

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Olga Perzanowska

Nr albumu: 294564

**Synteza i biofizyczna charakterystyka
modyfikowanych fragmentów ogona poli(A) jako
narzędzi do manipulowania metabolizmem
mRNA**

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr. hab. Jacka Jemielitego
Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii
oraz
dr hab. Joanny Kowalskiej
Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki,
Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej

Warszawa 2023

*Badania zrealizowano w ramach projektu OPUS 16 (2018/31/B/ST5/03821) oraz
projektu OPUS 17 (2019/33/B/ST4/01843) finansowanych ze środków
Narodowego Centrum Nauki*

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorom

Prof. dr. hab. Jackowi Jemielitemu – za umożliwienie mi realizowania badań w laboratorium, przekazany ogrom wiedzy, cenne rady i wsparcie w moim rozwoju naukowym

Dr hab. Joannie Kowalskiej – za opiekę merytoryczną, pomoc w planowaniu eksperymentów i analizie wyników oraz przygotowywaniu tekstów publikacji

Współpracownikom

Dr. Mirosławowi Śmietańskiemu – za owocną współpracę, pomoc w eksperymentach biologicznych i przygotowaniu tekstu publikacji

Dr. Marcinowi Warmińskiemu – za pomoc w nauce syntezy oligonukleotydów

Dr. hab. Pawłowi Sikorskiemu – za pomoc w badaniach biologicznych w liniach komórkowych

Dr. Mikołajowi Chromińskiemu – za pomoc merytoryczną, dokładne sprawdzenie tekstu rozprawy doktorskiej i miłe rozmowy

Dr. Przemysławowi Wanatowi i mgr. Michałowi Kopciałowi – za niezawodne wsparcie, inspirację i dobre rady

Koleżankom i kolegom z Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej – za inspirujące dyskusje, wspaniałą atmosferę i wsparcie

Mojej mamie, bratu Marcinowi, Michałowi, Lucusiowi i Emilii – za Wasze wsparcie

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	10
DOROBIEK NAUKOWY	12
STRESZCZENIE	15
I. CEL PRACY	17
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	18
1. WSTĘP	18
2. KWASY NUKLEINOWE.....	19
2.1. Budowa kwasów nukleinowych	19
2.2. Dojrzwanie informacyjnego RNA u Eukariontów.....	21
2.3. Struktura i biosynteza końca 3' mRNA.....	23
2.4. Inicjacja translacji.....	25
2.5. Degradacja mRNA.....	27
2.6. Białka oddziałujące z ogonem poli(A)	30
2.6.1. <i>Białko PABP</i>	30
2.6.2. <i>Białkowe czynniki deadenylujące</i>	32
2.7. Modyfikowane nukleotydy i ich wpływ na procesy translacji i metabolizmu mRNA ze szczególnym uwzględnieniem ogona poli(A).....	33
2.7.1. <i>Modyfikacje rybozy</i>	33
2.7.2. <i>Modyfikacje fosforanowe</i>	34
2.7.3. <i>Modyfikacje zasad</i>	36
3. ZASTOSOWANIE OLIGONUKLEOTYDÓW W MEDYCYNIE I OPRACOWYWANIU WYSPECJALIZOWANYCH BIOSENSORÓW	40
3.1. Oligonukleotydy o potencjale terapeutycznym	40
3.1.1. <i>Terapeutyczne antysensowne oligonukleotydy</i>	41
3.1.2. <i>mikroRNA o potencjale terapeutycznym</i>	46
3.1.3. <i>siRNA o potencjale terapeutycznym</i>	48
3.1.4. <i>Aptamery</i>	49
3.1.5. <i>Rybozomy, deoksyrybozomy i ich zastosowania terapeutyczne</i>	50
3.2. Oligonukleotydy w strukturach biosensorów o zastosowaniu diagnostycznym	51
4. mRNA JAKO CZĄSTECZKA O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM	55
4.1. Zastosowania mRNA w medycynie	55
4.1.1. <i>mRNA w terapiach genowych oraz strategiach edycji genów</i>	56
4.1.2. <i>mRNA w medycynie regeneracyjnej</i>	58
4.1.3. <i>Szczepionki mRNA</i>	59
4.1.3.1. <i>mRNA w terapiach antynowotworowych</i>	61
4.1.3.2. <i>Antywirusowe szczepionki mRNA</i>	64
4.2. Modyfikacje mRNA o potencjalne terapeutycznym	67
4.2.1. <i>Metody regulacji stabilności terapeutycznych mRNA</i>	67
4.2.2. <i>Metody regulacji immunogenności mRNA</i>	69
4.2.3. <i>Regulacja potencjału translacyjnego syntetycznych mRNA</i>	71
4.2.4. <i>Modyfikacje ogona poli(A)</i>	72

5. METODY OTRZYMYWANIA SYNTETYCZNYCH OLIGORYBONUKLEOTYDÓW, RNA ORAZ mRNA	76
5.1. Otrzymywanie kwasów rybonukleinowych metodą syntezy w fazie stałej	76
5.1.1. Etapy syntezy w fazie stałej wraz z omówieniem grup zabezpieczających	77
5.1.2. Synteza RNA zawierających chemiczne modyfikacje	79
5.2. Transkrypcja <i>in vitro</i>	80
5.2.1. Polimerazy RNA	80
5.2.2. Synteza modyfikowanych RNA metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	81
6. TERMOFOREZA MIKROSKALOWA W BADANIACH KWASÓW NUKLEINOWYCH.....	83
6.1. Podstawy termoforezy mikroskalowej – badania tworzenia kompleksów biologicznych.....	83
6.1.1. Podstawy teoretyczne termoforezy mikroskalowej	83
6.1.2. Pomiary tworzenia kompleksów z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej	86
6.1.3. Zastosowanie termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań molekularnych z udziałem RNA.....	87
III. BADANIA WŁASNE.....	90
7. PLAN BADAŃ	90
8. WYBÓR UKŁADU POMIAROWEGO I OTRZYMYWANIE REAGENTÓW DO BADAŃ	93
8.1. Synteza oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych	93
8.1.1. Synteza oligonukleotydu 5'-Hex-A ₁₂	93
8.1.2. Znakowanie fluorescencyjne 5'-Hex-A ₁₂ (A ₀)	94
8.2. Otrzymywanie oligonukleotydowych analogów poli(A)	95
8.2.1. Analogi poli(A) zawierające 2'-O-metyloadenozyne	96
8.2.2. Analogi zawierające wiązania tiofosfodiesterowe	97
8.2.3. Analogi zawierające 2'-fluoroadenozyne	99
8.2.4. Analogi zawierające N6-metyloadenozyne	100
8.2.5. Analogi zawierające guanozyne oraz niemodyfikowane analogi o różnej długości	101
9. BADANIA ODDZIAŁYWANIA ANALOGÓW POLI(A) Z PABP METODĄ TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ	104
9.1. Optymalizacja warunków pomiarowych	104
9.2. Oddziaływanie sond fluorescencyjnych z PABP	104
9.3. Pomiary kompetycyjnego wiązania modyfikowanych analogów poli(A) do PABP	107
9.3.1. Wiązanie analogów zawierających 2'-O-metyloadenozyne	107
9.3.2. Wiązanie analogów zawierających wiązania tiofosfodiesterowe	108
9.3.3. Wiązanie analogów zawierających 2'-O-fluoroadenozyne	109
9.3.4. Wiązanie analogów zawierających N6-metyloadenozyne	110
9.3.5. Wiązanie analogów zawierających guanozyne oraz o skróconym i wydłużonym łańcuchu	111
9.4. Podsumowanie	112
10. BADANIA PODATNOŚCI ANALOGÓW OGONA POLI(A) NA SPECYFICZNĄ DEGRADACJĘ	114
10.1. Eksperymenty degradacji enzymatycznej analogów poli(A) z udziałem CNOT7 ...	114
10.1.1. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających 2'-O-metyloadenozyne	114
10.1.2. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających wiązania tiofosfodiesterowe	116

10.1.3.	Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających 2'-fluoroadenozyne	118
10.1.4.	Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających N6-metyloadenozyne	119
10.1.5.	Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających guanozyne oraz o niemodyfikowanych łańcuchach różnej długości	119
10.2.	Podsumowanie	120
11.	ANALOGI POLI(A) JAKO INHIBITORY TRANSLACJI	122
11.1.	Badania inhibicji translacji w lizatach retikulocytów króliczych (RRL)	122
11.2.	Podsumowanie wyników	124
12.	OTRZYMYWANIE CHEMICZNIE MODYFIKOWANYCH 5'-FOSFORANÓW DINUKLEOTYDÓW	126
12.1.	Synteza 5'-monofosforanów dinukleotydów	127
12.1.1.	Otrzymywanie dinukleotydów adeninowych	127
12.1.2.	Otrzymywanie dinukleotydów guaninowych	129
13.	MODYFIKACJE KOŃCA 3' OLIGONUKLEOTYDÓW METODĄ LIGACJI ENZYMATYCZNEJ	132
13.1.	Przylączenie modyfikowanych 5'-fosforanów dinukleotydów do końca 3' analogu ogona poli(A)	132
13.2.	Eksperymenty degradacji enzymatycznej modyfikowanych oligonukleotydów z udziałem CNOT7	136
14.	MODYFIKACJE KOŃCA 3' mRNA LUCYFERAZY GAUSSIA	137
14.1.	Otrzymywanie mRNA lucyferazy <i>Gaussia</i> metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	137
14.2.	Przylączenie chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' mRNA lucyferazy <i>Gaussia</i>	139
14.3.	Eksperymenty enzymatycznej deadenyacji <i>in vitro</i> mRNA lucyferazy <i>Gaussia</i> z udziałem CNOT7	140
15.	BADANIA EKSPRESJI MODYFIKOWANYCH mRNA LUCYFERAZY GAUSSIA	142
15.1.	Badania wydajności translacji mRNA lucyferazy <i>Gaussia</i> w lizatach retikulocytów króliczych	142
15.2.	Badania ekspresji lucyferazy <i>Gaussia</i> w liniach komórkowych	143
15.2.1.	Badania ekspresji w komórkach linii A549	144
15.2.2.	Badania ekspresji w komórkach linii JAWS II	145
15.2.3.	Badania ekspresji w komórkach linii HEK 293	146
15.3.	Podsumowanie	146
IV.	PODSUMOWANIE	149
V.	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	152
16.	SYNTEZA OLIGONUKLEOTYDÓW	152
16.1.	Informacje ogólne	152
16.2.	Synteza w fazie stałej	152
16.2.1.	Synteza 5'-HEX-A ₁₂ (A0)	153
16.2.2.	Synteza A ₁₂	154
16.2.3.	Synteza A ₁₁	154
16.2.4.	Synteza A ₁₃	154
16.2.5.	Synteza A ₁₀ A _m A (A _m 1)	155
16.2.6.	Synteza A ₅ A _m A ₆ (A _m 2)	155
16.2.7.	Synteza A _m A ₁₁ (A _m 3)	155
16.2.8.	Synteza A _m 11A (A _m 4)	156
16.2.9.	Synteza A _m A ₁₀ A _m (A _m 5)	156

16.2.10.	Synteza $A_m p_s A_{m10} A_p s A_m$ (A_{m6})	156
16.2.11.	Synteza $A_{11} A_m$ (A_{m7})	157
16.2.12.	Synteza $A_9 A_p s A_2$ D1/D2 (A_{p1}/A_{p2})	157
16.2.13.	Synteza $A_{10} A_p s A$ D1/D2 (A_{p3}/A_{p4})	158
16.2.14.	Synteza $A_p s A_{11}$ D1/D2 (A_{p5}/A_{p6})	158
16.2.15.	Synteza $A_5 p_s A_6$ D1/D2 (A_{p7}/A_{p8})	158
16.2.16.	Synteza $A_p s_{11} A$ (A_{p9})	159
16.2.17.	Synteza $A_p s A_9 A_p s A$ (A_{p10})	159
16.2.18.	Synteza $m^6 A-A_{11}$ (m⁶A₃)	160
16.2.19.	Synteza $A_{10} A_F A$ (A_{F1})	160
16.2.20.	Synteza $A_5 A_F A_6$ (A_{F2})	160
16.2.21.	Synteza $A_F A_{11}$ (A_{F3})	161
16.2.22.	Synteza $A_{10} m^6 A A$ (m⁶A₁)	161
16.2.23.	Synteza $A_5 m^6 A A_6$ (m⁶A₂)	161
16.2.24.	Synteza $A_{11} G$ (G₁)	162
16.2.25.	Synteza $A_5 G A_6$ (G₂)	162
16.2.26.	Synteza $G A_{11}$ (G₃)	162
16.2.27.	Synteza pApA_m	163
16.2.28.	Synteza pAp_sA_m D1/D2	163
16.2.29.	Synteza pGpG_m	163
16.2.30.	Synteza pGp_sG_m D1/D2	164
16.3.	Synteza oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych	164
16.3.1.	Synteza 5'-FAM- A_{12} (A₀₋₁)	165
16.3.2.	Synteza 5'-Cy5- A_{12} (A₀₋₂)	165
16.3.3.	Synteza 5'-ROX- A_{12} (A₀₋₃)	166
16.3.4.	Synteza 5'-BDP-FL- A_{12} (A₀₋₄)	166
17.	MATERIALY BIOLOGICZNE	167
17.1.	PABP ¹⁻¹⁹⁰	167
17.2.	CNOT7	167
17.3.	Polimeraza RNA T7	168
17.4.	Polimeraza poli(A)	168
17.5.	Lizaty komórkowe	169
18.	REAKCJE ENZYMATYCZNE IN VITRO	170
18.1.	Transkrypcja <i>in vitro</i>	170
18.1.1.	Otrzymywanie mRNA kodującego lucyferazę <i>Firefly</i> metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	170
18.1.2.	Otrzymywanie mRNA kodującego lucyferazę <i>Gaussia</i> metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	170
18.2.	Ligacja enzymatyczna	171
18.2.1.	Ligacja z udziałem oligonukleotydów	171
18.2.2.	Ligacja z udziałem mRNA	171
18.3.	Trawienie enzymatyczne z udziałem deadenylazy CNOT7	171
18.3.1.	Trawienie enzymatyczne oligonukleotydowych analogów poli(A)	171
18.3.2.	Trawienie enzymatyczne mRNA	172
19.	TERMOFOREZA MIKROSKALOWA MST	173
19.1.	Pomiary bezpośredniego wiązania białko-ligand	173
19.2.	Pomiary wiązania kompetycyjnego	173
20.	BADANIA WYDAJNOŚCI TRANSLACJI W LIZATACH RETIKULOCYTÓW KRÓLICZYCH	174

20.1.	Badania wydajności translacji w lizatach retikulocytów króliczych	174
20.1.1.	<i>Badania wydajności translacji z udziałem oligonukleotydowych inhibitorów</i>	174
20.1.2.	<i>Ko-inhibicja z udziałem oligonukleotydowych inhibitorów i m⁷Gp_{spp}G.....</i>	174
20.2.	Badania wydajności translacji w liniach komórkowych.....	174
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	176

Wykaz skrótów

A/A_m – adenozyzna/2'-O-metyloadenozyzna

ATP – 5'-trifosforan adenozyzny

ARCA - ang. *Anti-reverse cap analog* – analog kapu zawierający grupę 3'-O-CH₃ w rybozie 7-metyloguanozyzny

CCR4-Not – ang. *Carbon Catabolite Repression—Negative On TATA-less*, kompleks białkowy odpowiedzialny za deadenylację eukariotycznych mRNA

CNOT7 – jedna z podjednostek katalitycznych kompleksu CCR4-Not

CTP - 5'-trifosforan cytozyny

CuAAC - ang. *Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, katalizowana jonami miedzi (I) cykloaddycja azydkowo-alkinowa

DcpS - ang. *Decapping Scavenger Enzyme*, enzyme odpowiedzialny za hydrolizę struktury 5' kapu mRNA

DMEM - ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – zmodyfikowana pożywka do hodowli linii komórkowych

DMSO - dimetylosulfotlenek

DTT - ang. *dithiothreitol* – ditiotreitól

EDITH – ang. *3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one*

EDTA - ang. *ethylenediaminetetraacetic acid* – kwas wersenowy

eIF4E - ang. *eukaryotic initiation translation factor 4E* – eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E, białko wiążące strukturę 5' kapu mRNA

GTP - 5'-trifosforan guanozyzny

HEPES - ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

mRNA – ang. *messenger RNA*, informacyjny/matrycowy RNA

(HR) MS – ang. *(high resolution) mass spectrometry*, (wysokorozdzielcza) spektrometria mas

MST – ang. *microscale thermophoresis*, termoforeza mikroskalowa

NTP – 5'-trifosforan dowolnego nukleozydu

PABP – ang. *polyA-binding protein*, białko wiążące ogon poli(A)

PAGE – ang. *Polyacrylamide gel electrophoresis*, metoda analityczna, elektroforeza na żelu poliakrylamidowym

RNA – kwas rybonukleinowy

RP-HPLC - ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography* – wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych

RPMI – ang. *Roswell Park Memorial Institute medium*, pożywka do hodowli linii komórkowych

TBE - Tris-Borate-EDTA

Tris - tris(hydroksymetylo)aminometan

UTP – 5'trifsoforan uracylu

3'/5' UTR– ang. *untranslated region*, fragmenty sekwencji mRNA nieulegające translacji

Dorobek naukowy

Publikacje bezpośrednio związane z tematem pracy

- Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Chemically modified poly(A) analogs targeting PABP: structure activity relationship and translation inhibitory properties**, Chem. Eur. J. 2022, e202201115
- Olga Perzanowska, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Chemo-enzymatic modification of mRNA poly(A) tail for increased stability and protein expression** - w przygotowaniu

Pozostałe publikacje

- Olga Perzanowska, Maciej Majewski, Malwina Strenkowska, Paulina Głowala, Mariusz Czarnocki-Cieciura, Maciej Mazur, Joanna Kowalska and Jacek Jemielity, **Nucleotide-decorated AuNPs as probes for nucleotide-binding proteins**, Sci. Rep., 11, 15741 (2021)
- Hai-Jun Zhang, Michał Ociepa, Molhm Nassir, Bin Zheng, Sarah Lewicki, Veronica Salmaso, Helay Babury, Jessica Nagel, Salahuddin Mirza, Beatriz Bueschbell, Haneen Al-Hroub, Olga Perzanowska, Ziqing Lin, Michael Schmidt, Martin Eastgate, Kenneth Jacobson, Christa Müller, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, Phil Baran, **Practical Stereocontrolled Access to Thioisosteres of Essential Signaling Molecules and Building Blocks for Life: Nucleoside Di- and Triphosphates**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2022-r4hpx – zaakceptowana do publikacji Nature Chemistry

Wystąpienia konferencyjne

- 11-16.09.2022 64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, **prezentacja ustna**, „Chemicznie modyfikowane analogi ogona poli A mRNA jako ligandy białka PABP i inhibitory translacji”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 01.09.2022, Young Researchers Symposium, **prezentacja ustna**, “Chemically modified poly(A) analogs as PABP ligands and translational inhibitors”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 28-21.08.2022, XXIV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **plakat**, “Chemically modified poly(A) analogs as PABP ligands and translational inhibitors”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 27-28.08.2021 S3NA-IRT Virtual Symposium 2021, **wirtualny plakat**, “The effect of nucleotide modifications on specific binding, degradation resistance and inhibitory potential of short poly(A) tail analogs”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska

- 30.08.2021-03.09.2021 Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki UW, **wirtualna prezentacja plakatowa**, „Wpływ modyfikacji nukleotydowych na proces wiązania analogów końca 3' mRNA przez białko PABP oraz ich odporność na specyficzną degradację”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 20-21.09.2021 Druga Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, **prezentacja ustna** “The effect of nucleotide modifications on specific binding, degradation resistance and inhibitory potential of short poly(A) tail analogs”, Olga Perzanowska, Mirosław Smietanski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 30.06.2020-01.07.2020 Pierwsza Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, **wirtualna prezentacja plakatowa**, “Controlled aggregation-based molecular probes for monitoring the activity of eIF-4E, a 5'mRNA cap-binding protein”, Olga Perzanowska, Maciej Majewski, Paulina Głowala, Maciej Mazur, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 2-6.09.2019 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, **prezentacja ustna**, „Koniugaty nanocząstek złota i analogów końca 5' mRNA jako narzędzia do badania procesów metabolizmu mRNA”, Olga Perzanowska, Maciej Majewski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 20-24.07.2019 12th EBSA/10th ICBP-IUPAP Congress, **plakat**, “Controlled aggregation-based molecular probes for monitoring the activity of eIF-4E, a 5'mRNA cap-binding protein”, Olga Perzanowska, Maciej Majewski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska
- 26-30.08.2018 XXIII International Roundtable On Nucleosides, Nucleotides And Nucleic Acids, **plakat**, “Gold nanoparticle-nucleotide conjugates as molecular probes for monitoring activity of cap-binding proteins”, Olga Perzanowska, Maciej Majewski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska

Streszczenie

Technologie oparte na potencjalnym zastosowaniu syntetycznych cząsteczek mRNA w medycynie rozwijane są od lat 90. ubiegłego wieku. Dzięki znaczącemu postępowi technologicznemu mRNA staje się coraz powszechniej stosowanym narzędziem w opracowywaniu szczepionek i terapii genowych. Mimo wielu zalet względem stosowanych dotychczas konwencjonalnych metod, jednym z głównych problemów terapii wykorzystujących syntetyczne mRNA jest inherentnie niska stabilność owych cząsteczek. Niezależnie od ścieżki rozpadu, proces degradacji mRNA w komórkach ssaków jest inicjowany przez deadenylację, czyli usunięcie ogona poli(A) znajdującego się na końcu 3' większości dojrzałych eukariotycznych mRNA. Ogon poli(A) działa jako jeden z głównych regulatorów losów mRNA, między innymi chroniąc regiony kodujące mRNA przed degradacją, a także odgrywając ważną rolę w procesie inicjacji translacji dzięki złożonym interakcjom białko-RNA. Obie te cechy, w połączeniu z niekodującą naturą ogona poli(A), czynią go idealnym celem do wprowadzenia korzystnych modyfikacji zwiększających stabilność i wydajność translacyjną mRNA, bez ingerencji w aktywność maszyneryi rybosomalnej odpowiedzialnej za biosyntezę białek. W ostatnich latach zaprezentowano szereg badań dotyczących modyfikacji mRNA w celu manipulacji stabilnością oraz potencjałem translacyjnym mRNA, co stanowiło inspirację dla moich badań.

Pierwsza część niniejszej rozprawy dotyczyła opracowania metody biofizycznej umożliwiającej badania nad zależnością struktura-aktywność w oddziaływaniu analogów ogona poli(A) z białkiem specyficznie wiążącym strukturę końca 3' mRNA (PABP). W celu opracowania metody wykorzystałam czułą technikę termoforezy mikroskalowej, która pozwala na badanie szerokiego spektrum oddziaływań molekularnych. Opracowana metoda została wykorzystana do badania oddziaływań między białkiem PABP, a blisko trzydziestoma oligonukleotydowymi analogami ogona poli(A), zawierającymi wybrane chemiczne i strukturalne modyfikacje. Dzięki szczegółowym badaniom udało się ustalić wpływ danej modyfikacji na specyficzne oddziaływanie z PABP, nie tylko ze względu na rodzaj użytej modyfikacji, ale również jej umiejscowienie w kieszeni wiążącej białka. Przeprowadziłam również badania odporności enzymatycznej wspomnianych analogów poli(A) z udziałem specyficznej deadenylazy. Możliwe było wyszczególnienie chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów poli(A) wykazujących równocześnie wysokie powinowactwo do PABP oraz odporność na enzymatyczną degradację. Z udziałem wybranych oligonukleotydów przeprowadzono następnie badania translacji w lizatach komórkowych, które wykazały, że wybrane przeze mnie związki wykazują potencjał inhibitorowy i specyficznie hamują proces translacji. Na podstawie niniejszej części badań wyciągnęłam szereg wniosków dotyczących wpływu struktury fragmentów poli(A) na ich powinowactwo do PABP. Między innymi owe badania dowiodły, że wszelkiego rodzaju modyfikacje chemiczne łańcucha poli(A) są najlepiej tolerowane, kiedy modyfikowana podjednostka znajduje się na końcu sekwencji wiązanej przez białko. Z tego względu w dalszej części badań skupiłam się na wprowadzaniu modyfikacji w obrębie samego końca 3' RNA.

Drugą część projektu doktorskiego poświęciłam na opracowanie metody pozwalającej na chemo-enzymatyczną modyfikację końca 3' syntetycznych mRNA. Modyfikacja ta miała na celu zwiększenie stabilności cząsteczek mRNA poprzez poprawę ich odporności na degradację przez egzonukleazy 3'-5', przy jednoczesnym zachowaniu możliwości oddziaływania z białkiem PABP. Poprawa stabilności przyczynia się następnie do wydłużenia czasu życia modyfikowanych mRNA w komórkach i skutkuje zwiększoną produkcją kodowanych przez mRNA białek. Opracowana przeze mnie metoda modyfikacji zakłada ligację enzymatyczną chemicznie 5'-fosforylowanych modyfikowanych dinukleotydów do końca 3' cząsteczki RNA. Do struktury

wspomnianych dinukleotydów wprowadzone zostały modyfikacje chemiczne, które w trakcie pierwszej części badań zidentyfikowane zostały jako najoptymalniejsze z punktu widzenia oddziaływania z PABP oraz stabilności enzymatycznej. Metoda modyfikacji końca 3' RNA wykorzystana została do otrzymania reporterowych cząsteczek mRNA o zwiększonej stabilności. Modyfikowane mRNA zostały następnie zbadane w trzech różnych liniach komórkowych pod kątem ich potencjału translacyjnego. Zidentyfikowane zostały dwa typy modyfikacji mRNA, które skutkowały nawet kilkukrotnie zwiększoną produkcją białka w komórkach.

Opracowane przeze mnie metody mogą przyczynić się do dalszych badań nad modyfikacjami ogona poli(A) mRNA. Z jednej strony, metoda pozwalająca na badanie oddziaływania między PABP a analogami poli(A) znajdzie zastosowanie w dalszych badaniach nad potencjalnie korzystnymi modyfikacjami poli(A). Z kolei metoda chemo-enzymatycznej modyfikacji końca 3' RNA może być stosowana w otrzymywaniu dowolnych cząsteczek RNA o zwiększonej stabilności, w szczególności mRNA o potencjale terapeutycznym.

I. Cel pracy

Celem projektu doktorskiego było opracowanie metod modyfikacji końca 3' mRNA na potrzeby modulowania ich stabilności i potencjału translacyjnego. Pierwszą część projektu doktorskiego poświęciłam na zbadanie wpływu wybranych modyfikacji chemicznych oraz strukturalnych końca 3' mRNA na jego stabilność oraz oddziaływanie ze specyficznym wiążącym go białkiem PABP (ang. *polyA-binding protein*). Wyniki owych badań zostały następnie wykorzystane do opracowania metody modyfikacji cząsteczek mRNA, mającej na celu zwiększenie stabilności oraz potencjału translacyjnego syntetycznych transkryptów o możliwym zastosowaniu terapeutycznym. Znajdujący się na końcu 3' większości eukariotycznych mRNA ogon poli(A) stanowi istotny element strukturalny ze względu na swój udział w procesach niezbędnych dla przetrwania komórki i całego organizmu. W kontekście projektowania i zastosowania mRNA w medycynie, powszechnie wykorzystuje się modyfikacje tej cząsteczki, które zwiększają jej stabilność, pozwalają kontrolować jej immunogenność oraz podnoszą jej potencjał translacyjny. Coraz częściej podejmuje się również próby modyfikacji ogona poli(A). Jest to element mRNA interesujący w kontekście terapeutycznym, ze względu na jego wspomniany już udział w licznych procesach komórkowych, jak również niekodujący charakter.

Niniejsza praca skupiona jest przede wszystkim wokół identyfikacji modyfikacji chemicznych w obrębie struktury ogona poli(A), które mogą znaleźć zastosowanie w otrzymywaniu cząsteczek mRNA o potencjale terapeutycznym. Projekt doktorski ma więc charakter interdyscyplinarny i obejmuje dziedziny takie jak synteza chemiczna, biofizyka, biochemia, biologia molekularna i spektroskopia. Pierwszą część rozprawy doktorskiej stanowi przegląd literaturowy, w którym opisane zostały podstawowe informacje dotyczące budowy oraz metabolizmu eukariotycznych cząsteczek mRNA, jak również funkcji jego poszczególnych elementów strukturalnych. Na podstawie rzeczywistych przykładów omówione zostały potencjalne zastosowania terapeutyczne krótkich fragmentów (oligonukleotydów) RNA oraz pełnych cząsteczek mRNA kodujących konkretne białka. Na koniec przybliżono metody syntezy cząsteczek RNA, jak również podstawy teoretyczne i praktyczne zastosowania termoforezy mikroskalowej.

Drugą część rozprawy stanowi opis badań własnych. Zaprezentowane zostały wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu doktorskiego. Opisany został proces opracowania i optymalizacji metody pomiarowej wykorzystującej technikę termoforezy mikroskalowej. Metoda ta umożliwiła badanie oddziaływań pomiędzy białkiem wiążącym strukturę ogona poli(A) (PABP) a oligonukleotydowymi analogami poli(A) zawierającymi różnorodne modyfikacje chemiczne i strukturalne. Przedstawione zostało możliwe wykorzystanie wybranych oligonukleotydów jako inhibitorów translacji. Opisano również nową metodę chemoenzymatycznej modyfikacji końca 3' mRNA. Właściwości modyfikowanych cząsteczek mRNA zbadane zostały w układzie lizatów komórkowych, jak również w trzech różnych liniach komórkowych. Całość pracy wykonana została w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW oraz w zakładzie Biofizyki IFD, Wydziału Fizyki UW. Rysunki przedstawione w pracy wykonane zostały przez autorkę niniejszej rozprawy, jeśli nie zaznaczono inaczej.

II. Część literaturowa

1. Wstęp

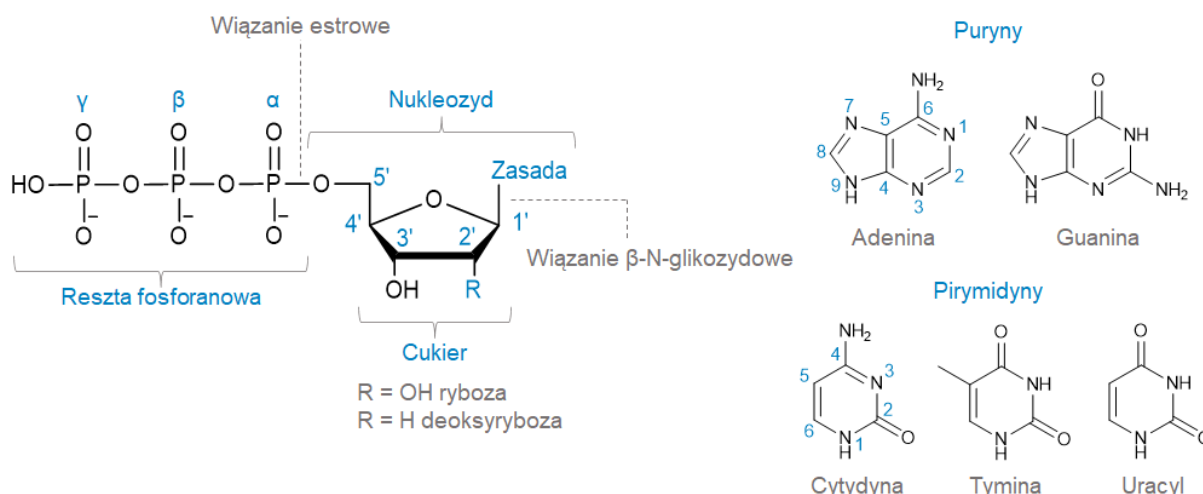
mRNA, czyli informacyjne RNA (ang. *messenger RNA*) jest to biomolekuła kluczowa dla funkcjonowania większości organizmów żywych. Stanowi ona kopię informacji genetycznej zawartej w DNA i u eukariontów powstaje przede wszystkim w jądrze komórkowym w procesie transkrypcji, czyli komplementarnego przepisywania sekwencji nukleotydowej z jednej cząsteczki kwasu nukleinowego (DNA) na drugą (mRNA). Dojrzała cząsteczka eukariotycznego mRNA powstała w jądrze komórkowym, w którym na stałe przechowywana jest większość komórkowego DNA, transportowana jest do cytoplazmy, gdzie bierze udział w procesie translacji, czyli biosyntezie białek. Zarówno koniec 3' jak i 5' mRNA posiadają charakterystyczne struktury niezbędne w procesach dojrzewania, transportu komórkowego i degradacji owej cząsteczki oraz biorą udział w procesie translacji i przyczyniają się do zwiększenia stabilności mRNA. Na końcu 3' większości eukariotycznych mRNA znajduje się ciąg adenozyń, liczący od kilkudziesięciu do nawet kilkuset podjednostek. Zwany jest ogonem poli(A) i pełni przede wszystkim rolę regulatorową w procesach metabolizmu mRNA, odpowiadając między innymi za stabilność oraz potencjał translacyjny tej cząsteczki. Poli(A) jest to niekodujący fragment mRNA, co w połączeniu z jego udziałem w licznych procesach biologicznych sprawia, że jest również interesującym celem badań.

Część literaturowa niniejszej rozprawy zawiera zwięzłe omówienie obecnego stanu wiedzy związanej z tematyką badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego. Moim celem jest przedstawienie czytelnikowi kontekstu moich badań, poczynając od podstawowej roli kwasów nukleinowych w organizmach żywych, a kończąc na rozwoju technologii terapeutycznych mRNA. W pierwszej kolejności omówiona zostanie struktura i funkcje kwasów nukleinowych, ze szczególnym uwzględnieniem syntezy, dojrzewania, budowy i metabolizmu końca 3' mRNA. Omówiona została również rola modyfikacji nukleotydowych w komórkowych procesach zachodzących z udziałem mRNA. Następnie przybliżone zostało zagadnienie terapeutycznych oligonukleotydów oraz wykorzystanie fragmentów kwasów nukleinowych w badaniach procesów związanych z biosyntezą białek. Rozwój technologii terapeutycznych oligonukleotydów stanowił podstawę dla późniejszych badań nad kwasami nukleinowymi o potencjale terapeutycznym. W kontekście niniejszej rozprawy, szczególnie istotnym zagadnieniem są badania nad modyfikacjami nukleotydowymi umożliwiającymi kontrolę właściwości biochemicznych i farmakokinetycznych oligonukleotydów oraz kwasów nukleinowych. W osobnym rozdziale omówione zostały syntetyczne cząsteczki mRNA o potencjale terapeutycznym i ich zastosowania w terapiach genowych, medycynie regeneracyjnej oraz w szczepionkach leczniczych i prewencyjnych. Na podstawie najnowszych przykładów literaturowych omówione zostały stosowane dotychczas metody modyfikacji ogona poli(A) syntetycznych mRNA. Przedstawione zostały techniki chemicznej oraz enzymatycznej syntezy cząsteczek RNA, które znalazły zastosowanie w prowadzonych przeze mnie badaniach nad projektem doktorskim. Na koniec omówiona została technika termoforezy mikroskalowej, z wykorzystaniem której opracowałam metodę badania oddziaływania między białkiem PABP a chemicznie modyfikowanymi analogami ogona poli(A).

2. Kwasy nukleinowe

2.1. Budowa kwasów nukleinowych

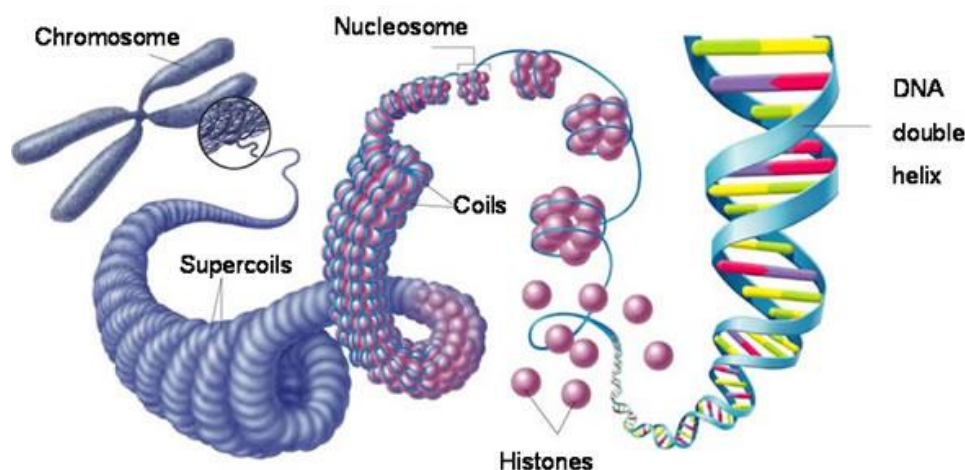
DNA i RNA są to biopolimery złożone z podjednostek zwanych nukleotydami. Z kolei nukleotydy są to estry fosforanowe nukleozydów, składających się z zasady azotowej połączonej zazwyczaj wiązaniem β -N-glikozydowym z cukrem rybozą (RNA) lub deoksyrybozą (DNA) (Rys. 1). Najczęściej spotyka się nukleotydy posiadające ugrupowanie fosforanowe przyłączone wiązaniem estrowym do tlenu w pozycji 5' rybozy. Ze względu na możliwość wielokrotnej fosforylacji nukleozydów, spotykamy zarówno ich mono- jak również di- i trifosforany.



Rysunek 1 Struktura i numeracja atomów nukleotydów.

5'-fosforany nukleozydów stanowią materiał budulcowy kwasów nukleinowych DNA i RNA. Naturalnie występujące nukleotydy, z których powstają łańcuchy kwasów nukleinowych, różnią się między sobą budową zasad azotowych, które podzielić możemy na dwie grupy: pirymidyny, czyli cytydynę (C), tyminę (T) i uracyl (U), oraz puryny, czyli adeninę (A) i guaninę (G). Powstanie biopolimerów DNA i RNA możliwe jest dzięki utworzeniu wiązania 5'-3' fosfodiesterowego między kolejnymi podjednostkami łańcucha. Strukturę DNA stanowią najczęściej dwa antyrównoległe łańcuchy związające się wokół wspólnej osi. Powstająca w ten sposób podwójna helisa DNA stabilizowana jest przez wiązania wodorowe tworzące się między zasadami azotowymi komplementarnych nukleotydów w przeciwnych niciach oraz oddziaływania warstwowe między zasadami kolejnych podjednostek tej samej nici. Do kanonicznych par zasad azotowych, zwanych również parami Watsona-Cricka, zaliczamy układy G-C i A-T w DNA oraz G-C i A-U w RNA. Odpowiadają one przede wszystkim za wspomnianą już stabilizację podwójnej helisy DNA oraz tworzenie części struktur drugorzędowych w pojedynczych niciach RNA. Istnieje również możliwość tworzenia się szeregu niekanonicznych par zasad azotowych (np. G-U, A-A), w tym par Hoogsteena powstających w wyniku obrotu zasad purynowych wokół wiązania glikozydowego. Charakteryzują się one niższą stabilnością od par kanonicznych i umożliwiają powstanie większości drugorzędowych struktur RNA oraz złożonych układów trójwymiarowych występujących zarówno w DNA jak i RNA, np. G-kwadrupleksów. Istnieje kilka rodzajów helisy DNA: częściej występujące prawoskrętne A-DNA i B-DNA (najpowszechniejsza forma DNA w roztworach wodnych) oraz rzadziej spotykana lewoskrętne helisa Z-DNA. W swojej w pełni rozwiniętej formie przeciętna nić ludzkiego DNA osiąga prawie 2 metry długości, ale w komórce jest ona dokładnie upakowana w postaci chromatyny. Chromatyna

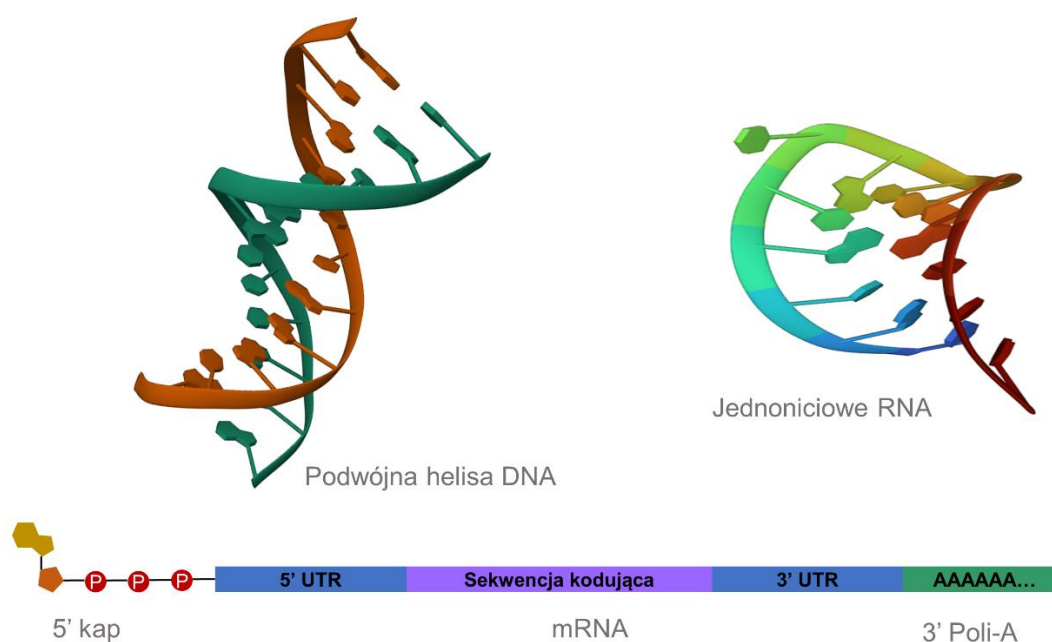
jest to kompleks DNA i białek, który poza uporządkowaniem DNA chroni jego strukturę przed uszkodzeniem oraz pełni rolę regulatorową w procesach replikacji i ekspresji genów. Na najniższym poziomie upakowania, podwójna helisa DNA nawijana jest wokół kompleksów białek histonowych, tworząc nukleosomy (Rys. 2). W skład jednego nukleosomu wchodzi około 146 par zasad owiniętych wokół oktameru histonowego. Pomiędzy kolejnymi nukleosomami występuje łącznikowy fragment DNA o długości do 80 par zasad. DNA wstępnie skondensowane w postaci nukleosomów nazywa się euchromatyną. Struktura ta jest bogata w sekwencje genowe i najczęściej podlega aktywnej transkrypcji. Wyższa forma upakowania zwana jest heterochromatyną, w której DNA zwinięte w nukleosomy przyjmuje helikalną strukturę o średnicy około 30 nm.



Rysunek 2 Stopnie upakowania nici DNA. Rysunek uzyskany z domeny publicznej.

Ze względu na swoją ścisłą strukturę, heterochromatyna może tworzyć strukturalne elementy chromosomów, jak centomery lub telomery. Z kolei heterochromatyna fakultatywna powstaje w wyniku wyciszania konkretnych genów w trakcie specjalizacji komórek. Najwyższą formą upakowania są chromosomy metafazowe, zbudowane z włókien chromatyny o średnicy 30 nm. Każdy chromosom zbudowany jest z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych centomerem.

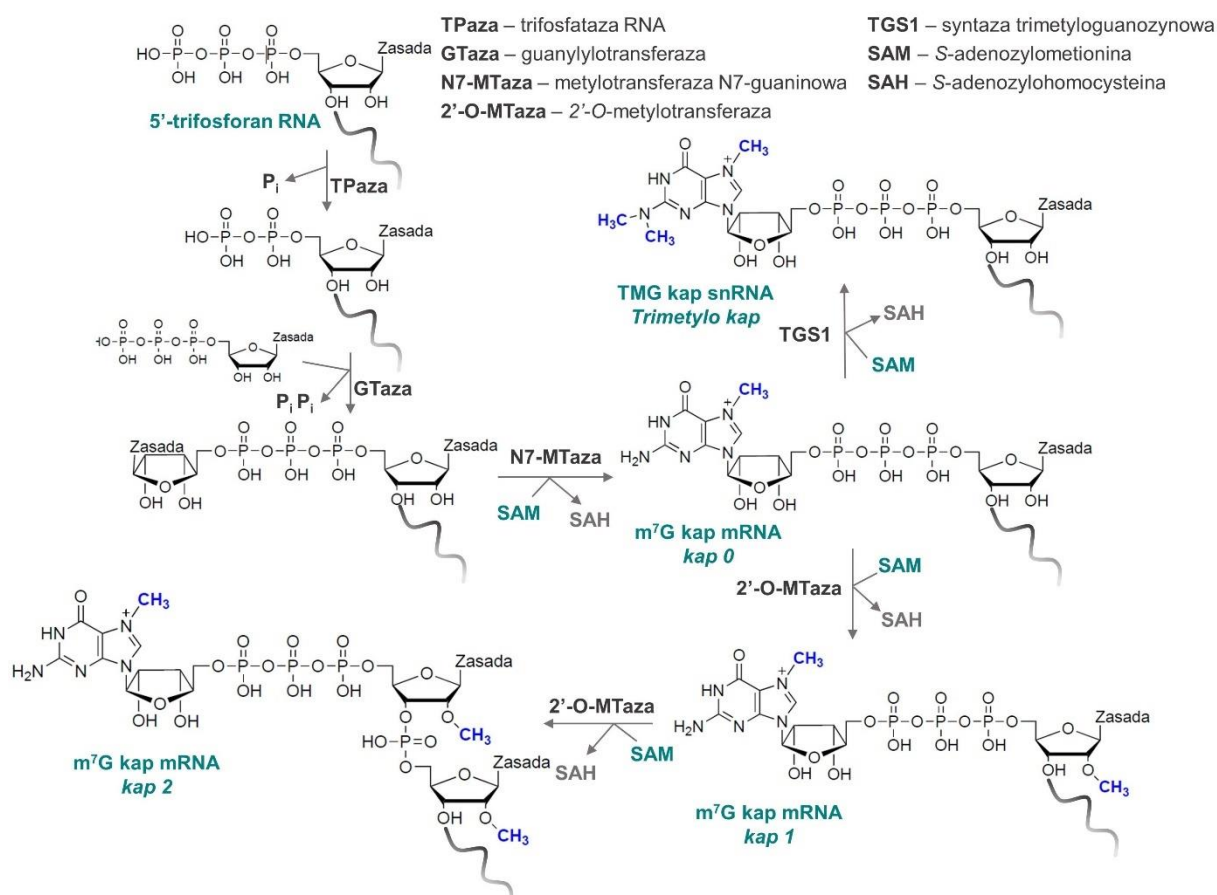
Procesowi transkrypcji towarzyszy rozwijanie cząsteczki DNA i rozdzielanie łańcuchów tworzących podwójną helisę, co umożliwia polimerazie RNA dostęp do zawartych w nich sekwencji nukleotydowych. W wyniku procesu transkrypcji, czyli przepisywania informacji genetycznej z DNA, powstaje niedojrzała, prekursorowa cząsteczka mRNA (pre-mRNA). W komórkach eukariotycznych transkrypcja zachodzi w jądrze komórkowym, w którym przebiega również proces dojrzewania cząsteczki mRNA, czyli transkrypcyjnej biosyntezy kapu na końcu 5' (kaping) oraz posttranskrypcyjnego wycinania intronów (splicing) i poliadenylacji na końcu 3' (Rys. 3).¹ Dojrzałe mRNA transportowane jest na zewnątrz jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie zająć może proces translacji, czyli komórkowej biosyntezy białek. W cytoplazmie dochodzi również do ostatecznej degradacji cząsteczki mRNA, w wyniku procesów związanych z regulacją ekspresji poszczególnych genów. Opisanym mechanizmom dojrzewania i degradacji podlega ogromna większość syntezowanych w jądrze mRNA, choć istnieją wyjątki, o których wspomnę w trakcie szczegółowego omawiania poszczególnych procesów związanych z metabolizmem mRNA.



Rysunek 3 Struktura jednoniciowego RNA (PDB: 1IK1) i podwójnej helisy DNA (PDB: 1EEL) oraz budowa dojrzałego eukariotycznego mRNA

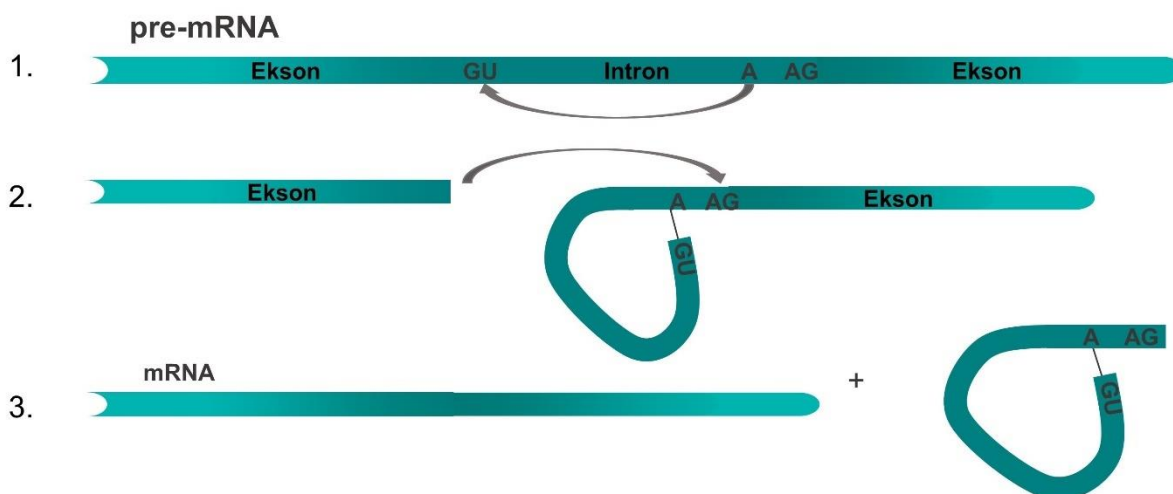
2.2. Dojrzewanie informacyjnego RNA u Eukariontów

Jak już wspomniałam, powstająca w wyniku transkrypcji cząsteczka eukariotycznego mRNA musi ulec procesowi dojrzewania, aby możliwy był jej transport na zewnątrz jądra komórkowego do cytoplazmy i następnie inicjacja procesu translacji. Już w trakcie trwania syntezy mRNA (ko-transkrypcyjnie) dochodzi do zjawiska kapingu, czyli przyłączenia 7-metyloguanozyny do łańcucha trifosforanowego znajdującego się na końcu 5' nowopowstającego transkryptu. Kaping jest to kilkietapowy proces rozpoczynający się w momencie przyłączenia ~30 podjednostek do powstającego łańcucha mRNA (Rys. 4).^{2,3} Biosynteza kapu u większości organizmów przebiega według tego samego schematu z udziałem trzech aktywności enzymatycznych. W pierwszej kolejności enzym 5'-trifosfataza RNA (TPaza) usuwa γ fosforan z pierwszej podjednostki transkryptu pozostawiając w tej pozycji 5'-difosforan.⁴ Guanylylotransferaza (GTaza) z cząsteczki GTP przenosi GMP na koniec 5' prowadząc do powstania konstruktu 5'G-ppp-N-RNA (gdzie N to pierwsza podjednostka transkryptu, najczęściej adenozyne).⁵ Na ostatnim etapie kapowania zachodzi metylacja guaniny w pozycji N7 przez mRNA (guanino-N7)-metylotransferazę (N7-MTaza)^{6,7}. N7-MTaza wykorzystuje cząsteczkę S-adenozylu-L-metioniny (SAM) jako źródło grupy metylowej. W ten sposób powstaje struktura tzw. kapu 0, który u niektórych organizmów może ulegać dalszym metylacjom np. w pozycji 2'-OH pierwszego (kap 1)^{8,9} i drugiego (kap 2)¹⁰ nukleotydu cząsteczki mRNA. Jeśli pierwszą podjednostką transkryptu jest 2'-O-metyloadenozyne, często ulega ona również metylacji w pozycji N6 zasady z utworzeniem m⁶A_m.¹¹ Opisane modyfikacje struktury kapu znacząco wpływają na poziom komórkowej ekspresji genów poprzez zmianę wydajności procesu inicjacji translacji, jak również zahamowanie procesu dekapingu, czyli usuwania struktury kapu z końca 5' mRNA poprzedzającego całkowitą degradację cząsteczki.¹²



Rysunek 4 Schemat syntezy 5' kapu mRNA. Rysunek wzorowany na pracy Warmiński et al.¹³

Post-transkrypcyjna część procesu dojrzewania mRNA składa się z poliadenylacji, która zostanie szczegółowo omówiona w kolejnym podrozdziale, oraz splicingu, czyli wycinania intronów. Splicing (z angielskiego „sklejanie”, „splatanie”) polega na usunięciu niekodujących fragmentów (intronów) spośród sekwencji kodujących (eksonów) z prekursora mRNA, co prowadzi do powstania jednej ciągłej sekwencji nukleotydowej kodującej konkretne białko.¹⁴ W większości przypadków za splicing odpowiada kompleks białek i RNA zwany spliceosomem,¹⁵ choć niekiedy dochodzi do samodzielnego usuwania się intronów.¹⁶ Do poprawnego przebiegu procesu splicingu niezbędne są dwie sekwencje sygnałowe: GU na końcu 5' intronu i AG na końcu 3', oraz nukleotyd adeninowy zaznaczający tzw. miejsce rozgałęzienia (Rys. 5). Małe jądrowe RNA (snRNA ang. *small nuclear RNA*) wchodzące w skład spliceosomu rozpoznają sekwencje sygnałowe i wiążą się komplementarnie z nimi oraz miejscem rozgałęzienia intronu. Usunięcie intronu przebiega na drodze dwóch następujących po sobie reakcji transestryfikacji.¹⁷ W pierwszej kolejności grupa 2'-OH nukleotydu znajdującego się w punkcie rozgałęzienia dokonuje ataku nukleofilowego na grupę 5'-fosforanową nukleotydu w pierwszej pozycji intronu, co prowadzi do powstania produktu pośredniego. Następnie grupa 3'-OH z ostatniego nukleotydu 5'-eksonu dokonuje ataku nukleofilowego na grupę 5'-fosforanową pierwszego nukleotydu za końcem 3' intronu. Dochodzi do równoczesnego połączenia się końców eksonów oraz uwolnienia intronu w postaci lassa.

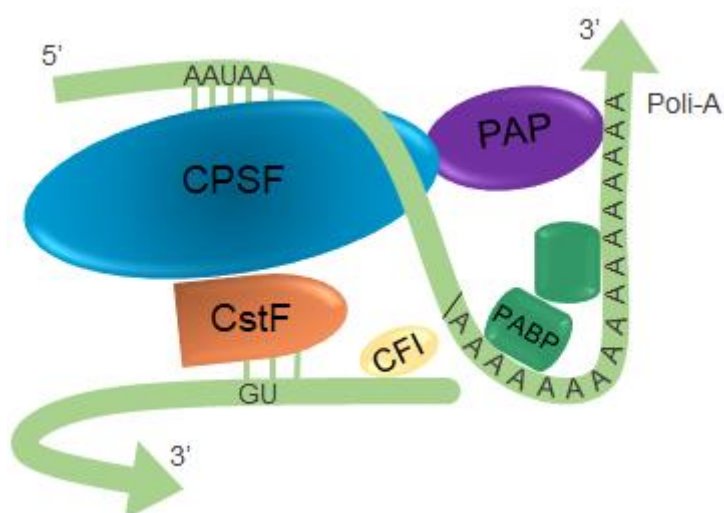


Rysunek 5 Schematyczne przedstawienie procesu splicingu pre-mRNA.

Niekiedy łączenie się eksonów nie przebiega zgodnie z ich kolejnością występowania w sekwencji pre-mRNA. Zamiast tego możliwe jest „mieszanie” eksonów – zjawisko to nazywa się alternatywnym splicingiem.¹⁸ Dzięki niemu możliwe jest powstanie wielu cząsteczek mRNA kodujących różne izoformy białka z tej samej cząsteczki pre-mRNA.¹⁹ Szacuje się, że około 95% multieksonowych ludzkich genów ulega alternatywnemu splicingowi.²⁰ Proces ten może przebiegać np. poprzez pominięcie niektórych eksonów lub pozostawienie niektórych intronów w sekwencji.

2.3. Struktura i biosynteza końca 3' mRNA

Koniec 3' dojrzałej cząsteczki mRNA, zwany ogonem poli(A), zbudowany jest z długiego ciągu adenozy. W przypadku komórek ssaczych jest to zazwyczaj około 250 nukleotydów adeninowych przyłączanych post-transkrypcyjnie do końca 3' pre-mRNA.²¹ Proces poliadenylacji przebiega niezależnie od matrycy DNA i katalizowany jest przez duży kompleks białek pełniących różnorodne funkcje (Rys. 6).²² W pobliżu końca 3' znajduje się sekwencja sygnałowa poliadenylacji (PAS, ang. *polyadenylation signal*, u ssaków najczęściej AAUAAA), która jest rozpoznawana i wiązana przez czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji CPSF (ang. *cleavage/polyadenylation specificity factor*).²³ Wiązanie CPSF jest dodatkowo wspomagane przez dwa białka: czynnik stymulacji cięcia CstF (ang. *cleavage stimulation factor*) oraz czynnik cięcia I CFI (ang. *cleavage factor I*). CstF wiąże fragment cząsteczki RNA bogaty w sekwencje GU i stabilizuje kompleks CPSF i RNA. Z kolei CFI rozpoznaje trzecią sekwencję wiązania (u ssaków UGUAA) i umożliwia CPSF wiązanie do cząsteczki mRNA nawet pod nieobecność sekwencji sygnałowej poliadenylacji.²⁴ CPSF endonukleolitycznie odcina 3'-końcowy fragment mRNA w odległości od 10 do 30 nukleotydów poniżej swojego miejsca wiązania. Poliadenylacja następuje bezpośrednio po miejscu odcięcia i jest to proces katalizowany przez polimerazę poli(A) (PAP). PAP wykorzystuje ATP jako substrat do polimeryzacji^{25,26}



Rysunek 6 Schemat kompleksu poliadenylującego pre-mRNA ssaczych.

Aktywność PAP stymulowana jest zarówno przez CPSF jak i jądrowe białko wiążące poli(A) (PABPN1, ang. *nuclear poly(A)-binding protein*), które wiąże nowopowstający łańcuch poliadenylowy i równocześnie chroni go przed przedwczesną degradacją.²⁷ Kolejne podjednostki PABPN1 przyłączają się do ogona poli(A) i, poprzez przerwanie wiązania między CPSF i PAP, hamują poliadenylację w momencie gdy ogon osiągnie długość ~250 adenozyń.²⁸

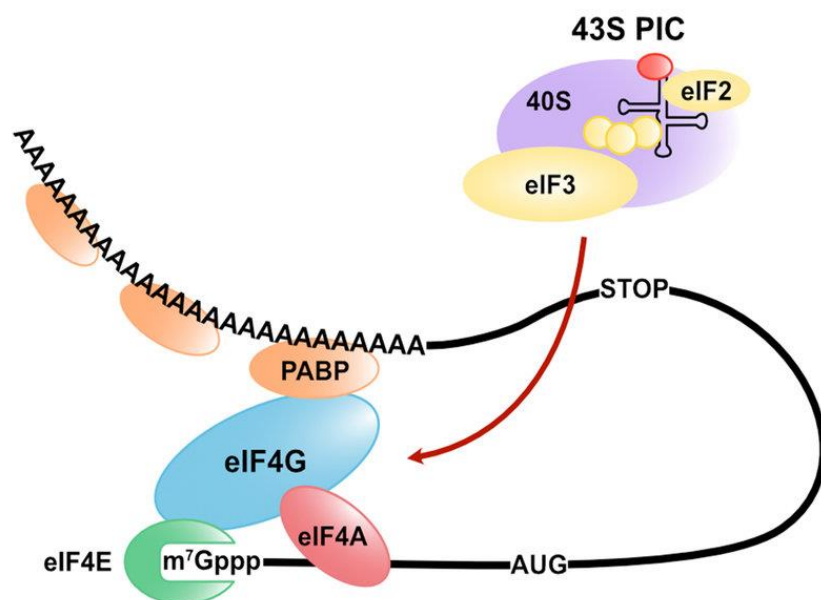
PAP samoistnie wykazuje bardzo niską procesywność i słabe powinowactwo do RNA.²⁶ Bez dodatkowej stymulacji innymi czynnikami białkowymi odpada od łańcucha RNA każdorazowo po przyłączeniu jednej podjednostki, a niekiedy nawet zanim dojdzie do przyłączenia. Wykazuje również niską specyficzność substratową, katalizując poliadenylację dowolnej cząsteczki RNA zakończonego wolną grupą 3'-OH. Zarówno aktywność jak i specyficzność PAP są wzmacniane poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami CPSF i PABPN1.^{29,30} CPSF oddziałuje z konkretną sekwencją znajdującą się w pobliżu końca 3' pre-mRNA, a PABPN1 wiąże nowopowstałe na końcu 3' mRNA fragmenty oligo-A. Oba te białka rekrutują PAP do jej właściwego substratu RNA, równocześnie synergistycznie wzmacniając jej procesywność tak by możliwe było sekwencyjne przeprowadzenie pełnej syntezy ogona poli(A) bez dysocjacji polimerazy od łańcucha.

Podczas gdy mRNA ssaków wyjściowo zakończone jest zazwyczaj ogonem poli(A) złożonym z ~250 adenozyń, w naturze spotyka się bardzo różne warianty jego długości, a także pewne modyfikacje. Długość poli(A) przekłada się bezpośrednio na aktywność translacyjną mRNA i stanowi istotny element regulatorowy w ekspresji genów, co zostanie omówione w jednym z kolejnych rozdziałów. Znane są przypadki mRNA, których ogon poli(A) nie przekracza długością kilkunastu nukleotydów.³¹ Istnieją nawet mRNA kodujące grupę białek histonowych, które w ogóle nie posiadają ogona poli(A), a jego funkcję pełni znajdująca się na końcu 3' struktura spinki do włosów.³² Jednakże za różnorodność w długości poli(A) poszczególnych mRNA odpowiadają przede wszystkim mechanizmy deadenylacji, czyli specyficznej degradacji łańcucha poliadenylowego.³³ mRNA powstające w jądrze komórkowym są najczęściej w ramach procesu dojrzewania wydłużane o ogon poli(A) tej samej długości. Następnie w ramach kontroli ekspresji genów oraz metabolizmu mRNA, ogony ulegają skracaniu, a niekiedy ponownemu wydłużaniu już w cytoplazmie.³⁴

Za różnorodność w strukturze i funkcjach cząsteczek mRNA odpowiada również zjawisko alternatywnej poliadenylacji. Podobnie jak w przypadku zjawiska alternatywnego splicingu, umożliwia ona produkcję wielu izoform mRNA z tej samej cząsteczki pre-mRNA.^{35,36} Możliwe jest to dzięki występowaniu więcej niż jednej sekwencji sygnałowej poliadenylacji (PAS) w pobliżu końca 3'. Wybór miejsca poliadenylacji przez białkową maszynę komórkową zależy od typu i funkcji danej komórki. Przykładowo, rozpoczęcie poliadenylacji w PAS znajdującej się bliżej końca 5' prowadzi do usunięcia większego fragmentu 3' UTR, a mRNA posiadające krótszy region 3' UTR wydajniej ulegają translacji.^{37,38} Silnie wyrażane geny, jak i geny konserwowane ewolucyjnie często ulegają alternatywnej poliadenylacji.³⁹

2.4. Inicjacja translacji

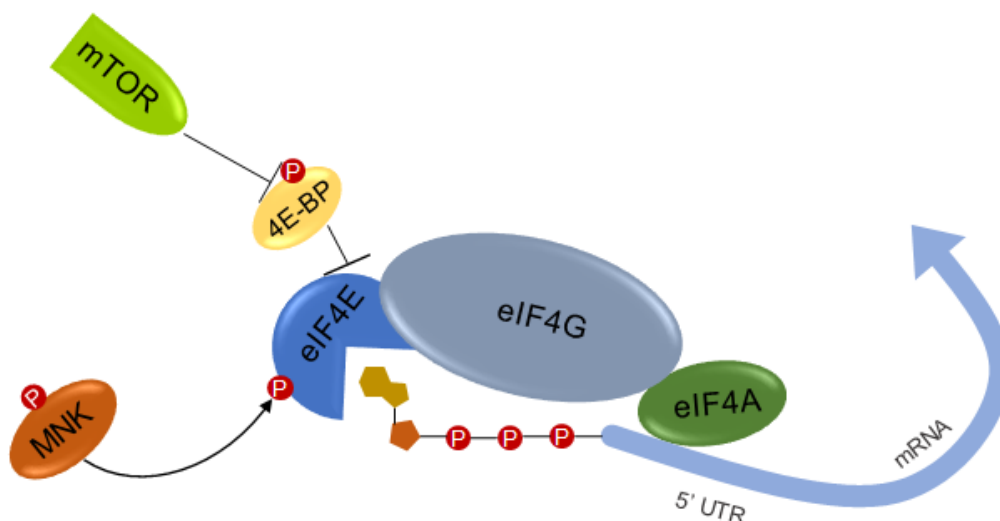
Inicjacja translacji to proces rozpoczynający komórkową biosyntezę białek, stanowiący etap limitujący jej szybkość oraz wydajność. Dojrzała cząsteczka mRNA ulega transportowi z jądra komórkowego do cytoplazmy.^{40,41} Tam zachodzi proces translacji polegający na odszyfrowaniu sekwencji nukleotydowej matrycy mRNA przez dwie podjednostki rybosomalne i przepisaniu jej na sekwencję aminokwasową produkowanego białka (Rys. 7). Pierwszy etap inicjacji translacji polega na utworzeniu preinicjacyjnego kompleksu rybonukleoprotein 43S PIC (ang. *43S preinitiation complex*).⁴² Składa się on z małej podjednostki rybosomalnej 40S związanej przez białkowe czynniki inicjujące eIF1, eIF1A, eIF3 oraz poczwórny kompleks eIF2-Met-tRNA^{Met}-GTP. 43S PIC jest stabilnym kompleksem obecnym w cytoplazmie, który w trakcie procesu translacji zostaje związany za pośrednictwem eIF3 z końcem 5' mRNA przez kompleks inicjujący translację eIF4F. 43S PIC przesuwa się wzdłuż łańcucha mRNA w kierunku 5'→3' aż napotka kodon start (AUG). Sekwencja kodonu AUG rozpoznawana jest przez Met-tRNA^{Met} znajdujące się w kieszeni wiążącej podjednostki 40S dzięki komplementarności zasad.⁴³ Następnie duża podjednostka rybosomalna 60S zostaje przyłączona z utworzeniem pełnego rybosomu 80S,⁴⁴ który przeprowadza proces syntezy łańcucha aminokwasowego.



Rysunek 7 Schemat procesu inicjacji translacji. Rysunek zapożyczony z pracy Fukao et al.⁴⁵

Białkowy kompleks eukariotyczny inicjacji translacji 4F (eIF4F, ang. *eukaryotic initiation factor 4F*) tworzy się poprzez oddziaływanie ze strukturą kapu zlokalizowaną na końcu 5' mRNA i składa się z trzech białek (eIF4A, eIF4E, eIF4G).⁴⁶ Regulacja aktywności białek

Trzecia podjednostka kompleksu inicjującego translację to białko eIF4E, odpowiadające za bezpośrednie rozpoznawanie i wiązanie struktury kapu na końcu 5'. Aktywność eIF4E może być regulowana na dwa sposoby (Rys 8). Pośrednia regulacja zachodzi poprzez fosforylację białek inhibitorowych 4E-BP (ang. *eIF4E-binding proteins*). Białka 4E-BP fosforylowane są przez kinazę białkową mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*), co prowadzi do ich uwolnienia z kieszeni wiążącej eIF4E, w której konkurują o wiązanie z eIF4G.⁵² Wolne eIF4E może zatem utworzyć kompleks z eIF4G i pośrednio eIF4A. To z kolei umożliwia rekrutację wspomnianego już kompleksu rybonukleoprotein 43S PIC. Na tym etapie aktywność eIF4E może zostać zwiększona na drodze bezpośredniej fosforylacji samego białka przez kinazę MNK (ang. *mitogen-activated protein kinase-interacting protein kinase*), co zwiększa jego powinowactwo do struktury kapu.⁵³



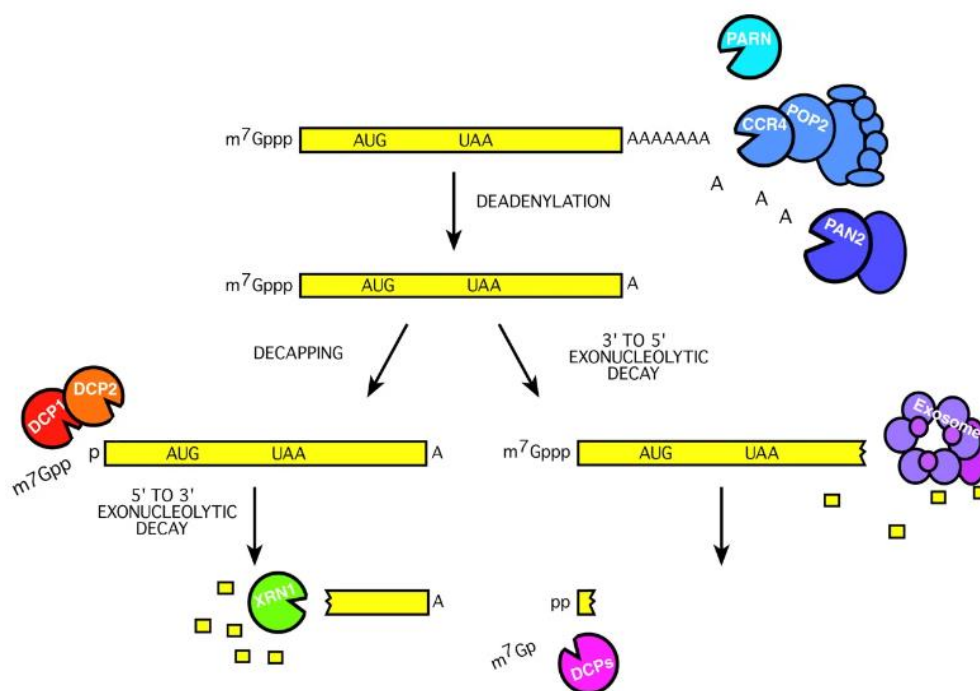
Ze względu na jego kluczową rolę w procesie inicjacji translacji, ekspresja białka eIF4E jest silnie regulowana w komórkach, a jego stężenie w cytoplazmie w normalnych warunkach pozostaje na stosunkowo niskim poziomie. Sprawia to, że cząsteczki mRNA konkurują o dostęp do kompleksu eIF4F i, co za tym idzie, produkcję kodowanego przez siebie białka.⁵⁴ Tak samo, jak w przypadku mRNA posiadających krótki region 3' UTR, cząsteczki o krótkim i nieustrukturyzowanym regionie 5' UTR wydajniej ulegają procesowi translacji poprzez umożliwienie białkowo-rybosomalnej maszyny translacyjnej szybkie poruszanie się w dół łańcucha i odnalezienie kodonu start. Z kolei mRNA zawierające długie i silnie ustrukturyzowane 5' UTR znacznie słabiej ulegają translacji.⁵⁵ Należą do nich mRNA proto-onkogenów oraz komórkowych czynników wzrostu. Są to zatem mRNA kodujące białka, których nadekspresja w komórkach może prowadzić do rozwoju nowotworów. W związku z powyższym, eIF4E pełni kluczową rolę w procesie nowotworzenia i stanowi istotny cel terapeutyczny w wielu terapiach

antynowotworowych. Zwiększona aktywność eIF4E powoduje znaczącą nadekspresję białek, których mRNA nie ulega wydajnej translacji w zdrowych komórkach. Nadaktywność eIF4E może być spowodowana jego nadekspresją lub zmniejszoną ekspresją albo nadmierną fosforylacją białek inhibitorowych 4E-BP1.^{56,57} Zarówno zwiększone stężenie eIF4E jak i zmniejszone stężenie 4E-BP w cytoplazmie komórkowej stanowią istotne markery nowotworowe.

2.5. Degradacja mRNA

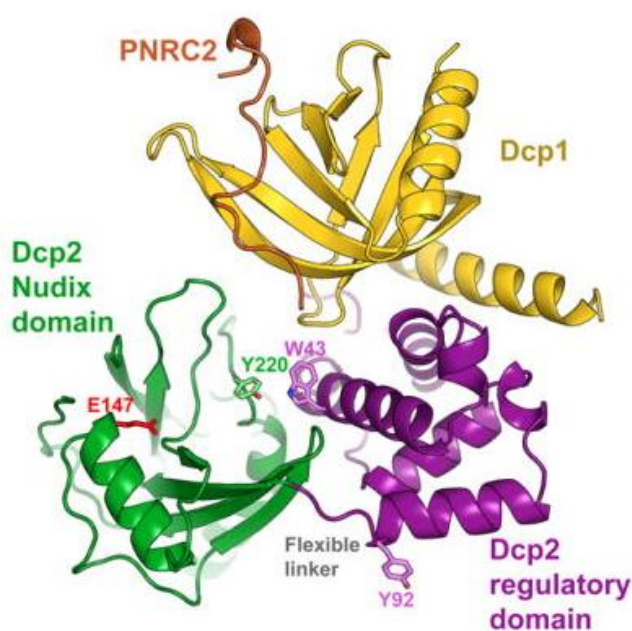
Degradacja mRNA w komórkach jest jednym z podstawowych mechanizmów regulacji ekspresji genów. Eukariotyczne mRNA ulega degradacji w cytoplazmie w czasie od kilku minut do kilku godzin od momentu jego transportu na zewnątrz jądra komórkowego. Sam proces degradacji może przebiegać na dwa główne sposoby – w kierunku $5' \rightarrow 3'$ lub $3' \rightarrow 5'$.⁵⁸ Jednakże pierwszym krokiem kierującym cząsteczkę mRNA na ścieżkę degradacji jest niemalże zawsze skrócenie ogona poli(A).⁵⁹ W trakcie trwania procesu translacji, zarówno koniec $3'$ jak i $5'$ chronione są przed aktywnością egzonukleaz dzięki specyficznym oddziaływaniom białko-RNA. Jak już wspomniałam w poprzednim rozdziale, struktura m^7G -kapu wiązana jest przez białkowy kompleks inicjujący translację eIF4F, z kolei znajdujący się końcu $3'$ ogon poli(A) wiązany jest przez cząsteczki białka PABP. Obecność białek utrudnia czynnikom degradującym dostęp do końców mRNA, zwłaszcza, że same białka oddziałują ze sobą prowadząc do zamykania się cząsteczki transkryptu w strukturę pętli. Jednakże z czasem ogon poli(A) ulega skróceniu i gdy osiągnie długość około 10 do 60 nukleotydów, mRNA poddawane jest degradacji.⁶⁰

W komórkach eukariotycznych deadenylacja, czyli usuwanie ogona poli(A), może zachodzić z udziałem kilku nukleaz, choć najczęściej funkcję tę pełni kompleks Ccr4–Caf1.⁶¹ W przypadku ścieżki degradacji w wariancie $5' \rightarrow 3'$, deadenylacja poprzedza usunięcie struktury kapu z końca $5'$ (dekapingu) przez kompleks Dcp1–Dcp2⁶² lub enzym Nudt16⁶³. Następnie zachodzi egzonukleolityczne trawienie łańcucha RNA przez enzym Xrn1.⁶⁴ Jest to preferowany kierunek degradacji, który może jednakże ulec zaburzeniu, co prowadzi do alternatywnej ścieżki degradacji w kierunku $3' \rightarrow 5'$ przez białkowy kompleks zwany egzozomem (Rys. 9).⁶⁵



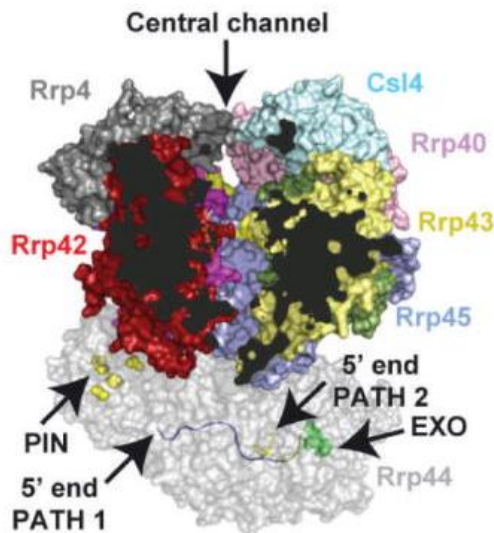
Rysunek 9 Schemat dwóch głównych ścieżek degradacji mRNA. Rysunek zapożyczony z pracy Decker et al.⁶⁰

Enzym Dcp2 z rodziny hydrolaz Nudix uważany jest za główny enzym dekapujący w komórkach eukariotycznych.⁶⁶ Hydrolizuje on wiązanie między α i β fosforanem w strukturze kapu, prowadząc do uwolnienia m^7GDP i cząsteczki RNA zakończonej 5'-monofosforanem. Aktywność Dcp2 zwiększana jest przez utworzenie kompleksu z białkiem Dcp1 oraz z innymi białkami aktywującymi, takimi jak Edc1 (ang. *enhancer of decapping*), czy PNRC2 (ang. *proline-rich nuclear receptor coregulatory protein*) (Rys. 10). Dcp1 prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie Dcp2, które umożliwiają obu podjednostkom kompleksu wiązanie do RNA i prowadzą do zwiększenia powinowactwa Dcp2 do substratu. Z kolei białko Edc1 wymusza dodatkowe zmiany konformacyjne kompleksu Dcp1-Dcp2, które ułatwiają wiązanie Dcp2 z pętlą RNA, a białko PNRC2 wspomaga proces hydrolizy kapu.



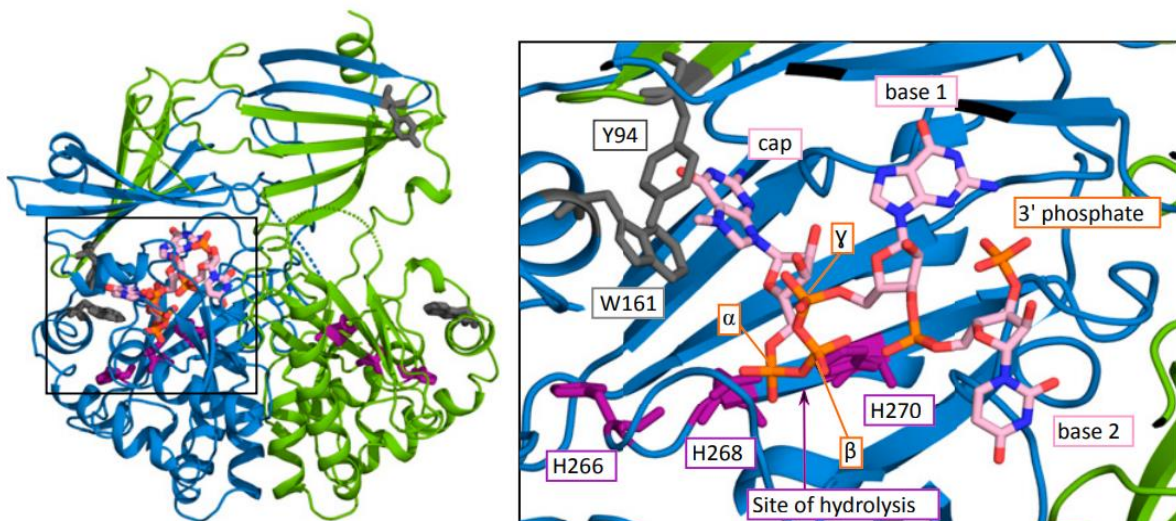
Rysunek 10 Struktura krystalograficzna kompleksu białek Dcp1-Dcp2-PNRC2 (PDB 5KQ4). Rysunek zapożyczony z pracy Mugridge et al.⁶⁶

Centralną część egzozomu przeprowadzającego degradację w kierunku 3' → 5' stanowi dziewięć podjednostek białkowych obecnych zarówno w jądrowej jak i cytoplazmatycznej odmianie kompleksu.⁶⁵ Co ciekawe, „jądro” egzozomu utraciło całą nukleolityczną aktywność w komórkach ludzkich. Zamiast tego stanowi ono strukturalną podporę wiążącą specyficznie fragmenty RNA bogate w podjednostki AU i U. Enzymatyczną aktywność egzozomu pełni nukleaza Rrp44 z rodziny rybonukleaz II (RNazy II) (Rys. 11). Jest ona luźno związana z centralnym kompleksem egzozomu, a w jądrze komórkowym jej funkcję może dodatkowo pełnić egzonukleaza Rrp6 z rodziny RNaz D. Poza domenami katalitycznymi, obie nukleazy posiadają również domeny pozwalające na specyficzne rozpoznawanie i wiązanie substratów. Rrp44 trawi procesywnie zarówno ustrukturyzowane jak i nieustrukturyzowane fragmenty RNA, biorąc udział przede wszystkim w degradacji cząsteczek mRNA. W cytoplazmie egzozom odpowiada za rozkład mRNA zarówno w ramach normalnego procesu metabolicznego związanego z kontrolą ekspresji genów, jak i kontroli jakości transkryptów.⁶⁷ Kontrola jakości obejmuje usuwanie przez egzozom cząsteczek mRNA posiadających przedwczesny kodon STOP w procesie zwanym NMD (ang. *Nonsense-Mediated Decay*), mRNA nie posiadających kodonu STOP w procesie NSD (ang. *Non-Stop Decay*) oraz mRNA, których translacja uległa wstrzymaniu i pozostają w trwałym kompleksie z maszyną translatablejną (NGD, ang. *No-Go Decay*).



Rysunek 11 Model 9-członowego jądra egzozomu w kompleksie z nukleazą Rrp44. Przygotowano na podstawie struktury krystalograficznej (PDB 2NN6). Rysunek zapożyczony z pracy Wasmuth et al.⁶⁸

Degradacja w kierunku $3' \rightarrow 5'$ prowadzi do powstania krótkiego fragmentu RNA zakończonego kapem na końcu $5'$. Struktura kapu usuwana jest z takiego fragmentu przez enzym DcpS (ang. *Decapping Scavenger enzyme*) poprzez hydrolizę wiązania pirofosforanowego między fosforanem β i γ kapu, prowadząc do uwolnienia cząsteczki m^7GMP i fragmentu RNA zakończonego $5'$ -difosforanem. DcpS należy do grupy pirofosfataz z rodziny HIT, czyli enzymów, których podjednostka katalityczna zawiera triadę histydynową.⁶⁹ DcpS katalizuje dekaping wyłącznie krótkich substratów, o długości maksymalnie 10 nukleotydów, nie dopuszczając tym samym do akumulacji w komórkach potencjalnie toksycznych, krótkich fragmentów kapowanego RNA.



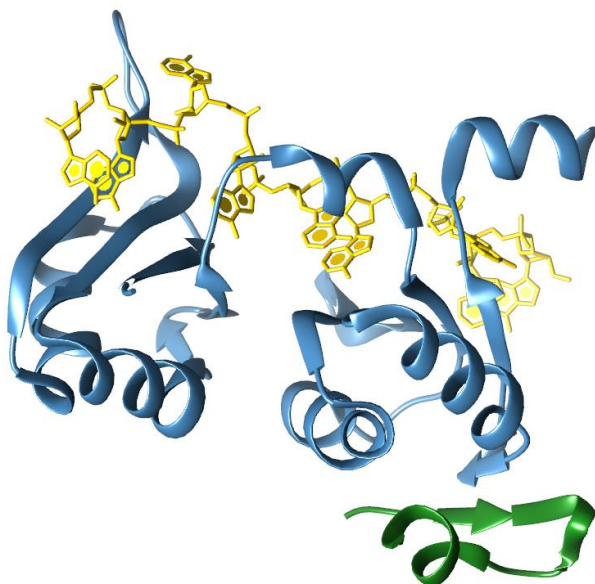
Rysunek 12 Struktura enzymu DcpS w kompleksie z cząsteczką $m^7GpppGU$. Kolorem zielonym i niebieskim zaznaczono dwie podjednostki strukturalne DcpS, w kieszeni wiążącej kolorem różowym i pomarańczowym zaznaczona jest struktura analogu kapu, a fioletowym reszty histydynowe biorące udział w hydrolizie kapu. Rysunek zapożyczony z pracy Fuchs et al.⁷⁰

2.6. Białka oddziałujące z ogonem poli(A)

W poprzednich podrozdziałach omówione zostały procesy związane z syntezą, dojrzewaniem i degradacją cząsteczek mRNA, jak również zjawiskiem translacji i jej regulacji w komórkach eukariotycznych. Wielokrotnie wspomniane zostały białka biorące udział w tych procesach, a oddziałujące bezpośrednio ze strukturą ogona poli(A). Zjawisko poliadenylacji zostało już szczegółowo omówione w kontekście transkrypcji i dojrzewania cząsteczki mRNA. W niniejszym podrozdziale chciałabym się skupić na białkach wiążących poli(A) związanych z procesami translacji oraz degradacji mRNA.

2.6.1. Białko PABP

Cytoplazmatyczne białko PABP (ang. *Poly(A)-binding protein*) ma ewolucyjnie konserwowaną strukturę. Składa się ono z 4 domen wiążących RNA (RRM, ang. *RNA recognition motif*) i C-końcowej domeny PABC (ang. *poly(A)-binding protein C-terminal domain*).⁷¹ Ogon poli(A) równocześnie obsadzony jest przez wiele cząsteczek PABP, co prowadzi do powstania multimerycznej struktury na końcu 3' mRNA. Jedna cząsteczka białka wiąże odcinek poli(A) o długości od 24 do 27 adenozyń,⁷² co oznacza, że całkowita liczba PABP znajdujących się w kompleksie z poli(A) zależy od długości ogona poli(A) w danym mRNA. Wykazano, że pełna struktura PABP (czyli 4 domeny RRM i PABC) nie jest niezbędna dla zachowania jego biologicznych funkcji, w tym wiązania poli(A) i oddziaływania z białkiem eIF4G. Do spełniania tych funkcji wystarczające są dwie N-końcowe domeny RRM1-2.⁷³ W rekombinowanym białku PABP przyjmują one odpowiednią konformację z utworzeniem wąskiego kanału wiążącego fragment łańcucha poliadenylowego o długości 11-12 adenozyń (Rys. 13). Metodami ilościowymi wykazano, że pełna cząsteczka wiąże fragment poli(A) o długości 25 adenozyń z równowagową stałą dysocjacji K_D równą 7 nM.⁷⁴

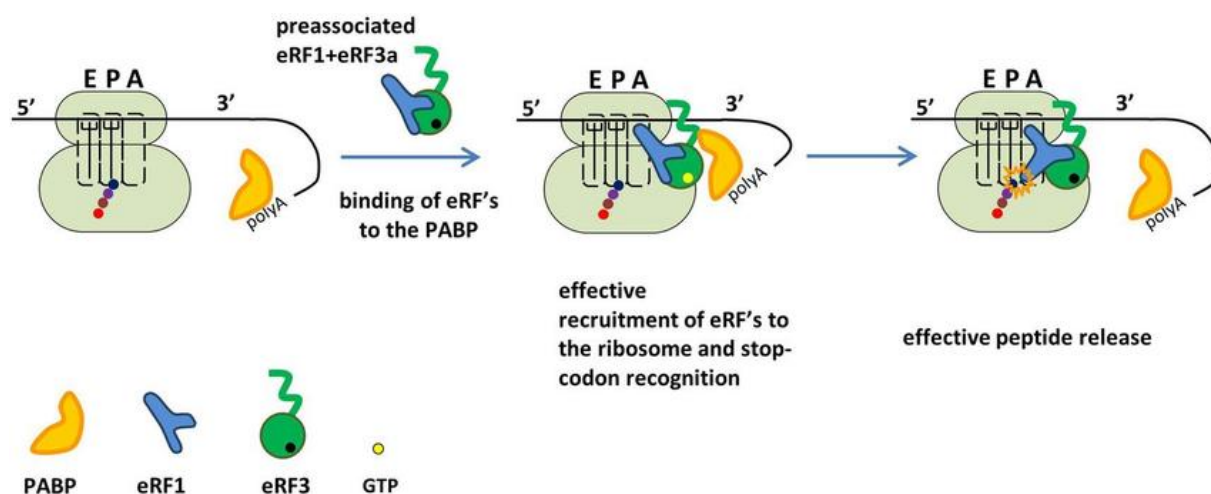


Rysunek 13 Struktura rekombinowanego białka PABP¹⁻¹⁹⁰ (niebieski) w kompleksie z łańcuchem poli(A) (żółty) oraz fragmentem eIF4G wiążącym PABP (zielony). Rysunek przygotowany na podstawie struktury krystalograficznej (PDB 4F02) zdeponowanej przez Safaei et al.⁷⁵

PABP pełni kilka istotnych funkcji w komórkach eukariotycznych. Jak już wspomniałam w poprzednim rozdziale, jego jądrowa odmiana PABPN1 bierze czynny udział w procesie poliadenylacji, jak również pośredniczy w transporcie nukleocytoplazmatycznym. Skupię się jednak na cytoplazmatycznej odmianie białka (PABPC1), która stabilizuje ogon poli(A) i tym

samą całą cząsteczkę mRNA, bierze udział w procesie inicjacji translacji, jak również uczestniczy w zjawisku degradacji mRNA. PABP stabilizuje cząsteczkę mRNA poprzez ochronę struktury ogona poli(A) przed aktywnością enzymów deadenylujących. Po pierwsze, ogon poli(A) gęsto obsadzony przez cząsteczki PABP nie jest dostępny dla 3' egzonukleaz. Dodatkowo, poprzez oddziaływanie ze znajdującym się na końcu 5' kompleksem inicjującym translację, PABP pośredniczy w utworzeniu zamkniętej pętli mRNA, co dodatkowo ogranicza dostęp wszelkiego rodzaju egzonukleazom.

O ile możliwe jest zajście translacji z udziałem cząsteczek mRNA nie posiadających ogona poli(A), jego obecność, oraz obecność znajdujących się na nim białek PABP, znacząco zwiększa wydajność tego procesu. Domeny RRM1-2 PABP oddziałują bezpośrednio z białkiem eIF4G wchodzącym w skład białkowego kompleksu zlokalizowanego na końcu 5' mRNA. Uważa się, że zamknięta pętla mRNA powstająca w wyniku zbliżenia do siebie obu końców cząsteczki promuje rekrutację zarówno małej jak i dużej podjednostki rybosomalnej w trakcie inicjacji translacji.⁷⁶ Białko PABP najpewniej oddziałuje również z innymi elementami kompleksu inicjującego, a jego oddziaływanie z eIF4G prowadzi do równoczesnego zwiększenia powinowactwa białka eIF4E do struktury kapu, jak i samego PABP do poli(A). PABP bierze również udział w terminacji translacji. Domena PABC białka oddziałuje bezpośrednio z czynnikami terminującymi translację eRF3a i eRF1 (ang. *eukaryotic release factor*)(Rys. 14).⁷⁷ Tym samym PABP pośredniczy w wiązaniu eRF1 do kodonu STOP (UAG, UAA, UGA) i następnie wymuszonej przez aktywność eRF3a zmiany konformacji eRF1. Jedna z domen eRF1 wiąże się z dużą podjednostką rybosomalną i rozpoczyna proces terminacji translacji.⁷⁸



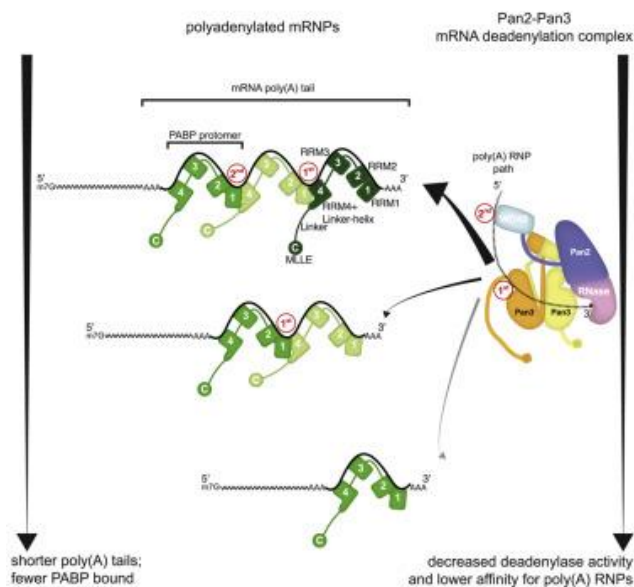
Rysunek 14 Schemat procesu terminacji translacji z udziałem oddziałujących z PABP czynników eRF1 i eRF3. Rysunek zapożyczony z pracy Ivanov et al.⁷⁷

Cytoplazmatyczne PABP koordynuje deadenylację mRNA przy równoczesnym chronieniu go przed przedwczesną degradacją.⁷⁹ Z jednej strony PABP odpowiada za rekrutację czynników deadenylujących poprzez interakcję z białkami z rodziny PAN i CNOT. Z drugiej jednak strony jego obecność na zarówno krótkich jak i długich ogonach poli(A) hamuje urydynylację końca 3', która kieruje mRNA na ścieżkę degradacji.⁸⁰ Dowiedziono również, że pod nieobecność PABP długie ogony poli(A) ulegają szybkiej deadenylacji zakończonej urydynylacją. Obecnie uważa się, że czynniki degradujące mRNA, takie jak egzosom czy enzym XRN1, aktywują się dopiero po usunięciu ostatniej cząsteczki PABP z końca 3'. Podsumowując, PABP odpowiada za kontrolowane skracanie ogona poli(A) cząsteczek mRNA znajdujących się w cytoplazmie, równocześnie nie dopuszczając przedwcześnie do całkowitej deadenylacji i następującej po niej degradacji transkryptu.

