Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology: Basic Principles, Strategies and Applications*. 2001, New York: Marcel Dekker.
39. Alt, M., et al., *Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(10): p. 868-76.
40. Zhang, H., et al., *Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(2): p. 347-53.
41. Baker, B.F., et al., *2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11994-2000.
42. Mercatante, D.R. and R. Kole, *Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1587**(2-3): p. 126-32.
43. Pan, Q., et al., *Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1413-5.
44. Lee, J.J.A. and T. Yokota, *Antisense Therapy in Neurology*. Journal of Personalized Medicine, 2013. **3**(3): p. 144-176.

45. Krajewska, M., et al., *Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas*. Cancer Res, 1996. **56**(10): p. 2422-7.
46. Taylor, J.K., et al., *Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(11): p. 1097-100.
47. Mercatante, D.R., et al., *Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16411-7.
48. Mercatante, D.R., J.L. Mohler, and R. Kole, *Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49374-82.
49. Ecker, D.J., et al., *Pseudo--half-knot formation with RNA*. Science, 1992. **257**(5072): p. 958-61.
50. Brown, E.A., et al., *Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5041-5.
51. Vickers, T., et al., *Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(12): p. 3359-68.
52. Klase, Z., et al., *HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 18.
53. Saxena, S.K. and E.J. Ackerman, *Microinjected oligonucleotides complementary to the alpha-sarcin loop of 28 S RNA abolish protein synthesis in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3263-9.
54. Crouch, R.J. and M.L. Dirksen, *Ribonucleases H*, in *Nucleases*, S.M. Linn and R.J. Roberts, Editors. 1982, Cold Spring Harbor New York
55. Wu, H., W.F. Lima, and S.T. Crooke, *Properties of cloned and expressed human RNase H1*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28270-8.
56. Tadokoro, T. and S. Kanaya, *Ribonuclease H: molecular diversities, substrate binding domains, and catalytic mechanism of the prokaryotic enzymes*. FEBS J, 2009. **276**(6): p. 1482-93.
57. Wu, H., W.F. Lima, and S.T. Crooke, *Molecular cloning and expression of cDNA for human RNase H*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1998. **8**(1): p. 53-61.
58. Yazbeck, D.R., K.L. Min, and M.J. Damha, *Molecular requirements for degradation of a modified sense RNA strand by Escherichia coli ribonuclease H1*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. 3015-25.
59. Lima, W.F., et al., *Human RNase H1 uses one tryptophan and two lysines to position the enzyme at the 3'-DNA/5'-RNA terminus of the heteroduplex substrate*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49860-7.
60. Ohtani, N., et al., *Molecular diversities of RNases H*. J Biosci Bioeng, 1999. **88**(1): p. 12-9.
61. Wu, H., et al., *Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17181-9.
62. Wu, H., W.F. Lima, and S.T. Crooke, *Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23547-53.
63. Nowotny, M., et al., *Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 264-76.
64. De Vivo, M., M. Dal Peraro, and M.L. Klein, *Phosphodiester cleavage in ribonuclease H occurs via an associative two-metal-aided catalytic mechanism*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(33): p. 10955-62.

65. Crow, Y.J., et al., *Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutieres syndrome and mimic congenital viral brain infection*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 910-6.
66. Jeong, H.S., et al., *RNase H2 of Saccharomyces cerevisiae is a complex of three proteins*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(2): p. 407-14.
67. Cerritelli, S.M. and R.J. Crouch, *Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes*. FEBS J, 2009. **276**(6): p. 1494-505.
68. Chapados, B.R., et al., *Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication*. J Mol Biol, 2001. **307**(2): p. 541-56.
69. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner*. Curr Biol, 2005. **15**(2): p. R61-4.
70. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
71. MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna, *Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 934-40.
72. MacRae, I.J. and J.A. Doudna, *Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(1): p. 138-45.
73. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
74. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
75. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell, 2007. **130**(1): p. 89-100.
76. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
77. Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, ed. S.T. Crooke. 2008, Boca Raton: CRC Press.
78. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
79. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.
80. Simon, P., et al., *Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence*. Biochimie, 2008. **90**(8): p. 1109-16.
81. Guntaka, R.V., B.R. Varma, and K.T. Weber, *Triplex-forming oligonucleotides as modulators of gene expression*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(1): p. 22-31.
82. Praseuth, D., A.L. Guieysse, and C. Helene, *Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1489**(1): p. 181-206.
83. Dias, N. and C.A. Stein, *Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(5): p. 347-55.
84. Juliano, R.L., X. Ming, and O. Nakagawa, *Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides*. Bioconjug Chem, 2011. **23**(2): p. 147-57.
85. Kara, J. and R. Duschinsky, *Inhibition of thymidylate kinase and DNA synthesis in HeLa cells by 5'-deoxythymidine*. Biochim Biophys Acta, 1969. **186**(1): p. 223-5.
86. Vaerman, J.L., et al., *Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides*. Blood, 1997. **90**(1): p. 331-9.

87. Koziolkiewicz, M., et al., *The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase*. Blood, 2001. **98**(4): p. 995-1002.
88. Miller, P.S., et al., *Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates*. Biochemistry, 1979. **18**(23): p. 5134-43.
89. Eckstein, F. and H.P. Bar, *Enzymatic hydrolysis of adenosine 3'-5'-cyclic phosphorothioate*. Biochim Biophys Acta, 1969. **191**(2): p. 316-21.
90. Matsukura, M., et al., *Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7706-10.
91. Campbell, J.M., T.A. Bacon, and E. Wickstrom, *Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid*. J Biochem Biophys Methods, 1990. **20**(3): p. 259-67.
92. Phillips, M.I. and Y.C. Zhang, *Basic principles of using antisense oligonucleotides in vivo*. Methods Enzymol, 2000. **313**: p. 46-56.
93. Kurreck, J., et al., *Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. 1911-8.
94. Crooke, S.T., *Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6651-9.
95. Crooke, S.T., et al., *Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes*. Biochem J, 1995. **312** (Pt 2): p. 599-608.
96. Monia, B.P., et al., *Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression*. J Biol Chem, 1993. **268**(19): p. 14514-22.
97. Lebedeva, I. and C.A. Stein, *Antisense oligonucleotides: promise and reality*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 403-19.
98. Kurreck, J., *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications*. Eur J Biochem, 2003. **270**(8): p. 1628-44.
99. Gerowska, M., A. Marciniak, and R. Kierzek, *Kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji rybozy (LNA) jako przykład szczególnych oligonukleotydów antysensowych nowej generacji*, in *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, t.20, J. Barciszewski and H. Koroniak, Editors. 2008.
100. Nielsen, P.E., et al., *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1497-500.
101. Nielsen, P.E., et al., *Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents*. Anticancer Drug Des, 1993. **8**(1): p. 53-63.
102. Egholm, M., et al., *PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 566-8.
103. Hanvey, J.C., et al., *Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids*. Science, 1992. **258**(5087): p. 1481-5.
104. Good, L. and P.E. Nielsen, *Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(4): p. 355-8.
105. Mologni, L., P.E. Nielsen, and C. Gambacorti-Passerini, *In vitro transcriptional and translational block of the bcl-2 gene operated by peptide nucleic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(2): p. 537-43.
106. Skorski, T., et al., *Antileukemia effect of c-myc N3'-->P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3966-71.
107. Doessing, H. and B. Vester, *Locked and unlocked nucleosides in functional nucleic acids*. Molecules, 2011. **16**(6): p. 4511-26.

108. Fratzczak, A., R. Kierzek, and E. Kierzek, *LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription*. *Biochemistry*, 2009. **48**(3): p. 514-6.
109. Noronha, A.M., et al., *Synthesis and biophysical properties of arabinonucleic acids (ANA): circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA:RNA hybrid duplexes*. *Biochemistry*, 2000. **39**(24): p. 7050-62.
110. Lok, C.N., et al., *Potent gene-specific inhibitory properties of mixed-backbone antisense oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxyribose nucleotides*. *Biochemistry*, 2002. **41**(10): p. 3457-67.
111. Ferrari, N., et al., *Characterization of antisense oligonucleotides comprising 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA): specificity, potency, and duration of activity*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1082**: p. 91-102.
112. Verbeure, B., et al., *RNase H mediated cleavage of RNA by cyclohexene nucleic acid (CeNA)*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(24): p. 4941-7.
113. Wang, J., et al., *Cyclohexene nucleic acids (CeNA) form stable duplexes with RNA and induce RNase H activity*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2001. **20**(4-7): p. 785-8.
114. Renneberg, D., et al., *Antisense properties of tricyclo-DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(13): p. 2751-7.
115. Pasternak, A. and J. Wengel, *Unlocked nucleic acid--an RNA modification with broad potential*. *Org Biomol Chem*, 2011. **9**(10): p. 3591-7.
116. Nolte, A., et al., *Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine*. *Nat Biotechnol*, 1996. **14**(9): p. 1116-9.
117. Klussmann, S., et al., *Mirror-image RNA that binds D-adenosine*. *Nat Biotechnol*, 1996. **14**(9): p. 1112-5.
118. Wyszko, E., et al., *Spiegelzymes(R) mirror-image hammerhead ribozymes and mirror-image DNAzymes, an alternative to siRNAs and microRNAs to cleave mRNAs in vivo?* *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86673.
119. van Rooij, E. and E.N. Olson, *MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(11): p. 860-72.
120. Oney, S., et al., *Development of universal antidotes to control aptamer activity*. *Nat Med*, 2009. **15**(10): p. 1224-8.
121. Garbesi, A., et al., *L-DNAs as potential antimessenger oligonucleotides: a reassessment*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(18): p. 4159-65.
122. Damha, M.J., P.A. Giannaris, and P. Marfey, *Antisense L/D-oligodeoxynucleotide chimeras: nuclease stability, base-pairing properties, and activity at directing ribonuclease H*. *Biochemistry*, 1994. **33**(25): p. 7877-85.
123. Dean, N.M. and C.F. Bennett, *Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(56): p. 9087-96.
124. Wagner, R.W., et al., *Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines*. *Science*, 1993. **260**(5113): p. 1510-3.
125. Flanagan, W.M., et al., *A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 3513-8.
126. Shen, L., et al., *Evaluation of C-5 propynyl pyrimidine-containing oligonucleotides in vitro and in vivo*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2003. **13**(3): p. 129-42.
127. Nykanen, A., B. Haley, and P.D. Zamore, *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*. *Cell*, 2001. **107**(3): p. 309-21.
128. Snead, N.M., et al., *5' Unlocked Nucleic Acid Modification Improves siRNA Targeting*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e103.

