

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Tomasz Śpiewła

Nr albumu: 435974

Badania nowych modyfikacji oraz optymalizacja procesu wytwarzania mRNA do zastosowań terapeutycznych

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem

dr hab. Joanny Kowalskiej

Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki,

Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej

oraz

prof. dr. hab. Jacka Jemielitego

Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii

Explorna Therapeutics sp. z o.o.

Warszawa 2025

*Praca realizowana w ramach IV edycji programu „Doktorat wdrożeniowy” finansowanego
przez MNiSW (umowa nr DWD/4/46/2020)*

Aby tworzyć naukę, trzeba być więcej niż człowiekiem,
ponieważ autor trzymający pióro odkrywcy natury stworzenia
powinien być wolny od
wszelkich uprzedzeń, interesów lub próżności

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorom

Dr hab. Joannie Kowalskiej – za szansę na rozpoczęcie pracy w grupie badawczej, za wsparcie merytoryczne, cenne rady i pomoc w rozwoju naukowym, współpracę przy opracowywaniu planów eksperymentalnych oraz analizie danych, jak również przygotowaniu manuskryptów publikacji;

Prof. dr. hab. Jackowi Jemielitemu – za zaufanie, jakim obdarzył mnie od początku współpracy, za możliwość realizacji projektu doktoratu wdrożeniowego, przekazaną wiedzę oraz stworzenie doskonałych warunków do samodzielnej pracy;

Współpracownikom

Koleżankom i kolegom z Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej – za wspólne rozwiązywanie problemów w laboratorium, cenne rady, inspirujące dyskusje, wspianą atmosferę i wszechstronne wsparcie;

Koleżankom i kolegom z firmy Explorna Therapeutics – za wspólne stawianie czoła wyzwaniom związanym z rozwojem technologii mRNA w młodej i prężnie rozwijającej się firmie, za wielopoziomową pomoc w wykonywanych eksperymentach oraz wspólnie spędzony czas w pracy, jak i poza nią;

Mamie oraz Darii

~

za to, że wierzyłyście, gdy inni zwątpili,
za to, że trwałyście, choć inni odstąpili,
za miłość i siłę, które serce budują,
bo dzięki Wam marzenia się realizują.

Rozprawę dedykuję mojemu **Tacie - Janowi Śpiewli**,
człowiekowi pracy i poświęcenia, którego pamięć zawsze będzie w Nas żywa.
Trzymam się Tato.

Spis treści

Dorobek naukowy.....	12
Streszczenie	15
I. Cel pracy	17
II. Część literaturowa	18
1. Wstęp.....	18
2. Kwasy nukleinowe.....	20
2.1 Budowa kwasów nukleinowych	20
2.2 Transkrypcja DNA	22
2.3 Dojrzewanie mRNA	23
2.4 Poliadenylacja końca 3' mRNA	26
2.5 Translacja	28
2.6 Degradacja mRNA	30
3. Białka oddziałujące z sekwencją 3'-końcową mRNA	31
3.1 Białko PABP	32
3.2 Białkowe kompleksy deadenylujące	33
4. Wrodzony układ odpornościowy.....	35
4.1 Receptory typu Toll-podobne.....	36
4.2 Receptory NOD-podobne.....	37
4.3 Receptory RIG-I-podobne	37
4.4 Białko STING.....	38
4.5 Geny stymulowane interferonem	38
4.6 Białka IFIT	39
4.6.1 Białko IFIT1	42
5. Perspektywy terapeutycznego wykorzystania cząsteczek mRNA.....	45
5.1 Terapie genowe	46
5.2 Edycja genów	48
5.3 Szczepionki mRNA	50
6. Metody otrzymywania syntetycznych cząsteczek mRNA	61
6.1 Syntezy RNA na podłożu stałym	61
6.2 Otrzymywanie syntetycznych mRNA z wykorzystaniem transkrypcji <i>in vitro</i>	62
6.3 Mechanizmy powstawania dsRNA podczas transkrypcji <i>in vitro</i>	65
6.4 Metody detekcji dwuniciowych RNA w preparatach mRNA	66
7. Modyfikacje mRNA wpływające na efekt biologiczny cząsteczki.....	68
7.1 Regulacja immunogenności mRNA	68
7.2 Wpływ modyfikacji końca 5' na stabilność i potencjał translacyjny mRNA.....	70
7.3 Modyfikacje sekwencji niekodujących UTR	74
7.4 Modyfikacje sekwencji kodującej CDS	76
7.5 Wpływ modyfikacji ogona poli(A) na stabilność i potencjał translacyjny mRNA	77
8. Metody wprowadzania ogona poli(A) do mRNA powstałego na drodze IVT	79

8.1	Modyfikacje sekwencji nukleotydowej ogona poli(A)	83
8.2	Chemiczne modyfikacje ogona poli(A).....	85
9.	Termoforeza mikroskalowa w badaniach interakcji kwasów nukleinowych z białkami .	87
9.1	Podstawy termoforezy mikroskalowej- badania kompleksów biomolekuł	88
9.2	Pomiary tworzenia kompleksów za pomocą termoforezy mikroskalowej	92
9.3	Zastosowania termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań białek z RNA.....	94
III.	Badania własne.....	98
1.	Cele i plan badań	98
2.	Wybór układu pomiarowego i otrzymywanie reagentów do badań	100
3.	Synteza kapowanych cząsteczek RNA.....	100
3.1	Kanoniczne analogi końca 5' RNA	101
3.2	Niekanoniczne analogi końca 5' RNA	102
3.3	Modyfikacje w obrębie reszty 2'-adenozyny	103
3.4	Modyfikacje N6-adenozyny	105
3.5	Aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny	106
4.	Przygotowanie fluorescencyjnie znakowanego białka IFIT1	108
4.1	Ekspresja białka IFIT1.....	108
4.2	Oczyszczanie białka IFIT1	109
4.3	Identyfikacja białka IFIT1 metodą spektrometrii mas.....	113
4.4	Fluorescencyjne znakowanie białka IFIT1	114
5.	Badanie oddziaływania kapowanych cząstek RNA z IFIT1 metodą termoforezy mikroskalowej.....	114
5.1	Optymalizacja warunków pomiarowych	114
5.2	Optymalizacja sekwencji nukleotydowej ligandów RNA	116
5.3	Oddziaływanie kanonicznych analogów kapu RNA z IFIT1	120
5.4	Wiązanie niekanonicznych analogów kapu RNA z IFIT1	121
5.5	Pomiary dla trinukleotydowych analogów kapu RNA z IFIT1	122
5.6	Wiązanie analogów zawierających modyfikacje w pozycji 2'-adenozyny	122
5.7	Wiązanie analogów zawierających modyfikacje w pozycji N6-adenozyny.....	124
5.8	Wiązanie analogów zawierających aromatyczne modyfikacje w pozycji N6-adenozyny	126
5.9	Podsumowanie.....	128
6.	Wykrywanie dwuniciowych RNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem testu dot-blot	130
6.1	Optymalizacja procedury wykrywania dsRNA za pomocą testu dot-blot.....	131
6.2	Dobór kontroli pozytywnej w postaci markera dsRNA	132
6.3	Podsumowanie.....	134
7.	Modyfikowane sekwencje ogona poli(A), jako element rozwoju technologii mRNA do zastosowań terapeutycznych	135
7.1	Synteza cząsteczek mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poli(A)	136
7.2	Funkcjonalna charakterystyka <i>in vitro</i> , badanie poziomu ekspresji białka zmodyfikowanych 3'-	

końcowych mRNA w liniach komórkowych	146
7.3 Analiza Western blot dla zmodyfikowanych 3-końcowych mRNA	158
7.4 Funkcjonalna charakterystyka zmodyfikowanych 3'-końcowych mRNA <i>in vivo</i> w modelu mysim	159
7.5 Podsumowanie.....	169
IV. Podsumowanie badań własnych	172
V. Część eksperymentalna	177
Synteza kapowanych cząsteczek mRNA	177
Informacje ogólne.....	177
Synteza kapowanych RNA- kanoniczne analogi końca 5' RNA	177
Synteza kapowanych RNA- niekanoniczne analogi końca 5' RNA.....	178
Synteza kapowanych RNA- modyfikacje 2'-adenozyny.....	178
Synteza kapowanych RNA- modyfikacje N6-adenozyny	178
Synteza kapowanych RNA- aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny.....	179
Ekspresja i oczyszczanie białka IFIT1	179
Optymalizacja ekspresji białka IFIT1	179
Ekspresja i oczyszczanie IFIT1	180
Fluorescencyjne znakowanie białka IFIT1	181
Termoforeza mikroskalowa MST	181
Optymalizacja warunków pomiarowych.....	181
Pomiary bezpośredniego wiązania białko-ligand.....	182
Analiza danych dla pomiarów MST	182
Analiza dwuniciowych cząsteczek RNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem testu dot-blot	182
Przygotowanie testu dot-blot do wykrywania dwuniciowych RNA	182
Modyfikowane sekwencje 3'-końcowe ogona poli(A) mRNA.....	183
Przygotowanie wektorów plazmidowych DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi	183
Informacje ogólne.....	183
Przygotowanie oligonukleotydowych wstawek dla zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowymi	183
Przygotowanie wektorów plazmidowych do klonowania metodą na tępe końce	185
Reakcja ligacji, transformacja bakterii kompetentnych i selekcja pojedynczych klonów	186
Przygotowanie matryc DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi do reakcji transkrypcji <i>in vitro</i>	186
Analiza niestabilności ogonów poli(A) w wektorach plazmidowego DNA	187
Transkrypcja <i>in vitro</i> i oczyszczanie mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-koncowymi	187
Sekwencjonowanie NanoPore DRS	187
Formulacja mRNA w nanocząstkach lipidowych LNPs	188
Kontrola jakości LNPs z wykorzystaniem metody DLS.....	188

Pomiar stężenia mRNA w LNPs z wykorzystaniem testu RiboGreen	188
Funkcjonalna charakterystyka mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi <i>in vitro</i> , na podstawie poziomu ekspresji białek Fluc i mKate2 w liniach komórkowych.....	189
Analiza Western blot dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi.....	189
Funkcjonalna charakterystyka mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi <i>in vivo</i> , na podstawie poziomu ekspresji białka Fluc w modelu mysim	190
Badanie poziomu białka Fluc dla wyizolowanych organów <i>ex vivo</i>	190
Materialy biologiczne	190
Białko Polimeraza RNA T7.....	190
Makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego	191
VI. Bibliografia	192

Wykaz najważniejszych skrótów

APC – komórki prezentujące antygen, ang. *antigen-presenting cells*

ARCA – ang. *anti-reverse cap analog*

ARE – ang. *AU-rich elements*

ASO – ang. *antisense oligonucleotides*

ATP – 5'-trifosforan adenozyne

CCR4-Not – ang. *Carbon Catabolite Repression—Negative On TATA-less*

CBC – ang. *cap-binding complex*

cGAS – ang. *cyclic GMP-AMP synthase*

CRISPR-Cas9 – ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9*

CTL – cytotoksyczne limfocyty T, ang. *cytotoxic T lymphocytes, CD8+*

CTP – 5'-trifosforan cytozyny

CPSF – ang. *cleavage and polyadenylation specificity factor*

DAMP – ang. *damage-associated molecular patterns*

DcpS – ang. *decapping scavenger enzyme*

Dcp1/Dcp2 – ang. *decapping enzyme 1 and 2 complex*

dsRNA – dwuniciowy DNA, ang. *double stranded RNA*

DMD – ang. *Duchenne muscular dystrophy*

DTT – ditiotreitól, ang. *dithiothreitol*

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA – kwas wersenowy, ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*

eIF4E – eukariotyczny czynnik inicjujący translację, ang. *eukaryotic initiation translation factor 4E*

ELISA – ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMSA – ang. *electromobility shift assays*

EPO – erytropoetyna, ang. *erythropoietin*

ER – siateczka endoplazmatyczna, ang. *endoplasmic reticulum*

FCS – ang. *fluorescence correlation spectroscopy*

FDA – ang. *food and drug administration*

Fluc – lucyferaza robaczka świetojańskiego, ang. *firefly luciferase*

FPLC – ang. *fast protein liquid chromatography*

FRET – ang. *Förster resonance energy transfer*

gRNA – ang. *guide RNA*

GMP – dobra praktyka produkcyjna, ang. *good manufacturing practice*

GTP – 5'-trifosforan guanozyny

HBB – ludzka β -globina, ang. *human β -globin*

HER2 – ang. *human epidermal growth factor receptor 2*

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności, ang. *human immunodeficiency virus*

HuR – ang. *human antigen R*

HEPES – ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic*

IMAC – chromatografia powinowactwa do unieruchomionych jonów metali, ang. *immobilized metal affinity chromatography*

IPTG – izopropyl- β -D-tiogalaktozyd, ang. *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

IFIT – indukowane interferonem białko z powtórzeniami tetratrikopeptydowymi, ang. *interferon induced protein with tertricopeptide repeats*

IRES – ang. *internal ribosome entry sites*

IRFs – ang. *interferon regulatory factors*

ISG – ang. *interferon-stimulated genes*

ITC – ang. *isothermal titration calorimetry*

JAK-STAT – ang. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*

LB – ang. *Luria-Bertani medium*

LNA – ang. *locked nucleic acid*

LNP – nanocząstki lipidowe, ang. *lipid nanoparticles*

MDA-5 – ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*

MHC-I – cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I, ang. *major histocompatibility complex class I*

MNK – ang. *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase*

mRNA – informacyjne mRNA, ang. *messenger RNA*

MFE – minimalna energia swobodna, ang. *minimal free energy*

MST – termoforeza mikroskalowa, ang. *microscale thermophoresis*

mTOR – ssaczy cel rapamycyny, ang. *mammalian target of rapamycin*

NK – ang. *natural killer*

NLR – ang. *NOD-like receptors*

NRM – ang. *non-replicating mRNA vaccines*

NTP – 5'trifosforan dowolnego nukleozydu

ORF – otwarta ramka odczytu, ang. *open reading frame*

OXA1L – ang. *oxidase assembly 1-like*

PABP – białko wiążące ogon poliA, ang. *polyA-binding protein*

PABPN1 – jądrowe białko wiążące ogon poliA, ang. *nuclear poly(A)-binding protein*

PAGE – ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*

PAMP – ang. *pathogen-associated molecular patterns*

PAS – ang. *polyadenylation signal*

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *polymerase chain reaction*

PD-1 – receptor programowanej śmierci 1, ang. *programmed death-1*

PD-L1 – ligand receptora programowanej śmierci 1, ang. *programmed death- ligand 1*

PRR – receptory rozpoznawania wzorców, ang. *pattern recognition receptors*

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy ang. *quantitative polymerase chain reaction*