2.6.2. Białkowe czynniki deadenyłujące

Powszechnie uważa się, że cytoplazmatyczna deadenyłacja zachodzi na zasadzie skoordynowanej współpracy dwóch głównych kompleksów białkowych – PAN2/3 i CNOT. Podczas gdy PAN2/3 odpowiada tylko za skracanie długich ogonów poli(A) (>150 par zasad), kompleks CNOT przeprowadza niespecyficzną deadenyłację poliadenylowanych RNA znajdujących się w cytoplazmie.⁷⁹

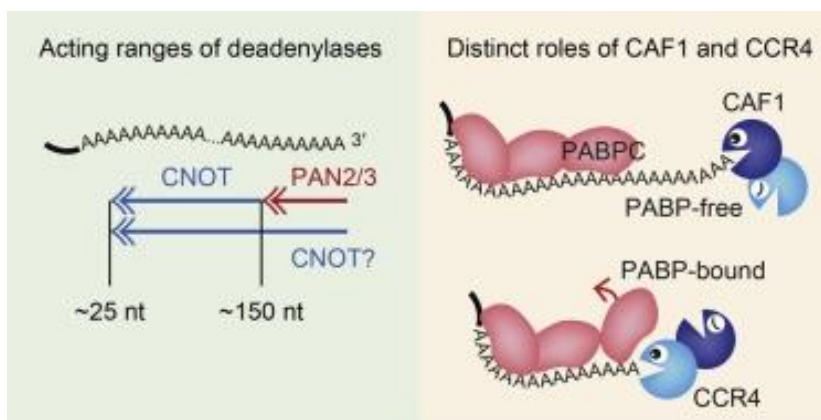
Kompleks PAN2/3 wykazuje znaczące powinowactwo do długich ogonów poli(A) i jego aktywność wzmacniana jest przez interakcję z białkiem PABP. PAN2/3 degraduje poli(A) w sposób nieciągły, fragmentami o długości około 27 nukleotydów, z wydajnością deadenyłacji malejącą wraz z długością ogona (Rys. 15).⁸¹ Sugeruje to, że degradacja zachodzi na zasadzie krótkich zrywów następujących po usunięciu kolejnej cząsteczki PABP z łańcucha poli(A). Zostało również wykazane, że aktywność PAN2/3 maleje gwałtownie w momencie skrócenia poli(A) do odcinka związanego przez tylko jedną cząsteczkę PABP. Oznacza to, że PAN2/3 w jednym momencie wiąże się wydajnie z fragmentami poli(A) o długości pozwalającej na obsadzenie przynajmniej dwoma lub trzema cząsteczkami PABP. Nie jest całkowicie jasne jaki jest mechanizm przejścia między deadenyłacją przeprowadzaną przez kompleksy PAN2/3 a CCR4-Not. Przy czym stosunkowo nowe badania pokazały, że o ile PAN2/3 rzeczywiście odpowiada za wstępne skracanie długich poli(A), kompleks ten nie pełni kluczowej roli w głównych procesach deadenyłacji i degradacji cytoplazmatycznych mRNA.⁷⁹



Rysunek 15 Schemat przedstawiający aktywność i powinowactwo do substratu kompleksu deadenyłującego PAN2/3 zależnie od długości ogona poli(A) mRNA. Rysunek zapożyczony z pracy Schäfer et al.⁸¹

Kompleks deadenyłujący CCR4-Not składa się z dwóch podjednostek katalitycznych, wykazujących różne powinowactwo substratowe (Rys. 16). Podjednostka CAF1, której rolę w ludzkim organizmie pełnią jej ortologi CNOT7 i CNOT8, degraduje poli(A) niezwiązane przez PABP i zatrzymuje się po napotkaniu jego cząsteczki.^{79,82} Z kolei podjednostka CCR4 (u ssaków jej ortologi to CNOT6 i CNOT6L) aktywowana jest przez obecność PABP i odpowiada za usunięcie jego cząsteczki z łańcucha poli(A) przed przystąpieniem do deadenyłacji. Podobnie jak w przypadku PAN2/3, kompleks CCR4-Not usuwa jednorazowo fragmenty poli(A) o długości około 27 nukleotydów. Jego aktywność ulega chwilowemu wstrzymaniu przed każdym epizodem

deadenylacji po napotkaniu kolejnej cząsteczki PABP. Aktywności podjednostek katalitycznych uzupełniają się, co umożliwia deadenylację mRNA niezależnie od stężenia PABP w komórkach – aktywność CCR4 pełni większą rolę w sytuacjach wysokiego stężenia PABP, podczas gdy CAF1 degraduje poli(A) pod jego nieobecność.



Rysunek 16 Aktywność kompleksu CNOT oraz jego podjednostek katalitycznych CAF1 i CCR4. Rysunek zapożyczono z pracy Yi et al.⁷⁹

2.7. Modyfikowane nukleotydy i ich wpływ na procesy translacji i metabolizmu mRNA ze szczególnym uwzględnieniem ogona poli(A)

Niniejszy podrozdział poświęcony jest modyfikowanym nukleotydom obecnym w strukturze mRNA. Opisane zostaną zarówno modyfikacje występujące naturalnie, jak i chemiczne modyfikacje wprowadzane do cząsteczek mRNA w celu regulacji ich metabolizmu i potencjału translacyjnego. Ze względu na szeroki wachlarz omawianych modyfikacji, zostały one podzielone ze względu na pozycję występowania w obrębie struktury nukleotydowej. Szczególna uwaga poświęcona została modyfikacjom ogona poli(A).

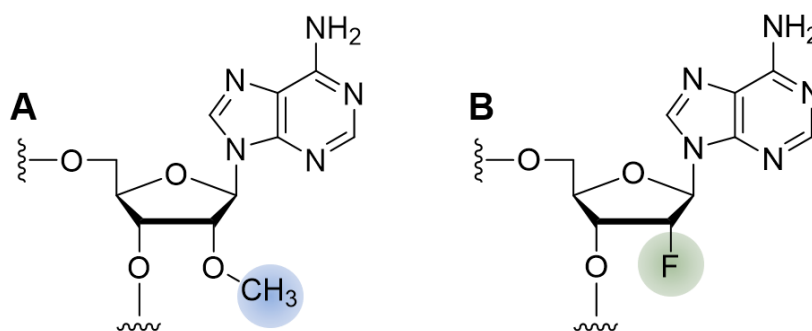
2.7.1. Modyfikacje rybozy

Jedną z najczęściej występujących modyfikacji mRNA jest metylacja w pozycji 2'-OH rybozy (Rys. 17A). Początkowo została wykryta w cząsteczkach rRNA i tRNA, choć szybko zanotowano również jej obecność w mRNA.^{83,84} W warunkach komórkowych 2'-O-metylacja wprowadzana jest do struktury RNA na dwa sposoby – przez niezależnie działające enzymy zwane metylotransferazami⁸⁵ lub rozbudowane kompleksy białek i małych jąderkowych RNA (snoRNA).⁸⁶ W przypadku mRNA, najwcześniej wykryto i zbadano 2'-O-metylację nukleotydów znajdujących się na końcu 5' i stanowiących element struktury 5' kapu. W ramach omawiania procesu kapingu wspomniałam, że 2'-O-metylacja pierwszego nukleotydu transkryptu prowadzi do powstania struktury kapu 1, a dodatkowa metylacja drugiego nukleotydu w łańcuchu – kapu 2. Jedną z podstawowych funkcji 2'-O-metylacji kapu jest umożliwienie elementom układu odpornościowego odróżnienie komórkowego mRNA od obcego mRNA, np. pochodzenia wirusowego.⁸⁷ Na drodze ewolucji wiele wirusów wykształciło tę samą modyfikację w strukturze własnego RNA w celu uniknięcia aktywacji interferonów typu I w momencie infekcji.

Poza strukturą kapu, spotyka się również 2'-O-metylację w środku cząsteczki mRNA. Najczęściej modyfikowanym nukleotydem jest urydyna – nukleotydy U_m stanowią ~70% wszystkich metylowanych podjednostek mRNA.^{88,89} 2'-O-metylacja znacząco zmienia właściwości fizykochemiczne modyfikowanego nukleotydu i w efekcie struktur trzeciorzędowych mRNA. Ze względu na umiejscowienie modyfikacja ta nie zakłóca parowania zasad, a nawet stabilizuje tworzenie się typowej dla struktur RNA podwójnej helisy typu A. Z drugiej strony, uniemożliwia

utworzenie powszechnie występującego wiązania wodorowego z grupą 2'-OH, utrudniając tym samym stabilizację cząsteczki RNA w kieszeniach wiążących białek. Pozbawia również tlen w pozycji 2' rybozy nukleofilowego charakteru, zwiększając tym samym odporność RNA na hydrolizę enzymatyczną.⁹⁰

2'-O-metylacja pełni kluczową rolę w procesach splicingu i translacji. Obecność metylowanych nukleotydów zarówno w małych jądrowych RNA (snRNA) wchodzących w skład spliceosomu, jak i pre-mRNA poddawanego dojrzewaniu, jest niezbędna dla zajścia procesu splicingu.⁹¹ 2'-O-metylacja w pobliżu miejsca rozgałęzienia może również prowadzić do alternatywnego splicingu.⁹² Zaobserwowano, że metylowane nukleotydy w obrębie sekwencji kodujących mRNA, jak również w strukturze tRNA wchodzących w skład maszyneryi translacyjnej, pełnią regulacyjną funkcję w procesie ekspresji genów.⁹³ Metylacja grupy 2'-OH zakłóca oddziaływanie tRNA-mRNA i rybosom-mRNA, zmieniając tym samym dynamikę procesu elongacji łańcucha aminokwasowego. 2'-O-metylacja jest więc modyfikacją powszechnie wykorzystywaną w strukturach syntetycznego mRNA, w celu poprawienia stabilności cząsteczki, jak również regulacji zachodzących z jej udziałem procesów metabolicznych.



Rysunek 17 Struktury nukleotydów zawierających modyfikacje rybozy: (A) 2'-O-Me; (B) 2'-F.

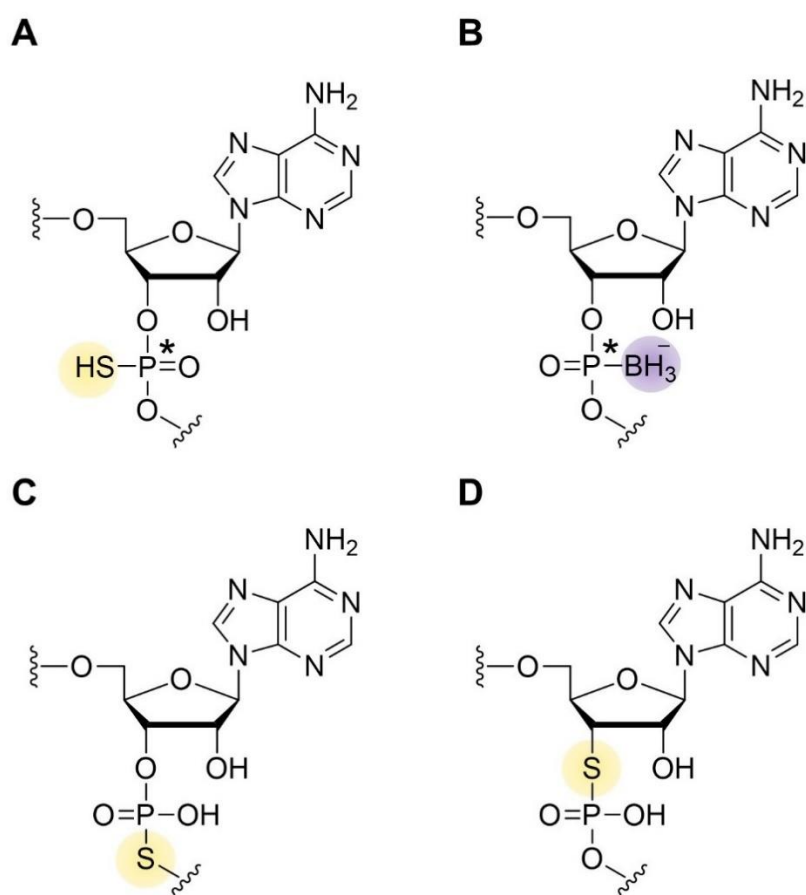
Inną powszechnie stosowaną modyfikacją rybozy w syntetycznych RNA jest substytucja grupy 2'-OH atomem fluoru (Rys. 17B). Atom fluoru łączy stosunkowo niewielkie rozmiary z wysoką elektroujemnością. W efekcie grupa 2'-F nie zaburza konformacji RNA, za to znacząco zwiększa temperaturę topnienia cząsteczki⁹⁴ oraz poprawia jego chemostabilność i odporność na działanie rybonukleaz, w tym powszechnie występującej RNazy A.⁹⁵ 2'-F obniża również znacząco immunogenność syntetycznych RNA oraz zwiększa powinowactwo w oddziaływaniach RNA-RNA.⁹⁶ Dlatego modyfikacja ta jest szczególnie często wykorzystywana w strukturach terapeutycznych antysensownych oligonukleotydów i aptamerów. Nukleotydy zawierające modyfikację 2'-F najczęściej wprowadzane są do cząsteczek RNA ko-transkrypcyjnie, poprzez wykorzystanie mutantów polimeraz RNA o szczególnie niskiej specyficzności substratowej.⁹⁵

2.7.2. Modyfikacje fosforanowe

Wiązanie fosfodiesterowe pełni kluczową funkcję w stabilizacji oraz promowaniu poprawnej konformacji cząsteczki mRNA, jak również pośredniczy w jego wiązaniu przez komórkowe czynniki odpowiedzialne za jego metabolizm i translację. Dzięki temu modyfikacje w obrębie grupy fosforanowej stały się powszechnie stosowaną metodą wpływania na właściwości syntetycznych cząsteczek RNA o zastosowaniu terapeutycznym.

Jedną z najczęściej stosowanych modyfikacji jest zastąpienie jednego z atomów tlenu grupy fosforanowej atomem siarki. Siarka wprowadzona może być zarówno w pozycjach 3' lub 5' podjednostek nukleotydowych, jak i zastąpić niemostrkowy atom tlenu grupy fosforanowej (Rys.

18A, 18C, 18D). Ze względów syntetycznych modyfikacje niemostkowe są łatwiejsze do otrzymania w syntezie w fazie stałej, gdzie sulfuryzacja grupy fosforanowej ostatniej podjednostki łańcucha następuje bezpośrednio po jej sprzęganiu.⁹⁷ Co istotne, modyfikacja ta skutkuje powstaniem stereogenicznego atomu fosforu (V) i otrzymaniem dwóch diastereoizomerów o konfiguracji S_P lub R_P , które mogą znacząco różnić się właściwościami fizykochemicznymi i farmakokinetycznymi. Każdy kolejny tiofosforan w sekwencji zwiększa liczbę diastereoizomerów zgodnie ze wzorem 2^{N-1} , gdzie N oznacza ilość modyfikowanych fosforanów w danej cząsteczce. Ze względu na brak możliwości skutecznej separacji poszczególnych diastereoizomerów, najczęściej stosuje się ich mieszaninę, a jej właściwości stanowią średnią z całej populacji wariantów izomerycznych. W syntezie sekwencji RNA możliwe jest otrzymanie diastereoselektywnych modyfikacji poprzez zastosowanie trifosforanów nukleotydów zmodyfikowanych w pozycji α mostka fosforanowego (NTP α S). Modyfikacje grup fosforanowych siarką w pozycjach mostkowych wymagają przygotowania amidofosforynów (w przypadku syntezy w fazie stałej) lub trifosforanów nukleotydów (w przypadku transkrypcji na matrycy DNA) zawierających wbudowane atomy siarki w odpowiednich pozycjach.⁹⁸ Oznacza to wyjściowo większe wyzwanie syntetyczne, jednakże takie podejście niweluje problem w postaci mieszaniny diastereoizomerów o różnorodnych, niekoniecznie korzystnych z punktu widzenia biochemicznego, właściwościach.



Rysunek 18 Struktury nukleotydów zawierających modyfikacje wiązania fosfodiesterowego. (A) Niemostkowa modyfikacja tiofosforanowa; (B) Niemostkowa modyfikacja boranofosforanowa; (C) Mostkowa modyfikacja w postaci 5'-fosfotioestru; (D) Mostkowa modyfikacja w postaci 3'-fosfotioestru.

Obecnie rozwijane są nowe metody syntetyczne pozwalające na otrzymanie stereoselektywnych tiofosforanów. Przykładowo, w pracy Knouse et al.⁹⁹ przedstawiono strategię

wykorzystując opracowane przez współautorów reagenty, których poszczególne enancjomery wymuszają konkretną konfigurację tiofosforanu w trakcie syntezy w fazie stałej. Możliwość otrzymania długich łańcuchów RNA, a nawet mRNA, o ściśle określonym profilu diastereoizomerycznym ułatwi szczegółowe badania nad właściwościami biochemicznymi poszczególnych diastereoizomerów, a w dalszej perspektywie projektowanie transkryptów o ściśle określonych właściwościach.

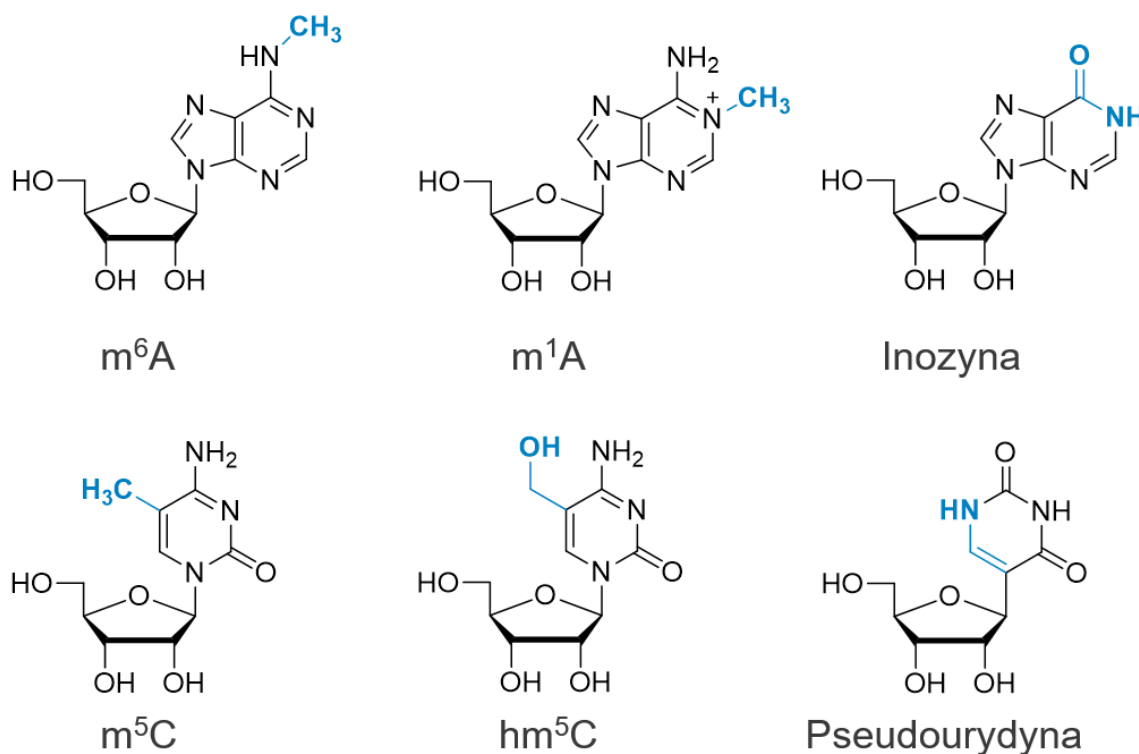
Bez względu na typ modyfikacji tiofosforanowej, ma ona szczególne zalety w zakresie zwiększania stabilności, potencjału translacyjnego¹⁰⁰ oraz powinowactwa syntetycznych RNA w oddziaływaniach RNA-białko i RNA-RNA.^{101,102,103} Przyczynia się do tego przede wszystkim zwiększona odporność zmodyfikowanej cząsteczki na działanie nukleaz - syntetyczne RNA wprowadzane do żywych komórek jest szczególnie podatne na enzymatyczną degradację, co znacząco zmniejsza jego efektywność jako terapeutyku. Dlatego też istotne jest opracowanie strategii pozwalających na zwiększenie okresu trwania syntetycznych RNA w komórkach, które nie zakłócają ich oddziaływania z celem terapeutycznym, a nawet te oddziaływania wzmacniają. W związku z tym tiofosforany znalazły swoje zastosowanie również w modyfikacjach ogona poli(A), którego stabilność i odporność na degradację stanowi istotny czynnik w stabilności całej cząsteczki mRNA. Syntetyczne mRNA, których ogony poli(A) zostały w około 30% zmodyfikowane przypadkowo rozmieszczonymi grupami tiofosforanowymi, wykazują znacząco zwiększoną odporność na deadenylację, przy równocześnie zachowanym poziomie ekspresji białek w komórkach eukariotycznych.¹⁰⁴

Innego rodzaju powszechnie stosowaną metodą modyfikacji wiązania fosfodiesterowego cząsteczek RNA jest wprowadzanie do ich struktury boranofosforanów. Boranofosforany wykazują podobne właściwości stabilizujące cząsteczki RNA co tiofosforany, a modyfikację tę można wprowadzić stosując bardzo zbliżone metody syntetyczne (Rys. 18B).¹⁰⁵ Tego typu modyfikacja również znalazła zastosowanie w syntezie syntetycznych RNA o potencjale terapeutycznym, zwłaszcza antysensownych oligonukleotydów.¹⁰⁶ Próby wprowadzenia jej do ogonów poli(A) mRNA skutkowały niewielką poprawą odporności na deadenylację i obniżyły poziom ekspresji białek w komórkach.¹⁰⁴

2.7.3. Modyfikacje zasad

Modyfikacje zasad mRNA pełnią istotne funkcje regulujące jego metabolizm oraz poziom ekspresji genów. Mają one związek z autoregulacją mRNA w zakresie splicingu, lokalizacji w komórkach, czasu życia i wydajności translacji. Sekwencja i wynikająca z niej struktura przestrzenna mRNA może ulegać modyfikacjom w czasie życia komórkowego tej cząsteczki. Modyfikacje zasad powodują istotne zmiany w parowaniu zasad, konformacji i ogólnych właściwościach termodynamicznych mRNA. Nawet niewielka zmiana struktury pojedynczej zasady może znacząco wpłynąć na to jaka konformacja i struktura trzeciorzędowa mRNA będzie preferowana i w efekcie jaka będzie dynamika oddziaływania całej cząsteczki z białkami. Można więc powiedzieć, że biologiczne właściwości i funkcje komórkowego mRNA zależą od krajobrazu modyfikacji zasad w jego strukturze.

Dotychczas wykryto sześć naturalnie występujących modyfikacji zasad mRNA. Zaliczają się do nich *N*⁶-metyloadenozyna (*m*⁶A), *N*¹-metyloadenozyna (*m*¹A), 5-metylocytydyna (*m*⁵C), 5-hydroksymetylocytydyna (*hm*⁵C), pseudourydyna oraz inozyna (Rys. 19).¹⁰⁷ Pod koniec podrozdziału zostaną również wspomniane substytucje zasad w sekwencji mRNA, które nie stanowią formalnie biochemicznych modyfikacji, ale również znacząco wpływają na właściwości całej cząsteczki.



Rysunek 19 Naturalnie występujące modyfikacje zasad w eukariotycznych mRNA

m^6A jest to odwracalna modyfikacja o wszechstronnym wpływie na losy mRNA w komórce. Jest to najczęściej występująca modyfikacja mRNA, również w strukturze ogona poli(A), gdzie pełni rolę stabilizującą.¹⁰⁸ W poli(A) komórek HeLa pojawia się ona raz na 700-800 nukleotydów. Uważa się, że na jedną cząsteczkę mRNA przypada średnio 3 – 5 podjednostek m^6A , najczęściej w okolicach regionu 3' UTR oraz kodonów stop.¹⁰⁹ Jest powiązana z procesami splicingu i degradacji mRNA oraz regulacją ekspresji białek i transportu nukleocytoplazmatycznego.¹¹⁰ m^6A wpływa zarówno na strukturę drugorzędową RNA jak i oddziaływanie z białkami wiążącymi RNA. Obecność grupy metylowej w pozycji N6 adenosyny nie blokuje tworzenia się wiązań wodorowych w parach Watsona-Cricka, jednakże zmienia energetyczny charakter pary A·U na bardziej niekorzystny.¹¹¹ Wokół m^6A RNA nie tworzy więc preferencyjnie par zasad i przyjmuje strukturę jednoniciową. Uważa się, że m^6A pełni rolę strukturalnego „przełącznika”, a jej obecność w cząsteczce służy celowemu wymuszeniu zmiany w strukturze drugorzędowej RNA i tym samym lokalnie zmienia jej właściwości biochemiczne. Demetylacja podjednostki powoduje powrót struktury RNA do pierwotnej konformacji.¹¹² Ponieważ m^6A powoduje rozwinięcie RNA do postaci jednoniciowej, zwiększa tym samym dostępność danego fragmentu dla białek odpowiedzialnych za metabolizm mRNA, w tym heterogenicznych jądrowych rybonukleoprotein C (HNRNCPC, ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C*) regulujących splicing i ilość danego transkryptu w komórce. Z kolei białka z rodziny YTH dzięki oddziaływaniom hydrofobowym wiążą specyficznie sekwencje mRNA zawierające modyfikację m^6A .¹¹³ Przykładowo, białko YTHDC1 odpowiada za regulację splicingu w jądrze komórkowym.¹¹⁴ Z kolei YTHDF2 pośredniczy w degradacji metylowanego mRNA, skraca jego okres półtrwania i zakłóca wiązanie rybosomu, podczas gdy YTHDF1 zwiększa wydajność translacji. Działając w tandemie, białka te odpowiadają za ścisłą regulację translacji określonych transkryptów. Podsumowując, m^6A jest modyfikacją o kluczowej roli w losach komórkowego mRNA, mającą swój bezpośredni bądź pośredni udział we wszystkich etapach życia transkryptu.

Podobnie do m^6A , m^1A jest bardzo niewielką modyfikacją w postaci grupy metylowej w pozycji 1 adenozyiny. Obecność m^1A prowadzi, jednakże, do bardzo poważnych zmian we właściwościach fizykochemicznych nukleotydu. Grupa metylowa całkowicie blokuje tworzenie się par Watsona-Cricka, za to wprowadza ładunek dodatni w obręb zasady. Dzięki temu możliwe stają się silne oddziaływania elektrostatyczne między podjednostką m^1A a kieszeniami wiążącymi białek, jak również tworzenie się alternatywnych struktur drugorzędowych RNA. Modyfikacja ta występuje przede wszystkim w strukturach rRNA i tRNA.¹¹⁵ Jest również obecna w mRNA, choć występuje w nim 10 razy rzadziej od m^6A .^{116,117} W mRNA modyfikacja m^1A spotykana jest przede wszystkim w strukturze 5' UTR, gdzie została powiązana z procesem inicjacji translacji i ze zwiększonym poziomem ekspresji genów. Najprawdopodobniej zaburzone parowanie zasad w strukturze 5' UTR zwiększa dostępność tego fragmentu mRNA dla maszyneryi translacyjnej.

m^5C jest stosunkowo słabo poznaną modyfikacją. W przeciwieństwie do m^1A , metylacja w pozycji 5 cytydyny w bardzo niewielkim stopniu wpływa na tworzenie par Watsona-Cricka, za to zwiększa hydrofobowość dużej bruzdy dupleksów RNA i promuje oddziaływania warstwowe zasad w sekwencji.¹¹⁸ m^5C występuje zarówno w kodujących, jak i niekodujących fragmentach mRNA, choć znaczące zagęszczenie tej modyfikacji obserwuje się w regionach 3' i 5' UTR.¹¹⁹ 5-hydroksymetylocytydina (hm^5C) jest produktem utleniania 5-metylocytydyny i dodatkowo zmienia zakres możliwości tworzenia się par zasad i oddziaływań elektrostatycznych cząsteczki mRNA.¹²⁰ hm^5C występuje najczęściej w transkryptach genów kodujących białka odpowiedzialne za podstawowe funkcje i rozwój komórek.

Pseudourydyna jest izomerem strukturalnym urydyny, zachowującym zdolność do tworzenia się par Watsona-Cricka. Jest to najwcześniej odkryta modyfikacja RNA. Pseudourydyna zmniejsza elastyczność jednoniciowego RNA, jak również poprawia termodynamiczne właściwości par zasad tworzących się w dwuniciowych RNA.¹²¹ Badania z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego wskazują na tworzenie się za pośrednictwem cząsteczki wody dodatkowego wiązania wodorowego między pozycją N1 pseudourydyny a łańcuchem fosforanowym RNA.¹²² To właśnie to oddziaływanie usztywnia strukturę RNA i najpewniej blokuje wiązanie kompleksów białkowych-snRNA odpowiedzialnych za splicing. Obecność dodatkowej grupy zdolnej do tworzenia wiązań wodorowych nie związanych z parowaniem zasad zwiększa również prawdopodobieństwo występowania specyficznych oddziaływań z białkami. Pseudourydyna stanowi zaledwie 0.2 – 0.6% wszystkich urydyn w mRNA,¹²³ jednakże istnieje korelacja między jej występowaniem a zwiększonym czasem trwania transkryptów.¹²⁴ Różne badania wykazały odmienny wpływ pseudourydyny na poziom ekspresji, co sugeruje, że stanowi ona element regulacyjny w strukturze mRNA, którego funkcja zależy od kontekstu otaczającej go sekwencji, roli samego transkryptu oraz mechanizmów translacji.¹²⁵ Obecność pseudourydyny w sekwencji kodonu stop niekiedy powoduje jego pominięcie przez maszynę translacyjną i może prowadzić do alternatywnego procesu syntezy białek.¹²⁶ Pseudourydyna jest powszechnie stosowaną modyfikacją mRNA syntezowanych *in vitro* przeznaczonych do celów terapeutycznych. Poza wspomnianą już kilkukrotnie podatnością syntetycznych mRNA na degradację przez mechanizmy komórkowe, mają one również duży potencjał wywoływania odpowiedzi immunologicznej podobnej do reakcji organizmu na RNA patogenów.¹²⁷ Zastąpienie urydyny pseudourydyną hamuje odpowiedź immunologiczną komórki, podczas gdy niemodyfikowane syntetyczne mRNA znacząco zwiększa poziom interferonu α (IFN- α).¹²⁴ Z tego względu przygotowane przez Pfizer-BioNTech i Moderna Therapeutics szczepionki przeciw SARS-CoV-2 zawierały tę właśnie modyfikację, która znacząco poprawiła potencjał terapeutyczny antywirusowych preparatów.¹²⁸

Wprowadzenie inozyny do sekwencji mRNA zachodzi poprzez podstawienie jej w miejsce adenozyiny przez enzym deaminazę oddziałującą z RNA (ADAR, ang. *adenosine deaminases acting on RNA*).¹²⁹ Główną rolą inozyny jest najpewniej tworzenie alternatywnych sekwencji mRNA i sekwencji aminokwasowych białek. Inozyna zmienia mechanizm tworzenia się par zasad, ponieważ wykazuje najsilniejsze powinowactwo do cytydyny.¹³⁰ Jest to nieco słabsze oddziaływanie niż A-U i poza zmianą sekwencji kodowanego białka, wpływa również na właściwości termodynamiczne transkryptu. Obecność inozyny może również prowadzić do alternatywnego splicingu poprzez wytwarzanie nowych miejsc cięcia dla spliceosomu. W ludzkim transkryptomie istnieje 100 milionów potencjalnych miejsc modyfikacji inozyną. W większości ulokowane są one w chętnie tworzących podwójne helisy RNA sekwencjach Alu, czyli kodowanych przez DNA fragmentach, które mogą ulegać relokowaniu w obrębie genomu w procesie transpozycji.¹³¹ Te mobilne elementy genetyczne zwane transpozonomi prowadzą zarówno do powstawania jak i usuwania mutacji, a nawet mogą kompletnie zmieniać krajobraz genetyczny komórek. Inozyna pełni również niezwykle istotną funkcję w rozróżnianiu komórkowego mRNA od RNA obcego, zwłaszcza wirusowego. Komórkowe mRNA zawierające podstawienie adenozyiny inozyną nie są w stanie utworzyć kompleksów z receptorem MDA5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*), którego rolą jest rozpoznawanie wirusowych dwuniciowych RNA.¹³² Aktywacja MDA5 prowadzi do cytozolicznej odpowiedzi immunologicznej i degradacji RNA rozpoznanego jako obce.

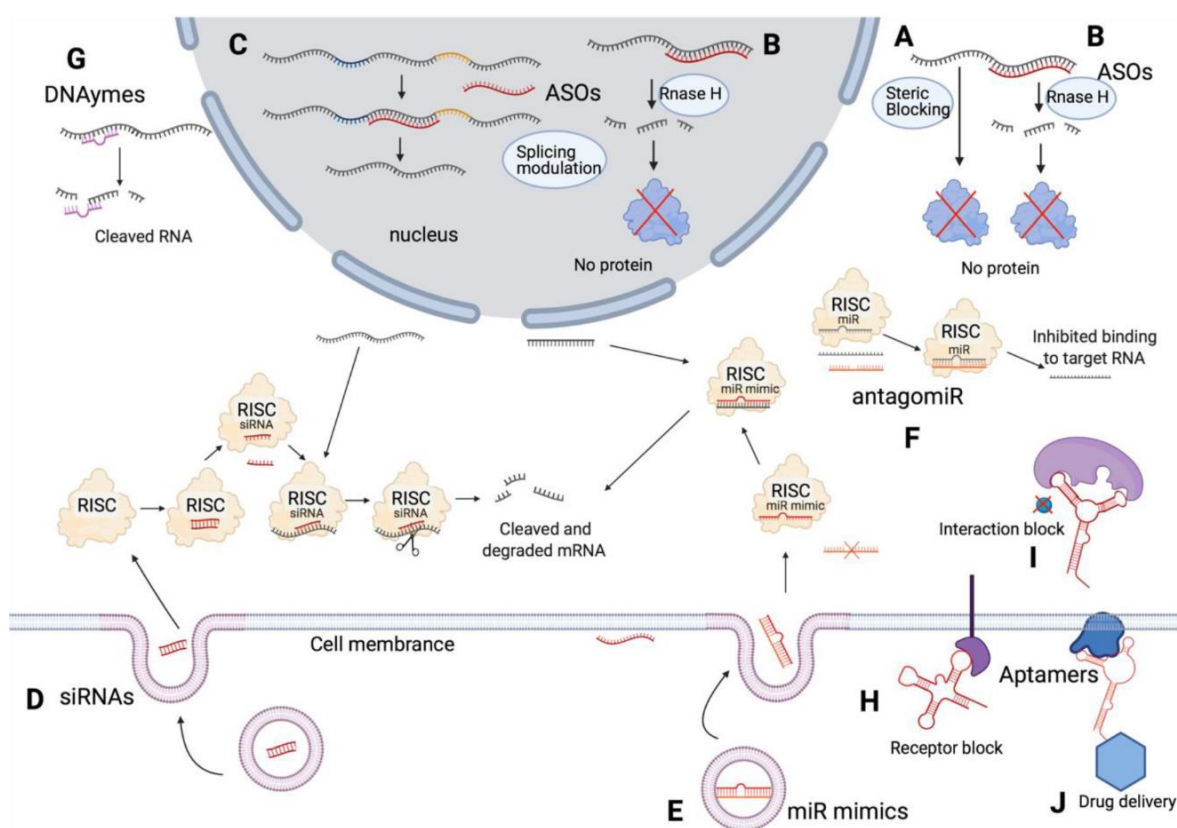
Na koniec należy również wspomnieć o modyfikacjach sekwencji mRNA wynikających z zastąpienia zasad innymi zasadami kanonicznymi. Jak już wspomniałam we wstępie do podrozdziału, zamiana zasady na inną nie jest typową modyfikacją biochemiczną mRNA, tym niemniej może nieść ze sobą poważne konsekwencje strukturalne i biologiczne. Przykładowo, urydyna może zostać wprowadzona do sekwencji mRNA poprzez posttranskrypcyjną deaminację cytydyny.¹³³ Prowadzi to do zmiany preferencji parowania zasad z guanozyny na adenozynę. Brak komplementarności zasad może prowadzić do destabilizacji potencjalnych dupleksów RNA i rozwijania struktury łańcucha do postaci jednoniciowej. Substytucja C do U promuje powstawanie nowych struktur drugorzędowych i tym samym wpływa między innymi na translację danego transkryptu.

W strukturze ogona poli(A) eukariotycznych mRNA częstą modyfikacją jest zastąpienie adenozyiny przez guanozynę. Poli(A) niektórych organizmów, w tym myszy, ryb i much, a nawet ponad 10% ludzkich mRNA, podzielone są na fragmenty przez wstawione w sekwencję ogona nukleotydy inne niż A, z preferencją do G.^{134,135} Guanozyna (lub inny nukleotyd niebędący adenozyną), dzieląc poli(A) na różnej długości sekwencje adenozynowe, wpływa na wydajność wiązania cząsteczek PABP, tym samym regulując poziom translacji mRNA. Przerywniki sekwencji poliadenylowej prowadzą również do zwiększenia stabilności poli(A) poprzez blokadę enzymów deadenylujących.¹³⁶

3. Zastosowanie oligonukleotydów w medycynie i opracowywaniu wyspecjalizowanych biosensorów

3.1. Oligonukleotydy o potencjale terapeutycznym

Oligonukleotydowe terapie stanowią nową klasę wyspecjalizowanych leków o wysokiej specyficzności działania. Są to krótkie fragmenty kwasów nukleinowych i zaliczamy do nich antysensowne oligonukleotydy (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*), małe interferujące RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*), mikroRNA (miRNA), aptamery oraz syntetyczne rybozomy i DNAzyny (Rys. 20).¹³⁷ Działanie większości terapeutycznych oligonukleotydów opiera się na tworzeniu par Watsona-Cricka z celem terapeutycznym, w celu wyciszenia konkretnego genu, stworzenia zawady sterycznej lub wymuszenia odmiennej formy splicingu. Wyjątkiem są aptamery, które rozpoznają swój cel molekularny nie na podstawie sekwencji, a jego struktury przestrzennej.¹³⁸



Rysunek 20 Schemat działania terapeutycznych oligonukleotydów. Antysensowne oligonukleotydy i (A) steryczna blokada translacji, (B) ukierunkowana degradacja RNAzą H, (C) modulacja splicingu; (D) siRNA wywołują degradację mRNA przez RISC (ang. RNA-induced silencing complex); syntetyczne analogi miRNA (E) prowadzą do degradacji mRNA przez RISC lub (F) blokują aktywność miRNA komórkowych; (G) DNAzyny specyficznie wiążą i rozcinają sekwencje RNA; aptamery (H) blokują receptory komórkowe, (I) blokują oddziaływanie między białkami, (J) pełnią rolę wektorów dla innych terapeutyków. Rysunek zapożyczono z pracy Xiong et al.¹³⁹

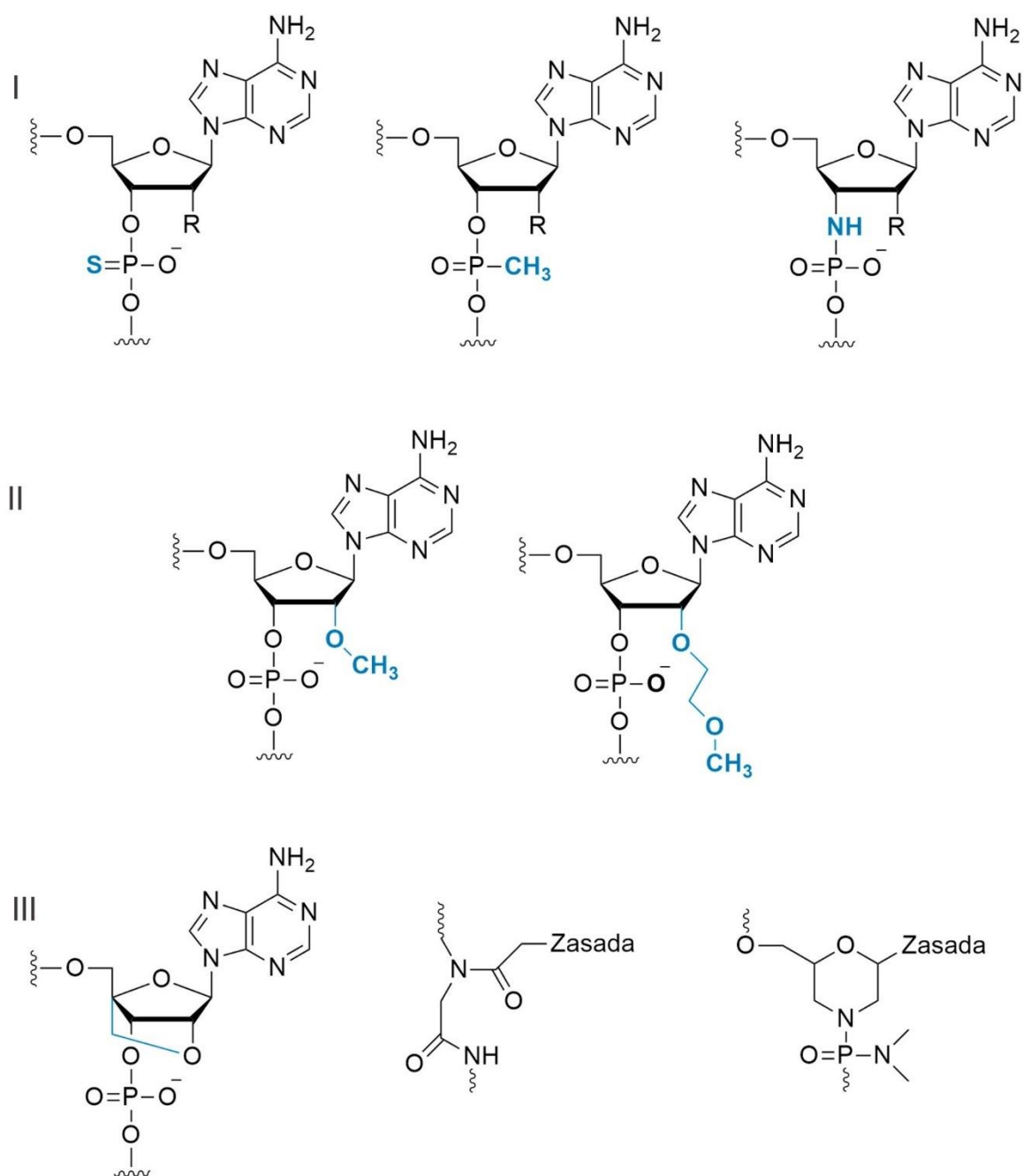
Ze względu na mechanizm działania i strukturę, terapeutyczne oligonukleotydy mogą być wykorzystane zarówno w leczeniu schorzeń powodowanych przez pojedyncze mutacje genowe, jak i w celu zwalczania infekcji patogenowych. Zadaniem tych pierwszych jest korekta danych mutacji z wykorzystaniem różnorodnych mechanizmów, na przykład poprzez blokadę translacji, degradację zależną od RNazy H, modulację splicingu, degradację zależną od siRNA oraz blokadę lub aktywację genów aptamerami.¹⁴⁰ Z kolei antywirusowe i antybakteryjne terapeutyczne oligonukleotydy mają na celu uniemożliwienie namnażania się i rozprzestrzeniania patogenu. Ze

względem na ogromną pulę możliwości w zakresie mechanizmu działania, oligonukleotydowe terapie mogą wiązać się z dowolną sekwencją DNA lub RNA patogenu. Najczęściej celem takiej terapii jest inhibicja translacji, np. poprzez wiązanie konkretnych sekwencji genowych lub oddziaływanie z rybosomalnym RNA w celu kompletnej blokady procesu syntezy białek.¹⁴¹ Zastosowanie oligonukleotydów w medycynie ma potencjał zrewolucjonizowania wielu terapii, zwłaszcza antynowotworowych. Konwencjonalne metody terapeutyczne najczęściej skupiają się na oddziaływaniu leków z białkami o zaburzonej aktywności, co wymaga wielu lat badań i dogłębnej znajomości struktury i charakterystyki danego białka, a niekiedy znalezienie odpowiedniej cząsteczki terapeutycznej okazuje się być niemożliwe. Wiele wciąż stosowanych terapii antynowotworowych niesie ze sobą liczne skutki uboczne, ze względu na niską specyficzność leków. Z kolei projektowanie i otrzymywanie oligonukleotydowych leków oddziałujących z konkretną sekwencją wybranego kwasu nukleinowego jest procesem dużo mniej czasochłonnym i wymagającym syntetycznie.¹⁴² Inherentna specyficzność działania terapeutyków oligonukleotydowych znacznie redukuje skalę potencjalnych efektów ubocznych. Dodatkowo ich mechanizm działania hamuje rozwój choroby już na poziomie genowym i niweluje problem lekooporności u pacjentów.

Oligonukleotydy w swojej podstawowej formie są niezwykle podatne na działanie endo- i egzonukleaz, szczególnie aktywnych w krwioobiegu. Dodatkowo obecność grup fosforanowych praktycznie uniemożliwia przenikanie tych cząsteczek przez błony komórkowe, a szczególnie problem stanowią ściany komórkowe bakterii. Głównym sposobem wnikania oligonukleotydów do komórek jest endocytoza.¹⁴³ Jednakże może ona prowadzić do kumulacji terapeutyku w późnych endosomach i lizosomach, co sprawia, że tylko niewielka część cząsteczek oligonukleotydu ma możliwość dotarcia do swojego celu terapeutycznego. Obok modyfikacji zwiększających stabilność oligonukleotydów, stosuje się obecnie liczne metody ułatwiające skuteczne przenikanie tych cząsteczek przez błony endosomalne, w tym modyfikacje chemiczne, koniugaty z cząsteczkami transportującymi lub nanonośniki. Zastosowanie koniugatów oligonukleotydów z cholesterolem, peptydami i cukrami zwiększa ich przenikalność przez błony komórkowe, a zastosowanie polimerów kationowych lub glikoli polietylenowych dodatkowo zmniejsza ich podatność na aktywność nukleaz.¹⁴⁴

3.1.1. Terapeutyczne antysensowne oligonukleotydy

Antysensowne oligonukleotydy (ASO) stoją u podstawy medycyny spersonalizowanej, zwanej również terapią celowaną. ASO są to krótkie, liczące 10 do 25 nukleotydów, fragmenty kwasów nukleinowych (DNA lub RNA), których sekwencje są komplementarne do sekwencji konkretnych celów terapeutycznych. Jednakże o skuteczności ASO nie stanowi tylko ich wysoka specyficzność – struktura oligonukleotydów jest odpowiednio zmodyfikowana, tak by zapewnić im stabilność w cytoplazmie i jądrze komórkowym, ułatwić transport przez błony komórkowe, jak również umożliwić konkretny mechanizm działania w komórkach. ASO działają na dwa główne sposoby – poprzez rekrutację RNazy H, która rozcina łańcuch RNA w duplesie DNA-RNA, lub poprzez blokadę steryczną konkretnej sekwencji celu terapeutycznego. ASO po raz pierwszy zostały użyte do celów terapeutycznych pod koniec lat 70-tych, w celu inhibicji translacji wirusa mięsaka Rousa przez 13-nukleotydowy fragment DNA komplementarny do rybosomalnego RNA owego wirusa.¹⁴⁵ Od tego czasu powstały trzy generacje ASO, każda charakteryzująca się wykorzystaniem konkretnych modyfikacji nukleotydowych mających na celu zwiększenie skuteczności terapeutyków (Rys. 21).



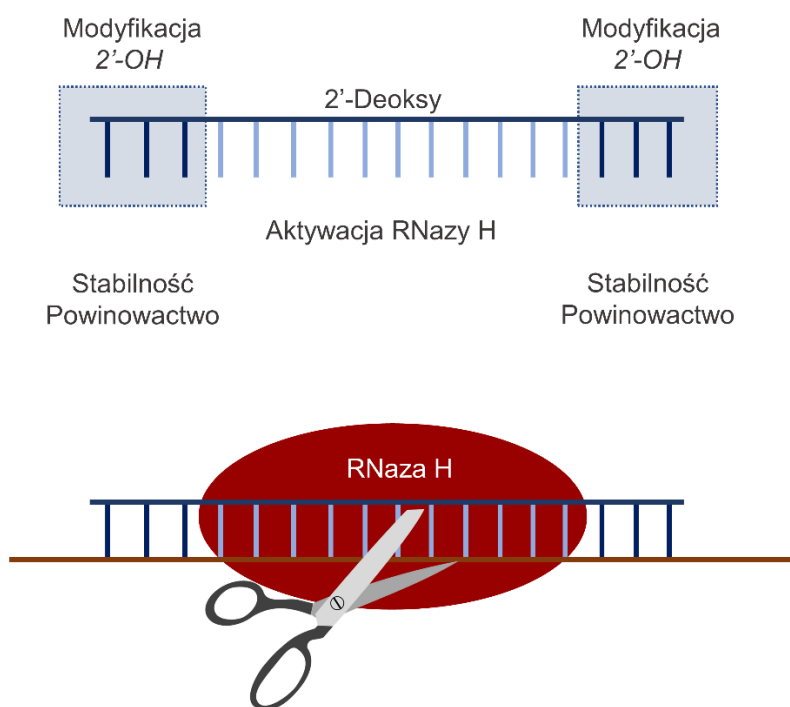
Rysunek 21 Nukleotydowe modyfikacje antysensownych oligonukleotydów pierwszej (I), drugiej (II) i trzeciej (III) generacji.

ASO pierwszej generacji zawierały modyfikacje fosforanowe. Jeden z atomów tlenu grupy fosforanowej zastąpiony jest atomem siarki (tiofosforany), grupą metylową (metylofosfoniany) lub aminową (amidofosforyny). Każda z chemicznych modyfikacji zmieniała właściwości ASO na szczególny sposób, przy czym tiofosforany zdecydowanie dominowały w terapiach pierwszej generacji. Po pierwsze, modyfikacja ta znacząco zmniejsza podatność ASO na działanie nukleaz.¹⁴⁶ Po drugie, podczas gdy grupy fosforanowe utrudniają przenikanie oligonukleotydów przez błony komórkowe, tiofosforany zwiększają powinowactwo ASO zarówno do białek osocza, tym samym wydłużając ich życie w krwioobiegu, jak również do białek ułożonych na powierzchni błon komórkowych.¹⁴⁷ Tiofosforanowe ASO wnikają do komórek poprzez różne formy endocytozy, jak choćby za pośrednictwem receptorów powierzchniowych lub przez pinocytozę.¹⁴⁸ Należy jednakże zaznaczyć, że obecność modyfikacji tiofosforanowej

zmniejsza powinowactwo ASO do cząsteczki mRNA, a nagromadzenie tych cząsteczek w krwioobiegu może być toksyczne w wysokich stężeniach.¹⁴⁹

Metylofosfoniany ASO wykazują większą odporność na działanie nukleaz, przy czym ze względu na zmniejszoną wypadkową wartość ładunku modyfikowanych podjednostek, znacznie słabiej oddziałują z białkami osocza i nieskutecznie wnikają do komórek. Z kolei amidofosforany ASO wykazują zwiększone powinowactwo do sekwencji celów terapeutycznych, jak również są wysoce odporne na degradację przez nukleazy. Jednakże ich wnikanie do komórek jest nieefektywne. Co więcej, związki te łatwo ulegają degradacji w środowisku kwaśnym, co wyklucza ich stosowanie w terapiach antynowotworowych. Ostatecznie więc zalety modyfikacji tiofosforanowej zadecydowały o jej popularności w pierwszych latach rozwoju ASO. Dodatkowo jako jedyna z dotychczas wymienionych, modyfikacja ta aktywuje RNazę H i umożliwia degradację wybranej sekwencji mRNA, ograniczając tym samym syntezę wybranego białka.¹⁵⁰

Druga generacja ASO wprowadziła alkilowe modyfikacje rybozy w pozycji 2'. Modyfikacje grupy 2'-OH grupą metylową (2'-OMe) lub metoksyetylową (2'-MOE) są mniej toksyczne od modyfikacji tiofosforanowej. Przy czym wprowadzenie tych modyfikacji na całej długości łańcucha oligonukleotydu uniemożliwia rekrutację RNazy H i w efekcie metoda ta stosowana jest przede wszystkim w przypadku terapii, których celem nie jest degradacja docelowego RNA. Tego typu ASO stosowane są zatem jako blokery steryczne lub niekiedy modulatory splicingu.¹⁵¹ Wspomniane modyfikacje rybozy mogą zostać również wykorzystane w syntezie tzw. gapmerów ASO.¹⁵² Są to oligonukleotydowe fragmenty DNA, oflankowane sekwencjami o strukturze przypominającej RNA (Rys. 22). Środkowy fragment gapmeru zawiera promujące degradację przez RNazę H modyfikacje tiofosforanowe, podczas gdy końce 3' i 5' ASO zawierają modyfikacje grupy 2'-OH zwiększające ich stabilność i powinowactwo do docelowej sekwencji RNA.



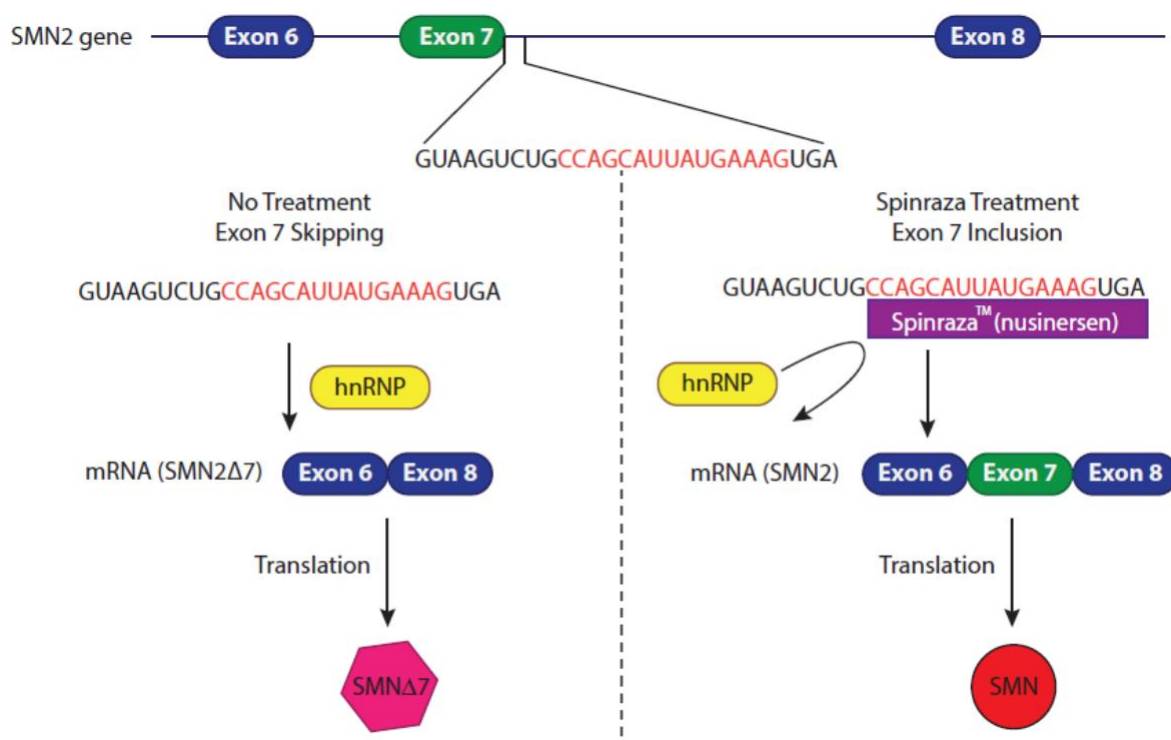
Rysunek 22 Schemat struktury i aktywności gapmeru ASO

ASO trzeciej generacji stanowią najbardziej różnorodną grupę, ze względu na liczne chemiczne modyfikacje nukleotydowe podnoszące zarówno powinowactwo terapeutyków do celów terapeutycznych, jak i odporność na degradację przez nukleazy. Pierwszym reprezentantem tej generacji jest modyfikacja LNA (ang. *locked nucleic acid*). Posiadające ją nukleotydy charakteryzuje usztywniona struktura pierścienia rybozy poprzez połączenie tlenu w pozycji 2' z węglem w pozycji 4' mostkiem metylenowym.¹⁵³ LNA znacząco zwiększa temperaturę topnienia ASO i tym samym ich ogólną stabilność termodynamiczną. Podobnie jak w przypadku modyfikacji drugiej generacji, pełna modyfikacja łańcucha ASO przy pomocy LNA uniemożliwia aktywację RNazy H. Tym samym powstały nowego rodzaju gapmery ASO, tym razem zawierające modyfikację LNA we flankujących sekwencjach DNA fragmentach RNA oligonukleotydów. Jest to korzystna strategia również ze względu na wysoką toksyczność ASO zawierających liczne modyfikacje LNA, podczas gdy zastosowanie struktury gapmeru tę toksyczność znacząco obniża.¹⁵⁴ Zastosowanie mostków metoksylowych i etylenowych do blokady struktury rybozy dodatkowo zmniejsza toksyczność ASO zawierających modyfikacje tego typu. Do kolejnych powszechnie stosowanych modyfikacji trzeciej generacji należą morfolinowe oligomery amidofosforanowe (PMO, ang. *phosphorodiamidate morpholino*oligomers) oraz peptydowe kwasy nukleinowe (PNA, ang. *peptide nucleic acids*). Ryboza w strukturze PMO zastąpiona jest pierścieniem morfolinowym, podczas gdy PNA zamiast 5'-fosforanu deoksyrybozy zawierają strukturę pseudopeptydową.¹⁵⁵ Tak ekstensywne modyfikacje struktury rybozy stosowane w ASO trzeciej generacji sprawiają, że są one praktycznie nierozpoznawalne dla nukleaz, są więc stabilne zarówno termodynamicznie jak i enzymatycznie. Ponieważ PMO i PNA nie posiadają ładunku wypadkowego, ich wiązanie do białek osocza jest znacznie osłabione i tym samym łatwo ulegają wydaleniu drogami moczowymi. Mimo to, wysokie powinowactwo do sekwencji DNA i RNA sprawia, że ASO trzeciej generacji mają wysoki potencjał zarówno terapeutyczny, jako blokery translacji i metabolizmu mRNA, jak i w opracowywaniu sond molekularnych pozwalających na śledzenie procesów komórkowych. Ponieważ modyfikacje wprowadzone w drugiej i trzeciej generacji ASO nie umożliwiają transportu cząsteczek oligonukleotydów do komórek, jak również nie aktywują RNazy H w celu degradacji docelowej sekwencji RNA, stosowane są one przede wszystkim w syntezie gapmerów ASO. Należy również wspomnieć, że obecnie nie stosuje się także samej modyfikacji tiofosforanowej w opracowywaniu struktury nowych ASO – służy ona przede wszystkim do tworzenia centralnej sekwencji DNA gapmerów, a w innych przypadkach występuje ona w połączeniu z modyfikacją 2'-OMe.

Wielokrotnie wspomniałam już o głównych mechanizmach działania antysensownych nukleotydów o potencjale terapeutycznym. Na koniec obecnego podrozdziału chciałabym na przykładzie opisanych w literaturze naukowej i niekiedy dopuszczonych do użytku ASO omówić przykłady zastosowania tych mechanizmów do wywołania konkretnych efektów terapeutycznych.

Pierwszy ASO dopuszczony do celów terapeutycznych, fomivirsen, powstał dzięki odkryciu na początku lat 90. ubiegłego wieku naturalnego mechanizmu regulacji poziomu translacji mRNA w komórkach przez cząsteczki mikroRNA (miRNA).¹⁵⁶ miRNA wiążą komplementarnie konkretne sekwencje zawarte w mRNA, tym samym posttranskrypcyjnie regulując poziom ekspresji genów w komórkach. Fomivirsen jest tiofosforanowym oligodeoksyrybonukleotydem.¹⁵⁷ Jest również jedynym ASO pierwszej generacji dopuszczonym do sprzedaży. Przeznaczony jest do leczenia cytomegalowirusowego zapalenia siatkówki, które jest szczególnie groźne dla osób o znacznie obniżonej odporności, w szczególności osób cierpiących na AIDS. Fomivirsen wiąże specyficznie sekwencję wirusowego RNA kodującego białko IE-2, niezbędnego dla replikacji wirusa. Tym samym hamuje namnażanie się wirusa w organizmie gospodarza i dalszy rozwój choroby.

ASO mogą również służyć jako modulatory procesu splicingu. Jak już wspomniałam w podrozdziale poświęconym dojrzewaniu mRNA w komórkach eukariotycznych, splicing polega na usuwaniu sekwencji intronów i łączeniu sekwencji eksonów pre-mRNA w celu stworzenia cząsteczki mRNA kodującej białko o konkretnej funkcjonalności. Zaburzenie procesu splicingu może prowadzić do produkcji nieprawidłowych białek i tym samym nieść bardzo poważne konsekwencje zdrowotne. W badaniach z roku 1993 udowodniono, że ASO drugiej generacji, zawierający modyfikację 2'-OMe i wiążący strukturę pre-mRNA kodującego β -globinę, może zapobiec niepoprawnemu splicingowi prowadzącemu do powstania defektywnego białka i rozwoju talasemii.¹⁵⁸ Na podstawie tych badań opracowano dopuszczony do użytku lek hamujący rozwój choroby SMA (ang. *spinal muscular atrophy*). Jest to uwarunkowane genetycznie schorzenie objawiające się postępującą w czasie degeneracją mięśni szkieletowych. Wywołane jest mutacją genu *SMN1* hamującą produkcję białka SMN (ang. *survival of motor neuron*).¹⁵⁹ Białko to kodowane jest również przez gen *SMN2*, którego naturalny splicing i ekspresja prowadzą jednakże do powstania skróconej i niestabilnej wersji białka, które szybko ulega degradacji w komórkach. Nusinersen (znany również jako Spinraza), lek dopuszczony do użytku w roku 2016, blokuje usuwanie eksonu 7 z sekwencji pre-mRNA *SMN2* i tym samym prowadzi do powstania pełnej i stabilnej cząsteczki białka SMN.¹⁶⁰ Nusinersen jest to 18-merowy ASO drugiej generacji, zawierający modyfikacje tiofosforanowe i 2'-O-metoksyłowe, nie wywołujący aktywności RNazy H.



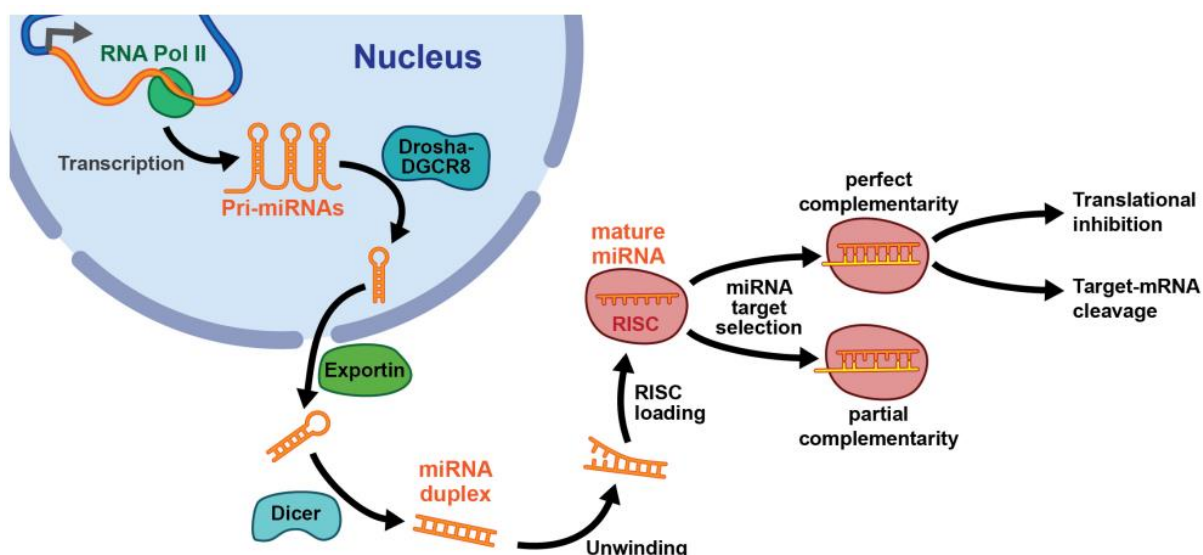
Rysunek 23 Schematyczne przedstawienie splicingu pre-mRNA *SMN2* prowadzącego do powstania skróconej wersji białka SMNΔ7 oraz działania leku nusinersen poprzez regulację splicingu i uniemożliwienie usunięcia eksonu 7, co prowadzi do powstania aktywnej formy SMN. Rysunek zapożyczono z pracy Bajan et al.¹⁶¹

miRNA regulują poziom translacji wybranych mRNA poprzez rekrutację kompleksu rybonukleoprotein RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). miRNA nakierowuje RISC na właściwą sekwencję mRNA, która ulega następnie rozcięciu przez jedną z katalitycznych podjednostek kompleksu – białko Argonaute.¹⁶² Nadekspresja miRNA, występująca na przykład w komórkach nowotworowych, może prowadzić do niekontrolowanej degradacji mRNA, zaburzając tym samym właściwą ekspresję genów. Leczenie przy pomocy ASO chorób związanych z

aktywnością miRNA może przebiegać dwojako. Z jednej strony, ASO może wiązać sekwencję mRNA będącą celem molekularnym danego miRNA, tym samym blokując do niej dostęp i uniemożliwiając jej rozcięcie przez RISC. Jest to strategia zaproponowana w pracy Messina et al.¹⁶³, gdzie zaprezentowano ASO trzeciej generacji zawierające modyfikowane nukleotydy LNA, które maskują dostęp do mRNA kodującego gonadotropiny przysadkowe, co prowadzi do zwiększenia poziomu owych hormonów w komórkach. Inna strategia terapeutyczna zakłada wykorzystanie ASO jako inhibitorów miRNA – ASO posiadające sekwencję identyczną z sekwencją rozpoznawanego przez miRNA mRNA, całkowicie blokują ich aktywność w komórkach poprzez specyficzne wiązanie. Przykładowo, lek miravirsen jest inhibitorem miR-122, miRNA niezbędnego dla replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C.^{164,165} Miravirsen, ASO trzeciej generacji z modyfikacją LNA, jest idealnie komplementarny zarówno do miR-122 jak i jego prekursora, tym samym blokuje nie tylko aktywność dojrzałej cząsteczki miRNA, ale również jego biosyntezę komórkową. Miravirsen jest lekiem eksperymentalnym, obecnie nie dopuszczonym jeszcze do powszechnego użytku. W roku 2017 został skierowany do drugiego etapu badań klinicznych.

3.1.2. mikroRNA o potencjale terapeutycznym

O mechanizmie działania i regulacyjnej roli miRNA wspomniałam już w poprzednim podrozdziale. Dotychczas miRNA omówione zostały w kontekście regulacji ich aktywności komórkowej przez antysensowne oligonukleotydy, przy czym syntetyczne analogi miRNA również posiadają wysoki potencjał terapeutyczny. miRNA są to krótkie, niekodujące, jednoniciowe fragmenty RNA o długości ~18-25 nukleotydów. Ich sekwencje są komplementarne do jednej lub kilku sekwencji zawartych w strukturze mRNA, najczęściej w pobliżu regionu 3' UTR. Podobnie do mRNA, miRNA syntezowane są w jądrze komórkowym, z którego transportowane są do cytoplazmy w niedojrzałej postaci pre-miRNA.¹⁶⁶ W cytoplazmie ulegają przycięciu do swojej dwuniciowej formy przez białko Dicer, wchodzące w skład kompleksu RISC. Wewnątrz kompleksu jedna z nici miRNA służy następnie za element nakierowujący RISC na fragment mRNA mający ulec degradacji lub sterycznej inhibicji uniemożliwiającej wiązanie rybosomu (Rys. 24).



Rysunek 24 Schemat biosyntezy, dojrzewania oraz aktywności miRNA w kompleksie z RISC. Rysunek zapożyczono z pracy Haddad et al.¹⁶⁸

Degradacja lub inhibicja mRNA kodującego dane białko są to jedne z komórkowych mechanizmów wyciszania ekspresji genów.¹⁶⁷ miRNA, wraz z cząsteczkami siRNA, stanowią

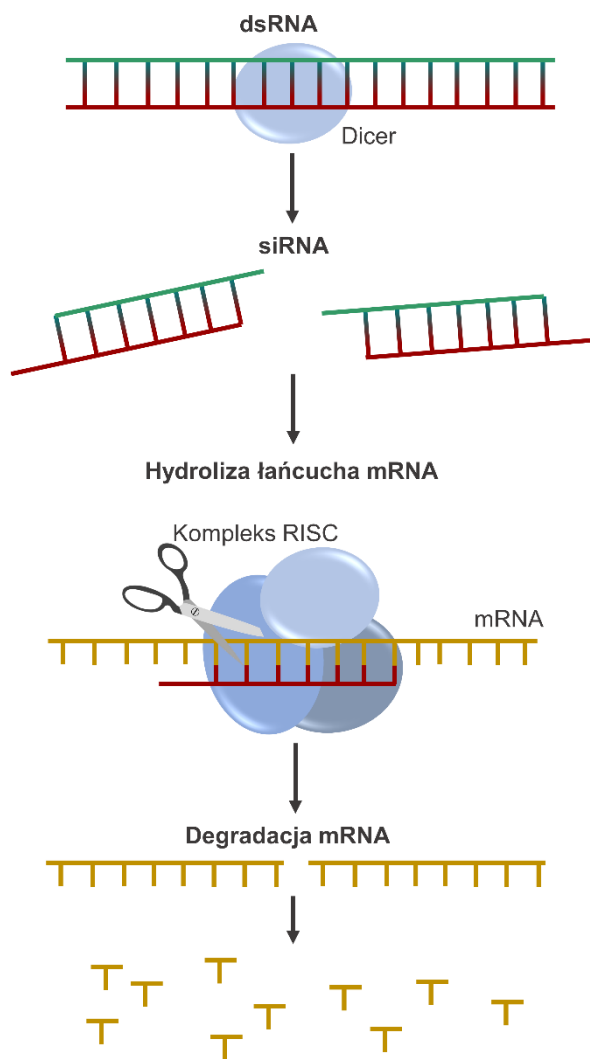
czynnik pośredniczący w procesie zwanym interferencją RNA, czyli wyciszaniu genów z poziomu transkryptu. W przeciwieństwie do siRNA, wiązanie miRNA z docelową sekwencją mRNA nie jest zawsze w pełni komplementarne, co w kontekście zastosowania terapeutycznego może prowadzić do toksyczności spowodowanej niespecyficznym oddziaływaniem.

Deregulacja poziomu miRNA w komórkach związana jest z licznymi schorzeniami, w tym chorobami układu immunologicznego, chorobą Alzheimera, chorobami układu krążenia i nowotworami.¹⁶⁹ Wykryto również zależność pomiędzy zaburzoną aktywnością miRNA a regulacją biosyntezy białek biorących udział w szlaku sygnałowym insuliny. Deregulacja aktywności poszczególnych miRNA stanowi więc marker wielu powszechnie występujących chorób. Z tego względu, w badaniach podstawowych i przemyśle farmaceutycznym miRNA zaczęto rozważać w pierwszej kolejności w kontekście opracowywania wyspecjalizowanych narzędzi diagnostycznych. Jednakże na chwilę obecną istnieje również szereg firm farmaceutycznych pracujących nad lekami opartymi na strukturze miRNA. Rozważane są dwa podejścia – zastosowanie terapii zastępczych z wykorzystaniem syntetycznych analogów miRNA w przypadku ich niedostatecznej biosyntezy w komórkach lub wykorzystanie inhibitorów miRNA w celu obniżenia ich aktywności komórkowej w sytuacji ich nadekspresji lub udziału w rozwoju choroby. Wspomniany już lek miravirsen zaliczany jest do tej drugiej kategorii. W opracowywaniu terapeutyków miRNA napotyka się na analogiczne wyzwania, co w przypadku ASO. Z tego też względu stosowane metody modyfikacji nukleotydowych mających na celu zwiększanie stabilności syntetycznych miRNA, jak również ich przenikalności do wnętrza komórek i powinowactwa do celów terapeutycznych, są zasadniczo identyczne co w przypadku ASO i nie będą ponownie omawiane w tym podrozdziale.

Na chwilę obecną, największa liczba badań nad terapeutykami miRNA dotyczy terapii antynowotworowych. Szereg potencjalnych leków opartych na strukturze miRNA znajduje się na etapie badań klinicznych. Przykładowo, badana jest grupa inhibitorów oddziałujących na miRNA-155 związany ze specjalizacją i proliferacją komórek układu limfatycznego.¹⁷⁰ Celem jest otrzymanie leków na różnego typu chłoniaki i białaczki. Opracowywany przez firmę ENGeneIC mesomir naśladuje strukturę miRNA-16, supresora nowotworowego, którego poziom ekspresji ulega obniżeniu w przypadku niektórych nowotworów.¹⁷¹ Z kolei MRX34, analog innego supresora nowotworowego – miRNA-34,¹⁷² wycofany został z badań klinicznych po pierwszym etapie ze względu na liczne skutki uboczne związane z zaburzeniami działania układu odpornościowego.

3.1.3. siRNA o potencjale terapeutycznym

siRNA mają strukturę dwuniciowego, niekodującego RNA. Nici podwójnej helisy siRNA są komplementarne w większej części sekwencji, przy czym na obu końcach 3' znajdują się po dwa niesparowane nukleotydy.¹⁷³ siRNA znajdujące się w cytoplazmie jest inkorporowane do struktury kompleksu RISC. Nici siRNA ulegają rozdzieleniu wewnątrz kompleksu i następnie nici posiadająca stabilniejszy koniec 5' pośredniczy w wyszukiwaniu i rozcinaniu komplementarnej



Rysunek 25 Schemat dojrzewania i aktywności siRNA w kompleksie z RISC

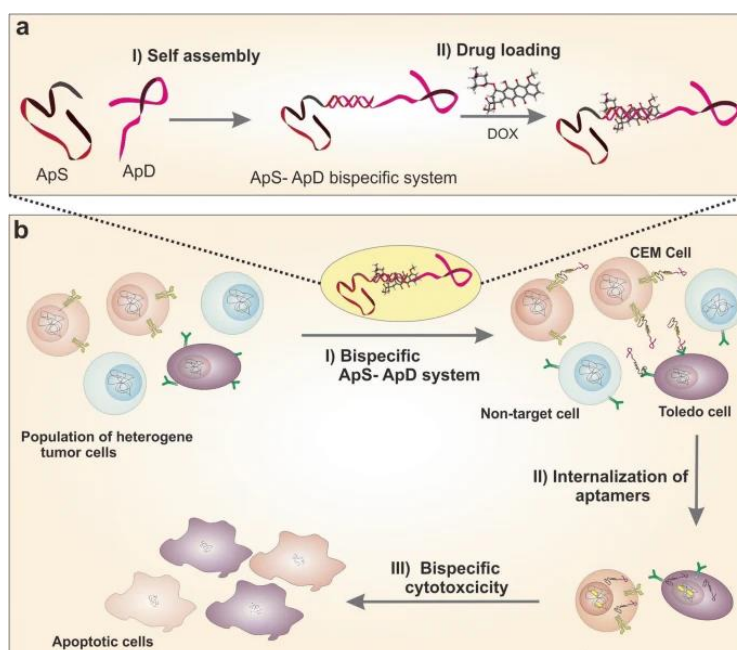
sekwencji mRNA (Rys. 25). Podobnie jak w przypadku innych terapeutycznych oligonukleotydów, największym wyzwaniem w zastosowaniu siRNA w medycynie jest opracowanie metod ich efektywnego i bezpiecznego dostarczania do komórek pacjenta. Same cząsteczki z definicji wykazują bardzo wysoką specyficzność i powinowactwo do celu terapeutycznego, niekiedy na poziomie pikomolowym.¹⁴² W przeciwieństwie do miRNA, którego struktura spinki do włosów obniża jego specyficzność działania, siRNA są idealnie komplementarne do docelowych sekwencji RNA. Większość terapeutyków siRNA została stworzona z myślą o nowelizacji terapii antynowotworowych. Przykładowo, opracowywany przez firmę Alnylam Pharmaceuticals lek ALN VSP znajduje się obecnie na pierwszym etapie badań klinicznych nad leczeniem nowotworów wątroby.¹⁷⁴ Lek ten składa się z dwóch różnych fragmentów siRNA zamkniętych w nanocząsteczce o średnicy ~80-100 nm. Nici siRNA posiadają różne modyfikacje nukleotydowe i mają na celu oddziaływać z dwoma onkogenami - czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF-A, ang. *vascular endothelial growth factor A*) oraz białka kinezy, których nadekspresja jest charakterystyczna dla wielu typów

nowotworów. Pierwszym terapeutycznym siRNA dopuszczonym na rynek przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) w 2018 roku jest patisiran, opracowany przez firmę Alnylam.¹⁷⁵ Jest to również pierwszy lek spowalniający rozwój polineuropatii spowodowanej rzadką dziedziczną chorobą genetyczną – amyloidozą transtyretynową. Ta sama firma opracowała również givosiran – dopuszczony w roku 2019 na rynek lek w terapii ostrej porfirie wątrobowej.¹⁷⁶ Jest to kolejna rzadka choroba genetyczna, spowodowana brakiem enzymów niezbędnych w syntezie hemu i akumulacją toksycznego metabolitu – porfobilinogenu. Givosiran inhibuje aktywność enzymu ALAS1 (ang. *delta-aminolevulinate synthase 1*) działającego na wczesnym etapie produkcji hemu, tym samym zapobiegając rozpoczęciu cyklu syntetycznego i uniemożliwiając powstawanie groźnych metabolitów.

3.1.4. Aptamery

Aptamery są to syntetyczne jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA rozpoznające swoje cele molekularne na podstawie ich struktury przestrzennej. Pełnią one funkcje analogiczne do naturalnie występujących przeciwciał, wykazując wysoką specyficzność działania. Projektowanie i synteza aptamerów odbywa się dzięki selekcji ich struktury z wykorzystaniem metody SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). W kontekście medycznym mogą pełnić one różnorakie funkcje - od nośników innych cząsteczek o potencjale terapeutycznym, przez inhibicję oddziaływań biomolekuł, po działanie jako agoniści receptorów szlaków sygnałowych i antagoniści punktów kontroli układu odpornościowego.^{177,178} Aptamery mają potencjał specyficznego wiązania najróżniejszych celów molekularnych w postaci tkanek, wirusów, bakterii, toksyn i komórek nowotworowych. Dzięki temu mogą być wykorzystane zarówno jako cząsteczki terapeutyczne, jak i biosensory i elementy narzędzi diagnostycznych oraz nośniki innych biomolekuł (Rys. 26).

Przykład aptameru jako nośnika cząsteczki terapeutycznej zaprezentowany został w roku 2018 w pracy Srivithya et al.¹⁷⁹ Koniugat aptameru MUC1 i nanopierścienia DNA interkalowanego doksorubicyną zaproponowano jako potencjalny lek na raka piersi. Koniugat z wysoką selektywnością wnika do komórek nowotworowych, przy minimalnych skutkach ubocznych. Z kolei aptamer zaprezentowany w pracy z 2020 roku autorstwa Tan et al. przysłużył się do rozwoju nowej metody specyficznego dostarczania nanocząsteczek MgO jako leku na insulinooporność w cukrzycy typu 2.¹⁸⁰



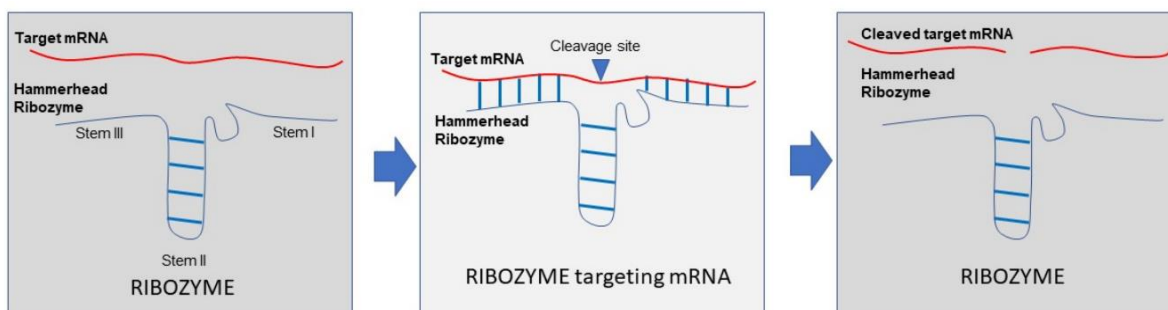
Rysunek 26 Schemat działania nośnika aptamerowego o podwójnej specyficzności. Cząsteczki aptamerów Sgs8c oraz Sgd5a ulegają samorzutnemu zwinieniu z utworzeniem koniugatu na drodze hybrydyzacji komplementarnych sekwencji. Cząsteczka doksorubicyny interkaluje dwuniciowy fragment koniugatu i może zostać specyficznym dostarczona do rozpoznawanych przez aptamery komórek nowotworowych. Rysunek zapożyczony z pracy Vandghanooni et al. na podstawie licencji nr 5425410508839.¹⁸¹

Terapeutyczne aptamery znajdujące się obecnie w trakcie badań klinicznych pełnią najczęściej funkcje inhibitorów lub antagonistów białek, receptorów i innych biomolekuł związanych z rozwojem chorób. Przykładowo, opublikowane w 2020 roku narzędzie terapeutyczne inhibuje aktywność miRNA-214 odpowiedzialnego za metastazę nowotworów piersi i czerniaka, równocześnie stymulując nadekspresję hamującego metastazę miRNA-148b.¹⁸² Z kolei aptamer

HA28 znalazł zastosowanie w leku umożliwiającym skuteczną rekonwalescencję po zawale mięśnia sercowego. HA28 inhibuje aktywność proteazy odpowiedzialnej za wydzielanie angiotensyny II komórek sercowo-naczyniowych, znacząco poprawiając przeżywalność myszy poddanych terapii.¹⁸³ Szereg aptamerów terapeutycznych badanych jest pod kątem leczenia zakrzepicy i innych chorób związanych z krzepnieniem krwi.^{184,185} Znajdujący się obecnie w 2. i 3. fazie badań klinicznych aptamer Fovista¹⁸⁶ oddziałuje z płytkopochodnym czynnikiem wzrostu (PDGF, ang. *Platelet-derived growth factor*), mitogenem związanym z angiogenezą siatkówki oka, zapobiegając rozwojowi choroby zapalenia błony naczyniowej oczu.

3.1.5. Rybozomy, deoksyrybozomy i ich zastosowania terapeutyczne

Rybozomy są to krótkie cząsteczki RNA o właściwościach katalitycznych analogicznych do białek enzymatycznych. Ich aktywność polega na równoczesnym specyficznym rozpoznaniu celu molekularnego w postaci komplementarnej sekwencji RNA oraz rozcięciu i/lub ligacji nici RNA w celu regulacji ekspresji genów, jak również zahamowania transkrypcji RNA obcego pochodzenia.¹⁸⁷ Rybozomy posiadają dwie domeny funkcjonalne, z których jedna odpowiada za komplementarne wiązanie docelowej sekwencji RNA, a druga jest domeną katalityczną o wysoce konserwowanej ewolucyjnie strukturze (Rys. 27).¹⁸⁸ Istnieje wiele odmian naturalnie występujących rybozymów, przy czym te o strukturach spinki do włosów oraz hammerhead zostały najlepiej przebadane i stanowią podstawę do opracowywania syntetycznych rybozymów o właściwościach terapeutycznych.^{189,190} Obie odmiany rybozymów posiadają zarówno aktywność hydrolityczną jak i przeprowadzają reakcje ligacji fragmentów RNA. Nie wymagają obecności kofaktorów w postaci jonów metali. Kluczowa jest również ich zdolność do samomodyfikacji i rearanżacji własnej struktury, co w naturze znajduje zastosowanie w procesie replikacji typu toczonego się koła.

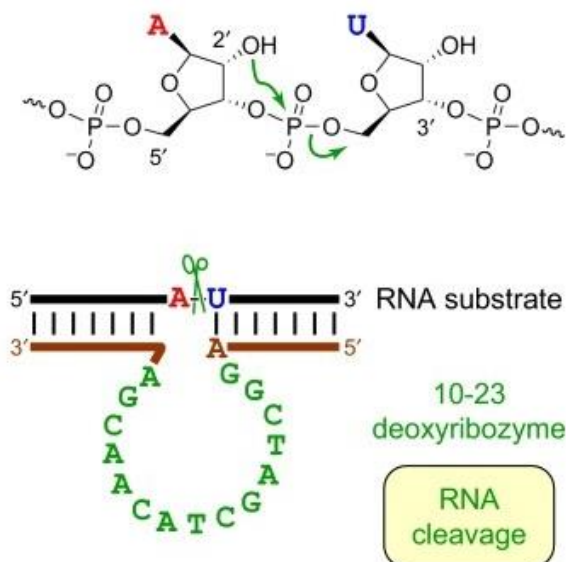


Rysunek 27 Schematyczne przedstawienie aktywności hydrolitycznej rybozymu typu hammerhead. Rysunek zapożyczony z pracy Garbo et al.¹⁹⁰

Pierwszym syntetycznym rybozymem o potencjale terapeutycznym, nad którym rozpoczęto badania kliniczne jest Angiozyme (RPI.4610).¹⁹¹ Stworzony został z myślą o leczeniu raka nerek poprzez specyficzne wiązanie i rozcinanie mRNA receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR1, ang. *vascular endothelial growth factor receptor-1*) i tym samym zahamowanie angiogenezy i rozwoju guza nowotworowego. Rybozomy mogą również znaleźć zastosowanie w zwalczaniu chorób powodowanych przez wirusy RNA. Przykładowo Heptazyme, lek przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C, hydrolizuje specyficznie region 5' UTR genomu wirusa.¹⁹²

Podobnie do aptamerów, deoksyrybozomy (DNAzomy) nie są cząsteczkami występującymi naturalnie, są za to selekcyjonowane do pełnienia konkretnych funkcji katalitycznych z wykorzystaniem metody SELEX.¹⁹³ Opracowanie i otrzymanie pierwszych DNAzymów zainspirowane zostało odkryciem enzymatycznych właściwości rybozymów na początku lat 80.

ubiegłego wieku.¹⁹⁴ Jednoniciowe DNA posiada właściwości biochemiczne niezwykle podobne do RNA, w tym tworzenie struktur drugorzędowych o skomplikowanych układach przestrzennych. Na chwilę obecną aktywność znanych rybozymów polega przede wszystkim na katalizie cięcia i ligacji innych cząsteczek RNA. Podobne właściwości wykazywały pierwsze uzyskane syntetycznie DNAzyny, w tym opublikowany w roku 1994 DNAzym rozcinający łańcuch monomeru RNA katalizujący atak grupy 2'-OH na sąsiednie wiązanie fosfodiesterowe.¹⁹⁵



Rysunek 28 Mechanizm hydrolizy łańcucha RNA katalizowanej przez DNAzym. Rysunek zapożyczono z pracy Silverman et al.¹⁹⁶

Początkowo DNAzyny wykorzystywane były w celu wyciszania genów i post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji (Rys. 28). Jednakże repertuar potencjalnych zastosowań DNAzymów niezwykle szybko wykroczył poza tę sferę i obecnie DNAzyny pełnią rolę biosensorów,^{197,198} narzędzi diagnostycznych,¹⁹⁹ elementów biologicznych bramek logicznych²⁰⁰ i wielu innych nowoczesnych narzędzi o podłożu biologicznym. Ze względu na łatwość w selekcji z wykorzystaniem metod sztucznej ewolucji, obecnie aktywność zdecydowanej większości DNAzymów wciąż polega na katalizie hydrolizy łańcuchów RNA.²⁰¹ Jednakże otrzymano również DNAzyny zdolne do hydrolizy łańcuchów DNA,²⁰² katalizowania tworzenia międzycząsteczkowych wiązań węgiel-węgiel,²⁰³ ligacji łańcuchów DNA i RNA,^{204,205} czy modyfikacji łańcuchów bocznych substratów peptydowych.²⁰⁶ Otrzymano również nieliczne DNAzyny o bardzo nietypowych właściwościach, jak choćby DNAzym PS5.ST1 imitujący aktywność chelatazy, wprowadzający kationy metali do struktury porfiryny.²⁰⁷ Z kolei DzPS2.M pełni funkcje analogiczne do enzymów peroksydaz i katalizuje reakcje utleniania szeregu substratów, w tym luminolu i NADH, tym samym znajdując liczne zastosowania w otrzymywaniu biosensorów, detekcji DNA oraz w badaniach strukturalnych cząsteczek.^{208,209}

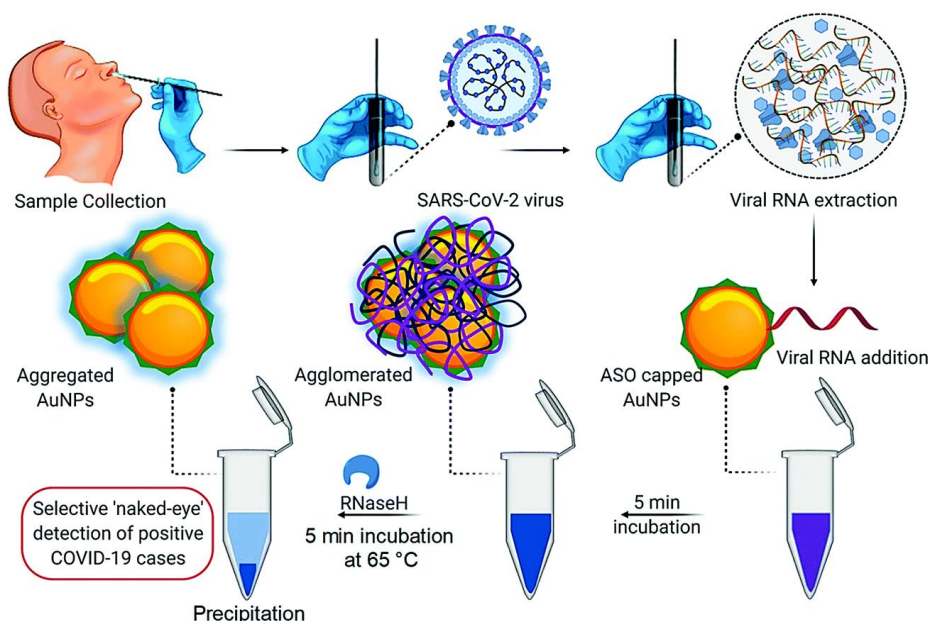
3.2. Oligonukleotydy w strukturach biosensorów o zastosowaniu diagnostycznym

Pierwsza część rozdziału 3 poświęcona została omówieniu różnego typu cząsteczek oligonukleotydowych w kontekście ich potencjału terapeutycznego. Jednakże wielokrotnie wspominałam o możliwych zastosowaniach owych cząsteczek w innych dziedzinach okołomedycznych, na przykład w diagnostyce. Zaznaczyłam również wszechstronność z zakresu struktury i aktywności syntetycznych oligonukleotydów, i jak może ona zostać wykorzystana do otrzymywania wysoce wyspecjalizowanych biosensorów, nośników innych substancji biologicznie

czynnych, katalizatorów reakcji chemicznych czy biologicznych bramek logicznych. W obecnym podrozdziale omówię kwestię wykorzystania oligonukleotydów w strukturach biosensorów, skupiając się przede wszystkim na biosensorach o potencjale diagnostycznym.