129. Amarzguoui, M., et al., *Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 589-95.
130. Czauderna, F., et al., *Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(11): p. 2705-16.
131. Braasch, D.A., et al., *RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA*. Biochemistry, 2003. **42**(26): p. 7967-75.
132. Harborth, J., et al., *Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003. **13**(2): p. 83-105.
133. Morrissey, D.V., et al., *Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(8): p. 1002-7.
134. Stull, R.A. and F.C. Szoka, Jr., *Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects*. Pharm Res, 1995. **12**(4): p. 465-83.
135. Hampel, A., *The hairpin ribozyme: discovery, two-dimensional model, and development for gene therapy*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **58**: p. 1-39.
136. Prody, G.A., et al., *Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA*. Science, 1986. **231**(4745): p. 1577-80.
137. Hutchins, C.J., et al., *Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(9): p. 3627-40.
138. Uhlenbeck, O.C., *A small catalytic oligoribonucleotide*. Nature, 1987. **328**(6131): p. 596-600.
139. Haseloff, J. and W.L. Gerlach, *Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities*. Nature, 1988. **334**(6183): p. 585-91.
140. Walter, N.G. and J.M. Burke, *The hairpin ribozyme: structure, assembly and catalysis*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(1): p. 24-30.
141. Beigelman, L., et al., *Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25702-8.
142. Joyce, G.F., *RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme*. Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 503-17.
143. Flory, C.M., et al., *Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 754-8.
144. Aigner, A., et al., *Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1700-7.
145. Wright, L. and P. Kearney, *Current status of ribozymes as gene therapy agents for cancer*. Cancer Invest, 2001. **19**(5): p. 495-509.
146. Macejak, D.G., et al., *Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes*. Hepatology, 2000. **31**(3): p. 769-76.
147. Mitsuyasu, R.T., et al., *Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 285-92.
148. Zeng, W., et al., *Effective inhibition of human immunodeficiency virus 1 replication by engineered RNase P ribozyme*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51855.
149. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
150. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.

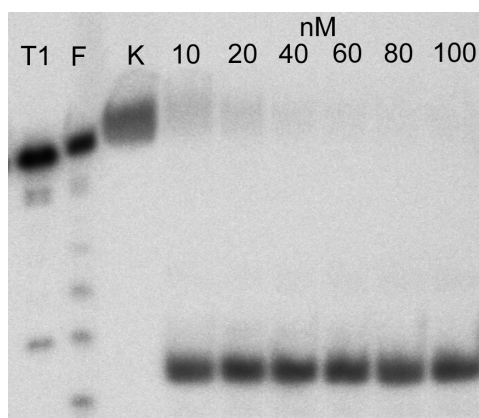
151. Shum, K.T., J. Zhou, and J.J. Rossi, *Nucleic Acid Aptamers as Potential Therapeutic and Diagnostic Agents for Lymphoma*. J Cancer Ther, 2013. **4**(4): p. 872-890.
152. Keefe, A.D. and S.T. Cload, *SELEX with modified nucleotides*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(4): p. 448-56.
153. Miller, V.M., et al., *Allele-specific silencing of dominant disease genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7195-200.
154. Alves, S., et al., *Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3341.
155. Zhang, Y., J. Engelman, and R.M. Friedlander, *Allele-specific silencing of mutant Huntington's disease gene*. J Neurochem, 2009. **108**(1): p. 82-90.
156. Ohnishi, Y., et al., *Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2248.
157. Wood, M.J., et al., *Therapeutic gene silencing in the nervous system*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 2**: p. R279-84.
158. Shen, H.L., et al., *Vector-based RNAi approach to isoform-specific downregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)165 expression in human leukemia cells*. Leuk Res, 2007. **31**(4): p. 515-21.
159. Wood, M., H. Yin, and G. McClorey, *Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy*. PLoS Genet, 2007. **3**(6): p. e109.
160. Hu, J., et al., *Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 478-84.
161. Drake, J.W., et al., *Rates of spontaneous mutation*. Genetics, 1998. **148**(4): p. 1667-86.
162. Crow, J.F., *Age and sex effects on human mutation rates: an old problem with new complexities*. J Radiat Res, 2006. **47 Suppl B**: p. B75-82.
163. Albrecht-Buehler, G., *The spectra of point mutations in vertebrate genomes*. Bioessays, 2009. **31**(1): p. 98-106.
164. Lynch, M., *Evolution of the mutation rate*. Trends Genet, 2010. **26**(8): p. 345-52.
165. Glenner, G.G., et al., *The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis*. Appl Pathol, 1984. **2**(6): p. 357-69.
166. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
167. Masters, C.L., et al., *Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels*. EMBO J, 1985. **4**(11): p. 2757-63.
168. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
169. Grundke-Iqbal, I., et al., *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. J Biol Chem, 1986. **261**(13): p. 6084-9.
170. Ihara, Y., et al., *Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease*. J Biochem, 1986. **99**(6): p. 1807-10.
171. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
172. Mattson, M.P., *Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives*. Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 1081-132.
173. Mattson, M.P., et al., *beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease*. Trends Neurosci, 1993. **16**(10): p. 409-14.

174. Kummer, C., et al., *Expression and potential function of beta-amyloid precursor proteins during cutaneous wound repair*. Exp Cell Res, 2002. **280**(2): p. 222-32.
175. Nawrot B., Antoszczyk S., and S. M., *Hamowanie ekspresji genów białek uczestniczących w wytwarzaniu β -amyloidu jako perspektywa neuroprotekcji w chorobie Alzheimer'a*, in *Neuroprotekcja - XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN*, Ś. M., Editor. 2003: Mogilany.
176. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-6.
177. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene*. Nature, 1991. **353**(6347): p. 844-6.
178. Suzuki, N., et al., *An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants*. Science, 1994. **264**(5163): p. 1336-40.
179. Maruyama, K., et al., *Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A beta 42(43)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(3): p. 730-5.
180. Hendriks, L., et al., *Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene*. Nat Genet, 1992. **1**(3): p. 218-21.
181. Walsh, D.M., et al., *In vitro studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala692-->Gly) Alzheimer's disease*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 3): p. 869-77.
182. Kamino, K., et al., *Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region*. Am J Hum Genet, 1992. **51**(5): p. 998-1014.
183. Nilsberth, C., et al., *The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A beta protofibril formation*. Nat Neurosci, 2001. **4**(9): p. 887-93.
184. Farrer, M.J., *Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 306-18.
185. Irizarry, M.C., et al., *Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(8): p. 889-95.
186. Withers, G.S., et al., *Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons*. Brain Res Dev Brain Res, 1997. **99**(1): p. 87-94.
187. Jo, E., et al., *alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34328-34.
188. Lotharius, J. and P. Brundin, *Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(20): p. 2395-407.
189. Lotharius, J. and P. Brundin, *Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(12): p. 932-42.
190. Perez, R.G., et al., *A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis*. J Neurosci, 2002. **22**(8): p. 3090-9.
191. Alerte, T.N., et al., *Alpha-synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: lessons from viral transduction of knockout mice*. Neurosci Lett, 2008. **435**(1): p. 24-9.
192. Cookson, M.R., *alpha-Synuclein and neuronal cell death*. Mol Neurodegener, 2009. **4**: p. 9.

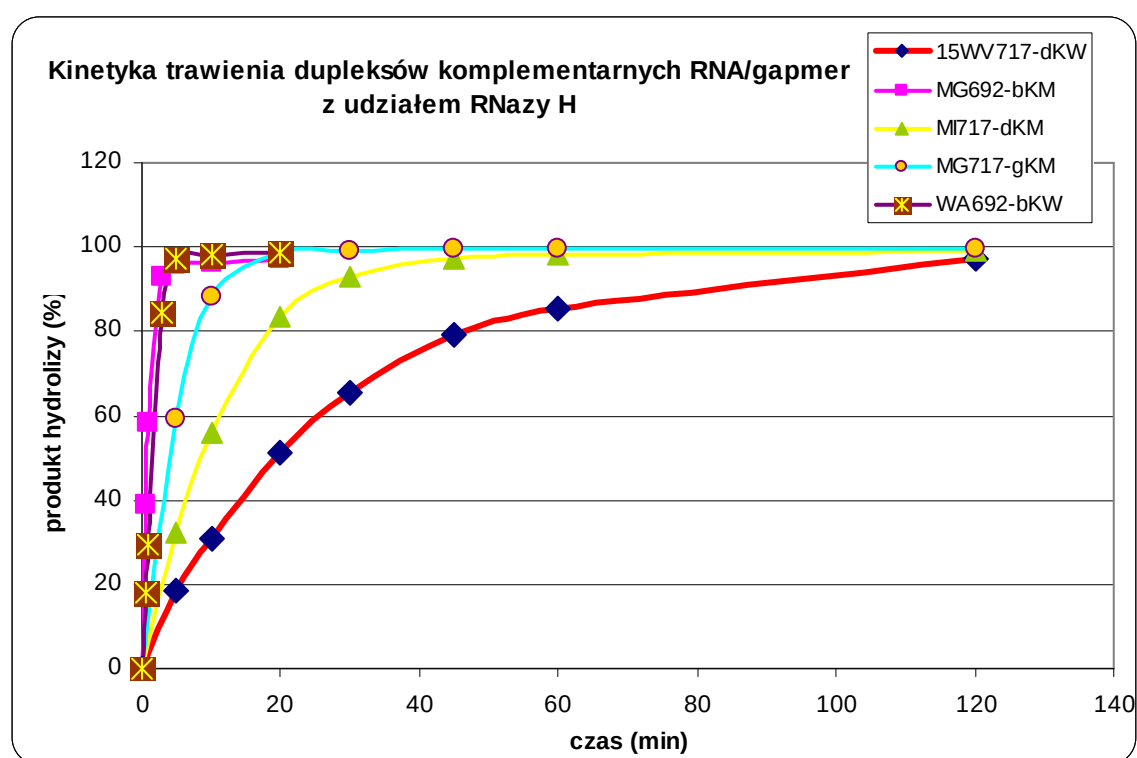
193. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
194. Zarranz, J.J., et al., *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 164-73.
195. Kruger, R., et al., *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 106-8.
196. Cookson, M.R., G. Xiromerisiou, and A. Singleton, *How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease*. Curr Opin Neurol, 2005. **18**(6): p. 706-11.
197. Ibanez, P., et al., *Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease*. Lancet, 2004. **364**(9440): p. 1169-71.
198. Ibanez, P., et al., *Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms*. Arch Neurol, 2009. **66**(1): p. 102-8.
199. Fuchs, J., et al., *Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication*. Neurology, 2007. **68**(12): p. 916-22.
200. Valentine, J.S. and P.J. Hart, *Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3617-22.
201. Kabashi, E., et al., *Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis?* Ann Neurol, 2007. **62**(6): p. 553-9.
202. Rosen, D.R., *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature, 1993. **364**(6435): p. 362.
203. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
204. Ravindranath, S.D. and I. Fridovich, *Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast*. J Biol Chem, 1975. **250**(15): p. 6107-12.
205. Rosen, D.R., et al., *A frequent ala 4 to val superoxide dismutase-1 mutation is associated with a rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(6): p. 981-7.
206. Cudkowicz, M.E., et al., *Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 1997. **41**(2): p. 210-21.
207. Hough, M.A., et al., *Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5976-81.
208. Aoki, M., et al., *Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation*. Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 323-4.
209. Aoki, M., et al., *Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene: a possible new subtype of familial ALS*. J Neurol Sci, 1994. **126**(1): p. 77-83.
210. Muller, F.L., et al., *MnSOD deficiency has a differential effect on disease progression in two different ALS mutant mouse models*. Muscle Nerve, 2008. **38**(3): p. 1173-83.
211. Bergemalm, D., et al., *Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models*. J Neurosci, 2006. **26**(16): p. 4147-54.
212. Hart, P.J., et al., *Subunit asymmetry in the three-dimensional structure of a human CuZnSOD mutant found in familial amyotrophic lateral sclerosis*. Protein Sci, 1998. **7**(3): p. 545-55.
213. Kierzek, E., et al., *The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(16): p. 5082-93.