RBPs – białka wiążące RNA, ang. *RNA binding proteins*

RIG-I – ang. *retinoic acid-Inducible gene I*

RLR – ang. *RIG-I-like receptors*

RNA – kwas rybonukleinowy

RP-HPLC – ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*

RRL – ang. *Rabbit reticulocyte lysate*

RSV – ang. *respiratory syncytial virus*

SAM – S-adenozylo-L-metionina

SAM* – ang. *self-amplifying mRNA vaccines*

SMA – ang. *spinal muscular atrophy*

snRNA – małe jądrowe RNA, ang. *small nuclear RNA*

snRNP – małe rybonukleoproteiny, ang. *small ribonucleoprotein*

SPR – ang. *surface plasmon resonance*

STARmap – ang. *spatially-resolved transcript amplicon readout mapping*

STING – ang. *stimulator of interferon genes*

TALEN – ang. *transcription activator-like effector nucleases*

TCR – ang. *T-cell receptor*

TFF – ang. *tangential flow filtration*

TLR – ang. *Toll-like receptors*

TTP – ang. *tristetraprolin*

UTP – 5'trifsoforan uracylu

VEE – ang. *Venezuelan equine encephalitis*

ZFN – ang. *zinc finger nucleases*

3'/5' UTR – region 3'/5' niepodlegające translacji, ang. *untranslated region*

43S PIC – ang. *43S preinitiation complex*

Inne skróty zostały wyjaśnione w tekście

Dorobek naukowy

Publikacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy

- Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **An MST-based assay reveals new binding preferences of IFIT1 for canonically and non-canonically capped RNAs**, RNA-A PUBLICATION OF THE RNA SOCIETY, 2025, 22;31(2):181-192. doi: 10.1261/rna.080089.124;
- Tomasz Spiewła, Karol Czubak, Zofia Pileh, Marek Baranowski, Pawel Krawczyk, Seweryn Mroczek, Dominika Nowis, Jakub Golab, Andrzej Dziembowski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Development of polyA segmentation patterns that improve DNA sequence stability and augment mRNA translational activity – w przygotowaniu.**

Pozostałe publikacje

- Renata Kasprzyk, Tomasz Spiewła, Mirosław Smietanski, Sebastian Golojuch, Laura Vangeel, Steven De Jonghe, Dirk Jochmans, Johan Neyts, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **Identification and evaluation of potential SARS-CoV-2 antiviral agents targeting mRNA cap guanine N7-Methyltransferase**, ANTIVIRAL RESEARCH, 2021; 193(105142);
- Marcelina Bednarczyk, Jessica K. Peters, Renata Kasprzyk, Jagoda Starek, Marcin Warminski, Tomasz Spiewła, Jeffrey S. Mugridge, John D. Gross, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Fluorescence-Based Activity Screening Assay Reveals Small Molecule Inhibitors of Vaccinia Virus mRNA Decapping Enzyme D9**, ACS CHEMICAL BIOLOGY, 2022;17, 6, 1460–1471;
- Agnieszka Mlynarska-Cieslak, Mikołaj Chrominski, Tomasz Spiewła, Marek R. Baranowski, Marcelina Bednarczyk, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Fluorinated Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Analogues for Continuous Sulfotransferase Activity Monitoring and Inhibitor Screening by ¹⁹F NMR Spectroscopy**, ACS CHEMICAL BIOLOGY, 2022; 17, 3, 661–669;
- Marcin Warminski, Edyta Trepkowska, Mirosław Smietanski, Pawel J. Sikorski, Marek R. Baranowski, Marcelina Bednarczyk, Hanna Kedzierska, Bartosz Majewski, Adam Mamot, Diana Papiernik, Agnieszka Popielec, Remigiusz A. Serwa, Brittany A. Shimanski, Piotr Sklepkiwicz, Marta Sklucka, Olga Sokolowska, Tomasz Spiewła, Diana Toczydlowska-Socha, Zofia Warminska, Karol Wolosewicz, Joanna Zuberek, Jeffrey S. Mugridge, Dominika Nowis, Jakub Golab, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Trinucleotide mRNA Cap Analogue N6-Benzylated at the Site of Posttranscriptional m6Am Mark Facilitates mRNA Purification and Confers Superior Translational Properties In Vitro and In Vivo**, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2024, 146 (8149-8163, doi:10.1021/jacs.3c12629;
- Marcin Warminski, Katarzyna Grab, Kacper Szczepanski, Tomasz Spiewła, Joanna Zuberek, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **Photoactivatable mRNA 5' Cap Analogs for RNA-Protein Crosslinking**, ADVANCED SCIENCE, 2024; 11,36(2400994);
- Marcin Warminski, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Tomasz Spiewła, Joanna Zuberek, Karolina Drazkowska, Hanna Kedzierska, Agnieszka Popielec, Marek Baranowski, Marta Sklucka, Marcelina Bednarczyk, Mirosław Smietanski, Karol Wolosewicz, Bartosz Majewski, Remigiusz Serwa, Dominika Nowis, Jakub Golab, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **Trinucleotide cap analogs with triphosphate chain modifications: synthesis, properties, and evaluation as mRNA capping reagents**, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2024; 52,18 (10788-10809);

- Katarzyna Grab, Mateusz Fido, Tomasz Spiewła, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Aptamer-based assay for high-throughput substrate profiling of RNA decapping enzymes**, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2024; 52, 21 (e100);
- Piotr Surynt, Blazej Wojtczak, Mikolaj Chrominski, Joanna Panecka-Hofman, Karina Kwapiszewska, Tomasz Kalwarczyk, Dorota Kubacka, Tomasz Spiewła, Renata Kasprzyk, Robert Holyst, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **Trimethylguanosine cap-fluorescent molecular rotor (TMG-FMR) conjugates are potent, specific snurportin1 ligands enabling visualization in living cells**, ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, 2024; 22,33 (6763-6790);
- Paweł Krawczyk, Michał Mazur, Wiktoria Orzeł, Olga Gewartowska, Sebastian Jeleń, Wiktor Antczak, Karolina Kasztelan, Aleksandra Brouze, Katarzyna Matylla-Kulińska, Natalia Gumińska, Bartosz Tarkowski, Ewelina P. Owczarek, Kamila Affek, Paweł Turowski, Agnieszka Tudek, Małgorzata Sroka, Tomasz Spiewła, Monika Kusio-Kobiałka, Aleksandra Wesołowska, Dominika Nowis, Jakub Golab, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, Andrzej Dziembowski, Seweryn Mroczek, **Re-adenylation by TENT5A enhances efficacy of SARS-CoV-2 mRNA vaccines**, NATURE, 2025; *zaakceptowane*
- Adam Mamot, Małgorzata Wasinska-Kalwa, Karol Czubak, Katarzyna Frankowska, Tomasz Spiewła, Marcin Warminski, Dominika Nowis, Jakub Golab, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **Chemical circularization of in vitro transcribed RNA opens new avenues for circular mRNA design** – *w recenzji*;
- Mikolaj Chrominski, Marcin Warminski, Mateusz Kozarski, Dorota Kubacka, Joanna Panecka-Hofman, Tomasz Spiewła, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, **Proximity-induced SuFEx increases the potency of cytosolicnucleotidase inhibitors and reveals a rare example of covalently targeted histidine** - *w recenzji*.

Zgłoszenia patentowe

- Pierwszy autor zgłoszenia międzynarodowego PCT wynalazku pt.: „*RNA molecules with modified 3' terminal sequences and application thereof*”. Numer zgłoszenia: PCT/PL2024/050093. Znak: PZ/9951/RW/PCT, podmiot zgłaszający Sieć Badawcza Łukasiewicz PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii.

Wystąpienia konferencyjne

- 07.09.2024 XXV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Young Researchers Symposium, Tokyo University of Science, Japonia, **prezentacja ustna**, „An MST-based assay reveals new binding preferences of IFIT1 for canonically and non-canonically capped RNAs”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 03-06.09.2024, XXV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Tokyo University of Science, Japonia, **plakat naukowy**, „An MST-based assay reveals new binding preferences of IFIT1 for canonically and non-canonically capped RNAs”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 24.06.2023 Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, Chemical Biology and Clinical Applications of Nucleosides, and Oligomers, Gordon Research Seminar, Salve Regina, Newport, USA, **prezentacja ustna**, „Determining the affinity of various capped RNAs for the IFIT1 protein using microscale thermophoresis”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 25-30.06.2023 Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, Chemical Biology and Clinical Applications of Nucleosides, Nucleotides and Oligomers, Gordon Research Seminar, Salve Regina, Newport, USA, **plakat naukowy**, „Determining the affinity of various capped RNAs for the IFIT1 protein using microscale thermophoresis”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 01.09.2022 XXIV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Young Researchers Symposium, Karolinska University, Stockholm, Szwecja, **prezentacja ustna**, „Microscale thermophoresis-based assay for evaluating the interaction of IFIT1 with capped RNAs”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 28-31.08.2022 XXIV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Karolinska University, Stockholm, Szwecja, **plakat naukowy**, „Microscale thermophoresis-based assay for evaluating the interaction of IFIT1 with capped RNAs”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 30.08.2021-03.09.2021 Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki UW, **wirtualna prezentacja plakatowa**, „Ocena wpływu interakcji białka IFIT1 z analogami kapu RNA oraz kapowanymi RNA z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska;
- 22-25.08.2021 S3NA-IRT Virtual Symposium 2021, **wirtualna prezentacja plakatowa**, „Microscale thermophoresis-based assay for the evaluation of interaction of IFIT1 with RNA cap analogs and capped RNAs”, Tomasz Spiewła, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska.

Streszczenie

Rozwój narzędzi molekularnych opartych na technologii syntetycznych mRNA trwa nieprzerwanie od ponad 30 lat. Ciągłe udoskonalanie metod wytwarzania, przechowywania oraz dostarczania kwasów nukleinowych do komórek pacjenta przyczyniło się do rozpowszechnienia procedur medycznych opartych na RNA, w tym szczepionek mRNA oraz terapii genowych. Głównym problemem, który wciąż nie został w pełni rozwiązany jest niska stabilność RNA. W warunkach fizjologicznych mRNA jest stosunkowo szybko degradowane, a proces ten zwykle inicjowany jest na końcowych fragmentach cząsteczki. Naturalne mRNA posiada struktury ochronne na obu końcach, które regulują jego degradację i chronią regiony kodujące. W przeważającej większości dojrzałych mRNA eukariontów na końcu 5' znajduje się struktura kapu (czapeczki), natomiast na końcu 3' obecny jest ogon poli(A). Struktura czapeczki chroni mRNA przed 5'-egzonukleazami i wspomaga inicjację translacji, podczas gdy ogon poli(A) zabezpiecza cząsteczkę mRNA przed degradacją od końca 3', zwiększając jej stabilność, a także uczestniczy w procesie translacji, wpływając na wydajność procesu. Współdziałanie obu tych struktur pozwala na efektywną translację oraz regulację stabilności mRNA, co jest kluczowe dla jego funkcjonowania w komórkach eukariotycznych i potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Z tego powodu zarówno kap jak i ogon poli(A) stanowią interesujące cele do wprowadzania modyfikacji poprawiających stabilność i wydajność translacyjną mRNA, przy jednoczesnym zachowaniu niskiej immunogenności i bez zakłócania procesu syntezy białek. W ostatnich latach opracowano szereg nowych metod modyfikacji mRNA, które znacząco poprawiły jego aktywność biologiczną, co stało się podstawą do opracowania wielu terapii przeciwnowotworowych¹ oraz dalszych badań w tym obszarze, w tym również mojego projektu naukowego.

Pierwsza część niniejszej rozprawy dotyczy opracowania biofizycznej metody pozwalającej na badanie oddziaływań cząsteczek RNA zawierających różnorodne analogi kapu z białkiem IFIT1 (ang. *interferon induced protein with tertricopeptide repeats*), wykrywającym i neutralizującym egzogenne RNA w komórce. Celem tych badań było uzyskanie nowej wiedzy na temat rozpoznania syntetycznych mRNA przez ludzki układ immunologiczny i umożliwienie wykorzystania jej w projektowaniu terapeutycznych mRNA. W opracowanej metodzie wykorzystałem technikę termoforezy mikroskalowej, która umożliwiła precyzyjną analizę rozległego zakresu interakcji molekularnych. Zaprojektowana metoda posłużyła mi następnie do zbadania oddziaływań między białkiem IFIT1, a ponad czterdziestoma RNA ze zróżnicowanymi modyfikacjami strukturalnymi w obrębie regionu końca 5'. Szczegółowe badania umożliwiły określenie wpływu konkretnych modyfikacji chemicznych na specyficzne oddziaływanie z białkiem IFIT1, ale również pozwoliły na szersze scharakteryzowanie wzorców oddziaływania poszczególnych grup modyfikacji w badanym kompleksie molekularnym. Początkowe pomiary referencyjnych cząsteczek wykazały znaczące różnice w powinowactwie wirusowego wariantu RNA ze strukturą kap-0-RNA względem IFIT1, w porównaniu z ludzkim wariantem kap-1-RNA, co jest zgodne z danymi literaturowymi uzyskiwanymi przy użyciu innych metod pomiarowych. Kolejne badania skupiły się na modyfikacjach pierwszej transkrybowanej zasady, w tym wprowadzeniu grup metylowych w pozycjach 2' oraz N6, wskazując na synergistyczny efekt obniżenia powinowactwa do IFIT1 w zależności od ilości podstawień metylowych oraz ich rozmieszczenia we wspomnianych pozycjach. Pomiary obejmowały również modyfikacje w obrębie N7-metylguanozyny, ukazując znaczący wzrost powinowactwa dla wariantów zawierających zmieniony wzór metylacji tej struktury, co wskazało na wysokie znaczenie badanego regionu w wiązaniu z IFIT1. Z kolei szczegółowe analizy różnorodnych podstawników w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej zasady wykazały pewne schematy oddziaływania dla zbliżonych strukturalnie oraz rozmiarowo modyfikacji. Ten fakt podkreśla istotność nie tylko zastosowanej modyfikacji, ale również przestrzennej konformacji zmienionego regionu w kontekście jego interakcji z kieszenią wiążącą białka. Opracowana

metoda pozwoliła mi na wyselekcjonowanie kilkunastu analogów RNA, które wykazywały niższe powinowactwo do białka IFIT1 w porównaniu z RNA zawierającym kap-1. Właściwość ta może prowadzić do obniżonej immunogenności lub zmniejszonej podatności zmodyfikowanych cząsteczek mRNA na działanie wrodzonego układu odpornościowego, co ma istotne znaczenie dla ich zastosowań terapeutycznych.

Drugą część niniejszej rozprawy poświęciłem na opracowanie metody wykrywania molekuł dwuniciowego RNA (dsRNA, ang. *double stranded RNA*) w preparatach mRNA. Cząsteczki dsRNA wykazują silne właściwości immunogenne, ponieważ aktywują receptory wrodzonej odporności, co prowadzi do indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej. Ich obecność w syntetycznych preparatach mRNA może wywoływać niepożądane reakcje immunologiczne u pacjentów, takie jak nadmierne stany zapalne, a także obniżać skuteczność terapeutyczną mRNA poprzez redukcję stabilności oraz efektywności translacji. Przygotowanie tej metody oparłem na szybkim i wysokoprzepustowym immunoteście typu dot-blot. Bazując na specyficznych względem dsRNA przeciwciałach, skonstruiowałem czuły i powtarzalny system detekcji dwuniciowych RNA, który umożliwiał szacunkowe określanie ich zawartości na różnych etapach procesu przygotowania mRNA. Opracowane rozwiązanie przetestowano na szerokim spektrum preparatów mRNA syntezowanych w laboratorium badawczym Explora Therapeutics i wdrożono do standardowych procedur kontroli jakości w firmie.