Biosensory jako narzędzia diagnostyczne wykorzystujące oligonukleotydy jako elementy rozpoznające cel molekularny dzielimy na dwie grupy – biosensory oparte na strukturze aptameru lub antysensownego oligonukleotydu. Pozostałe z omówionych dotychczas oligonukleotydów o zastosowaniach medycznych uczestniczą w inhibicji, katalizie reakcji hydrolizy lub ligacji kwasów nukleinowych w ramach zjawiska interferencji RNA. Częsteczki te działają zarówno pośrednio (miRNA, siRNA) jak i bezpośrednio (rybozymy, deoksyrybozymy) w celu post-transkrypcyjnego wyciszania genów. Pomimo ich wysokiej specyficzności w oddziaływaniu z celami molekularnymi, ich aktywność nie stanowi dobrej podstawy do budowy biosensorów i narzędzi diagnostycznych. Z kolei struktura zarówno aptamerów jak i antysensownych oligonukleotydów nie jest ograniczona potrzebą zachowania dodatkowej aktywności biologicznej. Są to cząsteczki łatwe do projektowania, ich synteza jest szybka i tania, a możliwość wszechstronnych modyfikacji chemicznych zapewnia swobodę w modulowaniu ich powinowactwa do celów molekularnych oraz stabilności i umożliwia włączenie ich w skład różnorodnych biosensorów.

Antysensowne oligonukleotydy (ASO) znajdują szczególne zastosowanie w diagnostyce chorób wirusowych, ze względu na możliwość wykorzystania ich w strukturze biosensorów w roli elementów rozpoznających charakterystyczne sekwencje genomu wirusa. Powszechnie stosowaną praktyką jest osadzanie cząsteczek ASO na powierzchni metali lub nanocząstek, których szczególne właściwości elektronowe i plazmonowe pozwalają na łatwą detekcję analitu z wykorzystaniem technik spektroskopowych takich jak SERS (ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) lub metodami kolorymetrycznymi.^{210,211} Doskonały przykład znaleźć możemy w opublikowanej w roku 2020 pracy Moitra et al. Przedstawione zostało w niej narzędzie diagnostyczne wykrywające RNA wirusa SARS-CoV-2.²¹² W obecności wykrywanej sekwencji białka N (fosfoproteiny nukleokapsydu) dochodzi do kontrolowanej agregacji nanocząstek złota zmodyfikowanych powierzchniowo cząsteczkami komplementarnego ASO. ASO zmodyfikowany został grupą tiolową umożliwiającą jego zakotwiczenie na powierzchni złota. Agregacja nanocząstek prowadzi do zmiany właściwości ich plazmonu powierzchniowego, w tym właściwości spektralnych, czemu towarzyszy zmiana koloru ich roztworu. Moitra et al. zaproponowali również możliwość zastosowania RNazy H w roztworze zagregowanych pod wpływem wirusowego RNA nanocząstek, aby doprowadzić do ich wytrącenia się z roztworu w postaci osadu (Rys. 29).



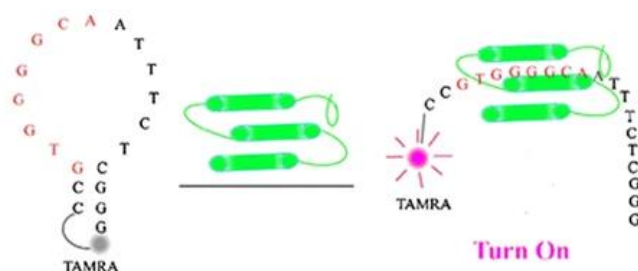
Rysunek 29 Schemat przedstawiający detekcję genomu wirusa SARS-CoV-2 z wykorzystaniem biosensora opartego na strukturze nanocząstek złota zmodyfikowanych powierzchniowo ASO z grupą tiolową. Rysunek zapożyczono z pracy Moitra et al.²¹²

Wykorzystując właściwości aptamerów narzędzia diagnostyczne wykazują imponującą wszechstronność w działaniu. Z użyciem aptamerów możliwe jest wykrycie zarówno bardzo niewielkich ilości komórek nowotworowych jak i ich metabolitów w złożonych płynach, jak krew czy surowica krwi. Komórki nowotworowe rozpoznawane są dzięki specyficznemu oddziaływaniu aptamerów z białkami powierzchniowymi stanowiącymi markery nowotworowe, takimi jak nukleolina lub onkoproteina MUC1. Najczęściej stosowanymi narzędziami diagnostycznymi są nanocząstki udekorowane na powierzchni cząsteczkami aptameru. Przykładowo, zaprezentowany w 2016 roku przez Borghei et al. koniugat nanocząstek i aptameru AS1411, pozwolił na kolorymetryczne wykrywanie komórek raka piersi MCF-7. Metoda ta pozwala na wykrycie nawet 10 komórek nowotworowych w badanym roztworze.²¹³ Jeszcze dokładniejszą detekcję zapewniło elektrochemiczne diagnostyczne narzędzie opublikowane przez Hashkavayi et al.²¹⁴ Technologia ta wykorzystuje elektrody grafitowe pokryte nanocząstkami złota oraz krzemionką SBA-15 modyfikowaną 3-aminopropylotrietoksylanem, na których powierzchni dodatkowo umieszczono aptamer wiążący komórki raka jelita CT26. Narzędzie pozwala na wykrycie zaledwie 2 komórek na mL roztworu.

Z równie wysoką skutecznością aptamery mogą zostać wykorzystane do diagnozy chorób zakaźnych. Aptamery AU1 i AD1 wykorzystane zostały do detekcji kandydozy, choroby spowodowanej infekcją grzybem *Candida*.²¹⁵ Oba aptamery wykazują wysokie powinowactwo do znajdujących się na powierzchni komórek grzybiczych β -Glukanów. W metodzie zwanej ELONA (ang. *enzyme-linked oligonucleotide assay*) wykorzystano wspomniane aptamery do detekcji komórek grzybiczych w próbkach krwi i osiągnięto ponad 90% skuteczności i specyficzności działania metody. Istnieje szereg opartych na strukturze aptamerowej narzędzi diagnostycznych pozwalających na detekcję infekcji wirusowych, w tym wirusem grypy typu A, dengą, ebolą, czy ziką.²¹⁶ Również diagnostyka związana z wirusem SARS-CoV-2 zyskała na wykorzystaniu struktur aptamerowych w biosensorach. Opublikowana w 2020 roku praca Wang et al. opisuje nanobiosensor oparty na strukturze grafenu modyfikowanego aptamerem, wykrywający cytokiny TNF- α i IFN- γ , których poziom w płynach ustrojowych jest wskaźnikiem postępu infekcji w czasie.²¹⁷ Grafenowy biosensor o budowie tranzystora polowego jest wysoce odporny na

odkształcenia i łatwo dopasowuje się do powierzchni ciała badanej osoby, tym samym pozwalając na stałe i wydajne monitorowanie przebiegu choroby.

Aptamery znalazły również szczególne zastosowanie w diagnostyce chorób neurodegeneracyjnych. Komórkowe białka prionowe (PrP^c, ang. *cellular prion protein*) mogą zostać wykryte na początkowym etapie choroby, zanim zajdzie ich transformacja do patogenicznej izoformy charakterystycznej dla choroby w jej zaawansowanym stadium. Wykrycie PrP^c możliwe jest z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanego aptameru, co zostało przedstawione w pracy Xiao et al.²¹⁸ Wykorzystujący zjawisko wygaszania fluorescencji aptamerowy biosensor rozpoznaje strukturę białka PrP^c (Rys. 30). Pod wpływem wiązania struktura aptameru ulega rozciągnięciu, co powoduje oddalenie cząsteczki fluorofora przyłączonego na końcu 5' od znajdujących się na końcu 3' nukleotydów guaninowych, których zasady wygaszają fluorescencję znacznika. Obecność prionowego białka w roztworze sygnalizowana jest więc wzrostem intensywności fluorescencji znacznika.

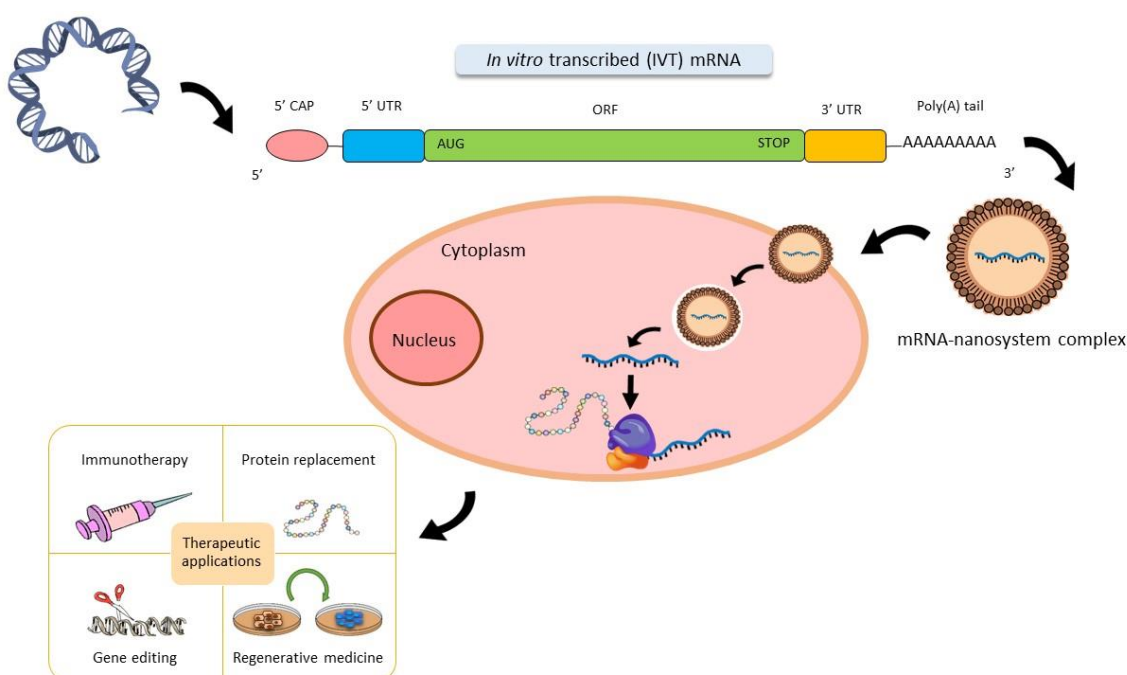


Rysunek 30 Schemat działania aptamerowego biosensora białka prionowego. Fluorescencja znacznika pozostaje wygaszona w strukturze wolnego aptameru, ale wzrasta po związaniu struktury aptameru z celem molekularnym. Rysunek zapożyczony z pracy Xiao et al.²¹⁸

4. mRNA jako cząsteczka o potencjale terapeutycznym

4.1. Zastosowania mRNA w medycynie

Od początku lat 90. ubiegłego wieku rozważano wykorzystanie syntetycznych mRNA transkrybowanych *in vitro* (IVT, ang. *in vitro transcribed*) w celach terapeutycznych. Już w roku 1990 opublikowane zostały badania, w których wykazano, że wprowadzenie reporterowego mRNA do komórek żywych myszy skutkuje produkcją kodowanego w nim białka.²¹⁹ Dwa lata później syntetyczne mRNA kodujące hormon wazopresynę wprowadzono do podwzgórza mózgu szczurów i zaobserwowano spodziewaną reakcję fizjologiczną.²²⁰ Początkowe sukcesy wykazały więc możliwość opracowania skutecznych terapii opartych na syntetycznych mRNA. Jednakże obawy dotyczące stabilności IVT mRNA, jego wysoka immunogenność oraz problematyczne dostarczanie do komórek organizmów żywych przyczyniły się do zarzucenia rozwoju tej technologii na kolejną dekadę.



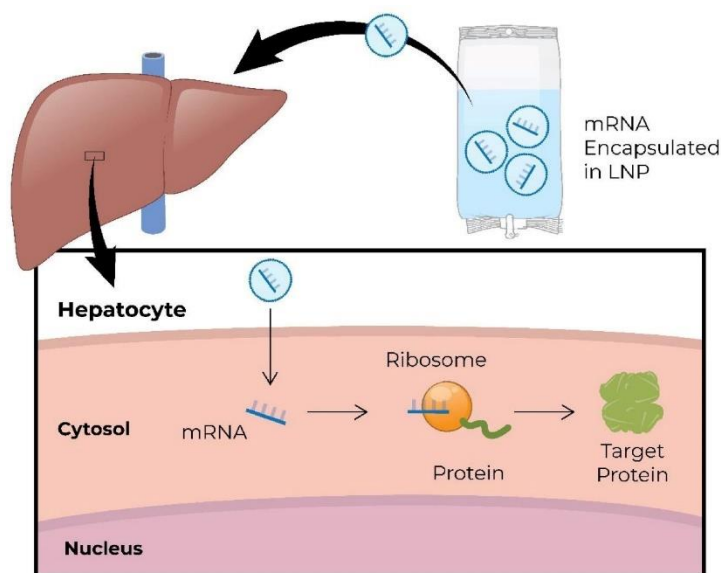
Rysunek 31 Schemat przedstawiający ideę dostarczania syntetycznego mRNA do komórek w celu wywołania jednego z wielu potencjalnych efektów terapeutycznych. Rysunek zapożyczony z pracy Gómez-Aguado et al.²²¹

W ostatnich latach intensywny rozwój biotechnologiczny pozwolił na opracowanie licznych strategii terapeutycznych opartych na IVT mRNA (Rys. 31). Bardzo szybko zauważono przewagę stosowania mRNA jako składnika czynnego szczepionek antywirusowych i antynowotworowych oraz jako podstawę terapii genowych względem obecnie stosowanych metodologii. W przeciwieństwie do dezaktywowanego lub martwego wirusa, mRNA nie niesie ryzyka infekcji oraz ograniczenia skuteczności działania przez nabytą odporność pacjenta na wirusowy wektor. Podczas gdy stosowanie syntetycznego DNA grozi mutagenizacją insercyjną, mRNA nie może być wbudowane do DNA w jądrze komórki. mRNA jest również usuwane z organizmu zgodnie z naturalnymi procesami komórkowymi. Szeroki wachlarz możliwości z zakresu modyfikacji strukturalnych pozwala na zwiększenie stabilności mRNA, regulację jego immunogenności, zwiększenie potencjału translacyjnego, kontrolę jego metabolizmu i okresu trwania w komórkach.^{222,223} mRNA może być dostarczane do komórek w cząsteczkach syntetycznych nośników, co pozwala znacząco zwiększyć wydajność i skuteczność tego typu preparatów.²²⁴ Ze względu na wysokie wydajności transkrypcji *in vitro*, mRNA może być również

stosunkowo tanio i wydajnie produkowane na skalę przemysłową. W ciągu ostatnich lat, w trakcie pandemii wirusa SARS-CoV-2, staliśmy się świadkami dowodu na liczne zalety terapii opartych na mRNA, dzięki niezwykle szybkiemu opracowaniu, produkcji i dystrybucji dwóch preparatów szczepionkowych wykorzystujących syntetyczne mRNA.^{225,226}

4.1.1. mRNA w terapiach genowych oraz strategiach edycji genów

Kwasy nukleinowe, w tym mRNA, stanowią podstawę terapii genowych. W założeniu, tego typu terapie mają na celu dostarczenie do komórek materiału genetycznego, który pozwoli na zahamowanie rozwoju nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych lub naczyniowo-sercowych oraz infekcji wirusowych poprzez zastąpienie, edycję, inhibicję lub addycję wybranych genów. Początkowo skupiono się na rozwoju białkowych terapii zastępczych (ang. *protein replacement therapies*), czyli dostarczaniu genów pozwalających na ekspresję w organizmie chorego białek, które bez interwencji medycznej nie były produkowane w ogóle albo powstawały w formie wadliwej. Pierwszym zastosowanym nośnikiem informacji genetycznej były cząsteczki plazmidowego rekombinowanego DNA (pDNA). Problemy związane z dostarczaniem cząsteczek terapeutycznych do komórek rozwiązano poprzez zastosowanie wektorów wirusowych, które, ze względu na cytotoksyczność i immunogenność, z czasem porzucono na rzecz nośników polimerowych i lipidowych.^{227,228} Zastosowanie DNA w terapii genowej wymaga od terapeutu wnikięcia nie tylko do wnętrza komórek, ale również do wnętrza jądra komórkowego. Potem nastąpić musi wbudowanie dostarczanej sekwencji do genomu pacjenta, proces transkrypcji oraz transport nowopowstałego mRNA do cytoplazmy, w której zajść może proces biosyntezy niezbędnego białka. Ze względu na szereg zdarzeń poprzedzających właściwą syntezę białka, terapie oparte na pDNA charakteryzują się niską wydajnością i dużą bezwładnością w porównaniu z metodą opartą na wykorzystaniu syntetycznego mRNA (Rys. 32). Ze względu na brak potrzeby integracji z komórkowym DNA, mRNA nie niesie zagrożenia związanego z mutagenizacją oraz trudnymi do przewidzenia skutkami ubocznymi wynikającymi ze zmian w genomie pacjenta.



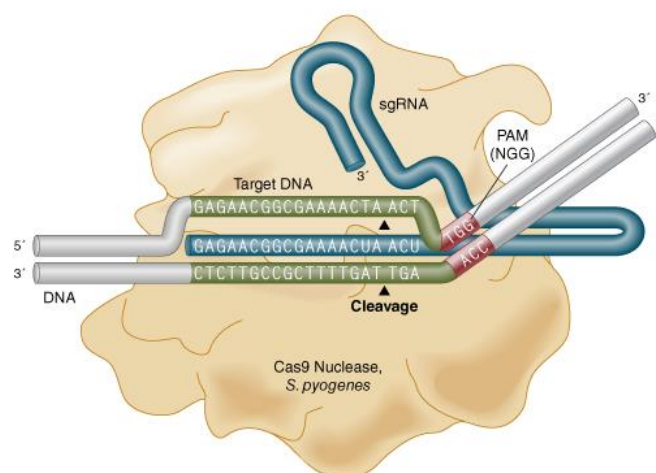
Rysunek 32 Schematyczne przedstawienie dostarczania terapeutycznego mRNA zamkniętego w nanocząstkach lipidowych w celu wyindukowania produkcji brakującego białka w komórkach wątroby. Rysunek zapożyczono z pracy An et al.²³⁰

Alternatywne podejście, zakładające dostarczenie funkcjonalnych białek bezpośrednio do organizmu pacjenta, ma zaletę w postaci pominięcia całej maszyneryi translacyjnej, jednakże posiada również bardzo liczne fundamentalne wady. Po pierwsze, białka wymagają zachowania natywnej struktury trójwymiarowej, aby móc pełnić swoje funkcje biologiczne, a bezpośrednie

wprowadzenie białek do krwioobiegu lub tkanek może prowadzić do ich denaturacji i utraty funkcjonalności. Po drugie, białka są dużymi cząsteczkami o bardzo ograniczonej zdolności do przenikania przez błony komórkowej, co kompletnie wyklucza terapeutyczne zastosowanie szczególnie dużych białek, takich jak czynniki transkrypcyjne. Po trzecie, białka terapeutyczne podawane zarówno dożylnie jak i podskórną są silnie immunogenne, co może negatywnie wpływać na skuteczność jak również farmakokinetykę owych preparatów, zwłaszcza w sytuacji stosowania wielokrotnych dawek.²²⁹

Do niedawna trzy duże firmy farmaceutyczne zajmowały się opracowywaniem preparatów z zakresu białkowej terapii zastępczej – Moderna, BioNTech oraz CureVac²³¹, choć w ostatnich latach, przede wszystkim po sukcesie szczepionek przeciw SARS-Cov-2, coraz więcej grup naukowych i biotechnologicznych start-upów rozpoczyna badania nad terapeutycznym zastosowaniem mRNA. Przykładowo, znajdujący się na drugim etapie badań klinicznych opracowany przez Modernę preparat AZD8601 jest cząsteczką mRNA kodującą czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A). W założeniu preparat ma być wprowadzany bezpośrednio do nasierdza sercowego podczas operacji pomostowania aortalno-wieńcowego w celu usprawnienia późniejszej angiogenezy i w efekcie poprawy funkcjonowania lewej komory sercowej.²³² Opracowany przez Translate Bio preparat MRT5005 ma z kolei na celu leczenie mukowiscydozy, choroby dziedzicznej spowodowanej mutacją genu kodującego białko CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) tworzące kanał chlorkowy w błonie komórkowej. MRT5005 koduje funkcjonalne białko CFTR i dostarczany jest do tkanki nabłonkowej płuc poprzez inhalację. Firma Arcturus Therapeutics opracowała terapeutyk ARCT-810 kodujący transkarbamylazę ornitynową (OTC, ang. *ornithine transcarbamylase*), białko niezbędne w cyklu mocznikowym. ARCT-810 ma na celu leczenie mającego podłoże genetyczne niedoboru OTC w organizmie. Preparat znajduje się na początkowych etapach badań klinicznych.

Edycja genów (ang. *genome editing*) jest stosunkowo nową, ale niezwykle szybko rozwijającą się dziedziną z zakresu terapii genowych. Molekularne narzędzia do edycji genów wykorzystują programowalne nukleazy, a więc enzymy specyficznie rozpoznające sekwencje w genomie komórkowym. Narzędzia te pozwalają na zmianę poziomu ekspresji wybranych genów poprzez wprowadzanie miejscowych modyfikacji, w tym usuwanie szkodliwych mutacji oraz powodowanie mutacji o charakterze pomocniczym.²³³ Odkrycie endonukleaz DNA kierowanych przez komplementarne RNA, takich jak Cas9, stworzyło nowe możliwości nie tylko w dziedzinie edycji genów, ale również w zakresie terapii wykorzystujących mRNA.²³⁴ Na chwilę obecną najczęściej wykorzystywaną i najlepiej poznaną technologią edycji genów jest system CRISPR-Cas9. Efektorowa domena tego systemu, endonukleaza Cas9, pochodząca z komórki paciorkowca *Streptococcus pyogenes*, działa w połączeniu z CRISPR. CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) jest to mechanizm obronny organizmów prokariotycznych, polegający na zachowywaniu i integrowaniu z własnym genomem materiału genetycznego patogenów, np. bakteriofagów.²³⁵ Sekwencje te mogą zostać wykorzystane w celu rozpoznania i zniszczenia patogenu w razie późniejszej infekcji. Endonukleaza Cas9 rozwija strukturę DNA obcego pochodzenia i wykorzystuje nakierowującą cząsteczkę RNA (gRNA, ang. *guide RNA*), uzyskaną na podstawie zachowanego przez komórkę materiału genetycznego, do rozpoznania komplementarnej sekwencji. W razie rozpoznania, Cas9 katalizuje hydrolizę nici obcego DNA (Rys. 33).



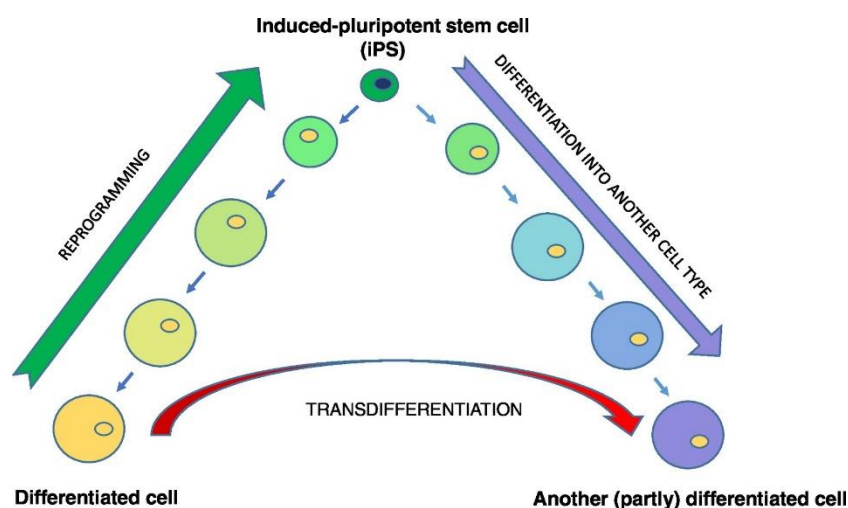
Rysunek 33 Schematyczne przedstawienie aktywności endonukleazy Cas9 kierowanej cząsteczką RNA. Cas9 za pośrednictwem gRNA rozpoznaje komplementarną sekwencję obcego DNA i przeprowadza hydrolizę jego łańcucha. Rysunek uzyskany z domeny publicznej.

Dostarczanie komponentów systemu CRISPR-Cas9 do komórek wymaga zastosowania plazmidowego DNA, mRNA lub gotowego kompleksu gRNA/Cas9.²³⁶ Główne zalety wykorzystania mRNA zamiast pDNA jako podstawy do produkcji pożądanych białek w komórkach wyszczególnione zostały już we wcześniejszej części rozdziału. W przypadku systemów edycji genów, dodatkową zaletą jest krótki okres życia mRNA w warunkach komórkowych, dzięki czemu produkcja endonukleazy ograniczona jest zarówno ilościowo, jak i czasowo, a granice te są łatwe do przewidzenia. Dzięki temu można łatwo uniknąć nadekspresji endonukleazy w komórkach, co mogłoby prowadzić do niespecyficznego cięcia genomu komórkowego oraz reakcji immunologicznej na obecność dużej ilości bakteryjnego białka. Wykorzystanie w terapiach edycji genów gotowego kompleksu gRNA/Cas9 niesie ze sobą liczne komplikacje związane przede wszystkim z produkcją samego enzymu, zachowaniem jego aktywności oraz dostarczaniem białka do komórek w niezmienionej formie.²³⁷ Są to problemy, których można uniknąć dostarczając do komórek mRNA kodujące Cas9 wraz z sekwencją gRNA. Zawarcie w sekwencji mRNA fragmentów kodujących cząsteczki regulatorowe, takie jak miRNA, może umożliwić ścisłą kontrolę nad poziomem ekspresji białkowych narzędzi do edycji genów. Wprowadzenie do struktury gRNA modyfikacji nukleotydowych, takich jak metylacja czy podstawienie atomem fluoru w pozycji 2'-OH, zwiększa stabilność tej cząsteczki, umożliwiając jej przetrwanie w komórkach wystarczająco długo, by mogła wydajnie uczestniczyć w procesie edycji komplementarnych genów.²³⁸

4.1.2. mRNA w medycynie regeneracyjnej

Podstawową ideą medycyny regeneracyjnej jest repopulacja funkcjonalnych komórek i odnowienie tkanek poprzez przywrócenie ich prawidłowego stanu fizjologicznego. Białka pełnią istotną rolę w procesie regeneracji uszkodzonych tkanek poprzez udział w kontroli wzrostu, podziału i różnicowania komórek. Do szczególnie istotnych białek zaliczamy czynniki wzrostu i transkrypcji oraz cytokiny. Dostarczenie funkcjonalnych białek do uszkodzonej tkanki może więc znacząco przyspieszyć proces regeneracji. Jak już jednak wspomniałam, bezpośrednie dostarczanie białek kluczowych dla regeneracji komórkowej jest niemożliwe lub bardzo niewydajne. Zastosowanie mRNA kodujących białka transkrypcyjne pozwala na ich bezpośrednią produkcję w komórkach i prowadzi do regulacji ekspresji konkretnych genów. Jest to technika stosowana w podejściu terapeutycznym zwanym programowaniem komórkowym.²³⁹ Zgodnie z pracą Yamanaka

i Takahashi et al.²⁴⁰ zastosowanie czterech wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct4, Sox2, Klf4 i cMyc) pozwala na indukowaną transformację już zróżnicowanych komórek z powrotem do ich pluripotencjalnej formy. Funkcjonalnie są to komórki podobne do embrionalnych komórek macierzystych, jako że posiadają zdolność do samoodnawiania i ponownego różnicowania do wyspecjalizowanych komórek.²⁴¹ Ponieważ pluripotencjalne komórki są generowane bezpośrednio z dojrzałych komórek somatycznych konkretnego pacjenta, umożliwiają one kontrolowaną regenerację uszkodzonych tkanek bez wywoływania odpowiedzi immunologicznej organizmu.^{242,243,244} Możliwa jest również transformacja dojrzałych, zróżnicowanych komórek do komórek innego typu w procesie zwanym transróżnicowaniem (ang. transdifferentiation). Jest to proces, który analogicznie do programowania komórkowego można wyindukować dostarczając do komórek wybrane czynniki transkrypcyjne (Rys. 34).^{245,246} Choć metoda ta pozwala na pominięcie etapu produkcji komórek pluripotencjalnych, transróżnicowanie jest procesem mało wydajnym oraz o ograniczonym zakresie możliwości w kwestii wyboru docelowych komórek. Dużo większą skutecznością cieszą się terapie łączone, w których programowanie komórkowe stosuje się w połączeniu z transróżnicowaniem, dzięki czemu możliwe jest osiągnięcie synergii działania obu strategii terapeutycznych.²⁴⁷



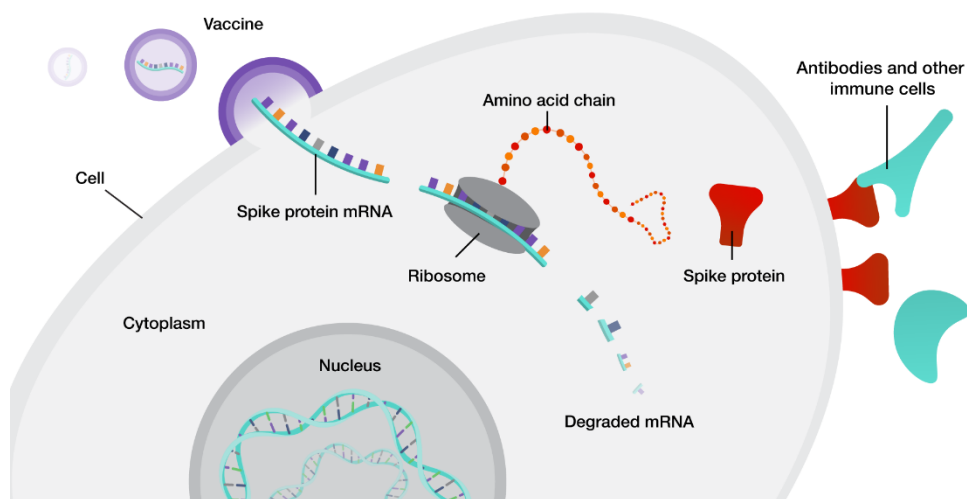
Rysunek 34 Schematyczne przedstawienie różnic w procesach programowania i transróżnicowania komórkowego. Rysunek zapożyczono z pracy Cieślak-Pobuda et al.²⁴⁵

Medycyna regeneracyjna jest stosunkową nową dziedziną, a mRNA zaczęło znacząco zyskiwać na popularności w kontekście zastosowania terapeutycznego dopiero w ciągu ostatniej dekady. Dlatego też wszystkie obecnie dostępne na rynku lub będące na zaawansowanym etapie badań klinicznych, produkty z dziedziny medycyny regeneracyjnej wykorzystują DNA dostarczane do komórek za pośrednictwem wektorów wirusowych lub zakładają wprowadzenie do organizmu pacjenta jego własnych komórek poddanych modyfikacjom genetycznym.²⁴⁸ Jednakże imponująco szybki rozwój technologii okołomedycznych wykorzystujących mRNA daje nadzieję na powstanie w najbliższych latach zupełnie nowej grupy terapeutyków, które zrewolucjonizują medycynę regeneracyjną.

4.1.3. Szczepionki mRNA

Zależnie od rodzaju kodowanego białka, szczepionki mRNA mogą mieć charakter profilaktyczny lub terapeutyczny. Szczepionki profilaktyczne mają na celu umożliwić organizmowi rozwinięcie naturalnej odporności przeciwko chorobom zakaźnym, np. wirusowym. Z kolei szczepionki o charakterze terapeutycznym, czyli przede wszystkim szczepionki antynowotworowe, umożliwiają organizmowi pacjenta wykorzystanie jego własnego układu odpornościowego do

selektywnego zniszczenia defektywnych komórek (Rys. 35). Na chwilę obecną dwa typy RNA badane są po kącie zastosowania w szczepionkach. Szczepionki konwencjonalnego typu zawierają mRNA, które swoją strukturą ściśle naśladuje naturalne mRNA komórkowe i koduje antygen, który ma zostać wyprodukowany w organizmie pacjenta w celu wyszkolenia i/lub aktywacji jego układu odpornościowego do specyficznego zwalczania patogenów lub komórek prezentujących dany antygen. Zainteresowaniem cieszą się również RNA posiadające zdolność do samo-replikacji. Samopowielające się RNA kodują nie tylko wybrany antygen, ale również wirusowe białka odpowiedzialne za replikację własnego kwasu nukleinowego w cytoplazmie komórkowej.^{249,250}



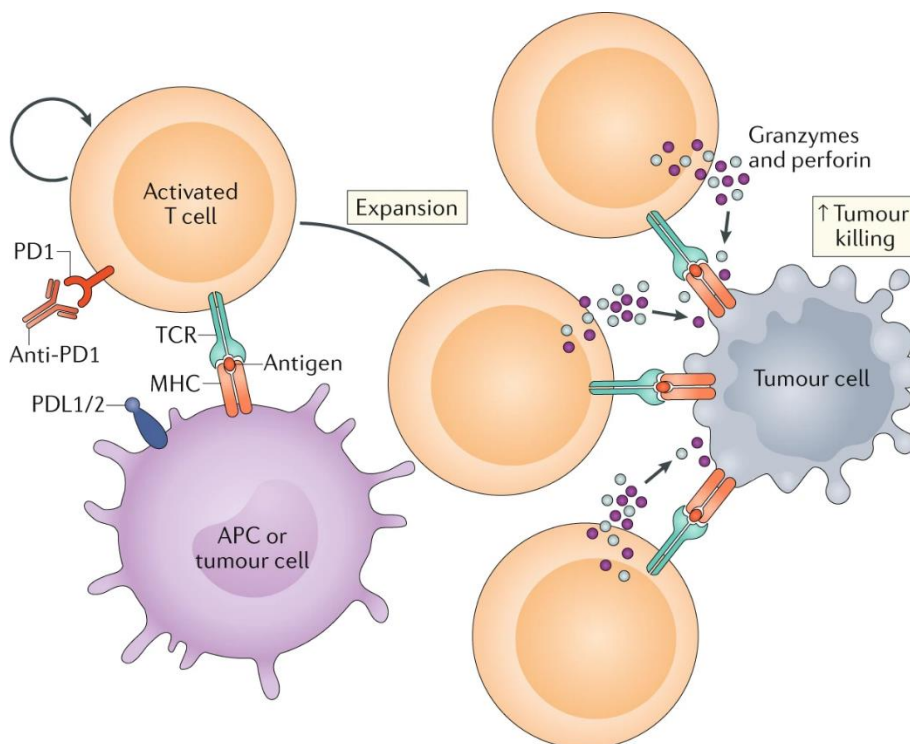
Rysunek 35 Schematyczne przedstawienie działania szczepionki mRNA na przykładzie szczepionki przeciw SARS-CoV-2.
Rysunek zapożyczono z domeny publicznej.

Opracowanie skutecznej szczepionki opartej na strukturze mRNA wymaga uwzględnienia charakterystyki samej cząsteczki. Wielokrotnie wspominałam już o niestabilności mRNA, wysokiej immunogenności związanej z odpowiedzią układu odpornościowego organizmu na kwas nukleinowy obcego pochodzenia, jak również szczegółowo omówiłam elementy strukturalne mRNA niezbędne dla jego stabilności, metabolizmu i udziału w procesie translacji. Sposoby modyfikacji mRNA pozwalające na regulację poszczególnych właściwości tej cząsteczki omówione zostaną w kolejnym rozdziale. W kontekście szczepionek mRNA wspomnę krótko o podstawowej budowie syntetycznego transkryptu o potencjale terapeutycznym. Poza sekwencją kodującą wybrany antygen, mRNA powinno posiadać flankujące ją sekwencje 3'UTR oraz 5'UTR. Ich obecność, jak również ich budowa, są kluczowe dla stabilności mRNA oraz inicjacji procesu translacji. Obecność 5' kapu jest niezbędna dla wydajnego procesu syntezy białek. 5' kap może być wprowadzany do struktury mRNA ko-transkrypcyjnie poprzez zastosowanie syntetycznego analogu kapu lub post-transkrypcyjnie przez enzymy kapujące.²⁵¹ Ogon poli(A) odpowiedniej długości jest również niezbędny dla zachowania stabilności mRNA oraz pośredniczy w procesie translacji. Może być kodowany bezpośrednio na matrycy DNA i dołączony do mRNA w procesie transkrypcji lub dodany do końca 3' gotowego transkryptu przez polimerazę poli(A). Mniej powszechnie stosowaną strategią regulacji właściwości biochemicznych mRNA jest zastąpienie rzadkich kodonów ich powszechnie występującymi odpowiednikami kodującymi ten sam aminokwas.²⁵² Wysokie stężenie komórkowe tRNA rozpoznających często występujące kodony może zwiększyć tempo procesu translacji. Jednakże jest to metoda mogąca powodować dodatkowe komplikacje wynikające ze zmiany struktury drugo- i trzeciorzędowej mRNA, w tym zaburzenie

procesu post-transkrypcyjnej modyfikacji nukleotydów skutkujące powstawaniem nowych wariantów białek.²⁵³

4.1.3.1. mRNA w terapiach antynowotworowych

Szczepionki antynowotworowe, wraz z innymi strategiami z zakresu immunoterapii, postrzegane są jako skuteczna alternatywa dla konwencjonalnych metod leczenia nowotworów. W założeniu nowoczesne szczepionki mają być zaprojektowane tak, aby wywołać specyficzną reakcję organizmu na neo-antygeny charakterystyczne dla danego typu nowotworu. Neo-antygeny powstają w efekcie zmian w genomie komórki nowotworowej względem genomu komórki zdrowej. Zmiany DNA mogące potencjalnie prowadzić do nowotworzenia to na przykład punktowe mutacje w postaci substytucji, delecji lub insercji pojedynczych nukleotydów, fuzja genów oraz retencja intronów. Neo-antygeny są to białka o defektywnej strukturze i aktywności, które za pośrednictwem ubiquityny ulegają degradacji przez obecny w cytoplazmie proteasom.²⁵⁴ Niewielka część krótkich peptydów powstających w wyniku owego procesu degradacji może wiązać się z cząsteczkami MHC-I, odpowiedzialnymi za wychwytywanie, transport i prezentację antygenów pochodzenia wewnątrzkomórkowego na powierzchni błony komórkowej.²⁵⁵ Prezentowane przez MHC-I antygeny mogą zostać rozpoznane przez limfocyty typu CD8⁺ T, które następnie ulegają aktywacji do limfocytów T cytotoksycznych (CTL, ang. *cytotoxic T lymphocytes*) o aktywności antynowotworowej.^{256,257} CTL bezpośrednio niszczą komórkę rozpoznaną jako nowotworową. Znacznie większą grupę stanowią pomocnicze limfocyty Th, znane również jako komórki CD4⁺ T, aktywowane przez profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC, ang. *antigen-presenting cells*), takie jak komórki dendrytyczne, makrofagi oraz limfocyty B.²⁵⁸ Profesjonalne komórki układu odpornościowego posiadają na powierzchni błony komórkowej związane z antygenami białka MHC-II. Antygeny te są rozpoznawane i wiązane przez limfocyty Th, które po aktywacji stymulują inne komórki układu odpornościowego.²⁵⁹



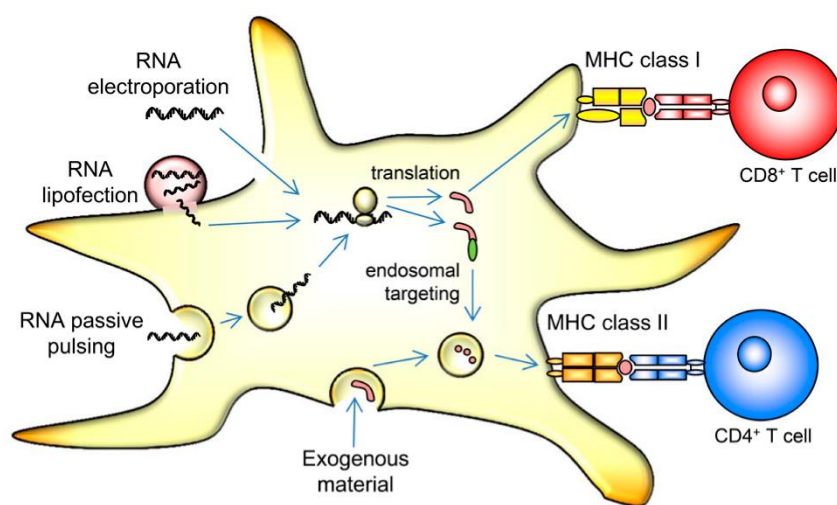
Rysunek 36 Schemat działania antynowotworowych limfocytów T cytotoksycznych (CTL). CTL aktywowane mogą być przez antygeny prezentowane bezpośrednio na powierzchni komórki nowotworowej lub przez profesjonalną komórkę układu odpornościowego prezentującą antygen. Rysunek zapożyczony z pracy A. D. Waldman et al. na podstawie licencji nr 5416971028999.²⁶²

Zależnie od klasy, limfocyty Th pobudzają do działania odpowiedzialne za usuwanie drobnoustrojów fagocyty, zwalczające pasożyty eozynofile, jak również neutrofile czy monocyty istotne w ochronie organizmu przed infekcjami bakteryjnymi oraz grzybicznymi. Niewielka część limfocytów Th aktywowana jest przez neo-antygeny pochodzące z komórek rakowych. Biorą one udział w zwalczaniu nowotworów w organizmie poprzez bezpośrednie zabijanie komórek guza lub wspomaganie aktywacji, wzrostu i aktywności limfocytów T specyficznie zwalczających komórki rakowe (Rys. 36).^{260,261}

Opracowanych zostało wiele potencjalnych szczepionek antynowotworowych, jednakże uzyskanie wysokiej skuteczności działania wciąż pozostaje głównym problemem badawczym. Przeważająca większość opracowanych preparatów wykorzystuje antygeny uważane za charakterystyczne dla danego typu nowotworu. Przykładowo opracowana przez CureVac szczepionka mRNA CV9202, znajdująca się obecnie w trakcie badań klinicznych, koduje sześć antygenów powszechnie występujących w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc.²⁶³ Preparat mRNA-5671 opracowany przez Modernę ma jeszcze szerszy zakres działania – celem terapeutycznym jest zmutowana forma proto-onkogenu KRAS (ang. *Kirsten rat sarcoma virus*), a będące obecnie w toku badania kliniczne mają na celu zbadanie skuteczności szczepionki w leczeniu zaawansowanej lub przerzutowej formy niedrobnokomórkowego raka płuc, raka jelita grubego oraz raka trzustki.²⁶⁴ Uważa się, że pełen potencjał szczepionek mRNA można wykorzystać stosując terapie zindywidualizowane. Wraz z rozwojem technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next generations sequencing*) możliwe jest zidentyfikowanie mutacji i innych zmian w genomie komórek nowotworowych konkretnego pacjenta.²⁶⁵ Działanie zindywidualizowanej szczepionki mRNA ma znacznie zawężony zakres działania, poprzez aktywację układu odpornościowego do wybiórczego zwalczania komórek danego nowotworu. Wynikająca z indywidualizacji terapii specyficzność działania umożliwia również wyeliminowanie skutków ubocznych stosowania preparatu oraz wyszkolenie limfocytów T o wysokim powinowactwie do wybranych neo-antygenów.^{266,267} Przykładem praktycznego zastosowania terapii zindywidualizowanej jest kolejna szczepionka opracowana przez Modernę - mRNA-4157. Ma ona na celu umożliwić wysoką skuteczność w leczeniu czerniaka, dzięki sekwencjonowaniu genomu komórek rakowych pacjenta oraz wyodrębnieniu 20 charakterystycznych dla danego nowotworu neo-antygenów i ich epitopów. Sekwencje kodujące wyselekcjonowane epitopy zawierane są w cząsteczkach mRNA, które podawane są następnie pacjentowi w formie zindywidualizowanej szczepionki.²⁶⁸ Innym przykładem zindywidualizowanej szczepionki mRNA jest opracowany przez BioNTech preparat BNT122 będący obecnie na drugim etapie badań klinicznych.²⁶⁹ Rozpoczęto badania nad jego skutecznością w leczeniu zaawansowanego lub przerzutowego czerniaka, raka pęcherza, jelita oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. Należy wspomnieć, że większość obecnie prowadzonych badań klinicznych skupia się na łączeniu konwencjonalnych terapii antynowotworowych, takich jak chemioterapia, z zastosowaniem szczepionek mRNA. Jednakże wraz z rozwojem technologii pozwalających na skuteczne opracowywanie oraz dostarczanie szczepionkowych preparatów antynowotworowych, możliwy będzie również coraz szybszy rozwój zindywidualizowanych terapii.

Metoda działania oraz skuteczność szczepionki, w tym antynowotworowej szczepionki mRNA, zależy w dużej mierze od sposobu wprowadzenia terapeutycznego do organizmu pacjenta. Podstawowym rozwiązaniem jest bezpośrednie dostarczenie szczepionki w formie mRNA zamkniętego w cząsteczce nośnika pochodzenia wirusowego lub obecnie częściej stosowanego nośnika syntetycznego, takiego jak nanocząstki lipidowe. Możliwe jest również dostarczenie szczepionki do organizmu pacjenta w postaci wyszkolonych komórek dendrytycznych. Komórki

dendrytyczne, jak już wspomniałam we wcześniejszej części rozdziału, należą do grupy profesjonalnych komórek układu odpornościowego. Prezentują antygeny niezbędne do wyspecjalizowania i aktywacji limfocytów Th oraz limfocytów T cytotoksycznych. Komórki dendrytyczne występują w zarówno we krwi jak i tkankach całego organizmu, umożliwiają więc szybką i specyficzną odpowiedź efektorowych komórek układu odpornościowego. Nie bez przyczyny uważa się więc komórki dendrytyczne za kluczowy element odpowiedzi immunologicznej związanej z rozpoznaniem antygenów. Już w latach 90 zaprezentowano pierwsze badania, w których do komórek dendrytycznych wprowadzono na drodze elektroporacji syntetyczne mRNA. Komórki te skutecznie wytwarzały oraz prezentowały zamierzony antygen, po wprowadzeniu do organizmu wspomagając niszczenie guzów nowotworowych w mysich modelach czerniaka (Rys. 37).²⁷⁰ Wielokrotnie wykazano, że wprowadzenie do komórek dendrytycznych mRNA kodujących białkowe stymulatory układu odpornościowego lub cytokiny prozapalne, wraz z mRNA kodującym nowotworowy antygen, zwiększa skuteczność działania tego typu szczepionek.



Rysunek 37 Schematyczne przedstawienie komórki dendrytycznej transfekowanej cząsteczką mRNA. Kodowany przez mRNA antygen prezentowany jest najczęściej przez białka MHC II w celu aktywacji limfocytów Th, rzadziej przez białka MHC I w celu aktywacji limfocytów T cytotoksycznych. Rysunek zapożyczony z pracy J. Dörrie et al.²⁷¹

Bezpośrednie dostarczanie szczepionek mRNA posiada z jednej strony zaletę w postaci pominięcia etapu elektroporacji i rozwoju komórek dendrytycznych, które w wyspecjalizowanej formie wprowadzane są do organizmu pacjenta. Z drugiej jednak strony, dostarczanie mRNA do tkanek ciała w wolnej postaci lub w cząsteczkach nośników wiąże się z szeregiem czynników ograniczających skuteczność terapii. Przede wszystkim mRNA musi pozostać stabilne do momentu odnalezienia i wnikięcia do wnętrza profesjonalnych komórek układu odpornościowego. Dostarczanie szczepionek standardowymi metodami przeprowadza się doskórnie, podskórnie, domięśniowo lub donosowo. Mniej konwencjonalną metodą jest dostarczanie preparatu do węzłów chłonnych. W wielu przypadkach metoda ta skutkuje zwiększoną efektywnością działania, zwłaszcza w przypadku szczepionek zawierających wolne mRNA, które w szybkim czasie może zostać dostarczone do komórek prezentujących antygen, a następująca aktywacja limfocytów może zajść bez potrzeby migracji komórek dendrytycznych.²⁷² Szczepionki wykorzystujące komórki dendrytyczne zawierające antygenowe mRNA również uzyskują zwiększoną skuteczność po wprowadzeniu do węzłów chłonnych w porównaniu do innych tkanek.²⁷³ Ciekawą alternatywą jest podanie szczepionki mRNA bezpośrednio do tkanki guza nowotworowego. Podawane w ten sposób preparaty najczęściej nie zawierają mRNA kodujących neo-antygeny. Zamiast tego kodują one cząsteczki stymulujące odpowiedź układu odpornościowego, wykorzystując aktywność pobliskich

limfocytów. Co ciekawe, właściwości samej cząsteczki mRNA mogą grać w takiej sytuacji istotną rolę – naturalnie wysoka immunogenność syntetycznego mRNA może zostać wykorzystana w ramach dodatkowej aktywacji odpowiedzi immunologicznej w obszarze nowotworu. TriMix mRNA jest to mieszanka trzech mRNA kodujących cząsteczki stymulujące odpowiedź układu odpornościowego - CD70, CD40 oraz TLR4.²⁷⁴ Razem pełnią one rolę adiuwantu, a więc substancji wspomagającej działanie szczepionki. W 2016 roku wykazano, że wprowadzenie TriMix mRNA do tkanki guza nowotworowego, bez dodatku mRNA kodującego jakikolwiek neo-antygen, skutkowało aktywacją komórek dendrytycznych typu CD8 α^+ i w efekcie limfocytów T cytotoksycznych specyficznie zwalczających komórki nowotworowe.²⁷⁵

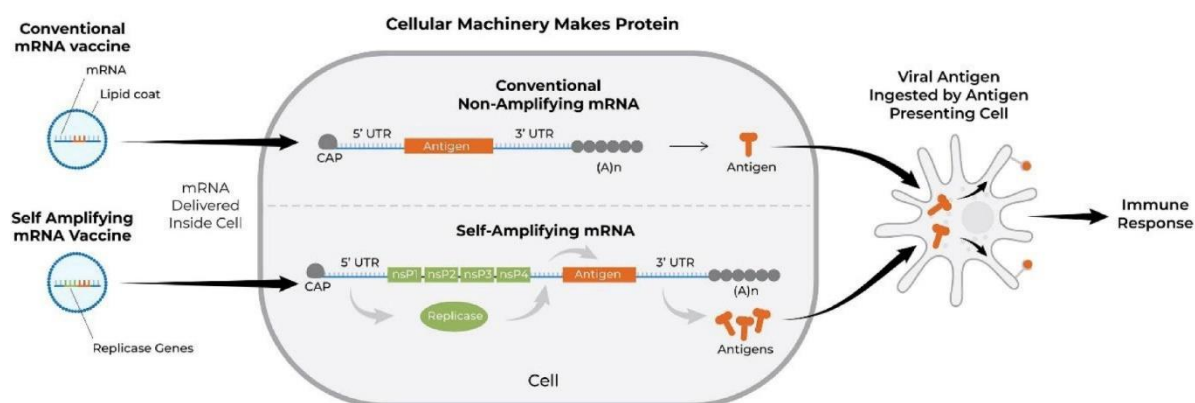
4.1.3.2. Antywirusowe szczepionki mRNA

Profilaktyczne szczepionki ograniczające rozwój infekcji patogennych stanowią podstawę zapobiegania i ograniczania rozprzestrzeniania epidemii. W ostatnich latach obserwujemy wzrost liczby wydarzeń o charakterze epidemicznym, ze względu na rosnące zagęszczenie zaludnienia i łatwość w przemieszczaniu się członków populacji.²⁷⁶ Istotne zagrożenie niesie ze sobą również postępujące przejmowanie przez ludzkość dotychczas niezamieszkanymi regionów, stanowiących środowisko naturalne zwierząt przenoszących patogeny, na które nie posiadamy naturalnej odporności.²⁷⁷ Opracowanie oraz wprowadzenie na rynek powszechnie stosowanych szczepionek antywirusowych było, i dużej mierze wciąż jest, długotrwałym i skomplikowanym procesem. Jednakże w ostatnich latach przekonaliśmy się, jak kluczowa dla ograniczenia rozwoju i rozprzestrzeniania się epidemii, które potencjalnie przerodzić mogą się w pandemię, jest możliwość szybkiego opracowania i wprowadzenia na rynek skutecznie działających preparatów. Ze względu na imponującą wszechstronność w działaniu, łatwość w opracowywaniu i dostosowywaniu do szybko zmieniających się warunków, jak również możliwość wydajnej produkcji na dużą skalę, szczepionki oparte na mRNA stanowią idealną odpowiedź na stojące przed ludzkością wyzwania.

W przeciwieństwie do preparatów białkowych, szczepionki mRNA mają potencjał wywoływania silnej i specyficznej odpowiedzi układu odpornościowego. Odpowiedź immunologiczna związana jest zarówno z aktywacją limfocytów typu CD8 $^+$ T, dzięki możliwości skutecznej produkcji endogennych antygenów prezentowanych na powierzchni komórek przez białka MHC-I, jak i limfocytów CD4 $^+$ T nakierowujących limfocyty T cytotoksyczne i makrofagi na zainfekowane komórki.²⁷⁸ Preparaty mRNA charakteryzuje również wysoka skuteczność działania, dzięki zdolności do wywoływania silnej reakcji immunologicznej na obecność antygenów przez dawki dużo mniejsze od konwencjonalnie stosowanych preparatów opartych np. na DNA.²⁷⁹ Podobnie do szczepionek antynowotworowych, szczepionki antywirusowe dostarczane mogą być bezpośrednio do tkanek pacjenta lub za pośrednictwem komórek dendrytycznych poddanych uprzedniej elektroporacji z udziałem mRNA. Szczepionki mRNA można również podzielić na nie-replikujące się oraz ulegające samo-replikacji.

Samo-replikujące się szczepionki mRNA najczęściej wykorzystują genom alfawirusa, w którym fragmenty kodujące białka odpowiedzialne za powielanie wirusowego RNA pozostały niezmienione, za to geny kodujące białka strukturalne zastąpiono sekwencjami wybranych antygenów. Dzięki mechanizmowi samopowielania bardzo niewielka wyjściowa dawka szczepionki może prowadzić do produkcji ogromnej ilości antygeny. Początkowa dawka mRNA ulega degradacji równie szybko jak mRNA nieposiadające zdolności do samopowielania, jednakże w przypadku szczepionek ulegających auto-replikacji równolegle do procesu translacji, możliwa jest dłuższa aktywna ekspresja kodowanego białka (Rys. 38). Do głównych zalet samopowielających się szczepionek mRNA zaliczyć możemy ich zdolność do produkowania

własnych adiuwantów oraz białek pośredniczących w procesie replikacji. Jednakże ze względu na złożoną budowę mRNA ulegającego samo-replikacji trudno przewidzieć oraz kontrolować stopień reakcji zapalnej organizmu na zastosowanie tego typu szczepionki. Dodatkowo, obecność wirusowych białek odpowiedzialnych za replikację może prowadzić do rozwinięcia reakcji immunologicznej pacjenta na daną szczepionkę i ograniczyć możliwość jej wielokrotnego stosowania.



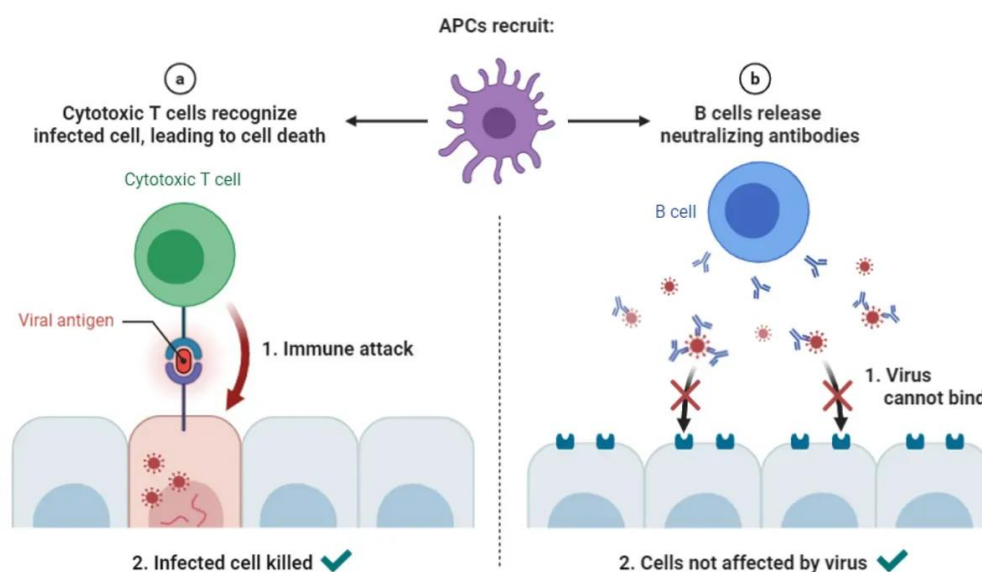
Rysunek 38 Porównanie mechanizmu działania konwencjonalnych szczepionek mRNA i szczepionek samopowielających się. Rysunek zapożyczono z pracy T. R. Damase et al.²³¹

Jeden z pierwszych przykładów samopowielającej antygenowej szczepionki mRNA zaprezentowano w roku 2003 w pracy opublikowanej przez Harvey et al.²⁸⁰ mRNA zaprojektowano na podstawie genomu wirusa Kunjin, podtypu wirusa Zachodniego Nilu. Do sekwencji wprowadzono gen kodujący białko Gag wirusa HIV-1. Szczepionkę podano myszom domięśniowo, w postaci wolnego mRNA lub mRNA zamkniętego w cząsteczkach przypominających kapsydy wirusowe. W efekcie komórki myszy produkowały kodowany w podanym mRNA antygen, co z kolei doprowadziło do wykształcenia się limfocytów CD8⁺ specyficznie rozpoznających białko Gag w ilości 4.5x większej niż w przypadku zastosowania szczepionki opartej na rekombinowanym genomie wirusa krowianki. Mechanizm samopowielania zastosowano również w opracowanej w 2020 roku przez McKay et al. szczepionce przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, zawierającej mRNA kodujące białko kolca wirusa.²⁸¹ W roku 2021 rozpoczął się pierwszy etap badań klinicznych nad skutecznością szczepionki.

Zasady działania szczepionek podawanych za pośrednictwem komórek dendrytycznych poddanych elektroporacji z udziałem terapeutycznego mRNA opisałam już w podrozdziale dotyczącym szczepionek antynowotworowych. W przypadku preparatów antywirusowych, zdecydowana większość badań w tej dziedzinie prowadzona jest w celu otrzymania szczepionki przeciwko aktywnej infekcji wirusem HIV-1. W toku przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych udowodniono, że preparaty zawierające modyfikowane komórki dendrytyczne są bezpieczne i wywołują aktywność specyficznych limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺.^{282,283} Jednakże nie udało się zaobserwować znaczących efektów terapeutycznych w przypadku stosowania tego typu szczepionek jako jedynej formy leczenia. Obecnie zakłada się, że szczepienie za pośrednictwem komórek dendrytycznych może być z powodzeniem stosowane jako jedna z kilku równoległych strategii terapeutycznych pozwalających na ograniczenie rozwoju wirusa HIV-1.²⁸⁴

Preparaty dostarczane bezpośrednio do tkanek wciąż stanowią najliczniej reprezentowaną grupę szczepionek mRNA, zarówno ze względu na łatwość opracowania ich struktury, jak i podania do organizmu pacjenta. Mimo, że pierwsze badania dowodzące możliwości

zastosowania syntetycznego mRNA w celu wywołania odpowiedzi układu odpornościowego w organizmach myszy przeprowadzone zostały już w latach 90,²⁸⁵ pierwsza praca prezentująca praktyczne zastosowanie mRNA w szczepionkach przeciwko chorobom zakaźnym opublikowana została dopiero dekadę temu.²⁸⁶ We wspomnianej pracy przedstawiono możliwość znaczącego wzrostu odporności na zakażenie wirusem grypy w organizmach myszy, poprzez podanie im mRNA kodującego zestaw wirusowych antygenów w połączeniu z adiuwantem RNA stabilizowanym przez białko protaminę. Moderna opracowała szereg potencjalnych szczepionek mRNA przeciwko chorobom układu oddechowego, w tym pierwsze szczepionki przeciwko dwóm szczepom ptasiej grypy (H10N8 i H7N9) badane na ludziach.²⁸⁷ W 2016 przedstawiono pierwszą szczepionkę mRNA przeciwko wściekliźnie u świń i gryzoni, której skuteczność w aktywacji specyficznych limfocytów CD4⁺ była większa od obecnie stosowanej szczepionki dostępnej na rynku.²⁸⁸ W pracy Pardi et al. zaproponowano zastosowanie kombinowanej szczepionki przeciwko szczepowi wirusa Zika odpowiedzialnemu za epidemię z 2013 roku.²⁷⁹ Szczepionka wykorzystuje mRNA kodujące dwa rodzaje wirusowych glikoprotein, zamknięte w nanocząstkach lipidowych. Pojedyncza dawka szczepionki zapewniła odporność na infekcję wirusem Zika u myszy do 5 miesięcy od momentu podania, a u naczelnych do 5 tygodni. Z wykorzystaniem tego samego zestawu antygenów Moderna opracowała szczepionkę przeciw wirusowi Zika, która obecnie znajduje się na pierwszym etapie badań klinicznych. Co ciekawe, w trakcie badań na myszach udowodniono, że szczepionka zapobiega dziedziczeniu infekcji wirusowej przez potomstwo zakażonych matek.²⁸⁹ Szczepionki mRNA posiadają zdolność wywoływania nie tylko aktywnej, komórkowej, reakcji układu odpornościowego, ale również odpowiedzi humoralnej, odpowiedzialnej za długotrwałą odporność pasywną (Rys. 39).



Rysunek 39 Schematyczne porównanie mechanizmu komórkowej i humoralnej odpowiedzi układu odpornościowego. Profesjonalne komórki układu odpornościowego prezentujące antygen (APCs) aktywują zarówno limfocyty T cytotoksyczne odpowiedzialne za zwalczanie między innymi aktywnej infekcji wirusowej, jak i limfocyty B produkujące neutralizujące przeciwciała zapobiegające rozwojowi infekcji. Rysunek uzyskany z domeny publicznej.

Dobrym przykładem jest opracowana przez Modernę szczepionka przeciwko przenoszonemu przez komary arbowirusowi Chikungunya. Preparat zawiera mRNA kodujące ludzkie ciała monoklonalne (mAb, ang. *monoclonal antibodies*) wyizolowane z limfocytów B osoby, która przetrwała naturalną infekcję wirusową.²⁹⁰ Jedno z badanych ciał monoklonalnych ulegało w organizmach myszy ekspresji na poziomie wystarczającym do zapewnienia długotrwałej odporności, znacząco ograniczającej postęp infekcji wirusowej i zapobiegającej przypadkom

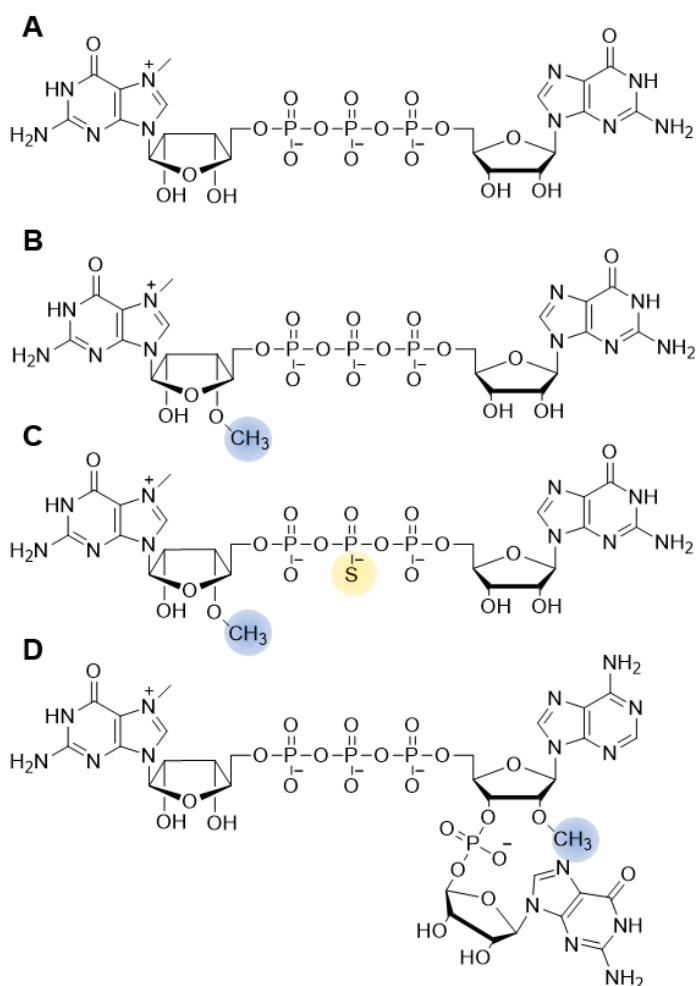
śmiertelnym. Podobnie obiecujące wyniki zaobserwowano u naczelnych, dzięki czemu w roku 2019 rozpoczęto pierwszy etap badań klinicznych na ludziach.²⁹¹

4.2. Modyfikacje mRNA o potencjalnie terapeutycznym

W rozdziale 2 szczegółowo omówiłam zagadnienie modyfikacji nukleotydowych w strukturach RNA, w tym zarówno modyfikacji występujących naturalnie, jak i wprowadzanych do transkryptów w celu kontrolowania ich właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych. W obecnym podrozdziale chciałabym skupić się na dopełnieniu obrazu poprzez zwięzłe omówienie modyfikacji cząsteczek mRNA o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Jak już wielokrotnie wspominałam, niska stabilność i wysoka immunogenność mRNA stanowią kluczowe zagadnienia w opracowywaniu skutecznych terapii opartych na wykorzystaniu tych cząsteczek. I choć ogromna część badań poświęcona została zwiększaniu ich stabilności oraz ograniczaniu immunogenności, mam nadzieję zwrócić uwagę czytelnika na fakt, że to właśnie owe naturalne właściwości mRNA niejednokrotnie stanowią o jego niezwyklej wszechstronności i potencjale w opracowywaniu nowoczesnych terapii. Potencjał translacyjny stanowi trzecie, i być może najważniejsze, zagadnienie związane z opracowywaniem terapeutycznych mRNA. Przy czym należy pamiętać, że ostatecznie ilość docelowego białka powstającego na podstawie danego mRNA jest wypadkową wszystkich zdarzeń związanych z metodą dostarczania cząsteczki, jej metabolizmu i systemowej reakcji organizmu na jej obecność, a nie tylko jej oddziaływania z czynnikami maszyneryi translacyjnej. Ze względu na cel moich badań i tematykę rozprawy doktorskiej, modyfikacjom ogona poli(A) poświęcony został osobny podrozdział.

4.2.1. Metody regulacji stabilności terapeutycznych mRNA

Właściwości powszechnie stosowanych modyfikacji cząsteczek RNA, jak 2'-O-metylacja rybozy lub grupy tiofosforanowe, zostały już szczegółowo omówione. W obecnym podrozdziale skupię się na konkretnych przykładach zastosowania modyfikacji stabilizujących terapeutyczne mRNA. Dwa elementy strukturalne mRNA w dużej mierze stanowią o jego stabilności – znajdujący się na końcu 5' kap oraz umiejscowiony na końcu 3' ogon poli(A). Wraz z rozwojem technologii terapeutycznych mRNA postępowały badania związane z poprawią stabilności obu tych struktur, przy czym ogromną część uwagi poświęcono właściwościom końca 5'. Struktura kapu może zostać wprowadzona do cząsteczki syntetycznego mRNA na dwa sposoby – z wykorzystaniem rekombinowanego enzymu kapującego pochodzącego z wirusa krowianki²⁹² lub ko-transkrypcyjnie, poprzez zastosowanie gotowych analogów struktury kapu. Na chwilę obecną stosuje się przede wszystkim tę drugą strategię, ponieważ umożliwia ona zastosowanie licznych chemicznych modyfikacji końca 5' mRNA. W pierwszych latach rozwoju technologii syntetycznych mRNA stosowano ko-transkrypcyjny kaping z udziałem analogu naśladującego podstawową strukturę kapu 0 (m^7GpppN , Rys. 40A).²⁹³ Jednakże poważną wadą tego podejścia jest możliwość odwrotnej inkorporacji struktury kapu do cząsteczki i powstania znaczącej populacji cząsteczek mRNA, w których podjednostka m^7G nie stanowi elementu kapu, za to znajduje się w pozycji pierwszego nukleotydu transkryptu. W rezultacie duża część syntetycznego mRNA nie jest rozpoznawana przez białka wiążące kap i nie ulega translacji. W ostatnich latach w syntezie *in vitro* mRNA stosuje się przede wszystkim struktury kapu typu ARCA (ang. *anti-reverse cap analogs*),²⁹⁴ choć powoli wypierane są one na rzecz struktur trinukleotydowych, o których wspomnę w dalszej części rozdziału. Ich szczególna budowa ($m_2^{7,3'-O}GpppG$, Rys. 40B) uniemożliwia odwrotną inkorporację kapu do cząsteczki mRNA.



Rysunek 40 Wybrane struktury analogów kapu stosowanych w syntezie mRNA: kap-0 (A), ARCA (B), β -S-ARCA (C), CleanCap (D).

procesie transkrypcji *in vitro* usuwa się populację niekapowanych mRNA metodami enzymatycznymi. Jednakże, nie rozwiązuje to problemu obniżonej całkowitej wydajności procesu transkrypcji. Mimo, że nie stanowią one odpowiedzi na wszystkie wyzwania syntetyczne, analogi ARCA stanowią obecnie podstawę transkrypcji *in vitro* mRNA. Przez lata opracowane zostały liczne modyfikacje chemiczne analogów ARCA, których celem jest zarówno zwiększenie stabilności struktury kapu i wydajności translacji, jak również kontrola immunogenności syntetycznych transkryptów. Charakter stabilizujący mają na przykład modyfikacje tiofosforanowe,²⁹⁷ imidofosforanowe²⁹⁸ i boranofosforanowe²⁹⁹ wprowadzone w mostku 5',5'-trifosforanowym. Zwiększają one odporność na enzymatyczną degradację struktury kapu przez enzym DCP2, tym samym przyczyniając się do zwiększonej trwałości mRNA w komórkach.³⁰⁰ Najnowszym dokonaniem w dziedzinie syntetycznych analogów kapu jest cząsteczka najpierw przedstawiona w pracy Ishikawa et al.³⁰¹ a następnie wprowadzona na rynek pod nazwą CleanCap przez firmę TriLink. Jest to trinukleotydomowa cząsteczka ($m^7GpppA_{mp}G$), której budowa nie tylko uniemożliwia odwrotną inkorporację na końcu 5' mRNA, ale również skutkuje wydajnością ko-transkrypcyjnego kapingu na poziomie 94%, tym samym niemalże całkowicie eliminując problem niekapowanych transkryptów (Rys. 40D).³⁰²

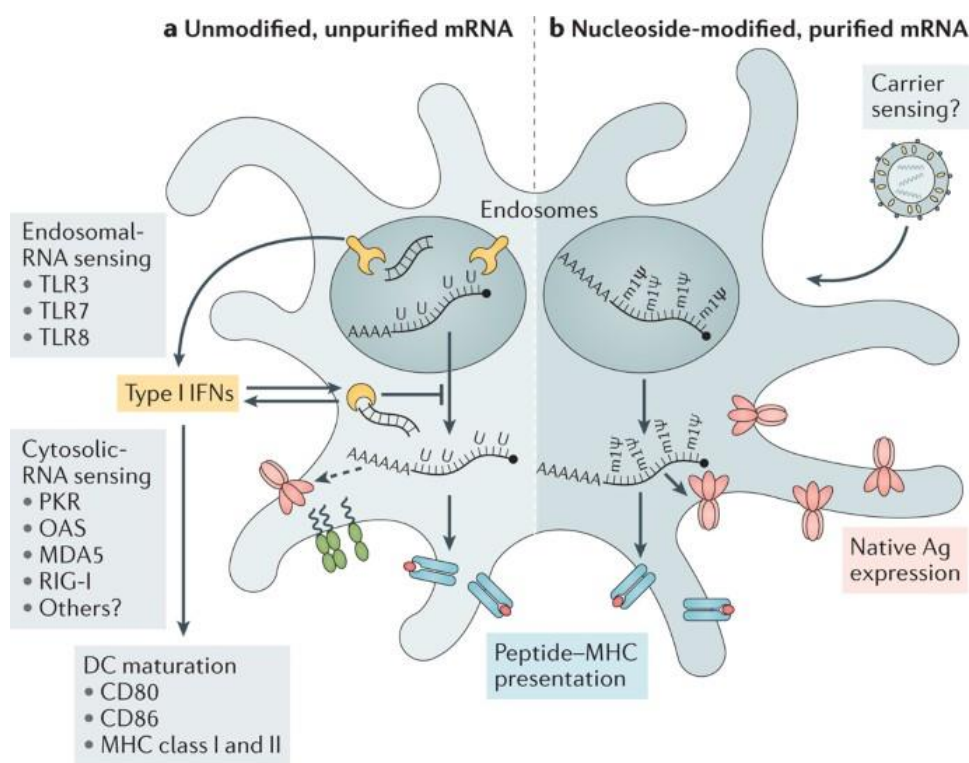
Mianowicie metylacja grupy 3'-OH podjednostki m^7G sprawia, że nie może ona zostać wykorzystana jako pierwszy nukleotyd transkryptu. Zastosowanie wybranych analogów ARCA prowadzi do nawet czterokrotnego zwiększenia wydajności procesu transkrypcji mRNA względem standardowych analogów kapu (Rys. 40C).²⁹⁵ mRNA kapowane strukturą ARCA prowadzą również do znacząco zwiększonej produkcji kodowanego białka.²⁹⁶ Analogi ARCA nie eliminują jednakże innego poważnego problemu związanego z syntezą mRNA *in vitro*. Ponieważ ko-transkrypcyjny kaping wymusza na cząsteczce analogu kapu konkurencję o pierwszą pozycję w łańcuchu z cząsteczką GTP, część powstających cząsteczek mRNA zawsze pozostaje niekapowana. Poza problemem związanym z obecnością cząsteczek mRNA nieaktywnych translacyjnie, niekapowane mRNA posiada na końcu 5' wolny łańcuch trifosforanowy, który znacząco zwiększa immunogenność transkryptów. Z tego względu po

Na koniec należy również wspomnieć o roli sekwencji UTR w regulacji stabilności mRNA. Ponieważ UTR nie biorą bezpośrednio udziału w procesie translacji ani nie są najistotniejszymi elementami strukturalnymi mRNA z punktu widzenia stabilności cząsteczki, wachlarz możliwości z zakresu modyfikacji ich struktury jest bardzo szeroki. Powszechnie

stosowaną praktyką jest wprowadzanie do syntetycznych mRNA sekwencji 3' UTR pochodzącej z α -globiny,³⁰³ a w ostatnich latach przeprowadzono obiecujące badania nad stabilizującymi właściwościami fragmentów 3' UTR pochodzących np. z mitochondrialnych podjednostek 12S rRNA.³⁰⁴ Niekiedy kontrolowane obniżenie stabilności mRNA stanowi istotny czynnik strategii terapeutycznej. Ogromnym atutem cząsteczki mRNA jest dynamika zachodzących z jej udziałem procesów – bardzo szybko po wprowadzeniu do komórki ulega ona procesowi translacji i równie szybko może ona zostać usunięta na drodze naturalnej degradacji. W obu przypadkach są to procesy stosunkowo łatwe do kontrolowania i przewidzenia, dzięki czemu efekt terapeutyczny preparatów mRNA jest również przewidywalny. Praktyką umożliwiającą ograniczenie ekspresji białka kodowanego przez syntetyczne mRNA jest wprowadzenie do 3' UTR sekwencji bogatych w adeninę i uracyl, co prowadzi do przyspieszonej degradacji transkryptu.³⁰⁵

4.2.2. Metody regulacji immunogenności mRNA

Istnieje szereg metod pozwalających na manipulację immunogennością syntetycznych mRNA, od modyfikacji sekwencji i elementów strukturalnych, aż po optymalizację syntezy i oczyszczania transkryptów. Syntetyczne mRNA wprowadzane do żywych komórek ma ogromny potencjał bycia rozpoznany jako cząsteczka pochodzenia patogennego (Rys. 41), tym samym aktywując receptory rozpoznające wzorce (PRR, ang. *pattern recognition receptors*), czyli białka odpowiedzialne za wywołanie nieswoistej odpowiedzi układu odpornościowego.³⁰⁶



Rysunek 41 Schemat reakcji elementów układu odpornościowego komórki dendrytycznej na dwa typy mRNA. Niemodyfikowane, nieoczyszczone mRNA (część a) aktywuje szereg receptorów wykrywających kwasy nukleinowe obcego pochodzenia. Oczyszczone mRNA (część b), zawierające modyfikacje nukleotydowe i zamknięte w cząsteczce nośnika nie wywołuje reakcji immunologicznej komórki. Rysunek zapożyczono z pracy Pardi et al. na podstawie licencji nr 5424721506977.³¹⁰

Białka te aktywowane są zarówno przez jednoniciowe mRNA jak i drugorzędowe struktury mRNA, takie jak spinki do włosów lokalnie przypominające dwuniciowe RNA pochodzenia wirusowego.³⁰⁷ Aktywacja PRR rozpoczyna szereg reakcji sygnałowych prowadzących ostatecznie do wydzielania w komórkach prozapalnych cytokin oraz interferonów

typu I. Częsteczki mRNA mogą również zostać rozpoznane przez helikazy RNA, w szczególności receptory RIG-I oraz MDA5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*) obecne w komórkach nie należących do układu odpornościowego. RIG-I wykrywa przede wszystkim cząsteczki dwuniciowych RNA posiadających wolne grupy fosforanowe na końcu 5', a więc pozbawione struktury kapu.³⁰⁸ Z kolei MDA5 wykrywa długie dwuniciowe mRNA.³⁰⁹

Naturalna immunogenność syntetycznych mRNA, rozumiana tutaj jako reaktogenność, czyli nieswoista odpowiedź układu odpornościowego, może stanowić zarówno atut jak i znaczącą przeszkodę, zależnie od jego docelowego zastosowania terapeutycznego. mRNA w pierwszej kolejności zaczęło cieszyć się zainteresowaniem jako potencjalny składnik aktywny szczepionek antywirusowych. Z jednej strony, efektem wprowadzenia szczepionkowego mRNA do organizmu jest reakcja immunologiczna wywołana obecnością kodowanego przez transkrypt antygenowego białka. Z drugiej strony, samo mRNA może stanowić cel dla komórek układu odpornościowego, pełniąc tym samym rolę własnego adiuwantu. Syntetyczne mRNA o wysokiej immunogenności lokalnie wzmacnia aktywność komórek odpornościowych, potencjalnie prowadząc do poprawy skuteczności preparatu szczepionkowego.³¹¹ Jednakże w przypadku zastosowań mRNA spoza zakresu immunoterapii, immunogenność mRNA nie jest efektem pożądanym i może znacząco ograniczyć skuteczność danej strategii terapeutycznej.

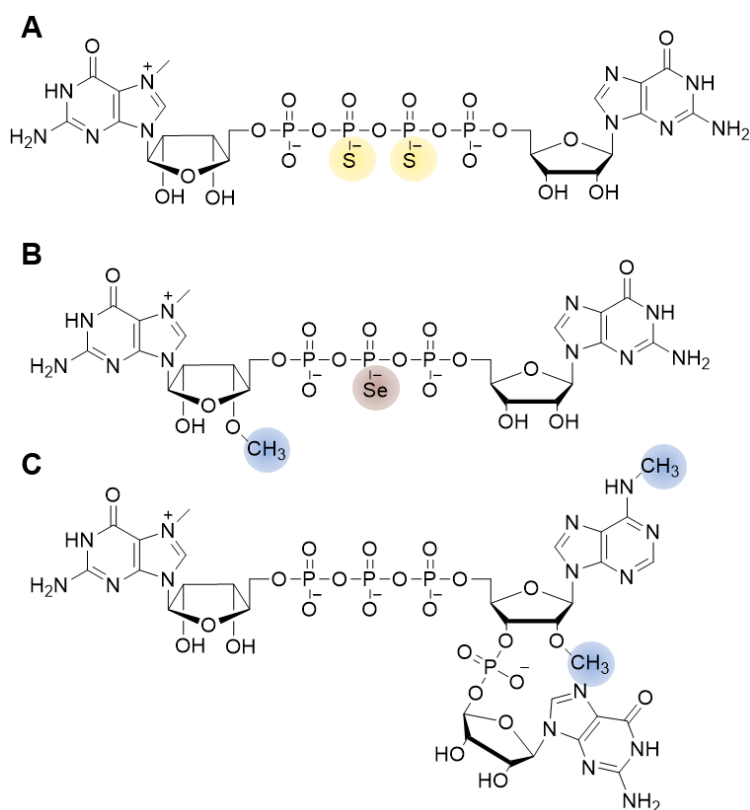
Efektem transkrypcji *in vitro* jest występowanie zarówno populacji mRNA niekapowanych, jak i mRNA dwuniciowych, a więc cząsteczek o wysokiej immunogenności. W poprzednim podrozdziale opisałam techniki eliminacji mRNA niekapowanych. Niezwykle skuteczną metodą usuwania cząsteczek dwuniciowych jest oczyszczanie syntetycznych mRNA metodami chromatograficznymi. W szczególności techniki HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) oraz FPLC (ang. *fast protein liquid chromatography*) pozwalają na otrzymanie mRNA wysokiej czystości i o znacząco obniżonej immunogenności.³¹² Oczyszczanie mRNA metodą FPLC może skutkować zwiększeniem ekspresji białka nawet 1000-krotnie w ludzkich komórkach dendrytycznych.

Jedną z najczęściej stosowanych technik ograniczania immunogenności mRNA jest wprowadzanie do jego sekwencji naturalnie występujących, modyfikowanych nukleotydów. Już w roku 2008 dowiedziono, że pseudourydyna nie tylko poprawia stabilność mRNA, ale również zapobiega rozpoznaniu mRNA przez kinazy białkowe R oraz receptory RIG-I.¹²⁴ Również zastąpienie 25% urydyn oraz cytydyn w sekwencji przez 5-metylocydyne oraz 2-tiourydyne ogranicza reakcję immunologiczną i prowadzi do zwiększonej ekspresji białka.³¹³ Opisana w ostatnich latach N¹-metylopseudourydyna nawet 13-krotnie zwiększa potencjał translacyjny mRNA względem transkryptów modyfikowanych pseudourydyną.³¹⁴

Podczas omawiania naturalnych modyfikacji nukleotydowych mRNA, wspomniałam jak istotną funkcję stanowią modyfikacje zawarte w obrębie struktury 5' kapu. W szczególności metylacja grupy 2'-OH pierwszego, a niekiedy również drugiego, nukleotydu transkryptu pozwala elementom układu odpornościowego na odróżnienie mRNA komórkowego od kwasów nukleinowych pochodzenia zewnętrznego, np. wirusowego. mRNA eukariotyczne występujące naturalnie w komórkach nigdy nie posiada na końcu 5' struktury kapu 0.³¹⁵ Z tego względu mRNA o docelowo niskiej immunogenności powinno zawierać strukturę 5' kapu o odpowiednim profilu metylacji poszczególnych grup.

4.2.3. Regulacja potencjału translacyjnego syntetycznych mRNA

Ostateczny potencjał translacyjny danej cząsteczki mRNA w dużej mierze zależy od procesów komórkowych niemających bezpośredniego związku ze zjawiskiem translacji. Kluczową rolę gra przede wszystkim stabilność transkryptu, ponieważ im większa jest jego przeżywalność w komórce, tym dłużej trwa proces aktywnej syntezy kodowanego białka. Z tego względu wiele modyfikacji chemicznych i strukturalnych, których celem jest ostatecznie poprawa potencjału translacyjnego mRNA, zmniejszeniu podatności transkryptu na degradację enzymatyczną. Jednakże, istnieje również szereg metod pozwalających na bezpośrednią regulację wydajności procesu inicjacji translacji, na przykład poprzez zwiększenie powinowactwa do białek maszyneryi translacyjnej.



Rysunek 42 Wybrane struktury analogów 5' kapu zawierające modyfikacje zwiększające potencjał translacyjny cząsteczki mRNA: analog di-tiotetrafosforanowy (A), β -Se-ARCA (B), analog trinukleotydowy m^7Gpppm^6AmpG (C).

5' kap mRNA posiada dwie podstawowe funkcje – chroni mRNA przed przedwczesną degradacją oraz uczestniczy w inicjacji procesu translacji poprzez rekrutację białka eIF4E. W poprzedniej części rozdziału podałam kilka przykładów modyfikacji struktury 5' kapu, których głównym celem była poprawa jego stabilności enzymatycznej, przekładającej się na wydajniejszą ekspresję białka poprzez wydłużenie czasu życia mRNA w komórce. W ostatnich latach opublikowano szereg badań przedstawiających modyfikacje 5' kapu prowadzące do zwiększenia powinowactwa owej cząsteczki do białka eIF4E.

W pracy z roku 2016 autorstwa Strenkowska et al. przedstawiono zestaw modyfikacji mostka 5',5'-trifosforanowego stabilizujących

oddziaływanie struktury kapu z eIF4E.³¹⁶ Wprowadzono modyfikacje takie jak wydłużenie mostka do tetrafosforanu, jak również zastosowanie jednej lub dwóch grup tiofosforanowych w pozycjach α i/lub β oraz β i/lub γ (Rys. 42A). Najwyższą wartość powinowactwa do eIF4E zaobserwowano dla analogów kapu posiadających mostek tetrafosforanowy i zawierających modyfikacje tiofosforanowe w pozycjach β/γ . Znalazło to swoje odzwierciedlenie w badaniach wydajności translacji z udziałem mRNA posiadających na końcu 5' wspomniane struktury kapu. Analogi kapu wykazujące najwyższe powinowactwo do eIF4E przyczyniły się do zwiększenia wydajności translacji mRNA blisko 3-krotnie względem mRNA zakończonych strukturą kapu 0. Podobnie obiecujące wyniki osiągnięto stosując modyfikacje seleniofosforanowe mostka (Rys. 42B).³¹⁷ Z pomocą badań krystalograficznych wykazano, że elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy atomami siarki lub selenu zawartymi w mostku fosforanowym stabilizują oddziaływania z kieszenią wiążącą białka eIF4E. Rola metylacji poszczególnych grup w strukturze kapu została już wielokrotnie wspomniana w kontekście rozpoznawania końca 5' eukariotycznych mRNA przez

białka oddziałujące z kapem. W ostatnich latach zbadano wpływ metylacji grupy 2'-OH pierwszego nukleotydu transkryptu, a w przypadku znajdującej się na tej pozycji adenozyiny również N6-metylacji, na powinowactwo do eIF4E oraz potencjał translacyjny mRNA (Rys. 42C).³¹⁸ Co ciekawe, obecność dodatkowych grup metylowych w obrębie pierwszego nukleotydu sekwencji mRNA nie wpłynęła znacząco na oddziaływanie z eIF4E. Równocześnie, w komórkach dendrytycznych zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji białka z udziałem niektórych transkryptów kapowanych wspomnianymi analogami końca 5'.

Omawiając zjawisko inicjacji translacji wspomniałam, że budowa odcinka 5' UTR mRNA ma znaczący wpływ na poziom ekspresji białka kodowanego przez konkretne transkrypty. Mianowicie, długie odcinki 5' UTR bogate w zasady GC i tworzące trwałe struktury drugorzędowe, jak G-kwadrukpleksy RNA, w zdecydowanej większości przypadków hamują proces translacji poprzez blokowanie migracji podjednostki rybosomalnej 40S wzdłuż łańcucha. Istnieją nieliczne wyjątki sekwencji 5' UTR, których struktura drugorzędowa z pozoru niekorzystna z punktu widzenia inicjacji translacji jest sprawnie linearyzowana przez białko eIF4A.³¹⁹ Na chwilę obecną w strukturach IVT mRNA wykorzystuje się szereg wybranych sekwencji 5' UTR, znanych ze skutecznego promowania inicjacji translacji. Do najpopularniejszych należą 5' UTR α - i β -globiny, najczęściej stosowane w połączeniu z 3' UTR tego samego pochodzenia. UTR z mRNA ludzkiego białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock protein*) oraz wybrane UTR pochodzenia wirusowego również są często stosowane w budowie syntetycznych transkryptów.^{320,241} Wymienione sekwencje 5' UTR wykorzystywane są przede wszystkim w celu promowania inicjacji translacji zależnej od kapu. Należy zaznaczyć, że dostępny jest również alternatywny mechanizm, w którym podjednostka rybosomalna wiąże się do mRNA nie za pośrednictwem kapu, zamiast tego oddziałując z zawartą w 5' UTR sekwencją IRES (ang. *internal ribosomal entry site*).³²¹ Obecność sekwencji IRES pozwala na niezależną od kapu, uniwersalną translację mRNA, nawet w sytuacji niskiego stężenia eIF4E w komórkach. Przykładowo, IRES pochodząca z mRNA kardiowirusa A pozwala na wydajną ekspresję białek bez potrzeby wprowadzania struktury kapu na końcu 5' mRNA.³²² Poza procesem inicjacji translacji, kap pełni również niezwykle istotną funkcję jaką jest ochrona mRNA przed degradacją. Dlatego też większość syntetycznych mRNA zawiera zarówno odpowiednią, niekiedy chemicznie modyfikowaną, strukturę kapu oraz sekwencję IRES w 5' UTR w celu wzmocnienia potencjału translacyjnego konstruktów. Po przyłączeniu rybosomu do mRNA, czy to poprzez interakcję z końcem 5' czy w sposób niezależny od kapu, dochodzi do rozpoznania kodonu start (AUG) w obrębie sekwencji Kozak. Sekwencję Kozak również można poddać optymalizacji w celu poprawy wydajności translacji.³²³ Na koniec należy wspomnieć, że 3' UTR pełni przede wszystkim rolę stabilizującą w cząsteczce mRNA, choć zauważono, że 3' UTR β -globiny zwiększa również potencjał translacyjny mRNA. Najoptymalniejsze wyniki otrzymano stosując dwie następujące po sobie sekwencje 3' UTR β -globiny.³⁰³

4.2.4. Modyfikacje ogona poli(A)

Podczas gdy modyfikacje struktury 5' kapu opracowywane są już od kilku dziesięcioleci, badania nad modyfikacjami ogona poli(A) trwają znacznie krócej. Obecny stan rzeczy nie jest jednakże wynikiem braku zainteresowania badaczy, lub niskiego potencjału związanego z rozwojem modyfikacji poli(A), a raczej wynika z problemów natury technicznej, które opisane zostały w poniższym rozdziale. Problemy te są w ostatnich latach skutecznie rozwiązywane, w wyniku czego już w trakcie trwania mojego projektu doktorskiego ukazało się kilka bardzo ciekawych i ważnych prac związanych z modyfikacjami poli(A) i ich wpływem na potencjał terapeutyczny mRNA. Ogon poli(A) nie stanowi elementu sekwencji kodującej i nie bierze bezpośredniego udziału w procesie biosyntezy białek. Można więc założyć, że jego modyfikacje nie zaburzają wiązania rybosomów, co mogłoby prowadzić do obniżenia wydajności

procesu translacji. Poli(A) stanowi zatem ciekawy obiekt badań w kontekście opracowywania mRNA o potencjale terapeutycznym - jest to element strukturalny, w obrębie którego wprowadzać można różnego rodzaju modyfikacje promujące stabilność całej cząsteczki mRNA i zwiększające jej potencjał translacyjny.