214. Proctor, D.J., et al., *Restricting the conformational heterogeneity of RNA by specific incorporation of 8-bromoguanosine*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(9): p. 2390-1.
215. Broda, M., et al., *Thermodynamic stability of RNA structures formed by CNG trinucleotide repeats. Implication for prediction of RNA structure*. Biochemistry, 2005. **44**(32): p. 10873-82.
216. Jackson, A.L., et al., *Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1179-87.
217. Hohjoh, H., *Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(4): p. 522-35.
218. Ding, H., et al., *Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis*. Aging Cell, 2003. **2**(4): p. 209-17.
219. Miller, V.M., et al., *Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(2): p. 661-8.
220. Feng, X., et al., *Allele-specific silencing of Alzheimer's disease genes: the amyloid precursor protein genes with Swedish or London mutations*. Gene, 2006. **371**(1): p. 68-74.
221. Ohnishi, Y., et al., *Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles*. J RNAi Gene Silencing, 2006. **2**(1): p. 154-60.
222. Xia, X., et al., *Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo*. Neurobiol Dis, 2006. **23**(3): p. 578-86.
223. Schwarz, D.S., et al., *Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide*. PLoS Genet, 2006. **2**(9): p. e140.
224. Sapru, M.K., et al., *Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi*. Exp Neurol, 2006. **198**(2): p. 382-90.
225. Sibley, C.R. and M.J. Wood, *Identification of allele-specific RNAi effectors targeting genetic forms of Parkinson's disease*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26194.
226. Maxwell, M.M., et al., *RNA interference-mediated silencing of mutant superoxide dismutase rescues cyclosporin A-induced death in cultured neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3178-83.
227. Liu, J., et al., *RNA duplexes with abasic substitutions are potent and allele-selective inhibitors of huntingtin and ataxin-3 expression*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(18): p. 8788-801.
228. Fiszer, A., et al., *Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(22): p. 10426-37.
229. Gagnon, K.T., et al., *Allele-selective inhibition of mutant huntingtin expression with antisense oligonucleotides targeting the expanded CAG repeat*. Biochemistry, 2010. **49**(47): p. 10166-78.
230. Carroll, J.B., et al., *Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the Huntington disease gene / allele-specific silencing of mutant huntingtin*. Mol Ther, 2011. **19**(12): p. 2178-85.
231. Gry, M., et al., *Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 365.

VI. ZAŁĄCZNIKI



Rysunek 65. Optimalizacja stężenia ASO dla testu RNazy H, przeprowadzona z wykorzystaniem oligonukleotydu typu gapmer, komplementarnego do docelowego RNA.



Wykres 80. Optimalizacja czasu trawienia dupleksów z udziałem rybonukleazy H

Tabela 38. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 4 (SOD1 A4V) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNazą H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydowa w miejscu SNP	Długość ASO / dodatkowe niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
4C aKW	CGAAGG C CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GCA C <u>AC</u>	76.4 ± 1.1 (64.5 ± 7.4)	199.7 ± 3.2 (164.6 ± 21.8)	14.47 ± 0.10 (13.43 ± 0.64)	73.0 (74.2)	5.77	-5.7	rC-dG	13/-	94.6 ± 3.8
4U aKW	CGAAGG U CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GCA C <u>AC</u>	93.3 ± 1.9 (53.9 ± 6.3)	257.5 ± 5.7 (138.22 ± 19.5)	13.46 ± 0.12 (11.03 ± 0.37)	61.9 (65.3)	6.78	-16.8	rU-dG	13/-	79.3 ± 17.0
4C aKM	CGAAGG C CGUGUG <u>GC</u> UTCC A GCA C <u>AC</u>	111.5 ± 3.7 (112.7 ± 7.8)	302.8 ± 10.9 (306.1 ± 22.9)	17.62 ± 0.34 (17.74 ± 0.74)	71.2 (71.3)	2.62	-7.5	rC-dA	13/-	96.3 ± 3.3
4U aKM	CGAAGG U CGUGUG <u>GC</u> UTCC A GCA C <u>AC</u>	115.6 ± 1.4 (114.3 ± 4.2)	307.6 ± 3.9 (303.8 ± 12.2)	20.24 ± 0.15 (20.11 ± 0.45)	78.7 (78.8)	0.00	0.0	rU-dA	13/-	93.9 ± 7.4
4C la1	CGAAGG C CGUGUG UCC G GCA	58.3 ± 1.5 (58.1 ± 3.9)	147.9 ± 4.3 (147.6 ± 11.7)	12.41 ± 0.12 (12.36 ± 0.31)	71.8 (71.6)	7.83	-6.9	rC-G ^L	7/-	-
4U la1	CGAAGG U CGUGUG UCC G GCA	62.0 ± 4.3 (56.5 ± 4.0)	167.2 ± 13.2 (150.1 ± 12.6)	10.12 ± 0.19 (9.94 ± 0.19)	56.1 (56.9)	10.12	-22.6	rU- G ^L	7/-	-
4C la2	CGAAGG C CGUGUG CUUCC G GCA C	86.2 ± 6.0 (80.0 ± 4.9)	223.0 ± 17.2 (205.0 ± 14.0)	17.04 ± 0.65 (16.38 ± 0.56)	80.1 (80.6)	3.20	1.4	rC-G ^L	10/-	-
4U la2	CGAAGG U CGUGUG CUUCC G GCA C	105.8 ± 1.0 (80.4 ± 1.9)	287.7 ± 3.1 (212.7 ± 5.5)	16.56 ± 0.09 (14.39 ± 0.26)	69.5 (70.6)	3.68	-9.2	rU- G ^L	10/-	-
4C aW8BrG	CGAAGG C CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GCA C <u>AC</u>	116.3 ± 3.8 (118.7 ± 20.9)	308.6 ± 10.7 (315.6 ± 59.6)	20.60 ± 0.42 (20.83 ± 2.38)	79.7 (79.5)	1.06	7.7	rC-d ^{8Br} G	13/-	98.9 ± 0.3
4U aW8BrG	CGAAGG U CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GCA C <u>AC</u>	149.1 ± 4.1 (136.0 ± 3.2)	410.8 ± 12.0 (372.6 ± 9.5)	21.66 ± 0.39 (20.41 ± 0.30)	72.0 (72.3)	0.00	0.0	rU- d ^{8Br} G	13/-	97.4 ± 1.8
4C aM8BrG	CGAAGG C CGUGUG <u>GC</u> UTCC A GCA C <u>AC</u>	111.0 ± 1.2 (134.9 ± 4.1)	303.6 ± 3.5 (374.3 ± 12.2)	16.82 ± 0.10 (18.84 ± 0.33)	68.7 (68.1)	4.94	7.4	rC-dA	13/ rC ₈ - d ^{8Br} G	98.1 ± 1.9
4U aM8BrG	CGAAGG U CGUGUG <u>GC</u> UTCC A GCA C <u>AC</u>	136.2 ± 2.6 (134.8 ± 16.0)	369.0 ± 7.6 (365.0 ± 46.2)	21.76 ± 0.28 (21.60 ± 1.66)	76.1 (76.0)	0.00	0.0	rU-dA	13/ rC ₈ - d ^{8Br} G	89.8 ± 11.7
4C a13	CGAAGG C CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GG C <u>AC</u>	88.3 ± 2.1 (105.5 ± 3.9)	235.8 ± 6.2 (286.8 ± 11.9)	15.14 ± 0.18 (16.59 ± 0.24)	70.5 (69.7)	-2.43	10.5	rC-dG	13/ rG ₉ -dG rU ₁₀ -C	32.1 ± 10.5
4U a13	CGAAGG U CGUGUG <u>GC</u> UTCC G GG C <u>AC</u>	89.6 ± 2.3 (101.9 ± 5.6)	247.8 ± 6.9 (285.2 ± 16.9)	12.71 ± 0.13 (13.45 ± 0.41)	60.0 (59.6)	0.00	0.0	rU-dG	13/ rG ₉ -dG rU ₁₀ -C	47.7 ± 5.2

4C a14	CGAAGG CC UGUG <u>GC</u> UTCC AG GAC <u>AC</u>	82.2 ± 2.8 (101.5 ± 2.2)	222.4 ± 8.3 (280.6 ± 6.5)	13.21 ± 0.18 (14.46 ± 0.27)	64.4 (63.3)	3.43	-4.5	rC-dA	13/ rG ₉ -dG	84.0 ± 19.4
4U a14	CGAAGG UC UGUG <u>GC</u> UTCC AG GAC <u>AC</u>	108.5 ± 2.2 (122.2 ± 23.4)	296.3 ± 6.6 (336.6 ± 69.7)	16.64 ± 0.18 (17.85 ± 1.79)	68.9 (68.7)	0.00	0.0	rU-dA	13/ rG ₉ -dG	21.5 ± 7.8
4C a16	CGAAGG CC UGUG <u>GC</u> UTCC AG GT <u>AC</u>	78.1 ± 2.4 (95.8 ± 5.3)	211.4 ± 7.2 (265.2 ± 16.7)	12.53 ± 0.15 (13.58 ± 0.24)	62.8 (61.6)	1.48	-1.0	rC-dA	13/ rG ₉ -dG rU ₁₀ -dT	88.0 ± 5.4
4U a16	CGAAGG UC UGUG <u>GC</u> UTCC AG GT <u>AC</u>	94.0 ± 2.1 (100.5 ± 1.6)	257.9 ± 6.2 (277.4 ± 5.0)	14.01 ± 0.14 (14.44 ± 0.12)	63.8 (63.5)	0.00	0.0	rU-dA	13/ rG ₉ -dG rU ₁₀ -dT	40.1 ± 13.3

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupletu, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA, kolor pomarańczowy – 8-bromo-deoksyguanozyna; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupletu porównywane w ramach analizy wyników; ^a – temperatura topnienia dupletu w stężeniu 10⁻⁴M