Trzecia część projektu doktorskiego obejmowała opracowanie modyfikacji strukturalnych w regionie ogona poli(A), które miały dwa główne zadania: (i) zwiększenie stabilności sekwencji poli(A) na poziomie DNA poprzez ograniczenie zjawiska skracania tego regionu w procesie amplifikacji wektorów plazmidowych w bakteriach oraz (ii) zwiększenie potencjału translacyjnego molekuł mRNA zawierających te modyfikacje z perspektywą ich terapeutycznego wykorzystania. W tym celu do sekwencji poli(A) wprowadzałem różnorodne układy heteronukleotydów, tworząc zmodyfikowane ogony o budowie modułowej. Zaprojektowane konstrukty genetyczne wklonowałem do wektorów plazmidowych, co umożliwiło ich efektywną amplifikację. Aby dogłębnie przeanalizować uzyskane modyfikacje, wprowadziłem je do różnorodnych genów reporterowych, takich jak lucyferaza świetlikowa (Fluc), fluorescencyjne białko o krótkim czasie półtrwania (mKate2_PEST) oraz erytropoetyna (EPO). Uzyskane matryce DNA posłużyły do syntezy kilkunastu wariantów mRNA z modularnym układem ogona poli(A) dla każdego z tych genów. Aktywność biologiczną, w tym potencjał translacyjny molekuł badano *in vitro* na czterech modelach komórkowych przy wykorzystaniu zarówno ludzkich, jak i mysich linii komórkowych. Zidentyfikowałem trzy wzory modyfikacji ogona poli(A) w mRNA, które skutkowały kilkukrotnym zwiększeniem produkcji białek reporterowych w porównaniu z niemodyfikowaną sekwencją. Wyselekcjonowane warianty poddano następnie badaniom *in vivo* z wykorzystaniem modelu mysiego. Jedna z modyfikacji, zawierająca heteronukleotydy cytozynowe, wykazała istotnie wyższą produkcję białka zarówno dla reportera lucyferazy, jak i erytropoetyny. Wyniki tych badań wskazały tę modyfikację jako najbardziej obiecującą w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

Opracowana przeze mnie biofizyczna metoda oceny powinowactwa cząsteczek RNA zawierających modyfikowane analogi kapu do białka IFIT1, może przyczynić się do dokładniejszej charakterystyki syntetycznych kapów oraz usprawnić proces ich selekcji w kontekście terapii mRNA. Z kolei stworzona metoda detekcji dsRNA w preparatach mRNA umożliwia szybką i ekonomiczną analizę zawartości immunogennych zanieczyszczeń w procesie produkcji mRNA, co jest kluczowe dla skutecznej kontroli jakości. Wyselekcjonowane modyfikacje ogona poli(A) wykazujące istotnie wyższy potencjał translacyjny, jak również lepszą stabilność na poziomie DNA, mają wysoki potencjał do zastosowania w terapeutycznych mRNA. Podsumowując, opracowane modyfikacje i metody umożliwiają udoskonalenie technologii mRNA, otwierając nowe możliwości dla dalszych badań nad zastosowaniem mRNA w medycynie.

I. Cel pracy

Zarówno znajdujący się na końcu 5' RNA kap, jak i 3'-końcowy ogon poli(A) stanowią kluczowe elementy strukturalne niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania cząsteczki mRNA, szczególnie w odniesieniu do jej stabilności, translacji oraz ochrony przed degradacją. Jednocześnie istniejące rozwiązania w obrębie tych struktur nie spełniają wymagań, jakie przed technologią mRNA stawiają zastosowania terapeutyczne, a w szczególności walka z nowotworami. Dlatego coraz częściej podejmowane są próby modyfikacji obu końców cząsteczki mRNA, a także ulepszone są metody oceny jakości oraz kontroli procesu produkcji preparatów mRNA. Wysoki potencjał terapeutyczny mRNA wynika z jego udziału w licznych procesach komórkowych, mimo naturalnej podatności na szybki rozkład. Z tego powodu kluczowe jest precyzyjne modyfikowanie zarówno końców, jak i sekwencji mRNA, aby zwiększyć jego stabilność i efektywność terapeutyczną. Wprowadzanie strukturalnych modyfikacji w mRNA wymaga opracowania zaawansowanych metod umożliwiających dokładne monitorowanie ich wpływu na mechanizmy odpowiedzialne za metabolizm kwasów nukleinowych w komórce. Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie było kilkupoziomowe usprawnienie funkcjonowania cząsteczek mRNA, jako narzędzi terapeutycznych poprzez osiągnięcie trzech założeń:

- (i) opracowanie metody oceny potencjalnej immunogenności cząsteczek RNA zakończonych różnymi analogami kapu na podstawie ich oddziaływania z białkiem IFIT1,
- (ii) opracowanie metody umożliwiającej detekcję dwuniciowych cząsteczek RNA w preparatach mRNA oraz
- (iii) opracowanie modyfikacji sekwencji poli(A) nadających zwiększony potencjał translacyjny mRNA.

Pierwszą część projektu doktorskiego dotyczyła analizy interakcji pomiędzy kapowanymi cząsteczkami RNA, a ludzkim białkiem immunologicznym IFIT1. Przeprowadzenie tych badań wymagało otrzymania rekombinowanego białka IFIT1 oraz syntezy kapowanych cząsteczek RNA, jak również potwierdzenia odpowiedniej jakości oraz aktywności obu składników. Następnym krokiem była optymalizacja metody bazującej na termoforezie mikroskalowej do oceny powinowactwa cząsteczek RNA do IFIT1. Kluczowym etapem były pomiary interakcji białka IFIT1 z różnorodnie kapowanymi cząsteczkami RNA oraz analiza porównawcza tych oddziaływań.

Druga część projektu skupiała się na skonstruowaniu testu umożliwiającego tanią i szybką ocenę zawartości dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) powstałych w trakcie syntezy mRNA. Opracowanie tej metody, bazującej na technice dot-blot, wymagało przeprowadzenia szeregu optymalizacji sposobu wykonania testu oraz zastosowanych odczynników, wykorzystując do tego specyficzne względem dsRNA przeciwciała. Kolejnym krokiem był dobór standardu dsRNA zapewniającego szeroki przedział detekcji dwuniciowych cząsteczek RNA. Końcowym krokiem było opracowanie strategii wdrożenia tej metody do procedur firmy Explorna Therapeutics.

Trzecia część projektu doktorskiego dotyczyła analizy aktywności biologicznej modyfikacji końca 3' mRNA, czyli ogona poli(A). Przeprowadzenie tych badań wymagało w pierwszej kolejności otrzymania plazmidów DNA kodujących mRNA z odpowiednio zmodyfikowanymi sekwencjami. Następnie, konieczne było otrzymanie syntetycznych mRNA metodą transkrypcji *in vitro*, ich oczyszczenie i potwierdzenie struktury oraz odpowiedniej jakości. Kluczowym etapem badań było określenie potencjału translacyjnego otrzymanych mRNA w różnych układach eksperymentalnych.

Prace badawcze prowadziłem w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW, w zakładzie Biofizyki IFD, Wydziału Fizyki UW oraz w firmie Explorna Therapeutics. Ilustracje zamieszczone w pracy zostały stworzone przez autora tej rozprawy, o ile nie wskazano inaczej.

II. Część literaturowa

1. Wstęp

Amerykański mikrobiolog, Carl Richard Woese, w 1967 roku przedstawił w książce *The genetic code: the molecular basis for genetic expression*² hipotezę mówiącą o podwójnej roli kwasów rybonukleinowych (RNA), jako nośników informacji genetycznej oraz katalizatorów reakcji. Dowodów popierających tę hipotezę dostarczył 14 lat później amerykański chemik, Thomas Cech, który odkrył samoistne wycinanie intronów z pewnych prekursorowych RNA, potwierdzając autokatalityczną naturę tego procesu zachodzącego bez pomocy białek. Owe odkrycie przemawiało za stwierdzeniem, że pierwszą „żywą cząsteczką” w historii naszej planety mogła być cząsteczka RNA zdolna do katalizowania własnej replikacji bez udziału białek. W 1986 roku Walter Gilbert, amerykański fizyk, chemik i biolog, nazwał teorię głoszącą rozpoczęcie życia na Ziemi od cząsteczek RNA, światem RNA. Przedstawił on założenia hipotezy, zgodnie z którymi w wodnym roztworze prostych cząsteczek organicznych, zwanej czasem zupą pierwotną (ang. *primordial soup*), nukleotydy spontanicznie łączyły się ze sobą, tworząc cząsteczki RNA. Te z nich, które przejawiały stabilną strukturę, jak i aktywność katalityczną były w stanie powielać same siebie. Autoreplikujące się molekuly RNA ewoluowały na drodze mutacji oraz rekombinacji, wykształcając nowe funkcje i zdolności. Cząsteczki RNA zaczęły syntezować białka, cechujące się znacznie lepszymi właściwościami enzymatycznymi. Enzymy białkowe stymulowały rozwój złożoności struktur powstających związków organicznych, doprowadzając również do powstania kwasów deoksyrybonukleinowych (DNA), pełniących rolę niemal doskonałych repozytoriów informacji genetycznej. Z czasem RNA utraciło swoją wiodącą rolę w ewolucji (przed powstaniem organizmów żywych) na poczet własnych tworców – białek oraz DNA, które wykazywały podwyższoną efektywność wykonywania wyspecjalizowanych funkcji, pierwotnie spełnianych przez cząsteczki RNA. Charakterystyka molekuł RNA wskazuje na to, że mogły zapoczątkować życie na naszej planecie, dlatego też tak wielu zwolenników popiera hipotezę świata RNA.³ Niemniej jednak ta idea wciąż pozostaje jedynie hipotezą naukową, która wymaga jednoznacznego potwierdzenia.

Od czasów wspomnianych prac tych wybitnych myślicieli i badaczy minęło już blisko czterdzieści lat obfitujących w rozwój wszelakich dziedzin nauki. Skokowemu rozwojowi uległa technologia, pozwalająca na głębszy wgląd w funkcjonowanie procesów fizjologicznych oraz ich patologie, prowadzące do chorób. Na przestrzeni lat powstała imponująca liczba terapii leczniczych opartych na stabilnych związkach wykorzystujących białka oraz DNA. Zastosowanie modyfikacji ekspresji genów, jak również rekombinowanych białek w terapiach doprowadziło do wyleczenia milionów żywych istot. Co istotne, zaawansowane metody badawcze umożliwiły wykorzystanie w terapiach również mniej stabilnych struktur, jakimi są cząsteczki RNA. Molekuly te wykazują znaczący potencjał w naprawie patofizjologii procesów biologicznych, jak również prewencji chorób zakaźnych, czego doskonałym przykładem są – wykorzystywane m.in. w szczepionkach przeciwwirusowych – mRNA, czyli informacyjne RNA (ang. *messenger RNA*). mRNA to fundamentalna biomolekuła dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Jest pośrednikiem w przekazie informacji genetycznej, stanowiąc kopię genów zawartych w DNA. Cząsteczki mRNA w organizmach eukariotycznych powstają przede wszystkim w jądrze komórkowym w trakcie procesu transkrypcji, czyli przepisywania sekwencji nukleotydowej z trwałego i stabilnego nośnika (DNA) na cząsteczki bardziej dynamiczne (mRNA). Następnie dochodzi do modyfikacji potranskrypcyjnych prowadzących do dojrzałej formy mRNA, które opuszcza jądro komórkowe i trafia do cytoplazmy, gdzie pełni swoją główną funkcję biosyntezy białek w procesie translacji. Cząsteczki mRNA zawierają na końcach 3' i 5' szczególne formacje ochronne, zapewniające prawidłowe dojrzewanie, transport wewnątrzkomórkowy, wydajną translację oraz finalnie degradację tych molekuł. Na końcu

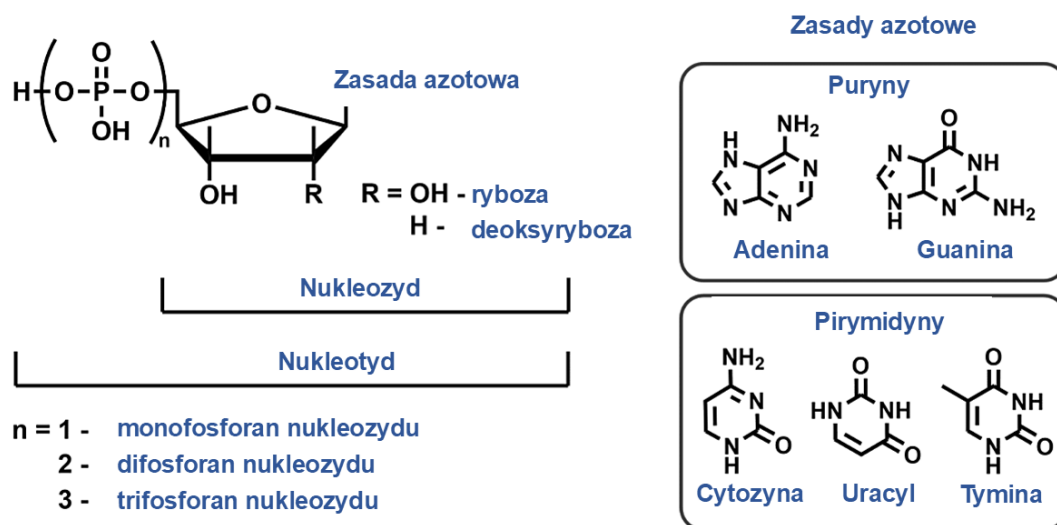
5' większości eukariotycznych mRNA znajduje się specyficzna struktura, tzw. kap (ang. *cap*). Jest to cząsteczka 7-metyloguanozyny połączona wiązaniem 5',5'-trifosforanowym z następnym nukleozydem, który często jest zmetylowany na atomie tlenu w pozycji 2' pierścienia rybofuranozowego. Struktura kapu przedstawiana skrótowo jako m⁷GpppN, pełni podstawową rolę w procesie inicjacji translacji, jak i ochronie przed degradacją, czyli krytycznym etapie regulacji ekspresji genów. Na końcu 3' większości eukariotycznych mRNA zlokalizowany jest niekodujący motyw kilkudziesięciu do nawet kilkuset adenozyń połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi, zwanych ogonem poli(A). Struktura ta odgrywa kluczową funkcję w procesach metabolizmu mRNA, regulując potencjał translacyjny jak i wpływając na stabilność i strukturę drugorzędową molekuly. Zarówno 5'-kap jak i 3'-ogon poli(A) biorą udział w licznych procesach biologicznych i są nieodzowną częścią prawidłowego funkcjonowania molekuł mRNA. Wykorzystanie mRNA w terapiach wymaga wprowadzania licznych modyfikacji, wpływających na biologiczny efekt działania tych cząsteczek. To z kolei tworzy potrzebę prowadzenia badań w zakresie doskonalenia tej technologii oraz jej wpływu na organizmy żywe.