W przeciwieństwie do 5' kapu, ogon poli(A) nie ma zwartej i chemicznie charakterystycznej struktury, stanowi za to ciąg nukleotydów obecnych również w całej cząsteczce mRNA. Istnieje kilka niezależnych sposobów na wprowadzanie modyfikacji w obrębie ogona poli(A), a każdy związany jest z innymi ograniczeniami. Pierwsza metoda polega na zastosowaniu modyfikowanych 5'-trifosforanów adenozyiny podczas syntezy mRNA *in vitro* na matrycy DNA, w której zakodowana jest sekwencja poli(A). W efekcie tego podejścia enzymatycznie syntezowane są cząsteczki mRNA posiadające poli(A) o określonej długości i zawierające modyfikowane podjednostki. Metoda ta wiąże się z dwoma głównymi ograniczeniami. Pierwsze z nich wynika z preferencji substratowych polimeraz RNA wykorzystywanych w transkrypcji *in vitro*. Wszelkiego rodzaju modyfikacje struktury 5'-trifosforanów nukleotydów, w tym ATP, mogą osłabić ich rozpoznawalność przez polimerazy RNA i tym samym obniżyć wydajność całego procesu transkrypcji. W kolejnym rozdziale poświęconym metodom syntezy cząsteczek RNA opiszę krótko zagadnienie specyficzności substratowej polimeraz RNA dzikiego typu i ich mutantów. Drugim ograniczeniem metody polegającej na wykorzystaniu modyfikowanych cząsteczek ATP jest fakt, że są one wbudowywane w całą strukturę mRNA, a więc nie tylko w poli(A), ale również w obrębie otwartej ramki odczytu kodującej białko. W pracy Strzelecka et al. zostało dowiedzione, że zastosowanie cząsteczek ATP α S, a więc zawierających modyfikację tiofosforanową, obniża zarówno wydajność transkrypcji, jak i powoduje znaczący spadek potencjału translacyjnego wraz ze wzrostem liczby modyfikowanych podjednostek w strukturze mRNA.¹⁰⁴ Można więc wnioskować, że opisana metoda modyfikacji poli(A) jest na tyle niespecyficzna i nieprecyzyjna, że może prowadzić do znaczącej liczby nieprzewidzianych efektów i skutków ubocznych. Tym samym nie stanowi optymalnego rozwiązania w kontekście otrzymywania cząsteczek mRNA o potencjale terapeutycznym

Inna metoda modyfikacji ogona poli(A) polega na post-transkrypcyjnym przyłączeniu do końca 3' mRNA sekwencji poliadenylowej przy zastosowaniu modyfikowanych cząsteczek ATP i polimerazy poli(A) (PAP). Dzięki temu podejściu można uniknąć wprowadzenia modyfikowanych nukleotydów do sekwencji kodującej białko, a pożądane modyfikacje znajdują się tylko w obrębie struktury poli(A). Owo podejście również posiada dwa zasadnicze ograniczenia. Pierwsze z nich związane jest z niejednorodną długością sekwencji poli(A) generowanych przez PAP bez udziału matrycy DNA. Do pewnego stopnia możliwe jest kontrolowanie warunków reakcji enzymatycznej poliadenylacji tak, by uzyskać mRNA o ogonach poli(A) zbliżonej długości. Jednakże jest to podejście na tyle niedokładne, że w wyniku każdej reakcji otrzymuje się frakcje mRNA o ogonach poli(A) różniących się długością nawet o kilkadziesiąt podjednostek.[strzelecka] Efekt ten dodatkowo potęgowany jest w przypadku zastosowania modyfikowanych cząsteczek ATP – większość polimeraz poli(A), podobnie jak inne transferazy nukleotydowe, wykazuje wysoką specyficzność substratową.³²⁴ Modyfikacje nukleotydowe, zwłaszcza znajdujące się w obrębie zasady azotowej, mogą powodować znaczące spowolnienie, a nawet wstrzymanie procesu polimeryzacji.³²⁵ W syntezie mRNA o potencjale terapeutycznym powtarzalność i precyzja oraz jednoznaczność struktury i wynikających z niej właściwości transkryptów są kluczowe. Dlatego też owa strategia modyfikacji poli(A) najpewniej nie znajdzie zastosowania w otrzymywaniu terapeutycznych mRNA, ale może być korzystna na potrzeby syntezy mRNA do celów badawczych. Jeden z przykładów modyfikacji ogona poli(A) z użyciem PAP zaprezentowany został w pracy autorstwa Anhäuser et al. z roku 2019.³²⁶ Do końca 3' mRNA przyłączone zostały

podjednostki zawierające modyfikację azydkową, umożliwiającą również fluorescencyjne znakowanie i wizualizację mRNA w żywych komórkach i organizmach modelowych, czego dowiedziono w późniejszej pracy.³²⁷ Sama obecność grupy azydkowej nie wpływała znacząco na potencjał translacyjny mRNA, podczas gdy na podstawie mRNA poddanego znakowaniu fluorescencyjnemu powstawało nawet 3-krotnie więcej białka. Zastosowane modyfikacje są więc korzystne pod kątem zwiększania potencjału translacyjnego syntetycznych mRNA, jak również umożliwiają wizualizację transkryptów *in vivo*.

W rozdziale 2 wspomniałam o występowaniu u niektórych organizmów cząsteczek mRNA posiadających ogony poli(A) o segmentowej strukturze. Wstawki w postaci pojedynczych nukleotydów lub całych fragmentów sekwencji niebędących adeniną, blokują degradację enzymatyczną przeprowadzaną przez komórkowe deadenylazy. Może to skutkować znacząco zwiększoną ekspresją białka kodowanego przez tak zmodyfikowane mRNA.³²⁸ Zjawisko to wykorzystane zostało podczas opracowywania szczepionek przeciw SARS-CoV-2 opartych na strukturze mRNA, wprowadzonych na rynek przez Pfizer-BioNTech.³²⁹ Przykład zastosowania tego typu modyfikacji poli(A) przedstawiony został w pracy Li et al.¹³⁵ Autorzy opisują korzystny wpływ obecności cytydyny w sekwencji poli(A) syntetycznych cząsteczek mRNA na ich trwałość zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Efekt ten przekładał się na zwiększoną produkcję białek kodowanych przez modyfikowane mRNA. Autorzy pracy wskazują, że wydłużony czas życia modyfikowanych mRNA wynika przede wszystkim z zahamowania aktywności kompleksu deadenylującego CCR4-NOT, a w szczególności jego dwóch podjednostek katalitycznych CNOT6L oraz CNOT7. Owe podjednostki wykazują znacznie obniżoną wydajność usuwania cytydyny z sekwencji poli(A) względem ich naturalnego substratu, czyli adenozyne. Szczególnie korzystny efekt zaobserwowano, gdy około 20% sekwencji poli(A) zastąpiono cytydyną, zwłaszcza w sytuacji skupienia modyfikacji w pobliżu końca 3'.

W pracy Krawczyk et al. (nieopublikowanej w momencie pisania niniejszej rozprawy doktorskiej) wykazano, że opracowane przez Modernę mRNA-1273, będące szczepionką przeciw wirusowi SARS-CoV-2, zawiera modyfikację końca 3' o szczególnie interesujących właściwościach.³³⁰ mRNA-1273 posiada ogon poli(A) długości około 100 adenozyne zakończony sekwencją mΨCmΨAG. Owa sekwencja zakodowana jest w matrycowym DNA i jest najpewniej pozostałością po cięciu matrycy przez enzymy restrykcyjne. mRNA-1273 ulega re-adenylacji, a więc enzymatycznemu wydłużeniu ogona poli(A), w przypadku podania preparatu domięśniowo. Szczegółowe badania prowadzone w komórkach układu odpornościowego dowiodły, że w makrofagach sekwencja mΨCmΨAG jest usuwana, a następnie do końca 3' szczepionkowego mRNA dołączane są nowe podjednostki A, w efekcie czego długość ogona poli(A) sięga nawet 200 adenozyne. Autorzy pracy postulują, że opisane przez nich właściwości mRNA-1273 przekładają się na wysoką skuteczność preparatu szczepionkowego, jak również stwarzają nowe możliwości poprawy właściwości preparatów opracowywanych w przyszłości.

Ostatnią omawianą przeze mnie metodą modyfikacji ogona poli(A) jest post-transkrypcyjne przyłączanie do końca 3' cząsteczek RNA nukleotydów lub oligonukleotydów na drodze enzymatycznej ligacji. Ligazy RNA i DNA, na przykład powszechnie stosowana ligaza T4 RNA 1, katalizują połączenie dwóch fragmentów kwasów nukleinowych. Z użyciem ligazy T4 RNA 1 możliwe jest przyłączenie do końca 3' dowolnego prekursora RNA oligonukleotydu o długości nawet kilkudziesięciu podjednostek. Ograniczenie stanowi potrzeba występowania grupy fosforanowej na końcu 5' oligonukleotydu (donora) oraz wolnej grupy 3'-OH na końcu 3' (akceptora) wyjściowej cząsteczki RNA. Przyłączane oligonukleotydy mogą zostać otrzymane na drodze syntezy chemicznej i zawierać różnego rodzaju modyfikacje nukleotydowe, w tym modyfikacje uniemożliwiające wielokrotną ligację do końca 3' prekursora RNA. Opisana strategia

jest korzystna zarówno pod kątem różnorodności potencjalnych modyfikacji końca 3' mRNA, jak i precyzji ich wprowadzania. Nie licząc ewentualnych wyzwań syntetycznych związanych z otrzymywaniem modyfikowanych oligonukleotydów, jedynym znaczącym ograniczeniem owej metody jest specyfika substratowa ligaz RNA. Przykładowo, ligaza T4 RNA 1 wykazuje preferencje względem nukleotydów akceptora ($A > G \geq C > U$) oraz donora ($pC > pU > pA > pG$),³³¹ jak również niektóre z modyfikacji chemicznych akceptowane są tylko w pewnym oddaleniu od miejsca łączenia.³³² Przykład owej strategii zaprezentowany został w pracy z roku 2022 autorstwa Aditham et al.³³³ We wspomnianej pracy przedstawiona została idea przyłączenia fragmentów oligonukleotydowych do końca 3' mRNA w celu zwiększenia stabilności transkryptów. Autorzy pracy zaprojektowali szereg 5'-fosforylowanych oligonukleotydów, zawierających zarówno sekwencje RNA jak i DNA, zawierających różnego rodzaju modyfikacje chemiczne i strukturalne. Ostatecznie wykazali, że zwłaszcza obecność tiofosforanów oraz G-kwadrupleksów DNA zwiększa stabilność i przeżywalność mRNA kodującego fluorescencyjne białko GFP w komórkach HeLa względem kontrolnych transkryptów. W efekcie zastosowanych modyfikacji udało się osiągnąć nawet 3-krotnie zwiększoną produkcję białka. Autorzy zbadali również cytotoksyczność oraz immunogenność modyfikowanych mRNA. Dowiedziono, że obecność tiofosforanów, wiązań DNA-RNA oraz podjednostek hamujących polimeryzację nie jest toksyczna dla komórek HeLa, jak również nie wywołuje większej odpowiedzi immunologicznej w komórkach względem kontrolnych cząsteczek mRNA. Ze względu na jej szczególne zalety i szeroki wachlarz możliwości doboru modyfikacji nukleotydowych, to właśnie strategia modyfikacji końców 3' RNA metodą enzymatycznej ligacji została przeze mnie wykorzystana w drugiej części projektu doktorskiego.

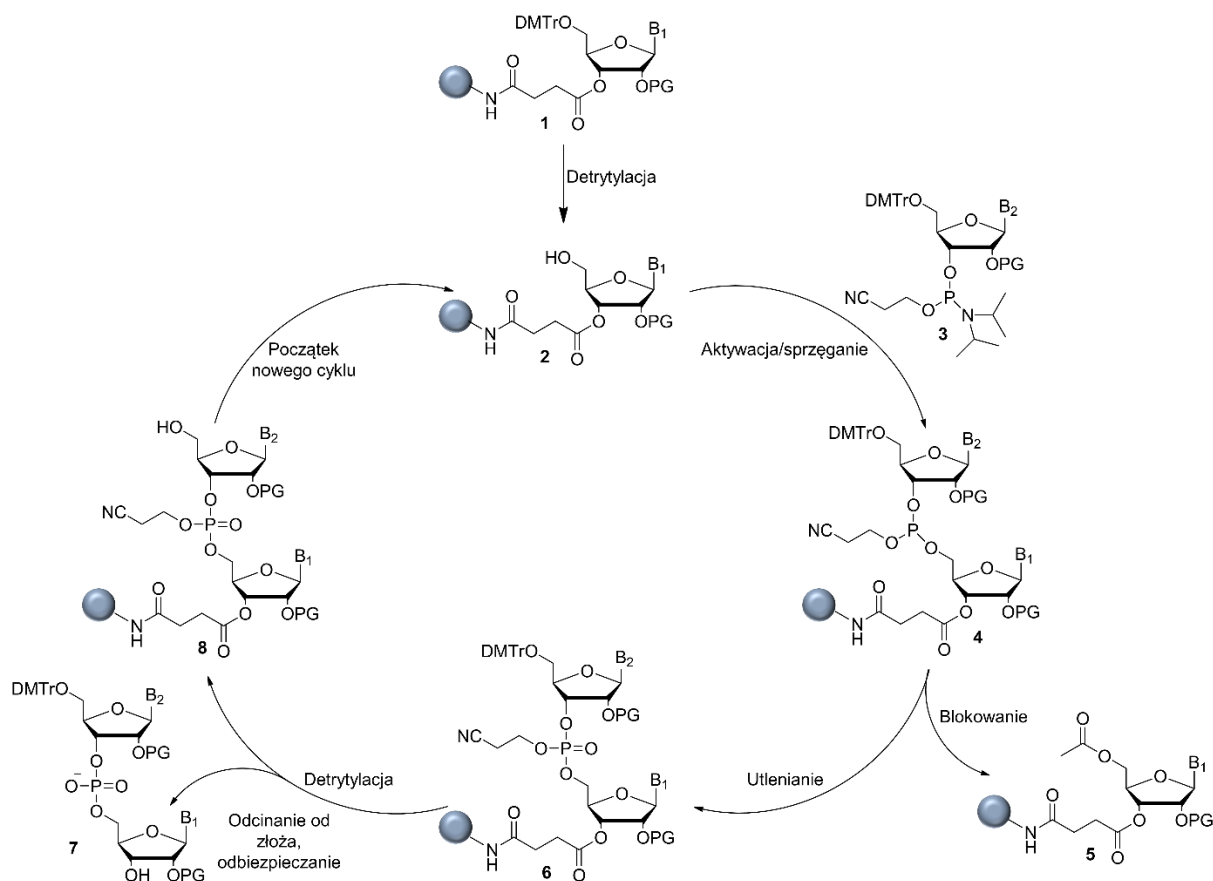
Na koniec chciałabym również wspomnieć o istotnej kwestii związanej z projektowaniem syntetycznych mRNA, a mianowicie optymalnej długości ogona poli(A). Podobnie jak w przypadku 5' kapu, regulacja potencjału translacyjnego mRNA poprzez manipulację strukturą ogona poli(A) wynika przede wszystkim z jego stabilizujących właściwości umożliwiających dłuższą przeżywalność mRNA w komórce. Na chwilę obecną w cząsteczkach syntetycznych mRNA najczęściej stosuje się poli(A) o długości 64-150 adenozyń,^{334,335} choć dostępne są badania, które wykazały, że optymalna długość poli(A) silnie zależy od typu komórek, w których zachodzi translacja. Przykładowo, komórki HeLa wykazują najwyższy poziom ekspresji białek z udziałem mRNA o poli(A) długości 40-98 adenozyń.³³⁶ Z kolei w komórkach dendrytycznych produkcja białek osiąga maksimum dla mRNA z ogonem o długości około 120 adenozyń.²²² Dowiedziono również, że obecność ogona poli(A) o długości przynajmniej 150 adenozyń znacząco ogranicza immunogenność mRNA.³³⁷ Długie sekwencje poli(A) mają więc potencjał nie tylko zwiększenia stabilności syntetycznego transkryptu, ale również ograniczenia odpowiedzi układu odpornościowego na jego obecność.

5. Metody otrzymywania syntetycznych oligorybonukleotydów, RNA oraz mRNA

W poprzednich rozdziałach szczegółowo opisałam możliwość wykorzystania oligonukleotydów, RNA oraz syntetycznych mRNA do celów zarówno terapeutycznych, jak i badawczych. Poruszona została tematyka wprowadzania do struktur wspomnianych cząsteczek chemicznych modyfikacji, pozwalających na manipulację ich strukturą przestrzenną, stabilnością i właściwościami biologicznymi oraz farmakokinetycznymi. Wyobrażenia i wiedza badacza są niezbędne dla dokonania każdego odkrycia i opracowania dowolnej metody, jednakże w przypadku skomplikowanych biomolekuł, jakimi są kwasy nukleinowe, to możliwości syntetyczne stanowią często największe wyzwanie. Niniejszy rozdział chciałabym poświęcić przedstawieniu podstawowych informacji dotyczących otrzymywania cząsteczek RNA, od krótkich oligonukleotydów po biologicznie aktywne mRNA. Omówione zostaną dwie podstawowe metody syntetyczne – synteza w fazie stałej oraz transkrypcja *in vitro*. W kontekście wspomnianych metod przedstawione zostaną również sposoby wprowadzania wybranych modyfikacji chemicznych do struktur RNA.

5.1. Otrzymywanie kwasów rybonukleinowych metodą syntezy w fazie stałej

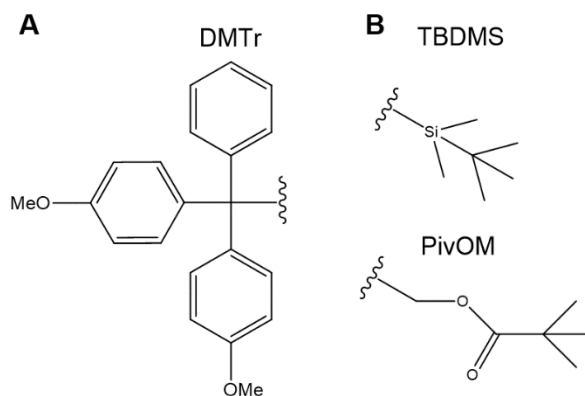
Najczęściej stosowaną metodą otrzymywania oligorybonukleotydów jest chemia amidofosforynów. Metoda ta opracowana została w latach 80. bieglego wieku przez parę badaczy, Beaucage'a i Caruthersa, w celu otrzymywania syntetycznych cząsteczek DNA o ustalonej sekwencji oraz długości do ~150 podjednostek.³³⁸ Z pozoru zaadaptowanie dobrze ustalonej metody syntezy oligonukleotydów DNA na potrzeby otrzymywania RNA stanowiło proste zadanie. Jednakże kluczowa różnica w strukturze owych kwasów nukleinowych, a więc obecność wysoce reaktywnej grupy 2'-OH w obrębie rybozy RNA, znacząco komplikuje owo zadanie. W celu uniknięcia niepożądanych reakcji pobocznych, grupy hydroksylowe oraz egzocykliczne grupy aminowe nukleozydu są odpowiednio chemicznie zabezpieczone, co w efekcie prowadzi do powstania amidofosforynu nukleozydu (3).³³⁹ W przypadku oligonukleotydów RNA wymagane jest wprowadzenie dodatkowej grupy zabezpieczającej grupy 2'-OH do struktury amidofosforynu, co wydłuża proces otrzymywania podjednostki oraz najczęściej obniża końcową wydajność syntezy. Synteza metodą amidofosforynową przebiega wedle cyklicznego protokołu, składającego się z szeregu etapów odbezpieczania wybranych grup funkcyjnych amidofosforynów i sprzęgania nowej podjednostki z końcem 5' powstającego oligonukleotydu.³⁴⁰ Synteza rozpoczyna się od pierwszego rybonukleozydu kowalencyjnie związanego ze stałym, nierozpuszczalnym podłożem (najczęściej z porowatego szkła lub polistyrenu). Ogólny schemat cyklu syntetycznego przedstawiony jest na Rysunku 43.



Rysunek 43 Ogólny schemat cyklu syntezy oligonukleotydu RNA metodą amidofosforynową. B₁/B₂ – naturalne bądź modyfikowane zasady kwasów nukleinowych; DMTr – grupa zabezpieczająca dimetoksytrytylowa; PG – wybrana grupa zabezpieczająca w pozycji 2'-OH.

5.1.1. Etapy syntezy w fazie stałej wraz z omówieniem grup zabezpieczających

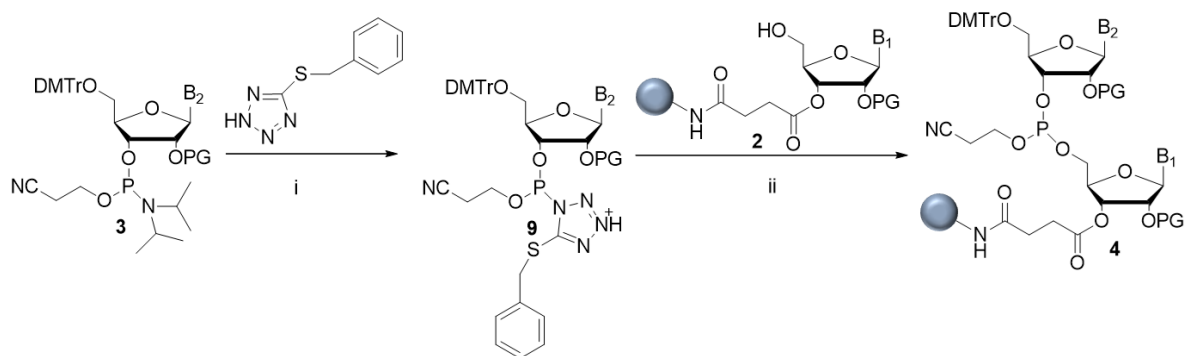
Pierwszym krokiem cyklu w syntezie metodą amidofosforynową jest odbezpieczenie grupy 5'-OH w kwasowych warunkach (2). Krok ten nazywa się często detritylacją, ponieważ prawie bez wyjątku do zabezpieczenia grupy 5'-OH wykorzystuje się pochodne trytylowe. Najczęściej stosowaną grupą zabezpieczającą jest DMTr (ang. 4,4'-Dimethoxytrityl; Rys. 44A).³³⁹



Rysunek 44 Wybrane grupy zabezpieczające stosowane w chemii amidofosforynowej. Grupa zabezpieczająca DMTr (A); grupy zabezpieczające 2'-OH (B).

Metoksyłowe pochodne tritylu są popularne nie tylko ze względu na łatwość w zastosowaniu syntetycznym, ale również w warunkach kwasowych tworzą one barwne, silnie absorbujące kationy, co znacząco ułatwia obserwację postępu i wydajności reakcji po każdym zakończonym cyklu syntezy. W efekcie detrytylacji związany z podłożem stałym nukleozyd posiada wolną grupę 5'-OH, do której przyłączona może zostać kolejna podjednostka łańcucha.

Znajdująca się w pozycji 3' grupa fosforynowa kolejnego amidofosforynu musi ulec aktywacji, aby możliwe było wydajne przyłączenie podjednostki do rosnącego łańcucha RNA (3). Najczęściej stosowanym aktywatorem jest BMT (ang. 5-benzylmercaptotetrazole), zapewniający wysoką wydajność etapu sprzęgania.³⁴¹ Jego wykorzystanie umożliwia otrzymanie nawet bardzo długich łańcuchów RNA (do ~110 podjednostek).³⁴² Jednakże, należy zaznaczyć, że z wykorzystaniem obecnie dostępnych metod syntetycznych otrzymanie łańcucha dłuższego niż ~60 podjednostek z zadowalającą wydajnością nie jest osiągalne. Powstający przejściowo kompleks tetrazolowy (9) pełni rolę grupy odchodzącej w momencie ataku nukleofilowego grupy 5'-OH ostatniej podjednostki oligonukleotydu (Rys. 45). W efekcie dochodzi do utworzenia wiązania fosfortriestrowego pomiędzy kolejnymi podjednostkami łańcucha (4).



Rysunek 45 Schemat aktywacji oraz sprzęgania kolejnej podjednostki łańcucha oligonukleotydu RNA. Aktywacja amidofosforynu z udziałem kwasowego azolu, tutaj BMT (i); podstawienie nukleofilowe przez grupę 5'-OH oligonukleotydu (ii).

Etap sprzęgania charakteryzuje się najczęściej wysoką wydajnością, bliską 100%. Jednakże osiągnięcie dokładnie 100% wydajności jest niezwykle mało prawdopodobne i z tego względu przynajmniej niewielka część oligonukleotydów nie ulegnie wydłużeniu o kolejną podjednostkę w każdym cyklu syntezy. W celu uniemożliwienia powstawania trudnych do wykrycia niekompletnych produktów, posiadających w środku sekwencji pojedyncze delecje, wolne grupy 5'-OH są permanentnie blokowane po każdym etapie sprzęgania (5). Odczynnik blokujący, potocznie znany jako Cap B, zawierający bezwodnik octowy i lutydynę z dodatkiem 4-(dimetyloamino)pirydyny, estryfikuje nieprzereagowane grupy 5'-OH i skutecznie uniemożliwia wydłużanie nieprawidłowych sekwencji. Ostatnim etapem cyklu jest utlenianie niestabilnego fosforynu powstającego w wyniku sprzęgania, do stabilnego fosforanu (6). Utlenianie zachodzi najczęściej w obecności jodu, w roztworze wodno-organicznym. Dalsze wydłużanie łańcucha oligonukleotydu wymaga ponownej detrytylacji grupy 5'-OH, co umożliwia przyłączenie kolejnej podjednostki w następnym cyklu syntetycznym (8). Po zakończonej syntezie gotowe oligonukleotydy odcinane są od stałego podłoża w warunkach zasadowych, np. poprzez działanie stężonego roztworu amoniaku. Równocześnie zabezpieczeniu ulegają grupy fosforanowe oraz egzocykliczne grupy obecne w zasadach nukleotydów, a w ostatniej kolejności zabezpieczana jest grupa 2'-OH (7).

Jak już wspomniałam, to skuteczne zabezpieczenie grupy 2'-OH stanowiło największe wyzwanie na początkowych etapach rozwoju chemii amidofosforynowej RNA. Kluczową kwestią

było niedopuszczenie do powstawania produktów ubocznych na skutek utworzenia wiązania w pozycji 2' kolejnego nukleotydu, zamiast pożądanego wiązania w pozycji 3'. Z tego względu grupa zabezpieczająca 2'-OH musi pozostać stabilnie związana przez wszystkie etapy detrytylacji, utleniania czy odbezpieczania egzocyklicznych grup aminowych. Równocześnie musi być możliwa do usunięcia w jednym kroku po zakończeniu wszystkich innych etapów syntezy i odbezpieczania. Nie może również ulegać migracji do pozycji 3' rybozy ani blokować etapów aktywacji i sprzęgania. Najczęściej stosowane są grupy zabezpieczające podatne na usuwanie w obecności jonów fluorkowych. Dobrym przykładem jest *tert*-butylodimetylosilil (TBDMS; Rys. 44B), spełniający wszystkie założenia dobrej grupy zabezpieczającej.³⁴³ Jedyną wadą jest rozmiar owej grupy, przez obecność której spada wydajność sprzęgania, a jego czas wydłuża się kilkukrotnie dla łańcuchów RNA względem syntezy DNA. Problem wydajności sprzęgania został w dużej mierze rozwiązany wraz z wprowadzeniem skutecznych aktywatorów, jak wspomniany już BMT. Dobrą alternatywą w syntezie krótkich łańcuchów jest grupa PivOM (ang. *privaloxyloxymethyl*; Rys. 44B),³⁴⁴ pozwalająca na około 5-krotnie krótszy czas sprzęgania względem TBDMS.

5.1.2. Synteza RNA zawierających chemiczne modyfikacje

W rozdziale drugim omówiłam modyfikowane nukleotydy w kontekście ich naturalnego występowania w strukturach RNA oraz zastosowania w ramach celowej modyfikacji syntetycznych łańcuchów. Wspomniałam o możliwości wprowadzania modyfikowanych podjednostek do RNA syntezowanych zarówno enzymatycznie *in vitro* jak i metodą amidofosforynową. W obecnej części pracy chciałabym na kilku przykładach omówić metody chemicznych modyfikacji RNA w ramach syntezy w fazie stałej.

Jedną z najczęściej stosowanych modyfikacji syntetycznych RNA jest wprowadzenie do łańcucha grup tiofosforanowych. Ich obecność bardzo skutecznie zabezpiecza cząsteczki RNA przed degradacją enzymatyczną, znacząco zwiększając ich żywotność w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Modyfikacja polegająca na zastąpieniu jednego z niemostkowych atomów tlenu atomem siarki jest stosunkowo prosta i wydajna – wymaga wprowadzenia niewielkiej zmiany w etapie utleniania następującym po sprzęganiu nowej podjednostki z łańcuchem oligonukleotydu. Transfer atomu siarki zachodzi z udziałem jednego z komercyjnie dostępnych reagentów, np. DDTT (ang. 3-[(Dimethylaminomethylene)amino]-3H-1,2,4-dithiazole-5-thione).³⁴⁰ Jak już uprzednio zaznaczyłam, powstający chiralny tiofosforan występuje w postaci dwóch diastereoizomerów *S_P* oraz *R_P*, w różnych proporcjach zależnie od warunków reakcji i użytych reagentów. Przykładowo, zastosowanie w syntezie często występującego połączenia grupy zabezpieczającej 2'-OH TBDMS oraz aktywatora BMT skutkuje powstaniem izomeru *R_P* w przewadze.³⁴⁵ O ile najczęściej możliwe jest rozdzielenie stereoizomerów oligonukleotydów zawierających pojedynczą modyfikację tiofosforanową, sytuacja jest dużo bardziej skomplikowana w przypadku łańcuchów wielokrotnie zmodyfikowanych. W takim przypadku najczęściej w badaniach i terapiach stosuje się mieszaninę wszystkich stereoizomerów danego związku. Jednakże zazwyczaj trudno jest przewidzieć właściwości biologiczne i farmakokinetyczne takiej mieszaniny. W ostatnich latach opracowana została metoda pozwalająca na selektywną syntezę wybranego stereoizomeru.¹⁵⁴ Zastąpienie cząsteczki amidofosforynu chiralnym fosforanem oraz zastosowanie grupy pomocniczej, w połączeniu ze specjalnym aktywatorem, pozwala na otrzymanie oligonukleotydów czystych pod względem stereochemicznym. Istnieje również o możliwość wprowadzenia atomów siarki w miejsce mostkowych atomów tlenu.⁹⁸ Pomaga to uniknąć komplikacji związanych z występowaniem trudnej do rozdzielenia mieszaniny stereoizomerów.

Modyfikacje rybozy najczęściej stosowane są w obrębie grupy 2'-OH, gdzie równocześnie mogą pełnić rolę grupy zabezpieczającej.³⁴⁶ W odróżnieniu od modyfikacji

tiofosforanowej, nie mogą być one wprowadzone w ramach cyklu syntetycznego. Niezbędne jest zastosowanie amidofosforynów już zawierających pożądaną modyfikację. Niewielkie modyfikacje, takie jak metylacja grupy 2'-OH oraz podstawienie w jej pozycję atomu fluoru lub grupy aminowej, są kompatybilne z syntezą w fazie stałej. Możliwe jest również zastosowanie amidofosforynów posiadających bardziej zaawansowane chemicznie modyfikacje, takie jak wielokrotnie już wspomniane LNA.³⁴⁷ LNA oraz ich liczne pochodne powszechnie stosowane są w strukturach aptamerów oraz ASO. Ich inkorporacja do łańcucha RNA jest możliwa z wykorzystaniem standardowej metody amidofosforynowej, bez potrzeby zastosowania specjalnych reagentów.

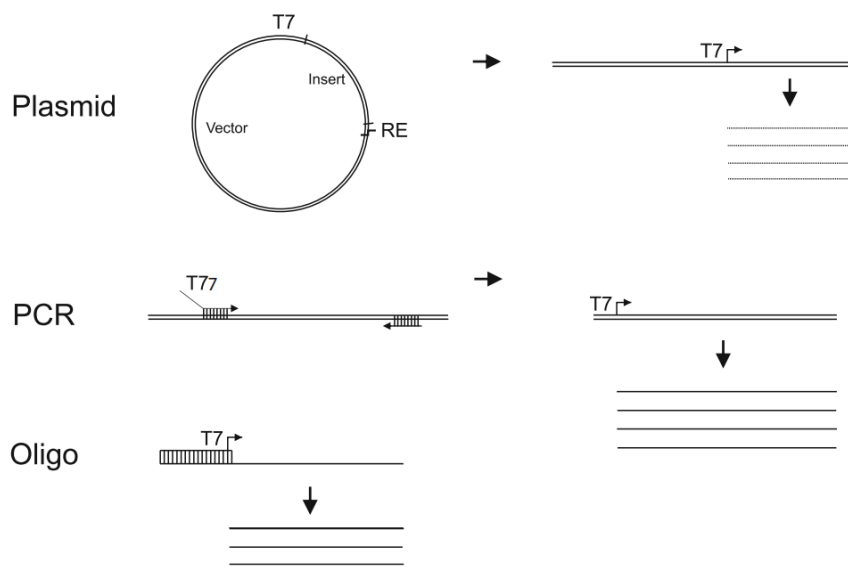
Modyfikacje zasad w większości są w pełni kompatybilne z metodą amidofosforynową. Zarówno niekanoniczne naturalnie występujące nukleotydy, takie jak inozyna czy pseudourydyna oraz metylowane zasady m⁶A, m¹A, m⁵C,¹⁰⁷ jak i nienaturalne modyfikowane nukleotydy mogą zostać włączone do oligonukleotydów RNA.³⁴⁸ Wyzwanie stanowi przede wszystkim synteza stabilnych amidofosforynów zawierających wspomniane modyfikacje. Ze względu na umiejscowienie modyfikacji w strukturze nukleotydu, nie stanowią one przeszkody na etapie sprzęgania.

5.2. Transkrypcja *in vitro*

Enzymatyczna synteza RNA w wielu przypadkach stanowi dobrą alternatywę dla syntezy w fazie stałej, zależnie od potrzeb badacza. Niewątpliwą zaletą metody amidofosforynowej jest możliwość otrzymania bardzo dużych ilości RNA w zautomatyzowany sposób. Z kolei jej głównym ograniczeniem jest możliwość syntezy tylko stosunkowo krótkich sekwencji, o długości do około 60 podjednostek. Dodatkowo, ze względu na warunki reakcji, zastosowanie labilnych cząsteczek modyfikowanych nukleotydów jest znacząco utrudnione. Transkrypcja *in vitro* pozwala otrzymać niewielkie ilości RNA, za to teoretycznie bez górnej granicy co do długości sekwencji. Warunki reakcji są również bardzo łagodne, co zwiększa zakres możliwości wprowadzenia strukturalnych i chemicznych modyfikacji do syntezowanego łańcucha, o ile wykorzystana w reakcji polimeraza zaakceptuje daną cząsteczkę jako substrat.

5.2.1. Polimerazy RNA

W transkrypcji *in vitro* stosuje się trzy główne systemy, zależne od stosowanej polimerazy – SP6, T3 oraz T7.³⁴⁹ Wszystkie trzy wymienione polimerazy pochodzą z bakteriofagów i zbudowane są z jednej podjednostki katalitycznej o wielkości około 100 kDa. Są one zależne od dwuniciowej matrycy DNA oraz wymagają obecności konkretnych sekwencji promotorowych o długości 23 par zasad.³⁵⁰ Umożliwiają syntezę cząsteczek RNA o długości od ~30 do nawet 10⁴ nukleotydów. Pożądaną sekwencję należy umieścić poniżej sekwencji promotora w kierunku 5' w sekwencji matrycy DNA. Ponieważ aktywna transkrypcja zaczyna się już na podstawie sekwencji promotora, koniec 5' każdego syntetycznego RNA uzyskanego z udziałem wybranej polimerazy zawsze zawiera krótki fragment o identycznej sekwencji. Zależnie od długości docelowego łańcucha RNA, stosuje się różnego rodzaju matryce DNA (Rys. 46). Matryce w postaci linearyzowanych enzymatycznie wektorów plazmidowych preferowane są w przypadku syntezy dużych ilości RNA o długości >100 nukleotydów. Matryce będące produktami namnażania wybranej sekwencji metodą PCR, czyli reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*), pozwalają na uzyskanie niewielkich ilości produktu RNA, ale za to dają możliwość łatwej manipulacji wybraną sekwencją. W przypadku syntezy krótkich RNA o długości <100 podjednostek stosuje się matryce w postaci oligonukleotydów DNA, w których tylko fragment zawierający sekwencję promotora musi być dwuniciowy.



Rysunek 46 Typy matrycy DNA wykorzystywanych w transkrypcji *in vitro*, na podstawie syntezy z udziałem polimerazy T7. Rysunek zapożyczony z pracy Beckert & Masquida.³⁴⁹

5.2.2. Synteza modyfikowanych RNA metodą transkrypcji *in vitro*

Substratami dla polimeraz RNA są 5'-trifosforany nukleozydów. Niemodyfikowane 5'-trifosforany kanonicznych nukleozydów są dostępne handlowo. Podstawowym wyzwaniem syntetycznym jest więc otrzymanie pożądanego modyfikowanego nukleozydu lub jego 5'-monofosforanu, a następnie przeprowadzenie jego fosforylacji. Sam proces fosforylacji najczęściej wymaga kilku etapów, z których każdy skutkuje obniżeniem całkowitej wydajności syntezy, jak również grozi rozpadem bardziej labilnych modyfikowanych cząsteczek. W ostatnich latach powstało wiele prac demonstrujących wydajne metody syntezy chemicznie modyfikowanych 5'-trifosforanów nukleozydów. Sposoby otrzymywania podjednostek na potrzeby transkrypcji *in vitro* nie będą omawiane w niniejszej rozprawie.^{351,352,353} Wśród najczęściej stosowanych modyfikacji nukleotydowych dominują promujące stabilność enzymatyczną modyfikacje grupy 2'-OH w obrębie rybozy, mające również potencjał wpływania na strukturę drugorzędową oraz parowanie zasad.^{354,355} Nie brakuje też przykładów zastosowania modyfikacji w obrębie zasady, mających szereg zastosowań – od obrazowania procesów zachodzących z udziałem cząsteczek RNA, po zwiększanie stabilności kompleksów aptamerów i ich celów molekularnych.^{356,357,358} Jak już wspomniałam, to specyficzność substratowa odpowiedzialnych za syntezę cząsteczek RNA polimeraz stanowi największe wyzwanie w transkrypcji *in vitro*.

W syntezie *in vitro* cząsteczek RNA zawierających chemicznie modyfikowane nukleotydy najczęściej wykorzystuje się polimerazę T7. W swojej naturalnej formie (WT, ang. *wild-type*) akceptuje szereg modyfikacji strukturalnych swoich nukleotydowych substratów, w tym na przykład wymienionych już modyfikacji rybozy, jak również obecność grup umożliwiających post-transkrypcyjne modyfikacje i znakowanie syntetycznych cząsteczek RNA.^{359,360} Jednakże część poświadczonych modyfikacji zaburza wiązanie nukleotydów do naturalnej formy polimerazy. Z tego względu metodami inżynierii genetycznej stworzono szereg mutantów polimerazy T7, akceptujących szeroki zakres chemicznie modyfikowanych nukleotydów. Przykładowo, otrzymana w 1995 roku polimeraza T7 RNA Y639F akceptuje pirymidyny zawierające atom fluoru w pozycji 2' rybozy.³⁶¹ Z kolei mutant T7 RNA Y639F H784A akceptuje podstawniki grupy 2'-OH w postaci grupy metylowej lub azydkowej.³⁶² W roku 2012 odkryto termofilną polimerazę Syn5, będącą homologiem polimerazy T7.³⁶³ Wymaga ona niższej temperatury oraz mniejszego stężenia

substratów nukleotydowych w celu przeprowadzenia transkrypcji z wydajnością porównywalną z T7 i, w przeciwieństwie do tradycyjnie stosowanej polimerazy, chętnie akceptuje chemiczne modyfikacje 5'-trifosforanów guanozyny. Kilka lat później uzyskano mutantą Syn5-Y564F, który z wydajnością wyższą niż T7 włącza do łańcuchów RNA nukleotydy zawierające modyfikację 2'-fluorową.⁹⁵ Kolejne odmiany polimerazy Syn5 mogą więc umożliwić syntezę łańcuchów RNA zawierających modyfikacje nieakceptowane przez powszechnie stosowaną polimerazę T7, tym samym dając nowe możliwości z zakresu modyfikacji cząsteczek RNA.

Ciekawą alternatywę dla białkowych polimeraz RNA stanowią rybozomy. Podobnie do enzymów białkowych, rybozomy przeprowadzają syntezę oligonukleotydów RNA w oparciu o matrycę DNA.³⁶⁴ Przykładowo, rybozym Z RNA akceptuje szereg chemicznych modyfikacji urydyny, takich jak LNA, podstawienie atomem fluoru w pozycji 2' rybozy, czy niewielkie modyfikacje zasady.³⁶⁵ Uzyskane do tej pory rybozomy o aktywności polimerazy wciąż nie mogą się mierzyć ze swoimi białkowymi odpowiednikami pod względem szybkości, dokładności i wydajności syntezy kwasów nukleinowych, jednakże mają niezaprzeczalny potencjał.

6. Termoforeza mikroskalowa w badaniach kwasów nukleinowych

Metody fluorescencyjne stanowią niezastąpiony element badań nad właściwościami biomolekuł oraz ich kompleksów. Pozwalają na zarówno ilościowe, jak i jakościowe badania procesów biologicznych. Z jednej strony umożliwiają wizualizację oraz lokalizację wybranych biomolekuł, zarówno w komórkach, jak i organizmach żywych. Z drugiej, pozwalają na biofizyczne badania właściwości cząsteczek *in vitro*, poczynając od dynamiki zwijania białek, przez kinetykę reakcji enzymatycznych, a kończąc na wyznaczaniu stałych dysocjacji kompleksów molekularnych.

Przez lata rozwoju biologii molekularnej i biofizyki powstało wiele badawczych metod fluorescencyjnych wykorzystujących najróżniejsze zjawiska fizyczne oraz właściwości biomolekuł. W zdecydowanej większości są to techniki pozwalające na wyznaczanie z dużą dokładnością konkretnych parametrów danej cząsteczki, czy zachodzącej z jej udziałem interakcji, ale tylko pod warunkiem, że dany układ badawczy spełnia ściśle określone założenia. Przykładowo, metody oparte na zjawisku wygaszania fluorescencji lub transferze energii rezonansowej Förstera umożliwiają wyznaczanie stałych dysocjacji kompleksów molekularnych, jednakże wymagają konkretnego umiejscowienia fluoroforów oraz ich odpowiedniej orientacji przestrzennej względem siebie. Z kolei metody wykorzystujące zjawisko dyfuzji, jak anizotropia fluorescencji (dyfuzja rotacyjna) czy spektroskopia korelacji fluorescencji (dyfuzja translacyjna), pozwalają wydajnie badać dynamikę tworzenia się kompleksów. Przy czym charakteryzują się wysoką dokładnością tylko w sytuacji bardzo wyraźnych zmian konformacyjnych oddziałujących cząsteczek lub gdy rozmiar tworzącego się kompleksu jest znacząco większy od rozmiaru fluorescencyjnej cząsteczki wchodzącej w jego skład. Jedną z nielicznych technik, które nie wykorzystują zjawiska fluorescencji a pozwalają na badanie dynamiki oddziaływania cząsteczek, jest izotermiczna kalorymetria miareczkowa. Dzięki pomiarom ciepła pochłanianego lub wydzielanego w wyniku oddziaływania biomolekuł, możliwe jest bezpośrednie wyznaczenie parametrów termodynamicznych danego procesu, a na ich podstawie wyznaczenie jego stechiometrii, czy stałych dysocjacji. Główną wadą tej metody jest duże zużycie próbki, a jej dodatkowe ograniczenie stanowi możliwość badania tylko oddziaływań o znaczącej zmianie entalpii.

Termoforeza mikroskalowa (MST, ang. *microscale thermophoresis*) jest wyjątkową metodą pod względem wszechstronności zastosowania w badaniu procesów tworzenia się kompleksów biomolekularnych. Ruchliwość termoforetyczna cząsteczek jest czuła na zmiany w rozmiarze, konformacji, ładunku oraz otocze hydratacyjnej oddziałujących cząsteczek, a więc łączy możliwości wielu wspomnianych wcześniej metod. Pozwala na pomiary oddziaływania cząsteczek o najróżniejszych rozmiarach i właściwościach – od małych ligandów wiązanych przez duże cząsteczki białek, po tworzenie złożonych kompleksów białkowych. Jej dodatkowymi atutami są bardzo niewielkie zużycie badanych materiałów, krótki czas pomiaru i stosunkowa łatwość analizy obliczeniowej wyników.

6.1. Podstawy termoforezy mikroskalowej – badania tworzenia kompleksów biologicznych

6.1.1. Podstawy teoretyczne termoforezy mikroskalowej

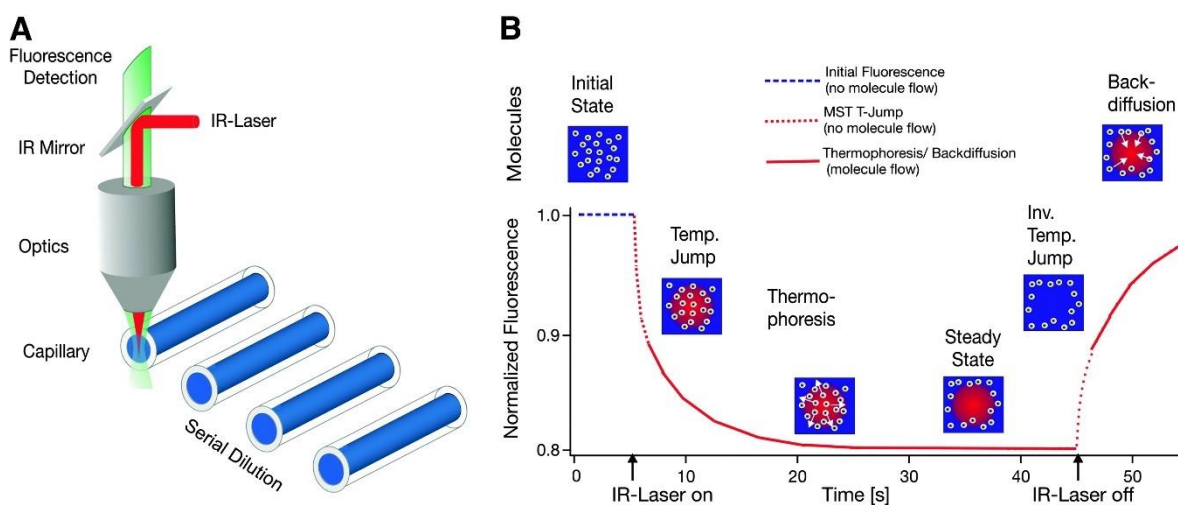
Zjawisko termoforezy polega na ruchu cząsteczek w gradiencie temperaturowym. Zaobserwowane zostało po raz pierwszy w roku 1856 przez Carla Ludwiga, a pierwsze badania dotyczące termoforezy cząsteczek w roztworach przeprowadzono kilkadziesiąt lat później.³⁶⁶ Przestrzenna różnica temperaturowa (ΔT) prowadzi do spadku stężenia rozpuszczonej w roztworze molekuly w punkcie o wyższej temperaturze w przypadku termoforezy dodatniej lub w punkcie o

niższej temperaturze w przypadku termoforezy ujemnej.³⁶⁷ Ruch biomolekuł wywołany lokalnym wzrostem temperatury silnie zależy od ich oddziaływania z rozpuszczalnikiem i opisany jest stałą Soreta S_T :

$$\frac{C_{hot}}{C_{cold}} = e^{-S_T \Delta T}$$

W ustalonych warunkach buforowania, pomiary termoforezy pozwalają na zaobserwowanie zmiany w rozmiarze, ładunku oraz entalpii swobodnej solwatacji biomolekuł.³⁶⁸ Różnica w termoforezie białka pozostającego w formie wolnej oraz w kompleksie jest znacząca, nawet w sytuacji wiązania z niewielkim ligandem. Brak znaczącej różnicy w rozmiarze lub ładunku kompleksu wciąż rekompensowany jest zmianą entalpii swobodnej solwatacji pod wpływem związania liganda do kieszeni wiążącej białka.

Układ eksperymentalny do pomiarów MST zawiera laser podczerwony (IR, ang. *infrared*) połączony z układem optycznym pozwalającym na wzbudzenie i pomiary emisji fluorescencji badanych cząsteczek (Rys. 46A). Roztwór zawierający biomolekuły tworzące badany kompleks znajduje się w szklanych kapilarach. Zazwyczaj w celu wyznaczenia stałej dysocjacji danego kompleksu przygotowuje się kilkanaście próbek, zawierających stałe stężenie cząsteczki fluorescencyjnej oraz seryjne rozcieńczenia drugiego składnika kompleksu. Laser IR pozwala na precyzyjne, punktowe podgrzanie znajdującego się w kapilarze roztworu. Po wyjściowym gwałtownym skoku temperatury (ang. *MST temperature jump*, T-Jump), wygenerowane ciepło ulega rozproszeniu w całej objętości próbki. W efekcie dochodzi do zjawiska termoforezy cząsteczek i utworzenia przestrzennego gradientu ich stężenia w roztworze. Kolejne fazy pomiaru MST przedstawione są na Rysunku 47B.



Rysunek 47 Układ eksperymentalny do pomiarów termoforezy mikroskalowej. (A) Roztwór badanych cząsteczek umieszczany jest w szklanych kapilarach. Fluorescencja cząsteczek wzbudzana jest oraz mierzona za pomocą tego samego układu optycznego, sprzężonego z laserem podczerwonym wykorzystywanym do punktowego podgrzewania próbki. (B) Przykładowy sygnał MST. Zaznaczono kolejne etapy pomiaru MST: od początkowej fluorescencji próbki mierzonej przed włączeniem lasera IR, poprzez moment skoku temperaturowego wywołanego włączeniem lasera i następującej po nim właściwej termoforezy cząsteczek, a kończąc na redystrybucji cząsteczek w roztworze po jego ponownym schłodzeniu. Rysunek zapożyczono z pracy Jerabek-Willemsen et al.³⁶⁷

Procesy zachodzące w trakcie pomiaru MST rozróżniamy ze względu na ich umiejscowienie w czasie względem momentów włączenia i wyłączenia lasera IR. Pierwsza faza pomiaru polega na zarejestrowaniu początkowej fluorescencji próbki w temperaturze otoczenia. Po włączeniu lasera następuje wspomniana już faza skoku temperaturowego (T-Jump), gdy zarejestrowana zmiana intensywności fluorescencji próbki wynika ze wzrostu temperatury, jeszcze

przed rozpoczęciem dyfuzji cząsteczek pod wpływem termoforezy. Po kilku sekundach od włączenia lasera dochodzi do utworzenia się równowagi temperaturowej na całej objętości próbki i rozpoczyna się faza pomiaru faktycznego zjawiska termoforezy emitujących fluorescencję cząsteczek. Po około 30 sekundach dochodzi do ustalenia się stanu równowagi gradientu stężenia molekuł. Po wyłączeniu lasera IR próbka ulega stopniowemu schłodzeniu. W pierwszej kolejności następuje krótki moment bezwładności układu, zwany odwróconym skokiem temperaturowym (ang. *inverted T-Jump*), po którym dochodzi do ponownego równomiernego rozmieszczenia cząsteczek w roztworze na drodze dyfuzji.

W przypadku MST możliwe jest zastosowanie przybliżenia liniowego stałej Soreta:

$$\frac{C_{hot}}{C_{cold}} = e^{-S_T \Delta T} \approx 1 - S_T \Delta T$$

Zarówno zmiana temperatury (ΔT) jak i ubytek stężenia wyrażony przez stosunek $\frac{C_{hot}}{C_{cold}}$ zachodzący pod wpływem podgrzania próbki, są bardzo niewielkie w relacji do parametrów wyjściowych. Próbka ulega podgrzaniu o 2–6 K, podczas gdy temperatura otoczenia wynosi ~300 K, w efekcie czego dyfuzja cząsteczek na drodze termoforezy nie prowadzi do dużych zmian w ich lokalnym stężeniu. W MST fluorescencja badanych biomolekuł wykorzystywana jest do pomiarów zmiany ich stężenia pod wpływem dyfuzji w gradiencie temperaturowym. Dla każdego punktu czasowego w trakcie trwania pomiaru MST możliwe jest wyznaczenie znormalizowanej wartości fluorescencji:

$$F_{norm} = \frac{F_{hot}}{F_{initial}}$$

gdzie $F_{initial}$ odnosi się do początkowej fluorescencji próbki przed włączeniem lasera IR, a F_{hot} to wartość fluorescencji w wybranym momencie po włączeniu lasera. Jednakże ta bardzo prosta zależność nie uwzględnia istotnych parametrów fizycznych próbki, a mianowicie zmiany właściwości fluorescencyjnych fluorofora pod wpływem skoku temperatury: $\frac{\partial F}{\partial T}$. Zależność tę wyznaczyć można na podstawie zmian fluorescencji zaobserwowanych w fazie T-Jump. Ostatecznie, liniowe przybliżenie znormalizowanej wartości fluorescencji w punkcie czasowym po ustaleniu się stanu równowagi termoforezy można przedstawić w następujący sposób:

$$F_{norm} = 1 + \left(\frac{\partial F}{\partial T} - S_T \right) \Delta T$$

Co ciekawe, zjawisko tworzenia się kompleksów zaobserwować można nie tylko w trakcie pomiaru termoforezy, ale również w fazie T-Jump. Ze względu na różnicę w skali czasowej, pomiary T-Jump (<1 sekunda) oraz termoforezy (>1 sekunda) można łatwo odseparować, co umożliwia zaobserwowanie różnych zjawisk związanych z dynamiką danych oddziaływań molekularnych. Zakłada się, że w sytuacji, gdy pod wpływem wiązania dochodzi do istotnych zmian we właściwościach tylko wyznakowanej cząsteczki, efekt ten widoczny będzie przede wszystkim w fazie T-Jump. Z kolei w fazie termoforezy zaobserwować możemy zmiany wynikające z różnicy w rozmiarze, ładunku oraz otoczce hydratacyjnej całego kompleksu. Zaobserwowanie tych różnic w wybranym punkcie czasowym T-Jump lub MST wymaga zastosowania szeregu próbek zawierających seryjne rozcieńczenia niewyznakowanego składnika kompleksu. Przy założeniu, że parametr x oznacza frakcję wyznakowanej cząsteczki będącą częścią kompleksu, wzór na wartość F_{norm} zależną od stężenia cząsteczki niewyznakowanej w danej próbce prezentuje się następująco:

$$F_{\text{norm}} = (1 - x)F_{\text{norm}}(\text{związane}) + x \cdot F_{\text{norm}}(\text{niezwiązane})$$

$F_{\text{norm}}(\text{związane})$ i $F_{\text{norm}}(\text{niezwiązane})$ są to znormalizowane wartości fluorescencji wyznakowanej cząsteczki w stanie wolnym oraz w kompleksie, gdzie wartość fluorescencji dla stanu niezwiązanego stanowi referencję. Przy ustaleniu odpowiedniego zakresu stężeń podjednostek kompleksu, możliwe jest wyznaczenie obu tych wartości fluorescencji i w efekcie parametru x . Określenie frakcji związanych cząsteczek w ustalonych warunkach pomiarowych pozwala następnie na obliczenie stałej dysocjacji kompleksu K_D .

6.1.2. Pomiary tworzenia kompleksów z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej

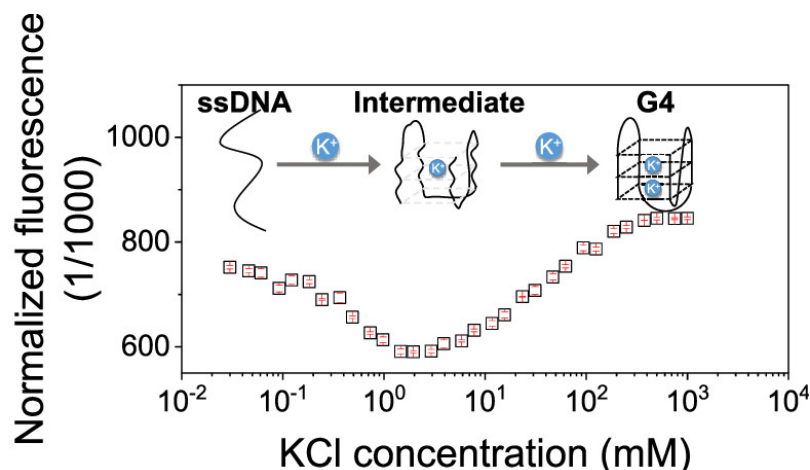
Każda metoda badawcza posiada ograniczenia związane z dokładnością i czułością układu, zależne od warunków pomiarowych i badanych procesów. W przypadku metody MST, której głównym zastosowaniem jest wyznaczanie stałych dysocjacji kompleksów molekularnych, ograniczenia te związane są przede wszystkim z powinowactwem badanych biomolekuł. Bardzo silne oddziaływania charakteryzują się niskimi wartościami K_D , które mogą być trudne do zmierzenia z zadowalającą dokładnością. Silnie oddziałujący układ molekularny wymaga użycia niskich stężeń wchodzących w jego skład cząsteczek, w tym cząsteczki wyznakowanej fluorescencyjnie. Obecnie na rynku dostępne są dwa typy instrumentów. Urządzenia do pomiarów MST pozwalające na zarejestrowanie stałych dysocjacji z dolną granicą dokładności wynoszącą ok 10 nM oraz urządzenia bardziej czułe, o dolnej granicy około ~10 pM, a więc umożliwiające badanie bardzo silnych oddziaływań. Teoretycznie nie istnieje górna granica pomiarowa wartości K_D , przynajmniej z punktu widzenia czułości sprzętu pomiarowego. Jednakże problem może stanowić potrzeba użycia bardzo wysokich stężeń cząsteczki niewyznakowanej w celu wysycenia kompleksu molekularnego, sięgających około 10-krotnej wartości K_D . Dodatkowo, wysokie stężenie biomolekuł może prowadzić do powstawania w roztworze ich agregatów oraz ograniczać ich ruchliwość termoforetyczną. MST charakteryzuje się szerokim zakresem czułości pomiarowej oraz umożliwia wykrycie szeregu zjawisk związanych z tworzeniem się kompleksów molekularnych. Z tego względu, MST daje możliwość badania najróżniejszych układów, których wybrane przykłady podane zostały poniżej.

Badania oddziaływań białko-białko pełnią kluczową rolę w poszerzaniu wiedzy związanej z istotnymi procesami molekularnymi, jak również w opracowywaniu leków i nowych terapii. W szczególności istotne jest określenie powinowactwa potencjalnych białek terapeutycznych do ich zamierzonych celów molekularnych, a w kolejnym kroku wpływu różnego rodzaju korzystnych modyfikacji strukturalnych na owo powinowactwo. W pracy Jerabek-Willemsen et al. posłużono się przykładem znanego białka terapeutycznego Anakinara, będącego antagonistą interleukiny 1 (IL-1), a więc receptora związanego z procesem zapalnym o szerokim spektrum działania.^{369,370} Anakinara jest białkiem terapeutycznym, wykorzystywanym w redukcji objawów reumatoidalnego zapalenia stawów.³⁷¹ W pomiarach MST posłużono się wyznakowanym fluorescencyjnie rozpuszczalnym fragmentem receptora IL-1 i szeregiem rozcieńczeń białka Anakinara. Wyznaczono wartość $K_D = 620$ pM, zgodną z uprzednio wyznaczoną wartością i wskazującą, że Anakinara wiąże białko IL-1 z wysokim powinowactwem.

MST znajduje również zastosowanie w badaniu oddziaływań między przeciwciałami a ich antygenami.³⁷² Białko interferon gamma (IFN- γ), cytokina kluczowa w aktywacji układu odpornościowego w reakcji na obecność wewnątrzkomórkowych patogenów oraz w hamowaniu rozwoju guzów nowotworowych, zostało wyznakowane fluorescencyjnie. IFN- γ w stałym stężeniu inkubowano następnie z jego specyficznym przeciwciałem w szerokim zakresie stężeń (od 0.1 do 700 nM) i na podstawie pomiarów MST wyznaczono stałą dysocjacji $K_D = 10 \pm 2$ nM.

MST wykorzystać można do badania procesów hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów. Przykładowo, w pracy Culver et al. przedstawione zostały badania dotyczące tworzenia kompleksów między oligonukleotydami DNA a fragmentami CNA (ang. *click nucleic acids*), należącymi do nowej klasy syntetycznych kwasów nukleinowych zwanych XNA (ang. *xeno nucleic acid*).³⁷³ Dzięki metodzie MST zbadano wpływ takich czynników, jak długość i sekwencja CNA oraz stężenie jonów soli w układzie na proces hybrydyzacji. W tym przypadku MST okazała się być na tyle czułą metodą, by umożliwić wykrycie braku komplementarności sekwencji na poziomie nawet pojedynczych zasad. Zaobserwowano też istotną zależność między długością łańcucha a stabilnością kompleksów hybrydowych – dla dłuższych sekwencji CNA wyznaczono niższe wartości względnej stałej dysocjacji $K_{D\text{ app}}$, wskazujące na silniejsze oddziaływanie z celem molekularnym w postaci cząsteczki DNA.

W wybranych przypadkach metoda MST może być również wykorzystana do badania procesów tworzenia struktur drugorzędowych i zmiany konformacji kwasów nukleinowych. Dobrym przykładem są opisane w pracy autorstwa Zhang et al. badania tworzenia się G-kwadrupleksów DNA w obecności jonów potasu (Rys. 48).³⁷⁴



Rysunek 48 Oddziaływanie między sekwencją ludzkiego telomerowego G-kwadrupleksu DNA (hTG4) oraz jonów potasu K⁺, prowadzące do powstania struktury drugorzędowej G-kwadrupleksu. Pomiarów dokonano z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej. Rysunek zapożyczono z pracy Zhang et al.³⁷⁴

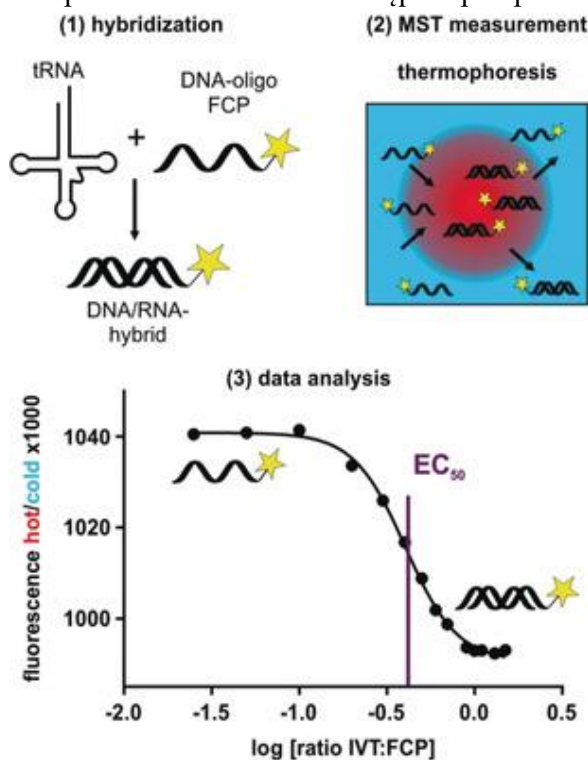
Sekwencja ludzkiego telomerowego G-kwadrupleksu DNA (hTG4) ulega zwijaniu do struktury drugorzędowej, tworząc stabilną strukturę pośrednią wiążącą jeden kation K⁺ i ostatecznie osiągając formę G-kwadrupleksu w kompleksie z dwoma kationami K⁺. hTG4 wyznakowano fluorescencyjnie i jego stałe stężenie miareczkowano rosnącym stężeniem kationów. Mimo niewielkiego wzrostu masy tworzących się kompleksów w postaci stanu przejściowego oraz G-kwadrupleksu, możliwe było zaobserwowanie różnicy w ich ruchliwości termoforetycznej względem liniowego DNA. Różnice w termoforezie wynikały ze zmiany ładunku w efekcie wiązania kationów oraz zmiany otoczki hydratacyjnej struktur drugorzędowych. Z udziałem MST zbadano stałe dysocjacji 10 różnych potencjalnych stadiów pośrednich zwijania G-kwadrupleksów i wytypowano najbardziej energetycznie korzystne struktury.

6.1.3. Zastosowanie termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań molekularnych z udziałem RNA

Pierwotnie uważano, że RNA w komórce pełni dwie główne role – cząsteczki kodującej, pośredniczącej w procesie biosyntezy białek w postaci mRNA oraz cząsteczki rRNA czynnie biorącej udział w owej syntezie jako część rybosomu. Jednakże ostatnie dziesięciolecia

badan pozwoliły odkryć szerokie spektrum procesów biologicznych, w których udział biorą cząsteczki RNA o najróżniejszych strukturach, rozmiarach i funkcjach. W poniższym podrozdziale opisane zostały wybrane przykłady wykorzystania termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań RNA z różnego rodzaju biomolekułami – od małych cząsteczkowych ligandów, po w pełni funkcjonalne białka.

W pracy Moon et al. z 2018 roku zaprezentowano badania dotyczące oddziaływania dwóch typów RNA z ich małocząsteczkowymi ligandami.³⁷⁵ W pierwszej kolejności zbadano tworzenie się kompleksów molekularnych z udziałem fragmentu RNA wirusa HIV-1 zwanego RRE (ang. *HIV Rev response element*). Jest to wysoce ustrukturyzowany fragment wirusowego mRNA o długości około 350 nukleotydów, rozpoznawany przez należące do wirusa HIV-1 białko Rev odpowiedzialne za transport mRNA zawierających sekwencje RRE na zewnątrz jądra komórkowego.³⁷⁶ Przeprowadzono pomiary powinowactwa RRE RNA do dwóch ligandów – krótkiego peptydu pochodzącego z białka Rev oraz neomycyny, cząsteczki naturalnego pochodzenia wiążącej sekwencję RRE i blokującej wiązanie do niej białka Rev.³⁷⁷ Peptyd Rev wyznakowano fluorescencyjnie i z wykorzystaniem MST wyznaczono stałą dysocjacji jego kompleksu z RRE RNA. Następnie przeprowadzono eksperymenty wiązania kompetycyjnego, w



Rysunek 49 Wizualizacja metody pozwalającej na ilościowe badanie populacji wybranych cząsteczek RNA w roztworach. Kwantyfikacji dokonano dzięki pomiarom procesów hybrydyzacji RNA z fluorescencyjnymi sondami DNA, z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej. Rysunek zapożyczony z pracy Jacob et al.³⁶¹

których kompleks RRE RNA-Rev miareczkowano rosnącym stężeniem neomycyny, obserwując uwalnianie fluorescencyjnego peptydu z kompleksu pod wpływem wypierania przez neomycynę. Dla obu procesów wiązania wyznaczono stałe dysocjacji zgodne z danymi literaturowymi. Druga część pracy poświęcona była badaniom oddziaływania dwóch ryboprzełączników z ich celem molekularnym – bakteryjnym metabolitem preQ₁ (ang. *pre-queuosine 1*).³⁷⁸ Wybrane na potrzeby badań ryboprzełączniki regulują biosyntezę preQ₁ na różnych poziomach – jeden na etapie transkrypcji, drugi na etapie translacji. Choć oba wykazują wysokie powinowactwo do swojego celu molekularnego i posiadają bardzo zbliżoną budowę, już wcześniej postulowano, że przechodzą znacząco różnie przemiany konformacyjne pod wpływem wiązania. Dzięki pomiarom MST zaobserwowano, że w efekcie wiązania do preQ₁, jeden ryboprzełącznik wykazywał zdecydowanie ujemną termoforezę, a drugi dodatnią. Wyniki te stanowiły więc dodatkowe potwierdzenie tezy dotyczącej wyraźnych różnic w strukturze przestrzennej

kompleksów molekularnych powstających z udziałem cząsteczek o wyjściowo bardzo zbliżonej budowie.

W poprzednim podrozdziale wspomniałam o możliwości badania procesów hybrydyzacji łańcuchów kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody MST. Znalazła ona również zastosowanie w pomiarach hybrydyzacji z udziałem cząsteczek RNA. Przykładowo, w pracy autorstwa Jacob et al. wykorzystano MST do ilościowych pomiarów niekodujących RNA.³⁷⁹

Podstawą metody było zastosowanie wyznakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów DNA, komplementarnych do wybranych niekodujących sekwencji RNA (Rys. 49). Walidacji metody dokonano dzięki pomiarom hybrydyzacji fluorescencyjnej sondy DNA (FCP, ang. *fluorescently labeled complementary DNA probes*) oraz różnych stężeń jej celu molekularnego, czyli tRNA^{Met}_(CAU) pochodzącego z *E. coli*. Na podstawie pomiarów MST wyznaczono parametr EC₅₀ kompleksu, odpowiadający stężeniu RNA niezbędnemu do hybrydyzacji 50% sondy DNA. Wyniki porównano z niezależnie przeprowadzonymi pomiarami metodą EMSA (ang. *Electrophoretic mobility shift assay*) i potwierdzono skuteczność proponowanej metody eksperymentalnej MST. Wykorzystując analogiczny układ dokonano ilościowych pomiarów rRNA pochodzących z drożdżowych rybosomów oraz populacji mRNA o różnych długościach ogona poli(A).

Na koniec obecnego rozdziału chciałabym podać przykłady wykorzystania termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań RNA-białko, mając nadzieję zwrócić uwagę czytelnika na wszechstronne możliwości, jakie daje owa metoda. Pierwszy przykład zaczerpnięty został z pracy Michell et al.³⁸⁰ Autorzy między innymi zbadali oddziaływanie między lipoproteiną wysokiej gęstości (HDL, ang. *high-density lipoprotein*), a jednym z jej ligandów, czyli zewnątrzkomórkowym małym RNA (sRNA, ang. *small RNA*). Główną rolą cząsteczek HDL jest transport międzykomórkowy. Wiążą różnego typu lipidy oraz białka, a w nielicznych przypadkach również małowielkościowe niekodujące RNA, w tym microRNA (miRNA) biorące udział regulacji ekspresji genów.^{381,382} Wśród wyizolowanych fragmentów RNA związanych z HDL zidentyfikowano również sRNA powstające w wyniku enzymatycznego rozcinania cząsteczek rRNA oraz tRNA (odpowiednio tDR oraz rDR). Metodą MST posłużono się w celu identyfikacji preferowanego liganda spośród fragmentów tDR, jak również określono zależność między strukturą drugorzędową, sekwencją oraz długością tDR a ich powinowactwem do cząsteczki HDL.

W pracy autorstwa Muttach et al.³⁸³ przedstawiono badania nad metodą otrzymywania miejscowo-specyficznych modyfikacji RNA pozwalających na indukowane światłem sieciowanie (ang. *photo-crosslinking*) z cząsteczką wybranego białka. We wspomnianej pracy opisana została metoda modyfikacji struktury 5' kapu w pozycji N7 z udziałem metylotransferazy o niskiej specyficzności substratowej. Metylotransferaza Ecm1 katalizuje transfer grupy metylowej z cząsteczki ko-substratu S-Adenozylo-metioniny (SAM) na pozycję N7 guanozyny wchodzącej w skład struktury 5' kapu. Jednakże z względu na swoją wyjątkowo niską specyficzność ko-substratową, Ecm1 posiada zdolność transferu znacznie większych grup,³⁸⁴ jak się okazuje w tym również grup umożliwiających międzycząsteczkowe sieciowanie pod wpływem światła o określonej długości fali. Metodą MST posłużono się w celu zbadania powinowactwa modyfikowanych w pozycji N7 analogów 5' kapu do białka eIF4E. Porównując stałe dysocjacji modyfikowanych analogów kapu do naturalnych substratów eIF4E (przykładowo m⁷GpppA), zauważono znaczący spadek powinowactwa pod wpływem obecności w pozycji N7 dużych grup aromatycznych. W przypadku dwóch spośród trzech badanych modyfikacji 5' kapu wiązanie do eIF4E było na tyle silne, by umożliwić reakcję sieciowania z kieszenią wiążącą białka. Z kolei analog modyfikowany benzofenonem, a więc największą spośród badanych grup sieciujących, nie był wiązany przez eIF4E, najpewniej ze względu na istotną zawadę steryczną. Wyniki te znalazły potwierdzenie w analizie elektroforetycznej próbek eIF4E inkubowanego z krótkimi RNA zawierającymi różne analogi kapu. Przed analizą próbki poddane zostały naświetlaniu mającemu wyindukować sieciowanie, a więc kowalencyjne wiązanie danej cząsteczki RNA do wnętrza kieszeni wiążącej białka. Dla dwóch typów RNA zaobserwowano niewielką populację cząsteczek wykazujących wolniejszą migrację w żelu poliakrylamidowym, a więc najpewniej znajdujących się w kompleksie z eIF4E.

III. Badania własne

7. Plan badań

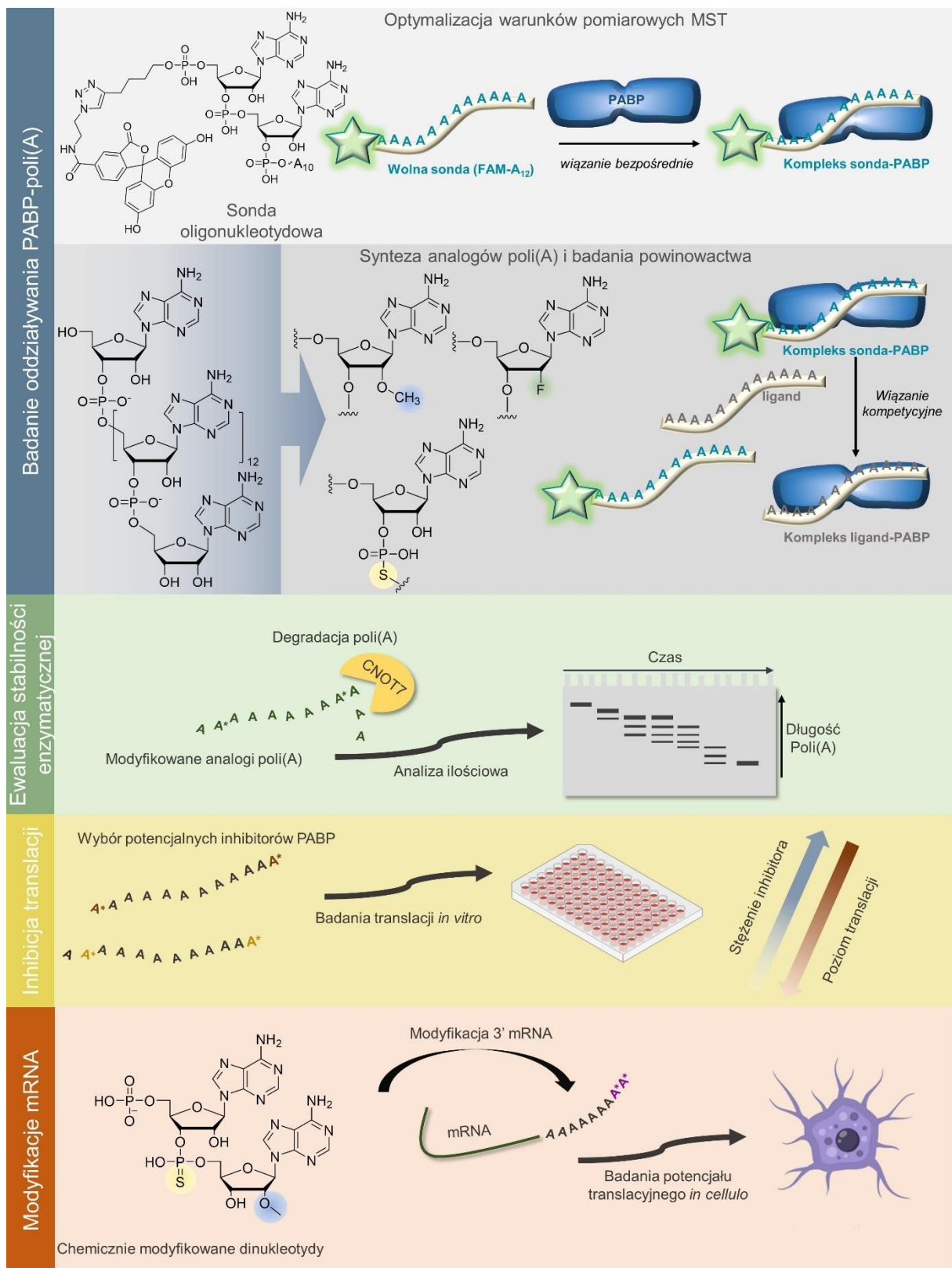
Głównym celem projektu doktorskiego było opracowanie metody modyfikacji końca 3' mRNA w celu poprawy ich stabilności i potencjału translacyjnego. W pierwszej kolejności opracowałam metodę pozwalającą na badanie zależności między strukturą ogona poli(A), a jego stabilnością i oddziaływaniem z białkiem PABP. Dotychczas przeprowadzono wiele badań skupiających się na oddziaływaniach białko-białko oraz białko-RNA z udziałem PABP. Jednakże wciąż wiemy stosunkowo niewiele o preferencjach PABP względem struktury chemicznej ogonów poli(A) i ich analogów. Pogłębienie wiedzy z tego zakresu może znacząco ułatwić opracowywanie terapeutycznych mRNA zawierających modyfikacje ogona poli(A), jak również inhibitorów translacji w postaci oligonukleotydowych analogów poli(A). Metody takie, jak EMSA³⁸⁵ (ang. *electrophoretic mobility shift assay*), SAAB³⁸⁶ (ang. *selection and amplification binding assay*) oraz anizotropia fluorescencji³⁸⁷ wykorzystywano do badania oddziaływań między PABP a poli(A), jednakże w większości metody te charakteryzują się stosunkowo niską rozdzielczością, wysokim zużyciem materiałów biologicznych oraz półilościowymi wynikami. Jako podstawę do opracowania zamierzonej metody badawczej zastosowałam opisaną w części literaturowej termoforezę mikroskalową (MST, ang. *microscale thermophoresis*). Jest to technika pomiarowa wykorzystująca zjawisko fluorescencji, która między innymi pozwala na badanie procesów tworzenia się kompleksów molekularnych. MST charakteryzuje się wysoką czułością oraz umożliwia dokładne wyznaczenie stałych dysocjacji K_D w bardzo szerokim zakresie, od wartości pikomolarnych po milimolarne. Ogromną zaletą MST jest również niewielkie zużycie badanych materiałów oraz możliwość szybkiego wykonania serii pomiarowych badanego kompleksu. W założeniu opracowywana przeze mnie metoda powinna pozwolić na wykrycie zmian w powinowactwie białka PABP do ligandów poli(A) różniących się w niewielkim stopniu strukturą i właściwościami fizykochemicznymi. Opublikowane badania dotyczące powinowactwa PABP do niemodyfikowanych łańcuchów poli(A) wykazały, że pełna czterodomenowa cząsteczka białka wiąże fragment poli(A) o długości 25 nukleotydów ze stałą $K_D = 7$ nM.³⁸⁶ A więc kolejnym wymogiem dotyczącym opracowywanej metody badawczej była możliwość badania silnych oddziaływań białko-ligand charakteryzujących się stałymi dysocjacji z zakresu nanomolarnego. Wszystkie przewidywane wymogi spełnia technika MST. Proces opracowywania metody badawczej przebiegał w następujących etapach:

- Projektowanie i synteza wyznakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydowych sond molekularnych
- Wstępne badanie procesu wiązania sond molekularnych do białka PABP przy pomocy termoforezy mikroskalowej
- Optymalizacja metody pomiarowej oraz struktury sondy – dobór znacznika fluorescencyjnego sondy, wybór odpowiedniego buforu dla badanego układu biomolekuł, optymalizacja czasu oraz temperatury inkubacji kompleksu białko-ligand, ustalenie zakresu stężeń komponentów kompleksu pozwalającego na dokładne wyznaczenie stałej dysocjacji
- Synteza chemicznie modyfikowanych oligonukleotydowych analogów ogona poli(A)
- Badania powinowactwa modyfikowanych ligandów do białka PABP z wykorzystaniem testu kompetycyjnego

Tak opracowana metoda może pozwolić na wyselekcjonowanie modyfikacji struktury poli(A) o najbardziej korzystnym wpływie na powinowactwo do białka PABP.

Kontynuację tej części projektu stanowiło badanie wpływu wybranych modyfikacji chemicznych na odporność struktury poli(A) na enzymatyczną degradację. Ta sama biblioteka związków, która została wykorzystana w pomiarach powinowactwa do PABP, miała być następnie zbadana pod kątem odporności na aktywność specyficznego enzymu CNOT7, wchodzącego w skład białkowego kompleksu odpowiedzialnego za deadenylację mRNA w komórkach eukariotycznych. Oligonukleotydy charakteryzujące się wysokim powinowactwem do PABP oraz stabilnością enzymatyczną mogą stanowić idealnych kandydatów na inhibitory translacji wiążące specyficznie PABP.

Drugim celem projektu doktorskiego było zbadanie wpływu wyselekcjonowanych modyfikacji chemicznych ogona poli(A) na stabilność enzymatyczną oraz potencjał translacyjny cząsteczek mRNA. Zaplanowano wprowadzenie modyfikacji nukleotydowych, wybranych na podstawie badań powinowactwa oraz eksperymentów degradacji enzymatycznej, do ogonów poli(A) reporterowych mRNA. Następnie modyfikowane mRNA miały być poddane ewaluacji pod kątem stabilności oraz wydajności translacji w lizatach komórkowych. Na ostatnim etapie projektu zaplanowano wprowadzenie mRNA zawierających modyfikacje poli(A) do komórek różnych linii, w celu ustalenia potencjału translacyjnego oraz trwałości modyfikowanych transkryptów *in cellulo*.



8. Wybór układu pomiarowego i otrzymywanie reagentów do badań

Do badań powinowactwa wybrałam rekombinowaną wersję białka PABP¹⁻¹⁹⁰, składającą się z pierwszych dwóch domen wiążących RNA (RRM, ang. *RNA recognition domain*). Wybór ten podyktowany był łatwością w ekspresji oraz oczyszczaniu skróconego wariantu PABP, jak również jego zwiększoną stabilnością w warunkach *in vitro* względem pełnej czterodomenowej cząsteczki białka. Jak już wspomniałam w rozdziale 2 podczas omawiania budowy oraz funkcji PABP, pełna cząsteczka tego białka nie jest niezbędna dla zachowania jego funkcji biologicznych, w tym specyficznego wiązania sekwencji poli(A) oraz oddziaływania z podjednostką eIF4G kompleksu inicjującego translację. Dwie N-końcowe domeny RRM1 i RRM2 są w stanie rozpoznać oraz związać fragment poli(A) o długości około 11-12 nukleotydów. Z tego względu wszystkie zsintezowane przeze mnie analogi poli(A) były 12-merami, nie licząc dwóch związków będących niemodyfikowanymi chemicznie 11- i 13-merami.

Wymogiem zastosowania termoforezy mikroskalowej jest posiadanie właściwości fluorescencyjnych przez jedną z cząsteczek badanego kompleksu. Istnieje kilka możliwości otrzymania fluorescencyjnego kompleksu białko-ligand. Pierwszy wariant zakłada wyznakowanie fluorescencyjne samego białka. Znakowanie białka na potrzeby pomiarów MST przeprowadza się najczęściej poprzez związanie cząsteczki barwnika z polihistydynową sekwencją (His-Tag) znajdującą się na jednym z końców rekombinowanego białka,³⁸⁸ lub poprzez kowalencyjne przyłączenie barwnika do obecnych w strukturze białka reszt lizyny.³⁸⁹ Jednakże nie zawsze możliwe jest otrzymanie białka rekombinowanego posiadającego sekwencję His-Tag. Z kolei kowalencyjne znakowanie reszt aminokwasowych może zaburzyć strukturę i aktywność białka, w szczególności, gdy znakowany aminokwas znajduje się w pobliżu kieszeni wiążącej. W drugim wariantcie możliwe jest zastosowanie fluorescencyjnie wyznakowanych ligandów. Ponieważ moim celem było zbadanie wpływu niewielkich modyfikacji nukleotydowych na powinowactwo ligandów do PABP, wprowadzanie dużych cząsteczek znaczników fluorescencyjnych do struktury oligonukleotydów również nie było optymalnym rozwiązaniem. Z tego względu, opracowując docelową metodę badawczą, przyjąłam trzecią strategię, zakładającą wiązanie kompetycyjne ligandów. Podejście to wymaga przygotowania wyznakowanej fluorescencyjnie sondy molekularnej, o strukturze bardzo zbliżonej do docelowo badanych ligandów. Następnie kompleks białka i sondy fluorescencyjnej miareczkowany jest kompetycyjnym ligandem, który wypiera sondę z kieszeni wiążącej. Wydajność procesu wypierania sondy przez ligand kompetycyjny stanowi miarę jego powinowactwa do białka. Pierwszym etapem mojej pracy syntetycznej było zatem przygotowanie 12-merowej sondy fluorescencyjnej, wykazującej dobre powinowactwo do PABP oraz wysoką stabilność.

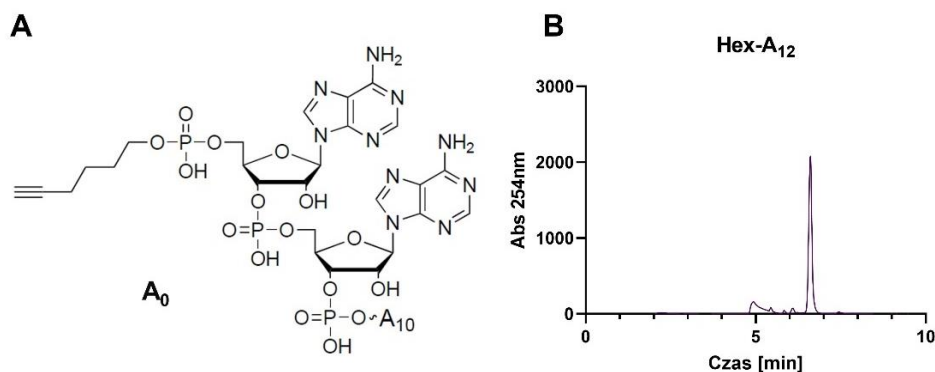
8.1. Synteza oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych

Syntezę sond fluorescencyjnych przeprowadziłam w dwóch etapach. W pierwszym etapie metodą syntezy w fazie stałej otrzymałam oligonukleotyd 5'-Hex-A₁₂ (A₀; Rys. 50) posiadający na końcu 5' grupę fosforanową z linkerem alkinowym. W kolejnym kroku przeprowadziłam znakowanie cząsteczki A₀ na drodze cykloaddycji alkinowo-azydkowej katalizowanej jonami miedzi (I) (CuAAC) z udziałem kilku znaczników fluorescencyjnych (Rys. 51).

8.1.1. Synteza oligonukleotydu 5'-Hex-A₁₂

Synteza oligonukleotydu 5'-Hex-A₁₂ (A₀) modyfikowanego na końcu 5' grupą fosforanową z linkerem alkinowym przeprowadzona została metodą syntezy w fazie stałej (Rys. 50). Posłużyłam się automatycznym syntetyzerem ÄKTA OligoPilot. Do syntezy użyłam handlowo

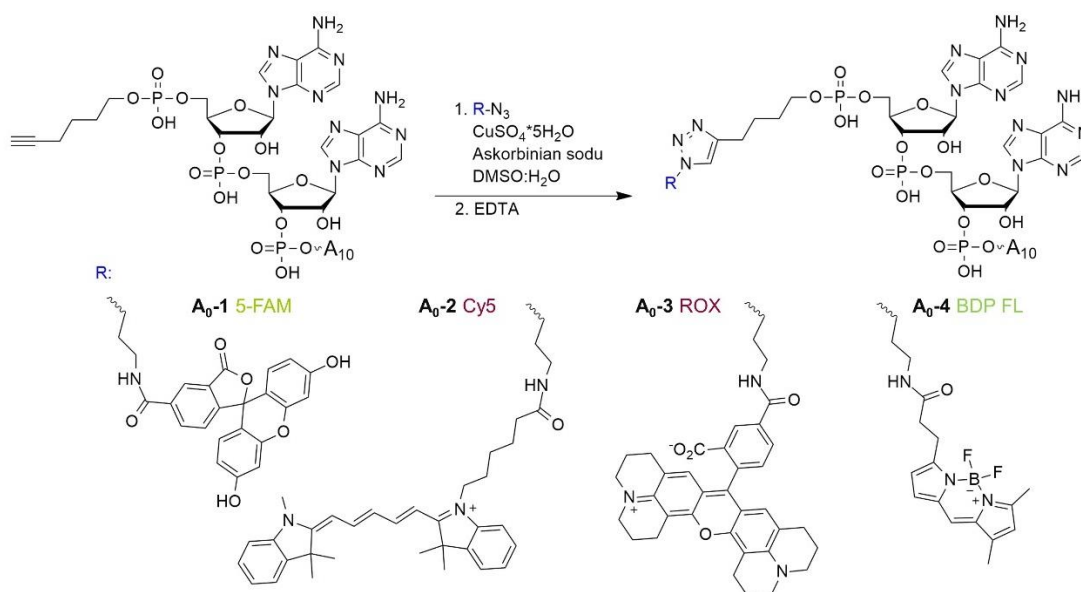
dostępnych amidofosforynów oraz stałego podłoża CPG obsadzonego amidofosforynem adenozynowym. Ogólny opis procedury syntetycznej znajduje się w części eksperymentalnej, w rozdziale 16.2. W ostatnim cyklu syntetycznym do końca 5' przyłączona została grupa fosforanowa z linkerem alkinowym. Obecność potrójnego wiązania węgiel-węgiel na końcu linkera miała umożliwić przeprowadzenie znakowania fluorescencyjnego na kolejnych etapach syntezy sondy. Odbezpieczony produkt syntezy wyizolowałam w postaci soli trietyloamonionowej z użyciem RP-HPLC.



Rysunek 50 12-merowy oligonukleotyd 5'-Hex-A₁₂ (A₀). (A) Struktura chemiczna. (B) Profil RP-HPLC oczyszczonego produktu syntezy A₀; $t_R(5'-Hex-A_{12}) = 6,7$ min. Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP) Supelcosil LC-18-T.