Tabela 39. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 46 (SNCA E46K) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNazą H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydowa w miejscu SNP	Długość ASO / dodatkowe niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
46G kkW	ACCAAG G AGGGAG <u>UGG</u> TTCTCC <u>CU</u>	145.8 ± 8.9 (147.6 ± 20.3)	384.0 ± 25.0 (388.8 ± 56.9)	26.69 ± 1.14 (26.95 ± 2.61)	86.8 (86.8)	-2.74	5.5	rG-dC	13/-	88.1 ± 4.8
46A kkW	ACCAAG A AGGGAG <u>UGG</u> TTCTCC <u>CU</u>	110.7 ± 1.8 (108.9 ± 2.9)	299.8 ± 5.2 (294.6 ± 8.6)	17.71 ± 0.16 (17.56 ± 0.26)	71.8 (71.9)	6.24	-9.5	rA-dC	13/-	61.2 ± 7.5
46G kkM	ACCAAG G AGGGAG <u>UGG</u> TTCTTCC <u>CU</u>	118.4 ± 4.5 (119.7 ± 4.8)	315.2 ± 12.8 (319.2 ± 13.8)	20.59 ± 0.50 (20.76 ± 0.56)	78.8 (78.8)	3.36	-2.5	rG-dT	13/-	86.3 ± 4.8
46A kkM	ACCAAG A AGGGAG <u>UGG</u> TTCTTCC <u>CU</u>	139.3 ± 3.7 (117.2 ± 8.6)	371.9 ± 10.4 (309.0 ± 24.7)	23.95 ± 0.43 (21.37 ± 0.89)	81.3 (82.0)	0.00	0.0	rA-dT	13/-	77.8 ± 14.6
46G lk2	ACCAAG G AGGGAG UUC <u>C</u> UCC	58.5 ± 1.3 (71.7 ± 9.9)	150.3 ± 3.9 (189.5 ± 29.0)	11.83 ± 0.10 (12.91 ± 0.88)	67.9 (67.3)	12.12	-13.4	rG-C ^L	7/-	-
46A lk2	ACCAAG A AGGGAG UUC <u>C</u> UCC	15.7 ± 0.5 (16.7 ± 6.0)	25.6 ± 1.7 (28.2 ± 19.0)	7.76 ± 0.02 (7.94 ± 0.23)	63.4 (65.6)	16.19	-17.9	rA-C ^L	7/-	-
46G lk1	ACCAAG G AGGGAG GGUUC <u>C</u> UCCC	112.4 ± 4.9 (109.8 ± 27.5)	294.7 ± 13.9 (286.9 ± 78.1)	20.98 ± 0.58 (20.78 ± 3.3)	82.8 (83.3)	2.97	1.5	rG-C ^L	10/-	-
46A lk1	ACCAAG A AGGGAG GGUUC <u>C</u> UCCC	88.1 ± 2.4 (82.4 ± 4.2)	240.6 ± 7.3 (223.5 ± 12.6)	13.45 ± 0.17 (13.08 ± 0.28)	63.5 (63.8)	10.50	-17.8	rA-C ^L	10/-	-
46G k1	ACCAAG G AGGGAG <u>UGG</u> TTCT G GC <u>CU</u>	80.1 ± 2.6 (77.0 ± 6.0)	218.4 ± 7.9 (208.7 ± 18.1)	12.41 ± 0.16 (12.26 ± 0.39)	61.5 (61.9)	-4.13	-16.3	rG-dC	rG ₉ -dG rG ₁₀ -dG	78.8 ± 20.6
46A k1	ACCAAG A AGGGAG <u>UGG</u> TTCT G GC <u>CU</u>	67.9 ± 1.8 (53.0 ± 9.1)	192.3 ± 5.6 (144.7 ± 29.2)	8.28 ± 0.03 (8.14 ± 0.21)	45.2 (46.7)	0.00	0.0	rA-dC	rG ₉ -dG rG ₁₀ -dG	26.2 ± 20.5
46G k2	ACCAAG G AGGGAG <u>UGG</u> TTCT T GGC <u>CU</u>	73.0 ± 2.2 (85.3 ± 8.5)	201.6 ± 6.7 (239.7 ± 26.8)	10.46 ± 0.08 (10.94 ± 0.28)	54.6 (53.9)	1.65	1.9	rG-dT	rG ₉ -dG rG ₁₀ -dG	31.3 ± 23.9
46A k2	ACCAAG A AGGGAG <u>UGG</u> TTCT T GGC <u>CU</u>	94.2 ± 2.7 (93.8 ± 4.4)	264.7 ± 8.4 (263.3 ± 13.6)	12.11 ± 0.13 (12.11 ± 0.21)	56.5 (56.6)	0.00	0.0	rA-dT	rG ₉ -dG rG ₁₀ -dG	81.7 ± 4.9
46G k3	ACCA A G G AGGGAG <u>UGG</u> A C CTCC <u>CU</u>	65.5 ± 0.8 (81.3 ± 14.7)	168.1 ± 2.3 (214.3 ± 43.3)	13.39 ± 0.07 (14.81 ± 1.30)	73.3 (72.2)	-4.28	-22.6	rG-dC	rA ₄ -dA rA ₅ -dA	84.1 ± 10.3
46A k3	ACCA A G A AGGGAG <u>UGG</u> A C CTCC <u>CU</u>	61.0 ± 1.4 (52.8 ± 7.1)	167.4 ± 4.3 (141.9 ± 21.9)	9.11 ± 0.04 (8.82 ± 0.30)	50.7 (51.0)	0.00	0.0	rA-dC	rA ₄ -dA rA ₅ -dA	59.1 ± 7.2

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupleksu, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupleksu porównywane w ramach analizy wyników; ^a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10⁻⁴M

Tabela 40. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 53 (SNCA A53T) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNAz H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydowa w miejscu SNP	Długość ASO / dodatkové niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
53G hKW	GGUGUG G CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC C GTT <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	99.2 ± 2.8 (99.6 ± 4.2)	260.6 ± 8.0 (261.9 ± 12.0)	18.37 ± 0.31 (18.41 ± 0.46)	79.0 (79.0)	0.62	5.2	rG -dC	13/-	97.1 ± 2.0
53A hKW	GGUGUG A CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC C GTT <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	103.1 ± 1.9 (102.7 ± 9.2)	283.0 ± 5.6 (281.5 ± 27.5)	15.36 ± 0.14 (15.35 ± 0.67)	66.0 (66.2)	3.63	-7.8	rA-dC	13/-	98.8 ± 0.6
53G hKM	GGUGUG G CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC T GTT <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	94.0 ± 1.0 (108.3 ± 7.6)	250.5 ± 2.8 (292.2 ± 21.8)	16.29 ± 0.09 (17.63 ± 0.79)	72.9 (72.4)	2.70	-0.9	rG-dT	13/-	96.9 ± 2.1
53A hKM	GGUGUG A CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC T GTT <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	117.5 ± 3.5 (117.2 ± 6.9)	317.5 ± 10.2 (316.6 ± 20.2)	18.99 ± 0.34 (18.99 ± 0.64)	73.8 (73.9)	0.00	0.0	rA-dT	13/-	99.1 ± 0.3
53G lh1	GGUGUG G CAACAG CAC <u>C</u> GUU	54.3 ± 1.3 (60.5 ± 3.1)	141.8 ± 3.8 (160.5 ± 9.2)	10.33 ± 0.07 (10.68 ± 0.22)	60.4 (59.8)	8.66	-13.4	rG-rC ^L	7/-	-
53A lh1	GGUGUG A CAACAG CAC <u>C</u> GUU	33.8 ± 1.2 (37.7 ± 10.9)	89.0 ± 4.0 (101.3 ± 36.2)	6.22 ± 0.05 (6.23 ± 0.35)	34.2 (34.6)	12.77	-39.6	rA-rC ^L	7/-	-
53G lh2	GGUGUG G CAACAG ACAC <u>C</u> GUUGU	87.7 ± 1.4 (88.2 ± 4.5)	230.8 ± 4.0 (232.3 ± 13.2)	16.12 ± 0.13 (16.19 ± 0.42)	75.1 (75.1)	2.87	1.3	rG-rC ^L	10/-	-
53A lh2	GGUGUG A CAACAG ACAC <u>C</u> GUUGU	77.7 ± 1.5 (77.1 ± 4.0)	216.3 ± 4.6 (214.5 ± 12.3)	10.58 ± 0.06 (10.59 ± 0.18)	54.1 (54.2)	8.41	-19.7	rA-rC ^L	10/-	-
53G h2	GGUGUG G CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC T G A A <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	84.0 ± 2.0 (92.1 ± 8.3)	235.4 ± 6.3 (260.3 ± 25.7)	10.97 ± 0.08 (11.34 ± 0.39)	54.3 (54.1)	1.44	-2.0	rG-dT	13/ rA ₉ -dA rA ₁₀ -dA	36.8 ± 4.4
53A h2	GGUGUG A CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC T G A A <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	100.1 ± 4.1 (87.2 ± 5.7)	282.8 ± 12.6 (243.0 17.7)	12.41 ± 0.20 (11.82 ± 0.24)	56.3 (57.0)	0.00	0.0	rA-dT	13/ rA ₉ -dA rA ₁₀ -dA	96.6 ± 1.5
53G h6	GGUGUG G CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC C G A A <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	91.0 ± 3.4 (89.1 ± 7.8)	250.1 ± 10.3 (244.2 ± 23.5)	13.46 ± 0.22 (13.37 ± 0.50)	62.6 (62.8)	-3.93	13.2	rG -dC	13/ rA ₉ -dA rA ₁₀ -dA	95.3 ± 3.1
53A h6	GGUGUG A CAACAG <u>CC</u> <u>A</u> CAC C G A A <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>	78.2 ± 2.7 82.1 ± 7.4	221.3 ± 8.4 233.5 ± 23.2	9.53 ± 0.07 9.66 ± 0.20	49.4 49.3	0.00	0.0	rA-dC	13/ rA ₉ -dA rA ₁₀ -dA	68.5 ± 5.0

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupletu, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupletu porównywane w ramach analizy wyników; ^a – temperatura topnienia dupletu w stężeniu 10⁻⁴M