Część literaturowa niniejszej rozprawy zawiera podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego tematyki badań prowadzonych w trakcie projektu doktorskiego. Jej celem jest zaprezentowanie czytelnikowi tła moich badań, zaczynając od podstawowej roli kwasów nukleinowych w organizmach, a kończąc na rozwoju technologii terapeutycznego mRNA. W pierwszej części szczegółowo omówiono strukturę kwasów nukleinowych oraz ich funkcję w komórce, poruszono etapy syntezy, dojrzewania i poliadenylacji cząsteczek RNA, jak również przemiany metaboliczne tych molekuł, wliczając translację i degradację RNA. Następnie przedstawiono białka bezpośrednio oddziałujące z ogonem poli(A) cząsteczki mRNA oraz kompleksy białkowe zaangażowane w proces deadenylacji. W kontekście tej pracy szczególnie istotne jest działanie ludzkiego układu immunologicznego oraz jego rola w wykrywaniu i przetwarzaniu obcych cząsteczek kwasów nukleinowych w komórkach. W dedykowanym rozdziale omówiono mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej człowieka, przedstawiając kluczowe receptory rozpoznające kwasy nukleinowe w komórkach oraz białka indukowane przez interferon, w tym rodzinę białek IFIT, ze szczególnym uwzględnieniem białka IFIT1. W osobnym rozdziale przedstawiono syntetyczne molekuly mRNA w kontekście ich zastosowań terapeutycznych, w tym terapii genowych, edycji genów, ale przede wszystkim szczepionek mRNA, zarówno przeciw wirusom jak i szczepionek przeciwnowotworowych. W kolejnej części skupiono się na wpływie modyfikacji mRNA na aktywność biologiczną cząsteczki, poruszając temat regulacji immunogenności, stabilności oraz efektywności translacyjnej. Osobny fragment poświęcono modyfikacjom ogona poli(A) mRNA oraz ich wpływu na stabilność i potencjał translacyjny, szczegółowo przedstawiając nukleotydowe modyfikacje sekwencji ogona poli(A) mRNA. Bazując na najnowszych publikacjach przedstawiono metody modyfikacji końca 3' syntetycznych mRNA, jak również najpowszechniej stosowane techniki enzymatycznej syntezy RNA, które wykorzystano w trakcie realizacji moich badań. Ponadto, omówiono genozę powstawania immunogennych dwuniciowych RNA w procesie produkcji mRNA oraz metody ich detekcji. Na zakończenie przedstawiono metodę termoforezy mikroskalowej, której użyłem do badania interakcji między białkiem IFIT1, a różnorodnie kapowanymi RNA. Opisane zostały teoretyczne podstawy, jak również literaturowe przykłady wykorzystania tej techniki do pomiarów szerokiej gamy oddziaływań kompleksów biomolekularnych, w tym białko-RNA.

2. Kwasy nukleinowe

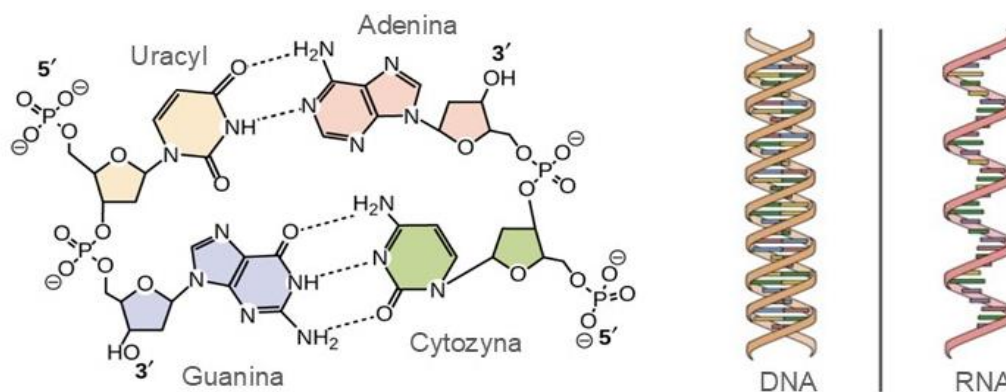
2.1 Budowa kwasów nukleinowych

Kwasy rybonukleinowe (RNA) oraz kwasy deoksyrybonukleinowe (DNA) są biopolimerami zbudowanymi z monomerycznych jednostek zwanych nukleotydami, przenoszą one informację genetyczną, która jest odczytywana w komórkach w celu wytworzenia RNA i białek, umożliwiając funkcjonowanie istot żywych. Nukleotydy składają się z cukru prostego (pentozy) odpowiednio rybozy w RNA oraz deoksyrybozy w DNA, połączonego wiązaniem β -N-glikozydowym z zasadą azotową oraz co najmniej jednej grupy fosforanowej. Taki układ strukturalny sprawia, że nukleotydy zalicza się do grupy estrów fosforanowych nukleozydów. Fosforylacja nukleozydów może zachodzić kilkukrotnie, co przekłada się na występowanie w naturze zarówno form monofosforanowych, jak i di- i trifosforanowych. Ugrupowanie fosforanowe przyłączone jest najczęściej do tlenu w pozycji 5' pentozy za pośrednictwem wiązania estrowego (Rys. 1).



Rysunek 1 Struktura nukleotydów tworzących RNA. Zasady azotowe budujące DNA i RNA

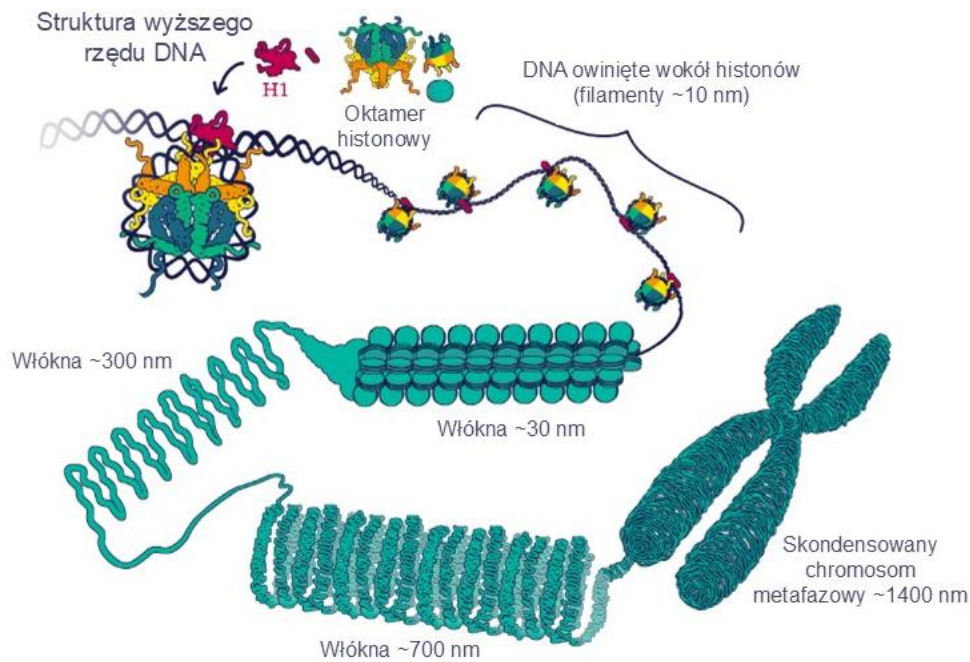
Podstawowymi elementami budującymi kwasy nukleinowe zarówno RNA jak i DNA są wspomniane 5'-fosforany nukleozydów. Wyróżniamy dwie główne grupy naturalnych odmian nukleotydów, różniących się strukturą tworzących je zasad azotowych. Pierwszą stanowią zasady purynowe (imidazolopirymidynowe) do których należą adenina (A) i guanina (G), a drugą- zasady pirymidynowe, czyli cytozyna (C), tymina (T) i uracyl (U). Elementem łączącym ogniwa w łańcuchu biopolimeru DNA i RNA jest wiązanie 5',3'-fosfodiesterowe występujące pomiędzy jednostkami cukrowymi (rybozy/deoksyrybozy) kolejnych nukleozydów w sekwencji. Molekuły DNA występują najczęściej w postaci podwójnej helisy, czyli struktury złożonej z dwóch antyrównoległych nici nukleotydów zwijających się wokół wspólnej osi. Za stabilizację tego układu odpowiadają przede wszystkim wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi nukleotydów w przeciwległych łańcuchach oraz oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami sąsiadujących nukleotydów w tej samej nici. Wiązania wodorowe tworzą się pomiędzy odpowiadającymi sobie zasadami azotowymi, które tworzą w ten sposób pary, zwane parami Watsona-Cricka. W cząsteczkach DNA występują pary A=T oraz G=C, z kolei w RNA tyminę zastępuje uracyl, tworząc pary A=U i G=C. Te kanoniczne pary odpowiadają za wzmocnienie struktury podwójnej helisy DNA oraz za tworzenie struktur drugorzędowych w RNA (Rys. 2).



Rysunek 2 Struktura fragmentu RNA z zasadami azotowymi i wiązaniami wodorowymi. Porównanie podwójnej helisy DNA oraz jednoniciowego RNA. Rysunek zaadaptowano z DNA chemical structure⁴

Istnieją również rzadziej występujące, niekanoniczne pary zasad azotowych charakteryzujące się zazwyczaj niższą stabilnością w porównaniu do kanonicznych par, co wpływa na strukturalną i funkcjonalną różnorodność kwasów nukleinowych. Do tej grupy zaliczamy pary Hoogsteena w których jedna zasada azotowa (zazwyczaj puryna) obraca się wokół swojego pierścienia i tworzy dodatkowe wiązania z inną zasadą azotową. Ten rodzaj wiązań może występować w strukturach drugorzędowych RNA i DNA, a zwłaszcza w przypadku guaniny i adeniny (G-A, A-A, G-G, G-T). W związku z tym, pary Hoogsteena stanowią jeden z mechanizmów pozwalających na powstawanie nietypowych struktur kwasów nukleinowych, takich jak G-kwadrupleksy (ang. *G-quadruplexes*). G-kwadrupleksy z kolei są strukturami składające się z zestawu guanin, gdzie guaniny tworzą stosy na podstawie nietypowych par Hoogsteena, co prowadzi do złożonych struktur trójwymiarowych takiego motywu. DNA przyjmuje różne formy helis, z których najbardziej rozpowszechnione to B-DNA, A-DNA i Z-DNA. B-DNA to standardowa forma DNA, powszechnie występująca w warunkach fizjologicznych, charakteryzująca się prawoskrętną helisą. Jest wysoce stabilna i dominuje w komórkach. Alternatywna forma A-DNA, pojawia się w specyficznych warunkach, takich jak np. zmniejszona wilgotność. Jej helisa jest krótsza i szersza niż w B-DNA, również w prawoskrętnej konfiguracji. Z-DNA to rzadka forma DNA, występująca przy wysokim naprężeniu i w sekwencjach nukleotydów bogatych w cytozynę i guaninę, jej helisa jest lewoskrętna i cechuje się mniejszą stabilnością niż pozostałe formy.

Całkowita długość ludzkiego DNA (genomu) wynosi ponad 3 miliardy par zasad. Składają się na to 24 różne chromosomy, w tym autosomy (chromosomy 1-22), chromosomy płciowe X i Y oraz mitochondrialne DNA. Aby taki materiał genetyczny zmieścił się w komórce, musi być wysoce skondensowany. Proces pakowania DNA u eukariontów odbywa się na kilku poziomach strukturalnych, a u jego podstawy znajduje się nukleosom, czyli podstawowa struktura kondensacji DNA. Nukleosom zawiera DNA owinięty niemal dwukrotnie wokół oktameru histonowego, zawierającego po dwie kopie białek histonowych H2A, H2B, H3 i H4, wiążąc fragment DNA o długości około 147 par zasad. Sąsiadujące nukleosomy są ze sobą związane krótkimi fragmentami DNA, co tworzy długie nici chromatyny włóknistej. Włókna o średnicy 30 nm ulegają dalszym skrętom, tworząc bardziej skondensowane struktury pętli chromosomowych o średnicy 300 – 700 nm. Pętle te są przypinane do struktur jądrowych, tworząc trójwymiarową organizację chromosomów w jądrze (Rys. 3). Podczas podziału komórkowego, chromatyna ulega maksymalnej kondensacji, tworząc widoczne pod mikroskopem chromosomy. Chromosomy są kluczowe dla segregacji genów podczas mitozy i mejozy, umożliwiając równomierne rozdzielenie materiału genetycznego między komórki potomne w procesie replikacji DNA. Z kolei proces przekształcania informacji genetycznej zapisanej w DNA na funkcjonalne cząsteczki RNA nazywamy transkrypcją.



Rysunek 3 Organizacja struktury DNA wyższego rzędu, rysunek na podstawie Mehta⁵

2.2 Transkrypcja DNA

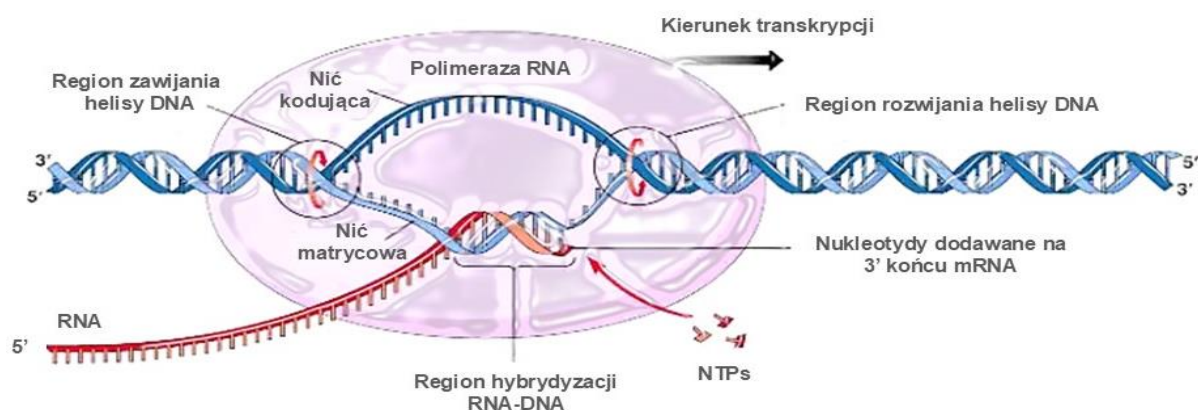
Proces transkrypcji DNA w komórkach eukariotycznych odbywa się w jądrze komórkowym. W trakcie transkrypcji genu, polimeraza RNA wiąże się do promotora genu i rozwija zwoje helisy DNA, tworząc pęcherzyk transkrypcyjny. Każdy dodany do rosnącego łańcucha nukleotyd sprawia, że pęcherzyk transkrypcyjny i heterodupleks DNA-RNA poruszają się względem matrycy DNA. Transkrypcja prowadzi do utworzenia pierwotnej formy mRNA (pre-mRNA). Na tym etapie dochodzi do dodania struktury tzw. czapeczki/kapu na końcu 5' (kaping). Następnie pre-mRNA przekształcana jest w dojrzałą formę mRNA (Rys. 4). Ten proces obejmuje usunięcie niekodujących sekwencji, zwanych intronami (ang. *splicing*) oraz dodanie sekwencji poli(A) na końcu 3' mRNA. Po uzyskaniu dojrzałej formy, mRNA jest eksportowane do cytoplazmy, aby umożliwić syntezę białek w procesie translacji. Również w cytoplazmie mRNA ulega procesowi degradacji, jako część regulacji ekspresji genów.