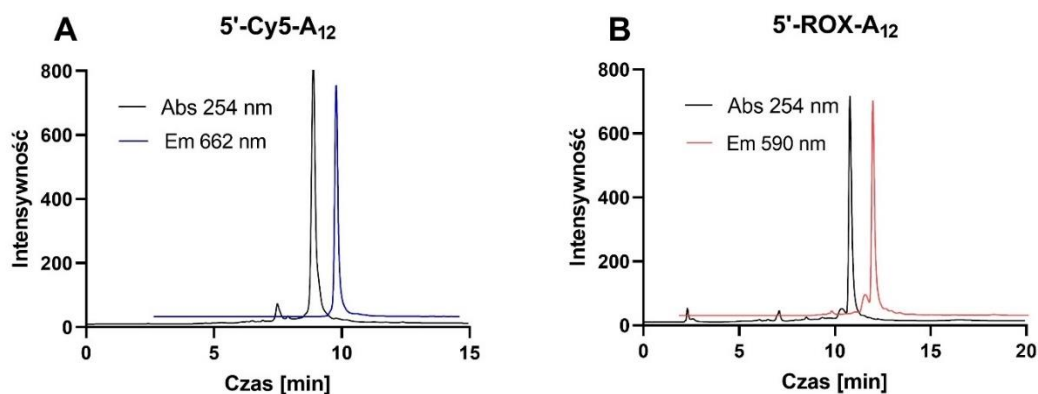
8.1.2. Znakowanie fluorescencyjne 5'-Hex-A₁₂ (A₀)

W celu otrzymania oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych zawierających różnego rodzaju znaczniki posłużyłam się metodą cykloadycji alkinowo-azydkowej katalizowanej jonami miedzi (I) (CuAAC), potocznie zwaną chemią click. Łącznie otrzymałam cztery sondy fluorescencyjne różniące się typem użytego znacznika. Wybrałam cztery znaczniki fluorescencyjne w postaci pochodnych azydkowych: izomer 5 fluoresceiny (5-FAM), cyjaninę 5 (Cy-5), rodaminę X (ROX) oraz fluoryzującą na zielono cząsteczkę BODIPY FL (BDP-FL). Fluorofory te różnią się znacząco wielkością, długościami fali wzbudzenia i emisji oraz fotostabilnością. Ogólny schemat syntezy sond oligonukleotydowych przedstawiony jest na Rysunku 51.



Rysunek 51 Schemat syntezy znakowanych fluorescencyjnie 12-merowych oligonukleotydów metodą CuAAC.

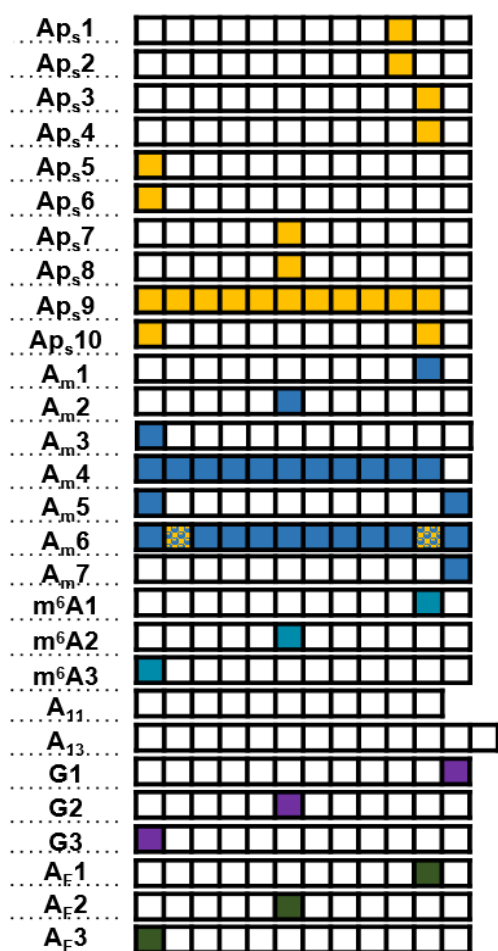
Wodny roztwór oligonukleotydu 5'-Hex-A₁₂ mieszany był z roztworami askorbinianu sodu oraz siarczanu miedzi (II), dzięki czemu katalizator reakcji - jon miedzi (I) generowany był *in situ*. Następnie do mieszaniny substratów dodawany był roztwór DMSO azydkowej pochodnej wybranego znacznika fluorescencyjnego. Ze względu na hydrofobowy charakter fluoroforów, ilość wody w mieszaninach reakcyjnych ograniczana była do maksymalnie 50% na rzecz większej ilości DMSO. Reakcje trwające około 1 godzinę pozwoliły na otrzymanie docelowych produktów ze stosunkowo wysokimi wydajnościami (Rys. 52). Produkty syntez wyizolowano w postaci soli trietyloamoniowych z wykorzystaniem RP-HPLC. Ich struktura potwierdzona została przy pomocy spektrometrii mas.



Rysunek 52 Przykładowe chromatogramy RP-HPLC z reakcji otrzymywania fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych. (A) 5'-Cy5-A₁₂ (A₀-2); $t_R(5'-\text{Cy5-A}_{12}) = 8,5 \text{ min}$. (B) 5'-ROX-A₁₂ (A₀-3); $t_R(5'-\text{ROX-A}_{12}) = 11 \text{ min}$. Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP) Supelcosil LC-18-T.

8.2. Otrzymywanie oligonukleotydowych analogów poli(A)

Na potrzeby badania wpływu modyfikacji chemicznych na powinowactwo analogów ogona poli(A) do PABP, zaprojektowałam oraz otrzymałam niewielką bibliotekę oligonukleotydowych związków. Łącznie przeprowadziłam syntezę 29 analogów poli(A), w tym szeregu związków różniących się rodzajem modyfikacji chemicznej oraz jej pozycją w sekwencji oligonukleotydu, jak również niemodyfikowanych oligonukleotydów różnej długości (Rys. 53). Wszystkie oligonukleotydy będące analogami ogona poli(A) otrzymałam analogicznie do związku A₀. Przeprowadziłam zautomatyzowane reakcje syntezy w fazie stałej z udziałem handlowo dostępnych amidofosforynów oraz podłoży stałych. Wszystkie związki zostały wyizolowane w postaci soli trietyloamoniowych z wykorzystaniem RP-HPLC, jak również poddane analizie z udziałem wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR-MS) w celu potwierdzenia ich czystości oraz masy. Ze względu na bardzo duży rozmiar cząsteczek oraz złożoną budowę otrzymanych oligonukleotydów, nie było możliwe potwierdzenie ich struktury metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).



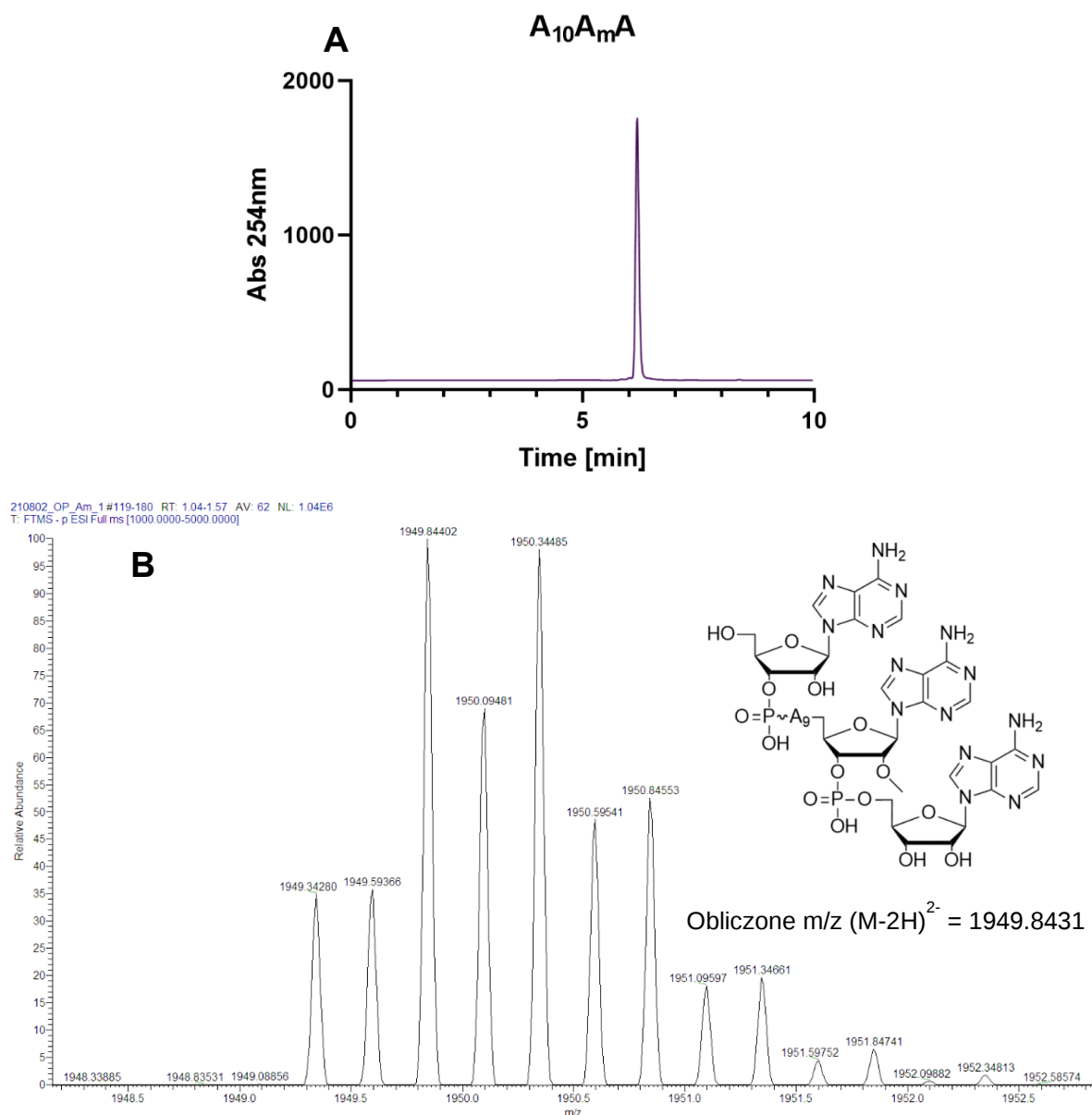
Rysunek 53 Pelen wykaz otrzymanych oligonukleotydowych analogów poli(A), wraz ze schematycznym przedstawieniem budowy oraz skrótowymi nazwami otrzymanych związków.

W badaniach zastosowane zostały następujące modyfikacje chemiczne i strukturalne oligonukleotydowych analogów poli(A): niemostrkowa modyfikacja tiofosforanowa (A_{p_s} lub PS), 2'-O-metyloadenozyna (A_m), 2'-fluoroadenozyna (A_F), N6-metyloadenozyna (m^6A) oraz zamiana adenozyny na guanozynę w sekwencji poli(A) (G). Modyfikacje te wybrane zostały ze względu na ich potencjalne zastosowanie w stabilizacji i kształtowaniu właściwości cząsteczek RNA (PS, A_m , A_F), lub ze względu na ich naturalne występowanie w strukturze poli(A) (m^6A , G).^{134,108} Moim celem było zbadanie, jak dana modyfikacja wpływa na powinowactwo oligonukleotydu do PABP oraz jego podatność na degradację enzymatyczną. Pod uwagę wzięty został zarówno typ, liczba, jak i umiejscowienie modyfikacji w obrębie oligonukleotydu i w efekcie wewnątrz kieszeni wiążących oddziałujących z nim białek. Przeprowadzona została synteza oligonukleotydów zawierających pojedyncze modyfikowane podjednostki w pobliżu jednego z końców, 5' lub 3', łańcucha lub w jego środkowej części. Otrzymane zostały również oligonukleotydy zawierające wielokrotne modyfikacje jednego typu lub modyfikacje mieszane. Pełen wykaz otrzymanych oligonukleotydów poli(A), wraz ze skrótowymi nazwami, przedstawiony został na Rysunku 53.

8.2.1. Analogi poli(A) zawierające 2'-O-metyloadenozynę

Metylacja grupy 2'-OH (2'-O-Me) jest jedną z najczęściej stosowanych modyfikacji chemicznych syntetycznych cząsteczek RNA. Jej podstawową funkcją jest ochrona cząsteczek RNA przed aktywnością nukleaz, a więc enzymów odpowiedzialnych za degradację kwasów nukleinowych.³⁹⁰ W pracy Barragán-Iglesias et al. zaprezentowano oligonukleotydowy inhibitor PABP nazwany SPOT-ON, zawierający 2'-O-metyloadenozyny (A_m) na całej długości sekwencji. Obecność modyfikowanych podjednostek przypuszczalnie przyczyniła się do bardzo wysokiej stabilności cząsteczki SPOT-ON względem niemodyfikowanego łańcucha poli(A). Jednakże dotychczasowe doniesienia wskazują, że modyfikacja 2'-O-Me może niekorzystnie wpływać na rozpoznanie i wiązanie cząsteczek RNA przez oddziałujące z nimi białka.³⁹¹ Z tego względu zaplanowałam przeprowadzenie dogłębnych badań nad wpływem modyfikacji A_m na powinowactwo analogów poli(A) do PABP. Łącznie otrzymałam siedem oligonukleotydów zawierających podjednostki A_m . Cztery spośród zsyntezowanych związków zawierały modyfikacje punktowe (A_{m1} , A_{m2} , A_{m3} , A_{m7}). Oligonukleotyd A_{m4} zmodyfikowany został dwiema podjednostkami A_m na końcach 3' i 5', podczas gdy A_{m5} zawierał modyfikacje na całej długości z wyjątkiem samego końca 3'. Analog A_{m6} stanowił dokładne odwzorowanie wspomnianej już cząsteczki SPOT-ON, składającej się z samych podjednostek A_m oraz dodatkowo zmodyfikowanej grupami tiofosforanowymi (PS) końcach 3' i 5'. W syntezie wykorzystano handlowo dostępne amidofosforyny oraz złoża CPG obsadzone amidofosforinami adenozynewymi lub 2'-O-

metyloadenizowymi, zależnie od typu podjednostki znajdującej się na końcu 3' oligonukleotydu. Przykładowe profile RP-HPLC oraz HR-MS dla wybranego oligonukleotydu (**A_m1**) zawierającego modyfikację A_m znajdują się na Rysunku 54.



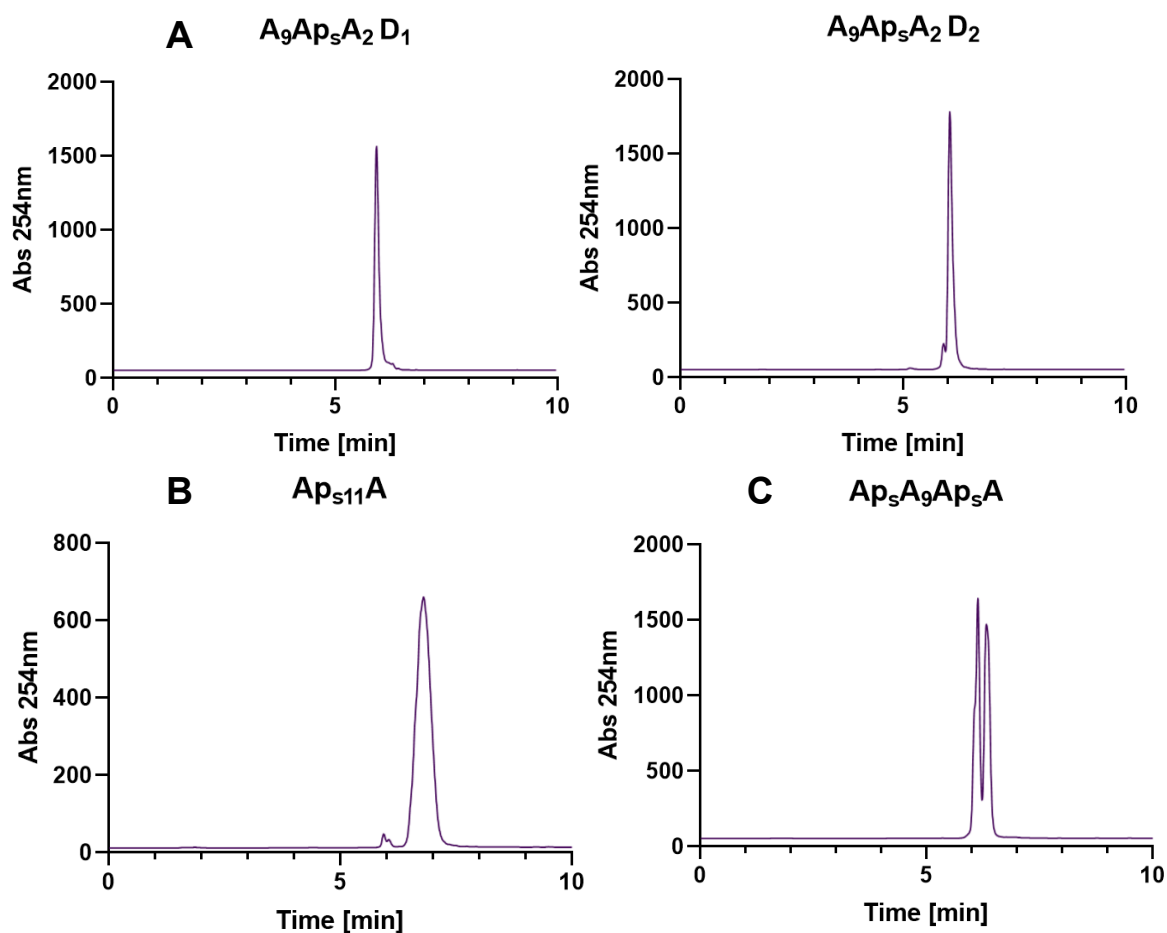
Rysunek 54 Przykładowe profile RP-HPLC oraz HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu zawierającego modyfikację A_m. (A) Chromatogram odbezpieczonego i oczyszczonego produktu reakcji otrzymywania oligonukleotydu A₁₀A_mA (**A_m1**); *t_R*(A₁₀A_mA) = 6.2 min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu A₁₀A_mA (**A_m1**).

8.2.2. Analogi zawierające wiązania tiofosfodiesterowe

Powszechnie wiadomo, że obecność grup tiofosforanowych (PS) w łańcuchach kwasów nukleinowych zwiększa ich odporność na degradację enzymatyczną.¹⁴⁶ mRNA zawierające wiązania tiofosfodiesterowe zbadane zostały w układach zarówno eukariotycznych, jak i prokariotycznych, a wpływ modyfikacji silnie zależał od jej umiejscowienia oraz zagęszczenia w sekwencji transkryptów.¹⁰⁰ Badania opublikowane w pracy Strzelecka i Śmiałowski et al. wykazały, że otrzymane na drodze enzymatycznej poliadenylacji mRNA posiadające ogony poli(A) składające się maksymalnie w 30% z podjednostek zawierających modyfikację PS wykazywały

znacznie zwiększoną odporność na deadenylację, przy równoczesnym zachowaniu wyjściowego poziomu translacji. Zwiększenie liczby modyfikowanych podjednostek ogonów poli(A) negatywnie wpływało na translację. Obecność wielu grup PS w łańcuchach kwasów nukleinowych może dawać efekt cytotoksyczności,³⁹² a więc modyfikację tę powinno się stosować oszczędnie i strategicznie w celu maksymalizacji efektów pożądaných, równocześnie unikając efektów negatywnych.

Łącznie zsyntezowałam dziesięć oligonukleotydów zawierających wiązania fosfodiesterowe. Osiem spośród otrzymanych związków zawierało punktowe modyfikacje PS w różnych pozycjach w sekwencji, przy czym w rzeczywistości stanowiły one cztery pary stereoizomerów (odpowiednio parami **Ap_s1** i **Ap_s2**, **Ap_s3** i **Ap_s4**, **Ap_s5** i **Ap_s6** oraz **Ap_s7** i **Ap_s8**; patrz Rys. 53). Jak już wspominałam w części literaturowej niniejszej pracy, niemożliwe modyfikacje tiofosforanowe wprowadzane do oligonukleotydów tradycyjnymi metodami syntetycznymi skutkują powstaniem centrum stereogenicznego w obrębie modyfikowanej grupy. Obecność jednej grupy tiofosforanowej w sekwencji oligonukleotydu prowadzi więc do powstania dwóch związków różniących się pod względem budowy przestrzennej. Każda kolejna modyfikacja w obrębie jednego łańcucha zwiększa liczbę możliwych kombinacji stereoizomerycznych zgodnie ze wzorem 2^{N-1} , gdzie N to całkowita liczba grup tiofosforanowych. Dodatkowo otrzymałam jeden oligonukleotyd zawierający modyfikacje dwóch skrajnych wiązań (**Ap_s10**) oraz oligonukleotyd (w postaci mieszaniny stereoizomerycznej), w którym wszystkie grupy fosforanowe zamienione zostały na tiofosforanowe (**Ap_s9**). Syntezę oligonukleotydów zawierających modyfikację PS prowadziłam zgodnie z procedurą ogólną z wykorzystaniem handlowo dostępnych amidofosforynów adenozynowych. Sulfuryzację wybranych grup fosforanowych prowadziłam z udziałem handlowo dostępnego odczynnika EDITH (ang. *3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one*). W przypadku oligonukleotydów zawierających modyfikacje punktowe (**Ap_s1** – **Ap_s8**) możliwe było rozdzielenie dwóch diastereoizomerów w trakcie standardowej procedury oczyszczania, nazwanych odpowiednio do czasu retencji na RP-HPLC D₁ i D₂. Ze względu na rozmiar cząsteczek oligonukleotydów, ustalenie ich konfiguracji absolutnej nie byłoby trywialne. Jednakże dane literaturowe wskazują, że diastereoizomery R_p najczęściej charakteryzują się krótszym czasem retencji od diastereoizomerów S_p na aparaturach RP-HPLC.³⁹³ W przypadku oligonukleotydów posiadających więcej niż jedną modyfikowaną podjednostkę nie było możliwości wyizolowania wszystkich wariantów stereoizomerów. Z tego względu związki **Ap_s9** i **Ap_s10** wyizolowano w postaci mieszanin izomerów. Przykładowe profile RP-HPLC oczyszczonych oligonukleotydów zawierających grupy PS przedstawione zostały na Rysunku 55.

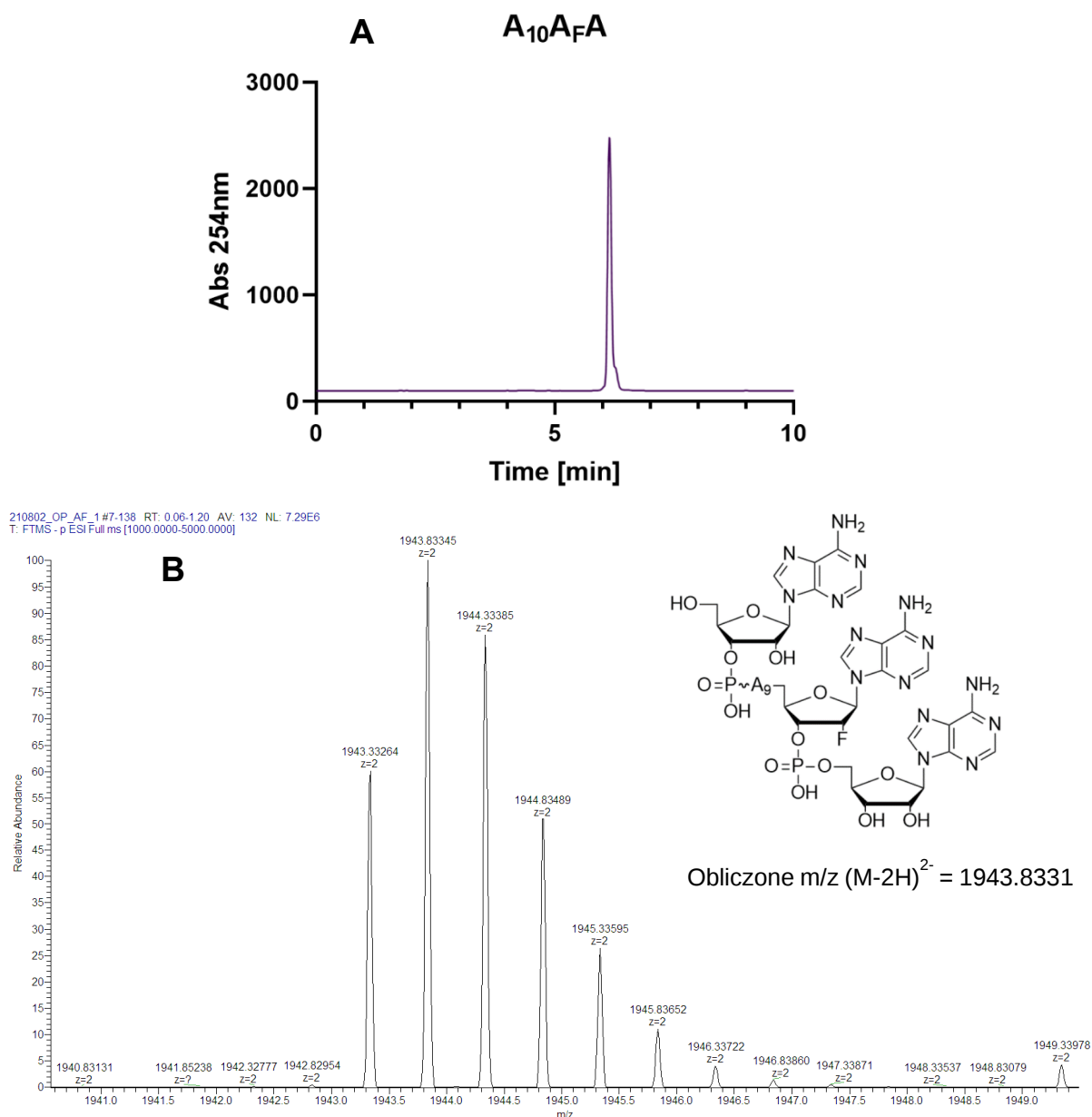


Rysunek 55 Profile RP-HPLC oligonukleotydów zawierających modyfikacje PS. (A) Stereoizomery D1 i D2 oligonukleotydu $A_9Ap_5A_2$ (**Ap_s1/Ap_s2**); $tR(A_9Ap_5A_2 D1) = 5.9$ min, $tR(A_9Ap_5A_2 D2) = 6.2$ min. (B) Mieszanina stereoizomerów oligonukleotydu $Ap_{s11}A$ (**Ap_s9**); $tR(Ap_{s11}A) = 6.9$ min. (C) Mieszanina 4 stereoizomerów oligonukleotydu $Ap_5A_9Ap_5A$ (**Ap_s10**); $tR(Ap_5A_9Ap_5A) = 6.2/6.4$ min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min.

8.2.3. Analogi zawierające 2'-fluoroadenozynę

Modyfikacja rybozy 2'-F pełni podobną funkcję w cząsteczkach syntetycznych RNA, co modyfikacja 2'-O-Me, mianowicie zwiększa stabilność chemiczną RNA i ich odporność na degradację enzymatyczną z udziałem rybonukleaz. Obecność modyfikacji 2'-F stabilizuje oddziaływania RNA-RNA, równocześnie nie zaburzając tworzenia się struktur drugorzędowych cząsteczki. Jest to więc powszechnie stosowana modyfikacja implementowana w strukturach syntetycznych RNA, takich jak aptamery i antysensowne oligonukleotydy. Jednakże dotychczas nie zbadano wpływu 2'-fluoroadenozyny na stabilność ogona poli(A), ani jego oddziaływanie z białkami specyficznie rozpoznającymi tę strukturę.

Łącznie przeprowadziłam syntezę trzech oligonukleotydów zawierających 2'-fluoroadenozynę. Modyfikacja wprowadzona została punktowo na końcu 3' (**A_F1**), w środku sekwencji oligonukleotydu (**A_F2**) oraz na końcu 5' (**A_F3**). Do syntezy wykorzystałam handlowo dostępne amidofosforyny adenozynowe oraz 2'-fluoroadenozynowe. Ze względu na brak dostępności stałego podłoża zawierającego odpowiednio modyfikowane amidofosforyny, w przypadku oligonukleotydu **A_F1** 2'-fluoroadenozyna wprowadzona została na drugiej pozycji od końca 3'. Przykładowe profile HPLC oraz HR-MS oligonukleotydu zawierającego modyfikację **A_F** znajdują się na Rysunku 56.



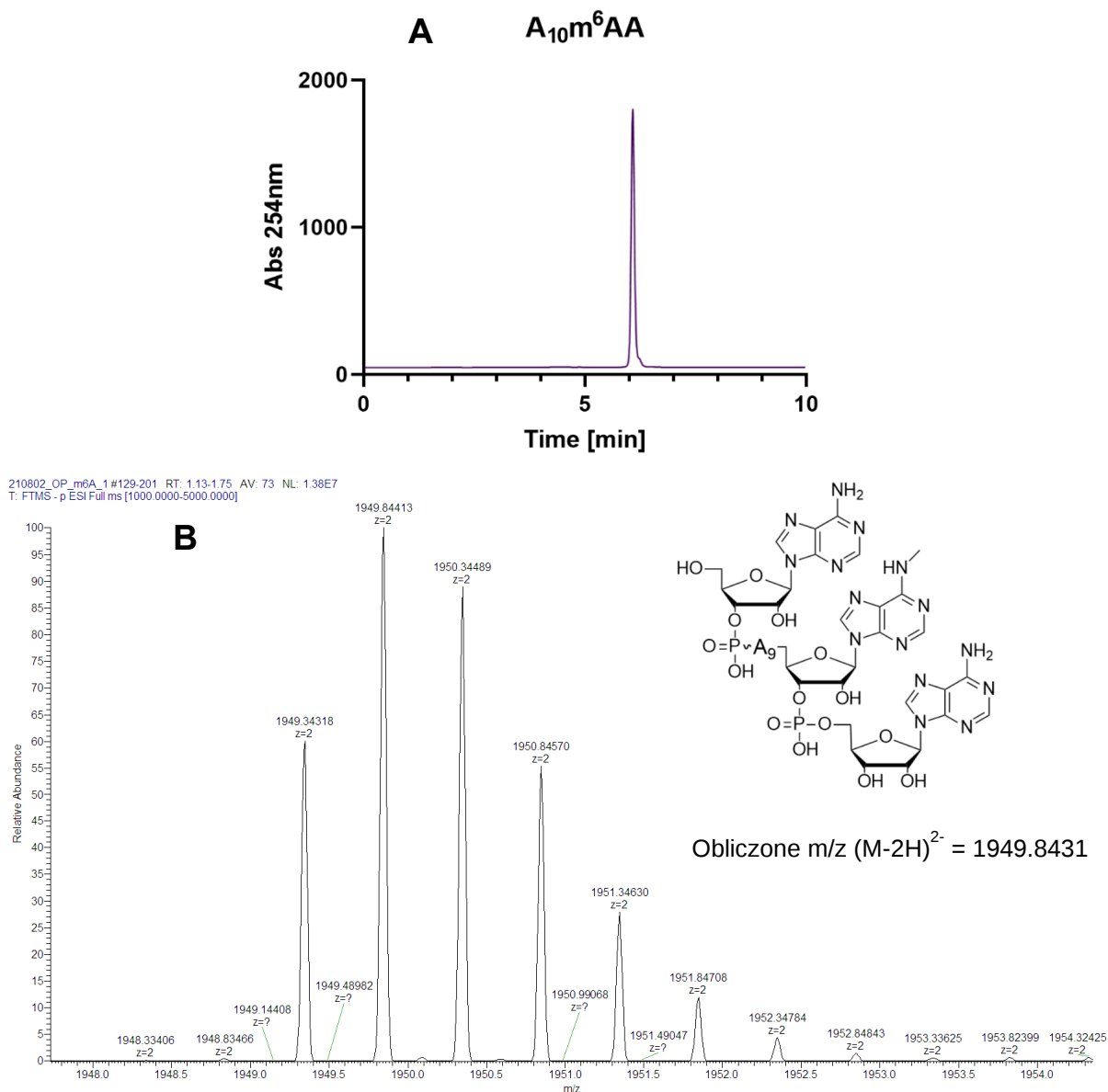
Rysunek 56 Przykładowy profil RP-HPLC oraz widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu zawierającego modyfikację A_F . (A) Chromatogram odbezpieczonego i oczyszczonego produktu reakcji otrzymywania oligonukleotydu $A_{10}A_F A$ ($A_F 1$); $t_R(A_{10}A_F A) = 6.2$ min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu $A_{10}A_F A$ ($A_F 1$).

8.2.4. Analogi zawierające N6-metyloadenozynę

N6-adenozyna (m^6A) jest najczęściej występującą naturalną modyfikacją mRNA. W rozdziale 2 szczegółowo opisałam niezwykle istotną rolę, jaką obecność m^6A pełni na wszystkich etapach komórkowego życia transkryptu, począwszy od splicingu pre-mRNA, poprzez regulację translacji, a kończąc na udziale w procesach degradacji. Podjednostki m^6A wymuszają lokalne zmiany konformacji RNA, wpływając na ich właściwości biochemiczne i oddziaływanie z białkami wiążącymi RNA. m^6A szczególnie często występują w sekwencjach 3' UTR, choć obecne są również w ogonach poli(A).

Otrzymałam trzy oligonukleotydy zawierające punktowe modyfikacje m^6A . Umieszczenie modyfikowanych podjednostek w sekwencji 12-merów było analogiczne do oligonukleotydów zawierających podjednostki A_F . A więc podjednostki m^6A znalazły się w pobliżu

końca 3' (**m⁶A1**), w środkowej części sekwencji (**m⁶A2**) oraz na końcu 5' (**m⁶A3**). Przykładowe profile RP-HPLC oraz HR-MS przedstawiające oligonukleotyd zawierający modyfikację m⁶A znajdują się na Rysunku 57.



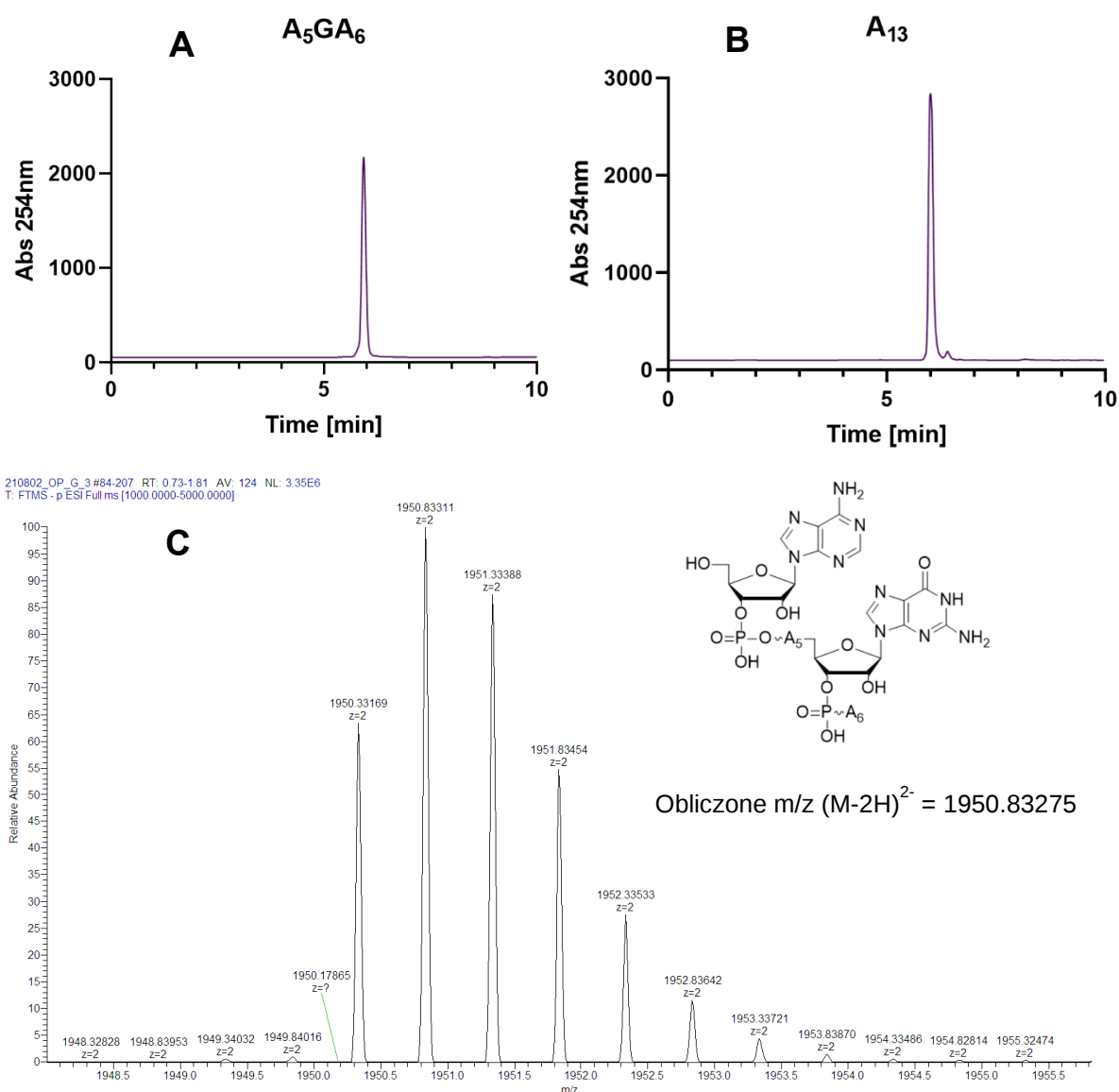
Rysunek 57 Przykładowy profil RP-HPLC oraz widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu zawierającego modyfikację m⁶A. (A) Chromatogram odbezpieczonego i oczyszczonego produktu reakcji otrzymywania oligonukleotydu A₁₀m⁶AA (**m⁶A1**); tR(A₁₀m⁶AA) = 6.1 min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu A₁₀AFA (**m⁶A1**).

8.2.5. Analogi zawierające guanozynę oraz niemodyfikowane analogi o różnej długości

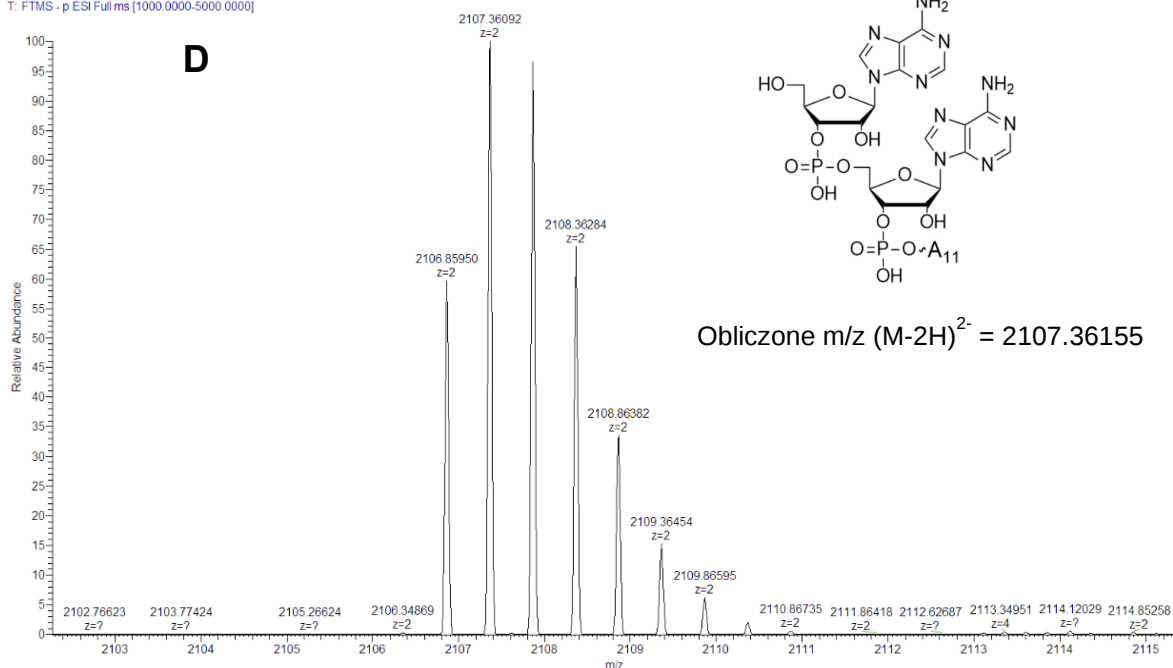
W kontekście struktury ogona poli(A) guanozyna nie stanowi chemicznej modyfikacji nukleotydowej w takim samym sensie, jak modyfikacje opisane powyżej. Jednakże obecność guanozyny w sekwencji poli(A) jest swojego rodzaju modyfikacją, która co więcej pełni istotne funkcje biologiczne. Ogony poli(A) cząsteczek mRNA niektórych organizmów posiadają punktowe modyfikacje w postaci pojedynczych podjednostek G, zastępujących naturalnie występujące w sekwencji adenozyne.¹³⁴ tego typu modyfikacja pełni dwójaką rolę. Po pierwsze, dzieli ogon poli(A) na segmenty przedzielone nukleotydami innymi niż A, co hamuje aktywność enzymów

deadenylujących. Poli(A) nie ulega więc ciągłej degradacji, zamiast tego usuwane są jego krótkie fragmenty. Przekłada się to na zwiększoną stabilność ogona poli(A) i w efekcie całej cząsteczki mRNA, jak również wpływa na proces translacji, której wydajność ściśle związana jest z długością sekwencji poliadenylowej na końcu 3'. Obecność zasad innych niż adenina w sekwencji wpływa również na wiązanie PABP do poli(A), co stanowi dodatkowy mechanizm regulacji procesów translacji i degradacji.

Przeprowadziłam syntezę trzech oligonukleotydów, w których jedna z podjednostek A zamieniona została na G. Analogicznie do opisanych poprzednio modyfikowanych oligonukleotydów, podjednostki G umieszczone zostały odpowiednio na końcu 3' (**G1**), w połowie sekwencji (**G2**) oraz na końcu 5' łańcucha (**G3**). Otrzymane zostały również trzy niemodyfikowane oligonukleotydy, w tym referencyjny oligonukleotyd **A₁₂** oraz dwa różniące się długością od pozostałych analogów poli(A) o jedną podjednostkę – **A₁₁** oraz **A₁₃**. Badania nad aktywnością PABP wykazały, że dwudomenowa odmiana białka wiąże fragmenty poli(A) o długości około 12 adenozyń. Moim celem było sprawdzenie czy wiązanie to może ulec dodatkowej stabilizacji lub destabilizacji pod wpływem niewielkiej różnicy w długości liganda. Przykładowe profile RP-HPLC oraz HR-MS oligonukleotydów posiadających podjednostkę G oraz o wydłużonym niemodyfikowanym łańcuchu przedstawione są na Rysunku 58.



210802 OP_A_13 #30-114 RT: 0.26-1.00 AV: 85 NL: 6.29E5
T: FTMS -p ESI Full ms [1000.0000-5000.0000]



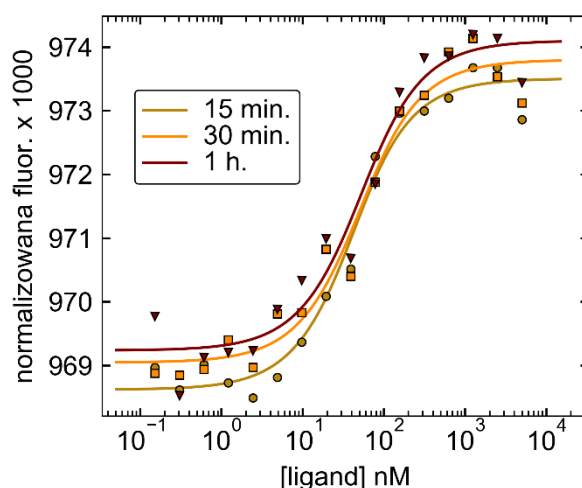
Rysunek 58 Przykładowy profil RP-HPLC oraz widmo HR-MS produktów syntezy oligonukleotydów pozbawionych modyfikacji chemicznych. (A) Chromatogram odbezpieczonego i oczyszczonego produktu reakcji otrzymywania oligonukleotydu A_5GA_6 (**G2**), $tR(A_5GA_6) = 5.9$ min. oraz (B) oligonukleotydu A_{13} $tR(A_{13}) = 6$ min.; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min. (C) Widmo HR-MS produktu syntezy oligonukleotydu A_5GA_6 (**G2**) oraz (D) A_{13} .

9. Badania oddziaływania analogów poli(A) z PABP metodą termoforezy mikroskalowej

9.1. Optymalizacja warunków pomiarowych

Opracowanie metody badawczej, pozwalającej na uzyskanie wiarygodnych oraz powtarzalnych wyników, wymaga przeprowadzenia optymalizacji podstawowych warunków pomiarowych na początkowym etapie badań. W przypadku metody służącej do pomiarów aktywności białek jednym z najistotniejszych elementów układu badawczego jest bufor, który stanowić będzie środowisko w jakim zachodzić będą obserwowane zjawiska. W celu określenia optymalnego buforu do badania aktywności białka PABP¹⁻¹⁹⁰ posłużyłam się dostępnymi danymi literaturowymi³⁹⁴ oraz pomiarami stabilności termicznej kompleksu PABP-A₁₂ w buforach o różnym składzie. Pomiary stabilności kompleksu wykonałam z użyciem urządzenia Tychy NT.6 firmy Nanotemper, umożliwiającego wyznaczenie temperatury topnienia białek (wyniki nie pokazane). Ostatecznie ustaliłam następujący skład buforu pomiarowego: 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2% Tween20, pH 7.4.

Kolejnym krokiem było określenie czasu inkubacji układu białko-ligand przed przystąpieniem do pomiarów. Jest to istotne zarówno z punktu widzenia dynamiki tworzenia się różnych kompleksów molekularnych, jak również stabilności tworzących go cząsteczek w czasie. Na tym etapie optymalizacji posłużyłam się pomiarami termoforezy mikroskalowej kompleksu PABP¹⁻¹⁹⁰ z sondą 5'-FAM-A₁₂ (A₀-1). Przygotowałam 16 roztworów o stałym stężeniu sondy fluorescencyjnej (25 nM) oraz różnych stężeniach białka w zakresie 0.15 nM – 10 μM. Roztwory inkubowane były w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, w czasie 15, 30 oraz 60 minut (Rys. 59). Dla najkrótszego czasu inkubacji, 15 minut, zaobserwować można było pełne wysycenie sondy oraz wyraźną krzywą wiązania kompleksu PABP¹⁻¹⁹⁰-A₀-1. 15 minut jest więc wystarczającym czasem na utworzenie się badanego kompleksu molekularnego.



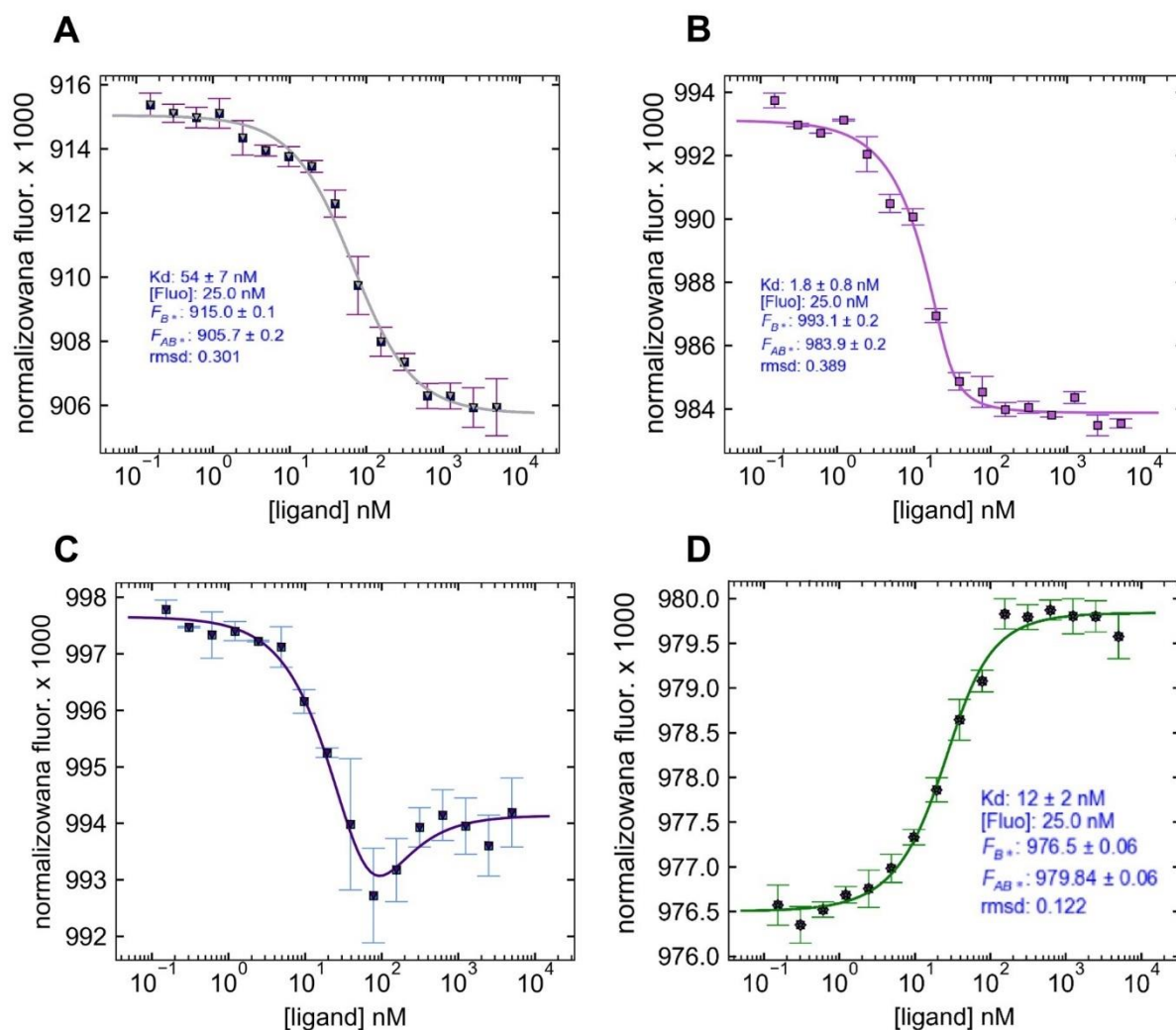
Rysunek 59 Krzywe wiązania kompleksu molekularnego między białkiem PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz sondą fluorescencyjną 5'-FAM-A₁₂. Roztwory o stałym stężeniu sondy oraz rosnącym stężeniu białka inkubowane były w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, w czasie 15, 30 oraz 60 minut. Krzywe wyznaczono na podstawie wartości fluorescencji w fazie pomiaru T-Jump. Do punktów pomiarowych dopasowano model wiązania 1:1 w programie Palmist.

9.2. Oddziaływanie sond fluorescencyjnych z PABP

Wyboru najlepszego znacznika fluorescencyjnego sondy wykorzystanej w pomiarach powinowactwa analogów poli(A) do PABP¹⁻¹⁹⁰ dokonałam na podstawie szeregu czynników:

- Stałych powinowactwa PABP¹⁻¹⁹⁰-sonda
- Stabilności kompleksu PABP¹⁻¹⁹⁰-sonda
- Powtarzalności wyników pomiarów tworzenia się kompleksu
- Stabilności sondy fluorescencyjnej

Otrzymane zostały cztery sondy fluorescencyjne – dwie wyznakowane cząsteczkami emitującymi światło z zakresu czerwonego (5'-Cy5-A₁₂, 5'-ROX-A₁₂) oraz dwie emitujące światło z zakresu zielonego (5'-FAM-A₁₂, 5'-BDP-Fl-A₁₂). Występują między nimi wyraźne różnice strukturalne - w rozmiarze i ładunku samej cząsteczki fluorescencyjnej oraz w długości linkera łączącego ją z fragmentem poli(A) (Rys. 51), co może mieć kluczowe znaczenie dla oddziaływania z kieszenią wiążącą białka. Pomiarów tworzenia się kompleksów molekularnych sond fluorescencyjnych z PABP¹⁻¹⁹⁰ dokonałam z użyciem metody MST, w warunkach opisanych w rozdziale 9.1. Stałe dysocjacji K_D kompleksów molekularnych wyznaczyłam w programie Palmist na podstawie dopasowania modelu wiązania 1:1 do wartości fluorescencji zmierzonych w fazie T-Jump pomiaru termoforezy.



Rysunek 60 Krzywe wiązania oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych do PABP¹⁻¹⁹⁰. (A) 5'-Cy5-A₁₂ (A0-2); (B) 5'-ROX-A₁₂ (A0-3); (C) 5'-BDP-FL-A₁₂ (A0-4); (D) 5'-FAM-A₁₂ (A0-1). Dla każdego układu zastosowano stałe stężenie sondy (25 nM) oraz stężenie białka w zakresie 0.15 nM - 10 uM. Krzywe wyznaczono na podstawie wartości fluorescencji w fazie pomiaru T-Jump. Do punktów pomiarowych dopasowano model wiązania 1:1 w programie Palmist, z wyjątkiem danych przedstawionych w punkcie (C), gdzie dopasowano model wiązania 1:2.

Sonda 5'-Cy5-A₁₂ (**A₀-2**) (Rys. 60A) wykazywała silne powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ ($K_D = 54$ nM). Otrzymane z jej udziałem wyniki eksperymentalne były powtarzalne. Podczas pomiarów MST nie zaobserwowałam zjawiska agregacji kompleksu białko-sonda, ani niespecyficznego wygaszania fluorescencji znacznika. Jednakże sama sonda **A₀-2** była niestabilna i ulegała rozpadowi w ciągu kilku dni mimo przechowywania w temperaturze -20°C, zarówno w formie wodnego roztworu, jak i w cieple stałym. Niestabilność sondy stanowiłaby poważne utrudnienie w otrzymywaniu wiarygodnych i powtarzalnych wyników w dłuższej perspektywie czasowej, z tego względu wykluczyłam wykorzystanie **A₀-2** w dalszych badaniach.

Sonda 5'-ROX-A₁₂ (**A₀-3**) (Rys. 60B) wykazywała bardzo silne powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ ($K_D = 1.8$ nM). Niestety, dostępny dla mojej grupy badawczej aparat do badania termoforezy mikroskalowej nie pozwala na wiarygodne pomiary bardzo silnych kompleksów molekularnych, dla których wartości stałych K_D są niższe niż ~10 nM. A więc wykorzystanie sondy **A₀-3** nie było możliwe z przyczyn technicznych.

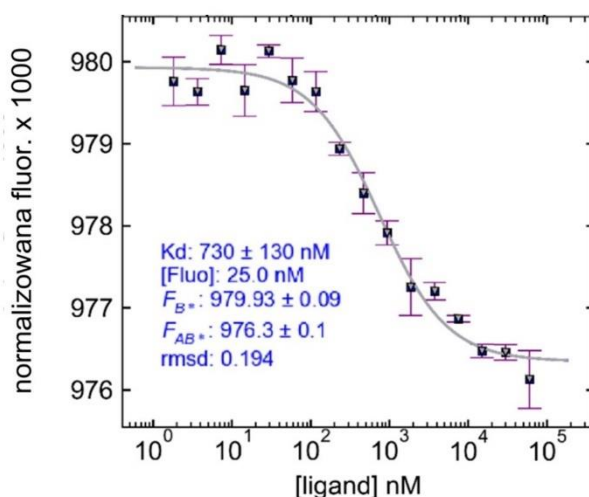
W przypadku badania wiązania sondy 5'-BDP-Fl-A₁₂ (**A₀-4**) do PABP¹⁻¹⁹⁰ zaobserwowałam niespecyficzne oddziaływanie między cząsteczkami kompleksu (Rys. 60C). W zakresie najwyższych stężeń białka dochodziło do przegięcia krzywej wiązania. Może to wynikać z dwustopniowego charakteru oddziaływania białko-ligand, jak również niespecyficznego oddziaływania cząsteczki znacznika fluorescencyjnego z białkiem w obrębie jego kieszeni wiążącej lub poza nią. Bez względu na naturę opisanego niespecyficznego oddziaływania, nie ma możliwości zastosowania modelu wiązania 1:1 do otrzymanych danych pomiarowych. Do przedstawionych na Rysunku 60C punktów pomiarowych dopasowany został model wiązania 1:2. Biorąc pod uwagę trudny do wyjaśnienia charakter oddziaływania między sondą **A₀-4** a PABP¹⁻¹⁹⁰, nie był to właściwy układ pomiarowy dla dalszych badań.

Sonda 5'-FAM-A₁₂ (**A₀-1**; Rys. 51) okazała się najlepszym wyborem. Wykazuje ona silne powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ w zakresie wartości K_D możliwych do wiarygodnego wyznaczenia na używanym sprzęcie pomiarowym ($K_D = 12$ nM). Wyniki były również powtarzalne, nie zaobserwowałam niespecyficznego oddziaływania białko-ligand. Sonda jest fotostabilna i może być przechowywana przez okres kilku miesięcy, zarówno w formie wodnego roztworu, jak i ciała stałego nie ulegając degradacji. Co ciekawe, ze wszystkich badanych sond fluorescencyjnych jedynie dla **A₀-1** zarejestrowałam krzywą wiązania do PABP¹⁻¹⁹⁰ o przebiegu charakterystycznym dla klasycznej termoforezy. Spodziewanym efektem powstawania kompleksu molekularnego jest spadek mobilności termoforetycznej wyznakowanej cząsteczki, co skutkuje wzrostem jej stężenia w punkcie pomiaru emisji fluorescencji. Dodatkowo zakłada się, że cząsteczki poruszają się w układzie w kierunku zimniejszych regionów i oddalają od źródła ciepła (dodatnia termoforeza).³⁹⁵ W przypadku sond **A₀-2**, **A₀-3**, **A₀-4** wzrost stężenia białka, skutkujący rosnącą liczbą cząsteczek sondy znajdujących się w kompleksie molekularnym, powodował spadek intensywności ich fluorescencji. Jest to występujące niekiedy zjawisko, mogące wynikać z faktu, że cząsteczki w stanie wolnym mają niższą mobilność termoforetyczną, niż w kompleksie z białkiem. Badany kompleks molekularny może również ulegać zjawisku ujemnej termoforezy, a więc poruszać się w kierunku cieplejszych regionów układu, zamiast się od nich oddalać. Powstająca ostatecznie krzywa termoforetyczna jest wypadkową wszystkich wymienionych efektów i bez względu na położenie jej górnego oraz dolnego plateau umożliwia wyznaczenie stałej dysocjacji K_D danego kompleksu molekularnego.

9.3. Pomiary kompetycyjnego wiązania modyfikowanych analogów poli(A) do PABP

Pomiary wiązania ligandów kompetycyjnych w postaci modyfikowanych oligonukleotydowych analogów ogona poli(A), do białka PABP¹⁻¹⁹⁰ w kompleksie z sondą 5'-FAM-A₁₂ przeprowadzone zostały w warunkach analogicznych do pomiarów bezpośredniego wiązania sondy. Sonda A₀-1 inkubowana była z PABP¹⁻¹⁹⁰ w temperaturze pokojowej przez 15 minut w buforze (50 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2% Tween20, pH 7.4). Użyte zostało stężenie białka tuż poniżej wartości odpowiadającej pełnemu wysyceniu sondy. Następnie roztwór gotowego kompleksu białko-sonda mieszaný był z roztworami wybranego liganda kompetycyjnego o różnym stężeniu. Pomiary MST prowadzone były po krótkiej inkubacji ostatecznych próbek w temperaturze pokojowej.

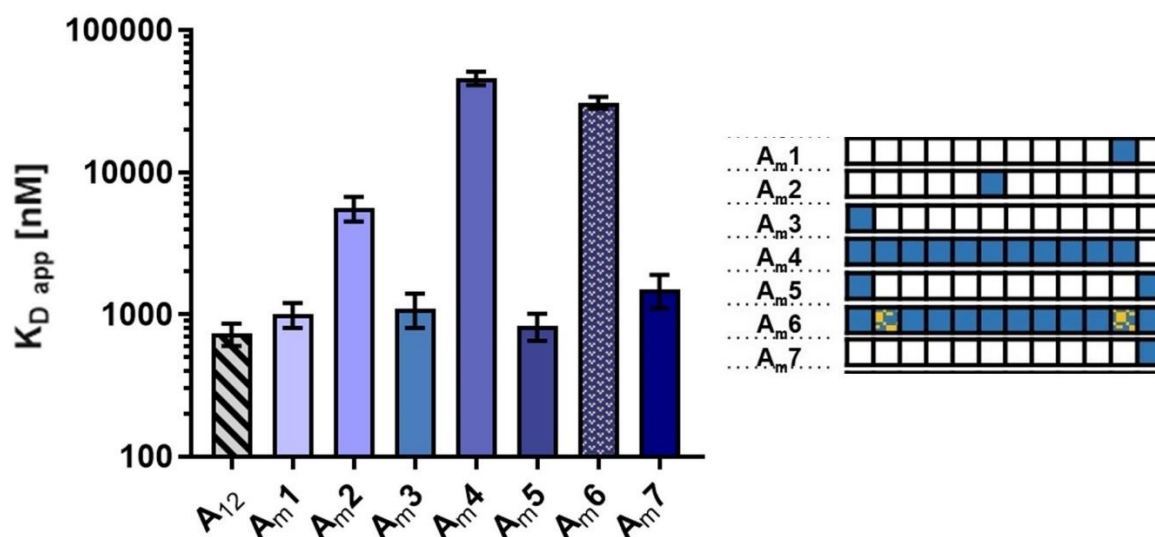
W pierwszej kolejności przeprowadziłam pomiary z udziałem niemodyfikowanego analogu poli(A) - A₁₂ (Rys. 61). A₁₂ zastępuje sondę w kieszeni wiążącej białka, uwalniając ją do roztworu i powodując zmianę w jej mobilności termoforetycznej. W efekcie można zaobserwować krzywą o odwrotnym przebiegu niż wyznaczona dla bezpośredniego wiązania białko-sonda (Rys. 60D). Pozorna wartość stałej dysocjacji $K_{D\text{ app}} = 730$ nM wyznaczona dla kompleksu PABP¹⁻¹⁹⁰-A₁₂ stanowiła punkt odniesienia podczas kolejnych pomiarów z udziałem analogów zawierających modyfikacje chemiczne. Wykorzystując opisaną w literaturze metodę dopasowania globalnego³⁹⁶ wyznaczyłam dokładną wartość K_D dla kompleksu PABP¹⁻¹⁹⁰-A₁₂ równą 18 nM, co jest zbliżone do wartości wyznaczonej metodą bezpośrednią dla kompleksu PABP z sondą znakowaną fluoresceiną



Rysunek 61 Krzywa wiązania kompetycyjnego niemodyfikowanego analogu A₁₂ do białka PABP¹⁻¹⁹⁰ w kompleksie z sondą w fluorescencyjną A₀-1. Krzywe wyznaczono na podstawie wartości fluorescencji w fazie pomiaru T-Jump. Do punktów pomiarowych dopasowano model wiązania 1:1 w programie Palmist.

9.3.1. Wiązanie analogów zawierających 2'-O-metyloadenozynę

Pomiary powinowactwa do PABP¹⁻¹⁹⁰ analogów poli(A) zawierających modyfikacje w postaci 2'-O-metyloadenozyny (A_m) prowadziłam zgodnie z procedurą ogólną opisaną na początku rozdziału 9.3. Na Rysunku 62 przedstawione zostały pozorne wartości $K_{D\text{ app}}$ uzyskane dla wszystkich kompleksów analogów modyfikowanych A_m z PABP¹⁻¹⁹⁰ (dane numeryczne zebrano w Tabeli 1).

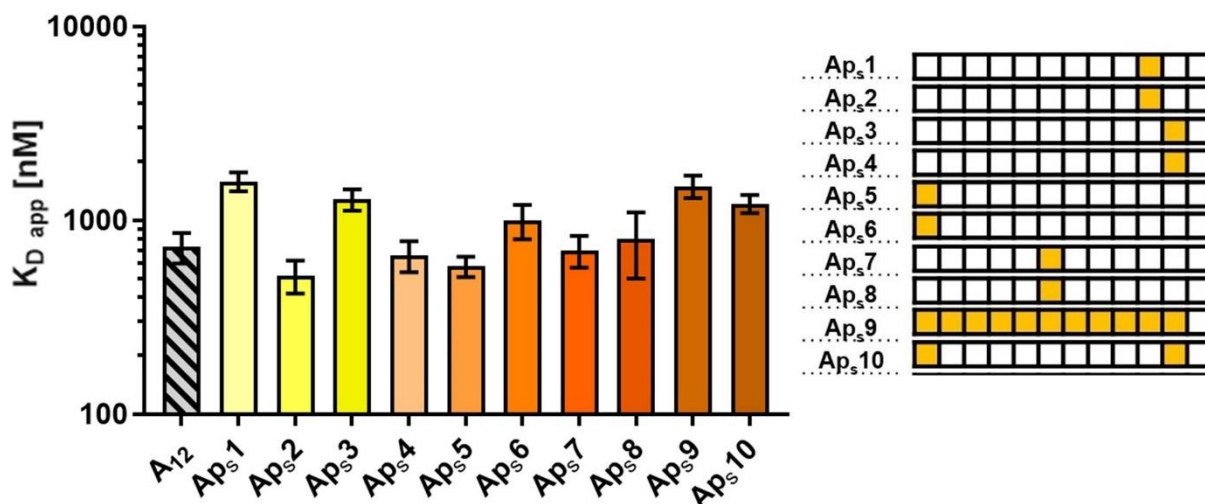


Rysunek 62 Pozorne stałe dysocjacji $K_{D \text{ app}}$ dla kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających modyfikowane podjednostki 2'-O-metyloadenozyny. Wartości uzyskano dzięki eksperymentom wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST. Wartości $K_{D \text{ app}}$ oraz odpowiadające im odchylenia standardowe wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń.

Między poszczególnymi analogami można zaobserwować bardzo wyraźnie różnice w wartościach $K_{D \text{ app}}$, wynikające zarówno z liczby, jak i umiejscowienia modyfikowanych podjednostek w łańcuchu oligonukleotydu. Po pierwsze, obecność pojedynczej podjednostki A_m w środkowej części łańcucha (A_{m2}, Rys. 53) skutkowałą spadkiem powinowactwa do PABP¹⁻¹⁹⁰ o pełen rząd wielkości względem niemodyfikowanego analogu, podczas gdy modyfikacje umiejscowione na końcach 3' lub 5' (A_{m1}, A_{m3}, A_{m5}, A_{m7}) tylko w niewielkim stopniu zaburzały wiązanie do białka. Po drugie, analogi zawierające wielokrotne modyfikacje A_m (A_{m4}, A_{m6}/SPOT-ON) wykazywały bardzo słabe powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰, o dwa rzędy wielkości słabsze od niemodyfikowanego A₁₂. Uzyskane wyniki wskazują na jasną preferencję dotyczącą umiejscowienia podjednostek A_m w łańcuchu oligonukleotydowym. Stanowią również potwierdzenie przedstawionej w rozdziale 9.3.1. tezy dotyczącej negatywnego wpływu obecności grupy metylowej w pozycji 2' rybozy na rozpoznanie i wiązanie łańcuchów RNA przez naturalnie oddziałujące z nimi białka. Zawierający same modyfikowane podjednostki oraz dwa modyfikowane wiązania tiofosfodiesterowe związek A_{m6} (SPOT-ON) tworzył kompleksy z PABP¹⁻¹⁹⁰ ze znacznie niższym powinowactwem niż analogi zawierające modyfikacje punktowe.

9.3.2. Wiązanie analogów zawierających wiązania tiofosfodiesterowe

Wyznaczono wartości stałych powinowactwa kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ z dziesięcioma analogami poli(A) zawierającymi wiązania tiofosfodiesterowe (Rys. 63). W grupie badanych oligonukleotydów znajdowały się cztery pary stereoisomerów analogów zawierających pojedyncze modyfikacje PS, jak również dwa związki wielokrotnie modyfikowane, stanowiące mieszaniny izomerów. Podobnie, jak w przypadku analogów zawierających podjednostki A_m, można zaobserwować wyraźnie różnice między analogami z różnego typu modyfikacjami PS, przy czym skala owych różnic jest dużo mniejsza. Poszczególne stereoisomery analogów zawierających modyfikacje punktowe (parami Ap_{s1} i Ap_{s2}, Ap_{s3} i Ap_{s4}, Ap_{s5} i Ap_{s6} oraz Ap_{s7} i Ap_{s8}) różniły się powinowactwem do PABP¹⁻¹⁹⁰ niekiedy nawet trzykrotnie. Dla niektórych (Ap_{s2}, Ap_{s4}, Ap_{s5}, Ap_{s7}, Ap_{s8}) wyznaczyłam wartości $K_{D \text{ app}}$ bardzo zbliżone do niemodyfikowanego analogu.

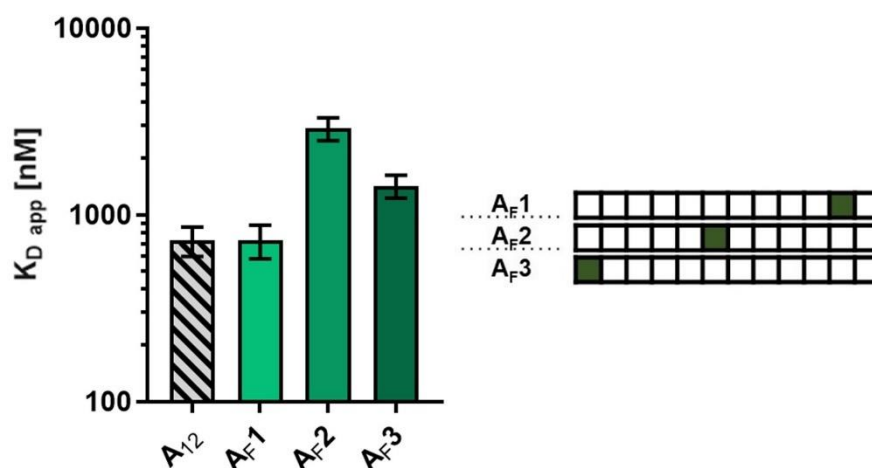


Rysunek 63 Pozorne stałe dysocjacji $K_{D\text{ app}}$ dla kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających modyfikowane wiązania tiofosfodiesterowe. Wartości uzyskano dzięki eksperymentom wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST. Wartości $K_{D\text{ app}}$ oraz odpowiadające im odchylenia standardowe wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń.

Nawet w przypadku związków będących mieszaninami stereoizomerów zawierających wielokrotne modyfikacje (**A_{p_s9}**, **A_{p_s10}**) spadek powinowactwa był stosunkowo niewielki. Oznacza to, że obecność wiązania tiofosfodiesterowego nie zaburza znacząco wiązania do PABP¹⁻¹⁹⁰. W odróżnieniu od analogów A_m, brak również wyraźnych różnic między analogami zawierającymi pojedyncze modyfikacje PS w różnych częściach łańcucha. Wspomniany w poprzednim podrozdziale związek **A_{m6}** zawiera dwa wiązania tiofosfodiesterowe w skrajnych częściach łańcucha. Jego szczególnie niskie powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ wynika najpewniej z faktu, że wszystkie znajdujące się w jego łańcuchu adenozyne zawierają modyfikację 2'-O-Me. Potwierdza tę hipotezę fakt, że **A_{p_s10}** posiadający modyfikacje PS umiejscowione analogicznie do **A_{m6}** charakteryzuje się znacznie silniejszym powinowactwem w kompleksie z PABP¹⁻¹⁹⁰.

9.3.3. Wiązanie analogów zawierających 2'-O-fluoroadenozyne

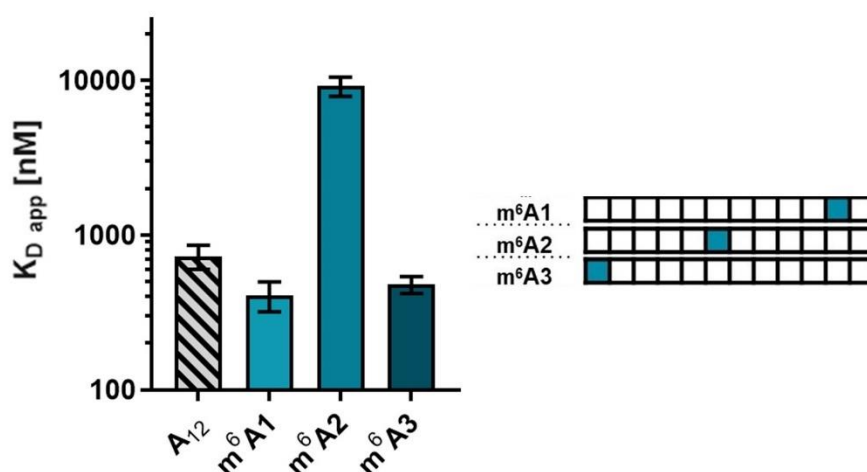
2'-O-fluoroadenozyne w strukturach kwasów nukleinowych pod wieloma względami wykazuje podobne właściwości do 2'-O-metyloadenozyne. Zarówno pod względem umiejscowienia, jak i wielkości modyfikacji, są to stosunkowo podobne cząsteczki. Znalazło to swoje potwierdzenie w wynikach pomiarów powinowactwa do PABP¹⁻¹⁹⁰ uzyskanych dla oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających pojedyncze podjednostki A_F (Rys. 64). Modyfikacje umiejscowione na końcach łańcucha oligonukleotydowego (**A_{F1}**, **A_{F3}**) zaburzały wiązanie do białka w dużo mniejszym stopniu, niż modyfikacja znajdująca się w jego środkowej części (**A_{F2}**). W przypadku analogu modyfikowanego na końcu 3' (**A_{F1}**) wyznaczona wartość $K_{D\text{ app}}$ jest niemal identyczna do wartości odpowiadającej niemodyfikowanemu **A₁₂**. Z kolei analog **A_{F2}** wykazuje pięciokrotnie niższe powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ niż **A₁₂**. Są to wyniki zbliżone do uzyskanych dla analogów A_m.



Rysunek 64 Pozorone stałe dysocjacji $K_{D app}$ dla kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających podjednostki 2'-O-fluoroadenozy. Wartości uzyskano dzięki eksperymentom wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST. Wartości $K_{D app}$ oraz odpowiadające im odchylenia standardowe wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń.

9.3.4. Wiązanie analogów zawierających N6-metyloadenozyne

N6-metyloadenozyne jest jedynym naturalnie występującym modyfikowanym nukleotydem spotykanym w ogonach poli(A) eukariotycznych mRNA. Z tego względu jej wpływ na tworzenie się kompleksów łańcuchów poliadenylowych i PABP jest ciekawym zagadnieniem, wartym zbadania. Wyznaczone zostały stałe powinowactwa kompleksów trzech analogów poli(A) zawierających podjednostki m⁶A z PABP¹⁻¹⁹⁰ (Rys. 65).

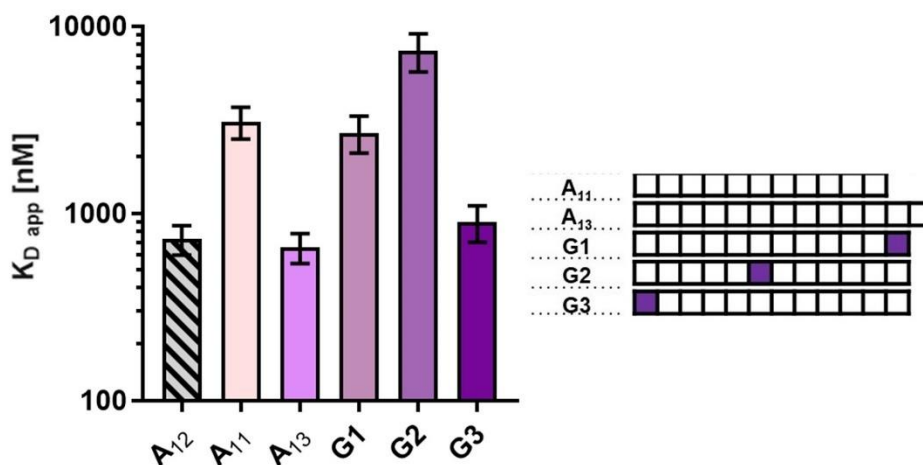


Rysunek 65 Pozorone stałe dysocjacji, $K_{D app}$, dla kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających podjednostki N6-metyloadenozy. Wartości uzyskano dzięki eksperymentom wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST. Wartości $K_{D app}$ oraz odpowiadające im odchylenia standardowe wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń.

Ponownie różnice między analogami modyfikowanymi na końcach 3' i 5' (m⁶A1, m⁶A3), a analogiem zawierającym podjednostkę m⁶A w połowie sekwencji (m⁶A2) są znaczące. m⁶A2 wykazuje bardzo niskie powinowactwo do białka, ponad rząd wielkości niższe niż niemodyfikowany analog. Z kolei wartości stałych dysocjacji kompleksów m⁶A1 i m⁶A3 z PABP¹⁻¹⁹⁰ są nieznacznie niższe, niż w przypadku analogu A₁₂. Oznacza to, że umiejscowienie modyfikowanej podjednostki m⁶A w skrajnych częściach łańcucha oligonukleotydu nie tylko nie zaburza jego wiązania do białka, ale może je również w niewielkim stopniu je stabilizować.

9.3.5. Wiązanie analogów zawierających guanozynę oraz o skróconym i wydłużonym łańcuchu

Na koniec przeprowadzone zostały pomiary powinowactwa do PABP¹⁻¹⁹⁰ analogów różniących się od niemodyfikowanego oligonukleotydu **A₁₂** długością (**A₁₁**, **A₁₃**) oraz obecnością pojedynczych guanozyn zastępujących adenozyne w sekwencji (**G1**, **G2**, **G3**). Wartości $K_{D\text{ app}}$ stałych powinowactwa przedstawione zostały na Rysunku 66.



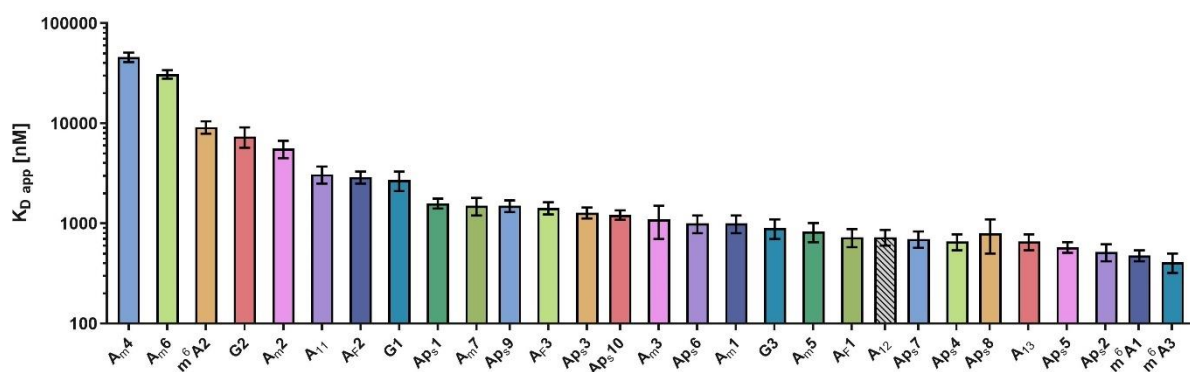
Rysunek 66 Stałe powinowactwa $K_{D\text{ app}}$ dla kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz oligonukleotydowych analogów poli(A) zawierających guanozynę oraz o długości 11 lub 13 adenozyne. Wartości uzyskano dzięki eksperymentom wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST. Wartości $K_{D\text{ app}}$ oraz odpowiadające im odchylenia standardowe wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń.

Skrócenie niemodyfikowanego łańcucha o jedną podjednostkę (**A₁₁**) skutkuje znaczącym spadkiem powinowactwa analogu poli(A) do PABP¹⁻¹⁹⁰. Z kolei analog o łańcuchu wydłużonym również o jeden nukleotyd (**A₁₃**) wykazywał powinowactwo bardzo zbliżone do **A₁₂**. Można więc wnioskować, że rekombinowana, dwudomenowa cząsteczka PABP posiada kieszeń wiążącą 12-merowy fragment poliadenylowy. Stąd też jej wiązanie do krótszego łańcucha poli(A) nie jest równie stabilne, natomiast wydłużenie sekwencji nie przyczynia się do zwiększenia stabilności owego oddziaływania.

Obecność guanozyne w sekwencji analogu poli(A) zaburza wiązanie do PABP¹⁻¹⁹⁰, co jest efektem spodziewanym biorąc pod uwagę naturalną preferencję substratową PABP do sekwencji poliadenylowych. Uzyskane wyniki pozostają również w zgodzie z dotychczasowymi danymi literaturowymi, wskazującymi na możliwość regulacji procesów translacji dzięki naturalnie występującym modyfikacjom ogonów poli(A) w postaci pojedynczych podjednostek G w ich strukturach. Tylko jeden z analogów zawierających guanozynę (**G3**) wykazywał wysokie powinowactwo do białka PABP¹⁻¹⁹⁰ na poziomie zbliżonym do niemodyfikowanego analogu, podczas gdy związki **G1** i **G2**, a więc zawierające modyfikacje na końcu 3' oraz w połowie sekwencji, tworzyły znacznie słabsze kompleksy z badanym białkiem.

9.4. Podsumowanie

Łącznie zbadalam 29 oligonukleotydowych analogów ogona poli(A) w kontekście ich powinowactwa do rekombinowanej, dwudomenowej odmiany białka PABP¹⁻¹⁹⁰. Na podstawie pomiarów wiązania kompetycyjnego wykonanych z użyciem metody MST wyznaczone zostały wartości pozornych stałych dysocjacji ($K_{D\text{ app}}$) dla kompleksów analogów z PABP¹⁻¹⁹⁰.



Rysunek 67 Zestawienie wszystkich wartości stałych powinowactwa $K_{D\text{ app}}$ uzyskanych dla analogów ogona poli(A) w kompleksie z białkiem PABP¹⁻¹⁹⁰. Wyniki przedstawiono w kolejności od najwyższej do najniższej wartości.

Na Rysunku 67 przedstawione zostało ogólne zestawienie uzyskanych wyników. Z kolei w Tabeli 1 znajdują się dokładne wartości numeryczne stałych $K_{D\text{ app}}$ wraz ze skróconymi i pełnymi nazwami badanych związków oligonukleotydowych. Na podstawie wyników przedstawionych w poprzednich podrozdziałach można wysunąć szereg ogólnych wniosków dotyczących specyfiki PABP¹⁻¹⁹⁰ w kontekście oddziaływania z 12-merowymi fragmentami sekwencji poliadenylowych zawierających różnego rodzaju modyfikacje chemiczne. W pierwszej kolejności należy zwrócić uwagę na wyraźną korelację między umiejscowieniem modyfikowanych podjednostek w łańcuchu oligonukleotydu, a jego powinowactwem do białka. Analogi zawierające modyfikacje w środkowej części sekwencji (np. **G2**, **A_m2**, **A_F2**) oddziaływały z PABP¹⁻¹⁹⁰ ze znacznie mniejszym powinowactwem niż niemodyfikowany analog **A₁₂**, jak również oligonukleotydy zawierające analogiczne modyfikacje w skrajnych częściach łańcucha (np. **m⁶A1**, **G3**, **A_F1**, **A_m1**). Drugą istotną obserwacją jest fakt, że powinowactwo analogów poli(A) do białka malało wraz z rosnącą liczbą modyfikacji. A więc związki takie, jak **A_m4**, **A_m6/SPOT-ON**, **Ap_s10**, zawierające liczne modyfikowane podjednostki charakteryzują się słabszym oddziaływaniem z PABP¹⁻¹⁹⁰ w porównaniu do analogu niemodyfikowanego oraz analogów zawierających punktowe modyfikacje, zwłaszcza umiejscowione w pobliżu końców 3' i 5'. Co ciekawe, analogi zawierające modyfikowane wiązania tiofosfodiesterowe jako jedyne zdają się nie wykazywać silnej zależności między umiejscowieniem i liczbą modyfikacji, a oddziaływaniem z białkiem. Bez względu na położenie wiązań PS oraz ich liczbę, wszystkie modyfikowane analogi wykazywały nieco słabsze powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ od niemodyfikowanego analogu. Znaczące różnice występują przede wszystkim pomiędzy stereoisomerami analogów zawierających modyfikacje punktowe, podczas gdy mieszaniny stereoisomerów związków **Ap_s9** i **Ap_s10** charakteryzują się bardzo zbliżonymi wartościami $K_{D\text{ app}}$ mimo dużej różnicy w liczbie modyfikowanych wiązań. Można więc ostatecznie wywnioskować, że dla oddziaływania z kieszenią wiążącą PABP¹⁻¹⁹⁰ istotna jest przede wszystkim struktura rybozy oraz rodzaj zasady kwasu nukleinowego.

Tabela 1 Wartości stałych powinowactwa kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ z oligonukleotydowymi analogami ogona poli(A).

NUMER	SKRÓT	OLIGONUKLEOTYD	K _{D, APP} (μM)	SD (μM)
1	A ₁₂	A ₁₂	0.73	0.13
2	Ap _s 1	A ₉ Ap _s A ₂ D1	1.59	0.18
3	Ap _s 2	A ₉ Ap _s A ₂ D2	0.52	0.10
4	Ap _s 3	A ₁₀ Ap _s A D1	1.28	0.16
5	Ap _s 4	A ₁₀ Ap _s A D2	0.66	0.12
6	Ap _s 5	Ap _s A ₁₁ D1	0.58	0.70
7	Ap _s 6	Ap _s A ₁₁ D2	1.00	0.20
8	Ap _s 7	A ₅ Ap _s A ₆ D1	0.70	0.13
9	Ap _s 8	A ₅ Ap _s A ₆ D2	0.80	0.30
10	Ap _s 9	Ap _s ₁₁ A	1.50	0.20
11	Ap _s 10	Ap _s A ₉ Ap _s A	1.22	0.13
12	A ₁₁	A ₁₁	3.10	0.60
13	A ₁₃	A ₁₃	0.66	0.12
14	G1	A ₁₁ G	2.70	0.60
15	G2	A ₅ GA ₆	13.00	3.00
16	G3	GA ₁₁	0.90	0.20
17	A _m 1	A ₁₀ A _m A	1.00	0.20
18	A _m 2	A ₅ A _m A ₆	4.70	0.80
19	A _m 3	A _m A ₁₁	1.10	0.30
20	A _m 4	A _m ₁₁ A	46.0	5.0
21	A _m 5	A _m A ₁₁ A _m	0.83	0.18
22	A _m 6	A _m p _s A _m 9A _m p _s A _m	31.0	3.0
23	A _m 7	A ₁₁ A _m	1.50	0.40
24	m ⁶ A1	A ₁₀ m ⁶ A	0.41	0.09
25	m ⁶ A2	A ₅ m ⁶ A ₆	9.2	1.3
26	m ⁶ A3	m ⁶ A-A ₁₁	0.48	0.06
27	A _F 1	A ₁₀ A _F A	0.73	0.15
28	A _F 2	A ₅ A _F A ₆	2.90	0.40
29	A _F 3	A _F A ₁₁	1.43	0.20

10. Badania podatności analogów ogona poli(A) na specyficzną degradację

W celu zbadania wpływu poszczególnych modyfikacji na proces specyficznego degradacji sekwencji poli(A), przeprowadzone zostały eksperymenty enzymatyczne z udziałem CNOT7, czyli katalitycznej podjednostki deadenylującego kompleksu białkowego CCR4-Not. CNOT7 posiada aktywność $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazy i bierze czynny udział w usuwaniu ogonów poli(A) z końca $3'$ cytoplazmatycznych cząsteczek eukariotycznego mRNA.

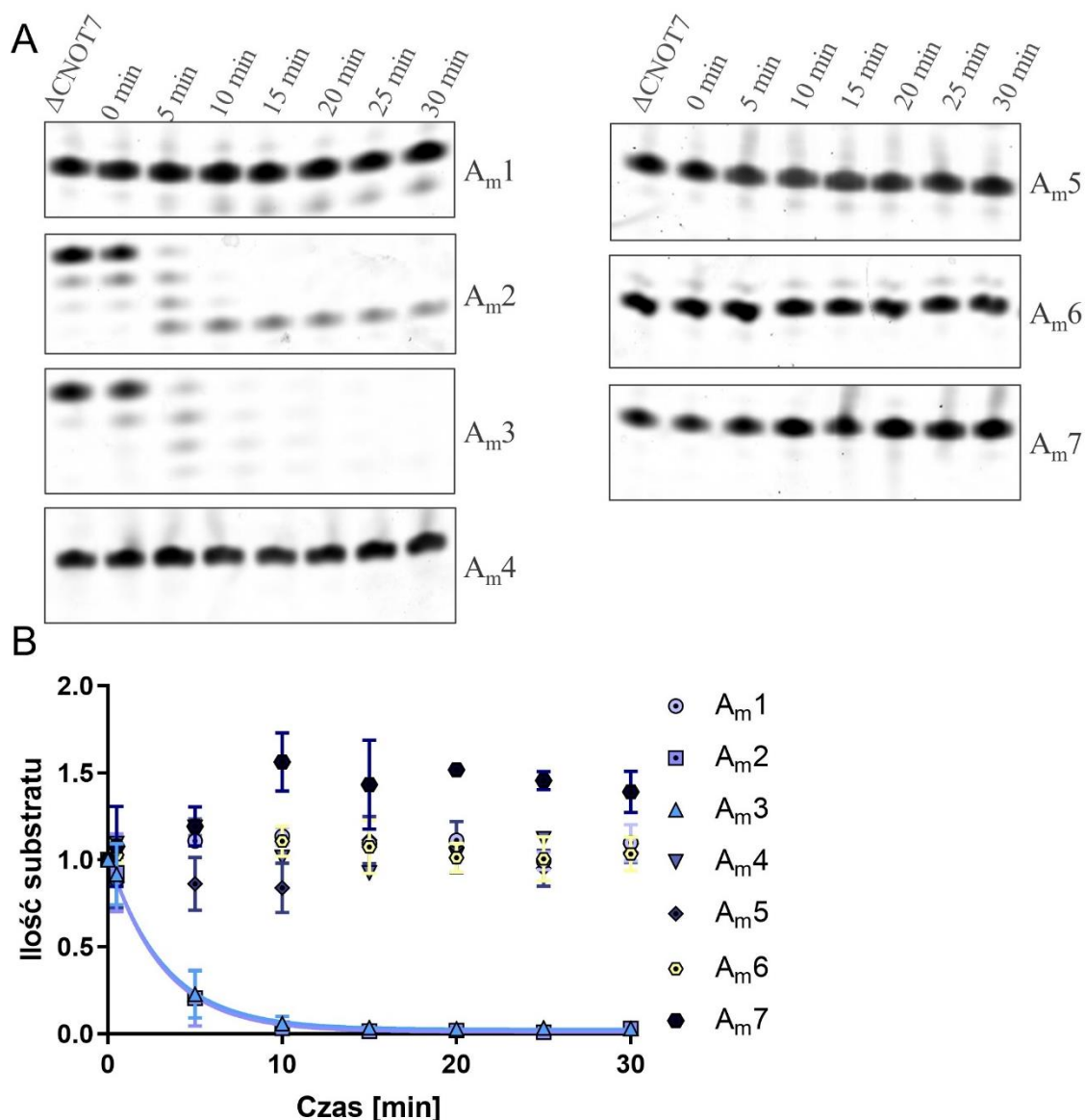
10.1. Eksperymenty degradacji enzymatycznej analogów poli(A) z udziałem CNOT7

Tę samą bibliotekę analogów ogona poli(A), których powinowactwo do rekombinowanego białka PABP zbadalam w rozdziale 9, poddałam eksperymentom specyficznego degradacji przez CNOT7. Każdy z analogów inkubowany był z CNOT7 przez 30 minut w temperaturze 37°C . Wszystkie eksperymenty z CNOT7 prowadziłam w buforze Tris 20 mM o pH 8.0, z dodatkiem 20 mM DTT, 10 mM MgCl_2 oraz 100 mM KCl. Z mieszaniny reakcyjnej pobierałam próbki w odstępach 5-minutowych, zaczynając od czasu 0 minut. Reakcja w każdym punkcie czasowym zatrzymywana była poprzez rozcieńczenie pobranej porcji mieszaniny reakcyjnej roztworem EDTA w stosunku 1:1. Próbkę, wraz z kontrolą negatywną w postaci oligonukleotydu nie poddanego trawieniu CNOT7, analizowano z wykorzystaniem wysokorozdzielczej elektroforezy żelowej na denaturującym mocznikowym żelu poliakrylamidowym (PAGE, ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*). Każdy żel po zakończonym rozdziale wybarwiany był interkalującym kwasem nukleinowym barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Gold. Następnie wykonywana była wizualizacja rozdzielonych na żelu oligonukleotydów poprzez wzbudzanie fluorescencyjne SYBR Gold i rejestrację emisji barwnika. Na podstawie intensywności prążków odpowiadających kolejnym punktom czasowym uzyskałam zależności ilości substratu oligonukleotydowego od czasu. Z kolei dzięki dopasowaniu funkcji jednofazowego zaniku eksponencjalnego wyznaczyłam wartości początkowych szybkości reakcji degradacji K [min^{-1}] (Rys. 74). W przypadku analogów całkowicie odpornych na degradację w warunkach eksperymentu wartości K nie zostały wyznaczone.