Tabela 41. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 692 (APP A692G) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNazą H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G_{37}^0$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta \Delta G_{37}^0$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydowa w miejscu SNP	Długość ASO / dodatkowe niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
692C bKW	UUUGCAGAAGAUG AAACGCTCTTCUAC	115.6 ± 5.1 (114.2 ± 8.1)	315.9 ± 24.1 (319.9 ± 15.2)	16.35 ± 0.39 (16.25 ± 0.64)	65.8 (65.8)	1.57	-1.4	rC-dG	13/-	97.0 ± 3.8
692G bKW	UUUGGAGAAGAUG AAACGCTCTTCUAC	111.4 ± 2.8 (103.6 ± 4.5)	318.9 ± 8.5 (295.1 ± 13.9)	12.43 ± 0.12 (12.12 ± 0.21)	54.4 (54.7)	5.49	-12.8	rG-dG	13/-	96.1 ± 1.9
692C bKM	UUUGCAGAAGAUG AAACCTCTTCUAC	90.8 ± 3.2 (91.6 ± 3.0)	261.0 ± 10.1 (263.7 ± 9.5)	9.81 ± 0.08 (9.84 ± 0.10)	48.6 (48.6)	8.11	-18.6	rC-dC	13/-	97.9 ± 0.4
692G bKM	UUUGGAGAAGAUG AAACCTCTTCUAC	128.3 ± 7.5 (128.5 ± 8.4)	355.9 ± 22.2 (356.3 ± 24.9)	17.92 ± 0.59 (17.98 ± 0.67)	67.2 (67.3)	0.00	0.0	rG-dC	13/-	94.0 ± 5.7
692C lb1	UUUGCAGAAGAUG AACGUCU	55.9 ± 2.8 (67.0 ± 7.2)	150.1 ± 8.9 (184.6 ± 21.9)	9.29 ± 0.1 (9.71 ± 0.39)	53.1 (52.5)	8.63	-14.1	rC-G ^L	7/-	-
692G lb1	UUUGGAGAAGAUG AACGUCU	40.4 ± 2.7 (41.6 ± 4.3)	115.4 ± 9.1 (119.2 ± 15.0)	4.60 ± 0.18 (4.58 ± 0.36)	22.8 (23.1)	13.32	-44.4	rG-G ^L	7/-	-
692C lb2	UUUGCAGAAGAUG AAACGUCUUC	69.1 ± 1.0 (79.8 ± 2.5)	182.1 ± 3.0 (214.1 ± 7.4)	12.60 ± 0.07 (13.37 ± 0.21)	66.9 (66.1)	5.32	-0.3	rC-G ^L	10/-	-
692G lb2	UUUGGAGAAGAUG AAACGUCUUC	71.4 ± 1.7 (70.7 ± 1.0)	202.5 ± 5.4 (200.0 ± 3.0)	8.64 ± 0.03 (8.62 ± 0.06)	46.4 (46.4)	9.28	-20.8	rG-G ^L	10/-	-
692C b8	UUUGCAGAAGAUG AAACCTCTAGUAC	58.5 ± 2.8 (58.1 ± 5.8)	172.7 ± 9.5 (171.2 ± 19.2)	4.92 ± 0.14 (4.95 ± 0.23)	28.7 (28.8)	3.39	-14.7	rC-dC	13/ rA ₉ -dA rG ₁₀ -dG	1.1 ± 1.9
692G b8	UUUGGAGAAGAUG AAACCTCTAGUAC	87.9 ± 1.6 (84.0 ± 3.3)	256.5 ± 5.2 (244.2 ± 10.7)	8.31 ± 0.01 (8.29 ± 0.07)	43.4 (43.6)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rA ₉ -dA rG ₁₀ -dG	88.1 ± 8.6
692C b12	UUUGCAGAAGAUG AAACCACTTCUAC	65.1 ± 3.1 (60.9 ± 3.9)	193.7 ± 10.5 (179.6 ± 12.8)	5.05 ± 0.13 (5.21 ± 0.12)	30.1 (30.4)	3.74	-15.1	rC-dC	13/ rA ₆ -dA rG ₇ -dG	4.4 ± 6.2
692G b12	UUUGGAGAAGAUG AAACCACTTCUAC	87.2 ± 2.2 (85.1 ± 3.9)	252.8 ± 6.9 (246.1 ± 12.3)	8.79 ± 0.03 (8.79 ± 0.07)	45.2 (45.4)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rA ₆ -dA rG ₇ -dG	90.1 ± 4.6
15 692C b8"	UCUUUUCAGAAGAUG AGAAACCTCTAGUAC	48.5 ± 1.8 (43.7 ± 7.4)	127.9 ± 5.6 (112.6 ± 23.5)	8.84 ± 0.04 (8.72 ± 0.24)	52.5 (53.4)	-0.30	3.8	rC-dC	15/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	5.4
15 692G b8"	UCUUUUGAGAAGAUG AGAAACCTCTAGUAC	71.7 ± 1.0 (79.5 ± 11.6)	201.7 ± 3.3 (226.1 ± 36.8)	9.14 ± 0.02 (9.32 ± 0.18)	48.7 (48.3)	0.00	0.0	rG-dC	15/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	94.1
15 692C b12"	UCUUUUCAGAAGAUG AGAAACCACTTCUAC	32.3 ± 1.0 (31.1 ± 11.2)	80.5 ± 3.3 (76.3 ± 36.0)	7.32 ± 0.02 (7.39 ± 0.19)	44.8 (45.9)	-0.26	2.5	rC-dC	15/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	10.2
15 692G b12"	UCUUUUGAGAAGAUG AGAAACCACTTCUAC	62.4 ± 2.3 (61.9 ± 4.9)	176.6 ± 7.4 (175.0 ± 16.0)	7.58 ± 0.03 (7.58 ± 0.12)	42.3 (42.4)	0.00	0.0	rG-dC	15/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	32.1

17 692C b8"	UCUUUGCAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	51.2 ± 2.2 (48.9 ± 14.7)	135.4 ± 6.8 (127.8 ± 45.9)	9.15 ± 0.06 (9.21 ± 0.55)	53.7 (55.0)	-0.54	4.1	rC-dC	15/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	4.9 ± 4.3
17 692G b8"	UCUUUGGAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	81.1 ± 3.6 (86.4 ± 13.0)	230.4 ± 11.2 (246.6 ± 40.7)	9.69 ± 0.10 (9.87 ± 0.33)	49.6 (49.5)	0.00	0.0	rG-dC	15/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	96.4 ± 1.2
17 692C b12"	UCUUUGCAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	39.1 ± 2.6 (37.0 ± 17.6)	101.4 ± 8.3 (94.7 ± 57.4)	7.62 ± 0.08 (7.67 ± 0.45)	45.9 (46.9)	0.45	2.0	rC-dC	15/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	2.8 ± 3.9
17 692G b12"	UCUUUGGAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	71.1 ± 1.8 (72.4 ± 8.4)	203.2 ± 5.8 (207.6 ± 27.0)	8.07 ± 0.02 (8.05 ± 0.11)	43.9 (43.6)	0.00	0.0	rG-dC	15/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	45.4 ± 11.3
17 692C b8'	UCUUUGCAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	109.1 ± 2.9 (93.8 ± 6.1)	317.7 ± 9.1 (269.5 ± 19.5)	10.52 ± 0.07 (10.17 ± 0.14)	48.8 (49.5)	7.48	-14.7	rC-dC	17/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	93.6 ± 1.3
17 692G b8'	UCUUUGGAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	145.6 ± 3.0 (125.8 ± 46.8)	411.2 ± 8.9 (352.5 ± 140.7)	18.00 ± 0.21 (16.5 ± 3.19)	63.5 (63.7)	0.00	0.0	rG-dC	17/ rA ₁₁ -dA rG ₁₂ -dG	91.8 ± 1.0
17 692C b12'	UCUUUGCAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	85.2 ± 2.9 (73.6 ± 2.2)	241.0 ± 9.2 (204.7 ± 7.1)	10.42 ± 0.09 (10.07 ± 0.11)	51.9 (52.7)	2.23	-11.9	rC-dC	17/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	93.3 ± 1.6
17 692G b12'	UCUUUGGAGAAGUUG AGAACCTCTAGUAC	77.0 ± 2.7 (86.3 ± 10.1)	207.6 ± 8.2 (235.3 ± 30.4)	12.65 ± 0.18 (13.28 ± 0.68)	63.8 (63.3)	0.00	0.0	rG-dC	17/ rA ₈ -dA rG ₉ -dG	95.9 ± 0.4
692C bWBrG	UUUGCAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	107.6 ± 2.8 (109.2 ± 6.2)	300.5 ± 8.6 (305.4 ± 18.8)	14.37 ± 0.18 (14.45 ± 0.41)	61.4 (61.2)	0.00	0.0	rC-d ^{8Br} G	13/-	97.9 ± 2.3
692G bWBrG	UUUGGAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	108.4 ± 1.2 (102.1 ± 18.3)	308.3 ± 3.7 (288.8 ± 56.3)	12.79 ± 0.06 (12.49 ± 0.88)	56.0 (56.2)	1.58	-5.4	rG-d ^{8Br} G	13/-	96.5 ± 2.4
692C bUN1	UUUGCAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	59.0 ± 1.0 (64.5 ± 4.2)	173.1 ± 3.5 (191.3 ± 13.8)	5.36 ± 0.04 (5.18 ± 0.13)	31.0 (30.6)	4.49	-17.8	rC-dC	13/ rG ₁₀ -C ^U	0
692G bUN1	UUUGGAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	90.3 ± 2.2 (91.6 ± 4.1)	259.2 ± 6.9 (263.3 ± 12.6)	9.85 ± 0.05 (9.89 ± 0.15)	48.8 (48.8)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rG ₁₀ -C ^U	95.9 ± 1.2
692C bUN2	UUUGCAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	68.7 ± 1.5 (66.5 ± 4.5)	206.9 ± 5.0 (199.6 ± 15.2)	4.51 ± 0.07 (4.60 ± 0.20)	28.1 (28.3)	3.49	-15.3	rC-dC	13/ rA ₉ -T ^U rG ₁₀ -C ^U	0
692G bUN2	UUUGGAGAAGUUG AAACCTCTTTCUAC	72.5 ± 3.1 (70.8 ± 3.0)	208.1 ± 9.9 (202.5 ± 9.6)	8.00 ± 0.04 (7.98 ± 0.07)	43.4 (43.5)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rA ₉ -T ^U rG ₁₀ -C ^U	93.1 ± 0.1
692C B b13	GUUCUUUGCAGAA CAAGAAACCAU	51.6 ± 1.0 (51.0 ± 20.3)	139.8 ± 3.3 (137.9 ± 64.7)	8.19 ± 0.01 (8.18 ± 0.39)	47.3 (47.4)	-0.05	2.2	rC-dC	13/rA ₁₀ -dA	0
692G B b13	GUUCUUUGGAGAA CAAGAAACCAU	62.9 ± 1.9 (58.5 ± 9.1)	176.7 ± 6.0 (162.0 ± 29.3)	8.14 ± 0.02 (8.20 ± 0.09)	45.1 (46.1)	0.00	0.0	rG-dC	13/rA ₁₀ -dA	92.0 ± 1.0
692C B b14	GUUCUUUGCAGAA CAAGAAAGCTAU	47.0 ± 1.4 (52.2 ± 10.5)	125.8 ± 4.4 (142.0 ± 33.2)	8.01 ± 0.02 (8.11 ± 0.24)	47.1 (46.7)	-0.41	3.0	rC-dC	13/rG ₈ -dG	0
692G B b14	GUUCUUUGGAGAA CAAGAAAGCTAU	47.7 ± 1.3 (59.9 ± 9.8)	129.3 ± 4.2 (168.4 ± 30.9)	7.60 ± 0.02 (7.70 ± 0.21)	44.1 (43.2)	0.00	0.0	rG-dC	13/rG ₈ -dG	79.5 ± 4.5