Rysunek 4 Budowa dojrzałego eukariotycznego mRNA

Wspomniany proces transkrypcji rozpoczyna się od inicjacji, w trakcie której białka regulatorowe, znane jako podstawowe czynniki transkrypcyjne, rozpoznają i wiążą się z sekwencjami promotorowymi w obrębie DNA, umożliwiając precyzyjne zlokalizowanie punktu startowego dla polimerazy RNA. Istnieje wiele różnych czynników transkrypcyjnych, które kontrolują ekspresję konkretnych genów. Niektóre czynniki aktywują transkrypcję (aktywatory), pomagając podstawowym białkom regulatorowym oraz polimerazie RNA związać się z promotorem. Inne czynniki transkrypcyjne hamują transkrypcję (represory), wchodząc w miejsce podstawowych czynników transkrypcyjnych lub polimerazy RNA i uniemożliwiają wiązanie z promotorem. W modelowym układzie, po połączeniu czynników transkrypcyjnych z promotorem następuje rekrutacja polimerazy RNA II, co prowadzi do

utworzenia kompleksu pre-inicjacyjnego, w którego skład wchodzi również inne białka pomocnicze, w tym TFIID oraz TFIIB. Kluczowym elementem polimerazy RNA II jest podjednostka RPB1, która zawiera miejsce aktywne odpowiedzialne za syntezę cząsteczki RNA.⁶ Podczas inicjacji transkrypcji, polimeraza RNA II łączy się z kompleksem pre-inicjacyjnym, a następnie przemieszcza się wzdłuż matrycy DNA, syntetyzując łańcuch RNA z wykorzystaniem trifosforanów nukleozydów jako bloków budulcowych. Podczas syntezy RNA zasada azotowa w dobudowywanym trifosforanie nukleozydu łączy się w parę z zasadą w matrycy DNA, powstaje wiązanie fosfodiesterowe, a jako produkt uboczny uwalniany jest pirofosforan. Polimeraza RNA syntetyzuje RNA w kierunku od 5' do 3', ponieważ może dodawać nukleotydy tylko do 3' końca łańcucha.⁷ Proces elongacji przebiega bardzo dynamicznie, a polimeraza RNA II musi dokładnie identyfikować i wybierać właściwe nukleotydy dołączane do rosnącego łańcucha RNA w tempie określonym przez kinetykę enzymatyczną. Jest to możliwe dzięki białkowym czynnikom elongacyjnym, które współdziałając z polimerazą RNA, zapewniając stabilność kompleksu i wpływając na jego procesywność. Zakończenie transkrypcji prowadzi do dysocjacji polimerazy RNA od matrycy DNA i uwolnienia niedojrzałej cząsteczki mRNA (pre-mRNA). W trakcie elongacji transkryptu, kompleks kapujący przyłącza się do C-końcowej domeny (CTD) polimerazy RNA II, umożliwiając dodanie struktury kapu do 5'-końca nowo powstającego RNA, co jest kluczowe dla stabilności transkryptu i jego dalszego przetwarzania.

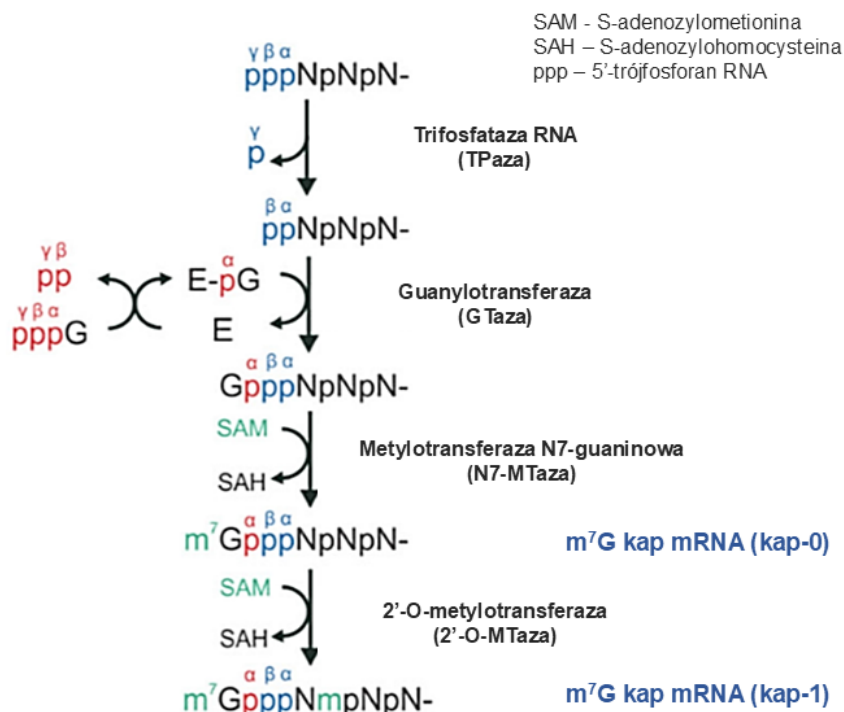


Rysunek 5 Proces transkrypcji DNA: Polimeraza RNA syntetyzuje RNA na podstawie nici matrycowej DNA. Helisa DNA rozwija się, a nowo powstające RNA jest wydłużane w kierunku 5' do 3'. Rysunek zapożyczony z Salmond⁸

2.3 Dojrzewanie mRNA

Prekursorowy mRNA ulega następnie serii przemian, prowadzących do dojrzałej formy mRNA, która jest transportowana na zewnątrz jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie inicjuje proces translacji. Dojrzewanie mRNA stanowi złożony zestaw molekularnych wydarzeń, które są kluczowym etapem ekspresji genów, umożliwiając przekształcenie surowego transkryptu pre-mRNA w funkcjonalną cząsteczkę. Podczas syntezy mRNA, już na etapie ko-transkrypcyjnym, dochodzi do istotnego procesu zwanego kapingiem, który polega na dołączeniu 7-metyloguanozyny poprzez mostek 5',5'-trifosforanowy na końcu 5' nowo tworzonego łańcucha mRNA.⁹ Proces ten rozpoczyna się w momencie dodania kilkudziesięciu nukleotydów do rosnącego łańcucha mRNA i obejmuje kilka etapów, angażując trzy kluczowe aktywności enzymatyczne. Mechanizm ten inicjowany jest przez rozpoznanie specyficznych sekwencji nukleotydowych w obrębie 5' końca transkryptu. Pierwszy krok, realizowany przez enzym 5'-trifosfatazę RNA (TPaza), polega na usunięciu γ -fosforanu z pierwszego nukleotydu transkryptu, pozostawiając 5'-difosforan. Następnie, guanylylotransferaza (GTaza), główny enzym katalizujący tę reakcję, przenosi GMP z GTP na 5' koniec, tworząc strukturę 5' GpppNRNA 3' (z "N" oznaczającym pierwszą nukleozydową jednostkę). Finalnym etapem tego procesu jest

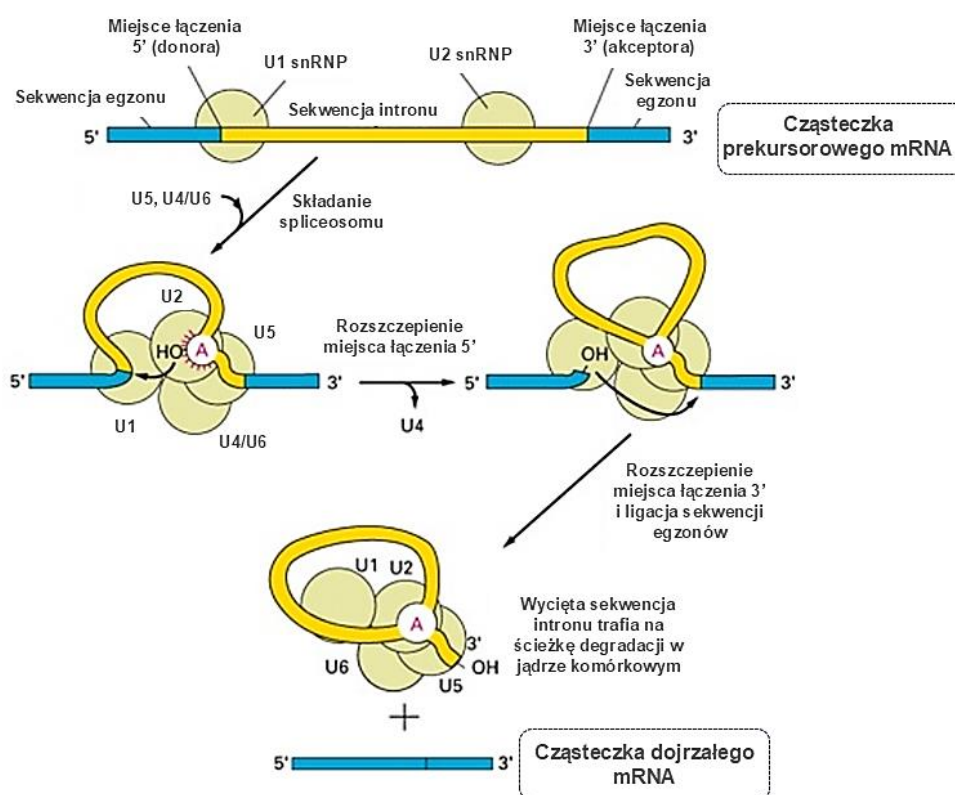
metylacja guaniny w pozycji N7 przez enzym metylotransferazę N7-guaninową (N7-MTazę), współdziałającą z kofaktorem S-adenozyl-L-metioniną (SAM).¹⁰ SAM pełni rolę donora grupy metylowej, która zostaje przeniesiona na guaninę na 5' końcu transkryptu, tworząc 7-metyloguanozynową czapeczkę (m⁷G), czyli kap. Powstała w ten sposób struktura m⁷GpppN nazywana jest kap-0 (Rys. 6).¹¹



Rysunek 6 Schemat syntezy kapu 5' RNA. Rysunek na podstawie pracy Cao ¹¹

W niektórych przypadkach, kap może być dalej modyfikowany przez metylację w pozycji 2'-OH pierwszego nukleotydu (tworząc kap-1) lub drugiego nukleotydu (tworząc kap-2), a także przez metylację w pozycji N6 zasady, jeśli pierwszym nukleotydem jest 2'-O-metyloadenozyna, co prowadzi do powstania wariantu m⁶A_m.¹² Procesy te zachodzą sekwencyjnie i są zależne od aktywności specyficznych enzymów modyfikujących, takich jak metylotransferazy, które są rekrutowane w odpowiednich etapach „życia” mRNA. Na przykład, podstawowa metylacja w pozycji 2'-O (kap-1) zachodzi w jądrze zaraz po dodaniu struktury kapu, natomiast kolejne modyfikacje, takie jak metylacja w pozycji N6 (m⁶A_m), mogą mieć miejsce później, już w cytoplazmie, podczas dojrzewania lub translacji mRNA. Te przestrzenno-czasowe różnice pozwalają na dynamiczne dostosowanie struktury kapu do potrzeb regulacyjnych komórki. Kap pełni wiele kluczowych funkcji w dojrzewaniu mRNA i w późniejszych etapach ekspresji genów, chroni końce 5' transkryptów przed 5'-egzonukleazami, czyli enzymami degradującymi cząsteczki RNA poprzez odcinanie kolejnych nukleotydów. Stanowi to istotne zabezpieczenie przed przedwczesnym rozpadem mRNA. Czapeczka pełni rolę sygnału inicjacyjnego podczas procesu translacji, ułatwia również transport mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Białka transportujące i rozpoznające czapeczkę współpracują, aby zapewnić efektywny eksport z jądra. Dodatkowo struktura kapu jest związana z procesem precyzyjnego usuwania intronów i składaniu egzonów w dojrzałym mRNA.¹³ Proces kappingu jest regulowany, co pozwala na dostosowanie ekspresji genów do zmieniających się warunków środowiskowych i sygnałów komórkowych. Znaczenie biologiczne tego procesu jest ogromne, ponieważ wpływa na stabilność, lokalizację i funkcję mRNA, co z kolei ma kluczowe znaczenie dla większości procesów komórkowych.

Następnym etapem post-translacyjnych modyfikacji cząsteczek RNA jest splicing, który ma na celu usunięcie intronów, czyli sekwencji niekodujących, oraz połączenie egzonów, czyli sekwencji kodujących mRNA. Termin splicing pochodzi z języka angielskiego, oznacza dosłownie „łączenie” lub „składanie” i jest mechanizmem eliminacji niekodujących sekcji z pre-mRNA, dzięki czemu powstaje ciągła sekwencja nukleotydowa zdolna do kodowania specyficznego białka.¹⁴ Proces ten zachodzi w jądrze komórkowym i jest regulowany przez wyspecjalizowane kompleksy nukleoproteinowe zwane spliceosomami. Splicing zaczyna się od rozpoznania granic pomiędzy intronami, a egzonami w transkrypcie pre-mRNA. Kluczowe w tym kontekście są dwie specyficzne sekwencje nukleotydowe: GU na końcu 5' intronu (miejsce donora) i AG na końcu 3' intronu (miejsce akceptora), jak również reszta adeninowa, wyznaczająca tzw. miejsce rozgałęzienia.¹⁵ Elementy te są rozpoznawane przez małe jądrowe RNA (snRNA, ang. *small nuclear RNA*), które są częścią spliceosomu, i wiążą się z nimi oraz z miejscem rozgałęzienia intronu, co umożliwia dokładne usunięcie intronu. W trakcie formowania tych kompleksów, mała rybonukleoproteina U1 (snRNP, ang. *small ribonucleoprotein*) wiąże się z miejscem donora, a U2 z miejscem akceptora, ułatwiając składanie spliceosomu.¹⁶ Następnie spliceosomy zaczynają asocjować się z transkrypcem pre-mRNA, tworząc większe kompleksy splicingowe, które ulegają aktywacji i katalizie poprzez związanie kolejnych snRNA, takich jak U4/U5/U6, tworząc kompleks katalityczny w obszarze akceptora.¹⁷ Proces katalizy zachodzi poprzez dwie kolejne reakcje transestryfikacji. W pierwszej fazie, grupa 2'-OH adeninowego miejsca rozgałęzienia atakuje nukleofilowo grupę 5'-fosforanową na początku intronu, tworząc produkt pośredni. W kolejnym kroku, grupa 3'-OH ostatniego nukleotydu egzonu 5' atakuje grupę 5'-fosforanową nukleotydu znajdującego się bezpośrednio po intronie w końcu 3', co prowadzi do połączenia końców egzonów oraz reorganizacji strukturalnej i uwolnienia intronów.¹⁸ Struktury snRNP's pełnią kluczową rolę w stabilizacji i przeprowadzeniu tych reakcji (Rys. 7).