10.1.1. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających 2'-O-metyloadenozyne

Wielokrotnie podkreślałam rolę nukleotydowej modyfikacji 2'-O-Me w stabilizacji cząsteczek RNA i poprawie ich odporności na enzymatyczną degradację przez zarówno $5' \rightarrow 3'$, jak i $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazy. Na Rysunku 68A przedstawione zostały zdjęcia żeli poliakrylamidowych wykonane po dokonaniu rozdziału elektroforetycznego próbek poddanych degradacji przez CNOT7. Wyniki uzyskane na podstawie analizy intensywności prążków w kolejnych punktach czasowych pozostają w zgodzie z oczekiwaniami i dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi (Rys. 68B). Mianowicie analogi zawierające modyfikowaną podjednostkę A_m na końcu $3'$ (A_{m4} , A_{m5} , A_{m6} , A_{m7}) pozostawały stabilne w obecności CNOT7 i nie ulegały degradacji w zastosowanych warunkach eksperymentalnych. Analog A_{m3} , zmodyfikowany na końcu $5'$, ulegał całkowitej degradacji. Jest to spodziewany efekt, jako że CNOT7 usuwa kolejne podjednostki łańcucha poliadenylowego od końca $3'$, a więc w przypadku A_{m3} napotkałby stabilizującą modyfikację dopiero po zakończeniu procesu degradacji. W przypadku A_{m2} zaobserwowałam ciekawe zjawisko. Analog ten zawiera podjednostkę A_m w połowie sekwencji. Z tego względu CNOT7 częściowo skracał łańcuch oligonukleotydu, po czym jego aktywność ulegała zahamowaniu po napotkaniu modyfikowanego nukleotydu. W stosunkowo krótkim czasie, około 10 minut od momentu rozpoczęcia inkubacji oligonukleotydu z enzymem, dochodziło do całkowitego zaniku substratu i powstania produktu częściowej degradacji, który

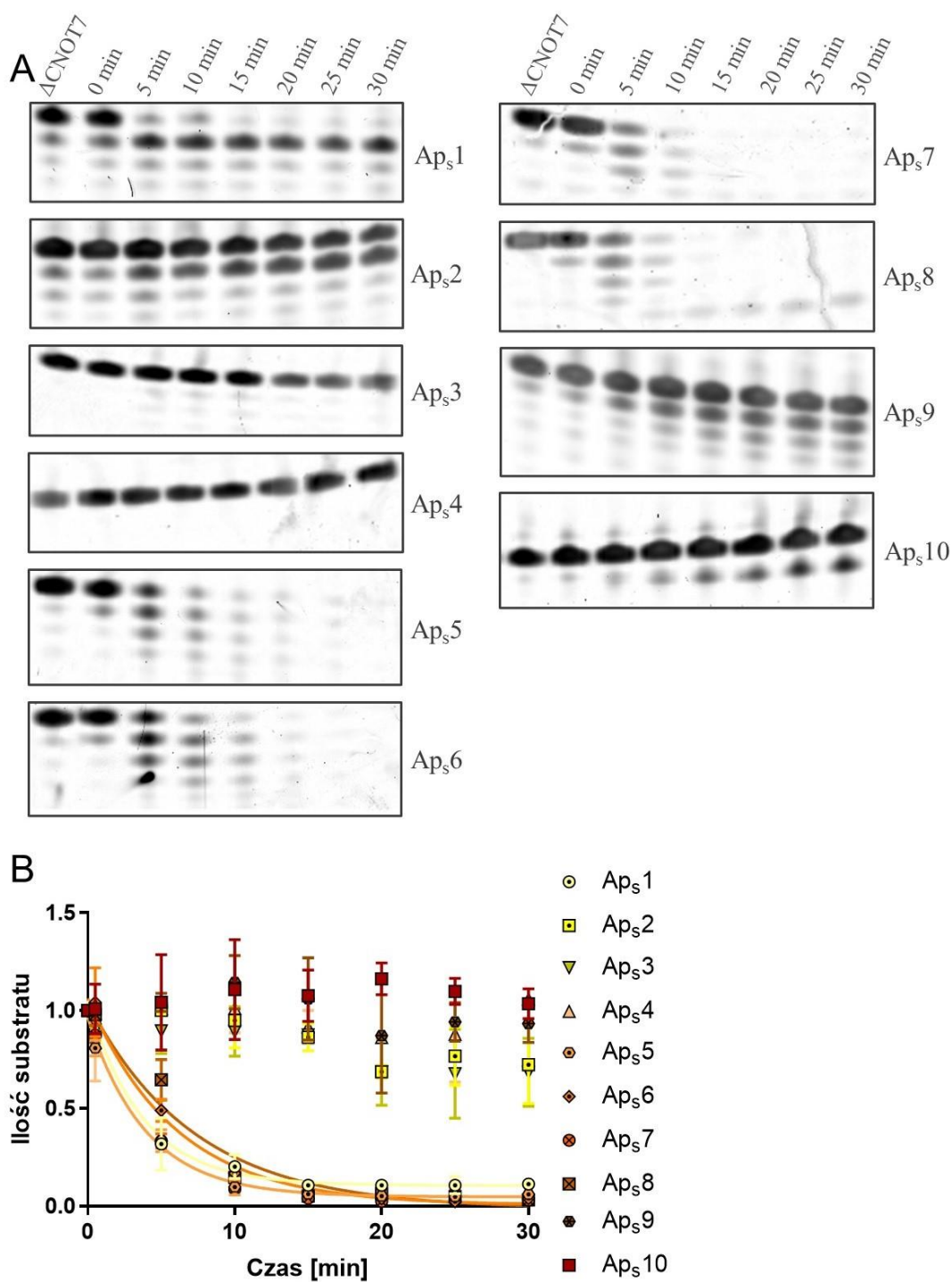
pozostawał stabilny aż do zakończenia inkubacji w czasie 30 minut. Z kolei analog **A_m1**, posiadający podjednostkę A_m na drugiej pozycji od końca 3', ulegał powolnej degradacji, o czym świadczy stopniowe pojawianie się prążka odpowiadającego skróconemu oligonukleotydowi tuż poniżej prążka wyjściowego substratu. Jest to ciekawa obserwacja z dwóch względów. Po pierwsze, zgodnie z oczekiwaniami brak modyfikacji ostatniego nukleotydu łańcucha powinien prowadzić do jego usunięcia w krótkim czasie, podczas gdy prążek odpowiadający substratowi ma dominującą intensywność we wszystkich punktach czasowych. Z drugiej strony, degradacja nie jest całkowicie zatrzymana, ale zachodzi bardzo powoli. Oznacza to, że aktywność egzonukleolityczna CNOT7 ulega częściowemu zahamowaniu pod wpływem obecności modyfikacji A_m w pobliżu końca 3', nawet jeśli nie jest to ostatnia podjednostka.



Rysunek 68 Degradacja analogów ogona poli(A) zawierających modyfikacje w postaci 2'-O-metyloadenozyny przez egzonukleazę CNOT7. (A) Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonane po rozdziale elektroforetycznym oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. (B) Zależność ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie znormalizowanej intensywności prążków odpowiadających substratowi w kolejnych punktach czasowych.

10.1.2. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających wiązania tiofosfodiesterowe

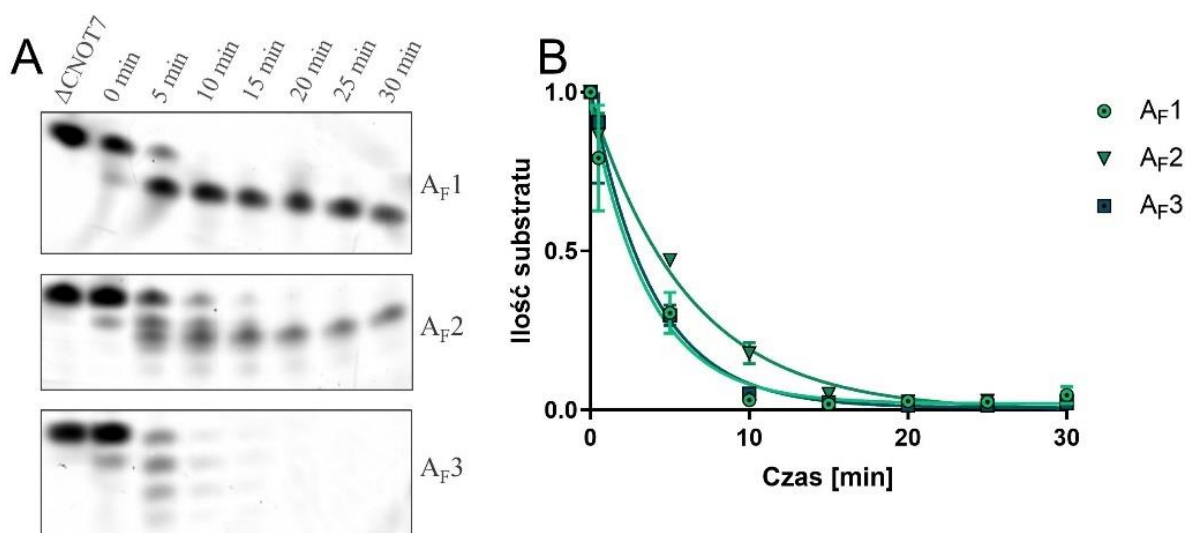
Modyfikacje RNA w postaci wiązań tiofosfodiesterowych pełnią podobną rolę do 2'-O-Me. Nadają kwasom nukleinowym odporność na działanie egzo- i endonukleaz. Stabilizują również oddziaływania RNA-RNA i RNA-białko, co znajduje szczególne zastosowanie w opracowywaniu terapeutycznych oligonukleotydów, takich jak ASO czy aptamery. Na Rysunku 69 przedstawione zostały zarówno zdjęcia żeli po rozdziale elektroforetycznym oligonukleotydów z modyfikacjami PS poddanych trawieniu przez CNOT7 (Rys. 69A), jak i ilości wyjściowych substratów w kolejnych punktach czasowych (Rys. 69B). Podobnie, jak w przypadku analogów poli(A) zawierających podjednostki A_m, podatność analogów posiadających modyfikacje PS na aktywność egzonukleolityczną CNOT7 silnie zależała od umiejscowienia modyfikowanego wiązania w sekwencji oligonukleotydu. Zauważalna była również różnica we właściwościach stereoizomerów analogów z pojedynczym wiązaniem tiofosfodiesterowym. Oligonukleotydy zawierające modyfikację ostatniego wiązania od końca 3' były odporne na degradację przez CNOT7 (**Ap_s3**, **Ap_s4**), albo ulegały jej bardzo powoli (**Ap_s9**, **Ap_s10**). W przypadku mieszanin stereoizomerów zawierających więcej niż jedno modyfikowane wiązanie, czyli związków **Ap_s9** i **Ap_s10**, z czasem dochodziło do ich powolnej degradacji. Przejawiało się to pojawianiem się prążków odpowiadających skróconym oligonukleotydów poniżej prążka głównego substratu. Oznacza to, że przynajmniej część wariantów stereoizomerycznych była bardziej podatna na działanie egzonukleazy CNOT7. Z kolei w przypadku dwóch stereoizomerów analogu, którego przedostatnie wiązanie od końca 3' zawierało grupę PS (**Ap_s1**, **Ap_s2**), dochodziło do usunięcia ostatniego nukleotydu z sekwencji. Co ciekawe, dynamika tego procesu różniła się dla poszczególnych stereoizomerów. W przypadku izomeru D1 (**Ap_s1**) ostatni nukleotyd usuwany był w krótkim czasie około 5 minut, co prowadziło do powstania skróconego oligonukleotydu odpornego na dalszą degradację. Z kolei w przypadku izomeru D2 ostatnia podjednostka była usuwana stosunkowo powoli, przez co w 30 minucie w roztworze reakcyjnym pozostało ponad 50% wyjściowego substratu. Oba izomery analogu posiadające modyfikowane wiązanie przy końcu 5' (**Ap_s5**, **Ap_s6**) ulegały bardzo szybkiej degradacji. Z kolei w przypadku związków **Ap_s7** i **Ap_s8**, modyfikowanych w połowie długości łańcucha, aktywność CNOT7 ulegała zahamowaniu po usunięciu pierwszych kilku podjednostek, podobnie do analogu A_m2. Prążki odpowiadające skróconemu izomerowi D1 oligonukleotydu były znacznie słabsze niż w przypadku izomeru D2. Wskazuje to na podobną zależność, jak zaobserwowana dla **Ap_s1** i **Ap_s2**, a więc drugi izomer wykazuje mniejszą podatność na degradację przez CNOT7.



Rysunek 69 Degradacja analogów ogona poli(A) zawierających modyfikowane wiązania tiofosfodiesterowe przez egzonukleazę CNOT7. (A) Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonane po rozdziale elektroforetycznym oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. (B) Zależność ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie znormalizowanej intensywności prążków odpowiadających substratowi w kolejnych punktach czasowych.

10.1.3. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających 2'-fluoroadenozynę

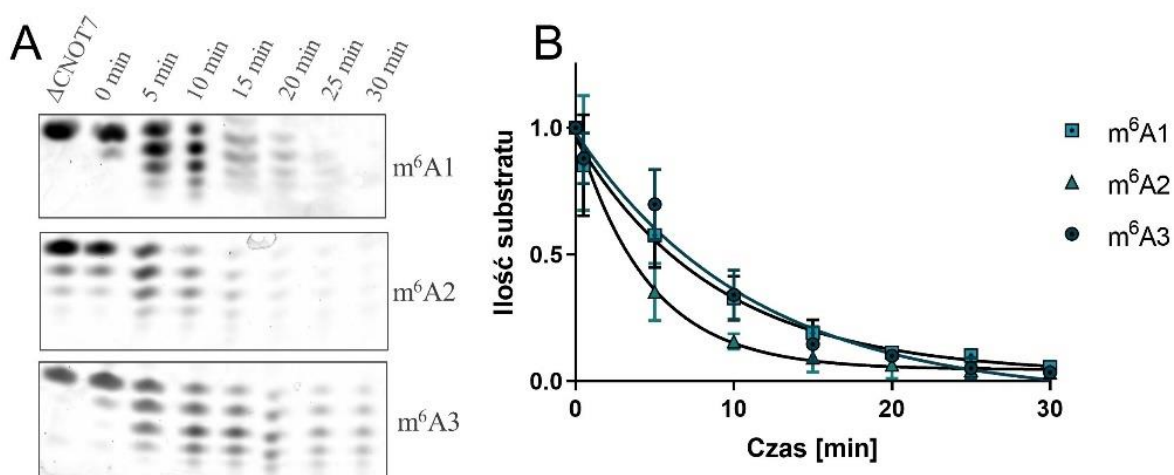
Jak już wspominałam, modyfikacja 2'-F, zarówno pod względem strukturalnym, jak i biochemicznym, posiada podobne właściwości do 2'-O-Me. Zapewnia zwiększoną stabilność enzymatyczną, jak również obniża immunogenność syntetycznych RNA oraz stabilizuje oddziaływania RNA-RNA. Na Rysunku 70 przedstawione zostały wyniki degradacji trzech analogów poli(A) zawierających podjednostki A_F. Ze względu na ograniczone możliwości syntetyczne (brak handlowo dostępnego podłoża zawierającego podjednostkę A_F) nie było możliwe otrzymanie oligonukleotydów modyfikowanych na końcu 3'. W przypadku analogu A_F1 podjednostka A_F znajdowała się na pozycji drugiej od końca 3'. Skutkowało to szybkim usunięciem ostatniego nukleotydu i powstaniem skróconego produktu degradacji, odpornego na aktywność enzymatyczną CNOT7. Podobną sytuację zaobserwowałam w przypadku analogu A_F2 modyfikowanego w połowie sekwencji. Zgodnie z oczekiwaniami analog A_F3, modyfikowany na końcu 5', ulegał całkowitej degradacji w krótkim czasie.



Rysunek 70 Degradacja analogów ogona poli(A) zawierających 2'-fluoroadenozynę przez enzym CNOT7. (A) Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonane po rozdziale elektroforetycznym oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. (B) Zależność ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie znormalizowanej intensywności prążków odpowiadających substratowi w kolejnych punktach czasowych.

10.1.4. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających N6-metyloadenozyne

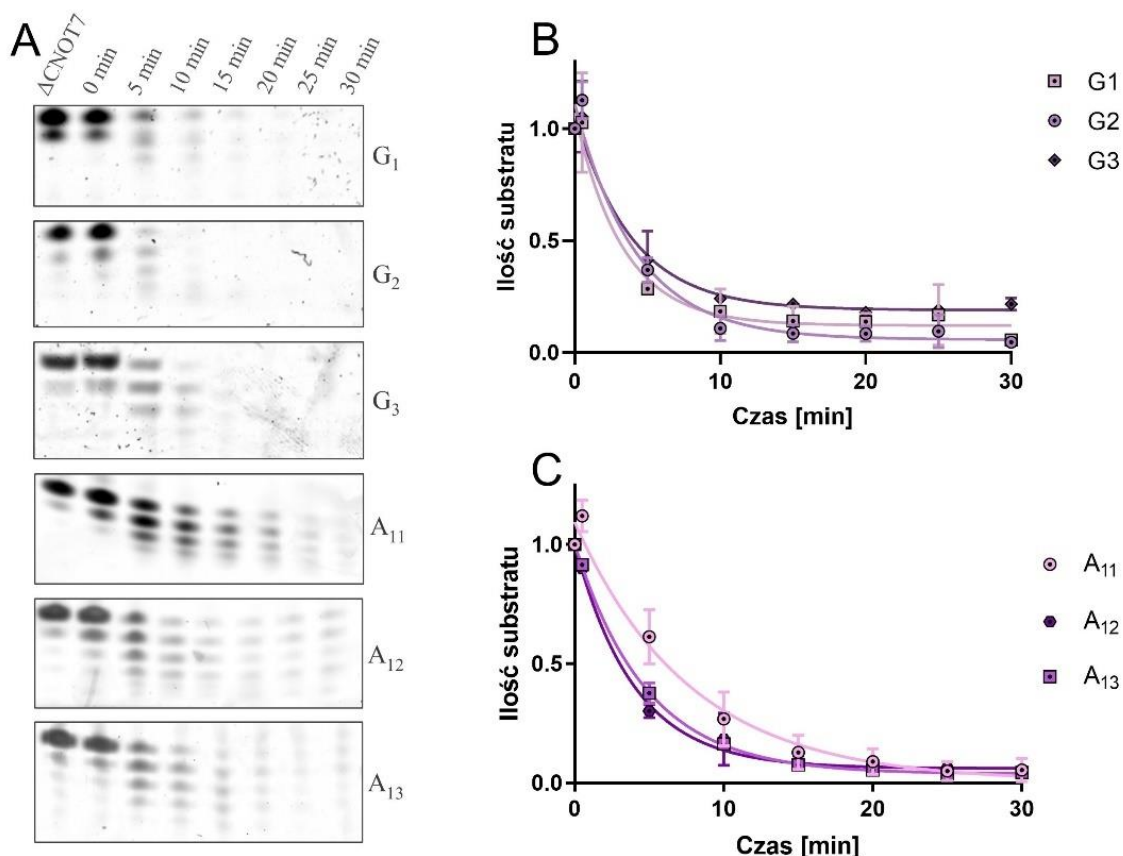
N6-metyloadenozyne jest to odwracalna i naturalnie występująca modyfikacja, której główną rolą jest wymuszanie lokalnych zmian struktury drugorzędowej RNA. Nazywana jest „przełącznikiem strukturalnym” i wpływa na właściwości biochemiczne RNA oraz pośrednio uczestniczy w zjawiskach dojrzewania i ekspresji mRNA. Jednakże obecnie brakuje doniesień dotyczących jej bezpośredniego wpływu na stabilność transkryptów. Wszystkie trzy analogi poli(A) zawierające podjednostki m⁶A ulegały kompletnej degradacji po 30 minutach inkubacji z enzymem CNOT7 (Rys. 71). Nie zauważyłam znaczącej różnicy między analogami zawierającymi modyfikacje na końcu 3', w połowie sekwencji i na końcu 5'.



Rysunek 71 Degradacja analogów ogona poli(A) zawierających N6-metyloadenozyne przez enzym CNOT7. (A) Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonanie po rozdziale elektroforetycznym oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. (B) Zależność ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie znormalizowanej intensywności prążków odpowiadających substratowi w kolejnych punktach czasowych.

10.1.5. Degradacja enzymatyczna analogów poli(A) zawierających guanozynę oraz o niemodyfikowanych łańcuchach różnej długości

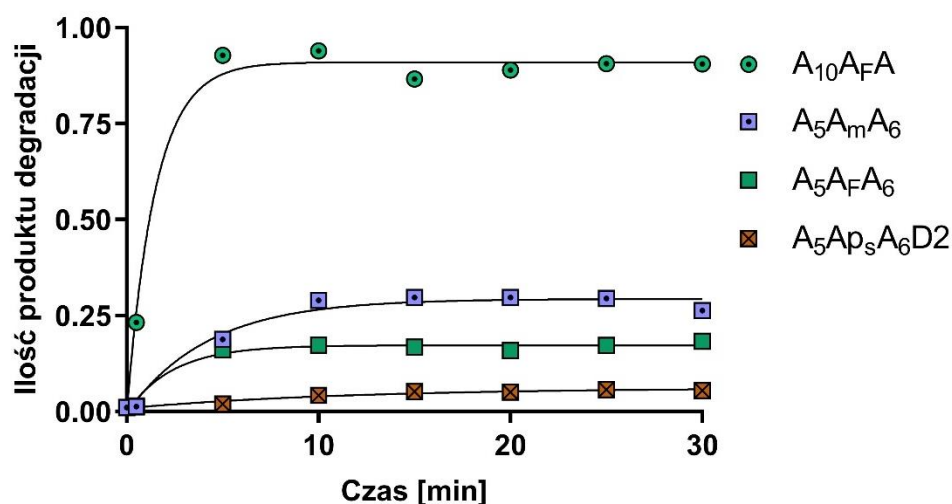
Guanozyne jest naturalnie występującą modyfikacją ogona poli(A), występującą również u ludzi, i pełni rolę stabilizatora przeciwko aktywności specyficznych enzymów odpowiedzialnych za deadenylację.¹³⁶ Bierze również udział w regulacji translacji, ponieważ lokalnie osłabia wiązanie PABP do poli(A).³⁹⁷ Tym samym zmniejsza liczbę cząsteczek białek związanych z końcem 3' mRNA, co przekłada się na wydajność procesu inicjacji translacji. W rozdziale 9.3.5. opisałam negatywny wpływ punktowych substytucji adenozyne guanozyną na wiązanie oligonukleotydów do PABP¹⁻¹⁹⁰, a więc uzyskane wyniki pozostawały w zgodzie z literaturą. Jednakże po przeprowadzeniu eksperymentów degradacji przez specyficzny enzym CNOT7 nie zaobserwowałam istotnego wpływu obecności guanozyne w sekwencji poliadenylowej na aktywność egzonukleazy (Rys. 72A, B). Wszystkie analogi zawierające punktowe modyfikacje w postaci guanozyne w zastosowanych warunkach eksperymentalnych ulegały degradacji porównywalnie szybko co oligonukleotydy różnej długości nie zawierające żadnych modyfikacji chemicznych ani strukturalnych (Rys. 72C).



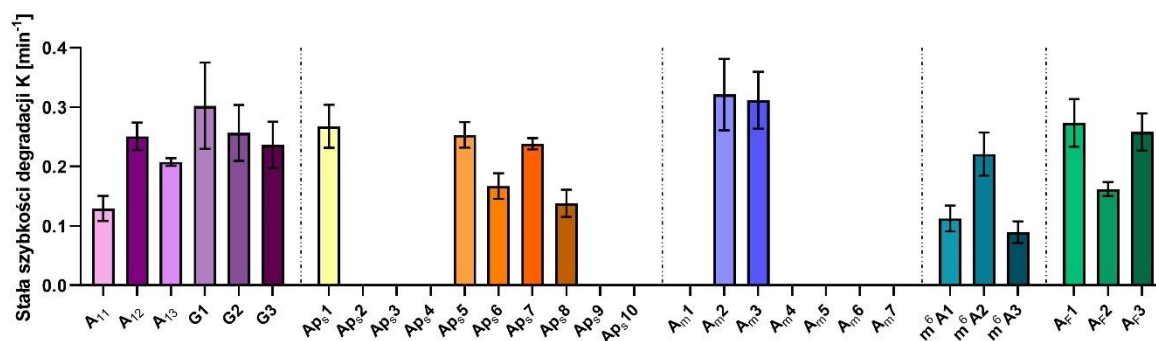
Rysunek 72 Degradacja analogów ogona poli(A) zawierających guanozynę oraz o różnej długości niemodyfikowanego łańcucha przez enzym CNOT7. (A) Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonane po rozdiale elektroforetycznym oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. (B) Zależność ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie znormalizowanej intensywności prążków odpowiadających substratowi w kolejnych punktach czasowych.

10.2. Podsumowanie

Przeprowadziłam eksperymenty degradacji enzymatycznej oligonukleotydowych analogów ogona poli(A). Do eksperymentów wykorzystany został enzym CNOT7, będący katalityczną podjednostką kompleksu białkowego odpowiedzialnego za deadenylację cytoplazmatycznych mRNA. Zaobserwowana została silna zależność między typem modyfikacji i jej umiejscowieniem w sekwencji oligonukleotydu, a jego podatnością na degradację enzymatyczną katalizowaną przez CNOT7. Przede wszystkim modyfikacje w postaci 2'-O-metyloadenozyny, 2'-fluoroadenozyny oraz wiązania tiofosfodiesterowego (Rys. 68, 69, 70) całkowicie hamowały aktywność enzymatyczną CNOT7. Efekt zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną był szczególnie zauważalny w przypadku analogów zawierających jedną z wymienionych korzystnych modyfikacji w pobliżu końca 3' oligonukleotydu (**A_{F1}**, **A_{m7}**). W przypadku analogów zawierających modyfikację ostatniej podjednostki lub wiązania w sekwencji, dany związek był całkowicie odporny na degradację (**A_{p4}**, **A_{p5}**, **A_{m7}**). Z kolei analogi zawierające modyfikacje w pewnym oddaleniu od końca 3' były degradowane częściowo, do momentu napotkania przez enzym modyfikowanej podjednostki. W drugim przypadku możliwe było zaobserwowanie stopniowego pojawiania się prążków odpowiadających skróconym oligonukleotydów, będących produktami częściowej degradacji (Rys. 73). Analogi zawierające modyfikację m⁶A oraz guanozynę, jak również niemodyfikowane oligonukleotydy różnej długości, ulegały szybkiej degradacji przez CNOT7. Na Rysunku 74 zaprezentowane zostały wartości stałych szybkości procesu degradacji *K* dla poszczególnych analogów.



Rysunek 73 Zależność ilości produktu częściowej degradacji analogów poli(A) przez enzym CNOT7 od czasu. Punkty pomiarowe uzyskane na podstawie intensywności prążków zarejestrowanych po analizie elektroforetycznej oligonukleotydów poddanych trawieniu przez CNOT7.



Rysunek 74 Wartości szybkości początkowych procesów degradacji K oligonukleotydowych analogów ogona poli(A) przez deadenylazę CNOT7. K wyznaczono na podstawie dopasowania modelu jednofazowego zaniku eksponencjalnego do punktów pomiarowych zależności ilości wyjściowego substratu oligonukleotydowego od czasu. Zależność określono na podstawie zdjęć żeli poliakrylamidowych po analizie elektroforetycznej analogów poddanych trawieniu przez CNOT7. Brak słupka oznacza, że dla danego analogu nie zaobserwowano procesu degradacji w zastosowanych warunkach eksperymentalnych.

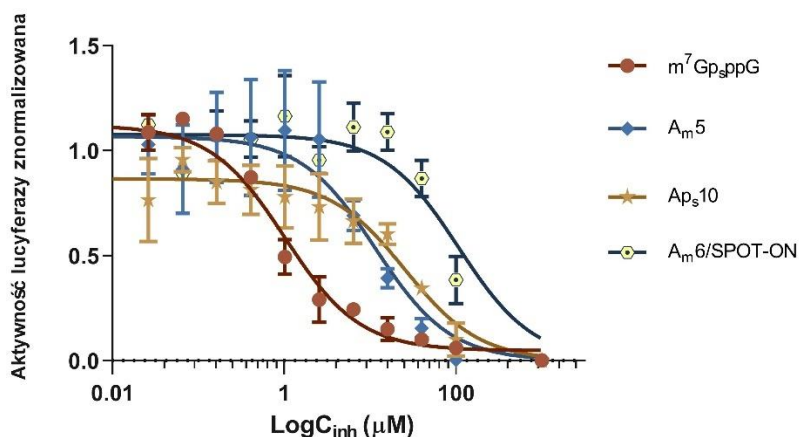
11. Analogi poli(A) jako inhibitory translacji

Jednym z potencjalnych zastosowań cząsteczek, które specyficznie oraz z wysokim powinowactwem wiążą konkretne cele molekularne, jest inhibicja procesów biologicznych. Rolę takich cząsteczek inhibitorowych mogą pełnić również oligonukleotydy, co znalazło swoje potwierdzenie w wielu pracach naukowych, w tym we wspomnianej już kilkakrotnie pracy Barragán-Iglesias et al.³⁸⁷ Oligonukleotyd, nazwany przez autorów SPOT-ON, zaprezentowany został jako inhibitor PABP, pośrednio wpływający na poziom translacji zarówno *in vitro* jak i w modelach mysich. SPOT-ON składał się z 12 modyfikowanych podjednostek A_m , przy czym dodatkowo, dwa skrajne wiązania fosfodiesterowe zastąpione zostały wiązaniami tiofosfodiesterowymi. Na podstawie badań powinowactwa z udziałem rekombinowanego białka PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz eksperymentów enzymatycznych z deadenylazą CNOT7, mogłam zidentyfikować grupę 12-merowych oligonukleotydów wykazujących znacznie wyższe powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ i odporność na degradację.

11.1. Badania inhibicji translacji w lizatach retikulocytów króliczych (RRL)

Spośród biblioteki oligonukleotydowych analogów poli(A), dwa zostały wybrane do zbadania pod kątem potencjału inhibitorowego. Były to związki $A_m A_{10} A_m$ (**A_m5**) oraz $A_p A_9 A_p A$ (**A_p10**). Eksperymenty translacyjne w lizatach retikulocytów króliczych (RRL) przeprowadzone zostały przez dr. Mirosława Śmietańskiego (Laboratorium Chemii Biologicznej – CeNT UW). Poziom translacji mierzony był na podstawie aktywności białka reporterowego lucyferazy *Firefly*, którego mRNA dodawano do lizatów komórkowych wraz z cząsteczkami inhibitorów. Aktywność inhibitorowa wybranych oligonukleotydów porównana została z właściwościami znanego inhibitora translacji będącego analogiem 5'-kapu (m^7Gp_5ppG)³⁹⁸. Inhibitor ten hamuje proces translacji poprzez wiązanie z czynnikiem inicjacji translacji eIF4E, a więc w sposób zupełnie odmienny od mechanizmu przewidzianego dla inhibitorów będących analogami poli(A). W przypadku analogów poli(A) oczekiwałam, że będą one specyficznie wiązać znajdujące się w lizatach komórkowych cząsteczki PABP, tym samym blokując możliwość ich związania z końcem 3' reporterowego mRNA. Ograniczenie liczby cząsteczek PABP na końcu 3' mRNA powinno prowadzić do zauważalnego spadku poziomu jego translacji i przełożyć się bezpośrednio na zmniejszoną produkcję kodowanego białka. Analogiczne eksperymenty przeprowadzone zostały również z udziałem inhibitora SPOT-ON.

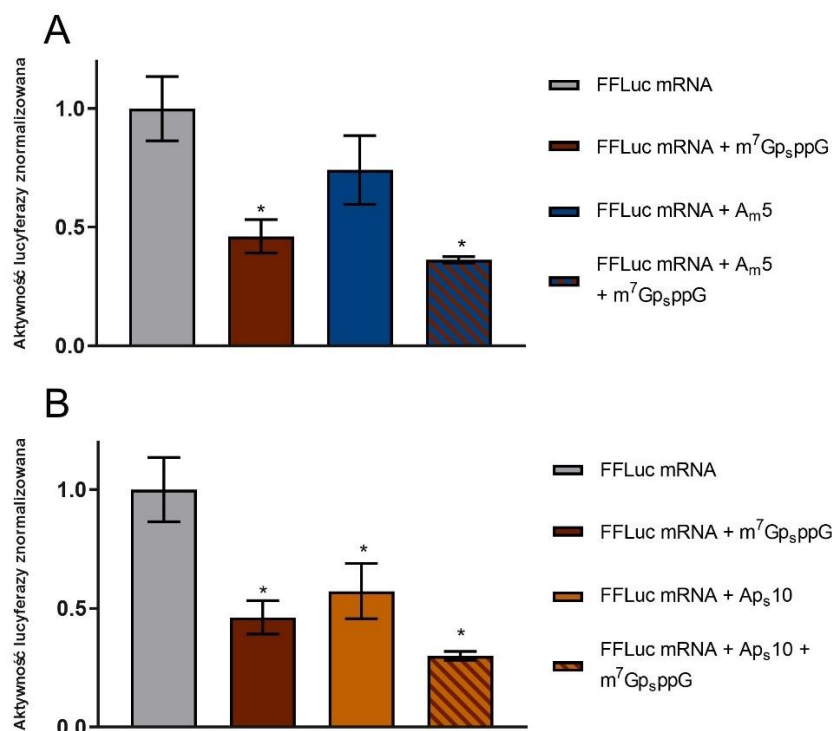
mRNA kodujące lucyferazę *Firefly* posiadające ogon poli(A) o długości 30 adenozyń inkubowane było w roztworze lizatów retikulocytów króliczych (RRL) wraz z dodatkiem wybranego inhibitora w różnych stężeniach. Zastosowano szeroki zakres stężeń inhibitorów w celu wyznaczenia stałych IC_{50} dla każdego z badanych związków. IC_{50} jest to miara aktywności inhibitora, odpowiadająca jego stężeniu niezbędnemu do inhibicji aktywności wybranej cząsteczki lub procesu biologicznego w 50%. Wykorzystany do eksperymentów system RRL firmy Promega pozwala na bezpośrednie badanie wydajności translacji mRNA. W eksperymencie używa się białka reporterowego, takiego jak lucyferaza *Firefly*, zakładając, że jego aktywność jest bezpośrednim odzwierciedleniem poziomu translacji mRNA. Po trwającej 1 godzinę inkubacji w temperaturze 30°C lizaty mieszano z roztworem lucyferyny, czyli substratu reakcji katalizowanej przez lucyferazę *Firefly*. Pomiar luminescencji prowadzono na czytniku mikropłytek Synergy H1 (BioTek). Na podstawie zależności luminescencji utlenionej formy lucyferyny od stężenia inhibitora wyznaczone zostały stałe IC_{50} dla związków **A_m5**, **A_p10** i SPOT-ON (**A_m6**) oraz kontroli m^7Gp_5ppG (Rys. 75).



Rysunek 75 Inhibicja translacji mRNA lucyferazy Firefly przez oligonukleotydowe analogi poli(A). Luminescencja produktu reakcji katalizowanej przez białko lucyferazę Firefly odpowiada wydajności translacji mRNA. Punkty pomiarowe wyznaczono na podstawie znormalizowanej średniej wartości luminescencji $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów. Wartości luminescencji znormalizowano do wartości uzyskanej dla próbek kontrolnych pozbawionych dodatku inhibitora. Na podstawie dopasowania trójparametrowego modelu inhibicji do zależności luminescencji od stężenia inhibitora, wyznaczono wartości IC₅₀ dla związków A_m5, A_p510, SPOT-ON/A_m6 oraz kontroli m⁷GpppG.

Oligonukleotydy A_m5 oraz A_p510 okazały się skutecznymi inhibitorami translacji (IC₅₀ odpowiednio 12 μM i 25 μM). Ich aktywność jest słabsza od inhibitora kontrolnego m⁷GpppG (IC₅₀ 1 μM), ale wartości IC₅₀ o rząd wielkości niższe od SPOT-ON (108 μM). Są to wyniki zgodne z przewidywaniami, ponieważ SPOT-ON/A_m6 wykazywał znacznie niższe powinowactwo do PABP¹⁻¹⁹⁰ od pozostałych dwóch oligonukleotydów (Tabela 1). Znalazło to swoje odzwierciedlenie w słabszej aktywności inhibitorowej w porównaniu do reszty zbadanych związków. Dodatkowo potwierdza to przedstawioną wcześniej teorię, że zastosowanie mniejszej liczby modyfikacji, za to strategicznie umiejscowionych w łańcuchu oligonukleotydu, jest korzystne z punktu widzenia powinowactwa do PABP. Bezpośrednio przekłada się to na stabilność kompleksów PABP z oligonukleotydami i ostatecznie na skuteczność analogów poli(A) w roli inhibitorów.

Związki A_m5 oraz A_p510 zbadano również pod kątem addytywności ich aktywności w połączeniu ze wspomnianym już inhibitorem białka eIF4E - m⁷GpppG. Zastosowany został opisany już system RRL. Lizaty inkubowane były przez 1 godzinę z mRNA kodującym lucyferazę Firefly oraz z dodatkiem inhibitora m⁷GpppG, A_m5 lub A_p510, lub z dodatkiem mieszaniny m⁷GpppG-A_m5 albo m⁷GpppG-A_p510. Poziom translacji w próbkach zawierających jeden z inhibitorów lub ich mieszaninę porównano z translacją w lizatach nie zawierających inhibitora (Rys. 76). W przypadku obu oligonukleotydów zaobserwowano silniejszą inhibicję translacji w przypadku zastosowania mieszaniny inhibitorów niż dla każdego ze związków z osobna, co wyraźnie wskazuje na addytywność ich działania.



Rysunek 76 Inhibicja procesu translacji mRNA kodującego lucyferazę Firefly w lizatach retikulocytów króliczych, poprzez zastosowanie inhibitora białka eIF4E m⁷Gp_sppG w połączeniu z oligonukleotydowym inhibitorem PABP A_m5 (A) oraz A_p10 (B). Wartości luminescencji wyznaczono na podstawie trzech niezależnych eksperymentów oraz znormalizowano do średniej wartości luminescencji uzyskanej dla pomiarów translacji bez dodatku inhibitora.

Korelacja między wysokim powinowactwem do PABP a niskimi wartościami IC₅₀ dla oligonukleotydów A_m5 i A_p10 wyraźnie sugeruje, że opracowane przeze mnie inhibitory obniżają wydajność translacyjną na drodze specyficznego wiązania z PABP, a nie poprzez inne niespecyficzne oddziaływania z maszyną translacyjną. Addytywność aktywności inhibitorowej oligonukleotydów poli(A) i cząsteczki blokującej kieszeń wiążącą eIF4E wskazuje na możliwość wpływania na wydajność procesu translacji poprzez inhibicję PABP w połączeniu z dotychczas stosowanymi metodami. Należy również zauważyć, że w systemie RRL w procesie inicjacji translacji biorą udział pełne, czterodomenowe cząsteczki PABP. Oznacza to, że wyniki uzyskane *in vitro* dla rekombinowanego białka PABP¹⁻¹⁹⁰ znajdują swoje odzwierciedlenie w bardziej złożonych układach biologicznych.

11.2. Podsumowanie wyników

Przeprowadzone zostały eksperymenty wydajności translacji w lizatach retikulocytów króliczych, mające na celu zbadanie aktywności dwóch potencjalnych inhibitorów PABP (A_m5 i A_p10). Dla porównania analogiczne eksperymenty przeprowadzone zostały z udziałem inhibitora translacji m⁷Gp_sppG oddziałującego z białkiem eIF4E oraz opublikowanego już inhibitora PABP, zwanego SPOT-ON (A_m6). Oba związki A_m5 i A_p10, wytypowane jako potencjalne inhibitory translacji na podstawie wysokiego powinowactwa do PABP¹⁻¹⁹⁰ oraz stabilności enzymatycznej, okazały się skuteczniej obniżać poziom produkcji białka reporterowego od SPOT-ON. Wykazywały również zdolność do skutecznego działania w połączeniu z inhibitorem eIF4E – zastosowanie m⁷Gp_sppG w połączeniu z jednym z dwóch badanych inhibitorów PABP skutkowało obniżeniem poziomu translacji w stopniu większym niż dla każdego z inhibitorów z osobna.

Na podstawie opisanych powyżej wyników można wyciągnąć wnioski dotyczące zarówno wykorzystania analogów poli(A) jako inhibitorów procesu translacji, jak i całej

przedstawionej dotychczas części projektu doktorskiego. Po pierwsze, istotna jest wyraźna korelacja pomiędzy powinowactwem oligonukleotydowych analogów poli(A) do rekombinowanego PABP¹⁻¹⁹⁰ a ich aktywnością jako inhibitorów translacji. Oznacza to, że opracowana przeze mnie metoda badania powinowactwa kompleksów PABP¹⁻¹⁹⁰ z analogami poli(A) pozwala na uzyskanie wiarygodnych informacji dotyczących preferencji owego białka odnośnie struktury ligandów. Metoda ta umożliwiła mi dogłębne zbadanie zależności między strukturą a aktywnością analogów poli(A) i w efekcie identyfikację modyfikacji chemicznych oraz ich umiejscowienia w sekwencji oligonukleotydów, które nie zaburzają oddziaływania z PABP. Wszystkie trzy zbadane analogi poli(A) mają potencjał inhibitorowy. Jednakże otrzymane wyniki wyraźnie sugerują, że zastosowanie niewielkiej liczby strategicznie umiejscowionych modyfikacji nukleotydowych pozwala na maksymalizację efektów związanych ze stabilnością inhibitorów, przy równoczesnym uniknięciu obniżenia powinowactwa do PABP.

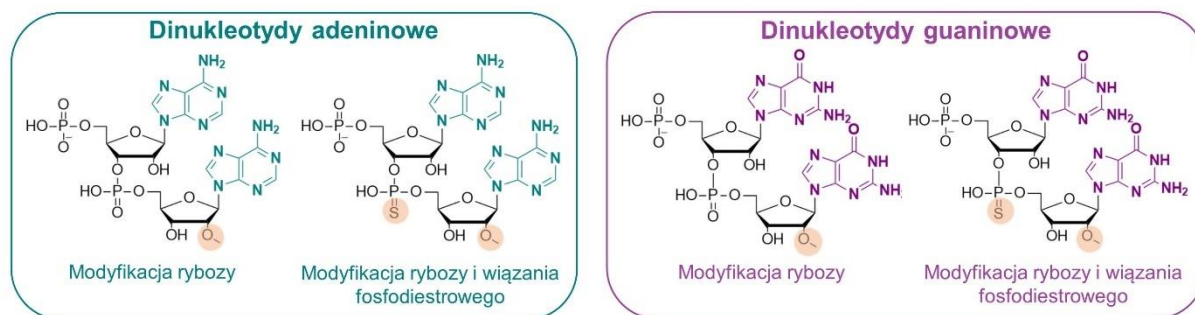
Po drugie, dzięki eksperymentom wydajności translacji mogę wnioskować, że otrzymane przeze mnie inhibitory oddziałują z pełnymi cząsteczkami PABP w złożonym układzie biologicznym. Działają one niezależnie od inhibitora specyficznie blokującego aktywność białka eIF4E. Stanowi to pośredni dowód na specyficzność działania oligonukleotydowych inhibitorów poprzez wiązanie cząsteczek PABP i ograniczenie udziału tego białka w procesie inicjacji translacji. W literaturze, częściowo przytoczonej w części literaturowej niniejszej rozprawy, nie brakuje dowodów na istotną rolę PABP w zjawisku ekspresji genów, a uzyskane przeze mnie wyniki stanowią kolejne potwierdzenie tych obserwacji.

Na koniec należy również wypunktować ograniczenia związane z wykorzystaniem systemu lizatów retikulocytów króliczych w badaniach translacji, zwłaszcza względem badań prowadzonych *in vivo* oraz na liniach komórkowych. System RRL jest znacząco uproszczony, ponieważ zawiera głównie białka maszyneryi translacyjnej, za to pozbawiony jest białek odpowiadających za degradację mRNA. W procesie przygotowania lizatów służących do badań translacyjnych, wszelkie cząsteczki komórkowego mRNA usuwane są enzymatycznie, w celu minimalizacji interferencji z translacją mRNA wprowadzanego do układu przez badacza. W rozdziale 4. szczegółowo opisałam skomplikowaną sieć zależności między poszczególnymi procesami zachodzącymi z udziałem danej cząsteczki mRNA, a ostateczną produkcją kodowanego przez nią białka. W systemie RRL wszystkie te procesy za wyłączeniem samej translacji sprowadzone są do minimum. Możliwe jest więc bezpośrednie badanie wydajności translacji syntetycznego mRNA, o czym nie możemy mówić w przypadku złożonych układów, w których ilość powstającego białka jest wypadkową wszystkich procesów związanych z dostarczaniem syntetycznego transkryptu, jego metabolizmem i immunogennością. System RRL może więc stanowić dobrą podstawę do wstępnych badań związanych z procesem translacji, np. z udziałem syntetycznych mRNA lub inhibitorów translacji. Uzyskane wyniki nie stanowią jednakże wiernego odzwierciedlenia potencjału badanych cząsteczek w warunkach *in vivo*, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym. Dalsze badania w złożonych układach biologicznych są niezbędne w celu dokładnego zbadania aktywności opracowanych przeze mnie inhibitorów translacji.

12. Otrzymywanie chemicznie modyfikowanych 5'-fosforanów dinukleotydów

Obecne w literaturze przykłady modyfikacji końca 3' cząsteczek mRNA wymagają ko-transkrypcyjnego wprowadzania modyfikowanych podjednostek do struktury ogona poli(A)³²⁶ lub, w przypadku modyfikacji post-transkrypcyjnych, opisują zastosowanie stosunkowo długich i skomplikowanych sekwencji oligonukleotydowych.³³³ Głównym celem drugiej części mojego projektu doktorskiego było opracowanie metody modyfikacji końca 3' cząsteczek RNA, od krótkich oligonukleotydów po mRNA kodujące funkcjonalne białka, przy pomocy małych, łatwych do otrzymania oraz chemicznie modyfikowanych cząsteczek. Zamierzonym efektem wspomnianej modyfikacji było zwiększenie stabilności enzymatycznej końca 3' RNA, ze szczególnym naciskiem na ochronę przed deadenylacją. Z kolei w przypadku cząsteczek mRNA pożądanym efektem modyfikacji końca 3' oraz wynikającej z nich zwiększonej stabilności transkryptów, była poprawa ich potencjału translacyjnego. Stabilizowane cząsteczki RNA i mRNA mogą znaleźć liczne zastosowania terapeutyczne, w tym jako prewencyjne szczepionki przeciwko chorobom wirusowym, terapeutyczne szczepionki przeciwnowotworowe, w terapiach genowych genetycznych chorób rzadkich i metabolicznych, w produkcji terapeutycznych przeciwciał *in vivo*, terapiach komórkowych, medycynie regeneracyjnej, jak również mogą zostać wykorzystane w systemach edycji genów, takich jak CRISPR-Cas9.

Dzięki badaniom nad wpływem wybranych modyfikacji chemicznych na powinowactwo analogów ogona poli(A) do PABP, oraz ich odporność na degradację enzymatyczną przez deadenylazę CNOT7, opracowałam struktury 5'-fosforanów dinukleotydów, które na drodze ligacji enzymatycznej mogą być przyłączone do końca 3' cząsteczki RNA (Rys. 77). Jedynym wymogiem strukturalnym wobec cząsteczek RNA poddawanych modyfikacji jest obecność wolnej grupy 2'-OH w obrębie rybozy ostatniego nukleotydu w sekwencji. Na podstawie dotychczasowych wyników wytypowałam dwie modyfikacje nukleotydowe jako najbardziej korzystne z punktu widzenia zamierzonych efektów, mianowicie 2'-O-metylację oraz wiązanie tiofosfodiesterowe.



Rysunek 77 Struktury 5'-fosforanów dinukleotydów adeninowych oraz guaninowych zawierających modyfikacje chemiczne w postaci 2'-O-metylacji i/lub wiązania tiofosfodiesterowego.

Wszystkie znane eukariotyczne deadenylazy wykazują wysoką specyficzność substratów^{399,400}. Dlatego też zaplanowałam syntezę dinukleotydów, które oprócz wspomnianych modyfikacji chemicznych zawierały zasady adeninowe lub guaninowe. W rozdziale 10.1.5. zaprezentowałam wyniki, wskazujące, że obecność pojedynczej guanozyny w sekwencji nie hamuje degradacji oligonukleotydowych analogów poli(A) przez enzym CNOT7. Należy jednak zaznaczyć, że CNOT7 jest tylko jedną z kilku podjednostek katalitycznych kompleksu białkowego CCR4-Not, który dodatkowo nie jest jedynym kompleksem odpowiedzialnym za deadenylację mRNA w komórkach eukariotycznych. Istniała więc możliwość, że wprowadzenie podjednostek G na końcu 3' cząsteczki mRNA może zapewnić jej dodatkową ochronę przed deadenylacją poprzez zaburzenie wiązania deadenylaz do struktury ogona poli(A).¹³⁶ Równocześnie miałam na uwadze

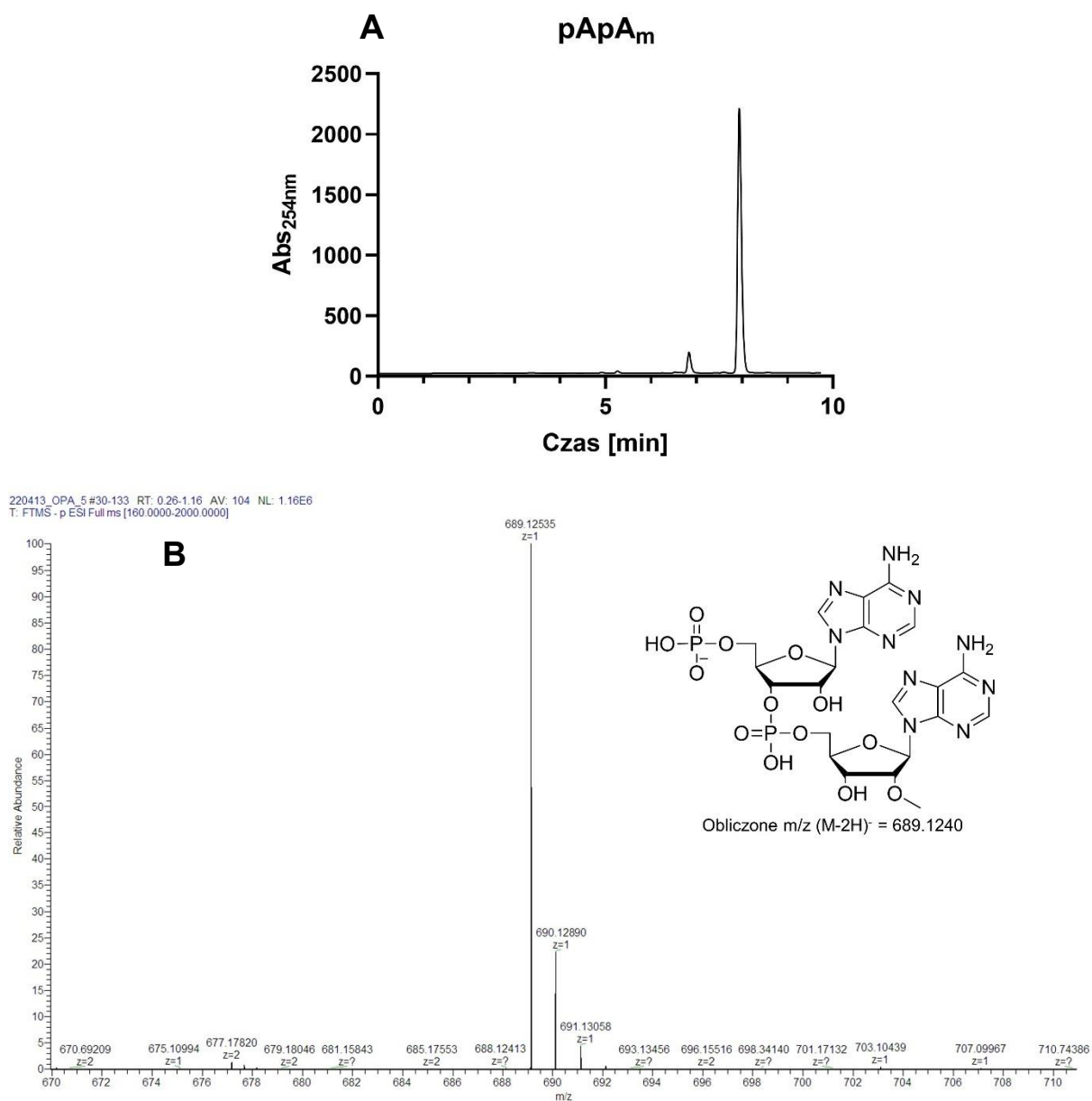
fakt, że zmiana zasady na końcu 3' mRNA na inną niż A może zaburzyć wydajność złożonych procesów biologicznych, takich jak inicjacja translacji. Jak już wspomniałam, moim celem było zwiększenie stabilności enzymatycznej, jak również poprawa potencjału translacyjnego mRNA. Dlatego też zaplanowałam przetestowanie kilku kombinacji chemicznych modyfikacji i zasad. Zaprojektowałam dwa zestawy 5'-monofosforanów dinukleotydów, różniące się rodzajem zasady azotowej. W każdym zestawie znalazły się dinukleotydy zawierające 2'-O-metylację w obrębie drugiego nukleotydu i/lub pojedyncze wiązanie tiofosfodiesterowe między podjednostkami (Rys. 77).

12.1. Synteza 5'-monofosforanów dinukleotydów

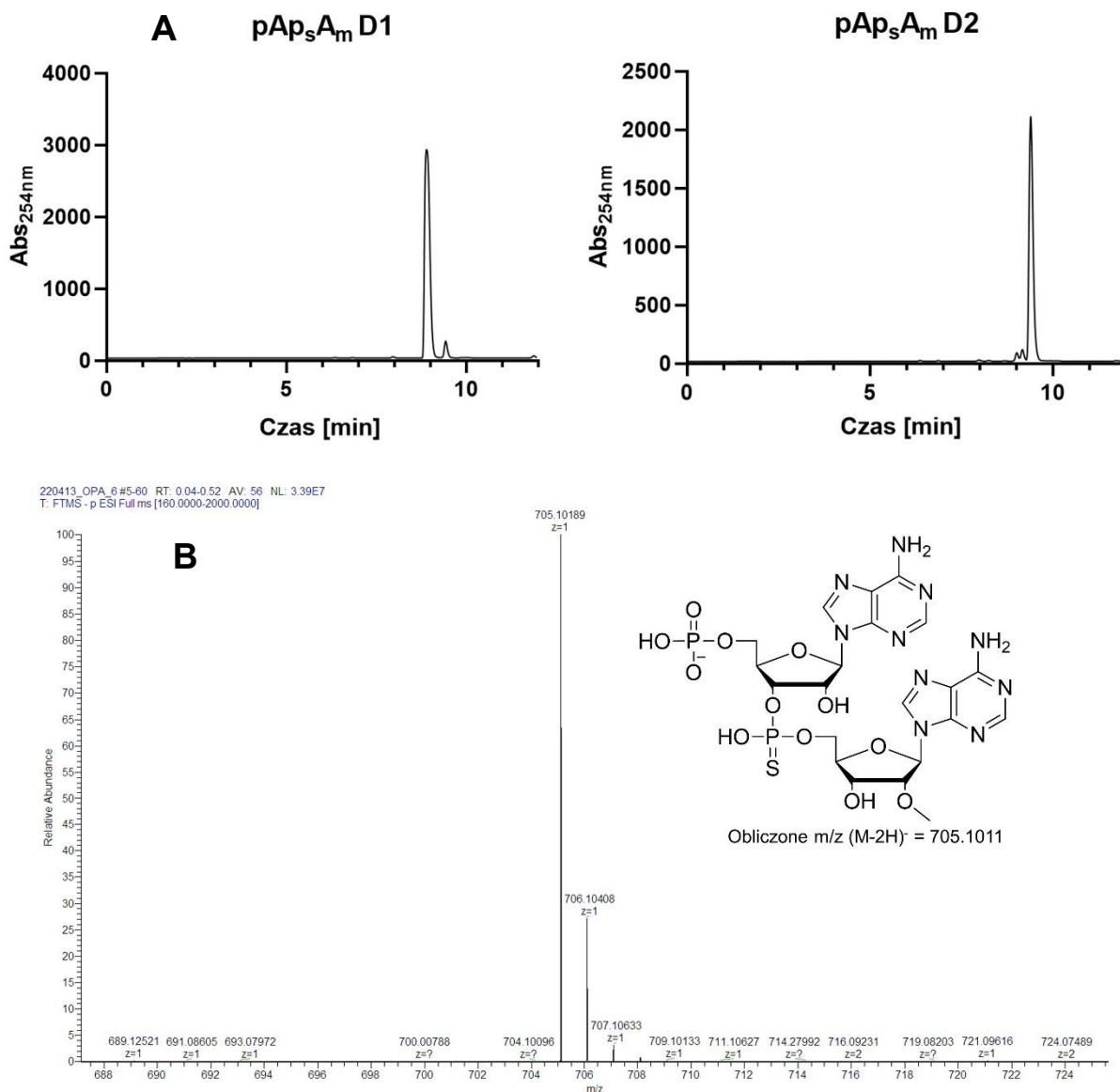
5'-monofosforany dinukleotydów otrzymałam wykorzystując metodę syntezy w fazie stałej. Posłużyłam się automatycznym syntetyzerem ÄKTA OligoPilot. Do syntezy wykorzystałam handlowo dostępne amidofosforyny oraz podłoża stałe CPG obsadzone amidofosforinami 2'-O-Me-A lub 2'-O-Me-G. Sulfuryzacja grup fosforanowych prowadzona było z udziałem handlowo dostępnego odczynnika EDITH (ang. 3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one). Gotowe produkty syntezy były odcinane od złoża oraz wstępnie odbezpieczane poprzez zawieszenie w mieszaninie v1:1 stężonego roztworu wodnego amoniaku i metyloaminy (AMA) i podgrzanie do temperatury 50°C przez 1 godzinę. Z kolei odbezpieczenie grup 2'-OH przeprowadziłam z udziałem trihydrofluorku trietyloaminy w DMSO. Reakcja odbezpieczania prowadzona była przez około 4 godziny w temperaturze 60 °C. Odbezpieczone produkty syntezy wyizolowane zostały w postaci soli amonowej z użyciem RP-HPLC.

12.1.1. Otrzymywanie dinukleotydów adeninowych

Łącznie otrzymałam trzy dinukleotydy adeninowe różniące się zastosowanymi modyfikacjami chemicznymi. Związek pApA_m zawiera modyfikację 2'-O-Me na drugim nukleotydzie. Z kolei związki pAp_sA_m D1 oraz pAp_sA_m D2 stanowią dwa diastereoizomery dinukleotydu, w którego strukturze poza podjednostką A_m znalazło się również wiązanie tiofosfodiesterowe. Związki otrzymane zostały zgodnie z procedurą ogólną. W standardowym procesie oczyszczania metodą RP-HPLC możliwe było wyizolowanie diastereoizomerów pAp_sA_m, nazwanych D1 oraz D2 odpowiednio do ich czasu retencji w trakcie rozdzielania. Profil RP-HPLC oraz widmo HR-MS produktów syntezy pApA_m znajdują się na Rysunku 78, z kolei na Rysunku 79 przedstawione zostały profile RP-HPLC oraz widmo HR-MS dla izomerów D1 i D2 dinukleotydu pAp_sA_m.



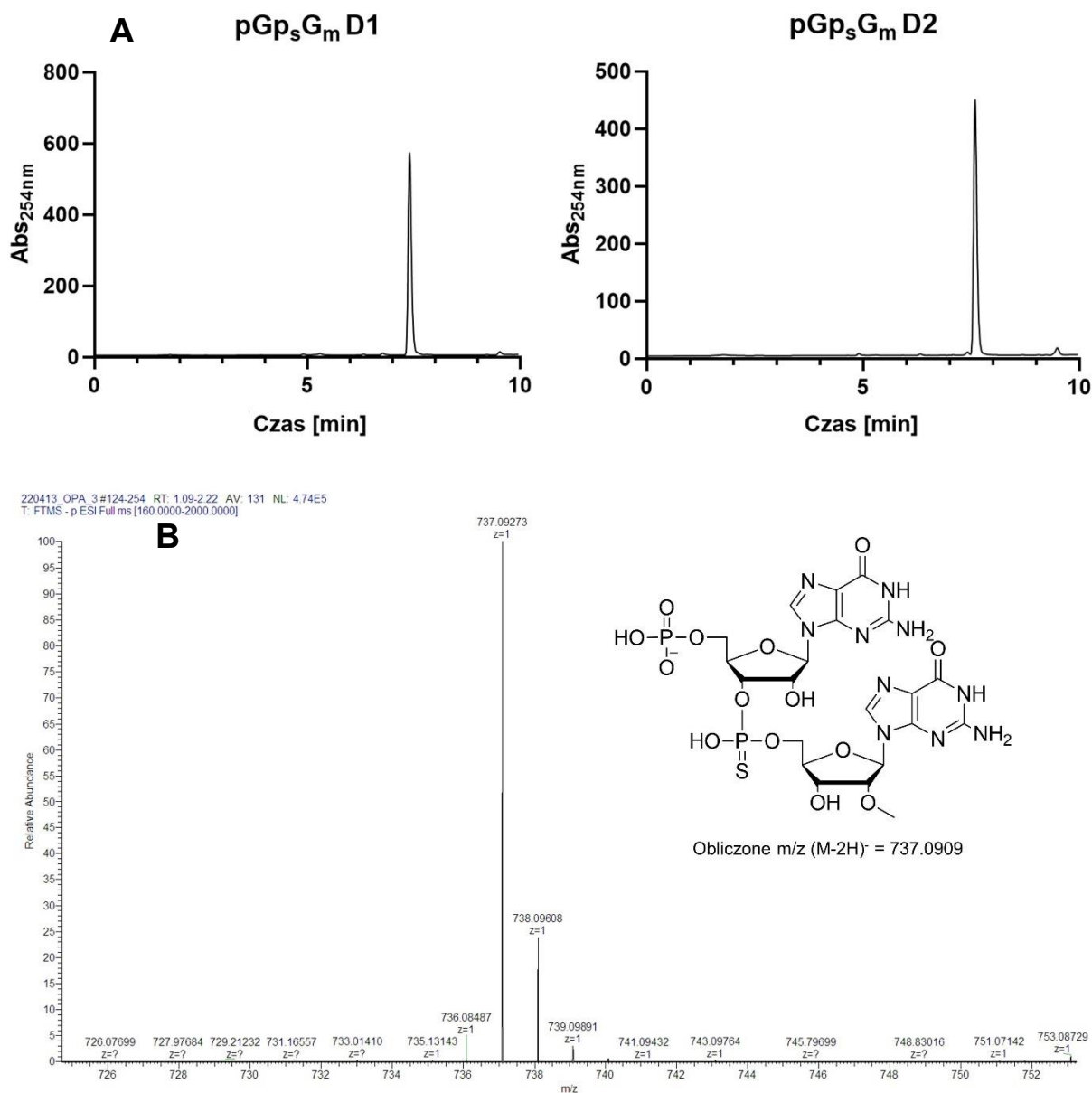
Rysunek 78 Profil RP-HPLC oraz widmo HR-MS produktu syntezy dinukleotydu pApA_m. (A) Chromatogram odbezpieczonego i oczyszczonego produktu reakcji otrzymywania pApA_m; tR(pApA_m) = 8 min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS produktu syntezy pApA_m.



Rysunek 79 Profile RP-HPLC oraz przykładowe widmo HR-MS izomerów D1 i D2 produktu syntezy dinukleotydu pAp_sA_m. (A) Chromatogramy odbezpieczonych i oczyszczonych produktów reakcji otrzymywania pAp_sA_m; *t*R(pAp_sA_m D1) = 9 min; *t*R(pAp_sA_m D2) = 9.4 min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS izomeru D1 produktu syntezy pAp_sA_m.

12.1.2. Otrzymywanie dinukleotydów guaninowych

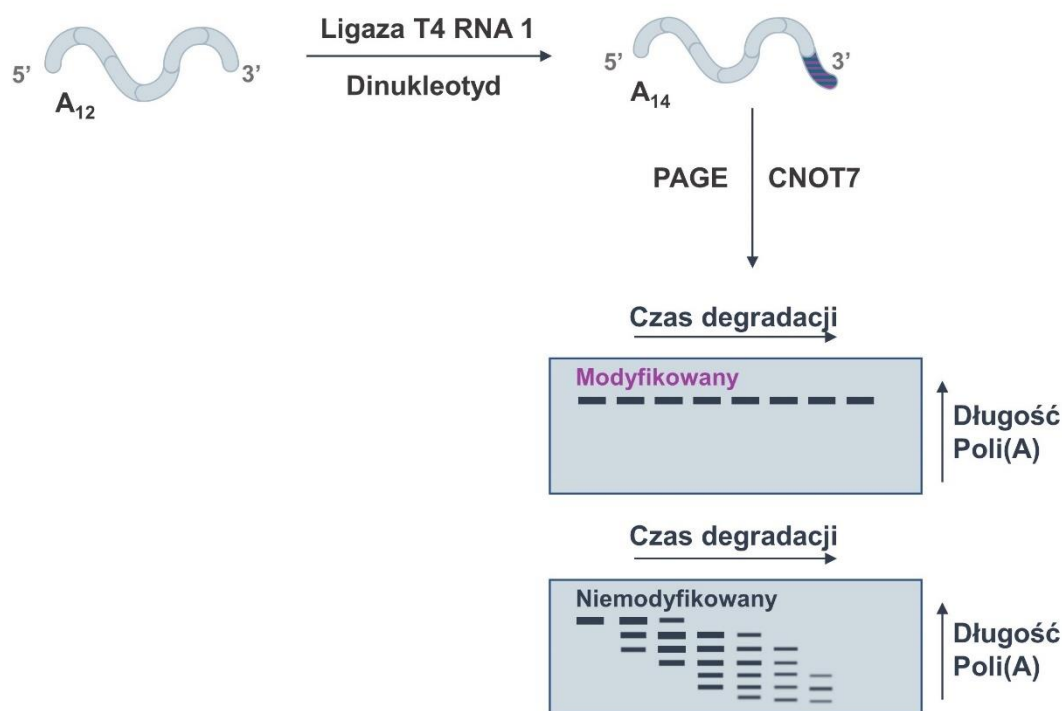
Otrzymałam trzy dinukleotydy guaninowe o analogicznej strukturze do opisanych w rozdziale 12.1.1. związków adeninowych. A więc dinukleotyd pGpG_m posiada pojedynczą modyfikację w postaci metylacji grupy 2'-OH. Otrzymałam również dwa stereoizomery D1 oraz D2 dinukleotydu pGp_sG_m. Synteza związków przeprowadzona została zgodnie z ogólnym protokołem. Ponownie w wyniku oczyszczania możliwe było odseparowanie stereoizomerów pGp_sG_m. Profile HPLC oraz widma HR-MS wszystkich trzech dinukleotydów znajdują się na Rysunkach 80 i 81.



Rysunek 81 Profile RP-HPLC oraz przykładowe widmo HR-MS izomerów D1 i D2 produktu syntezy dinukleotydu pGp_sG_m. (A) Chromatogramy odbezpieczonych i oczyszczonych produktów reakcji otrzymywania pGp_sG_m; $t_R(\text{pGp}_s\text{G}_m\text{D1}) = 7.4$ min; $t_R(\text{pGp}_s\text{G}_m\text{D2}) = 7.6$ min; eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: A:MeOH v1:1; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–15 min. (B) Widmo HR-MS izomeru D1 produktu syntezy pGp_sG_m.

13. Modyfikacje końca 3' oligonukleotydów metodą ligacji enzymatycznej

Głównym celem wprowadzania modyfikowanych dinukleotydów do mRNA jest stabilizacja końca 3'. Aby umożliwić łatwą weryfikację i optymalizację procesu ligacji, w pierwszej kolejności skupiłam się na opracowaniu metody modyfikacji krótkich oligonukleotydów poliadenylowych. Na wcześniejszym etapie projektu doktorskiego opracowałam skuteczną i wygodną metodę badania podatności oligonukleotydów poliadenylowych na specyficzną degradację. Substratem oligonukleotydowym poddawany modyfikacji końca 3' był opisany we wcześniejszej części rozprawy niemodyfikowany analog poli(A) A_{12} . 5'-monofosforany dinukleotydów przyłączane były do końca 3' oligonukleotydu A_{12} na drodze enzymatycznej ligacji z udziałem ligazy T4 RNA 1 (Rys. 82). W celu weryfikacji wydajności procesu ligacji, jej produkty oczyszczane były metodą RP-HPLC a następnie poddawane eksperymentom degradacji enzymatycznej z udziałem CNOT7. Ponieważ przeprowadzone przeze mnie badania dowiodły, że zarówno 2'-O-metylacja jak i wiązanie tiofosfodiestrowe hamują aktywność CNOT7, zakładałam, że produkty ligacji będą stabilne w obecności tego enzymu, podczas gdy frakcje niemodyfikowane ulegną degradacji. Oligonukleotydy poddane trawieniu przez CNOT7 analizowane były następnie poprzez rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym (PAGE).

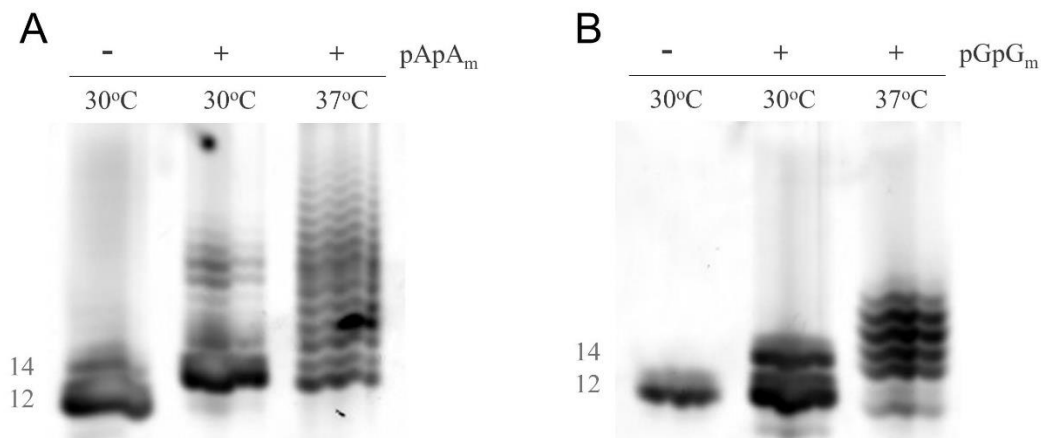


Rysunek 82 Schemat modyfikacji analogu poli(A) A_{12} poprzez przyłączenie 5'-fosforanów dinukleotydów do końca 3' oligonukleotydu na drodze ligacji enzymatycznej. Produkty ligacji były analizowane poprzez rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym.

13.1. Przyłączanie modyfikowanych 5'-fosforanów dinukleotydów do końca 3' analogu ogona poli(A)

Optymalizację procesu ligacji przeprowadziłam pod kątem ustalenia odpowiedniego czasu reakcji, temperatury w jakiej była prowadzona oraz stosunku stężeń substratów. Moim celem było osiągnięcie całkowitej konwersji niemodyfikowanego substratu oligonukleotydowego w modyfikowany produkt jednokrotnej ligacji, a więc wydłużony o dwie podjednostki A lub G. Metylacja grupy 2'-OH rybozy jako taka nie blokuje kompletnie możliwości przyłączenia kolejnej

podjednostki co końca 3' RNA, ponieważ to grupa 3'-OH tworzy wiązanie fosfodiesterowe. Jednakże obecność grupy metylowej w pozycji 2' rybozy stanowi wystarczającą zawadę steryczną, by znacząco zmniejszyć wydajność ligacji.⁴⁰¹ W pierwszej kolejności kierowałam się wskazaniem producenta handlowo dostępnej ligazy T4 RNA 1 (New England BioLabs). Reakcję prowadziłam w buforze dedykowanym do reakcji z udziałem ligazy T4 RNA 1 producenta New England BioLabs (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5), z dodatkiem 10% DMSO i w obecności 1 μM oligonukleotydu A₁₂, 1 mM ATP, 3 mM DTT, 1.2 U/μl inhibitora RNazy RiboLock oraz 1 U/μl enzymu ligazy T4 RNA 1. Sugerowany przez producenta protokół zakładał prowadzenie reakcji ligacji w temperaturze 24°C przez 2 godziny lub w temperaturze 16°C przez 16 godzin przy nadmiarze molowym donora (5'-fosforanu dinukleotydu) względem akceptora (A₁₂) minimalnie 2-krotnym i maksymalnie 10-krotnym. Przy zastosowaniu pierwszego wariantu sugerowanego przez producenta ligazy (24°C, 2 godziny) zaobserwowałam powstawanie produktów jednokrotnej ligacji. Jednakże zarówno 5- jak i 10-krotny nadmiar molowy donora nie był wystarczający dla osiągnięcia pełnej konwersji substratu A₁₂ do modyfikowanego produktu. Zwiększenie temperatury, przy zachowaniu pozostałych parametrów reakcji i zastosowaniu 5-krotnego nadmiaru donora, dało mieszane efekty. W przypadku dinukleotydów adeninowych (Rys. 83A), przy zastosowaniu temperatury 30°C zaobserwowałam pełną konwersję substratu do produktu jednokrotnej ligacji oraz powstanie niewielkiej ilości produktów wielokrotnej ligacji. Z kolei w wyniku reakcji prowadzonej w temperaturze 37°C uzyskałam przeważającą ilość produktów wielokrotnej ligacji. W przypadku dinukleotydów guaninowych (Rys. 83B), zwiększenie temperatury reakcji do 30°C wciąż nie zapewniło pełnej konwersji substratu do produktu, za to w temperaturze 37°C doszło do powstania wielu produktów wielokrotnej ligacji i nie było możliwe zaobserwowanie prążka odpowiadającego pożądanemu 14-merowemu produktowi.



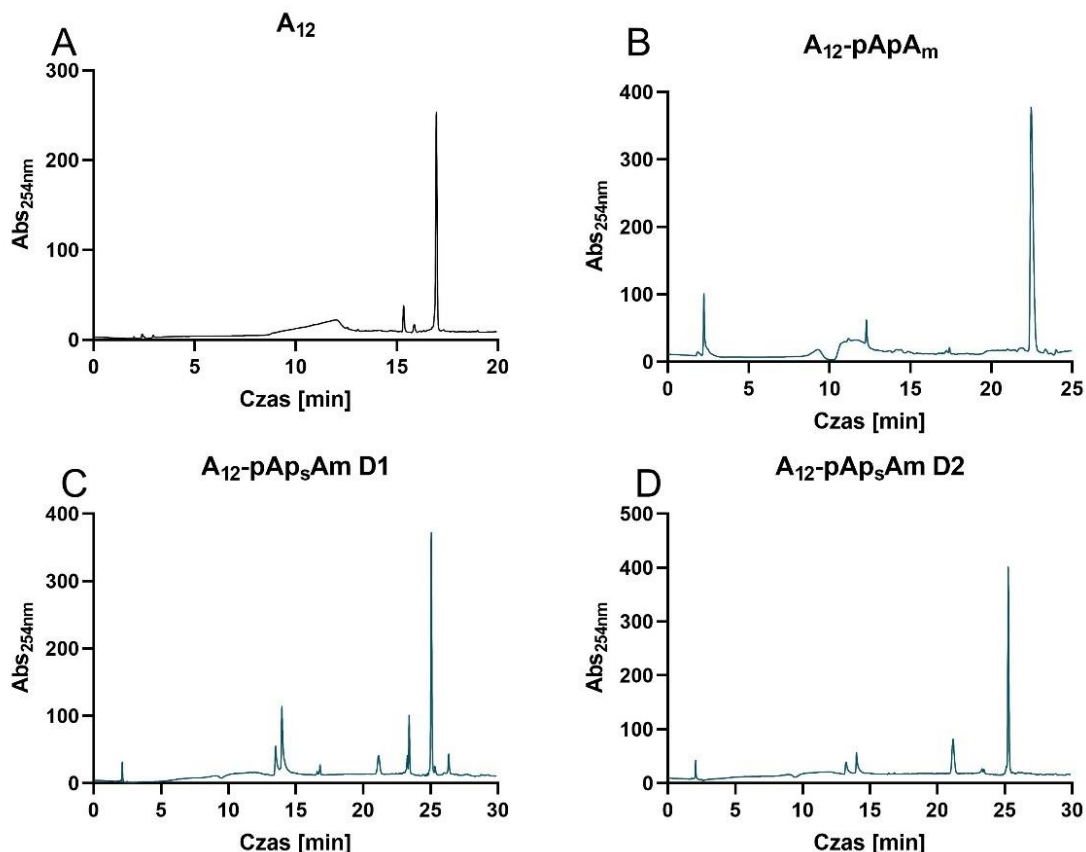
Rysunek 83 Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold po analizie elektroforetycznej mieszanin poreakcyjnych próbnym reakcji ligacji 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' A₁₂. (A) Reakcje ligacji z udziałem dinukleotydu pApA_m; (B) Reakcje ligacji z udziałem dinukleotydu pGpG_m.

Dzięki wstępnym wynikom eksperymentalnym dokonałam szeregu istotnych obserwacji. Po pierwsze, przyłączenie 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' oligonukleotydu RNA na drodze enzymatycznej ligacji jest możliwe, jednakże wydajność owej reakcji silnie zależy od jej warunków i rodzaju donora dinukleotydowego. Po drugie, dinukleotydy adeninowe najprawdopodobniej stanowią lepszy substrat dla ligazy T4 RNA 1 od dinukleotydów guaninowych. Z tego względu na dalszych etapach optymalizacji doбираłam warunki tak, by zmaksymalizować wydajność dla reakcji z udziałem dinukleotydów guaninowych. Po trzecie, stosując temperaturę reakcji równą 24°C zaobserwowałam powstawanie tylko produktów

jednokrotnej ligacji, choć konwersja substratu oligonukleotydowego nie była pełna. Z kolei zwiększenie temperatury w jakiej prowadzona jest reakcja przyspiesza jej przebieg, jednakże skutkuje powstaniem dużej ilości produktów wielokrotnej ligacji. Jest to efekt szczególnie niepożądany w perspektywie otrzymywania cząsteczek RNA o potencjale terapeutycznym, których struktura powinna być ściśle określona, a ich synteza powtarzalna i precyzyjna.

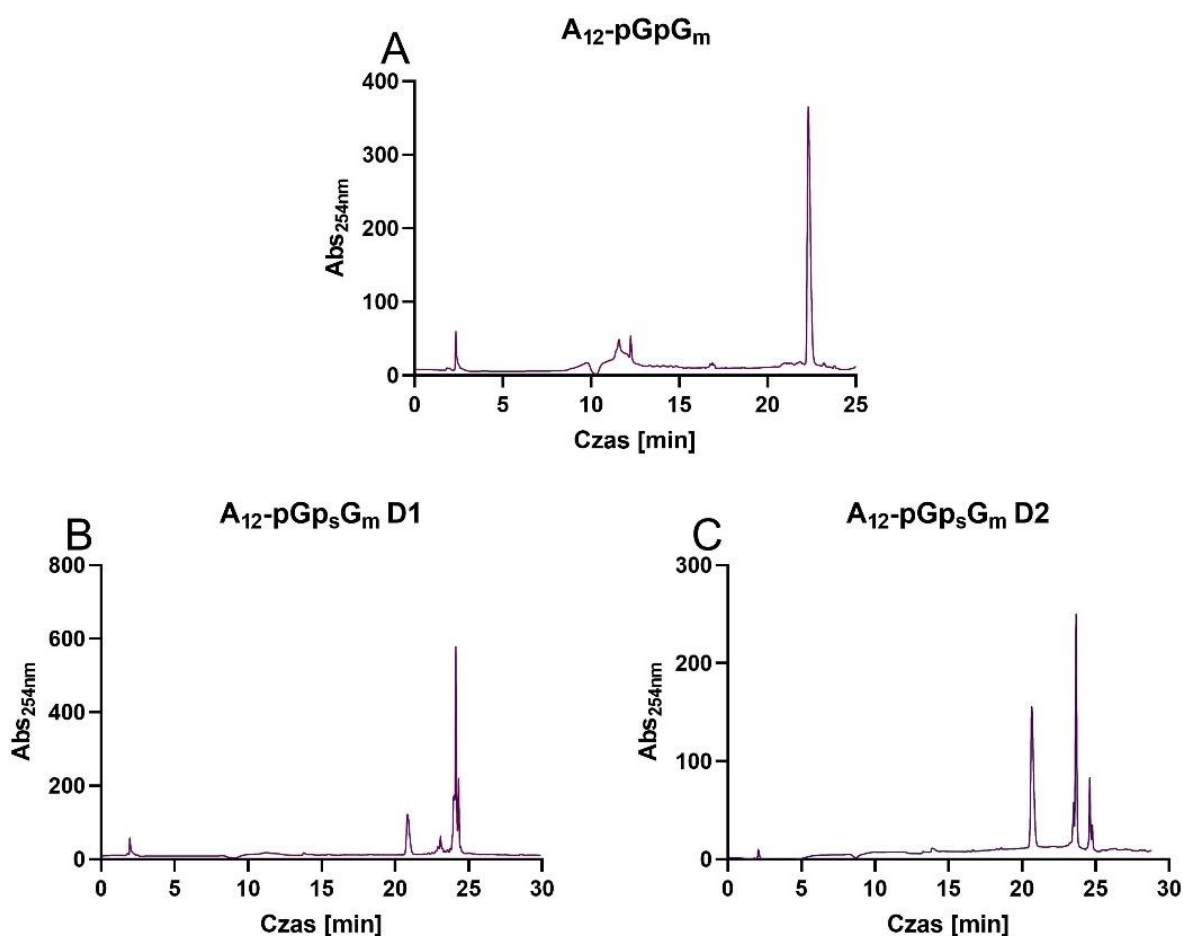
Przy zastosowaniu drugiego z wariantów reakcji ligacji sugerowanych przez producenta (16°C, 16 godzin) uzyskałam bardzo niewielki stopień konwersji stosując 5- i 10-krotny nadmiar dinukleotydowego donora względem akceptora A_{12} . Ostatecznie przetestowałam prowadzenie reakcji w temperaturze 24°C, przy 5-krotnym nadmiarze donora względem akceptora przez 4, 6 albo 16 godzin. Reakcje ligacji prowadzone przez noc, czyli około 16 godzin, jako jedyne skutkowały zupełną konwersją substratu A_{12} do produktu jednokrotnej ligacji dla każdego z zastosowanych donorów dinukleotydowych.

Według zoptymalizowanego protokołu, reakcję ligacji 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' oligonukleotydu A_{12} prowadziłam w temperaturze 24°C przez 16 godzin, przy zastosowaniu 5-krotnego molowego nadmiaru donora względem akceptora ($C_{A_{12}} = 1 \mu\text{M}$, $C_{\text{dinukl}} = 5 \mu\text{M}$). Pozostałe warunki reakcji pozostały niezmiennione względem opisanych na początku niniejszego rozdziału. Reakcję ligacji zatrzymywałam poprzez 10-krotne rozcieńczenie wodą. Przed oczyszczaniem metodą RP-HPLC przeprowadzałam ekstrakcję mieszaniną v1:1 fenol/chloroform w celu usunięcia ligazy z roztworu oligonukleotydów.



Rysunek 84 Profile RP-HPLC mieszanin poreakcyjnych ligacji 5'-fosforanów dinukleotydów adeninowych do końca 3' oligonukleotydu A_{12} . (A) Substrat oligonukleotydowy A_{12} ; $tR(A_{12}) = 17$ min. (B) Reakcja otrzymywania A_{12} -pApAm; $tR(A_{12}$ -pApAm) = 23 min. (C) Reakcja otrzymywania A_{12} -pApAm D1; $tR(A_{12}$ -pApAm D1) = 25 min. (D) Reakcja otrzymywania A_{12} -pApAm D2; $tR(A_{12}$ -pApAm D2) = 25.5 min. Eluent A: 0,1 M bufor octan trietyloaminy pH 7,0, eluent B: 0,2 M bufor octan trietyloaminy v1:1 ACN; gradient liniowy 0–30% w czasie 0–20 min, 30–50% w czasie 20–30 min.

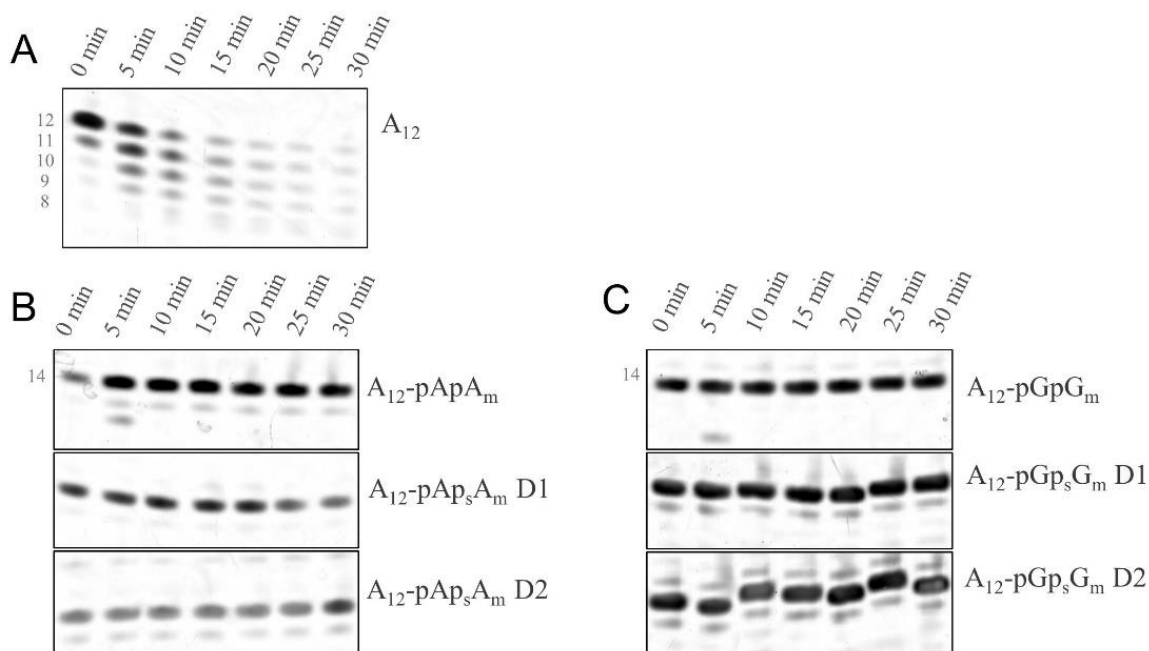
Na Rysunku 84 znajdują się profile RP-HPLC mieszanin poreakcyjnych ligacji z udziałem dinukleotydów adeninowych (Rys. 83B-C) oraz substratu A_{12} (Rys. 84A). Dla wszystkich trzech dinukleotydów zaobserwowałam całkowitą konwersję substratu A_{12} do 14-merowych produktów. Z kolei na Rysunku 85 znajdują się analogiczne profile RP-HPLC odpowiadające mieszaninom poreakcyjnym ligacji z udziałem dinukleotydów guaninowych. W ich przypadku również zaobserwowałam całkowitą konwersję wyjściowego oligonukleotydu do oczekiwanego produktu, jednakże dla reakcji otrzymywania oligonukleotydu A_{12} -pGp_sG_m D2 zauważyłam powstanie niewielkiej ilości produktu dwukrotnej ligacji o nieco dłuższym czasie retencji od oczekiwanego 14-meru. Fakt, że w prawie wszystkich przypadkach zaobserwowałam jednokrotne przyłączenie modyfikowanej cząsteczki do końca 3' oligonukleotydu był więc bardzo zadowalający. Jedyny wyjątek stanowiła reakcja otrzymywania wspomnianego już oligonukleotydu A_{12} -pGp_sG_m D2. Różnica w czasie retencji między 14- a 16-merowym produktem była na tyle duża, że możliwe było wyizolowanie pożądanego oligonukleotydu będącego wynikiem jednokrotnej ligacji. Oczyszczone oligonukleotydy zostały poddane jednokrotnej liofilizacji.



Rysunek 85 Profile RP-HPLC mieszanin poreakcyjnych ligacji 5'-fosforanów dinukleotydów guaninowych do końca 3' oligonukleotydu A_{12} . (A) Reakcja otrzymywania A_{12} -pGpG_m; $tR(A_{12}$ -pGpG_m) = 23 min. (B) Reakcja otrzymywania A_{12} -pGp_sG_m D1; $tR(A_{12}$ -pGp_sG_m D1) = 24 min. (C) Reakcja otrzymywania A_{12} -pGp_sG_m D2; $tR(A_{12}$ -pGp_sG_m D2) = 23 min. Eluent A: 0,1 M bufor octan trietyloaminy pH 7,0, eluent B: 0,2 M bufor octan trietyloaminy v1:1 ACN; gradient liniowy 0–30% w czasie 0–20 min, 30–50% w czasie 20–30 min.