17 692C B ba15	GUGUUCUUUG C AGAAGA <u>C</u> A AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	46.4 ± 2.2 (57.0 ± 12.4)	119.1 ± 6.8 (151.7 ± 37.4)	9.50 ± 0.08 (10.00 ± 0.81)	58.2 (57.1)	-2.47	19.3	rC-dC	15/ 5'-rGrU rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	0
17 692G B ba15	GUGUUCUUUG G AGAAGA <u>C</u> A AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	84.5 ± 3.8 (36.6 ± 11.5)	249.7 ± 12.2 (94.3 ± 37.5)	7.03 ± 0.04 (7.34 ± 0.41)	38.9 (44.0)	0.00	0.0	rG-dC	15/ 5'-rGrU rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	81.3 ± 0.6
17 692C B ba16	GUGUUCUUUG C AGAAGA <u>A</u> C AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	58.7 ± 2.2 (59.2 ± 10.1)	156.7 ± 6.9 (157.9 ± 31.2)	10.08 ± 0.09 (10.19 ± 0.47)	57.0 (57.5)	-1.95	10.4	rC-dC	16/ 5'-rG rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	0
17 692G B ba16	GUGUUCUUUG G AGAAGA <u>A</u> C AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	53.1 ± 1.1 (43.9 ± 11.6)	144.9 ± 3.4 (115.3 ± 37.1)	8.13 ± 0.01 (8.17 ± 0.17)	46.6 (49.0)	0.00	0.0	rG-dC	16/ 5'-rG rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	78.0 ± 5.0
17 692C B ba17	GUGUUCUUUG G AGAAGA <u>C</u> A AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	67.0 ± 1.5 (64.3 ± 12.9)	183.4 ± 4.8 (175.0 ± 39.8)	10.13 ± 0.06 (10.02 ± 0.52)	54.6 (54.8)	-1.56	9.4	rC-dC	17/ rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	0
17 692G B ba17	GUGUUCUUUG G AGAAGA <u>C</u> A AAGAAAC C --- <u>UCU</u>	79.7 ± 1.7 (71.6 ± 18.5)	229.2 ± 5.5 (203.1 ± 58.9)	8.57 ± 0.02 (8.57 ± 0.22)	45.2 (46.1)	0.00	0.0	rG-dC	17/ rA ₁₂ - ____ rG ₁₃ - ____ rA ₁₄ - ____	89.1 ± 2.7

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupleksu, żółte podświetlenie oznacza nukleotydy typu UNA, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA, kolor pomarańczowy – 8-bromo-deoksyguanozyna; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupleksu, porównywane w ramach analizy wyników;
^a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10⁻⁴M

Tabela 42. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 693 (APP E693G) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNazą H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydowa w miejscu SNP	Długość ASO / dodatkowe niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
693A eKW	UUUGCAG A AGAUG <u>AAACGTCTTCUAC</u>	115.6 ± 5.1 (114.2 ± 8.1)	319.9 ± 15.2 (315.9 ± 24.1)	16.35 ± 0.39 (16.25 ± 0.64)	65.8 (65.8)	0.65	-7.4	rA-dT	13/-	98.8 ± 0.7
693G eKW	UUUGCAG G AGAUG <u>AAACGTCTTCUAC</u>	106.9 ± 1.5 (108.4 ± 2.8)	295.9 ± 4.6 (300.2 ± 8.5)	15.15 ± 0.11 (15.26 ± 0.20)	64.2 (64.2)	1.85	-9	rG-dT	13/-	97.1 ± 1.2
693A eKM	UUUGCAG A AGAUG <u>AAACGTCCTCUAC</u>	83.9 ± 2.9 (92.2 ± 5.3)	232.8 ± 8.9 (258.1 ± 16.2)	11.69 ± 0.15 (12.10 ± 0.27)	57.3 (57.0)	5.31	-15.9	rA-dC	13/-	96.9 ± 1.7
693G eKM	UUUGCAG G AGAUG <u>AAACGTCCTCUAC</u>	100.2 ± 5.1 (107.8 ± 7.1)	268.2 ± 14.9 (290.4 ± 20.9)	17.00 ± 0.48 (17.70 ± 0.62)	73.2 (72.9)	0.00	0.0	rG-dC	13/-	97.7 ± 2.3
693A le1	UUUGCAG A AGAUG <u>GUCUUCU</u>	60.3 ± 1.2 (68.0 ± 8.9)	164.8 ± 3.7 (188.6 ± 27.7)	9.24 ± 0.04 (9.52 ± 0.24)	51.6 (51.3)	7.76	-21.6	rA-U ^L	7/-	-
693G le1	UUUGCAG G AGAUG <u>GUCUUCU</u>	51.6 ± 0.8 (65.9 ± 8.6)	142.1 ± 2.5 (187.9 ± 26.8)	7.52 ± 0.01 (7.62 ± 0.30)	43.0 (42.2)	9.48	-30.2	rG-U ^L	7/-	-
693A le2	UUUGCAG A AGAUG <u>CGUCUUCUAC</u>	81.8 ± 1.7 (83.5 ± 2.7)	225.4 ± 5.3 (230.6 ± 8.3)	11.88 ± 0.09 (11.98 ± 0.13)	58.7 (58.7)	5.12	-14.5	rA-U ^L	10/-	-
693G le2	UUUGCAG G AGAUG <u>CGUCUUCUAC</u>	84.6 ± 1.7 (82.5 ± 2.4)	238.9 ± 5.3 (232.6 ± 7.7)	10.44 ± 0.06 (10.38 ± 0.06)	52.0 (52.2)	6.56	-21.2	rG-U ^L	10/-	-
693A e1	UUU G CA G AGAUG <u>AAAGCTCCTCUAC</u>	64.4 ± 2.3 (60.1 ± 3.3)	187.6 ± 7.5 (173.3 ± 10.8)	6.26 ± 0.05 (6.37 ± 0.12)	35.7 (36.2)	4.54	-21.6	rA-dC	13/ rG ₄ -dG rC ₅ -dC	41.1 ± 12.6
693G e1	UUU G CA G AGAUG <u>AAAGCTCCTCUAC</u>	69.6 ± 2.1 (68.5 ± 5.7)	189.5 ± 6.4 (186.2 ± 17.2)	10.80 ± 0.09 (10.77 ± 0.36)	57.3 (57.5)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rG ₄ -dG rC ₅ -dC	97.6 ± 1.4
693A e3	UUUGCAG A AGAUG <u>AAACGTCCAGUAC</u>	70.1 ± 2.5 (58.3 ± 3.8)	205.7 ± 8.2 (166.8 ± 12.1)	6.35 ± 0.05 (6.54 ± 0.11)	36.2 (37.0)	3.22	-12.8	rA-dC	13/ rA ₉ -dA rG ₁₀ -dG	21.6 ± 10.7
693G e3	UUUGCAG G AGAUG <u>AAACGTCCAGUAC</u>	81.4 ± 2.4 (75.7 ± 3.0)	231.7 ± 7.6 (213.8 ± 9.10)	9.57 ± 0.07 (9.41 ± 0.17)	49.0 (49.3)	0.00	0.0	rG-dC	13/ rA ₉ -dA rG ₁₀ -dG	94.4 ± 3.4

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupleksu, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupleksu porównywane w ramach analizy wyników; ^a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10⁻⁴M

Tabela 43. Zestawienie kompletnych parametrów termodynamicznych RNA 717 (APP V717I) w dupleksach z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi.

Dupleksy		Zależność T_M^{-1} od $\log C_T$ (Średnie dopasowanie krzywych topnienia)						Struktura		Wyniki trawień RNAz H <i>in vitro</i>
Nazwa	Sekwencja 5'-3' RNA 3'-5' ASO	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (eu)	$-\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	T_M^a (°C)	$\Delta\Delta G^0_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	Para nukleotydy w miejscu SNP	Długość ASO / dodatki niesparowania	Wydajność hydrolizy (%) (po 20')
717G dKW	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGCAGT <u>A</u> GU	67.1 ± 1.1 (83.6 ± 5.9)	177.7 ± 3.3 (227.5 ± 17.4)	12.00 ± 0.07 (13.05 ± 0.51)	64.5 (63.2)	-1.02	3.2	rG -dC	13/-	60.8 ± 7.7
717A dKW	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGCAGT <u>A</u> GU	100.9 ± 2.5 (81.9 ± 8.4)	298.6 ± 7.9 (237.5 ± 27.0)	8.35 ± 0.02 (8.24 ± 0.14)	42.7 (43.6)	2.63	-18.6	rA -dC	13/-	16.1 ± 2.9
717G dKM	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGT <u>A</u> GT <u>A</u> GU	64.2 ± 1.2 (81.8 ± 9.1)	173.2 ± 3.8 (227.3 ± 27.5)	10.48 ± 0.05 (11.30 ± 0.60)	57.3 (56.2)	0.50	-4.0	rG -dT	13/-	64.7 ± 9.2
717A dKM	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGT <u>A</u> GT <u>A</u> GU	61.2 ± 1.6 (77.2 ± 7.2)	161.9 ± 4.9 (210.4 ± 21.2)	10.98 ± 0.09 (11.91 ± 0.62)	61.3 (60.2)	0.00	0.0	rA -dT	13/-	83.6 ± 12.6
717G Id1	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA UAG <u>C</u> AGU	48.0 ± 0.9 (59.1 ± 3.50)	124.7 ± 2.8 (159.3 ± 11.1)	9.31 ± 0.03 (9.73 ± 0.26)	56.1 (54.7)	1.67	-5.2	rG -rC ^L	7/-	-
717A Id1	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA UAG <u>C</u> AGU	50.5 ± 2.1 (50.1 ± 7.0)	137.8 ± 6.7 (136.5 ± 22.5)	7.71 ± 0.04 (7.78 ± 0.06)	44.4 (45.0)	1.60	-16.9	rA -rC ^L	7/-	-
717G Id2	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA CUAG <u>C</u> AGUAG	81.8 ± 1.6 (98.6 ± 3.6)	215.4 ± 4.7 (264.6 ± 10.4)	15.01 ± 0.15 (16.55 ± 0.36)	72.9 (72.1)	-4.03	11.6	rG -rC ^L	10/-	-
717A Id2	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA CUAG <u>C</u> AGUAG	75.7 ± 2.6 (80.4 ± 6.8)	210.7 ± 8.1 (225.1 ± 20.8)	10.36 ± 0.10 (10.57 ± 0.32)	53.5 (53.4)	0.62	-7.8	rA -rC ^L	10/-	-
717G d11	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>A</u> T <u>G</u> CAGT <u>A</u> GU	72.4 ± 1.6 (76.4 ± 4.4)	201.8 ± 5.1 (214.2 ± 13.5)	9.80 ± 0.05 (9.93 ± 0.17)	51.7 (51.5)	-2.7	11.2	rG -dC	13/ rA ₄ -dA rU ₅ -dT	89.6 ± 0.7
717A d1	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>A</u> T <u>G</u> CAGT <u>A</u> GU	51.1 ± 2.0 (41.3 ± 6.0)	141.9 ± 6.6 (109.5 ± 19.8)	7.10 ± 0.04 (7.30 ± 0.22)	40.5 (42.9)	0.00	0.0	rA -dC	13/ rA ₄ -dA rU ₅ -dT	90.8 ± 5.9
717G d2	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>A</u> T <u>G</u> TAGT <u>A</u> GU	54.8 ± 1.4 (55.7 ± 6.2)	151.5 ± 4.6 (154.3 ± 19.7)	7.79 ± 0.01 (7.87 ± 0.11)	44.3 (44.6)	0.88	-2.9	rG -dT	13/ rA ₄ -dA rU ₅ -dT	93.6 ± 2.9
717A d2	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>A</u> T <u>G</u> TAGT <u>A</u> GU	67.5 ± 3.4 (62.7 ± 4.5)	189.5 ± 10.8 (174.2 ± 14.4)	8.67 ± 0.08 (8.65 ± 0.08)	47.2 (47.8)	0.00	0.0	rA -dT	13/ rA ₄ -dA rU ₅ -dT	97.3 ± 2.6
717G d4	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGT <u>A</u> CA <u>A</u> GU	18.7 ± 0.7 (22.5 ± 5.3)	40.2 ± 2.2 (52.9 ± 17.2)	6.28 ± 0.05 (6.12 ± 0.16)	32.8 (31.4)	0.75	-8.3	rG -dT	13/ rC ₉ -dC rA ₁₀ -dA	6.7 ± 12.4
717A d4	GUGAUC <u>A</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGT <u>A</u> CA <u>A</u> GU	38.7 ± 0.7 (39.7 ± 6.3)	102.1 ± 2.3 (105.0 ± 20.5)	7.03 ± 0.01 (7.11 ± 0.07)	41.1 (41.6)	0.00	0.0	rA -dT	13/ rC ₉ -dC rA ₁₀ -dA	81.4 ± 26.3
717G d5	GUGAUC <u>G</u> UCAUCA C <u>A</u> C <u>T</u> AGCACA <u>A</u> GU	33.4 ± 1.6 (45.5 ± 12.4)	83.6 ± 5.1 (122.2 ± 39.4)	7.45 ± 0.05 (7.59 ± 0.22)	45.8 (44.4)	-0.51	6.1	rG -dC	13/ rC ₉ -dC rA ₁₀ -dA	54.5 ± 6.5