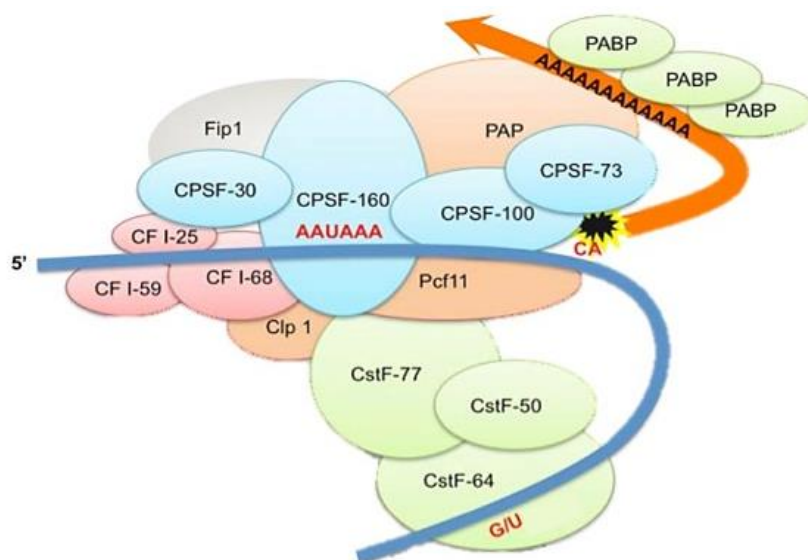


Rysunek 7 Proces składania spliceosomu i dojrzewania mRNA. Schemat usuwania intronów przez spliceosom oraz łączenia egzonów, prowadzący do powstania dojrzałej cząsteczki mRNA. Rysunek zapożyczony z *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition¹⁹

Warto wspomnieć, że proces splicingu może zachodzić na różne sposoby, prowadząc do powstania różnych form mRNA z jednego pre-mRNA. To zjawisko znane jest jako splicing alternatywny, które wprowadza dodatkową warstwę regulacji genowej.²⁰ Może ono decydować o tym, które egzony zostaną uwzględnione w dojrzałym mRNA, wpływając na strukturę i funkcję kodowanego białka. Takie działanie umożliwia syntezę licznych wariantów białka, czyli izoform, z pojedynczego genu. Jest to szczególnie istotne, ponieważ szacuje się, że proces ten dotyczy zdecydowanej większości ludzkich genów, co jest kluczowe dla zróżnicowania komórkowego, rozwoju, a także odpowiedzi na różne sygnały komórkowe.²¹ Proces splicingu jest ściśle regulowany. Elementy regulacyjne, takie jak sekwencje motywów splicingowych oraz białka regulacyjne, wpływają na wybór miejsc donora i akceptora, decydując o tym, które egzony pozostaną sklejone.

2.4 Poliadenylacja końca 3' mRNA

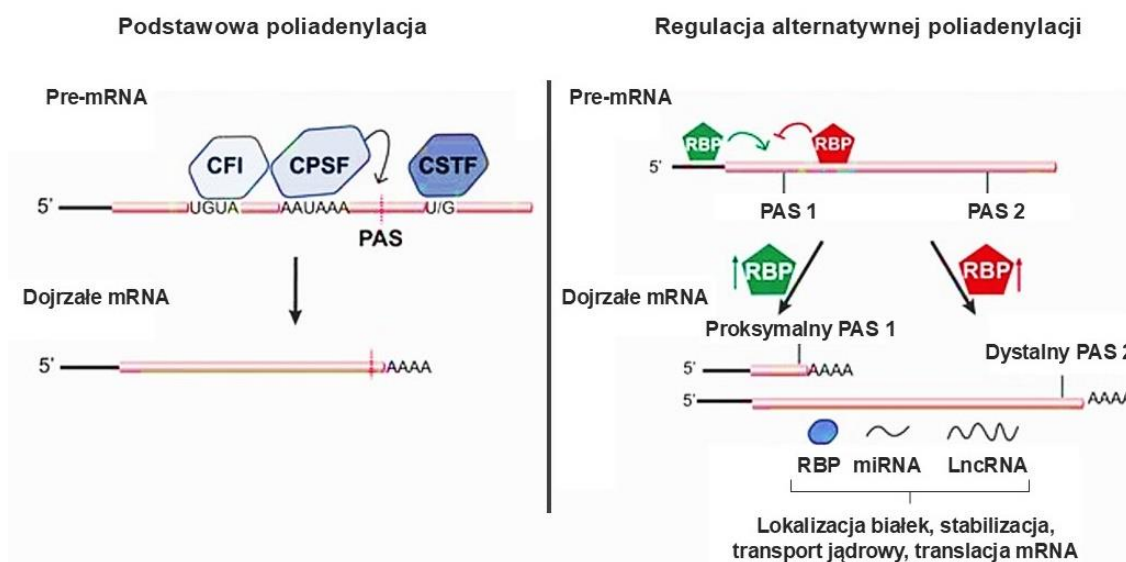
Kolejnym kluczowym etapem dojrzewania mRNA jest poliadenylacja, podczas której na końcu 3' pre-mRNA dodawana jest sekwencja kilkudziesięciu lub kilkuset adenozyń połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi, tworząc ogon poli(A).²² Ten zachodzący w jądrze komórkowym proces ma fundamentalne znaczenie dla stabilności mRNA, jego transportu do cytoplazmy oraz uczestnictwa w procesie translacji. Proces poliadenylacji inicjowany jest w momencie rozpoznania specyficznych sekwencji, motywów poliadenylacyjnych, na końcu 3' transkryptu pre-mRNA (PAS, ang. *polyadenylation signal*).²³ Ta sekwencja sygnałowa składa się z motywu sygnałowego (AAUAAA) oraz kilku innych motywów położonych wzdłuż transkryptu. Motyw sygnałowy jest rozpoznawany przez czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji CPSF (ang. *cleavage and polyadenylation specificity factor*).²⁴ CPSF inicjuje proces poliadenylacji przez endonukleolityczne cięcie mRNA w odległości 10 do 30 nukleotydów poniżej miejsca wiązania. Proces ten jest wspierany przez inne białka, w tym czynnik stymulacji cięcia (CstF, ang. *cleavage stimulation factor*), który wiąże fragment RNA bogaty w sekwencje GU i stabilizuje kompleks CPSF-RNA oraz czynnik cięcia I (CFI, ang. *cleavage factor I*), który rozpoznaje dodatkową sekwencję wiązania (UGUAA) i umożliwia wiązanie CPSF nawet bez obecności klasycznej sekwencji sygnałowej poliadenylacji.²⁵ Po odcięciu końca 3' mRNA przez CPSF, polimeraza poli(A) (PAP, ang. *poly(A) polymerase*) dołącza do procesu i katalizuje dodanie ogona poli(A) do mRNA, wykorzystując ATP jako substrat do polimeryzacji (Rys. 8).



Rysunek 8 Schemat procesu poliadenylacji mRNA w komórkach eukariotycznych. Kompleks składający się z CPSF, CstF oraz PAP, które współpracuje w przycinaniu końca mRNA i dodawaniu adenin do rosnącego łańcucha ogona poli(A). Na ogonie poli(A) wiąże się białko PABP, stabilizując cząsteczkę mRNA. Rysunek wykonany na podstawie pracy Domiński et al.²⁶

Kompleks poliadenylacyjny zawiera również czynniki regulujące oraz białka wspomagające, które stabilizują wiązanie i zwiększają specyficzność i procesywność enzymu poliadenylującego. PAP w swojej podstawowej formie wykazuje niską aktywność i procesywność, co oznacza, że ma tendencję do odłączania się od łańcucha RNA po przyłączeniu jednej adenozy, a czasem nawet przed jej przyłączeniem.²⁷ Ponadto, PAP ma słabe powinowactwo do RNA i niską specyficzność substratową, co teoretycznie pozwala jej na poliadenylację dowolnej cząsteczki RNA z wolną grupą 3'-OH.²⁸ Istotną rolę w procesie poliadenylacji odgrywają dwa białka: czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji CPSF i jądrowe białko wiążące poli(A) PABPN1 (ang. *nuclear poly(A)-binding protein*). CPSF rozpoznaje sekwencję sygnałową znajdującą się w pobliżu końca 3' pre-mRNA, inicjując proces cięcia i poliadenylacji, podczas gdy PABPN1 wiąże się z nowo powstającym ogonem poli(A), chroniąc go przed degradacją i regulując długość poliadenylacji.²⁹

Istnieje również zjawisko alternatywnej poliadenylacji, które polega na wyborze odmiennych miejsc poliadenylacji PAS w pre-mRNA, co prowadzi do powstania wielu wariantów mRNA z jednego transkryptu, różniących się długością regionu niekodującego 3' UTR (ang. *3' untranslated region*) i co za tym idzie, ogonem poli(A).³⁰ Ta różnorodność ma istotne konsekwencje dla regulacji ekspresji genów, stabilności mRNA, lokalizacji w komórce oraz efektywności translacji. Najistotniejszym momentem alternatywnej poliadenylacji jest rozpoznanie przez kompleks białek poliadenylacyjnych, w tym CPSF, sekwencji sygnałowych PAS w pre-mRNA (Rys. 9).



Rysunek 9 Schemat porównujący podstawową poliadenylację z alternatywną regulacją poliadenylacji. Z lewej strony przedstawiony jest proces podstawowej poliadenylacji pre-mRNA, w którym kompleksy białkowe, takie jak CFI, CPSF oraz CSTF, współdziałają w rozpoznaniu sygnału poliadenylacji (PAS), prowadząc do wytworzenia dojrzałego mRNA z ogonem poli(A). Z prawej strony ukazano mechanizm alternatywnej poliadenylacji, gdzie białka wiążące RNA (RBP) mogą modulować wybór różnych miejsc poliadenylacji (PAS 1 i PAS 2), co wpływa na końcową strukturę mRNA i jego funkcje, takie jak lokalizacja białek, stabilizacja, transport jądrowy oraz translacja. Rysunek zapożyczony z pracy Blake et al.³¹

Wybór konkretnego miejsca PAS zależy od wielu czynników, w tym od dostępności sekwencji sygnałowych, obecności białek wiążących RNA RBPs (ang. *RNA binding proteins*) oraz LncRNA (ang. *long non-coding RNA*), które mogą promować lub hamować użycie określonych miejsc PAS, jak również od stanu fizjologicznego komórki.³² Alternatywna poliadenylacja może prowadzić do skrócenia lub wydłużenia regionu 3' UTR mRNA. Skrócenie 3' UTR przez wybór miejsca PAS bliżej kodującej sekwencji prowadzi do ominięcia regionów sekwencji wiążących białka regulacyjne i miRNA (mikroRNA, ang. *micro RNA*), co zazwyczaj prowadzi do zwiększenia stabilności i translacji mRNA. Natomiast wydłużenie 3' UTR poprzez wybór dalszego miejsca PAS może wprowadzić dodatkowe

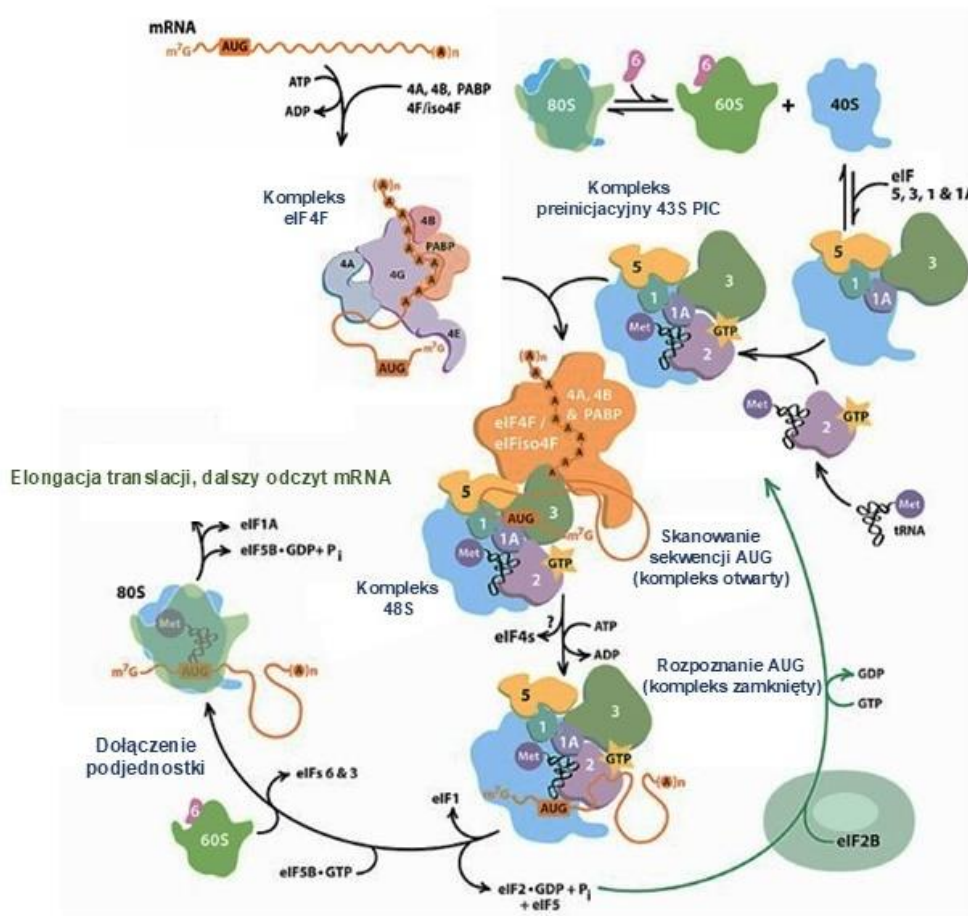
miejsca wiązania dla miRNA i innych regulatorów, co często prowadzi do zmniejszenia ekspresji białka.³³ Alternatywna poliadenylacja jest zjawiskiem powszechnym w genomie eukariotycznym i została zaobserwowana dla wielu genów. Jest szczególnie ważna w różnicowaniu komórek, rozwoju organizmów i odpowiedzi na stres. Zjawisko to znajduje odzwierciedlenie w komórkach nowotworowych, w których często obserwuje się preferencyjne wykorzystanie krótkich wariantów 3' UTR, co prowadzi do uniknięcia represji przez miRNA i zwiększenia ekspresji onkogenów, czyli sekwencji zdolnych do indukowania karcenogenezy.³⁴

Długość ogona poli(A) u ssaków może się znacząco różnić, zawierając zazwyczaj od 100 do 250 reszt adeninowych.³⁵ Ogon poli(A) pełni wiele kluczowych funkcji w dojrzałym mRNA, z których jedną z najważniejszych jest ułatwianie transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy. Proces ten jest możliwy dzięki współpracy białek rozpoznających poliadenylację z kompleksami porów jądrowych, które umożliwiają efektywny eksport mRNA.³⁶ Co więcej, długość ogona poli(A) wpływa na efektywność translacji – dłuższy ogon stabilizuje kompleks inicjacyjny, co sprzyja efektywniejszemu rozpoczęciu translacji w cytoplazmie.³⁷ Ogon poli(A) odgrywa również istotną rolę w kontrolowaniu jakości mRNA, ponieważ uszkodzone, błędnie przetworzone post-transkrypcyjnie lub nieprawidłowo zmodyfikowane cząsteczki mRNA mogą ulegać degradacji. Ogon poli(A) stanowi więc jedno z miejsc, które podlega monitorowaniu jakości, determinując losy danej cząsteczki mRNA. Proces poliadenylacji, jest precyzyjnie regulowany przez czynniki transkrypcyjne, białka regulacyjne oraz modyfikacje epigenetyczne, wpływające na intensywność i specyficzność tego mechanizmu.