13.2. Eksperymenty degradacji enzymatycznej modyfikowanych oligonukleotydów z udziałem CNOT7

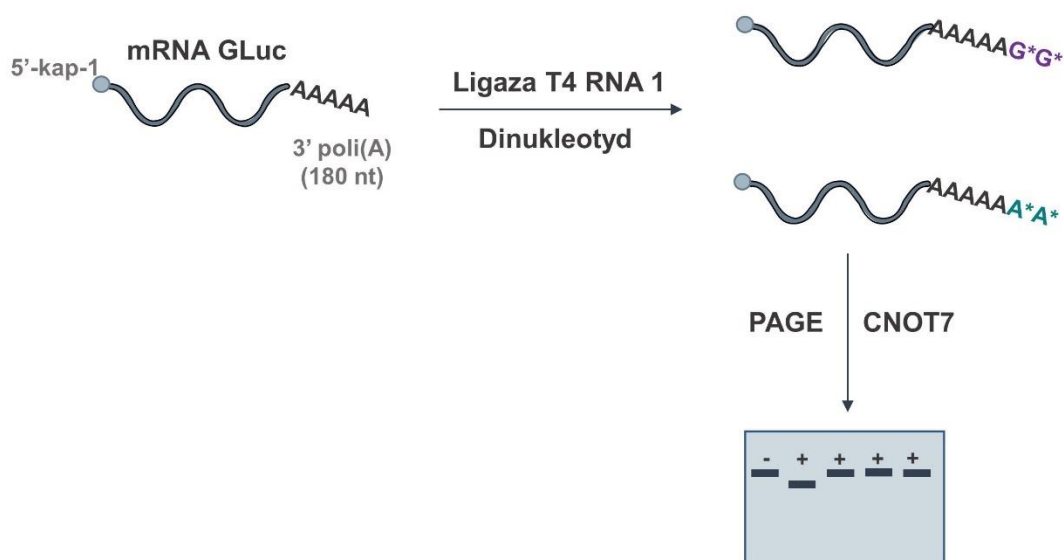
Próbe trawienia enzymatycznego modyfikowanych na końcu 3' 14-merowych oligonukleotydów prowadziłam zgodnie z protokołem szczegółowo opisanym w rozdziale 10.1. (bufor Tris 20 mM o pH 8.0, z dodatkiem 20 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$ oraz 100 mM KCl). Reakcje enzymatyczne prowadziłam przez 30 minut. Z mieszaniny reakcyjnej pobierałam próbki w odstępach 5-minutowych, zaczynając od czasu 0 minut. Reakcja w każdym punkcie czasowym zatrzymywana była poprzez rozcieńczenie pobranej porcji mieszaniny reakcyjnej roztworem EDTA w stosunku v1:1. Na Rysunku 86 znajdują się zdjęcia żeli poliakrylamidowych, wykonane po rozdiale elektroforetycznym próbek oligonukleotydów poddanych degradacji przez CNOT7. Niemodyfikowany kontrolny oligonukleotyd A_{12} ulega szybkiej degradacji (Rys. 86A), podczas gdy modyfikowane na końcu 3' 14-mery (A_{12} -pApA_m i A_{12} -pAp_sA_m D1/D2, Rys. 86B; A_{12} -pGpG_m i A_{12} -pGp_sG_m D1/D2, Rys. 86C) pozostają w pełni stabilne w zastosowanych warunkach eksperymentalnych. Oznacza to, że wszystkie zastosowane chemicznie modyfikowane dinukleotydy mogą zostać wykorzystane w celu znaczącej poprawy stabilności cząsteczek RNA i ich ochrony przed aktywnością enzymów deadenylujących.



Rysunek 86 Próby degradacji modyfikowanych 14-merowych oligonukleotydów uzyskanych na drodze ligacji 5'-monofosforanów dinukleotydów przez enzym CNOT7. Zdjęcia żeli poliakrylamidowych wybarwionych SYBR Gold wykonano po rozdiale elektroforetycznym próbek oligonukleotydów poddanych trawieniu przez enzym CNOT7. (A) Niemodyfikowany oligonukleotyd A_{12} . (B) 14-mery uzyskane po ligacji A_{12} z dinukleotydami adeninowymi. (C) 14-mery uzyskane po ligacji A_{12} z dinukleotydami guaninowymi.

14. Modyfikacje końca 3' mRNA lucyferazy *Gaussia*

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na krótkich oligonukleotydach były bardzo zadowalające i dawały nadzieję na dalsze powodzenie projektu, którego celem była stabilizacja końca 3' *in vitro* transkrybowanych cząsteczek mRNA. Otrzymany zestaw 5'-monofosforanów dinukleotydów adeninowych i guaninowych wykorzystałam następnie do opracowania i optymalizacji reakcji ich ligacji do końca 3' mRNA kodującego lucyferazę *Gaussia*. Analogicznie do krótkich oligonukleotydów, przeprowadziłam ewaluację procesu ligacji poprzez poddanie modyfikowanych mRNA eksperymentom trawienia enzymatycznego z CNOT7 (Rys. 87).



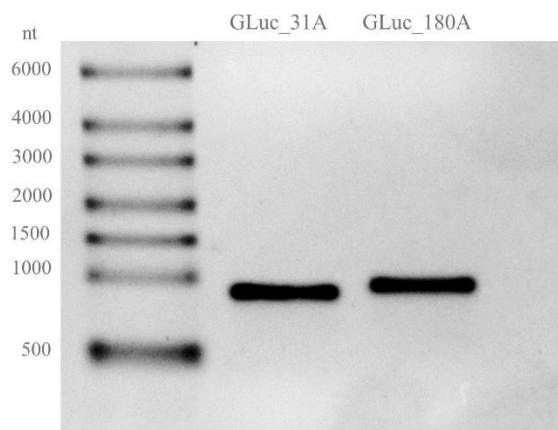
Rysunek 87 Schemat modyfikacji mRNA lucyferazy *Gaussia* poprzez przyłączenie 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' transkryptu na drodze ligacji enzymatycznej. Produkty ligacji były analizowane poprzez rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym.

14.1. Otrzymywanie mRNA lucyferazy *Gaussia* metodą transkrypcji *in vitro*

mRNA kodujące lucyferazę *Gaussia* otrzymałam metodą transkrypcji *in vitro*. Do reakcji wykorzystałam plazmid pJET_T7_GLuc_31A, który w celu linearyzacji poddałam cięciu enzymem restrykcyjnym AarI. Transkrypcję *in vitro* prowadziłam w buforze (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM spermidyny), z dodatkiem matrycy DNA, 5'-trifosforanów nukleotydów ATP/UTP/CTP (4 mM) i GTP w stężeniu dwukrotnie niższym (2 mM) od analogu kapu 1 (m⁷GpppA_{mp}G, 4 mM) oraz polimerazy RNA T7. W reakcji znalazła się również nieorganiczna pirofosfataza, której zadaniem była hydroliza powstającego w trakcie transkrypcji pirofosforanu magnezu. Po 3 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C do reakcji dodałam DNAzę I w celu degradacji matrycowego DNA. Reakcję transkrypcji zatrzymywałam poprzez 2-krotne rozcieńczenie wodą. Na tym etapie mRNA oczyszczane było na kolumnkach firmy Monarch (Monarch RNA Cleanup Columns T2050, New England BioLabs) w celu usunięcia soli, polimerazy T7 oraz 5'-trifosforanów nukleotydów.

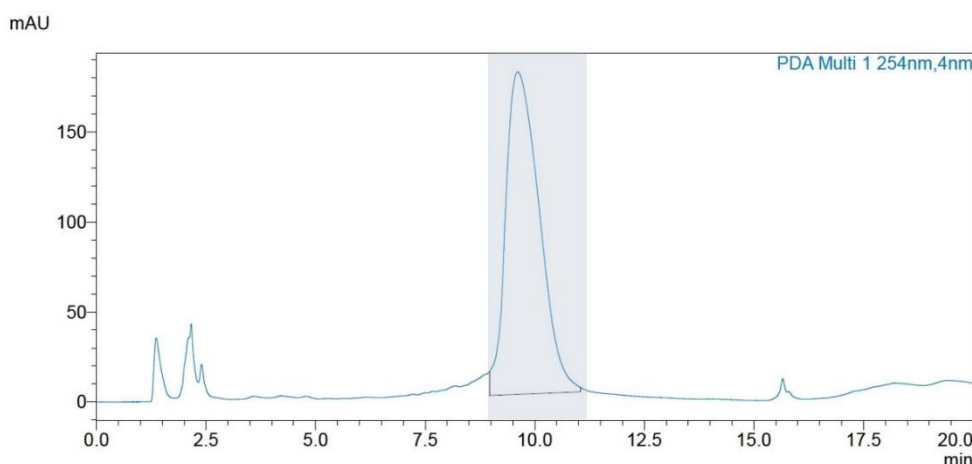
Większość eukariotycznych mRNA posiada ogon poli(A) o długości między 100 a 200 podjednostek. mRNA posiadające krótkie ogony poli(A), o długości poniżej 50 adenozyń, ulegają procesowi translacji mało wydajnie. Z tego względu mRNA otrzymane na podstawie matrycy pJET_T7_GLuc_31A poddałam procesowi poliadenylacji, aby wydłużyć jego ogon poli(A) z długości około 31A do 180A (Rys. 88). Reakcję poliadenylacji prowadziłam w handlowo

dostępnym buforze (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M NaCl, 10 mM MgCl₂), z dodatkiem ATP, inhibitora RNaz RiboLock, mRNA lucyferazy *Gaussia* oraz polimerazy poli(A).



Rysunek 88 mRNA lucyferazy *Gaussia* z ogonem poli(A) długości 31 i 180 adenzyn. Zdjęcie żelu 1% agarozowego wykonane zostało po rozdiale elektroforetycznym próbek mRNA przed i po reakcji poliadenylacji.

Po procesie poliadenylacji przeprowadziłam dwuetapowy proces oczyszczania mRNA. W pierwszej kolejności ponownie oczyściłam mRNA na kolumnkach firmy Monarch. Następnie mRNA oczyściłam z użyciem RP-HPLC w celu usunięcia cząsteczek dwuniciowych i skróconych oraz zanieczyszczeń pozostałych po procesie transkrypcji i poliadenylacji (Rys. 89).



Rysunek 89 Chromatogram oczyszczania mRNA lucyferazy *Gaussia* na RP-HPLC; $t_R(\text{mRNA GLuc}) = 9\text{--}11$ min. Eluent A: 0,1 M bufor octanu trietyloaminy pH 7.0, eluent B: 0,2 M bufor octanu trietyloaminy v1:1 ACN; gradient liniowy 20–25% B w czasie 0–20 min, 25–100% B w czasie 20–25 min. Kolumna RNASep™ Prep – RNA Purification Column (ADS Biotec), przepływ 0.9 ml/min, temperatura 55°C.

Po oczyszczaniu przeprowadziłam wytrącanie mRNA z buforu do elucji użytego do oczyszczania na RP-HPLC. Do eluatu dodałam 1.2 objętości izopropanolu, octan sodu (NaOAc pH 5.8) do stężenia końcowego 0.3 M oraz glikogen w ilości 1 μ l/1 ml eluatu i ko-precypitatu GlycoBlue™ (Invitrogen) w ilości 0.25 1 μ l/1 ml eluatu. Po całonocnej inkubacji w temperaturze -20 °C roztwór eluatu i izopropanolu poddawałam wirowaniu (12000 rpm, 40 minut), a następnie mRNA w formie osadu przemywałam 80% etanolem. Po ponownym wirowaniu usuwałam supernatant, a osad osuszałam całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem. mRNA rozpuszczałam ponownie w wodzie a następnie wyznaczałam stężenie jego roztworu spektrofotometrycznie. Jakość i czystość transkryptu sprawdzałam na 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy (EtBr).

14.2. Przyłączanie chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' mRNA lucyferazy *Gaussia*

W celu przeprowadzenia modyfikacji końca 3' mRNA lucyferazy *Gaussia* (GLuc) przy pomocy chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów musiałam wprowadzić niezbędne zmiany do protokołu ligacji opracowanego na potrzeby modyfikacji krótkich oligonukleotydów. Główna różnica wynikała z potrzeby zastosowania znacznie niższego stężenia mRNA, a więc akceptora reakcji ligacji, niż było to możliwe w przypadku reakcji przeprowadzanej na oligonukleotydach. mRNA lucyferazy *Gaussia* jest około 100 razy większą cząsteczką niż oligonukleotyd A₁₂, a więc zastosowanie stężenia molowego mRNA równego 1 μM mogłoby skutkować zatłoczeniem molekularnym uniemożliwiającym wydajny przebieg reakcji enzymatycznej. Dodatkowo, transkrypcja *in vitro* nie może dorównać skalą syntezy chemicznej w fazie stałej, a więc otrzymanie tak dużej ilości produktu mRNA nie było możliwe. Z tego względu stężenie cząsteczek mRNA, a więc wolnych końców 3' biorących udział w procesie ligacji, było znacznie niższe. Aby możliwie zwiększyć wydajność ligacji zastosowałam dużo większy krotny nadmiar molowy 5'-fosforanów dinukleotydów (donorów) względem mRNA (akceptora). Z kolei czas reakcji z całonocnej inkubacji skrócony został do 1 godziny, aby zapobiec degradacji mRNA. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam również detergent PEG8000, który powszechnie stosuje się w reakcjach ligacji z udziałem cząsteczek mRNA w niskim stężeniu, w celu uzyskania optymalnego zatłoczenia molekularnego i przyspieszenia przebiegu reakcji.⁴⁰² Reakcje otrzymywania mRNA lucyferazy *Gaussia* modyfikowanych na końcu 3' prowadziłam w handlowo dostępnym buforze producenta New England BioLabs (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5) z dodatkiem 15% PEG8000 i 10% DMSO, w obecności 1.5 μg mRNA GLuc, 2U/μl ligazy T4 RNA 1, 1.2U/μl inhibitora RNazy RiboLock oraz 17/42/84 μM pApAm/pApsAm D1/pApsAm D2/pGpGm /pGpsGm D1/pGpsGm D2. Reakcje prowadzone były w temperaturze 24°C przez 1 godzinę i zatrzymywane poprzez 10-krotne rozcieńczenie wodą. Produkty mRNA oczyszczane były na kolumnkach silikażelowych firmy New England BioLabs (Monarch RNA Cleanup Columns T2030). Przeprowadziłam szereg reakcji próbnych stosując 20- 50- oraz 100-krotny nadmiar molowy donora. Reakcję w każdym wariancie przeprowadziłam trzykrotnie. Wydajność procesu ligacji ustalałam poddając produkty reakcji eksperymentom trawienia enzymatycznego z udziałem deadenylazy CNOT7 (dokładny protokół opisany został w rozdziale 14.3.). 20-krotny nadmiar donora względem mRNA skutkował około 50% konwersją substratu do odpornego na degradację produktu. W przypadku zastosowania 50-krotnego nadmiaru konwersja wynosiła około 90%. Z kolei 100-krotny nadmiar donora sprawił, że we wszystkich trzech powtórzeniach reakcji zaobserwowałam 100% konwersję i mogłam wyizolować czyste cząsteczki mRNA stabilizowane modyfikacją końca 3'. Zoptymalizowany protokół zakładał zatem stosowanie stężenia donorów dinukleotydowych równego 84 μM odpowiadającego 100-krotnemu nadmiarowi donora względem akceptora mRNA.

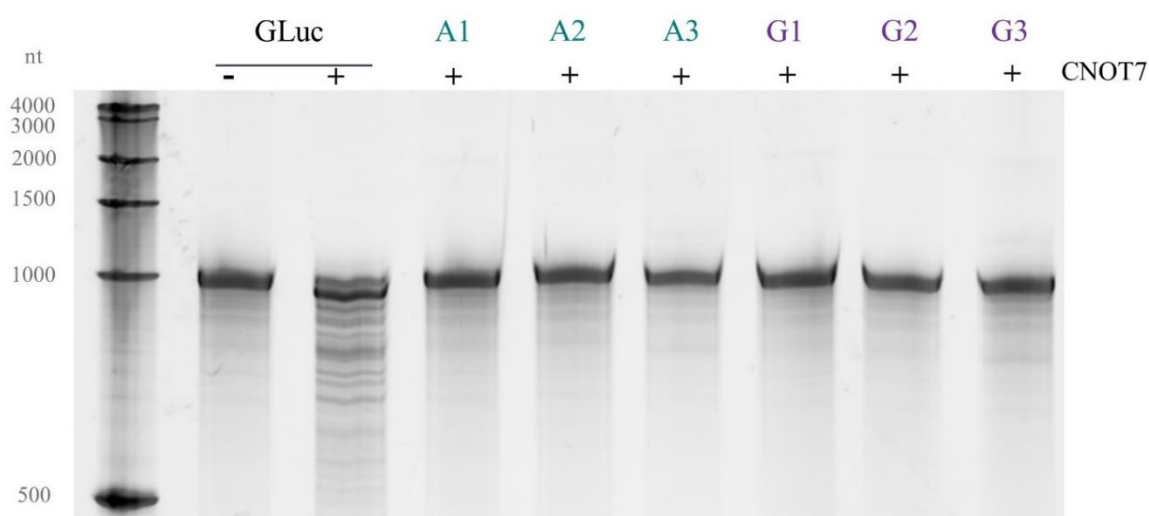
W analogicznych warunkach, ale bez dodatku donora w postaci 5'-monofosforanu dinukleotydu, przygotowałam kontrolne, niemodyfikowane mRNA GLuc. Po oczyszczeniu na kolumnkach silikażelowych (Monarch) wyznaczałam spektrofotometrycznie stężenie modyfikowanych na końcu 3' mRNA GLuc oraz mRNA GLuc kontrolnego. Wydajność otrzymywania modyfikowanych mRNA po procesie oczyszczania wynosiła ~70%, bez względu na rodzaj wprowadzanej modyfikacji. W Tabeli 2 przedstawiony został zestaw wszystkich otrzymanych przeze mnie cząsteczek modyfikowanych mRNA, wraz z nazwami skrótowymi.

Tabela 2 Wykaz mRNA lucyferazy *Gaussia* zawierających modyfikację na końcu 3', wraz z nazwami skrótowymi.

SKRÓT	mRNA
A1	GLuc-pApAm
A2	GLuc-pAp _s Am D1
A3	GLuc-pAp _s Am D2
G1	GLuc-pGpG _m
G2	GLuc-pGp _s G _m D1
G3	GLuc- pGp _s G _m D2

14.3. Eksperymenty enzymatycznej deadenylacji *in vitro* mRNA lucyferazy *Gaussia* z udziałem CNOT7

Każdorazowo po przeprowadzeniu reakcji modyfikacji końca 3' mRNA GLuc na drodze enzymatycznej ligacji z 5'-monofosforanami dinukleotydów, produkty reakcji poddawałam analizie jakościowej. Analogicznie do krótkich oligonukleotydów, cząsteczki mRNA stabilizowane na końcu 3' nie powinny być podatne na degradację enzymatyczną przez specyficzną deadenylazę CNOT7. Z kolei zgodnie z danymi literaturowymi¹⁰⁴ cząsteczki mRNA pozbawione modyfikacji końca 3' powinny ulec skróceniu o długość ogona poli(A) w wyniku deadenylacji przeprowadzanej przez CNOT7. Eksperymenty enzymatycznej deadenylacji prowadziłam w warunkach podobnych do zastosowanych w przypadku krótkich oligonukleotydów (rozdział 10.1.). W typowej reakcji o objętości końcowej równej 5 µl znajdowało się 60 ng mRNA GLuc oraz enzym CNOT7 w stężeniu 0.2 µg/µl. Reakcja prowadzona była w buforze Tris 20 mM o pH 8.0, z dodatkiem 20 mM DTT, 10 mM MgCl₂ oraz 100 mM KCl. Po 40 minutach inkubacji w temperaturze 37°C reakcja była zatrzymywana przez dodanie roztworu EDTA (12 mM). Równolegle do reakcji deadenylacji z udziałem mRNA modyfikowanych na końcu 3', prowadziłam reakcję z kontrolnym niemodyfikowanym mRNA. Próbkę mRNA poddanych deadenylacji analizowałam na mocznikowym 7% żelu poliakrylamidowym (Rys. 90).



Rysunek 90 Zdjęcie żelu poliakrylamidowego po rozdziale elektroforetycznym próbek mRNA poddanych działaniu deadenylazy CNOT7. Analizę PAGE wykonano na 7% żelu mocznikowym, a następnie produkty rozdziału wybarwiono SYBR Gold.

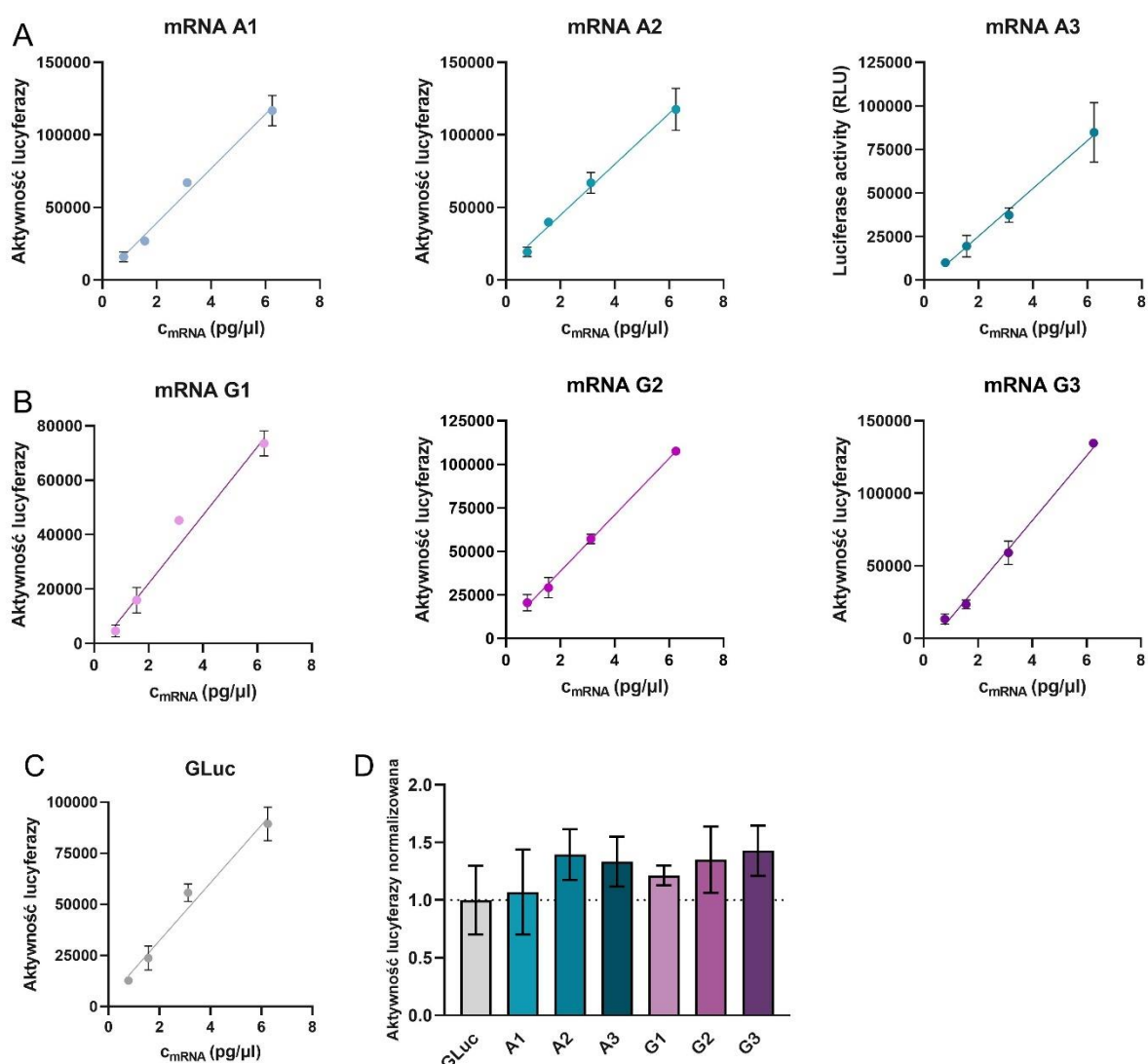
mRNA kontrolne ulegało skróceniu o długość odpowiadającą łańcuchowi poli(A) na końcu 3', czyli około 180 nukleotydów. Z kolei mRNA, do których końca 3' dołączone zostały modyfikowane dinukleotydy pozostawały stabilne w warunkach eksperymentalnych. Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność zastosowanego protokołu ligacji, jak również świadczą o znacząco braku podatności modyfikowanych z jej pomocą mRNA na deadenylację przez CNOT7.

15. Badania ekspresji modyfikowanych mRNA lucyferazy *Gaussia*

Zwieńczeniem drugiej części mojego projektu doktorskiego było zbadanie wpływu chemicznych modyfikacji końca 3' cząsteczek mRNA na ich ekspresję w różnych układach biologicznych. W pierwszej kolejności przeprowadziłam wstępne badania wydajności translacji w lizatach retikulocytów króliczych. Następnie zbadłam ekspresję modyfikowanych mRNA w trzech różnych liniach komórkowych.

15.1. Badania wydajności translacji mRNA lucyferazy *Gaussia* w lizatach retikulocytów króliczych

W lizatach retikulocytów króliczych przeprowadziłam wstępne badania wydajności translacji modyfikowanych mRNA kodujących lucyferazę *Gaussia*. Podobnie do lucyferazy *Firefly*, *Gaussia* jest białkiem katalizującym reakcję powstawania luminescencyjnego produktu z pozbawionego luminescencji substratu.



Rysunek 91 Badania wydajności translacji mRNA lucyferazy *Gaussia* modyfikowanych na końcu 3'. (A) mRNA ligowane z dinukleotydami adeninowymi. (B) mRNA ligowane z dinukleotydami guaninowymi. (C) Niemodyfikowane mRNA GLuc. (D) Wydajność translacji modyfikowanych mRNA GLuc. Znormalizowane wartości wydajności translacji obliczone na podstawie współczynnika kierunkowego prostej uzyskanej dzięki dopasowaniu liniowemu do punktów pomiarowych zależności luminescencji od stężenia mRNA. Wyniki zostały znormalizowane do wartości wyznaczonej dla mRNA niemodyfikowanego. Na wykresie przedstawiono średnie wartości wydajności translacji $\pm$ SD uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów.

Wydajność translacji w układzie RRL badałam poprzez rejestrację aktywności lucyferazy zależnej od stężenia mRNA. Zakres stężeń mRNA został dobrany tak, by uzyskać liniową zależność między luminescencją produktu reakcji katalizowanej przez GLuc a ilością transkryptu wprowadzanego do roztworu RRL (Rys. 91A, B, C). mRNA inkubowane było w roztworze RRL przez godzinę w temperaturze 30°C. Następnie do roztworu lizatów dodawany był roztwór koelenterazyny h w PBS. Pomiary luminescencji utlenionej przez lucyferazę koelenterazyny h wykonałam na czytniku mikropłytek Synergy H1 (BioTek). Wykonałam dopasowanie regresji liniowej do punktów odpowiadających zależności luminescencji od stężenia mRNA. Współczynniki kierunkowe (a) równań prostych otrzymanych na podstawie dopasowania liniowego odpowiadały wydajności translacji charakterystycznej dla danej cząsteczki mRNA (Rys. 91D).

Dla wszystkich modyfikowanych mRNA wydajność translacji była na poziomie porównywalnym lub nieco wyższym od mRNA niemodyfikowanego. Jak już wspomniałam w rozdziale 11.1., układ RRL jest bardzo uproszczony. Przede wszystkim pozbawiony jest znaczącej części maszynarii komórkowej odpowiedzialnej za metabolizm mRNA, w szczególności za jego degradację. Oznacza to, że zwiększona stabilność transkryptów w niewielkim stopniu przekłada się na wydajność translacji w układzie RRL, która zależy przede wszystkim od powinowactwa białek maszynarii translacyjnej do badanych cząsteczek mRNA. Ponieważ różnice między mRNA modyfikowanym a kontrolnym są stosunkowo niewielkie, można wnioskować, że obecność chemicznie modyfikowanych podjednostek na końcu 3' mRNA nie zakłóca ich oddziaływania z maszyną translacyjną obecną w układzie RRL.

15.2. Badania ekspresji lucyferazy *Gaussia* w liniach komórkowych

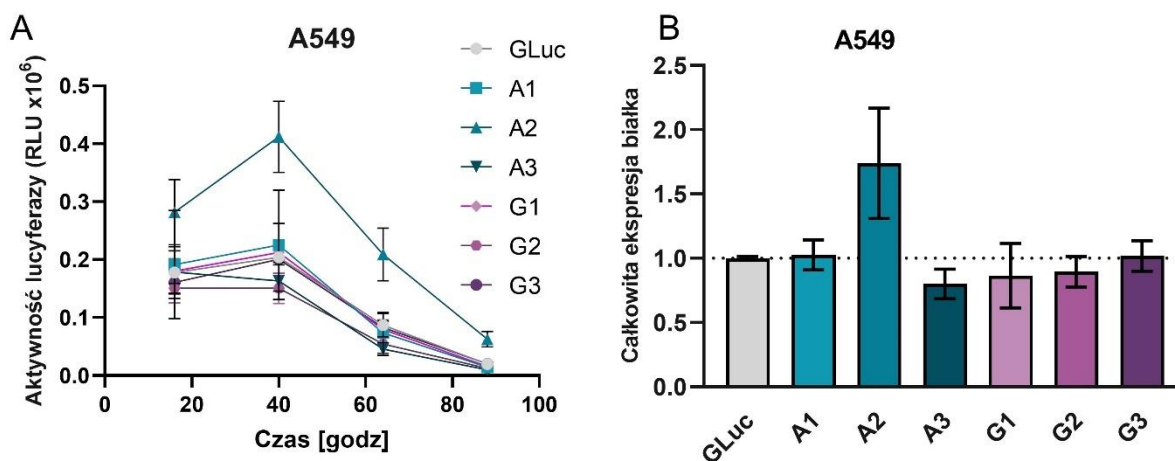
Wiedząc, że wszystkie cząsteczki modyfikowanych mRNA GLuc były wysoce odporne na deadenylację, zakładałam, że niektóre z nich mogą ulegać ekspresji wydajniej od mRNA niemodyfikowanego, przede wszystkim ze względu na potencjalnie wydłużony czas półtrwania w warunkach komórkowych. Równocześnie należało uwzględnić znaczące różnice w mechanizmach translacji, metabolizmie mRNA oraz wydajności transfekcji występujące w poszczególnych liniach komórkowych. Z tego względu przeprowadziłam badania ekspresji lucyferazy *Gaussia* w trzech różnych liniach komórkowych, różniących się pod względem morfologii i pochodzenia. Do badań wybrałam komórki linii A549, JAWS II oraz HEK 293.

Ekspresja lucyferazy *Gaussia* badana była w kilku punktach czasowych. Pożywka, w której hodowane były komórki transfekowane mRNA pobierana była co 24 godziny, przez 4 dni od momentu zakończenia procesu transfekcji. Lucyferaza *Gaussia* wydzielana jest przez komórki do pożywki, dzięki czemu pomiary luminescencji nie wymagają ich lizy. Oznacza to również, że transfekowane komórki można hodować na przestrzeni kilku dni, uzyskując pośrednie informacje dotyczące trwałości mRNA w danej linii komórkowej. Aktywność lucyferazy *Gaussia* badałam pośrednio, poprzez pomiary *in situ* luminescencji produktu powstającego w wyniku katalizowanej przez nią reakcji. Pomiary luminescencji prowadziłam na czytniku mikropłytek Synergy H1 (BioTek). Ekspresję poszczególnych mRNA w każdej linii komórkowej oszacowałam na podstawie trzech niezależnych eksperymentów prowadzonych na różnych populacjach komórek. W każdym eksperymencie dokonywałam trzech niezależnych transfekcji danym mRNA.

15.2.1. Badania ekspresji w komórkach linii A549

Ludzkie komórki nabłonkowe raka płuc A549 stanowią powszechnie stosowany model zarówno w badaniach podstawowych, jak i klinicznych. Znalazły zastosowanie w badaniach chorób płuc, takich jak infekcje wirusowe, astma czy alergię. Przede wszystkim, komórki linii A549 są podstawowym modelem w badaniach terapii antynowotworowych płuc⁴⁰³.

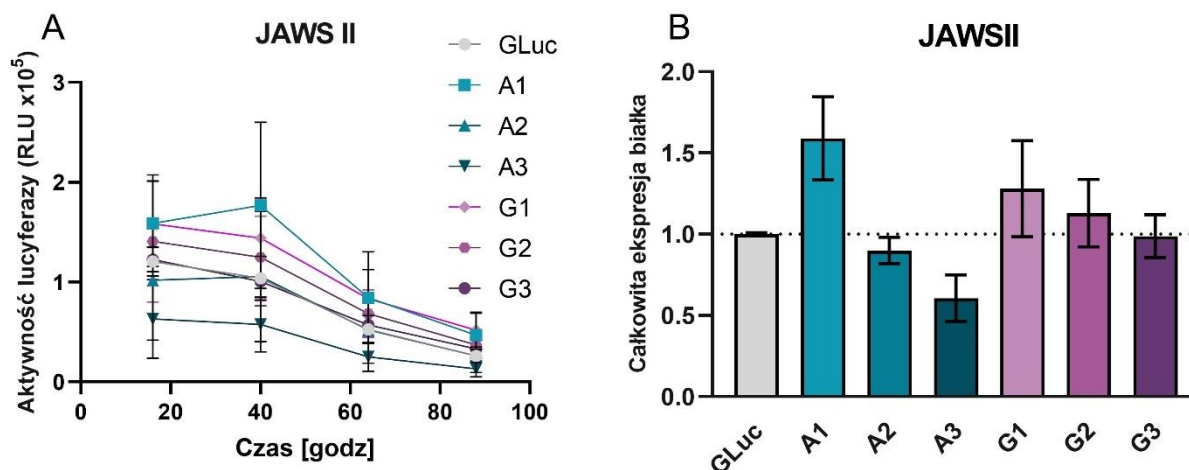
Wszystkie, z wyjątkiem jednego, mRNA zawierające chemiczne modyfikacje końca 3' ulegały ekspresji w stopniu porównywalnym do niemodyfikowanej kontroli (Rys. 92B). mRNA A2, a więc posiadające modyfikację w postaci izomeru D1 dinukleotydu pAp_sA_m dołączonego do końca 3' ogona poli(A), ulegało ekspresji o około 70% wydajniej. Pozostałe modyfikacje nie przyczyniły się do zwiększenia ekspresji mRNA, choć należy zauważyć, że nie spowodowały również jej znaczącego spadku. Nie zaobserwowałam znaczących różnic w trwałości poszczególnych mRNA w komórkach, choć i w tym przypadku mRNA A2 stanowiło wyjątek (Rys. 92A). Przez pierwsze 60 godzin poziom ekspresji mRNA A2 i produkcji lucyferazy *Gaussia* był znacznie wyższy, niż w przypadku mRNA kontrolnego, jak również innych mRNA modyfikowanych. Dopiero w ciągu ostatnich 24 godzin hodowli transfekowanych komórek zaobserwowałam znaczący spadek ekspresji.



Rysunek 92 Badania ekspresji mRNA modyfikowanych na końcu 3' w linii komórkowej A549. (A) Aktywność lucyferazy *Gaussia* w pożywce komórkowej w czasie 16, 40, 64 oraz 80 godzin od transfekcji. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD uzyskane z 3 niezależnych eksperymentów, w każdym po 3 niezależne transfekcje. (B) Całkowita ekspresja lucyferazy *Gaussia* w czasie 4 dni, obliczona jako suma aktywności lucyferazy we wszystkich czterech punktach czasowych podstawie wyników przedstawionych w punkcie (A). Wartości całkowitej ekspresji uzyskane dla modyfikowanych mRNA zostały znormalizowane do wartości odpowiadającej niemodyfikowanemu mRNA kontrolnemu. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD.

15.2.2. Badania ekspresji w komórkach linii JAWS II

Niedojrzałe mysie komórki dendrytyczne linii JAWS II od dawna wykorzystywane są jako model komórek pośredniczących w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu.⁴⁰⁴ Znajdują między innymi zastosowanie w badaniach szczepionek antynowotworowych, których mechanizm zakłada wykorzystanie układu odpornościowego pacjenta do samodzielnego zwalczania komórek rakowych.⁴⁰⁵

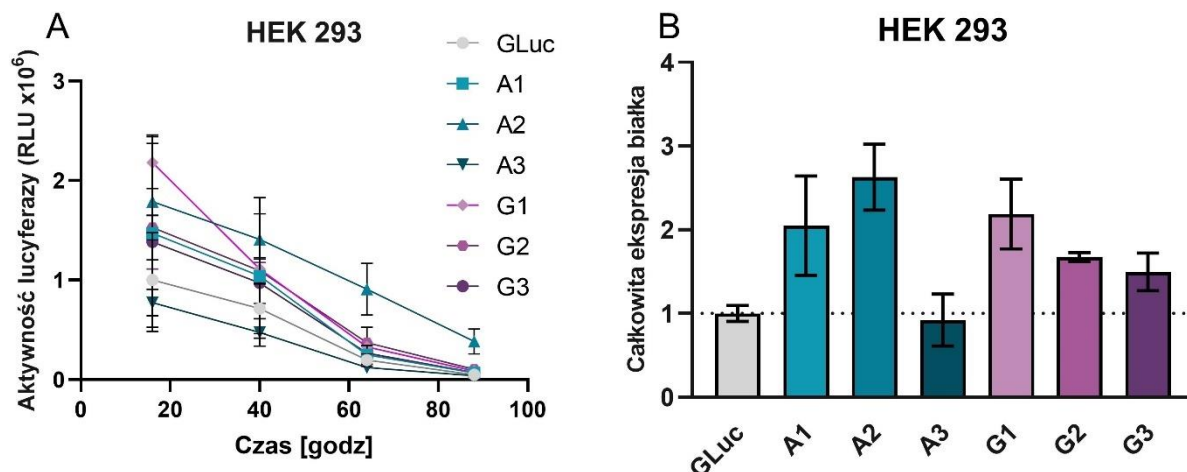


Rysunek 93 Badania ekspresji mRNA modyfikowanych na końcu 3' w linii komórkowej JAWS II. (A) Aktywność lucyferazy Gaussa w pożywce komórkowej w czasie 16, 40, 64 oraz 80 godzin od transfekcji. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD uzyskane z 3 niezależnych eksperymentów, w każdym po 3 niezależne transfekcje. (B) Całkowita ekspresja lucyferazy Gaussa w czasie 4 dni, obliczona jako suma aktywności lucyferazy we wszystkich czterech punktach czasowych. Wartości całkowitej ekspresji uzyskane dla modyfikowanych mRNA zostały znormalizowane do wartości odpowiadającej niemodyfikowanemu mRNA kontrolnemu. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD.

Poziom ekspresji poszczególnych mRNA w linii komórkowej JAWS II był znacznie bardziej zróżnicowany niż w linii A549 (Rys. 93). Po pierwsze, zaobserwowałam znaczące różnice w początkowej ekspresji poszczególnych modyfikowanych transkryptów (Rys. 93A). mRNA A3 we wszystkich eksperymentach wykazywało niski poziom ekspresji już po 16 godzinach od transfekcji. Z kolei produkcja białka w wyniku ekspresji mRNA A1 od samego początku była na poziomie około 60% wyższym niż w przypadku mRNA niemodyfikowanego. Po drugie, różnice w ekspresji zależały zarówno od rodzaju zasady dinukleotydów, jak i chemicznych modyfikacji (Rys. 93B). Wszystkie mRNA zawierające modyfikację końca 3' w postaci dinukleotydów guaninowych wykazywały ekspresję na poziomie zbliżonym do kontroli, podczas gdy między mRNA modyfikowanymi dinukleotydami adeninowymi wystąpiły znaczące różnice. mRNA A1 (modyfikacja pApA_m) ulegało ekspresji z wydajnością 160% względem kontroli, podczas gdy mRNA A3 (modyfikacja pAp_sA_m D2) na poziomie 60%. Dla mRNA A2 (modyfikacja pAp_sA_m D1) produkcja białka była porównywalna z mRNA niemodyfikowanym. Podobny trend, choć charakteryzujący się mniejszymi różnicami w ekspresji, zauważyłam dla modyfikacji guaninowych. Można wnioskować, że obecność 2'-O-metyloadenozyny na końcu 3' mRNA poprawia jego stabilność i przyczynia się do zwiększenia ekspresji. Z kolei dodatkowa modyfikacja w postaci wiązania tiofosfodiesterowego najpewniej zaburza jeden lub kilka procesów prowadzących do produkcji białka w komórkach linii JAWS II. Zwłaszcza izomer D2 dinukleotydu pAp_sA_m przyczynił się do znaczącego obniżenia ekspresji.

15.2.3. Badania ekspresji w komórkach linii HEK 293

Komórki nerkowe linii HEK 293 mają wszechstronne zastosowania. Ulegają transfekcji syntetycznymi kwasami nukleinowymi z wydajnością sięgającą 100%. Charakteryzuje je również szybki wzrost oraz naturalnie wysoki poziom translacji i produkcji białek.⁴⁰⁶



Rysunek 94 Badania ekspresji mRNA modyfikowanych na końcu 3' w linii komórkowej HEK 293. (A) Aktywność lucyferazy Gaussia w pożywce komórkowej w czasie 16, 40, 64 oraz 80 godzin od transfekcji. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD uzyskane z 3 niezależnych eksperymentów, w każdym po 3 niezależne transfekcje. (B) Całkowita ekspresja lucyferazy Gaussia w czasie 4 dni, obliczona jako suma aktywności lucyferazy we wszystkich czterech punktach czasowych. Wartości całkowitej ekspresji uzyskane dla modyfikowanych mRNA zostały znormalizowane do wartości odpowiadającej niemodyfikowanemu mRNA kontrolnemu. Dane przedstawione jako wartości średnie $\pm$ SD.

Badania ekspresji mRNA w komórkach linii HEK 293 skutkowały najbardziej zróżnicowanymi wynikami (Rys. 94). Aż 5 spośród 6 badanych mRNA zawierających modyfikację końca 3' ulegały ekspresji na poziomie zauważalnie wyższym od mRNA niemodyfikowanego (Rys. 94B). Najwyższą produkcję białka zaobserwowałam dla mRNA **A2** (260%), a w następnej kolejności dla mRNA **A1** (200%) i **G1** (220%). mRNA **A3** ulegało ekspresji na poziomie porównywalnym do kontroli. Wszystkie mRNA stosunkowo szybko ulegały degradacji w komórkach (Rys. 94A), a więc różnice w całkowitej produkcji białka wynikały przede wszystkim z poziomu ekspresji mRNA w ciągu pierwszych 40 godzin od transfekcji. Co ciekawe, mRNA **A2** ulegało degradacji zauważalnie wolniej od pozostałych transkryptów – aktywność lucyferazy w kolejnych punktach czasowych utrzymywała się na poziomie kilkakrotnie wyższym niż w przypadku pozostałych mRNA. Z kolei mRNA **G1** charakteryzował wysoki początkowy poziom ekspresji, który ulegał gwałtownemu spadkowi w kolejnych punktach czasowych.

15.3. Podsumowanie

Przeprowadziłam badania ekspresji syntetycznych mRNA chemo-enzymatycznie modyfikowanych na końcu 3' na drodze ligacji z 5'-monofosforanami dinukleotydów. Łącznie otrzymałam 6 modyfikowanych cząsteczek mRNA, podzielonych na dwie grupy ze względu na rodzaj chemicznie modyfikowanych nukleotydów przyłączanych do ich końca 3' – adeninowych i guaninowych. W obu grupach znalazły się cząsteczki zawierające 2'-O-metylację ostatniej podjednostki transkryptu (Tabela 2, **A1** i **G1**) oraz po dwa stereoizomery dinukleotydów posiadających dodatkowo wiązanie tiofosfodiesterowe łączące ostatnie dwie podjednostki (**A2** i **A3**, **G2** i **G3**).

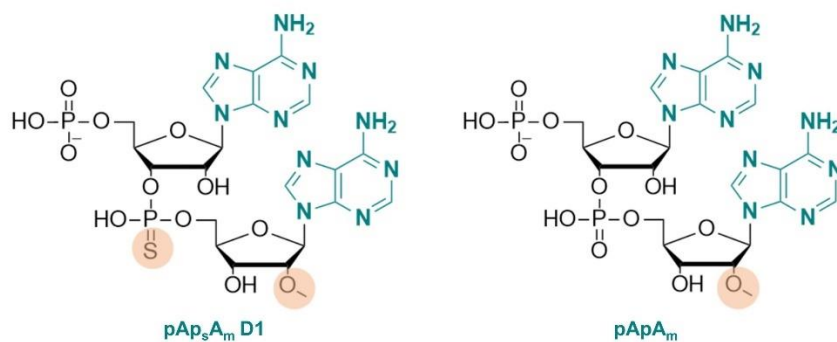
W pierwszej kolejności przeprowadziłam badania ekspresji w układzie lizatów retikulocytów króliczych (RRL). Mimo ograniczonej złożoności owego układu, dzięki tym

badaniom udało mi się uzyskać wstępne informacje dotyczące potencjału translacyjnego otrzymanych przeze mnie modyfikowanych mRNA. Przede wszystkim zauważyłam, że ich translacja utrzymuje się na poziomie zbliżonym do mRNA niemodyfikowanego. Ponieważ stabilność mRNA nie jest najistotniejszym czynnikiem w eksperymentach prowadzonych w układzie RRL, zadowalające wydajności translacji oznaczają najpewniej, że zastosowane modyfikacje końca 3' mRNA nie zaburzą oddziaływania z białkami maszynierii translacyjnej obecnej w lizatach. Należy zauważyć, że wydajność translacji żadnego z modyfikowanych mRNA nie wyróżniała się znacząco w porównaniu z mRNA kontrolnym.

Badania na liniach komórkowych dostarczyły znacznie więcej interesujących wniosków. Po pierwsze, zauważyłam wyraźne różnice między mRNA modyfikowanymi przy pomocy dinukleotydów adeninowych i guaninowych. mRNA z grupy G sumarycznie ulegały ekspresji mniej wydajnie, choć ilość produkowanego z nich białka utrzymywała się na poziomie zbliżonym do mRNA niemodyfikowanego (Rys. 91B, 92B, odpowiednio komórki linii A549, JAWS II) lub nieco wyższym (Rys. 93B, komórki linii HEK 293). Różnice w ekspresji poszczególnych mRNA z modyfikacjami guaninowymi były stosunkowo niewielkie. Można jednakże zauważyć, że mRNA **G1**, a więc zawierające tylko modyfikację G_m na końcu 3', ulegało ekspresji nieco wydajniej od mRNA modyfikowanych dodatkowo wiązaniem tiofosfodiesterowym (**G2**, **G3**). Z kolei mRNA z grupy A charakteryzowały się znacząco różnym poziomem ekspresji, co było zauważalne we wszystkich liniach komórkowych. mRNA **A3** ulegało ekspresji z najmniejszą wydajnością ze wszystkich trzech transkryptów. Ilość produkowanego z jego udziałem białka konsekwentnie utrzymywała się na poziomie niższym od mRNA niemodyfikowanego. Modyfikacja A_m obecna w mRNA **A1** przyczyniła się do jego znacząco zwiększonej ekspresji w liniach JAWS II (160%) oraz HEK 293 (200%), ale nie w linii A549. Z kolei mRNA **A2**, zawierające modyfikację A_m oraz wiązanie fosfodiesterowe (stereoizomer D1), ulegało ekspresji na poziomie 170% w komórkach A549 oraz 260% w komórkach HEK 293 względem mRNA niemodyfikowanego. W komórkach JAWS II jego ekspresja uległa nieznacznemu obniżeniu względem kontroli. Należy zaznaczyć, że występują znaczące różnice między wynikami ekspresji uzyskanymi w poszczególnych liniach komórkowych. Najpewniej wynikają one z różnic w mechanizmach translacji, metabolizmie mRNA oraz wydajności transfekcji charakterystycznych dla każdego typu komórek. Można więc zakładać, że eksperymenty przeprowadzone na komórkach innych linii, niż zastosowane przeze mnie w trakcie badań, potencjalnie dostarczyłyby nowych informacji.

Podwyższona ekspresja poszczególnych mRNA wynika prawdopodobnie z ich zwiększonej stabilności w warunkach komórkowych. Jednakże biorąc pod uwagę znaczące różnice w ekspresji mRNA zawierających modyfikacje, które powinny w podobnym stopniu zapewniać odporność na degradację enzymatyczną, należy rozważyć występowanie innych czynników wpływających na potencjał translacyjny. Dobrym przykładem są mRNA **A2** i **A3**, powstające w wyniku ligacji mRNA lucyferazy *Gaussiau* ze stereoizomerami D1 i D2 dinukleotydu pAp_sA_m . Tak niewielka różnica w strukturze końca 3' przyczyniła się do zauważalnych różnic w ekspresji. Obecność stereoizomeru D2 zaburza przynajmniej jeden z procesów biologicznych przebiegających w komórkach, a prowadzących do biosyntezy białek. Trudno wnioskować, czy obecność guanozyny na końcu 3' mRNA ma negatywny wpływ na potencjał translacyjny. Wszystkie transkrypty z grupy G ulegają ekspresji na poziomie porównywalnym do kontroli lub nieco wyższym, ale mniej wydajnie od mRNA z grupy A. Przykładowo, może to oznaczać, że ich zwiększona stabilność wynikająca z hamowania aktywności deadenylaz jest równoważona przez osłabione oddziaływania z białkami maszynierii translacyjnej. Jednakże nie jest to wniosek, który mogę z pewnością wyciągnąć na podstawie wyników przeprowadzonych badań.

Ostatecznie wytypowałam dwa rodzaje modyfikacji końca 3' mRNA, które przyczyniły się do znaczącego zwiększenia poziomu ekspresji syntetycznych transkryptów. Są to modyfikacje, które wprowadzałam poprzez enzymatyczną ligację 5'-monofosforanów dinukleotydów pApA_m oraz pAp_sA_m D1 do końca 3' mRNA lucyferazy *Gaussia* (odpowiednio mRNA A1 i A2) (Rys. 95). Obie modyfikacje przyczyniły się do zwiększenia ekspresji białka w dwóch z trzech linii komórkowych. Równocześnie w żadnej z linii nie skutkowały spadkiem ekspresji znacząco poniżej wartości odpowiadającej mRNA kontrolnemu. mRNA A2 jako jedyne ulegało zauważalnie zwiększonej ekspresji (170%) w komórkach linii A549 względem kontroli. Komórkach linii JAWS II mRNA A2 ulegało również wyraźnie wolniejszej degradacji, na co wskazuje stosunkowo powolny spadek aktywności lucyferazy *Gaussia* w kolejnych punktach czasowych względem innych typów mRNA. W komórkach dendrytycznych JAWS II mRNA A1 wyróżniało się poziomem ekspresji białka na tle pozostałych modyfikowanych transkryptów, podczas gdy ekspresja mRNA A2 znajdowała się na poziomie nieznacznie niższym od kontroli. Owe wyniki wskazują, że obie wytypowane przeze mnie modyfikacje końca 3' mogą być użyteczne w opracowaniu terapeutycznych mRNA o innym zastosowaniu i profilu działania.



Rysunek 95 Struktury chemiczne 5'-monofosforanów dinukleotydów pApA_m oraz pAp_sA_m D1.

Otrzymane przeze mnie chemicznie modyfikowane dinukleotydy umożliwiły zarówno zwiększenie stabilności mRNA, jak i poprawę ekspresji syntetycznych mRNA w liniach komórkowych. Są to niezwykle pożądane cechy w kontekście opracowywania cząsteczek mRNA o potencjale terapeutycznym. Wykazanie wszechstronnej skuteczności tego typu modyfikacji mRNA wymaga dalszych badań na liniach komórkowych i eksperymentów na organizmach modelowych. Cenniejszą wiedzę dostarczyć by mogły również badania czasów półtrwania mRNA w żywych komórkach. Mogą one przynieść dokładniejsze zrozumienie procesów degradacji i translacji modyfikowanych transkryptów, i przyczynić się do dalszej optymalizacji aktywności terapeutycznych mRNA.

IV. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metody modyfikacji końca 3' cząsteczek mRNA na potrzeby modulowania ich potencjału translacyjnego poprzez zwiększenie ich stabilności w warunkach komórkowych. Pierwszą część badań poświęciłam stworzeniu metody pozwalającej na badanie oddziaływania chemicznie modyfikowanych analogów ogona poli(A) ze specyficznym wiążącym go białkiem PABP. Metoda ta miała zostać narzędziem do selekcji modyfikacji chemicznych, najkorzystniejszych w kontekście modulowania aktywności translacyjnej mRNA poprzez celowanie w białko PABP. Wiedza zdobyta dzięki opracowanej metodzie została następnie wykorzystana do projektowania oligonukleotydowych inhibitorów translacji, jak również chemo-enzymatycznych metod manipulacji stabilnością i metabolizmem cząsteczek mRNA.

Projekt doktorski składał się z dwóch głównych części. Część pierwsza poświęcona była badaniom wpływu chemicznych modyfikacji oligonukleotydowych analogów ogona poli(A) na ich powinowactwo do PABP oraz stabilność enzymatyczną. Druga część pracy dotyczyła zastosowania najkorzystniejszych modyfikacji nukleotydowych w opracowaniu metody post-transkrypcyjnej modyfikacji końca 3' cząsteczek RNA, w tym reporterowego mRNA.

W pierwszej części projektu zrealizowałam następujące zadania:

- Synteza oligonukleotydowych analogów ogona poli(A)

W pierwszej kolejności zsyntezowałam dodekamerowy oligonukleotyd adenylowy, modyfikowany na końcu 5' linkerem alkinowym umożliwiającym znakowanie fluorescencyjne metodą CuAAC. Wykorzystując go jako substrat, otrzymałam 4 sondy fluorescencyjne, różniące się rodzajem znacznika. Zsyntezowałam również 28 analogów ogona poli(A), zawierających różnego typu modyfikacje chemiczne i strukturalne. Wszystkie oligonukleotydy scharakteryzowałam przy pomocy metody RP-HPLC, jak również wysokorozdzielczej spektrometrii mas.

- Badania oddziaływania analogów poli(A) z PABP

Wykorzystałam technikę termoforezy mikroskalowej do opracowania metody badania powinowactwa analogów ogona poli(A) do białka PABP¹⁻¹⁹⁰. Dzięki analizie pomiarów tworzenia się kompleksów molekularnych poli(A)-PABP wykonanych metodą MST, dokonałam wyboru optymalnej sondy fluorescencyjnej. Następnie przeprowadziłam serię eksperymentów wiązania kompetycyjnego z udziałem PABP¹⁻¹⁹⁰ w kompleksie z wybraną sondą oraz analogów poli(A). Podejście kompetycyjne umożliwiło mi opracowanie łatwej i powtarzalnej metody wyznaczania pozornych stałych dysocjacji kompleksów oligonukleotyd-PABP. Na podstawie wyników mogłam ocenić wpływ poszczególnych modyfikacji nukleotydowych na powinowactwo danego analogu poli(A) do PABP¹⁻¹⁹⁰, zarówno pod względem typu zastosowanej modyfikacji, jak i jej umiejscowienia w sekwencji oligonukleotydu.

- Badania stabilności enzymatycznej analogów poli(A)

W celu oceny odporności oligonukleotydowych analogów poli(A) na specyficzną degradację opracowałam i zastosowałam eksperymenty trawienia enzymatycznego z udziałem deadenylazy CNOT7. Zidentyfikowałam chemiczne modyfikacje, które odpowiednio umiejscowione w sekwencji oligonukleotydu zapewniały częściową lub całkowitą odporność na degradację enzymatyczną.

- Badania inhibicji translacji w lizatach retikulocytów króliczych

Dwa otrzymane i wyselekcjonowane przeze mnie do tego eksperymentu oligonukleotydowe analogi poli(A) zostały zbadane jako potencjalne inhibitory translacji w lizatach retikulocytów króliczych. Badania te dowiodły, że otrzymane przeze mnie związki są skutecznymi inhibitorami procesu translacji. Dodatkowo, badania te potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że zastosowanie mniejszej liczby chemicznych modyfikacji, ale za to strategicznie umiejscowionych w sekwencji oligonukleotydu poliadenylowego, skutkuje równocześnie wysoką stabilnością i silnym oddziaływaniem inhibitora z jego celem molekularnym – PABP. Badania nad addytywnością aktywności inhibitorowej wykazały, że otrzymane przede mnie związki mogą być potencjalnie stosowane w tandemie z innymi inhibitorami translacji o odmiennym mechanizmie działania, w celu manipulacji ekspresją białek. Eksperymenty translacyjne zostały wykonane przez dr. Mirosława Śmietańskiego

Druga część projektu, obejmująca pracę nad metodą chemo-enzymatycznej modyfikacji cząsteczek RNA obejmowała następujące punkty:

- Synteza chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów

Na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących wpływu chemicznych modyfikacji na powinowactwo do PABP oraz enzymatyczną stabilność oligonukleotydowych analogów poli(A), zaplanowałam syntezę związków umożliwiających post-transkrypcyjną modyfikację cząsteczek RNA. Opracowałam i zsyntezowałam dwie grupy 5'-monofosforanów dinukleotydów, różniących się rodzajem zasady azotowej (A lub G) oraz typem modyfikacji chemicznych. Łącznie otrzymałam 6 związków, po 3 dla każdego rodzaju zasady azotowej, zawierających modyfikacje w postaci 2'-O-metylacji drugiej podjednostki dinukleotydu i/lub wiązania tiofosfodiesterowego łączącego owe podjednostki.

- Chemo-enzymatyczne modyfikacje końca 3' oligonukleotydów RNA oraz mRNA

W celu wykorzystania zsyntezowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów do modyfikacji RNA, opracowałam i zoptymalizowałam metodę przyłączania ich na drodze ligacji enzymatycznej do końca 3' RNA. W pierwszej kolejności przeprowadziłam modyfikacje krótkich oligonukleotydów poliadenylowych. Za pomocą opracowanego już protokołu trawienia enzymatycznego przez CNOT7, potwierdziłam zwiększoną odporność produktów reakcji ligacji na specyficzną degradację. Następnie, po uprzedniej optymalizacji metody ligacji pod kątem czasu i temperatury reakcji, jak stosunku molowego substratów, otrzymałam modyfikowane na końcu 3' mRNA kodujące białko reporterowe lucyferazę *Gaussia*. Wykorzystując ponownie deadenylazę CNOT7, potwierdziłam przyłączenie modyfikowanych chemicznie dinukleotydów do końca 3' poliadenylowanych mRNA.

- Badania ekspresji modyfikowanych mRNA

Stosując dwuetapową procedurę zbadalam poziom ekspresji mRNA modyfikowanych chemo-enzymatycznie na końcu 3'. W pierwszej kolejności wykonałam eksperymenty wydajności translacji w układzie RRL. Potwierdziłam, że wszystkie modyfikowane mRNA ulegają translacji na poziomie zbliżonym lub wyższym od mRNA niemodyfikowanego. Następnie przeprowadziłam serię eksperymentów *in cellulo*. Do badań wybrałam trzy linie komórkowe (A549, JAWS II, HEK 293) o znacząco różnej morfologii, fizjologii i pochodzeniu. Porównując wyniki uzyskane w komórkach różnych linii, dla mRNA zawierających poszczególne modyfikacje chemiczne, udało mi się zidentyfikować modyfikacje końca 3' transkryptów o najkorzystniejszym wpływie na ich potencjał translacyjny. Są to bardzo interesujące i obiecujące wyniki ze względu na możliwość

zastosowania opracowanej przeze mnie metody do post-transkrypcyjnej modyfikacji wszelkiego rodzaju cząsteczek RNA, od krótkich oligonukleotydów, po w pełni funkcjonalne mRNA. Zwłaszcza w przypadku cząsteczek o potencjale terapeutycznym, w szczególności mRNA, zwiększona stabilność enzymatyczna jest bardzo pożądana. Przekłada się ona na dłuższe życie transkryptów w warunkach komórkowych, a w efekcie na ich zwiększoną skuteczność terapeutyczną.

Podsumowując, jednym z najważniejszych osiągnięć niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metody badania powinowactwa modyfikowanych oligonukleotydów poli(A) do specyficznie wiążącego ich białka PABP. Opracowana metoda badania oddziaływań z PABP umożliwiła pogłębienie wiedzy dotyczącej preferencji substratowych PABP, jak również wyselekcjonowanie skutecznych i nowatorskich inhibitorów translacji. Drugim istotnym rezultatem było opracowanie skutecznej i prostej metody post-transkrypcyjnej modyfikacji RNA. Umożliwiła ona otrzymanie mRNA o zwiększonej stabilności enzymatycznej i podniesionym potencjale translacyjnym. Planowane są dalsze badania *in vivo* w organizmach modelowych, mające na celu przetestowanie skuteczności owej metody w otrzymywaniu cząsteczek mRNA o poprawionych właściwościach terapeutycznych. Jeśli badania te potwierdzą potencjał opracowanych modyfikacji, wiedza zdobyta podczas realizacji tego projektu doktorskiego może mieć istotne znaczenie w projektowaniu skuteczniejszych terapeutyków opartych na mRNA, do zastosowań w terapiach genowych, w produkcji terapeutycznych przeciwciał *in vivo* oraz prewencyjnych szczepionek przeciwko chorobom wirusowym lub terapeutycznym szczepionek przeciwnowotworowych.

V. Część eksperymentalna

16. Synteza oligonukleotydów

16.1. Informacje ogólne

Wszystkie odczynniki użyte do syntezy zakupione zostały w firmach Sigma-Aldrich (odczynniki chemiczne), LinkTech/Biosearch Technologies (amidofosforyny nukleotydów, podłoża obsadzone amidofosforynami modyfikowanych nukleotydów), ChemGenes (podłoża obsadzone amidofosforynami naturalnych nukleotydów), Lumiprobe (azydki barwników fluorescencyjnych). W eksperymentach używana była filtrowana woda miliQ. Bufory do HPLC były przygotowywane z użyciem acetonitrylu lub metanolu HPLC Gradient Grade for LC-MS. Do przygotowania buforów octanu amonu użyto stałego octanu amonu oraz 50% kwasu octowego. Do przygotowania buforów octanu trietyloaminy użyto trietyloaminy oraz bezwodnego kwasu octowego. Bufory były następnie odgazowywane i przefiltrowane poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem. Bufory zawierające acetonitryl oraz metanol przechowywane były w temperaturze pokojowej, natomiast bufory będące roztworami bez dodatku rozpuszczalnika organicznego przechowywane były w temperaturze 4 °C.

Analizę RP-HPLC prowadzono na urządzeniu Agilent Tech Series 1200 z użyciem kolumny Gemini 3 μ m NX-C18 110Å LC (150 x 4.6 mm przepływ 1 ml/min) z zastosowaniem różnych gradientów liniowych metanolu w 0,05 M buforze octanu amonu (pH 5.9). Detekcję absorpcji wykonywano przy długości fali 260 nm, a fluorescencji przy długości fali 360 nm lub w maksimum emisji znacznika fluorescencyjnego. Semi-preparatywne RP-HPLC przeprowadzano na tym samym aparacie, wyposażonym w kolumnę Clarity Oligo-RP C-18 (150 x 10 mm, przepływ 5 mL/min) z zastosowaniem różnych gradientów liniowych acetonitrylu w 0,1 M buforze octanu trietyloaminy (pH 7.0). Detekcję absorpcji wykonywano przy 260 nm fluorescencji przy maksimum emisji znacznika.

Metoda	Eluent A	Eluent B	Gradient eluentu B	Kolumna
A	0.05 M bufor octanu amonu (pH 5.9)	MeOH	50% 0-15 min	Gemini NX-C18
B	0.05 M bufor octanu amonu (pH 5.9)	MeOH	50% 0-7.5 min	Gemini 3 NX-C18
C	0.1 M bufor octanu trietyloaminy (pH 7.0)	ACN	25% 0-45 min	Oligo-RP C-18
D	0.1 M bufor octanu trietyloaminy (pH 7.0)	ACN	25% 0-60 min	Oligo-RP C-18

Strukturę i czystość produktów ostatecznych potwierdzano z użyciem RP-HPLC oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas HR MS (ESI⁻). Produkty pośrednie charakteryzowano przy pomocy niskorozdzielczej MS (ESI⁻). Widma masowe wysokiej rozdzielczości rejestrowano na spektrometrze Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos, a niskiej rozdzielczości na spektrometrze Sciex QTRAP 3200.

16.2. Synteza w fazie stałej

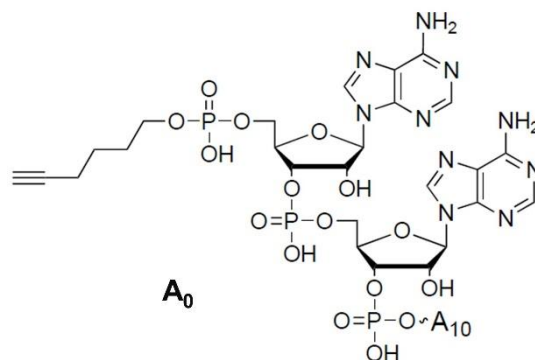
Syntezy oligonukleotydów w fazie stałej wykonane zostały na aparacie AKTA Oligopilot plus 10 (GE Healthcare) z użyciem kolumny PrimerSupport™ wypełnionej podłożem stałym zawieszonym w bezwodnym acetonitrylu. W procesie sprzęgania roztwór acetonitrylu

zawierający 5-krotny nadmiar molowy amidofosforynu względem obsadzenia złoza poddawany był recyrkulacji przez kolumnę przez 15 minut. Sulfuryzację grupy fosforanowej wybranych podjednostek prowadzono w 0.05M roztworze EDITH (3-etoksy-1,2,4,-ditiiazolidyn-5-on) w acetonitrylu. 3% roztwór (v/v) kwasu dichlorooctowego w toluenie używany był w procesie detrytylacji, 0.05M roztwór jodu w pirydynie w procesie utleniania, 20% roztwór (v/v) 1-metyloimidazolu w acetonitrylu używany był jako CapA i 40% (v/v) roztwór bezwodnika octowego oraz 40% (v/v) pirydyny jako CapB. Po ostatnim cyklu syntezy oligonukleotydy przyłączone do złoza przemywano 20% (v/v) roztworem dietyloaminy w acetonitrylu w celu usunięcia 2-cyanoetylowych grup zabezpieczających. Na koniec złoza przemywane były bezwodnym acetonitrylem i suszone argonem.

Wszystkie oligonukleotydy były odcinane od złoza, z równoczesnym usunięciem grup zabezpieczających zasady azotowe, przy pomocy roztworu v1:1 amoniaku (30%) i metyloaminy (40%). Po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 50°C przy równoczesnym wytrząsaniu (350 rpm) roztwór był filtrowany przez sącze strzykawkowy w celu usunięcia cząsteczek złoza. Złoże przemyto dwukrotnie wodą w celu wymycia produktów syntezy. Nadmiar amoniaku usuwano z roztworu poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem. Roztwór następnie suszono poprzez liofilizację. Grupa zabezpieczająca 2'-O-TBDMS usuwana była przez rozpuszczenie oligonukleotydów w DMSO z dodatkiem trihydrofluorku trietyloaminy i inkubację w temperaturze 65°C przez 3 godziny. Następnie dodawano 3M roztwór octanu sodowego oraz 1-butanol i mieszaninę chłodzono w temperaturze -18°C przez 30 minut. Osad w postaci soli sodowej oligonukleotydu był następnie odwirowywany, przemywany 70% roztworem etanolu i po ponownym odwirowaniu osuszany przez liofilizację. Finalnie oligonukleotydy oczyszczano metodą RP-HPLC i wydzielano w postaci soli trietyloamoniowych. Oligonukleotydy syntezowane na podłożach zawierających amidofosforyny niemodyfikowanych nukleotydów przygotowano w skali 10 µM, a na podłożach z modyfikowanymi chemicznie nukleotydami w skali 5 µM.

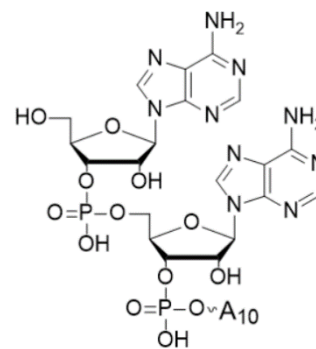
16.2.1. Synteza 5'-HEX-A₁₂ (A₀)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 µmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 µmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Amidofosforyn 5-Hexyn-1-yl-(2-cyanoetyl)-(N,N-diizopropyl) (29,8 mg, 100 µmol) również rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (0,2 M). Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 14 mg (3,5 µmol) związku A₀ w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 35%.



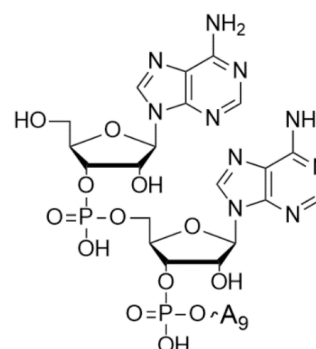
16.2.2. Synteza **A₁₂**

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 20 mg (5,2 μ mol) związku **A₁₂** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 52%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1942,83606, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₇₀P₁₁²⁻ 1942,835. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 5,8 min.



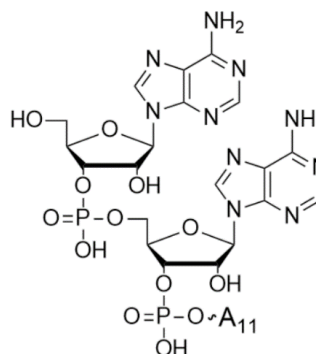
16.2.3. Synteza **A₁₁**

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 18 mg (5,0 μ mol) związku **A₁₁** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 50%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1778,38064, obliczone dla C₁₁₀H₁₃₂N₅₅O₆₄P₁₀²⁻ 1778,30585. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6 min.



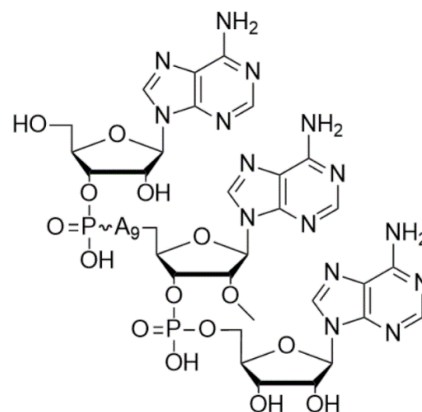
16.2.4. Synteza **A₁₃**

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (691 mg, 700 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 17,7 mg (4,2 μ mol) związku **A₁₃** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 42%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 2107,36092, obliczone dla C₁₃₀H₁₅₆N₆₅O₇₆P₁₂²⁻ 2107,36155. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



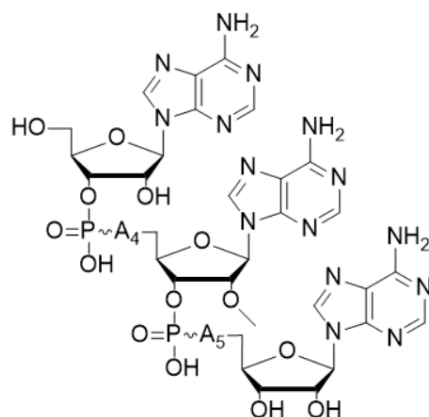
16.2.5. Synteza $A_{10}A_mA$ (A_m1)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-OMe-Bz-A-CEP (89 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 17,5 mg (4,5 μ mol) związku A_m1 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 45%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,84402, obliczone dla $C_{121}H_{146}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 1949,8431. Czas retencji metodą RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,2 min.



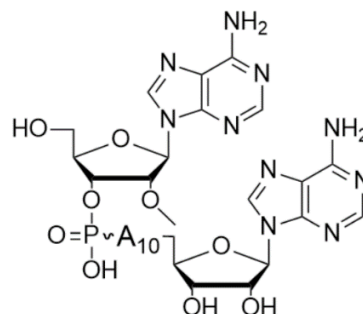
16.2.6. Synteza $A_5A_mA_6$ (A_m2)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-OMe-Bz-A-CEP (89 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 26 mg (6,6 μ mol) związku A_m2 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 66%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,84626, obliczone dla $C_{121}H_{146}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



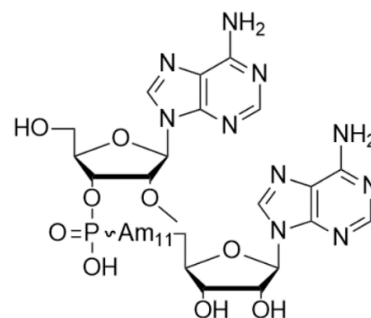
16.2.7. Synteza A_mA_{11} (A_m3)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-OMe-Bz-A-CEP (89 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 23 mg (6,0 μ mol) związku A_m3 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 60%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,84571, obliczone dla $C_{121}H_{146}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,3 min.



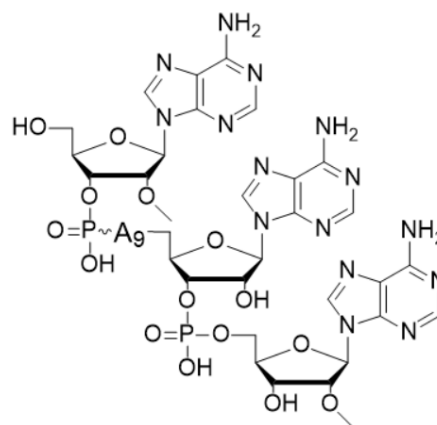
16.2.8. Synteza $A_{m11}A$ (**A_{m4}**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (99 mg, 100 μ mol) oraz 2'-OMe-Bz-A-CEP (533 mg, 600 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 16 mg (4,0 μ mol) związku **A_{m4}** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 40%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 2019,91874, obliczone dla $C_{131}H_{166}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 2019,92135. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 8,3 min.



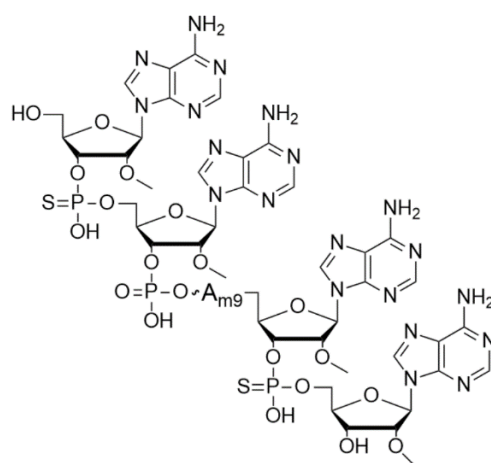
16.2.9. Synteza $A_m A_{10} A_m$ (**A_{m5}**)

Podłoże stałe 2'-OAc CNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (271 mg, 300 μ mol) oraz 2'-OMe-Bz-A-CEP (65 mg, 75 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 12,5 mg (3,2 μ mol) związku **A_{m5}** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 32%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1956,85356, obliczone dla $C_{122}H_{148}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 1956,8509. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,3 min.



16.2.10. Synteza $A_{mps} A_{m10} A_{ps} A_m$ (**A_{m6}**)

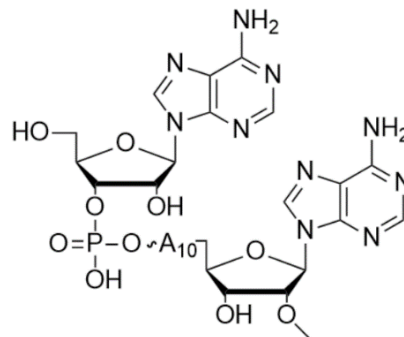
Podłoże stałe 2'-OAc CNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn 2'-OMe-Bz-A-CEP (290 mg, 350 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0.2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda D). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 5,7 mg (1,4 μ mol) związku **A_{m6}** w postaci białego proszku. Wydajność



po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 28%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 2042,90910, obliczone dla C₁₃₂H₁₆₈N₆₀O₆₈P₁₁S₂²⁻ 2042,90635. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 8,9 min.

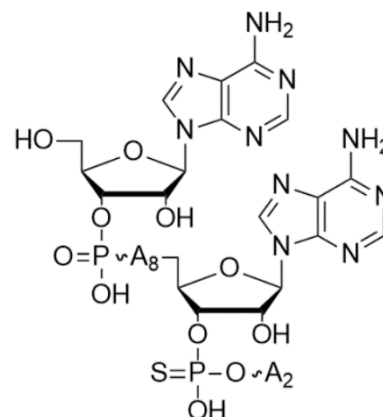
16.2.11. Synteza A₁₁A_m (A_m7)

Podłoże 2'-OAc CNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (280 mg, 350 μmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 7,8 mg (2,0 μmol) związku A_m7 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 40%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,84759, obliczone dla C₁₂₁H₁₄₆N₆₀O₇₀P₁₁²⁻ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



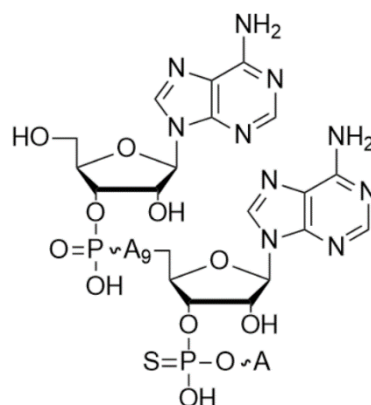
16.2.12. Synteza A₉A_pA₂ D1/D2 (A_p1/A_p2)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0.05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 8 mg (2,2 μmol) związku A_p1 oraz 17 mg (4,4 μmol) związku A_p2 w postaci białego proszku. Całkowita wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 66%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: dla A_p1 1950,82771, dla A_p2 1950,82541, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₆₉P₁₁S²⁻ 1950,82385. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla A_p1 to t_R = 5,9 min, dla A_p2 t_R = 6,2 min.



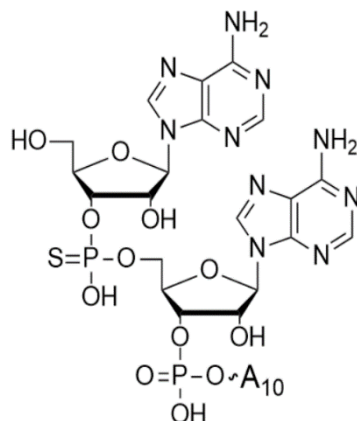
16.2.13. Synteza $A_{10}Ap_sA$ D1/D2 (**Ap_s3**/**Ap_s4**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 7,8 mg (2 μ mol) związku **Ap_s3** oraz 16 mg (4,2 μ mol) związku **Ap_s4** w postaci białego proszku. Całkowita wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 62%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: dla **Ap_s3** 1950,82905, dla **Ap_s4** 1950,82675, obliczone dla $C_{120}H_{144}N_{60}O_{69}P_{11}S^2-$ 1950,82385. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla **Ap_s1** to t_R = 5,9 min, dla **Ap_s2** t_R = 6,1 min.



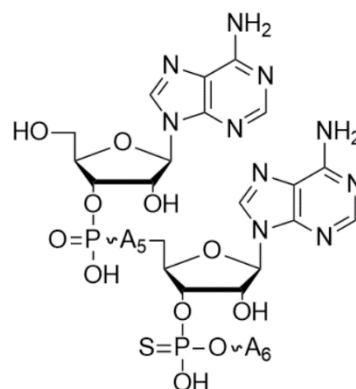
16.2.14. Synteza Ap_sA_{11} D1/D2 (**Ap_s5**/**Ap_s6**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 7 mg (1,8 μ mol) związku **Ap_s5** oraz 14 mg (3,5 μ mol) związku **Ap_s6** w postaci białego proszku. Całkowita wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 55%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: dla **Ap_s5** 1950,82205, dla **Ap_s6** 1950,83730, obliczone dla $C_{120}H_{144}N_{60}O_{69}P_{11}S^2-$ 1950,82385. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla **Ap_s1** to t_R = 5,9 min, dla **Ap_s2** t_R = 6,1 min.



16.2.15. Synteza $A_5p_sA_6$ D1/D2 (**Ap_s7**/**Ap_s8**)

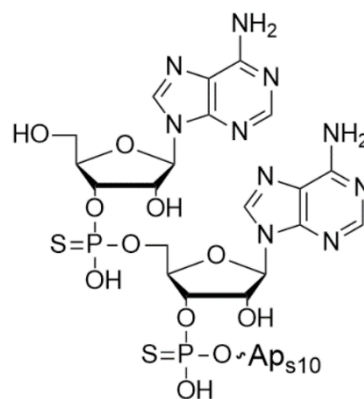
Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C).



Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 8 mg (2,1 μmol) związku **Ap_s7** oraz 17,5 mg (4,5 μmol) związku **Ap_s8** w postaci białego proszku. Całkowita wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 65%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: dla **Ap_s7** 1950,82580, dla **Ap_s8** 1950,82832, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₆₉P₁₁S²⁻ 1950,82385. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla **Ap_s7** to t_R = 5,9 min, dla **Ap_s8** t_R = 6,1 min.

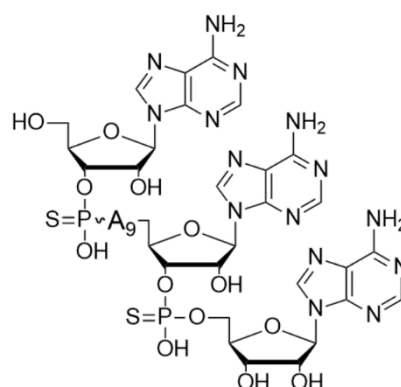
16.2.16. Synteza Ap_{s11}A (**Ap_s9**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 27 mg (7,0 μmol) związku **Ap_s9**. Całkowita wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 70%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 2030,70885, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₅₉P₁₁S₁₁²⁻ 2030,70965. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda B) to t_R = 6,5-7,1 min.



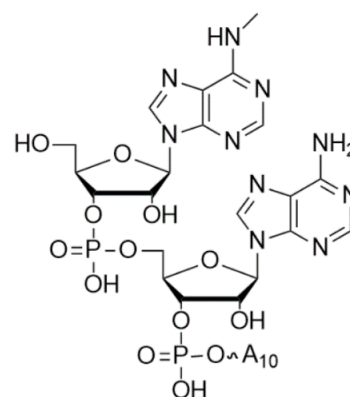
16.2.17. Synteza Ap_sA₉Ap_sA (**Ap_s10**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyn rA (Bz) CE (642 mg, 650 μmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworu o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grup fosforanowych prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 22 mg (5,6 μmol) związku **Ap_s10**. Całkowita wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 56%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-3H$)³⁻: 1305,54079, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₃N₆₀O₆₈P₁₁S₂³⁻ 1305,54163. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,2; 6,5 min.



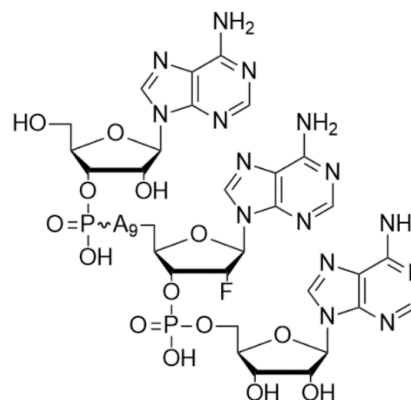
16.2.18. Synteza m^6A-A_{11} (m^6A3)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz N6-Methyl-A-CE (103 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 27,3 mg (7,0 μ mol) związku m^6A3 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 70%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1949,84592, obliczone dla $C_{121}H_{146}N_{60}O_{70}P_{11}^{2-}$ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



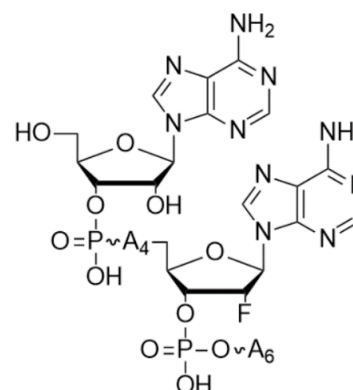
16.2.19. Synteza $A_{10}A_{FA}$ (A_F1)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-F-Ac-C-CE (79 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 23,7 mg (6,1 μ mol) związku A_F1 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 61%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1943,83345, obliczone dla $C_{120}H_{144}FN_{60}O_{69}P_{11}^{2-}$ 1943,8331. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



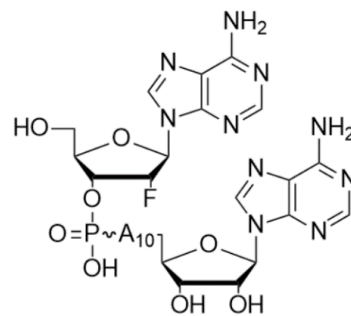
16.2.20. Synteza $A_5A_{FA_6}$ (A_F2)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-F-Ac-C-CE (79 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 22,5 mg (6 μ mol) związku A_F2 w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 60%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z ($M-2H$)²⁻: 1943,86763, obliczone dla $C_{120}H_{144}FN_{60}O_{69}P_{11}^{2-}$ 1943,8331. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



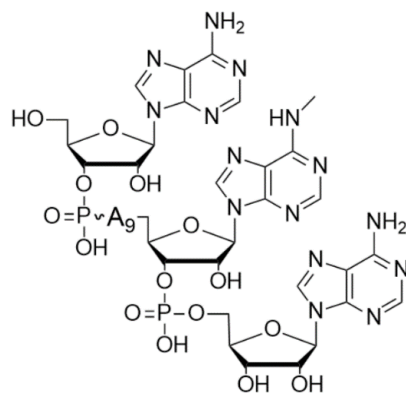
16.2.21. Synteza A_{FA11} (**A_F3**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz 2'-F-Ac-C-CE (79 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 26 mg (6,8 μ mol) związku **A_F3** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu metodą RP-HPLC wyniosła 68%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1943,83440, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄FN₆₀O₆₉P₁₁²⁻ 1943,8331. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,2 min.



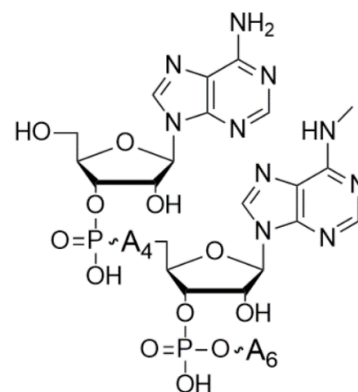
16.2.22. Synteza $A_{10}m^6AA$ (**m⁶A1**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz N6-Methyl-A-CE (103 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 27,3 mg (7,0 μ mol) związku **m⁶A1** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 70%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,83413, obliczone dla C₁₂₁H₁₄₆N₆₀O₇₀P₁₁²⁻ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



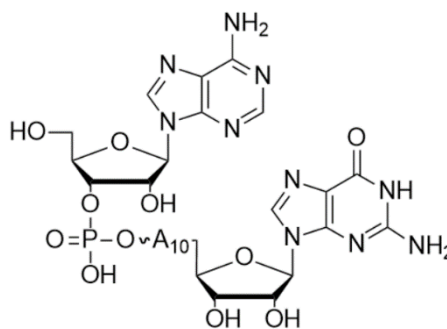
16.2.23. Synteza $A_5m^6AA_6$ (**m⁶A2**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz N6-Methyl-A-CE (103 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 27,3 mg (7,0 μ mol) związku **m⁶A2** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 70%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1949,85073, obliczone dla C₁₂₁H₁₄₆N₆₀O₇₀P₁₁²⁻ 1949,8431. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



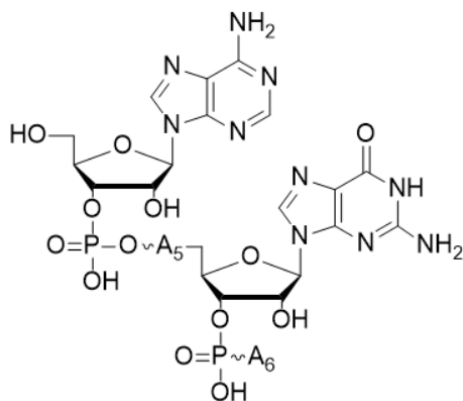
16.2.24. Synteza A₁₁G (**G1**)

Podłoże stałe Ribo G300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz Ac-G-CE (94 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0.2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 17,5 mg (4,5 μ mol) związku **G1** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 45%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1950,83427, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₇₁P₁₁²⁻ 1950,83275. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 5,8 min.



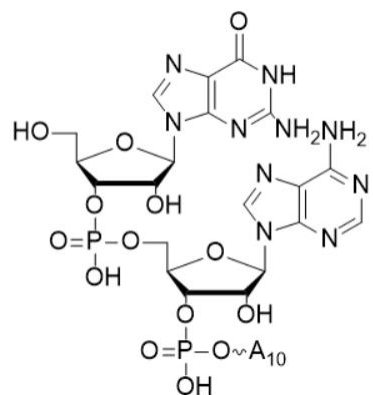
16.2.25. Synteza A₅GA₆ (**G2**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz Ac-G-CE (94 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 20,5 mg (5,3 μ mol) związku **G2** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 53%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1950,83427, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₇₁P₁₁²⁻ 1950,83311. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 5,9 min.



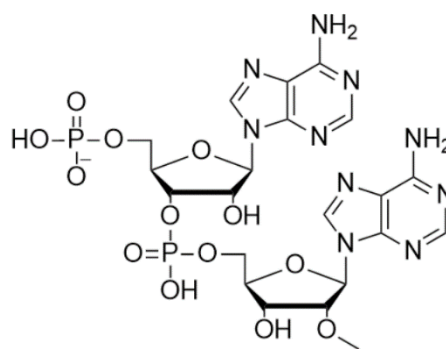
16.2.26. Synteza GA₁₁ (**G3**)

Podłoże stałe Ribo A300 CPG 1000/110 (34 mg, 10 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (592 mg, 600 μ mol) oraz Ac-G-CE (94 mg, 100 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 23 mg (5,9 μ mol) związku **G3** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 59%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 1950,82762, obliczone dla C₁₂₀H₁₄₄N₆₀O₇₁P₁₁²⁻ 1950,83311. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 6,1 min.



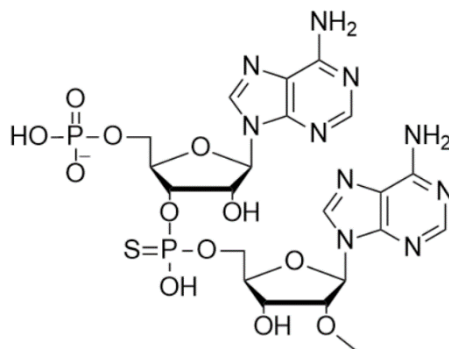
16.2.27. Synteza **pApA_m**

Podłoże stałe 2'-OAc CNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (74 mg, 75 μ mol) oraz Bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl (21 mg, 75 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda D). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,1 mg (3,0 μ mol) związku **pApA_m** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 60%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-H)⁻: 689,12535, obliczone dla C₂₁H₂₇N₁₀O₁₃P₂⁻ 689,1240. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 8 min.



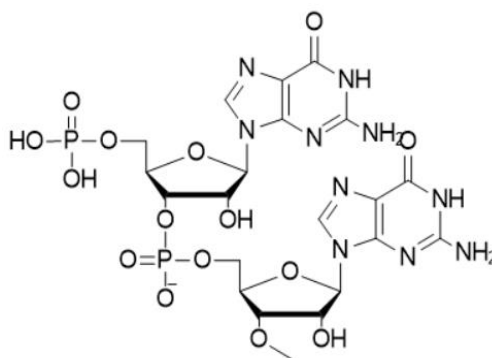
16.2.28. Synteza **pAp_sA_m D1/D2**

Podłoże stałe 2'-OAc CNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny rA (Bz) CE (74 mg, 75 μ mol) oraz Bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl (21 mg, 75 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grupy fosforanowej prowadzono poprzez recyrkulację 0,05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda D). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,1 mg (1,5 μ mol) związku **pApA_m D1** oraz 1,4 mg (2,0 μ mol) związku **pApA_m D2** w postaci białego proszku. Wydajność całkowita po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 70%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-H)⁻: dla **pApA_m D1** 705,10189, dla **pApA_m D2** 705,10226 obliczone dla C₂₁H₂₇N₁₀O₁₂P₂S⁻ 705,1011. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla **pApA_m D1** to t_R = 8,9 min, dla **pApA_m D2** t_R = 9,5 min.



16.2.29. Synteza **pGpG_m**

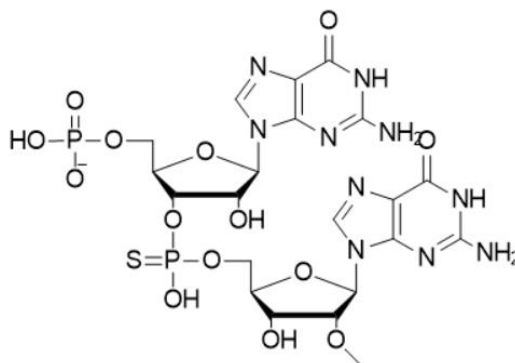
Podłoże stałe 2'OMe-G (dmf) RNA CPG 1000/110 (167 mg, 5 μ mol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny Ac-G-CE (70 mg, 75 μ mol) oraz Bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl (21 mg, 75 μ mol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda D). Zebrany eluat został kilkakrotnie



zliofilizowany. Otrzymano 1,6 mg (2,2 μmol) związku **pGpG_m** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 44%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-H)⁻, obliczone dla C₂₁H₂₇N₁₀O₁₅P₂⁻ 721,1138. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) to t_R = 8 min.