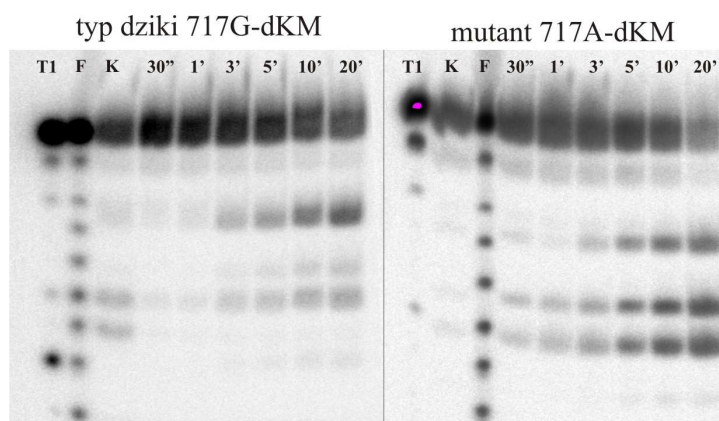
717A d5	GUGAUC <u>CA</u> UCA <u>CA</u> CTAGCACA <u>AGU</u>	47.2 ± 1.4 (56.6 ± 9.0)	129.8 ± 4.6 (160.4 ± 29.4)	6.94 ± 0.03 (6.85 ± 0.26)	39.7 (38.7)	0.00	0.0	rA-dC	13/ rC ₉ -dC rA ₁₀ -dA	1.1 ± 0.9
717G d7	GUGAUC <u>GU</u> CAUCA <u>CA</u> CTAG <u>GT</u> CTAGU	31.1 ± 1.4 (34.2 ± 10.8)	80.8 ± 4.8 (90.5 ± 35.9)	6.00 ± 0.07 (6.10 ± 0.43)	31.8 (33.1)	1.34	-9.3	rG-dG	13/ rC ₆ -dC rU ₈ -dT rC ₉ -dC	4.7 ± 6.2
717A d7	GUGAUC <u>CA</u> UCAUCA <u>CA</u> CTAG <u>GT</u> CTAGU	61.5 ± 2.9 (59.7 ± 6.8)	174.6 ± 9.2 (168.5 ± 22.1)	7.34 ± 0.04 (7.40 ± 0.09)	41.1 (41.6)	0.00	0.0	rA-dG	13/ rC ₆ -dC rU ₈ -dT rC ₉ -dC	0.6 ± 1.2
717G d14	GUGAUC <u>GU</u> CAUCA <u>CA</u> CTAGCAG <u>AGU</u>	74.4 ± 1.1 (73.5 ± 5.1)	204.9 ± 3.4 (201.8 ± 15.5)	10.89 ± 0.05 (10.89 ± 0.25)	56.3 (56.6)	4.01	16.6	rG-dC	13/rA ₁₀ -dA	94.1 ± 1.7
717A d14	GUGAUC <u>CA</u> UCAUCA <u>CA</u> CTAGCAG <u>AGU</u>	40.3 ± 1.3 (43.0 ± 6.4)	107.6 ± 4.2 (116.4 ± 20.7)	6.88 ± 0.03 (6.92 ± 0.08)	39.7 (39.8)	0.00	0.0	rA-dC	13/rA ₁₀ -dA	10.1 ± 4.9

Kolorem czerwonym oznaczono parę w miejscu SNP, kolorem niebieskim – niekanoniczne pary w obrębie dupleksu, podkreślenie- LNA, kursywa – 2'-O-metylo-RNA; pogrubioną czcionką oznaczono parametry termodynamiczne uzyskane z zależności odwrotności temperatury topnienia i logarytmu stężenia dupleksu porównywane w ramach analizy wyników; ^a – temperatura topnienia dupleksu w stężeniu 10⁻⁴M

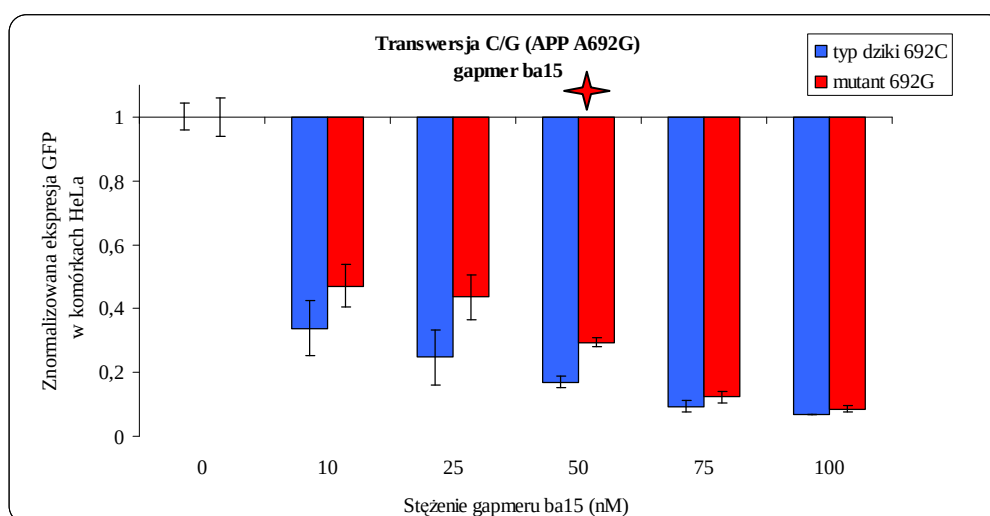
Tabela 44. Przykładowy arkusz kalkulacyjny służący przygotowaniu próbek do eksperymentu topnień UV.

Sequence		Abs. (80C) in water	Volume (ml)	Dilution	# OD	Ext. Coeff	# Mol	Abs. (20C) in buffer
53G	GGUGUAACAACAG	4,650	0,5	10	23,3	136160	1,71E-07	
hKM	C ^L U ^M G ^L ttgtcacA ^L C ^M C ^L	3,600	0,5	10	18,0	115300	1,56E-07	

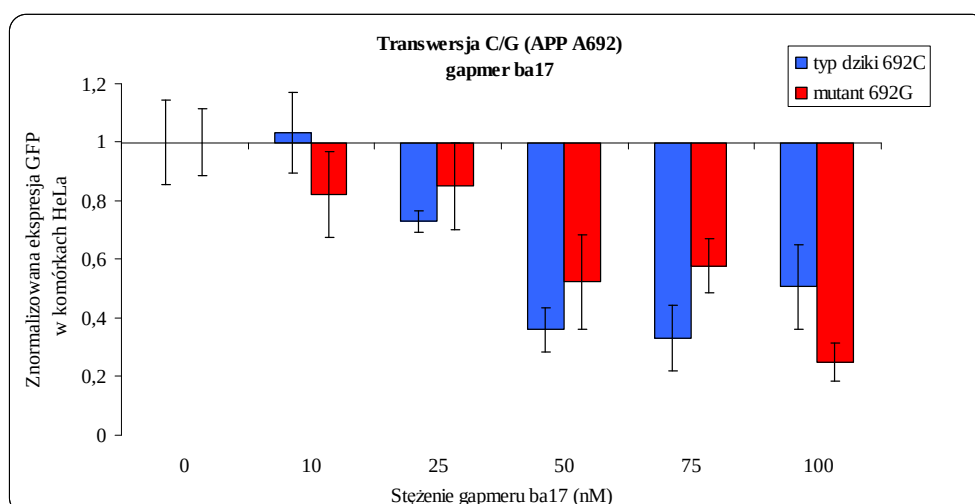
PS1		e260=		125730					
Conc. #	Conc. (M)	Path (cm)	Th. Abs	Volume (ul)	# Mol	WA53G	hKM	Vol. Prevs. (ul)	Vol. Buffer (ul)
						Vol. Stock A (ul)	Vol. Stock B (ul)		
1	1,2E-04	0,100	1,50	30	3,579E-09	5,24	5,73	Dry Down	30
2	7,3E-05	0,100	0,92	30	2,195E-09			18,40	11,60
3	4,5E-05	0,100	0,56	30	1,346E-09			18,40	11,60
4	2,8E-05	0,500	1,73	150	4,127E-09	6,04	6,61	Dry Down	150
5	1,7E-05	0,500	1,06	150	2,531E-09			91,99	58,01
6	1,0E-05	0,500	0,65	150	1,552E-09			91,99	58,01
7	6,3E-06	1,000	0,80	300	1,903E-09	2,79	3,05	Dry Down	300
8	3,9E-06	1,000	0,49	300	1,167E-09			183,97	116,03
9	2,4E-06	1,000	0,30	300	7,158E-10			183,97	116,03