2.5 Translacja

Dojrzałe mRNA, opatrzone czapeczką 5' i ogonem poli(A) na końcu 3', jest gotowe do procesu translacji, kluczowego etapu ekspresji genów, w którym informacja zawarta w mRNA jest odczytywana przez rybosomy i przekształcana w sekwencję aminokwasów białka. W komórkach eukariotycznych, translacja zachodzi w cytoplazmie i jest precyzyjnie kontrolowana przez różnorodne czynniki regulacyjne, a etap inicjacji procesu translacji limituje szybkość i wydajność biosyntezy białek.³⁸ Inicjacja procesu translacji rozpoczyna się od utworzenia kompleksu preinicjacyjnego 43S PIC (ang. *43S preinitiation complex*).³⁹ Kompleks wiążący kap CBC (ang. *cap-binding complex*), składający się z białek eIF4E, eIF4G i eIF4A, łączy się z końcem 5' mRNA, co inicjuje składanie kompleksu preinicjacyjnego.⁴⁰ Cząsteczka inicjacyjnego metionilo-tRNA (Met-tRNAⁱ; ang. *initiator methionine tRNA*) łączy się z czynnikiem eIF2-GTP (ang. *eukaryotic initiation factor 2 bound to guanosine triphosphate*), tworząc gotowy do działania kompleks 43S.⁴¹ Kompleks 43S przemieszcza się wzdłuż mRNA, skanując sekwencję do momentu zlokalizowania startowego kodonu AUG. Po znalezieniu kodonu inicjacyjnego, do podjednostki 40S rybosomu dołącza duża podjednostka rybosomalna 60S, tworząc kompletny rybosom 80S. Kompletny rybosom 80S katalizuje następnie syntezę polipeptydu, czyli łączenie aminokwasów w łańcuch białkowy (Rys. 10). W fazie elongacji, rybosomy przemieszczają się wzdłuż mRNA, odczytując sekwencje kodonów i łącząc je z komplementarnymi tRNA, dostarczającymi odpowiednie aminokwasy do wydłużającego się łańcucha peptydowego.⁴² Proces elongacji translacji jest katalizowany przez peptydylotransferazę, zlokalizowaną w dużej podjednostce rybosomu (60S).⁴³ W trakcie elongacji rybosom posiada trzy kluczowe miejsca wiążące tRNA: miejsce A (aminoacylowe), miejsce P (peptydylowe) i miejsce E (wyjściowe). Na początku etapu elongacji, tRNA związane z nowym aminokwasem wchodzi do miejsca A, podczas gdy tRNA niosące rosnący łańcuch polipeptydowy znajduje się w miejscu P. Po przekazaniu aminokwasu, tRNA, które przekazało swój ładunek, przemieszcza się do miejsca E, skąd opuszcza rybosom. Proces ten powtarza się cyklicznie, prowadząc do stopniowego wydłużania łańcucha polipeptydowego zgodnie z sekwencją kodonów mRNA. Gdy rybosom napotka kodon stop (UAA, UAG lub UGA), translacja zostaje zakończona.⁴⁴ Do rybosomu przyłączają się czynniki terminacyjne, takie jak eRF1 i eRF3, które

katalizują hydrolizę ostatniego tRNA, uwalniając nowo powstały peptyd.⁴⁵ Po zakończeniu translacji rybosom dysocjuje na swoje podjednostki (40S i 60S), co przygotowuje go do rozpoczęcia kolejnej rundy translacji.



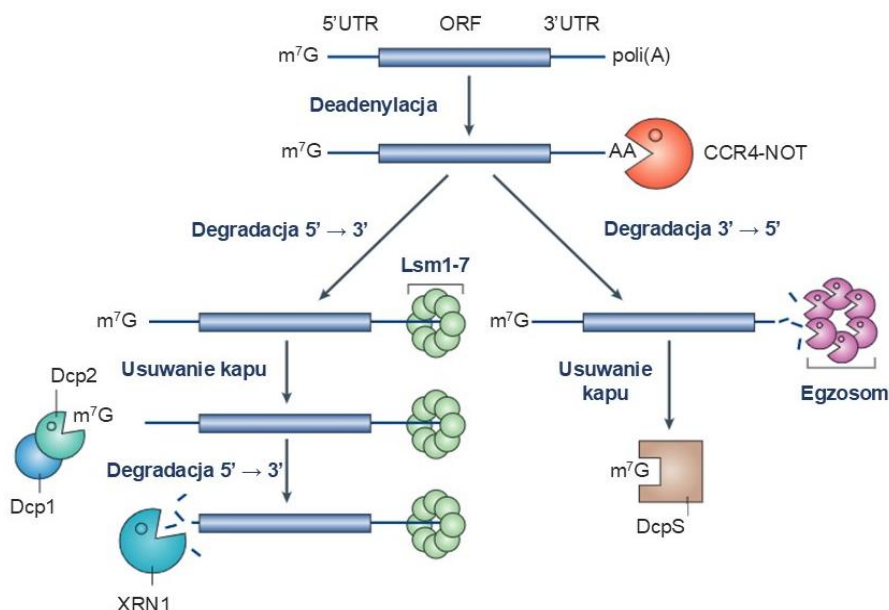
Rysunek 10 Przebieg inicjacji translacji mRNA w cytoplazmie. Po eksporcie mRNA z jądra do cytoplazmy, mRNA wiąże się z kompleksem eIF4F na końcu 5' i PABP na końcu 3'. Rekrutowane są również czynniki eIF4A i eIF4B, które promują ATP-zależne rozwijanie struktury wtórnej mRNA przed interakcją z kompleksem preinicjacyjnym 43S, złożonym z rybosomu 40S oraz czynników eIF1, eIF1A, eIF3 i eIF5. Kompleks 48S, który skanuje mRNA w celu znalezienia kodonu startowego AUG, po jego rozpoznaniu łączy się z podjednostką 60S, tworząc funkcjonalny rybosom 80S, gotowy do elongacji peptydu. Na podstawie Browning⁴⁶

Translacja jest precyzyjnie regulowanym procesem, w którym kluczową rolę odgrywa eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4F (eIF4F, ang. *eukaryotic initiation factor 4F*), wiążący się z czapeczką znajdującą się na końcu 5' mRNA.⁴⁷ Kompleks eIF4F składa się z trzech głównych białek: eIF4A, eIF4E i eIF4G.⁴⁸ Jego działanie jest regulowane przez złożone mechanizmy fosforylacji i defosforylacji, które odgrywają kluczową rolę zarówno w inicjacji, jak i zakończeniu translacji. Podjednostka eIF4G pełni rolę platformy, która umożliwia utworzenie kompleksu inicjującego translację oraz przyłączenie małej podjednostki rybosomalnej 40S do mRNA.⁴⁹ Dodatkowo, eIF4G wspomaga interakcję z białkiem PABP (ang. *poly(A) binding protein*), które wiąże się z ogonem poli(A) na końcu 3' mRNA, co prowadzi do powstania zamkniętej pętli mRNA, ułatwiającej efektywną translację. Kolejnym składnikiem kompleksu jest eIF4A, wykazujące aktywność helikazy, co pozwala na rozplątywanie struktur drugorzędowych RNA w regionie 5' UTR.⁵⁰ Dzięki temu mała podjednostka rybosomalna może swobodnie przesuwąć się w poszukiwaniu kodonu startowego AUG. Z kolei eIF4E (ang. *eukaryotic initiation factor 4E*), trzeci kluczowy element, odpowiada za rozpoznawanie i wiązanie czapeczki na końcu 5' mRNA. Regulacja aktywności eIF4E odbywa się na dwa sposoby: bezpośrednio, przez fosforylację eIF4E przez kinazę MNK (ang. *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein*

kinase) oraz pośrednio, przez fosforylację białek inhibitorowych 4E-BP (ang. *eIF4E-binding proteins*) przez kinazę mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*).⁵¹ Fosforylacja 4E-BP prowadzi do ich uwolnienia, co umożliwia interakcję eIF4E z eIF4G i eIF4A, tworząc kompleks inicjujący translację.⁵² Takie regulacje umożliwiają efektywne tworzenie kompleksu inicjującego translację i są kluczowe dla prawidłowego przebiegu syntezy białek w komórkach eukariotycznych.

2.6 Degradacja mRNA

Degradacja mRNA to bardzo istotny i ściśle regulowany proces w komórkach eukariotycznych. Pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy informacyjnej, decydując o czasie życia poszczególnych mRNA i eliminując niepotrzebne, uszkodzone lub przestarzałe transkrypty RNA. W zdecydowanej większości przypadków pierwszym etapem jest skrócenie ogona poli(A), co jest sygnałem do rozpoczęcia procesu degradacji.⁵³ Proces ten może przebiegać dwiema głównymi ścieżkami: od końca 5' do 3' lub od 3' do 5'.⁵⁴ W trakcie translacji, zarówno końce 3' jak i 5' mRNA są chronione przed degradacją przez specyficzne interakcje białko-RNA. Struktura kapu na końcu 5' jest związana przez kompleks białkowy eIF4F, natomiast ogon poli(A) na końcu 3' jest wiązany przez białko PABP. Te interakcje białkowe nie tylko chronią mRNA przed degradacją, ale także prowadzą do utworzenia struktury pętli, która dodatkowo stabilizuje transkrypt.⁵⁵ Głównym inicjatorem degradacji mRNA są kompleksy deadenylujące, w tym kompleks Ccr4–Caf1, który bierze udział w skracaniu ogona poli(A) mRNA oraz białkowy kompleks dekapujący Dcp1/Dcp2 (ang. *decapping enzyme 1 and 2 complex*).⁵⁶ Po skróceniu ogona poli(A) do długości około kilkunastu nukleotydów, mRNA jest gotowe do degradacji (Rys. 11).



Rysunek 11 Mechanizmy degradacji mRNA. Ogon poli(A) jest usuwany przez aktywność deadenylazy, tj. kompleks CCR4–NOT. Po deadenylacji mRNA może ulec degradacji na dwa sposoby: poprzez dekapowanie, a następnie degradację w kierunku 5'→3', lub przez degradację w kierunku 3'→5'. W szlaku dekapowania kompleks Lsm1–7 (pierścieniowy kompleks biorący udział w regulacji stabilności i degradacji mRNA) wiąże się z końcem 3' transkryptu mRNA i indukuje dekapowanie za pośrednictwem kompleksu Dcp1–Dcp2, co czyni mRNA podatnym na degradację przez Xrn1 w kierunku 5'→3'. Innym mechanizmem degradacji zdeadenylowanego mRNA jest jego rozkład w kierunku 3'→5' przez egzozom, po czym resztkowa struktura kapu zostaje usunięta przez enzym DcpS. Na podstawie Garneau⁵⁷

W ścieżce degradacji 5' → 3', deadenylacja jest zwykle pierwszym krokiem, po którym następuje dekaping, czyli usunięcie kapu 7-metyloguanozynowego (m⁷G) przez kompleks Dcp1/Dcp2. Centralną rolę w procesie dekapingu odgrywa pirofosfataza Dcp2, która hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe, między α i β fosforanem w strukturze kapu m⁷G, co skutkuje uwolnieniem cząsteczki

m⁷GDP i pozostawieniem cząsteczki RNA zakończonej grupą 5'-monofosforanową.⁵⁸ Uwolniony 5'-monofosforan mRNA jest podatny na degradację przez 5'-egzonukleazy RNA.⁵⁹ Dcp1 współdziała z Dcp2, indukując zmiany konformacyjne, które nie tylko zwiększają powinowactwo kompleksu do RNA, ale także tworzą warunki dla efektywnej hydrolizy kapu, katalizowanej przez Dcp2.⁶⁰ Następnie transkrypt ulega egzonukleolizie, enzym Xrn1 przemieszcza się od końca 5' w kierunku 3' nici, odcinając 5'-monofosforany kolejnych nukleotydów.⁶¹ Ścieżka 3' → 5' jest katalizowana przez kompleks białkowy zwany egzosomem i może działać równolegle lub komplementarnie do degradacji od końca 5' → 3', w zależności od kontekstu komórkowego i rodzaju cząsteczek RNA.⁶² Egzosom to kompleks enzymatyczny składający się z dziewięciu podjednostek stanowiących jego strukturalną podstawę zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie. Kluczową rolę enzymatyczną w egzosomie pełnią nukleazy Rrp44 (rodzina RNaz II) i Rrp6 (rodzina RNaz D), gdzie Rrp44 jest głównie związana z degradacją RNA w cytoplazmie, a Rrp6 wspomaga ten proces w jądrze komórkowym. Rrp44 jest zdolna do procesywnej degradacji zarówno ustrukturyzowanych, jak i nieustrukturyzowanych fragmentów RNA, odgrywając centralną rolę w rozkładzie mRNA.⁶³ Ten mechanizm zapewnia dodatkową kontrolę nad stabilnością i degradacją mRNA w komórce, umożliwiając precyzyjne regulowanie ekspresji genów. Jednym z etapów degradacji RNA w kierunku 3' → 5' jest usunięcie struktury kapu z krótkich fragmentów RNA, które pozostają po degradacji.⁶⁴ Usunięcie kapu jest niezbędne, by umożliwić pełną degradację RNA oraz zapobiec niepożądanym skutkom akumulacji takich fragmentów w komórce. Enzym odpowiedzialny za usunięcie kapu z krótkich fragmentów RNA to DcpS (ang. *decapping scavenger enzyme*). DcpS działa poprzez hydrolizę wiązania pirofosforanowego między fosforanami β i γ w strukturze kapu, co prowadzi do uwolnienia cząsteczki m⁷GMP (7-metyloguanozynomonofosforanu) oraz cząsteczki RNA zakończonej 5'-difosforanem.⁶⁵ Z kolei molekula m⁷GMP stanowi substrat dla nukleozydazy cytozylowej cNIIIB (ang. *cytosolic 5'-nucleotidase*), katalizującej defosforylację nukleozydowych 5'-monofosforanów, regulując w ten sposób poziom nukleotydów w komórkach.⁶⁶ Mechanizmy te są kluczowe dla recyklingu elementów struktury kapu oraz ostatecznego rozkładu molekuł RNA.