16.2.30. Synteza **pGp_sG_m D1/D2**

Podłoże stałe 2'OMe-G (dmf) RNA CPG 1000/110 (176 mg, 5 μmol) umieszczono w kolumnie do syntezy i zawieszano w acetonitrylu. Amidofosforyny Ac-G-CE (70 mg, 75 μmol) oraz Bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl (21 mg, 75 μmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu w celu uzyskania roztworów o stężeniu 0,2 M. Syntezę, odcinanie od złoza i oczyszczanie oligonukleotydu prowadzono zgodnie z procedurą ogólną. Sulfuryzację grupy fosforanowej prowadzono poprzez recyrkulację 0.05 M roztworu EDITH przez kolumnę w czasie 10 minut. Odbezpieczony oligonukleotyd oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (metoda D). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,7 mg (0,9 μmol) związku **pGpG_m D1** oraz 0,9 mg (1,2 μmol) związku **pGpG_m D2** w postaci białego proszku. Wydajność całkowita po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 31%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-H)⁻: dla **pGpG_m D1** 737,09273, dla **pGpG_m D2** 737,09284 obliczone dla C₂₁H₂₇N₁₀O₁₂P₂S⁻ 737,0909. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda A) dla **pGpG_m D1** to t_R = 7,5 min, dla **pGpG_m D2** t_R = 7,7 min.

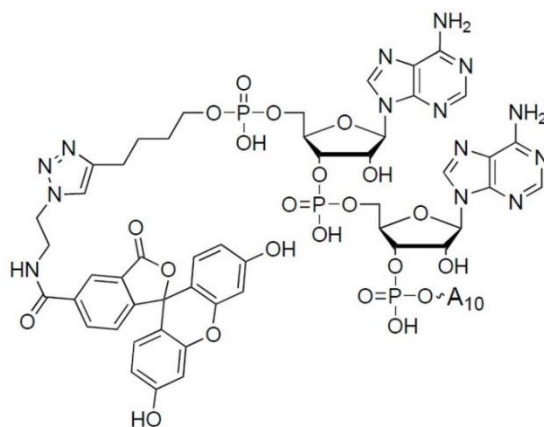


16.3. Synteza oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych

Wszystkie sondy fluorescencyjne przygotowane zostały według jednego ogólnego protokołu z wykorzystaniem metody cykloaddykcji alkinowo-azydkowej katalizowanej jonami miedzi (I) (CuAAC). 5'-Hex-A₁₂ rozpuszczany był w mieszaninie wody i DMSO. Następnie dodawano wodny roztwór CuSO₄ (0.4 eq.) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (4 eq.) oraz 1.5 eq. barwnika fluorescencyjnego w formie roztworu w DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przy ciągłym mieszaniu do momentu pełnej konwersji głównego substratu 5'-Hex-A₁₂ do oczekiwanego produktu. Produkty syntezy oczyszczano na RP-HPLC (metoda D). Fluorescencyjne związki kilkakrotnie liofilizowano unikając ich nadmiernej ekspozycji na światło. Ewaluację głównej sondy wykorzystanej w badaniach biofizycznych (5'-FAM-A₁₂) wykonano przy pomocy RP-HPLC oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas.

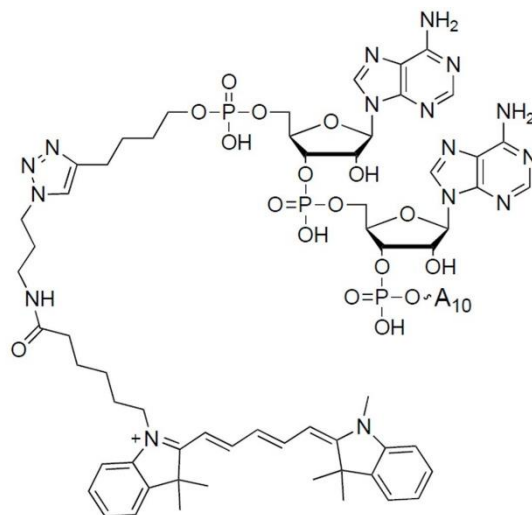
16.3.1. Synteza 5'-FAM-A₁₂ (A₀-1)

5'-Hex-A₁₂ (A₀; 1 mg, 0,23 μmol) rozpuszczono w 4,5 μl H₂O i 5 μl DMSO. Dodano 1 μl wodnego roztworu CuSO₄ o stężeniu 94 mM (0,094 μmol), 1 μl wodnego roztworu askorbinianu sodu o stężeniu 0,94 M (0,94 μmol) oraz 3,52 μl roztworu 5-FAM w DMSO o stężeniu 100 mM (0,35 μmol). Po około 3 godzinach zaobserwowano pełną konwersję substratu do produktu A₀-1. Produkt oczyszczono przy pomocy semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,8 mg (0,178 μmol) związku A₀-1 w postaci żółtego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 76%. HR MS (-) ESI zmierzone m/z (M-2H)²⁻: 2244,89608, obliczone dla C₁₄₉H₁₆₉N₆₄O₇₉P₁₂²⁻ 2244,90326. Czas retencji na RP-HPLC analitycznym (metoda B) to t_R = 6,3 min.



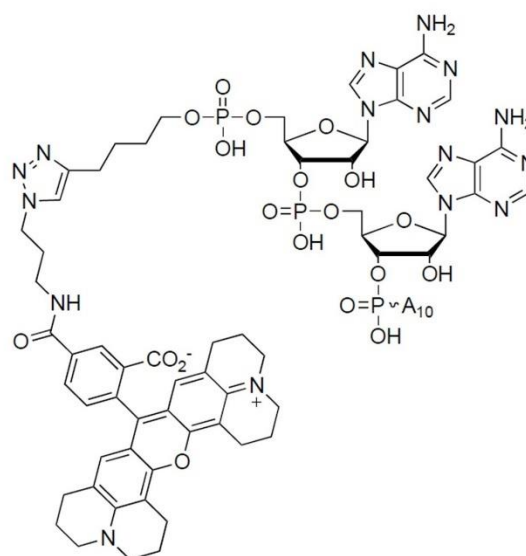
16.3.2. Synteza 5'-Cy5-A₁₂ (A₀-2)

5'-Hex-A₁₂ (A₀; 1 mg, 0,23 μmol) rozpuszczono w 4,5 μl H₂O i 5 μl DMSO. Dodano 1 μl wodnego roztworu CuSO₄ o stężeniu 94 mM (0,094 μmol), 1 μl wodnego roztworu askorbinianu sodu o stężeniu 0,94 M (0,94 μmol) oraz 3,52 μl roztworu Cy5 w DMSO o stężeniu 100 mM (0,35 μmol). Po 1 godzinie zaobserwowano pełną konwersję substratu do produktu A₀-2. Produkt oczyszczono przy pomocy semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,67 mg (0,145 μmol) związku A₀-2 w postaci granatowego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 63%.



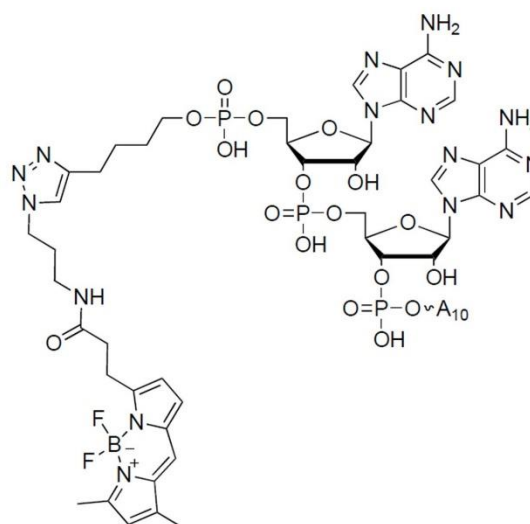
16.3.3. Synteza 5'-ROX-A₁₂ (A₀-3)

5'-Hex-A₁₂ (A₀; 1 mg, 0,23 μmol) rozpuszczono w 4,5 μl H₂O i 5 μl DMSO. Dodano 1 μl wodnego roztworu CuSO₄ o stężeniu 94 mM (0,094 μmol), 1 μl wodnego roztworu askorbinianu sodu o stężeniu 0,94 M (0,94 μmol) oraz 3,52 μl roztworu ROX w DMSO o stężeniu 100 mM (0,35 μmol). Po 1 godzinie zaobserwowano pełną konwersję substratu do produktu A₀-3. Produkt oczyszczono przy pomocy semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,56 mg (0,121 μmol) związku A₀-3 w postaci różowego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 53%.



16.3.4. Synteza 5'-BDP-FL-A₁₂ (A₀-4)

5'-Hex-A₁₂ (A₀; 1 mg, 0,23 μmol) rozpuszczono w 4,5 μl H₂O i 5 μl DMSO. Dodano 1 μl wodnego roztworu CuSO₄ o stężeniu 94 mM (0,094 μmol), 1 μl wodnego roztworu askorbinianu sodu o stężeniu 0,94 M (0,94 μmol) oraz 3,52 μl roztworu BDP-FL w DMSO o stężeniu 100 mM (0,35 μmol). Po 1 godzinie zaobserwowano pełną konwersję substratu do produktu A₀-4. Produkt oczyszczono przy pomocy semi-preparatywnego RP HPLC (metoda C). Zebrany eluat został kilkakrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,78 mg (0,177 μmol) związku A₀-4 w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność po oczyszczaniu na RP-HPLC wyniosła 77%.



17. Materiały biologiczne

17.1. PABP¹⁻¹⁹⁰

Białko PABP¹⁻¹⁹⁰ stosowane w badaniach zostało otrzymane oraz oczyszczone przez dr. Mirosława Śmietańskiego w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Sekwencja kodująca N-końcowy region ludzkiego białka PABP1 (Gene ID: 26986) zawierająca motywy RRM1 i RRM2 (PABP¹⁻¹⁹⁰) została amplifikowana z plazmidu pET11_PABP1. Amplifikowana sekwencja była następnie subklonowana przy użyciu podejścia SLIC do wektora ekspresyjnego pochodzącego z pET28 linearyzowanego enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI. Białko fuzyjne poddano nadekspresji w szczepie *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL (Stratagene) w podłożu LB uzupełnionym kanamycyną (50 µg/mL) i chloramfenikolem (32 µg/mL). Ekspresję 6×His-SUMO-PABP¹⁻¹⁹⁰ indukowano za pomocą 1 mM IPTG przy gęstości optycznej (OD₆₀₀) wynoszącej ~0,6. Komórki hodowano przez kolejne 16 godzin w temperaturze 18°C, odwirowywano przy 5000 × g w temperaturze 4 °C przez 15 minut i przechowywano w temperaturze -20°C. W celu oczyszczenia komórki z 250 mL hodowli rozmrażano, zawieszano w 30 mL buforu do lizy (100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 10% glicerolu, 5 mM β-merkaptioetanolu i 10 mM imidazolu) uzupełnionego inhibitorami proteaz (aprotyniną, leupeptyną, pepstatyną i PMSF) oraz lizozymem (1 mg/mL) i inkubowano na lodzie przez 30 min. Po zwiększeniu stężenia NaCl w roztworze lizującym do 500 mM, komórki inkubowano w lodzie przez 15 min i rozbijano za pomocą sonikacji. Ekstrakt komórkowy klarowano przez wirowanie przy 15000 rpm w 4 °C i filtrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych z membraną PVDF 0,45 µm. Sklarowane lizaty były ładowane na 5 mL kolumnę HisTrap FF (GE Healthcare) wypełnioną buforem zawierającym 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 % glicerolu, 5 mM β-merkaptioetanolu i 10 mM imidazolu. Białko 6×His-SUMO-PABP¹⁻¹⁹⁰ eluowano przy użyciu buforu uzupełnionego 300 mM imidazolem. Aby usunąć N-końcowy tag 6×His-SUMO, do 10 mL eluowanego białka 6×His-SUMO-PABP¹⁻¹⁹⁰ dodano 5 µL proteazy His6_Ulp1 Sumo (MCLAB). Mieszaninę dializowano przez noc w 4°C w buforze zawierającym 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 5% glicerolu, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT i 10 mM imidazolu. Po przefiltrowaniu przy użyciu membrany PVDF 0,45 µm, mieszaninę załadowano na kolumnę HisTrap FF (GE Healthcare) o objętości 5 mL, wypełnioną buforem dializacyjnym. Frakcja przepływowa zawierająca PABP¹⁻¹⁹⁰ była filtrowana, zatężana przy użyciu kolumnienki do filtracji Amicon Ultra-15 (Millipore) i następnie wprowadzana na kolumnę do filtracji żelowej Hi Load 26/600 Superdex 75 (GE Healthcare), wypełnioną buforem zawierającym 100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 5% glicerolu, 0,5 mM EDTA i 0,5 mM DTT. Białka zebrane po filtracji żelowej analizowano przy użyciu 12% PAGE, a wybrane frakcje zatężano przy użyciu kolumnienki filtracyjnej Amicon Ultra-4 10 kDa MWCO (Millipore) do 2,26 mg/mL (105 µM), porcjowano, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80 °C. Końcowy stosunek A_{260/280} wynoszący ~0,6 potwierdził, że białko PABP¹⁻¹⁹⁰ nie było zanieczyszczone RNA.

17.2. CNOT7

Enzym CNOT7 stosowany w badaniach został otrzymany oraz oczyszczony przez dr. Mariusza Czarnockiego-Cieciurę w Laboratorium Struktury Białka, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej. Region cDNA kodujący pełną długość ludzkiej deadenylazy CNOT7 subklonowano do wektora ekspresyjnego pET51b z N-końcowym znacznikiem StrepTAGII-HA i C-końcowym 10xHIS. Białko fuzyjne poddano ekspresji w szczepie *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL (Stratagene) w pożywce Super Broth Auto Induction Media (Formedium, Norfolk, UK) uzupełnioną ampicyliną (50 µg/mL) przez 48 h w 18°C. Komórki odwirowywano przy 4000 × g w 4°C przez 15 min i przechowywano w -20°C. Do oczyszczania

komórki z 2 L hodowli (60 g) rozmrażano, zawieszano ponownie w 180 ml buforu lizującego (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM imidazolu, 10 mM β -merkaptoetanolu, 300 mM mocznika, 50 mM argininy, 50 mM kwasu glutaminowego) uzupełnionego inhibitorami proteaz (PMSF, pepstatyna A, chymostatyna, leupeptyna, benzamidyna) oraz lizozymem (0,25 mg/mL) i rozrabiano za pomocą homogenizatora wysokociśnieniowego EmulsiFlex-C3 (Avestin Europe GmbH, Mannheim, Niemcy). Ekstrakt komórkowy sklarowano przez ultrawiórowanie przy 140 000 x g w 4 °C przez 45 min i rekombinowane białko CNOT7 oczyszczono automatycznie przy użyciu systemu ÄKTAexpress FPLC (GE Healthcare). Do automatycznego oczyszczania zastosowano następujący protokół: (1) chromatografia powinowactwa niklu (bufor: 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 10 mM β -merkaptoetanolu, 10 mM lub 600 mM imidazolu); (2) chromatografia wykluczania wielkości (bufor: 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0; kolumna: HiLoad 16/60 Superdex 200). Czystość deadenylazy CNOT7 została potwierdzona na 12% PAGE. Oczyszczone białko zatężono przez ultrafiltrację do 110-120 μ M, zamrożono ciekłym azotem w buforze do przechowywania (bufor SEC uzupełniony 15% glicerolem i 1 mM DTT) i przechowywano w porcjach w -80 °C.

17.3. Polimeraza RNA T7

Polimeraza RNA T7 wykorzystana w badaniach została otrzymana oraz oczyszczona przez mgr. Tomasza Śpiewkę w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Pobrano 1 μ l plazmidu pT7-911Q i dodano do 100 μ l chemicznie kompetentnych bakterii szczepów BL21 (DE3)-RIL. Bakterie inkubowano 20 minut na lodzie, 45 sekund w 42 °C (heat shock) i 2 minuty na lodzie. Do zawiesiny bakteryjnej dodano 500 μ l medium SOB i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (60 minut, 650 rpm). Uzyskaną hodowlę wysiano na szalki z podłożem LB-agar z dodatkiem ampicyliny. Przygotowaną płytkę pozostawiono w 37°C na 16 godzin (O/N). Do 25 ml medium LB dodano 25 μ l ampicyliny, a następnie inokulowano roztwór kilkoma pojedynczymi koloniami bakteryjnymi dla szczepu BL21 (DE3)-RIL. Zawiesinę bakteryjną inkubowano 3 godziny, 37°C, 220 rpm. Po uzyskaniu przez hodowlę gęstości optycznej bliskiej OD=1 (długość fali λ = 600 nm) indukowano bakterie roztworem 0.5 mM IPTG. Zawiesiny inkubowano w 37°C przez 4 godziny. Po hodowli pobrano 100 ml zawiesiny i zwirowano (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Po wirowaniu usunięto supernatant, pelet zawieszono w 170 ml buforu do lizy (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10 %, DTT 1 mM, inhibitory proteaz: PMSF 100 mM, Leupeptyna 1.05 mM, Pepstatyna 100 μ M, Aprotonina 30 μ M, lizozym 0.1 mg/ml) i inkubowano na lodzie 20 minut. Następnie próbki poddano sonikacji (2.5 min, 50%, 30s on/off). W celu oczyszczenia, lizat nałożono na kolumnę 2x 5ml HisTrap FF wypełnioną buforem Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 1M, imidazol 20 mM, glicerol 10 %, DTT 1mM. Białko eluowano przy użyciu buforu uzupełnionego 300 mM imidazolem. W celu usunięcia cząsteczek kwasów nukleinowych (DNA) związanych do oczyszczanego białka polimerazy T7 oraz usunięcia zanieczyszczeń białkowych, zastosowano kolumny HiTrapHEPARIN. Po oczyszczaniu zebrano frakcję piku głównego zawierającą białko Polimerazę T7 i zagęszczono na kolumnkach do filtracji Amicon 50kDa. Filtrację żelową prowadzono na kolumnie HiLoad Superdex 16/600 200 pg wykorzystując do elucji bufor Tris 10 mM pH 8.0, NaCl 300mM, DTT 1mM. Białko zebrane po filtracji żelowej analizowano przy użyciu 12% PAGE, a wybrane frakcje zatężano przy użyciu kolumnki filtracyjnej Amicon Ultra-4 10 kDa MWCO (Millipore), porcjowano i zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -20 °C.

17.4. Polimeraza poli(A)

Polimeraza poli(A) zakupiona została od firmy Lucigen (Biosearch Technologies). Polimeraza znajdowała się w buforze 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, and 0.1% Triton® X-100 w stężeniu 4U/ μ l. Według wytycznych

producenta, 1 jednostka polimerazy oznacza ilość białka zdolną do konwersji 1 nmol ATP w nierozpuszczalny w kwasie produkt w czasie 10 minut w temperaturze 37°C w standardowych warunkach (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 µg drożdżowego tRNA, 1 mM ATP).

17.5. Lizaty komórkowe

Lizaty retikulocytów króliczych zakupione zostały od firmy Promega. Zgodnie z informacjami producenta, lizaty zostały pozbawione komórkowego mRNA z pomocą nukleazy mikrokokowej. Lizaty są również optymalizowane na rzecz translacji poprzez dodatek fosfokreatyny i kinazy fosfokreatynowej, mieszaniny tRNA, heminy (w celu zapobiegania inhibicji translacji) oraz octanu magnezu i octanu potasu.

18. Reakcje enzymatyczne *in vitro*

18.1. Transkrypcja *in vitro*

18.1.1. Otrzymywanie mRNA kodującego lucyferazę *Firefly* metodą transkrypcji *in vitro*

mRNA lucyferazy *Firefly* przygotowane i oczyszczone zostało przez dr Mirosława Śmiateńskiego w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Końcowy transkrypt zawierał krótki 5' UTR, ORF, dwa kolejne 3' UTR *H.sapiens* β -globiny oraz ogon poli(A)₃₅. Reakcję (30 μ L) prowadzono przez 4 h w 37°C w buforze transkrypcyjnym (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT i 2 mM spermidyny), z dodatkiem 10 U/ μ L polimerazy SP6 HC RNA (ThermoFisher Scientific), 2 U/ μ L inhibitora RNazy RiboLock, 2 mM ATP, CTP i UTP, 0.25 mM GTP, 2.5 mM analogu kapu (ARCA) m²_{7,3'}-O^{3'}GpppG i 100 ng/ μ L matrycy DNA amplifikowanej metodą PCR. mRNA oczyszczono wstępnie za pomocą kolumnienek NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel), a następnie za pomocą RP HPLC na urządzeniu Agilent Technologies Series 1200 HPLC z kolumną RNASepTM Prep (ADS Biotec) w temperaturze 55 °C, stosując 40-60% gradient liniowy buforu B (0,1 M octan trietyloamoniowy pH 7.0 i 25% acetonitrylu) w buforze A (0,1 M octan trietyloamoniowy pH 7.0) w ciągu 25 min przy przepływie 0,9 mL/min. mRNA odzyskiwano z eluatu przez wytrącenie za pomocą NaOAc pH 5.2 (stężenie końcowe 0,3 M) i jednej objętości izopropanolu. Następnie przeprowadzano dwa etapy przemycania peletu mRNA za pomocą 0,4 mL 70% etanolu. Stężenie mRNA określano na podstawie współczynnika ekstynkcji przewidywanego dla rzeczywistej sekwencji mRNA przy użyciu oprogramowania DNA Calculator (www.molbiotools.com) i spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy 260 nm. czystość mRNA analizowano za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym 1× Tris-Borate-EDTA (TBE).

18.1.2. Otrzymywanie mRNA kodującego lucyferazę *Gaussia* metodą transkrypcji *in vitro*

mRNA kodujące lucyferazę *Gaussia* otrzymano przy użyciu plazmidu pJET_T7_GLuc_31A, który wcześniej linearyzowano poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym AarI (ThermoFisher Scientific). Plazmid uzyskano poprzez sklonowanie sekwencji promotora T7 i sekwencji kodującej lucyferazy *Gaussia* do pJET_T7_GLuc_31A. Sekwencja promotora T7 została sklonowana i wprowadzona, wraz z sekwencją kodującą lucyferazę *Gaussia*, do pJET_luc_31A. Reakcję transkrypcji *in vitro* (120 μ L) inkubowano w 37°C przez 3h w buforze transkrypcyjnym (40 mM Tris-HCl pH 7,9, 20 inhibitora RNazy mM MgCl₂, 1 mM DTT, i 2 mM spermidyna) z dodatkiem 0.125 mg/ml T7 RNA polimerazy, 1U/ μ L RiboLock, 4 mM ATP/UTP/CTP, 2 mM GTP, 4 mM m⁷GpppA_{mp}G (analog cap 1), 0,002U/ μ L pirofosfatazy nieorganicznej i 40ng/ μ L matrycy DNA. Po 3h inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodano 1U/ μ L DNazy i kontynuowano inkubację przez kolejne 30 min w 37°C. Reakcję następnie rozcieńczano 2x i oczyszczano mRNA za pomocą kolumnienek Monarch RNA Cleanup Columns T2050 (New England BioLabs). Jakość transkryptu oceniano na natywnym 1% żelu agarozowym 1× TBE, a stężenie próbki oznaczano spektrofotometrycznie.

Ogon poli(A) mRNA lucyferazy *Gaussia* wydłużano do ~180A przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Poly(A) Polymerase Tailing Kit (LuciGen). Reakcję (~400 μ L) inkubowano przez 30 min w 37°C w buforze (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 M NaCl, 10 mM MgCl₂) z dodatkiem 1 mM ATP, 1U/ μ L inhibitora RNazy RiboLock, 0,8 U/ μ L Polimerazy poli(A) i 0,6 μ g/ μ L mRNA. Reakcja była zatrzymywana przez dodanie EDTA do końcowego stężenia 11 mM. mRNA ponownie oczyszczano przy użyciu kolumnienek firmy Monarch. Jakość mRNA

oceniano na żelu agarozowym, jak opisano wcześniej. Ostateczne oczyszczanie na RP HPLC przeprowadzono na aparacie Agilent Technologies Series 1200 HPLC przy użyciu kolumny RNASep™ Prep - RNA (ADS Biotec) w temperaturze 55°C. Zastosowano liniowy gradient buforu B (0,1 M octan trietyloamoniowy pH 7.0 i 50% acetonitrylu) od 20% do 25% w buforze A (0,1 M octan trietyloamoniowy pH 7.0) w ciągu 20 minut przy przepływie 0,9 ml/min. mRNA było następnie wytrącane z eluatu przy użyciu 1,2 objętości izopropanolu z dodatkiem 0,3 M NaOAc (pH 5.2) i 1 µl/ml glikogenu. Pelet mRNA przemywano dwukrotnie 70% etanolem. Następnie pelet mRNA suszono pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszczono w wodzie wolnej od RNaz. Stężenie końcowej próbki oznaczano spektrofotometrycznie, a jej jakość oceniano na 1% żelu agarozowym w 1× TBE.

18.2. Ligacja enzymatyczna

18.2.1. Ligacja z udziałem oligonukleotydów

5'-fosforany dinukleotydów (pApA_m, pAp_sA_m D1/D2, pGpG_m, pGp_sG_m D1/D2) przyłączano do 3' końca 12-merowego analogu poli(A) A₁₂ przy użyciu ligazy T4 RNA 1 stosując następujący protokół ligacji enzymatycznej: mieszaninę reakcyjną (100 µl) zawierającą 10 µl 10x stężonego buforu (stężenie końcowe buforu: 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5), 10 µl DMSO, 1 mM ATP, 3 mM DTT, 1,2 U/µl inhibitora RNazy RiboLock, 1U/µl ligazy T4 RNA 1, 1 µM A12, 5 µM wybranego dinukleotydu, inkubowano przez noc (16h) w 24°C. Reakcję stopowano przez 10-krotne rozcieńczenie wodą. Przed oczyszczaniem przeprowadzono ekstrakcję mieszaniną chloroform/fenol w celu usunięcia enzymu i soli z roztworu. Oczyszczanie przeprowadzono na aparacie Agilent Technologies Series 1200 HPLC przy użyciu kolumny Kinetex 2,6 µm C18 (Phenomenex). Zastosowano liniowy gradient buforu B (0,1M octan trietyloamoniowy pH 7,0 i 50% acetonitrylu) od 0% do 30% w buforze A (0,1M octan trietyloamoniowy pH 7,0) w ciągu 20 minut i od 30% do 50% do 30 minut, przy przepływie 1 ml/min. Po oczyszczeniu próbki były liofilizowane i rozpuszczane w wodzie. Stężenie końcowej próbki oznaczano spektrofotometrycznie.

18.2.2. Ligacja z udziałem mRNA

5'-fosforany dinukleotydów (pApA_m, pAp_sA_m D1/D2, pGpG_m, pGp_sG_m D1/D2) przyłączano do 3' końca mRNA Gaussia Luciferase przy użyciu T4 RNA Ligase 1 stosując następujący protokół ligacji enzymatycznej: mieszanina reakcyjna (5 µl) zawierająca 0.5 µl 10x stężonego buforu (stężenie końcowe buforu: 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5), 0,5 µl DMSO, 1 mM ATP, 1,2 U/µl inhibitora RNazy RiboLock, 2U/µl T4 RNA Ligase 1, 15% PEG800, 1,5 µg oczyszczonego mRNA i 81 µM wybranego dinukleotydu, inkubowano przez 1h w 24°C. Reakcję zatrzymywano przez 10-krotne rozcieńczenie wodą, a produkty mRNA oczyszczano przy użyciu kolumnienek Monarch RNA Cleanup Columns T2030 (New England BioLabs). Jakość zmodyfikowanego mRNA oceniano na natywnym 1% żelu agarozowym 1× Tris-Borate-EDTA (TBE), a stężenie próbki oznaczano spektrofotometrycznie. Wydajność po ligacji i oczyszczaniu wynosiła zwykle ~70%.

18.3. Trawienie enzymatyczne z udziałem deadenylazy CNOT7

18.3.1. Trawienie enzymatyczne oligonukleotydowych analogów poli(A)

Reakcję inicjowano mieszając 30 µl roztworu CNOT7 (6,25 ng/ml) w buforze reakcyjnym (Tris 25 mM, 25 mM DTT, 12,5 mM MgCl₂, 125 mM KCl, pH 8,0) z 7,5 µl wodnego roztworu analogu poli(A) (100 µM), aby uzyskać następujące stężenia końcowe: 5 ng/ml CNOT7, 20 µM analogu poli(A), 20 mM Tris, 20 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl. Reakcję

inkubowano łącznie 30 min w temperaturze 37°C, przy stałym mieszaniu 750 rpm. Podczas inkubacji, co 5 min pobierano porcję (3,75 µl) z reakcji i zatrzymywano ją poprzez zmieszanie z 4 µl mieszaniny barwnika obciążającego (95% formamid, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF) i EDTA (25 mM) i umieszczono w lodzie. Próbę kontrolną przygotowano mieszając analog poli(A) i roztwory buforowe o tych samych stężeniach bez dodatku CNOT7.

18.3.2. Trawienie enzymatyczne mRNA

Reakcję degradacji ogona poli(A) (deadenylacji) mRNA lucyferazy *Gaussia* prowadzono zgodnie z następującym protokołem: mieszanina reakcyjna (5 µl) w buforze (20 mM Tris, 20 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, pH 8,0) zawierająca 60 ng wybranego mRNA i 0,2 µg/µl CNOT7 inkubowana była w 37°C przez 40 minut. Reakcja była zatrzymywana za pomocą EDTA (do stężenia końcowego 12 mM). Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie na 7% mocznikowym żelu poliakrylamidowym.

19. Termoforeza mikroskalowa MST

19.1. Pomiar bezpośredniego wiązania białko-ligand

Eksperymenty mikroskalowej termoforezy MST przeprowadzono na urządzeniu Monolith NT.115 firmy NanoTemper Technologies, w kapilarach Monolith NT.115 Standard Capillaries. Szesnaście roztworów o malejących stężeniach PABP przygotowano w buforze (50 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,2% Tween20, pH 7,4) metodą seryjnego dwukrotnego rozcieńczania, zaczynając od najwyższego stężenia PABP wynoszącego 10 μ M. Każdy roztwór mieszało z równą objętością roztworu wybranej sondy fluorescencyjnej (**A₀-1**, **A₀-2**, **A₀-3** lub **A₀-4**; 50 nM) w tym samym buforze (końcowe stężenie sondy w próbce wynosiło 25 nM). Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej kapilary wypełniano roztworami i mierzono MST (25°C, niebieski detektor dla sond **A₀-1** i **A₀-4**, czerwony detektor dla sond **A₀-2** i **A₀-3**, 20% mocy lasera). Dane termoforetyczne analizowano przy użyciu oprogramowania Palmist (wersja 1.5.8). Punkty danych dla krzywej wiązania pozyskiwano w czasie Temperature Jump (T-Jump). Krzywa wiązania została dopasowana przy użyciu modelu bezpośredniego wiązania 1:1, a wartość K_D została obliczona jako średnia wartość $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

19.2. Pomiar wiązania kompetycyjnego

Mieszaninę PABP¹⁻¹⁹⁰ (600 nM) i sondy **A₀-1** (50 nM) inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej w buforze (skład opisano powyżej). Szesnaście roztworów o malejących stężeniach analogu poli(A) w tym samym buforze przygotowano metodą seryjnego dwukrotnego rozcieńczania, zaczynając od najwyższego stężenia 150 μ M. Równe objętości roztworu kompleksu PABP-**A₀-1** dodawano następnie do każdej próbki analogu poli(A) i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej (końcowe stężenia PABP, **A₀-1** i analogu poli(A) wynosiły odpowiednio 300 nM, 25 nM, 75 μ M - 23 nM). Szesnaście kapilar wypełniono każdym z przygotowanych roztworów i dla każdej próbki zmierzono MST (25°C, niebieski detektor, 20% mocy lasera). Dane termoforetyczne analizowano przy użyciu oprogramowania Palmist. Punkty danych dla krzywej wiązania zostały pozyskane w czasie T-Jump. Krzywa wiązania została dopasowana przy użyciu modelu bezpośredniego wiązania 1:1, a wartości $K_{D\text{ app}}$ zostały obliczone jako średnia wartość $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

20. Badania wydajności translacji w lizatach retikulocytów króliczych

20.1. Badania wydajności translacji w lizatach retikulocytów króliczych

20.1.1. Badania wydajności translacji z udziałem oligonukleotydowych inhibitorów

Pomiary wydajności translacji z udziałem inhibitorów oligonukleotydowych przeprowadzone zostały przez dr. Mirosława Śmietańskiego w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Do badania wpływu analogów poli(A) na wydajność translacji mRNA kodującego lucyferazę *Firefly* użyto systemu RRL (Promega). RRL (4 μ l) rozcieńczano 4 μ l buforu translacyjnego zawierającego 100 μ M mieszaniny aminokwasów, 475 mM KOAc i 2,5 mM MgOAc i inkubowano przez 1 h w 30°C. Następnie do 8 μ l mieszaniny translacyjnej dodano 1 μ l oczyszczonego mRNA lucyferazy *Firefly* (0,5 ng/ μ l) zmieszanego z 1 μ l analogu poli(A) lub rozcieńczenia m⁷Gp_sppG (0,0262-100 μ M) i inkubowano przez 1 h w 30 °C. Reakcję zatrzymywano przez zamrożenie w ciekłym azocie. Aby wykryć luminescencję, 50 μ l Luciferase Assay Reagent (0,47 mM lucyferyny VivoGlo™ Luciferin; Promega), 20 mM trycyny, 3,55 mM Mg(HCO₃)₂, 66 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 0,53 mM ATP, i 0,27 mM koenzymu A dodano do 10 μ l mieszaniny translacyjnej, którą uprzednio rozmrożono na lodzie i rozcieńczono 2-krotnie H₂O. Luminescencję mierzono przy użyciu czytnika mikropłytek Synergy H1 (BioTek). Aby porównać wpływ analogów poli(A) na wydajność translacji, średnie wartości luminescencji normalizowano do sygnału luminescencji uzyskanego dla próbek bez inhibitorów.

20.1.2. Ko-inhibicja z udziałem oligonukleotydowych inhibitorów i m⁷Gp_sppG

Pomiary wydajności translacji z udziałem mieszaniny inhibitorów translacji przeprowadzone zostały przez dr. Mirosława Śmietańskiego w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Eksperymenty przeprowadzono według następującego protokołu: 1 μ l mRNA lucyferazy *Firefly* (0,5 ng/ μ l) zmieszanego z 1 μ l analogu poli(A) (280 μ M; **Am5** lub **Aps10**), 1 μ l m⁷Gp_sppG (10,3 μ M), lub z obydwojema dodawano do mieszaniny translacyjnej (4 μ l RRL zmieszane z 4 μ l buforu translacyjnego), preinkubowano przez 1 h w 30 °C i inkubowano przez 1 h po dodaniu liganda. Luminescencję mierzono jak opisano powyżej. Aby porównać wydajność translacji mRNA kodującego lucyferazę *Firefly* w obecności m⁷Gp_sppG, analogów poli(A) lub obu, średnie wartości były normalizowane do luminescencji próbek bez inhibitorów.

20.2. Badania wydajności translacji w liniach komórkowych

Komórki linii A549 (ATCC CCL-185) oraz HEK 293 (ATCC CRL-1573) hodowane były w pożywce komórkowej DMEM (Gibco) z dodatkiem 10% FBS (ang. *fetal bovine serum*), suplementu GlutaMAX (Gibco) oraz 1% penicyliny i streptomycyny, w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Z kolei komórki linii JAWS II (ATCC CRL-11904) hodowane były w pożywce RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 10% FBS, pirogronianu sodu (Gibco), 1% penicyliny i streptomycyny oraz 5 ng/ml czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; PeproTech), również w 37°C w atmosferze 5% CO₂. We wszystkich eksperymentach wykorzystane zostały komórki pasażowane 5-25 razy. W dniu transfekcji komórki wysiewane były w płytkach 96-dołkowych, w ilości 10⁴ komórek na 100 μ l pożywki na jeden dołek, bez dodatku antybiotyków. Mieszanina do transfekcji składała się z 10 μ l medium OptiMem (Gibco) z dodatkiem 5 ng/ μ l mRNA oraz 0.3 μ l lipofektaminy (MessengerMAX Transfection Reagent; Invitrogen). Transfekcja trwała 16h. Kolejne punkty czasowe badano poprzez pobranie pożywki znad komórek z danego dołka i zastąpienie świeżym roztworem. Pożywka pobierana była co 24 godziny przez 4 dni od momentu zakończenia procesu

transfekcji. Aktywności lucyferazy *Gaussia* badana była poprzez dodanie do 10 μ l pożywki, w której hodowane były transfekowane komórki 50 μ l roztworu koelenterazyny w PBS (10 ng/ml). Następnie mierzono luminescencję produktu reakcji katalizowanej przez lucyferazę na czytniku mikropłytek Synergy H1 (BioTek).

VI. Bibliografia

1. Kramer, S. Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts. *Parasitology* **148**, 1196–1218 (2021).
2. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S.-H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7511–7526 (2016).
3. Martinez-Rucobo, F. W. *et al.* Molecular Basis of Transcription-Coupled Pre-mRNA Capping. *Mol. Cell* **58**, 1079–1089 (2015).
4. Lima, C. D., Wang, L. K. & Shuman, S. Structure and Mechanism of Yeast RNA Triphosphatase: An Essential Component of the mRNA Capping Apparatus. *Cell* **99**, 533–543 (1999).
5. Chun, C. *et al.* Structure of the guanylyltransferase domain of human mRNA capping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10104–10108 (2011).
6. Cowling, V. H. Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem. J.* **425**, 295–302 (2009).
7. Ensinger, M. J. & Moss, B. Modification of the 5' terminus of mRNA by an RNA (guanine-7-)-methyltransferase from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **251**, 5283–5291 (1976).
8. Bélanger, F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. & Pelletier, J. Characterization of hMTTr1, a Human Cap1 2'-O-Methyltransferase *. *J. Biol. Chem.* **285**, 33037–33044 (2010).
9. Smietanski, M. *et al.* Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation. *Nat. Commun.* **5**, 3004 (2014).
10. Werner, M. *et al.* 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4756–4768 (2011).
11. Mauer, J. *et al.* Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* **541**, 371–375 (2017).
12. Borbolis, F. & Syntichaki, P. Biological implications of decapping: beyond bulk mRNA decay. *FEBS J.* **289**, 1457–1475 (2022).
13. Warminski, M., Sikorski, P. J., Kowalska, J. & Jemielity, J. Applications of Phosphate Modification and Labeling to Study (m)RNA Caps. *Top. Curr. Chem.* **375**, 16 (2017).
14. De Conti, L., Baralle, M. & Buratti, E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *WIREs RNA* **4**, 49–60 (2013).
15. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
16. Pyle, A. M. Group II Intron Self-Splicing. *Annu. Rev. Biophys.* **45**, 183–205 (2016).
17. Alonso, D. & Mondragón, A. Mechanisms of catalytic RNA molecules. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 1529–1535 (2021).
18. Irimia, M. & Roy, S. W. Origin of spliceosomal introns and alternative splicing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
19. Barash, Y. *et al.* Deciphering the splicing code. *Nature* **465**, 53–59 (2010).
20. Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413–1415 (2008).
21. Kühn, U. *et al.* Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor *. *J. Biol. Chem.* **284**, 22803–22814 (2009).
22. Shi, Y. & Manley, J. L. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev.* **29**, 889–897 (2015).
23. Clerici, M., Faini, M., Muckenfuss, L. M., Aebersold, R. & Jinek, M. Structural basis of AAUAAA polyadenylation signal recognition by the human CPSF complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 135–138 (2018).
24. Charlesworth, A., Meijer, H. A. & de Moor, C. H. Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *WIREs RNA* **4**, 437–461 (2013).
25. Wahle, E., Martin, G., Schiltz, E. & Keller, W. Isolation and expression of cDNA clones encoding mammalian poly(A) polymerase. *EMBO J.* **10**, 4251–4257 (1991).
26. Wahle, E. Purification and characterization of a mammalian polyadenylate polymerase involved in the 3' end

- processing of messenger RNA precursors. *J. Biol. Chem.* **266**, 3131–3139 (1991).
27. Schmid, M. *et al.* The Nuclear PolyA-Binding Protein Nab2p Is Essential for mRNA Production. *Cell Rep.* **12**, 128–139 (2015).
 28. Turtola, M. *et al.* Three-layered control of mRNA poly(A) tail synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **35**, 1290–1303 (2021).
 29. Murthy, K. & Manley, J. L. The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev.* **9**, 2672–2683 (1995).
 30. Kerwitz, Y. *et al.* Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* **22**, 3705–3714 (2003).
 31. Huarte, J. *et al.* Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell* **69**, 1021–1030 (1992).
 32. Marzluff, W. F., Wagner, E. J. & Duronio, R. J. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 843–854 (2008).
 33. E., B. C. & B., S. A. Poly(A) Tail Length Control in *Saccharomyces cerevisiae* Occurs by Message-Specific Deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6548–6559 (1998).
 34. Villalba, A., Coll, O. & Gebauer, F. Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 452–457 (2011).
 35. Tian, B. & Manley, J. L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 18–30 (2017).
 36. Chen, W. *et al.* Alternative Polyadenylation: Methods, Findings, and Impacts. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **15**, 287–300 (2017).
 37. Jia, J., Yao, P., Arif, A. & Fox, P. L. Regulation and dysregulation of 3'UTR-mediated translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 29–34 (2013).
 38. Akman, H. B., Oyken, M., Tuncer, T., Can, T. & Erson-Bensan, A. E. 3'UTR shortening and EGF signaling: implications for breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6910–6920 (2015).
 39. Masamha, C. P. & Wagner, E. J. The contribution of alternative polyadenylation to the cancer phenotype. *Carcinogenesis* **39**, 2–10 (2018).
 40. Sloan, K. E., Gleizes, P.-E. & Bohnsack, M. T. Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA-Protein Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 2040–2059 (2016).
 41. Stewart, M. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 609–617 (2010).
 42. Eliseev, B. *et al.* Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2678–2689 (2018).
 43. Hinnebusch, A. G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779–812 (2014).
 44. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M. & Ban, N. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 189–198 (2012).
 45. Fukao, A., Tomohiro, T. & Fujiwara, T. Translation Initiation Regulated by RNA-Binding Protein in Mammals: The Modulation of Translation Initiation Complex by Trans-Acting Factors. *Cells* **10**, (2021).
 46. Merrick, W. C. eIF4F: A retrospective. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 24091–24099 (2015).
 47. Li, Y. *et al.* Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and eIF4F Assembly through Direct Dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia* **12**, 848–855 (2010).
 48. Gandin, V. *et al.* mTORC1 and CK2 coordinate ternary and eIF4F complex assembly. *Nat. Commun.* **7**, 11127 (2016).
 49. Wagner, S. D., Willis, A. E. & Beck, D. eIF4G BT - Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine. in (ed. Parsyan, A.) 163–171 (Springer Netherlands, 2014). doi:10.1007/978-94-017-9078-9_7
 50. P., S. R. W. *et al.* Viral and cellular mRNA-specific activators harness PABP and eIF4G to promote translation initiation downstream of cap binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 6310–6315 (2017).
 51. Andreou, A. Z. & Klostermeier, D. The DEAD-box helicase eIF4A. *RNA Biol.* **10**, 19–32 (2013).
 52. Peter, D. *et al.* Molecular Architecture of 4E-BP Translational Inhibitors Bound to eIF4E. *Mol. Cell* **57**, 1074–1087 (2015).

53. Proud, C. G. Mnk1, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1849**, 766–773 (2015).
54. Benedetti, A. & Graff, J. De Benedetti A, Graff JR.. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23: 3189-3199. *Oncogene* **23**, 3189–3199 (2004).
55. Leppek, K., Das, R. & Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 158–174 (2018).
56. Zheng, J., Li, X., Zhang, C. & Zhang, Y. eIF4E Overexpression Is Associated with Poor Prognoses of Ovarian Cancer. *Anal. Cell. Pathol.* **2020**, 8984526 (2020).
57. Malina, A., Cencic, R. & Pelletier, J. Targeting translation dependence in cancer. *Oncotarget* **2**, 76–88 (2011).
58. Schoenberg, D. R. & Maquat, L. E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 246–259 (2012).
59. Chen, C.-Y. A. & Shyu, A.-B. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *WIREs RNA* **2**, 167–183 (2011).
60. J., D. C. & Roy, P. mRNA decay enzymes: Decappers conserved between yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12512–12514 (2002).
61. Collart, M. A. & Panasenko, O. O. The Ccr4–Not complex. *Gene* **492**, 42–53 (2012).
62. Valkov, E. *et al.* Structure of the Dcp2–Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 574–579 (2016).
63. Grzela, R. *et al.* Hydrolytic activity of human Nudt16 enzyme on dinucleotide cap analogs and short capped oligonucleotides. *RNA* **24**, 633–642 (2018).
64. Jones, C. I., Zabolotskaya, M. V. & Newbury, S. F. The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *WIREs RNA* **3**, 455–468 (2012).
65. Schmid, M. & Jensen, T. H. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 501–510 (2008).
66. Mugridge, J. S., Ziemniak, M., Jemielity, J. & Gross, J. D. Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1–Dcp2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 987–994 (2016).
67. Kilchert, C., Wittmann, S. & Vasiljeva, L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 227–239 (2016).
68. Wasmuth, E. V & Lima, C. D. Structure and Activities of the Eukaryotic RNA Exosome. *Enzym.* **31**, 53–75 (2012).
69. Milac, A. L., Bojarska, E. & Wypijewska del Nogal, A. Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 452–462 (2014).
70. Fuchs, A.-L., Wurm, J., Neu, A. & Sprangers, R. Molecular basis of the selective processing of short mRNA substrates by the DcpS mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 202009362 (2020).
71. Mangus, D. A., Evans, M. C. & Jacobson, A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* **4**, 223 (2003).
72. Sawazaki, R. *et al.* Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail. *Sci. Rep.* **8**, 1455 (2018).
73. H., K. S. & B., S. A. RNA Recognition Motif 2 of Yeast Pab1p Is Required for Its Functional Interaction with Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 51–57 (1998).
74. Burd, C. G., Matunis, E. L. & Dreyfuss, G. The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3419–3424 (1991).
75. Safaee, N. *et al.* Interdomain Allostery Promotes Assembly of the Poly(A) mRNA Complex with PABP and eIF4G. *Mol. Cell* **48**, 375–386 (2012).
76. Gorgoni, B. & Gray, N. K. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: A developmental perspective. *Brief. Funct. Genomics* **3**, 125–141 (2004).
77. Ivanov, A. *et al.* PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7766–7776 (2016).
78. Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V, Frolova, L. Y., Kisselev, L. L. & Pestova, T. V. In vitro reconstitution of eukaryotic

- translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**, 1125–1136 (2006).
79. Yi, H. *et al.* PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Mol. Cell* **70**, 1081–1088.e5 (2018).
 80. Morgan, M. *et al.* mRNA 3' uridylation and poly(A) tail length sculpt the mammalian maternal transcriptome. *Nature* **548**, 347–351 (2017).
 81. Schäfer, I. B. *et al.* Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase. *Cell* **177**, 1619–1631.e21 (2019).
 82. Collart, M. A. & Panasenko, O. O. The Ccr4-Not complex: architecture and structural insights. *Macromol. Protein Complexes Struct. Funct.* 349–379 (2017).
 83. Schwartz, S. & Motorin, Y. Next-generation sequencing technologies for detection of modified nucleotides in RNAs. *RNA Biol.* **14**, 1124–1137 (2017).
 84. Li, X., Xiong, X. & Yi, C. Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nat. Methods* **14**, 23–31 (2017).
 85. Kozbial, P. Z. & Mushegian, A. R. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct. Biol.* **5**, 19 (2005).
 86. Jády, B. E. & Kiss, T. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *EMBO J.* **20**, 541–551 (2001).
 87. Züst, R. *et al.* Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137–143 (2011).
 88. Ayadi, L., Galvanin, A., Pichot, F., Marchand, V. & Motorin, Y. RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1862**, 253–269 (2019).
 89. Dai, Q. *et al.* Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision. *Nat. Methods* **14**, 695–698 (2017).
 90. Trim, A. R. & Parker, J. E. Preparation, purification and analyses of thirteen alkali-stable dinucleotides from ribonucleic acid. *Biochem. J.* **116**, 589–598 (1970).
 91. Dönmez, G., Hartmuth, K. & Lührmann, R. Modified nucleotides at the 5' end of human U2 snRNA are required for spliceosomal E-complex formation. *RNA* **10**, 1925–1933 (2004).
 92. Ge, J., Liu, H. & Yu, Y.-T. Regulation of pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocytes by targeted 2'-O-methylation. *RNA* **16**, 1078–1085 (2010).
 93. Elliott, B. A. *et al.* Modification of messenger RNA by 2'-O-methylation regulates gene expression in vivo. *Nat. Commun.* **10**, 3401 (2019).
 94. Manoharan, M. *et al.* Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. *Angew. Chemie* **123**, 2332–2336 (2011).
 95. Zhu, B. *et al.* Synthesis of 2'-Fluoro RNA by Syn5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **43**, e94–e94 (2015).
 96. Pallan, P. S. *et al.* Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3482–3495 (2011).
 97. Xu, Q., Barany, G., Hammer, R. & Musier-Forsyth, K. Efficient introduction of phosphorothioates into RNA oligonucleotides by 3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one (EDITH). *Nucleic Acids Res.* **24**, 3643–3644 (1996).
 98. Li, N.-S., Frederiksen, J. K. & Piccirilli, J. A. Synthesis, Properties, and Applications of Oligonucleotides Containing an RNA Dinucleotide Phosphorothiolate Linkage. *Acc. Chem. Res.* **44**, 1257–1269 (2011).
 99. Knouse, K. W. *et al.* Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science (80-.).* **361**, 1234–1238 (2018).
 100. Kawaguchi, D. *et al.* Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **59**, 17403–17407 (2020).
 101. Yang, X., Dinuka Abeydeera, N., Liu, F.-W. & Egli, M. Origins of the enhanced affinity of RNA–protein interactions triggered by RNA phosphorodithioate backbone modification. *Chem. Commun.* **53**, 10508–10511 (2017).
 102. Duschmalé, J. *et al.* In vitro and in vivo properties of therapeutic oligonucleotides containing non-chiral 3' and 5'

- thiophosphate linkages. *Nucleic Acids Res.* **48**, 63–74 (2020).
103. Watanabe, T. A., Geary, R. S. & Levin, A. A. Plasma Protein Binding of an Antisense Oligonucleotide Targeting Human ICAM-1 (ISIS 2302). *Oligonucleotides* **16**, 169–180 (2006).
 104. Strzelecka, D. *et al.* Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. *RNA* **26**, 1815–1837 (2020).
 105. Takahashi, Y., Sato, K. & Wada, T. Solid-Phase Synthesis of Boranophosphate/Phosphorothioate/Phosphate Chimeric Oligonucleotides and Their Potential as Antisense Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **87**, 3895–3909 (2022).
 106. Hall, A. H. S. *et al.* High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2773–2781 (2006).
 107. Harcourt, E. M., Kietrys, A. M. & Kool, E. T. Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature* **541**, 339–346 (2017).
 108. Viegas, I. J. *et al.* N6-methyladenosine in poly(A) tails stabilize VSG transcripts. *Nature* **604**, 362–370 (2022).
 109. Meyer, K. D. *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* **149**, 1635–1646 (2012).
 110. Lesbirel, S. & Wilson, S. A. The m(6)A-methylase complex and mRNA export. *Biochim. Biophys. acta. Gene Regul. Mech.* **1862**, 319–328 (2019).
 111. Liu, N. *et al.* N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. *Nature* **518**, 560–564 (2015).
 112. Zheng, G. *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol. Cell* **49**, 18–29 (2013).
 113. Li, F., Zhao, D., Wu, J. & Shi, Y. Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in complex with an m6A mononucleotide reveals an aromatic cage for m6A recognition. *Cell Res.* **24**, 1490–1492 (2014).
 114. Xu, C. *et al.* Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 927–929 (2014).
 115. Helm, M., Giegé, R. & Florentz, C. A Watson–Crick Base-Pair-Disrupting Methyl Group (m1A9) Is Sufficient for Cloverleaf Folding of Human Mitochondrial tRNALys. *Biochemistry* **38**, 13338–13346 (1999).
 116. Dominissini, D. *et al.* The dynamic N1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **530**, 441–446 (2016).
 117. Li, X. *et al.* Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N1-methyladenosine methylome. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 311–316 (2016).
 118. Wang, S. & Kool, E. T. Origins of the Large Differences in Stability of DNA and RNA Helices: C-5 Methyl and 2'-Hydroxyl Effects. *Biochemistry* **34**, 4125–4132 (1995).
 119. Squires, J. E. *et al.* Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5023–5033 (2012).
 120. Delatte, B. *et al.* Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science (80-.).* **351**, 282–285 (2016).
 121. Davis, D. R. Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5020–5026 (1995).
 122. Chun, C., Xinliang, Z., Ryszard, K. & Yi-Tao, Y. A Flexible RNA Backbone within the Polypyrimidine Tract Is Required for U2AF65 Binding and Pre-mRNA Splicing InVivo. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4108–4119 (2010).
 123. Li, X. *et al.* Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 592–597 (2015).
 124. Karikó, K. *et al.* Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol. Ther.* **16**, 1833–1840 (2008).
 125. Schwartz, S. *et al.* Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell* **159**, 148–162 (2014).
 126. Karijolich, J. & Yu, Y.-T. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature* **474**, 395–398 (2011).

127. Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. & Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1–7 (2000).
128. Morais, P., Adachi, H. & Yu, Y.-T. The Critical Contribution of Pseudouridine to mRNA COVID-19 Vaccines. *Front. cell Dev. Biol.* **9**, 789427 (2021).
129. Nakahama, T. & Kawahara, Y. Adenosine-to-inosine RNA editing in the immune system: friend or foe? *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 2931–2948 (2020).
130. Nigita, G., Veneziano, D. & Ferro, A. A-to-I RNA editing: current knowledge sources and computational approaches with special emphasis on non-coding RNA molecules. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 37 (2015).
131. Bazak, L. *et al.* A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. *Genome Res.* **24**, 365–376 (2014).
132. Liddicoat, B. J. *et al.* RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science (80-.)*. **349**, 1115–1120 (2015).
133. Blanc, V. *et al.* Genome-wide identification and functional analysis of Apobec-1-mediated C-to-U RNA editing in mouse small intestine and liver. *Genome Biol.* **15**, 1–17 (2014).
134. Liu, Y., Nie, H., Liu, H. & Lu, F. Poly(A) inclusive RNA isoform sequencing (PAIso-seq) reveals wide-spread non-adenosine residues within RNA poly(A) tails. *Nat. Commun.* **10**, 5292 (2019).
135. Li, C. Y. *et al.* Cytidine-containing tails robustly enhance and prolong protein production of synthetic mRNA in cell and in vivo. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **30**, 300–310 (2022).
136. Lim, J. *et al.* Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science (80-.)*. **361**, 701 LP – 704 (2018).
137. Khvorova, A. & Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **35**, 238–248 (2017).
138. Lipi, F., Chen, S., Chakravarthy, M., Rakesh, S. & Veedu, R. N. In vitro evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies. *RNA Biol.* **13**, 1232–1245 (2016).
139. Xiong, H., Veedu, R. N. & Diermeier, S. D. Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, (2021).
140. Mehta, M. *et al.* Oligonucleotide therapy: An emerging focus area for drug delivery in chronic inflammatory respiratory diseases. *Chem. Biol. Interact.* **308**, 206–215 (2019).
141. Pifer, R. & Greenberg, D. E. Antisense antibacterial compounds. *Transl. Res.* **223**, 89–106 (2020).
142. Petrocca, F. & Lieberman, J. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 747–754 (2011).
143. Juliano, R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6518–6548 (2016).
144. Xiao, F. *et al.* Oligonucleotide–Polymer Conjugates: From Molecular Basics to Practical Application. *Top. Curr. Chem.* **378**, 24 (2020).
145. Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 285–288 (1978).
146. Campbell, J. M., Bacon, T. A. & Wickstrom, E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods* **20**, 259–267 (1990).
147. Gaus, H. J. *et al.* Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay. *Nucleic Acids Res.* **47**, 1110–1122 (2019).
148. Croke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W. & Liang, X. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **35**, 230–237 (2017).
149. Krieg, A. M. & Stein, C. A. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: Antisense or Anti-Protein? *Antisense Res. Dev.* **5**, 241 (1995).
150. Chan, J. H. P., Lim, S. & Wong, W. S. F. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33**, 533–540 (2006).
151. Passini, M. A. *et al.* Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* **3**, 72ra18-72ra18 (2011).

152. Liang, X.-H., Sun, H., Nichols, J. G. & Crooke, S. T. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Mol. Ther.* **25**, 2075–2092 (2017).
153. Nielsen, K. E. *et al.* NMR Studies of Fully Modified Locked Nucleic Acid (LNA) Hybrids: Solution Structure of an LNA:RNA Hybrid and Characterization of an LNA:DNA Hybrid. *Bioconjug. Chem.* **15**, 449–457 (2004).
154. Iwamoto, N. *et al.* Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **35**, 845–851 (2017).
155. Sardone, V., Zhou, H., Muntoni, F., Ferlini, A. & Falzarano, M. S. Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Molecules* **22**, (2017).
156. Quemener, A. M. *et al.* The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *WIREs RNA* **11**, e1594 (2020).
157. Geary, R. S., Henry, S. P. & Grillone, L. R. Fomivirsen. *Clin. Pharmacokinet.* **41**, 255–260 (2002).
158. Dominski, Z. & Kole, R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8673–8677 (1993).
159. Hua, Y. *et al.* Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* **478**, 123–126 (2011).
160. Mercuri, E. *et al.* Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.* **378**, 625–635 (2018).
161. Bajan, S. & Hutvagner, G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells* **9**, (2020).
162. Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (80-.)*. **305**, 1434–1437 (2004).
163. Messina, A. *et al.* A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat. Neurosci.* **19**, 835–844 (2016).
164. Lanford, R. E. *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science (80-.)*. **327**, 198–201 (2010).
165. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
166. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
167. Hannon, G. J. RNA interference. *Nature* **418**, 244–251 (2002).
168. Haddad, G., Kölling, M. & Lorenzen, J. The hypoxic kidney: Pathogenesis and noncoding RNA-based therapeutic strategies. *Swiss Med. Wkly.* **149**, (2019).
169. Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G. J. & De Guire, V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* **30**, 114–127 (2019).
170. Seto, A. G. *et al.* Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **183**, 428–444 (2018).
171. Reid, G. *et al.* Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann. Oncol.* **24**, 3128–3135 (2013).
172. Ling, H., Girnita, L., Buda, O. & Calin, G. A. Non-coding RNAs: the cancer genome dark matter that matters! *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 705–714 (2017).
173. de Fougères, A., Manoharan, M., Meyers, R. & Vornlocher, H.-P. RNA interference in vivo: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics. *Methods Enzymol.* **392**, 278–296 (2005).
174. Tabernero, J. *et al.* First-in-Humans Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. *Cancer Discov.* **3**, 406–417 (2013).
175. FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease.
176. FDA approves givosiran for acute hepatic porphyria.
177. Kumar Kulabhusan, P., Hussain, B. & Yüce, M. Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
178. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**,

- 2443–2454 (2012).
179. Srivithya, V., Roun, H., Babu, M. S., Hyung, P. J. & Ha, P. S. Aptamer-conjugated DNA nano-ring as the carrier of drug molecules. *Nanotechnology* **29**, 95602 (2018).
 180. Tan, K. X., Jeevanandam, J., Pan, S., Yon, L. S. & Danquah, M. K. Aptamer-navigated copolymeric drug carrier system for in vitro delivery of MgO nanoparticles as insulin resistance reversal drug candidate in Type 2 diabetes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **57**, 101764 (2020).
 181. Vandghanooni, S., Eskandani, M., Barar, J. & Omid, Y. Bispecific therapeutic aptamers for targeted therapy of cancer: a review on cellular perspective. *J. Mol. Med.* **96**, 885–902 (2018).
 182. Quirico, L. *et al.* Axl-148b chimeric aptamers inhibit breast cancer and melanoma progression. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 1238–1251 (2020).
 183. Jin, D. *et al.* A Chymase Inhibitory RNA Aptamer Improves Cardiac Function and Survival after Myocardial Infarction. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **14**, 41–51 (2019).
 184. Jilma, B. *et al.* A randomised pilot trial of the anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 in patients with type 2b von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* **104**, 563–570 (2010).
 185. Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A. & Sharma, T. K. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* **8**, 4016–4032 (2018).
 186. Dunn, E. N., Sheth, V. S. & Hariprasad, S. M. An overview of the fovista and rinucumab trials and the fate of anti-PDGF medications. *Ophthalmic Surgery, Lasers Imaging Retin.* **48**, 100–104 (2017).
 187. Zhou, L.-Y., Qin, Z., Zhu, Y.-H., He, Z.-Y. & Xu, T. Current RNA-based therapeutics in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* **19**, 172–196 (2019).
 188. Reymond, C., Beaudoin, J.-D. & Perreault, J.-P. Modulating RNA structure and catalysis: lessons from small cleaving ribozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3937–3950 (2009).
 189. Scott, W. G., Horan, L. H. & Martick, M. Chapter One - The Hammerhead Ribozyme: Structure, Catalysis, and Gene Regulation. in *Catalytic RNA* (ed. Soukup, G. A. B. T.-P. in M. B. and T. S.) **120**, 1–23 (Academic Press, 2013).
 190. Garbo, S., Maione, R., Tripodi, M. & Battistelli, C. Next RNA Therapeutics: The Mine of Non-Coding. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, (2022).
 191. Kobayashi, H. *et al.* Safety and pharmacokinetic study of RPI.4610 (ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **56**, 329–336 (2005).
 192. Trepanier, J. B., Tanner, J. E. & Alfieri, C. Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir. Ther.* **11**, 273–287 (2006).
 193. Silverman, S. K. Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2701–2706 (2004).
 194. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849–857 (1983).
 195. Breaker, R. R. & Joyce, G. F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* **1**, 223–229 (1994).
 196. Silverman, S. K. Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 595–609 (2016).
 197. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3184–3196 (2013).
 198. McConnell, E. M. *et al.* Biosensing with DNAzymes. *Chem. Soc. Rev.* (2021).
 199. Zhou, W., Ding, J. & Liu, J. Theranostic DNAzymes. *Theranostics* **7**, 1010–1025 (2017).
 200. Liu, S., Ding, J. & Qin, W. Dual-analyte chronopotentiometric aptasensing platform based on a G-quadruplex/hemin DNAzyme and logic gate operations. *Anal. Chem.* **91**, 3170–3176 (2019).
 201. Zhang, J. RNA-cleaving DNAzymes: Old catalysts with new tricks for intracellular and in vivo applications. *Catalysts* **8**, 550 (2018).
 202. Sun, Y. *et al.* New cofactors and inhibitors for a DNA-cleaving DNAzyme: superoxide anion and hydrogen peroxide mediated an oxidative cleavage process. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).

203. Famulok, M. In Vitro Selected (Deoxy) ribozymes that Catalyze Carbon–Carbon Bond Formation. *Ribozymes* **1**, 545–556 (2021).
204. Aranda, J., Terrazas, M., Gómez, H., Villegas, N. & Orozco, M. An artificial DNAzyme RNA ligase shows a reaction mechanism resembling that of cellular polymerases. *Nat. Catal.* **2**, 544–552 (2019).
205. Cuenoud, B. & Szostak, J. W. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* **375**, 611–614 (1995).
206. Keijzer, J. F. & Albada, B. Site-specific and trigger-activated modification of proteins by means of catalytic hemin/g-quadruplex DNAzyme nanostructures. *Bioconjug. Chem.* **31**, 2283–2287 (2020).
207. Li, Y. & Sen, D. A catalytic DNA for porphyrin metallation. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 743–747 (1996).
208. Pavlov, V. *et al.* Amplified chemiluminescence surface detection of DNA and telomerase activity using catalytic nucleic acid labels. *Anal. Chem.* **76**, 2152–2156 (2004).
209. Kosman, J. & Juskowiak, B. Bioanalytical application of peroxidase-mimicking DNAzymes: Status and challenges. *Catal. Act. Nucleic Acids* 59–84 (2017).
210. Alvarez, M. M. *et al.* Optical Absorption Spectra of Nanocrystal Gold Molecules. *J. Phys. Chem. B* **101**, 3706–3712 (1997).
211. Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212–4217 (1999).
212. Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K., Frieman, M. B. & Pan, D. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano* **14**, 7617–7627 (2020).
213. Borghei, Y.-S. *et al.* Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta* **904**, 92–97 (2016).
214. Hashkavayi, A. B., Raoof, J. B., Ojani, R. & Kavosian, S. Ultrasensitive electrochemical aptasensor based on sandwich architecture for selective label-free detection of colorectal cancer (CT26) cells. *Biosens. Bioelectron.* **92**, 630–637 (2017).
215. Tang, X.-L., Hua, Y., Guan, Q. & Yuan, C.-H. Improved detection of deeply invasive candidiasis with DNA aptamers specific binding to (1→3)- β -D-glucans from *Candida albicans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **35**, 587–595 (2016).
216. Lou, B. *et al.* Aptamer-based biosensors for virus protein detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* 116738 (2022).
217. Wang, Z. *et al.* A wearable and deformable graphene-based affinity nanosensor for monitoring of cytokines in biofluids. *Nanomaterials* **10**, 1503 (2020).
218. Xiao, S. J. *et al.* Aptamer-mediated turn-on fluorescence assay for prion protein based on guanine quenched fluorophore. *Talanta* **79**, 1283–1286 (2009).
219. A., W. J. *et al.* Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science (80-.)*. **247**, 1465–1468 (1990).
220. Jirikowski, G. F., Sanna, P. P., Maciejewski-Lenoir, D. & Bloom, F. E. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science (80-.)*. **255**, 996–998 (1992).
221. Gómez-Aguado, I. *et al.* Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomaterials* **10**, (2020).
222. Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009–4017 (2006).
223. Thess, A. *et al.* Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals. *Mol. Ther.* **23**, 1456–1464 (2015).
224. Kauffman, K. J., Webber, M. J. & Anderson, D. G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J. Control. Release* **240**, 227–234 (2016).
225. Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615 (2020).
226. Baden, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403–416 (2021).
227. Ni, R., Zhou, J., Hossain, N. & Chau, Y. Virus-inspired nucleic acid delivery system: linking virus and viral mimicry.

- Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 3–26 (2016).
228. Slivac, I., Guay, D., Mangion, M., Champeil, J. & Gaillet, B. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 105–118 (2017).
 229. Jarvi, N. L. & Balu-Iyer, S. V. Immunogenicity Challenges Associated with Subcutaneous Delivery of Therapeutic Proteins. *BioDrugs* **35**, 125–146 (2021).
 230. An, D. *et al.* Systemic Messenger RNA Therapy as a Treatment for Methylmalonic Acidemia. *Cell Rep.* **21**, 3548–3558 (2017).
 231. Damase, T. R. *et al.* The limitless future of RNA therapeutics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 161 (2021).
 232. Carlsson, L. *et al.* Biocompatible, purified VEGF-A mRNA improves cardiac function after intracardiac injection 1 week post-myocardial infarction in swine. *Mol. Ther. Clin. Dev.* **9**, 330–346 (2018).
 233. Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* **21**, 121–131 (2015).
 234. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
 235. Koonin, E. V & Makarova, K. S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B* **374**, 20180087 (2019).
 236. Wang, H.-X. *et al.* CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem. Rev.* **117**, 9874–9906 (2017).
 237. Luther, D. C., Lee, Y. W., Nagaraj, H., Scaletti, F. & Rotello, V. M. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* **15**, 905–913 (2018).
 238. Yin, H. *et al.* Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187 (2017).
 239. Warren, L. *et al.* Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618–630 (2010).
 240. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
 241. Sepac, A. *et al.* Comparison of cardiomyogenic potential among human ESC and iPSC lines. (2012).
 242. Nagoshi, N., Tsuji, O., Nakamura, M. & Okano, H. Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells. *Regen. Ther.* **11**, 75–80 (2019).
 243. Rana, D., Kumar, S., Webster, T. J. & Ramalingam, M. Impact of induced pluripotent stem cells in bone repair and regeneration. *Curr. Osteoporos. Rep.* **17**, 226–234 (2019).
 244. Yoshida, Y. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications. *Circ. Res.* **120**, 1958–1968 (2017).
 245. Cieřlar-Pobuda, A. *et al.* Transdifferentiation and reprogramming: overview of the processes, their similarities and differences. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* **1864**, 1359–1369 (2017).
 246. Eguizabal, C., Montserrat, N., Veiga, A. & Belmonte, J. C. I. Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine. in *Seminars in reproductive medicine* **31**, 82–94 (Thieme Medical Publishers, 2013).
 247. Pesaresi, M., Sebastian-Perez, R. & Cosma, M. P. Dedifferentiation, transdifferentiation and cell fusion: in vivo reprogramming strategies for regenerative medicine. *FEBS J.* **286**, 1074–1093 (2019).
 248. Beheshtizadeh, N. *et al.* Commercialization and regulation of regenerative medicine products: Promises, advances and challenges. *Biomed. Pharmacother.* **153**, 113431 (2022).
 249. Ljungberg, K. & Liljeström, P. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 177–194 (2015).
 250. Vogel, A. B. *et al.* Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol. Ther.* **26**, 446–455 (2018).
 251. Shuman, S. RNA capping: progress and prospects. *Rna* **21**, 735–737 (2015).
 252. Burgess-Brown, N. A. *et al.* Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-

- gene study. *Protein Expr. Purif.* **59**, 94–102 (2008).
253. Mauro, V. P. & Chappell, S. A. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends Mol. Med.* **20**, 604–613 (2014).
 254. Kraft, C., Peter, M. & Hofmann, K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* **12**, 836–841 (2010).
 255. Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell. Mol. life Sci.* **68**, 1503–1520 (2011).
 256. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. & Gögenur, I. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer* **124**, 359–367 (2021).
 257. Wang, W. *et al.* CD8⁺ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature* **569**, 270–274 (2019).
 258. Halle, S., Halle, O. & Förster, R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* **38**, 432–443 (2017).
 259. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4⁺ T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.* **8**, 194 (2017).
 260. Overwijk, W. W. Human CD4⁺ T cells spontaneously detect somatic mutations in cancer cells. *Nat. Med.* **21**, 12–14 (2015).
 261. Tran, E. *et al.* Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **344**, 641–645 (2014).
 262. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 651–668 (2020).
 263. Sebastian, M. *et al.* Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **14**, 748 (2014).
 264. Multicenter Study to Assess the Safety and Tolerability of mRNA-5671/V941 as a Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab in Participants With KRAS Mutant Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer, Colorectal Cancer or Pancreatic Adenocarci. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03948763>. (Accessed: 26th October 2022)
 265. Han, X.-J. *et al.* Progress in neoantigen targeted cancer immunotherapies. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 728 (2020).
 266. Tran, E., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. 'Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat. Immunol.* **18**, 255–262 (2017).
 267. Keskin, D. B. *et al.* Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* **565**, 234–239 (2019).
 268. An Efficacy Study of Adjuvant Treatment With the Personalized Cancer Vaccine mRNA-4157 and Pembrolizumab in Participants With High-Risk Melanoma (KEYNOTE-942). (2022). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03897881>. (Accessed: 26th October 2022)
 269. A Phase II Clinical Trial Comparing the Efficacy of RO7198457 Versus Watchful Waiting in Patients With ctDNA-positive, Resected Stage II (High Risk) and Stage III Colorectal Cancer. (2022). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04486378>. (Accessed: 26th October 2022)
 270. Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 465–472 (1996).
 271. Dörrie, J., Schaft, N., Schuler, G. & Schuler-Thurner, B. Therapeutic Cancer Vaccination with Ex Vivo RNA-Transfected Dendritic Cells—An Update. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
 272. Bialkowski, L. *et al.* Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 273. Bol, K. F. *et al.* Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* **4**, e1019197 (2015).
 274. Bonehill, A. *et al.* Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA. *Mol. Ther.* **16**, 1170–1180 (2008).
 275. Van Lint, S. *et al.* Intratumoral Delivery of TriMix mRNA Results in T-cell Activation by Cross-Presenting Dendritic

- Cells Intratumoral mRNA-Based Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 146–156 (2016).
276. Hazarie, S., Soriano-Paños, D., Arenas, A., Gómez-Gardeñes, J. & Ghoshal, G. Interplay between population density and mobility in determining the spread of epidemics in cities. *Commun. Phys.* **4**, 191 (2021).
 277. Spervovasilis, N., Markaki, I., Papadakis, M., Tsioutis, C. & Markaki, L. Epidemics and pandemics: Is human overpopulation the elephant in the room? *Ethics, Med. public Heal.* **19**, 100728 (2021).
 278. Chahal, J. S. *et al.* An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8⁺ T cell responses in a mouse model. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
 279. Pardi, N. *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* **543**, 248–251 (2017).
 280. Harvey, T. J. *et al.* Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development. *J. Virol.* **77**, 7796–7803 (2003).
 281. McKay, P. F. *et al.* Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice. *Nat. Commun.* **11**, 1–7 (2020).
 282. Jacobson, J. M. *et al.* Dendritic cell immunotherapy for HIV-1 infection using autologous HIV-1 RNA: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **72**, 31 (2016).
 283. Gay, C. L. *et al.* Immunogenicity of AGS-004 Dendritic Cell Therapy in Patients Treated During Acute HIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **34**, 111–122 (2017).
 284. Mohamed, H., Miller, V., Jennings, S. R., Wigdahl, B. & Krebs, F. C. The Evolution of Dendritic Cell Immunotherapy against HIV-1 Infection: Improvements and Outlook. *J. Immunol. Res.* **2020**, 9470102 (2020).
 285. Martinon, F. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1719–1722 (1993).
 286. Petsch, B. *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1210–1216 (2012).
 287. Feldman, R. A. *et al.* mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine* **37**, 3326–3334 (2019).
 288. Schnee, M. *et al.* An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004746 (2016).
 289. Jagger, B. W. *et al.* Protective efficacy of nucleic acid vaccines against transmission of zika virus during pregnancy in mice. *J. Infect. Dis.* **220**, 1577–1588 (2019).
 290. Kose, N. *et al.* A lipid-encapsulated mRNA encoding a potentially neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. *Sci. Immunol.* **4**, eaaw6647 (2019).
 291. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of mRNA-1944 in Healthy Adults. (2021). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03829384>. (Accessed: 3rd November 2022)
 292. Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D. & Karikó, K. In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides. *Synth. messenger RNA cell Metab. Modul.* 29–42 (2013).
 293. Kiriakidou, M. *et al.* An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**, 1141–1151 (2007).
 294. Jemielity, J. *et al.* Novel “anti-reverse” cap analogs with superior translational properties. *Rna* **9**, 1108–1122 (2003).
 295. Grudzien-Nogalska, E., Jemielity, J., Kowalska, J., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *Rna* **13**, 1745–1755 (2007).
 296. Kocmik, I. *et al.* Modified ARCA analogs providing enhanced translational properties of capped mRNAs. *Cell Cycle* **17**, 1624–1636 (2018).
 297. Wojtczak, B. A. *et al.* 5′-phosphorothiolate dinucleotide cap analogues: Reagents for messenger RNA modification and potent small-molecular inhibitors of decapping enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 5987–5999 (2018).
 298. Ziemniak, M. *et al.* Phosphate-modified analogues of m7GTP and m7Gppppm7G—Synthesis and biochemical properties. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 5369–5381 (2015).
 299. Kowalska, J. *et al.* Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10245–

10264 (2014).

300. Grudzien-Nogalska, E. & Kiledjian, M. New insights into decapping enzymes and selective mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **8**, e1379 (2017).
301. Ishikawa, M., Murai, R., Hagiwara, H., Hoshino, T. & Suyama, K. Preparation of eukaryotic mRNA having differently methylated adenosine at the 5'-terminus and the effect of the methyl group in translation. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **53**, 129–130 (2009).
302. Vaidyanathan, S. *et al.* Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification. *Mol. Ther. Acids* **12**, 530–542 (2018).
303. Adibzadeh, S. *et al.* Enhancing Stability of Destabilized Green Fluorescent Protein Using Chimeric mRNA Containing Human Beta-Globin 5' and 3' Untranslated Regions. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **11**, 112 (2019).
304. von Niessen, A. G. O. *et al.* Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Mol. Ther.* **27**, 824–836 (2019).
305. Fotin-Mleczek, M. *et al.* Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity. *J. Immunother.* **34**, (2011).
306. Pandey, S., Kawai, T. & Akira, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016246 (2015).
307. Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 12542–12550 (2004).
308. Schlee, M. *et al.* Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**, 25–34 (2009).
309. Pichlmair, A. *et al.* Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* **83**, 10761–10769 (2009).
310. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 261–279 (2018).
311. Pascolo, S. The messenger's great message for vaccination. *Expert review of vaccines* **14**, 153–156 (2015).
312. Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, e142–e142 (2011).
313. Kormann, M. S. D. *et al.* Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat. Biotechnol.* **29**, 154–157 (2011).
314. Andries, O. *et al.* N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control. Release* **217**, 337–344 (2015).
315. Zhong, Z. *et al.* mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today* **23**, 16–39 (2018).
316. Strenkowska, M. *et al.* Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9578–9590 (2016).
317. Warminski, M. *et al.* Structural Insights into the Interaction of Clinically Relevant Phosphorothioate mRNA Cap Analogs with Translation Initiation Factor 4E Reveal Stabilization via Electrostatic Thio-Effect. *ACS Chem. Biol.* **16**, 334–343 (2021).
318. Sikorski, P. J. *et al.* The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Res.* **48**, 1607–1626 (2020).
319. Dmitriev, S. E. *et al.* Efficient translation initiation directed by the 900-nucleotide-long and GC-rich 5' untranslated region of the human retrotransposon LINE-1 mRNA is strictly cap dependent rather than internal ribosome entry site mediated. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4685–4697 (2007).
320. Karikó, K., Muramatsu, H., Keller, J. M. & Weissman, D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol. Ther.* **20**, 948–953 (2012).
321. Komar, A. A. & Hatzoglou, M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell cycle* **10**, 229–240 (2011).

322. Tan, X. & Wan, Y. Enhanced protein expression by internal ribosomal entry site-driven mRNA translation as a novel approach for in vitro loading of dendritic cells with antigens. *Hum. Immunol.* **69**, 32–40 (2008).
323. Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**, 947–950 (1987).
324. Martin, G., Doublié, S. & Keller, W. Determinants of substrate specificity in RNA-dependent nucleotidyl transferases. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 206–216 (2008).
325. Winz, M.-L., Samanta, A., Benzinger, D. & Jäschke, A. Site-specific terminal and internal labeling of RNA by poly(A) polymerase tailing and copper-catalyzed or copper-free strain-promoted click chemistry. *Nucleic Acids Res.* **40**, e78–e78 (2012).
326. Anhäuser, L., Hüwel, S., Zobel, T. & Rentmeister, A. Multiple covalent fluorescence labeling of eukaryotic mRNA at the poly(A) tail enhances translation and can be performed in living cells. *Nucleic Acids Res.* **47**, e42–e42 (2019).
327. Westerich, K. J. *et al.* Bioorthogonal mRNA labeling at the poly(A) tail for imaging localization and dynamics in live zebrafish embryos. *Chem. Sci.* **11**, 3089–3095 (2020).
328. Trepotec, Z., Geiger, J., Plank, C., Aneja, M. K. & Rudolph, C. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. *RNA* **25**, 507–518 (2019).
329. Nance, K. D. & Meier, J. L. Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. *ACS Cent. Sci.* **7**, 748–756 (2021).
330. Krawczyk, P. S. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccine is re-adenylated &in vivo&, enhancing antigen production and immune response. *bioRxiv* 2022.12.01.518149 (2022). doi:10.1101/2022.12.01.518149
331. McLAUGHLIN, L. W., ROMANIUK, E., ROMANIUK, P. J. & NEILSON, T. The Effect of Acceptor Oligoribonucleotide Sequence on the T4 RNA Ligase Reaction. *Eur. J. Biochem.* **125**, 639–643 (1982).
332. Höbartner, C. & Micura, R. Chemical synthesis of selenium-modified oligoribonucleotides and their enzymatic ligation leading to an U6 SnRNA stem–loop segment. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1141–1149 (2004).
333. Aditham, A. *et al.* Chemically Modified mocRNAs for Highly Efficient Protein Expression in Mammalian Cells. *ACS Chem. Biol.* (2022). doi:10.1021/acscchembio.1c00569
334. Mockey, M. *et al.* mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly (A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1062–1068 (2006).
335. Tcherepanova, I. Y. *et al.* Ectopic expression of a truncated CD40L protein from synthetic post-transcriptionally capped RNA in dendritic cells induces high levels of IL-12 secretion. *BMC Mol. Biol.* **9**, 1–13 (2008).
336. Peng, J. & Schoenberg, D. R. mRNA with a < 20-nt poly (A) tail imparted by the poly (A)-limiting element is translated as efficiently in vivo as long poly (A) mRNA. *Rna* **11**, 1131–1140 (2005).
337. Koski, G. K. *et al.* Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J. Immunol.* **172**, 3989–3993 (2004).
338. Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862 (1981).
339. Somoza, Á. Protecting groups for RNA synthesis: an increasing need for selective preparative methods. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2668–2675 (2008).
340. Höbartner, C. & Wachowius, F. Chemical synthesis of modified RNA. *technology* **17**, 19 (2011).
341. Wei, X. Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach. *Tetrahedron* **69**, 3615–3637 (2013).
342. Shiba, Y. *et al.* Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3287–3296 (2007).
343. Ogilvie, K. K., Sadana, K. L., Thompson, E. A., Quilliam, M. A. & Westmore, J. B. The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **15**, 2861–2863 (1974).
344. Biscans, A. *et al.* Direct Synthesis of Partially Modified 2'-O-Pivaloyloxymethyl RNAs by a Base-Labile Protecting Group Strategy and their Potential for Prodrug-Based Gene-Silencing Applications. *ChemBioChem* **15**, 2674–2679 (2014).

345. Jahns, H. *et al.* Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
346. Prakash, T. P. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Chem. Biodivers.* **8**, 1616–1641 (2011).
347. Koshkin, A. A. *et al.* Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* **54**, 3607–3630 (1998).
348. Ziemkiewicz, K., Warminski, M., Wojcik, R., Kowalska, J. & Jemielity, J. Quick Access to Nucleobase-Modified Phosphoramidites for the Synthesis of Oligoribonucleotides Containing Post-Transcriptional Modifications and Epitranscriptomic Marks. *J. Org. Chem.* **87**, 10333–10348 (2022).
349. Beckert, B. & Masquida, B. Synthesis of RNA by in vitro transcription. in *Rna* 29–41 (Springer, 2011).
350. Yin, Y. W. & Steitz, T. A. Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase. *Science (80-.)*. **298**, 1387–1395 (2002).
351. Caton-Williams, J., Lin, L., Smith, M. & Huang, Z. Convenient synthesis of nucleoside 5'-triphosphates for RNA transcription. *Chem. Commun.* **47**, 8142–8144 (2011).
352. Caton-Williams, J., Hoxhaj, R., Fiaz, B. & Huang, Z. Use of a Novel 5'-Regioselective Phosphitylating Reagent for One-Pot Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphates from Unprotected Nucleosides. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **52**, 1–30 (2013).
353. Sau, S. P. & Chaput, J. C. A one-pot synthesis of α -l-threofuranosyl nucleoside triphosphates (tNTPs). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 3271–3273 (2016).
354. Seio, K. *et al.* Synthesis and hybridization of 2'-O-methyl-RNAs incorporating 2'-O-carbamoyluridine and unique participation of the carbamoyl group in U–G base pair. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 7275–7280 (2009).
355. Egli, M. & Pallan, P. S. Crystallographic studies of chemically modified nucleic acids: a backward glance. *Chem. Biodivers.* **7**, 60–89 (2010).
356. Smith, C. C., Hollenstein, M. & Leumann, C. J. The synthesis and application of a diazirine-modified uridine analogue for investigating RNA–protein interactions. *RSC Adv.* **4**, 48228–48235 (2014).
357. Kabza, A. M. & Szczepanski, J. T. An l-RNA Aptamer with Expanded Chemical Functionality that Inhibits MicroRNA Biogenesis. *ChemBioChem* **18**, 1824–1827 (2017).
358. Jao, C. Y. & Salic, A. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15779–15784 (2008).
359. Milisavljević, N., Perlíková, P., Pohl, R. & Hocek, M. Enzymatic synthesis of base-modified RNA by T7 RNA polymerase. A systematic study and comparison of 5-substituted pyrimidine and 7-substituted 7-deazapurine nucleoside triphosphates as substrates. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 5800–5807 (2018).
360. Sawant, A. A. *et al.* A versatile toolbox for posttranscriptional chemical labeling and imaging of RNA. *Nucleic Acids Res.* **44**, e16–e16 (2016).
361. Sousa, R. & Padilla, R. A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase. *EMBO J.* **14**, 4609–4621 (1995).
362. Padilla, R. & Sousa, R. A Y639F/H784A T7 RNA polymerase double mutant displays superior properties for synthesizing RNAs with non-canonical NTPs. *Nucleic Acids Res.* **30**, e138–e138 (2002).
363. Zhu, B. *et al.* The RNA polymerase of marine cyanophage Syn5. *J. Biol. Chem.* **288**, 3545–3552 (2013).
364. Wochner, A., Attwater, J., Coulson, A. & Holliger, P. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science (80-.)*. **332**, 209–212 (2011).
365. Attwater, J. *et al.* Chemical fidelity of an RNA polymerase ribozyme. *Chem. Sci.* **4**, 2804–2814 (2013).
366. Ludwig, C. & Staatsdruckerei, K. K. H. *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung.* (Aus der KK Hof-und Staatsdruckerei, in Commission bei W. Braumüller ..., 1856).
367. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 342–353 (2011).
368. Duhr, S. & Braun, D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19678–19682 (2006).

369. Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **1077**, 101–113 (2014).
370. Dinarello, C. A. Interleukin-1, Interleukin-1 Receptors and Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 457–499 (1998).
371. Choy, E. H., Kavanaugh, A. F. & Jones, S. A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 154–163 (2013).
372. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* **1**, 100 (2010).
373. Culver, H. R. *et al.* Click Nucleic Acid–DNA Binding Behavior: Dependence on Length, Sequence, and Ionic Strength. *Biomacromolecules* **21**, 4205–4211 (2020).
374. Zhang, M.-L., Xu, Y.-P., Kumar, A., Zhang, Y. & Wu, W.-Q. Studying the Potassium-Induced G-Quadruplex DNA Folding Process Using Microscale Thermophoresis. *Biochemistry* **58**, 3955–3959 (2019).
375. Moon, M. H., Hilimire, T. A., Sanders, A. M. & Schneekloth, J. S. J. Measuring RNA–Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis. *Biochemistry* **57**, 4638–4643 (2018).
376. Le Grice, S. F. J. Targeting the HIV RNA genome: high-hanging fruit only needs a longer ladder. *Futur. HIV-1 Ther.* 147–169 (2015).
377. Kirk, S. R., Luedtke, N. W. & Tor, Y. Neomycin–acridine conjugate: a potent inhibitor of rev-rre binding. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 980–981 (2000).
378. McCown, P. J., Liang, J. J., Weinberg, Z. & Breaker, R. R. Structural, functional, and taxonomic diversity of three preQ1 riboswitch classes. *Chem. Biol.* **21**, 880–889 (2014).
379. Jacob, D. *et al.* Absolute Quantification of Noncoding RNA by Microscale Thermophoresis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **58**, 9565–9569 (2019).
380. Michell, D. L. *et al.* Elucidation of physico-chemical principles of high-density lipoprotein–small RNA binding interactions. *J. Biol. Chem.* **298**, 101952 (2022).
381. Allen, R. M. *et al.* Bioinformatic analysis of endogenous and exogenous small RNAs on lipoproteins. *J. Extracell. vesicles* **7**, 1506198 (2018).
382. Tabet, F. *et al.* HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat. Commun.* **5**, 1–14 (2014).
383. Muttach, F., Mäsing, F., Studer, A. & Rentmeister, A. New AdoMet Analogues as Tools for Enzymatic Transfer of Photo-Cross-Linkers and Capturing RNA–Protein Interactions. *Chem. Eur. J.* **23**, 5988–5993 (2017).
384. Holstein, J. M., Anhäuser, L. & Rentmeister, A. Modifying the 5'-cap for click reactions of eukaryotic mRNA and to tune translation efficiency in living cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 10899–10903 (2016).
385. Kühn, U. & Pieler, T. XenopusPoly(A) Binding Protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein – Protein Interaction. *J. Mol. Biol.* **256**, 20–30 (1996).
386. Görlach, M., Burd, C. G. & Dreyfuss, G. The mRNA Poly(A)-Binding Protein: Localization, Abundance, and RNA-Binding Specificity. *Exp. Cell Res.* **211**, 400–407 (1994).
387. Barragán-Iglesias, P. *et al.* Inhibition of Poly(A)-binding protein with a synthetic RNA mimic reduces pain sensitization in mice. *Nat. Commun.* **9**, 10 (2018).
388. Bartoschik, T. *et al.* Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis. *Sci. Rep.* **8**, 4977 (2018).
389. Dempsey, D. R., Jiang, H., Kalin, J. H., Chen, Z. & Cole, P. A. Site-Specific Protein Labeling with N-Hydroxysuccinimide-Esters and the Analysis of Ubiquitin Ligase Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 9374–9378 (2018).
390. Hernandez, F. J. *et al.* Degradation of nuclease-stabilized RNA oligonucleotides in Mycoplasma-contaminated cell culture media. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 58–68 (2012).
391. Choung, S., Kim, Y. J., Kim, S., Park, H.-O. & Choi, Y.-C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 919–927 (2006).
392. Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. & Prydz, H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* **31**, 589–595 (2003).

393. Frederiksen, J. K. & Piccirilli, J. A. B. T.-M. in E. Chapter 14 - Separation of RNA Phosphorothioate Oligonucleotides by HPLC. in *Biophysical, Chemical, and Functional Probes of RNA Structure, Interactions and Folding: Part A* **468**, 289–309 (Academic Press, 2009).
394. Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N. & Burley, S. K. Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. *Cell* **98**, 835–845 (1999).
395. Rainard, J. M., Pandarakalam, G. C. & McElroy, S. P. Using Microscale Thermophoresis to Characterize Hits from High-Throughput Screening: A European Lead Factory Perspective. *SLAS Discov. Adv. life Sci. R D* **23**, 225–241 (2018).
396. Scheuermann, T. H., Padrick, S. B., Gardner, K. H. & Brautigam, C. A. On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data. *Anal. Biochem.* **496**, 79–93 (2016).
397. Zhao, T. *et al.* Impact of poly(A)-tail G-content on Arabidopsis PAB binding and their role in enhancing translational efficiency. *Genome Biol.* **20**, 189 (2019).
398. Kowalska, J. *et al.* Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *Rna* **14**, 1119–1131 (2008).
399. Wang, H. *et al.* Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J.* **29**, 2566–2576 (2010).
400. Wolf, J. & Passmore, L. A. mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 184–187 (2014).
401. Motorin, Y. & Marchand, V. Detection and Analysis of RNA Ribose 2'-O-Methylations: Challenges and Solutions. *Genes* **9**, (2018).
402. Harrison, B. & Zimmerman, S. B. Polymer-stimulated ligation: enhanced ligation of oligo- and polynucleotides by T4 RNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8235–8251 (1984).
403. Franklin, M. A549 – A model for non-small cell lung cancer. *May* (2016). Available at: <https://drugdevelopment.labcorp.com/industry-solutions/oncology/preclinical/tumor-spotlights/model-spotlight-a549-a-model-for-non-small-cell-lung-cancer.html>.
404. Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H. & Brunham, R. C. Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect. Immun.* **76**, 2392–2401 (2008).
405. Heiser, A. *et al.* Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest.* **109**, 409–417 (2002).
406. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).