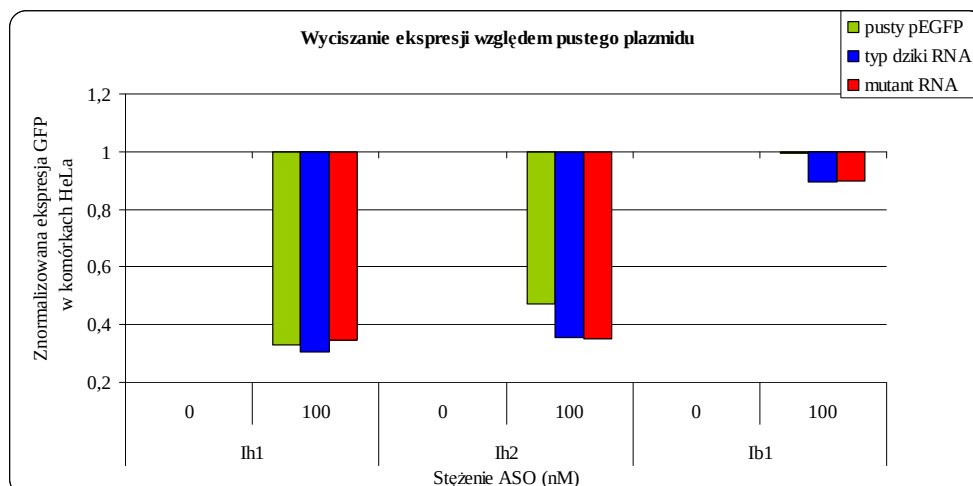
Rysunek 66. Kinetyka trawienia dupleksów RNA 717 z gapmerem dKM



Wykres 81. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru ba15. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Istotnie statystycznie różnice oznaczono gwiazdką.



Wykres 82. Zmiana ekspresji GFP pod wpływem gapmeru ba15. Wyniki reakcji qPCR – średnie poziomy ekspresji dwóch wariantów RNA w zależności od stężenia stosowanych oligonukleotydów poddane były analizie statystycznej ($P < 0,05$). Uzyskane różnice okazały się nieistotne statystycznie.



Wykres 83. Wyciszenie ekspresji poszczególnych konstruktów plazmidowych względem pustego plazmidu GFP w obecności 100 nM inhibitora. Ih1/ Ih2 – inhibitory dla sekwencji RNA 53, Ib1 – inhibitor dla sekwencji RNA 692.

Tabela 45.

ASO	Wydajność hydrolizy (%)	
	Typ dziki 99-46G	Mutant 99-46A
kKW	69,8 ± 25,9	72,8 ± 3,8
kKM	49,1 ± 29,9	72,6 ± 4,3
k1	92,2 ± 1,0	38,3 ± 17,1
k2	29,7 ± 17,1	56,4 ± 21,2
k3	61,9 ± 24,0	43,6 ± 15,3
k4	46,5 ± 23,1	52,6 ± 27,7

Tabela 46.

ASO	Wydajność hydrolizy (%)	
	Typ dziki 99-53G	Mutant 99-53A
hKW	83,5 ± 3,3	64,6 ± 8,2
hKM	78,8 ± 1,4	77,5 ± 12,1
h1	51,5 ± 11,1	53,4 ± 8,7
h2	24,6 ± 1,3	69,9 ± 6,9
h3	52,7 ± 22,2	47,5 ± 4,0
h4	71,9 ± 17,2	60,0 ± 1,7
h5	77,8 ± 1,5	43,3 ± 0,9
h6	84,1 ± 0,8	32,3 ± 8,9

VII. STRESZCZENIE

Alleloselektywne wyciszanie zmutowanych wariantów genów jest zagadnieniem często podejmowanym na całym świecie, w kontekście poszukiwania terapeutyków na nieuleczalne jak dotąd, dziedziczne w sposób autosomalny dominujący schorzenia. W literaturze zaprezentowanych zostało kilka rozwiązań, prowadzących do ukierunkowanej inhibicji ekspresji wariantu zmutowanego genu m.in. dla chorób neurodegeneracyjnych wynikających z ekspansji trójnukleotydowych powtórzeń, choroby Alzheimera czy ALS. W zdecydowanej większości wykorzystują one mechanizm interferencji RNA. Celem niniejszej rozprawy było osiągnięcie alleloselektywnej degradacji RNA różniących się pojedynczą substytucją nukleotydową, w obecności antysensowych oligonukleotydów, przy udziale rybonukleazy H.

W ramach realizacji podjętego celu zweryfikowano dwie nowe, niezależne strategie. Pierwsza z nich, nazwana koncepcją tandemowych oligonukleotydów, wykorzystuje dwa współdziałające ze sobą oligonukleotydy, różniące się strukturalnie i funkcjonalnie. Aktywnie działającym oligonukleotydem jest gapmer, komplementarny do formy zmutowanej RNA. Posiada on w swojej strukturze 7-nukleotydowy fragment DNA, tzw. gap, aktywujący rybonukleazę H, otoczony modyfikowanymi rybonukleotydami, zwiększającymi trwałość termodynamiczną tworzonego dupleksu i stabilność w obecności komórkowych nukleaz. Współdziałający z nim drugi oligonukleotyd, krótszy i komplementarny do formy dzikiej RNA, spełnia względem niej funkcję inhibitora kompetycyjnego. Zawierając modyfikowane nukleotydy 2'-OMe-RNA wzmacniające trwałość komplementarnych par dupleksu RNA-inhibitor, oligonukleotyd ten uniemożliwia związanie się formy dzikiej RNA z gapmerem, przez co osłania ją przed działaniem rybonukleazy H. Druga koncepcja bazuje na zaburzeniu helikalności dupleksu poprzez wprowadzane motywy strukturalne (pojedyncze i podwójne niesparowanie, jednostronne wybrzuszenie, pętle nukleotydowe), a także nukleotydowe i nienukleotydowe modyfikacje. Ich celem jest termodynamiczne i strukturalne zróżnicowanie dupleksów dwóch wariantów RNA różniących się pojedynczym nukleotydem, względem aktywności hydrolitycznej rybonukleazy H.

Spośród różnych typów nukleotydowych substytucji wybrano zmiany najczęściej pojawiające się w genomie ludzkim tj. G/A, C/G, C/T i A/G, występujące w kontekście neurodegeneracji. Geny uwikłane w procesy neurodegeneracyjne są jak dotąd najczęstszym celem podejść alleloselektywnych. Substytucje nukleotydowe, w odniesieniu do których analizowano proponowane alleloselektywne koncepcje, występują w obrębie genów APP,

SNCA oraz SOD1 i generują rzadkie przypadki dziedzicznej postaci choroby Alzheimera, Parkinsona oraz ALS. Pulę zsyntetyzowanych dla każdego przypadku antysensowych oligonukleotydów selekcjonowano w reakcji z RNazą H *in vitro*. Następnie, dla oligonukleotydów rokujących działanie alleloselektywne przeprowadzono pomiary termodynamiczne w dupleksach z wariantami RNA oraz testowano je w linii komórkowej *HeLa* transfekowanej plazmidami zawierającymi około stu nukleotydowe fragmenty poszczególnych wariantów analizowanych genów.

Rezultaty uzyskane dla obydwu koncepcji pozwalają stwierdzić, że możliwa jest alleloselektywna degradacja RNA różniących się pojedynczym nukleotydem dla większości analizowanych przypadków. Trwałość termodynamiczna poszczególnych dupleksów miała znaczenie dla powodzenia koncepcji tandemowych oligonukleotydów, choć skuteczność jej działania w linii komórkowej *HeLa* zwykle była niższa niż w warunkach *in vitro*. Dla powodzenia koncepcji motywów strukturalnych parametry termodynamiczne duplexu nie miały większego znaczenia, dopóki pozwalały na jego utworzenie się. Zauważono, że wydajność alleloselektywnej degradacji w dużym stopniu zależy od typu substytucji, jej otoczenia sekwencyjnego, a także od stężenia zastosowanego oligonukleotydu. Wytypowano motywy strukturalne najlepiej różnicujące poziom degradacji wariantu dzikiego i zmutowanego RNA, jednak nie dla wszystkich przypadków okazały się one jednakowo wydajne.

ABSTRACT

Allele-selective silencing of mutant genes, based on antisense strategy and RNAi machinery, is strongly explored field of research, especially in terms of its therapeutic applications. Much of successful work has been already done in this area. RNA interference is a tool of choice much more frequently than traditional antisense approaches, mainly because of strong sequence-specificity to the target. RNase H, known for its RNA silencing potential as first, is non-sequence-specific endonuclease, the function of which was originally not associated with the down regulation of gene expression, but with the maintenance of DNA stability and DNA repair. The discovery made by Zamecnik and Stephenson over 35 years ago, that RNA is hydrolyzed in presence of complementary oligodeoxyribonucleotides resulting in silencing of gene expression, has revealed a therapeutic mechanism improved until the present day.

The aim of presented thesis is to verify, whether changes in structure of short nucleic acid duplexes can provoke selective hydrolysis of single nucleotide polymorphism (SNP) variants of gene on mRNA level, via RNase H mechanism of action. Antisense gapmers with different sequence complementarity interruptions, nucleotides modifications and non-nucleotide substitutions were used to obtain allele-selective digestion of mutant SNP variant of genes, associated with neurodegeneration, through RNase H cleavage. Two different approaches were applied.

First of them, tandem oligonucleotides approach, assumes usage of two oligonucleotides working simultaneously in order to direct ribonuclease H digestion toward mutant SNP allele. The shorter one fully 2'-O-methyl-RNA modified oligonucleotide, acting as RNase H inhibitor, is targeted to wild type RNA variant of SNP. The longer one, antisense gapmer inducing RNase H cleavage of RNA in heteroduplex, is complementary to mutant RNA variant of SNP. The approach tests whether the difference of one mismatch between two duplexes is able to direct RNase H hydrolysis toward mutant variant of gene.

The second, structural motifs approach is based on the assumption that helical structure interruptions as bulges mismatches, internal loops, also presence of different modified nucleosides such as 8-bromodeoxyguanosine, UNA, and non-nucleotide substitutions are able to determine selective hydrolysis with RNase H via differences in thermodynamic stability and helix conformation of the duplexes.

These two conceptions were investigated for four types of nucleotide substitutions (SNP) C/G, G/A, A/G, C/T, within three genes associated with neurodegeneration: APP,

SOD1 and SNCA. Oligonucleotides, which differentiated level of hydrolysis of both SNP alleles in RNase H assay *in vitro*, were selected for thermodynamic measurements and *in vivo* experiments in *HeLa* cells.

Presented studies have shown that it is possible to direct RNase H hydrolysis toward particular variant of gene using structural rearrangements of heteroduplex helix as well as with use of tandem oligonucleotides, and effect of selectivity mostly depends on antisense oligonucleotide concentration.