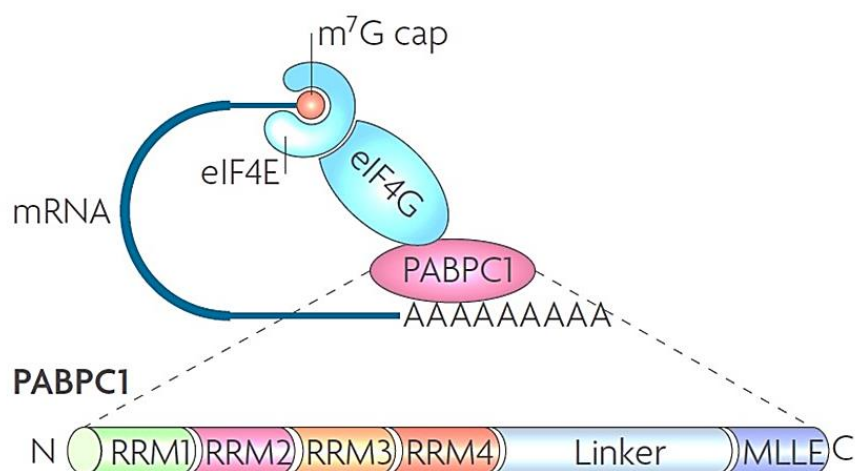
Degradacja mRNA jest szczegółowo regulowana, a wśród wielu mechanizmów kontroli jakości występuje białko UPF1 (ang. *up-frameshift protein 1*), nadzorujące jakość translacji.⁶⁷ Współdziała z kompleksem NMD (ang. *nonsense-mediated mRNA decay*), eliminując mRNA zawierające wczesne kodony stop. Mechanizm NGD (ang. *non-go-decay*) rozkłada transkrypty zablokowane na rybosomie, a mechanizm NSD (ang. *non-stop decay*) kieruje się przeciwko mRNA pozbawionym kodonów STOP.⁶⁸ Duży wpływ na degradację mają również białka wiążące RNA – RBPs, które mogą poprzez aktywację egzonukleolizy przyspieszyć ten proces.⁶⁹ Dodatkowym czynnikiem regulacyjnym jest stres komórkowy, który może wpływać na tempo degradacji mRNA, dostosowując ekspresję genów do zmieniających się warunków komórkowych.

3. Białka oddziałujące z sekwencją 3'-końcową mRNA

Szereg wyżej wspomnianych białek, w tym czynniki inicjacyjne, elongacyjne i terminacyjne, bierze udział w procesie translacyjnym, koordynując ruch rybosomów i syntezę białek. Równolegle, białka regulacyjne odgrywają kluczową rolę w kontrolowaniu tempa translacji, wpływając na ilość oraz szybkość produkcji białek kodowanych przez określone mRNA. W kontekście mojej pracy doktorskiej szczególnie ważne jest zrozumienie roli białek oddziałujących ze strukturą ogona poli(A) na końcu 3' mRNA, które mają bezpośredni wpływ na proces translacji oraz degradacji mRNA i temu zagadnieniu poświęcony będzie kolejny rozdział.

3.1 Białko PABP

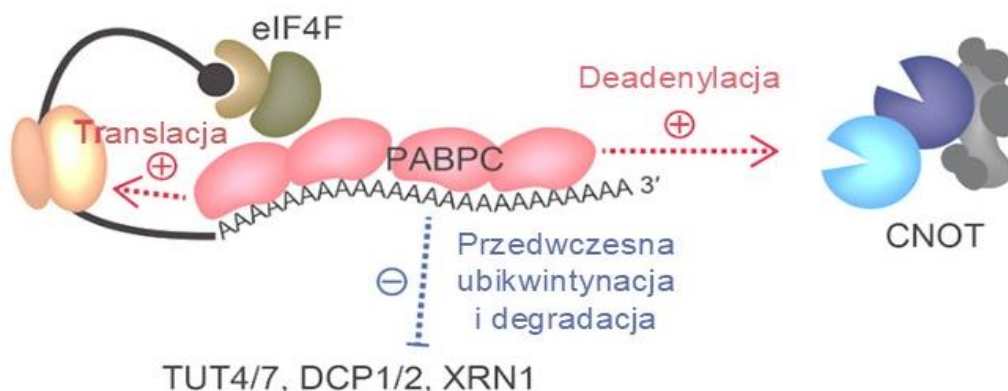
Białko wiążące ogon poli(A) PABP (ang. *poly(A)-binding protein*), to kluczowa molekula w regulacji ekspresji genów, szczególnie w kontekście stabilizacji i regulacji procesów związanych z ogonem poli(A) mRNA.⁷⁰ PABP jest wysoce konserwatywnym białkiem składające się z 636 reszt aminokwasowych, zawierającym cztery tandemowe motywy rozpoznające RNA (RRM, ang. *RNA recognition motifs*), niestrukturalny region łącznikowy i C-kończącą domenę PABC.⁷¹ Wszystkie cztery RRM bezpośrednio uczestniczą w wiązaniu z nukleotydami adeninowymi ogona poli(A) ze stałą dysocjacji (K_D) wynoszącą około 4 nM.⁷² Z drugiej strony, łącznik i domena C-kończąca (MLLE- zawierająca motyw peptydowy KITEMLLE aminokwasów Lys – Ile – Thr– Glu – Met – Leu – Leu – Glu) odgrywają kluczową rolę w interakcjach międzycząsteczkowych pomiędzy kolejnymi PABP związanymi z mRNA (Rys. 12).⁷³



Rysunek 12 Kompleks inicjacji translacji z udziałem PABPC1. Białko PABPC1 wiąże się z ogonem poli(A) mRNA, stabilizując strukturę mRNA poprzez interakcję z kompleksem eIF4G. Tworzy mostek między końcem 3' (ogonem poli(A)), a końcem 5' (m^7G cap) mRNA, co wspiera efektywną inicjację translacji. PABPC1, poprzez swoje domeny RRM (RRM1-4), odgrywa kluczową rolę w regulacji stabilności mRNA i wzmacnia proces translacyjny, promując efektywną rekrutację rybosomów. Rysunek na podstawie Tritschler⁷⁴

Badania wykazały, że pojedyncze białko PABP wymaga od 24 do 27 zasad adeninowych do wiązania się z ogonem poli(A).⁷⁵ Wysokie powinowactwo PABP do struktury ogona poli(A) ma kluczowe znaczenie dla procesu translacji. Główną funkcją białka PABP jest stabilizacja mRNA poprzez bezpośrednie wiązanie z ogonem poli(A), co chroni transkrypt przed degradacją, utrzymując go w formie gotowej do translacji. PABP uczestniczy również w inicjacji translacji, oddziałując z kompleksem eIF4F, w skład którego wchodzi: eIF4E, eIF4G oraz eIF4A. Podczas inicjacji translacji, PABP wiąże jednocześnie ogon poli(A) i oddziałuje z innymi czynnikami, takimi jak eIF4G i białko PAIP1 (ang. *poly(A) binding protein interacting protein 1*).⁷⁶ Te interakcje sprzyjają tworzeniu aktywnej pętli mRNA, zbliżając końce 5' i 3' mRNA, co ułatwia rekrutację podjednostki 40S rybosomu do końca 5' oraz rekrutację dużej podjednostki (60S).⁷⁷ Umożliwia to rybosomowi skanowanie mRNA w poszukiwaniu kodonu startowego (AUG), co PABP wspomaga poprzez stabilizację rybosomu w odpowiednim miejscu. Dzięki promowaniu tworzenia aktywnej pętli mRNA oraz wspieraniu procesu inicjacji, PABP znacząco wpływa na ogólną wydajność i precyzję translacji. Dodatkowo, po związaniu z poli(A), PABP koordynuje proces deadenylacji ogona, pełniąc zarówno funkcje ochronne, jak i promujące degradację, zależne od wielu czynników.⁷⁸ Z jednej strony, PABP rekrutuje enzymy odpowiedzialne za skracanie ogona poli(A), takie jak kompleksy PAN2-PAN3 i CCR4-NOT (CNOT). Z drugiej strony, PABP, zarówno na krótkich, jak i długich ogonach poli(A), zapobiega urydynylacji na końcu 3', co zapobiega degradacji mRNA.⁷⁹ W przypadku braku PABP, długie ogony poli(A) ulegają

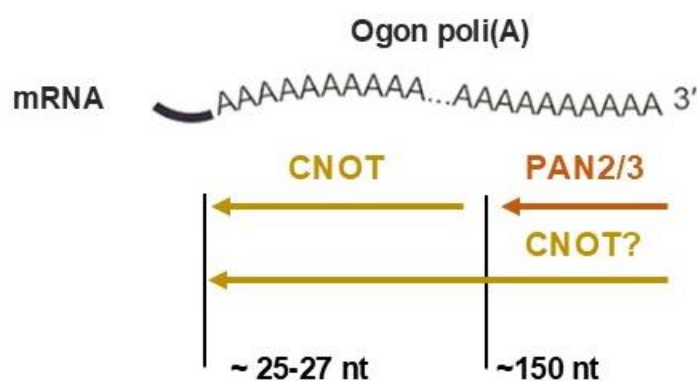
skróceniu, po czym następuje urydynylacja, co aktywuje mechanizmy degradacyjne, takie jak działanie enzymu Xrn1 i egzosomu.⁸⁰ Degradacja mRNA zostaje w pełni uruchomiona dopiero po oddysocjowaniu ostatniej cząsteczki PABP z końca 3' mRNA (Rys. 13).



Rysunek 13 Wielostronna rola PABPC. Białko PABPC wiążące ogon poli(A) mRNA, wspierające zarówno inicjację translacji poprzez interakcję z kompleksem eIF4F, jak i regulację degradacji mRNA. PABPC hamuje przedwczesną degradację mRNA, natomiast jego oddziaływanie z kompleksem CNOT promuje deadenylację, co ostatecznie prowadzi do degradacji mRNA przez szlaki zależne od TUT4/7, DCP1/2, XRN1 i egzosomu. Rysunek na podstawie Yi⁸¹

3.2 Białkowe kompleksy deadenylujące

Deadenylacja stanowi jeden z kluczowych mechanizmów posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, wpływając bezpośrednio na stabilność, translację i degradację mRNA. W ludzkich komórkach proces ten odbywa się w cytoplazmie i jest kontrolowany przez współdziałanie dwóch głównych kompleksów białkowych: PAN2/3 oraz CCR4-NOT (CNOT).⁸² Oba te kompleksy pełnią komplementarne funkcje, co pozwala na precyzyjne zarządzanie cyklem życia mRNA. Ich synergistyczne działanie utrzymuje równowagę między stabilizacją a degradacją mRNA, odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej i odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Kompleks PAN2/3 jest odpowiedzialny za skracanie długich ogonów poli(A), które przekraczają około 150 nukleotydów, natomiast CCR4-NOT zajmuje się bardziej ogólną deadenylacją różnorodnych poliadenylowanych RNA w komórce (Rys 14).⁸³



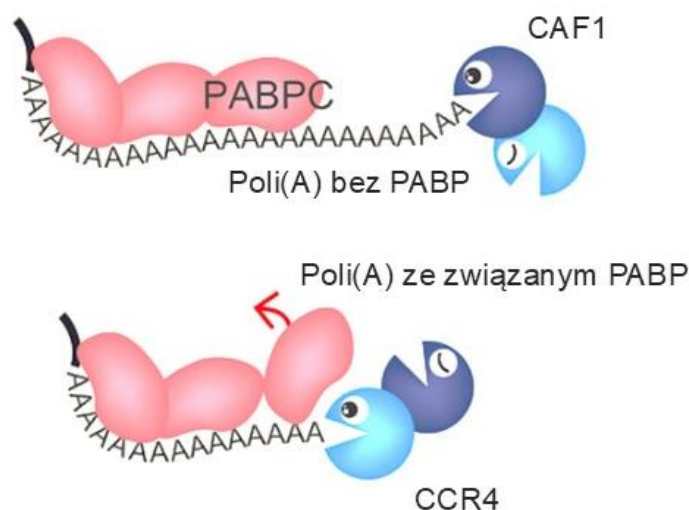
Rysunek 14 Schemat przedstawia zakresy aktywności kompleksów deadenylujących ogon poli(A) mRNA. Kompleks PAN2/3 odpowiada za skracanie ogona poli(A) do około 150 nukleotydów, natomiast CNOT może uczestniczyć w dalszym usuwaniu ogona poli(A) po działaniu PAN2/3 lub działać niezależnie na pełnej długości ogona poli(A)

3.2.1 Kompleks PAN2-PAN3

Kompleks PAN2/PAN3, składający się z białek PAN2 i PAN3, jest jednym z kluczowych czynników degradacji mRNA w cytoplazmie komórek eukariotycznych. Jego działanie jest ściśle powiązane z procesem obróbki ogona poli(A), odpowiadając za stopniowe skracanie tego elementu, co stanowi sygnał do uruchomienia dalszej degradacji mRNA przez inne mechanizmy, takie jak szlak egzonukleolityczny 5'→3'.⁸⁴ PAN3 pełni rolę regulatora, wiążąc się z ogonem poli(A) mRNA i rekrutując PAN2, które wykazuje aktywność egzonukleazy.⁸⁵ PAN3 nie tylko stabilizuje cały kompleks na mRNA, ale także zwiększa jego powinowactwo do ogona poli(A), co pozwala na bardziej efektywne skracanie przez PAN2.⁸⁶ Kompleks PAN2/3 preferencyjnie oddziałuje z długimi sekwencjami poli(A), zwykle przekraczającymi 150 nukleotydów, a jego aktywność jest dodatkowo wzmocniona poprzez interakcję z białkiem PABP.⁸⁷ Proces deadenylacji zachodzi etapowo, w trakcie którego skracanie ogona poli(A) odbywa się o odcinki długości około 27 nukleotydów.⁸⁸ Efektywność skracania maleje wraz ze zmniejszaniem długości ogona poli(A), co sugeruje, że degradacja przebiega w sekwencji krótkich kroków, następujących po odłączeniu kolejnych cząsteczek PABP.⁸⁹ Deadenylacja przeprowadzana przez PAN2/PAN3 jest wstępnym etapem degradacji mRNA, który następnie ulega dalszym procesom usuwania przez inne mechanizmy, takie jak aktywność kompleksu CCR4-NOT oraz szlaki zależne od egzonukleaz. Mimo, że dokładny mechanizm przełączania się pomiędzy aktywnością PAN2/3 a CCR4-NOT nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, wiadomo, że współdziałanie tych procesów jest niezbędne dla skutecznej eliminacji mRNA, co zapobiega kumulacji nieprawidłowych lub zbędnych transkryptów, mogących zaburzać prawidłową ekspresję genów.

3.2.2 Kompleks deadenylujący CCR4-NOT

Kompleks CCR4-NOT (CNOT) jest głównym kompleksem odpowiedzialnym za skracanie ogona poli(A) w cytoplazmie, co prowadzi do destabilizacji mRNA i jego ostatecznej degradacji.⁹⁰ CNOT składa się z kilku podjednostek, z których najważniejsze w kontekście deadenylacji to CCR4 reprezentowana w ludzkim organizmie przez białka CNOT6, CNOT6L oraz posiadająca aktywność egzonukleazową CAF1, występująca w formie białek CNOT7 i CNOT8.⁸¹



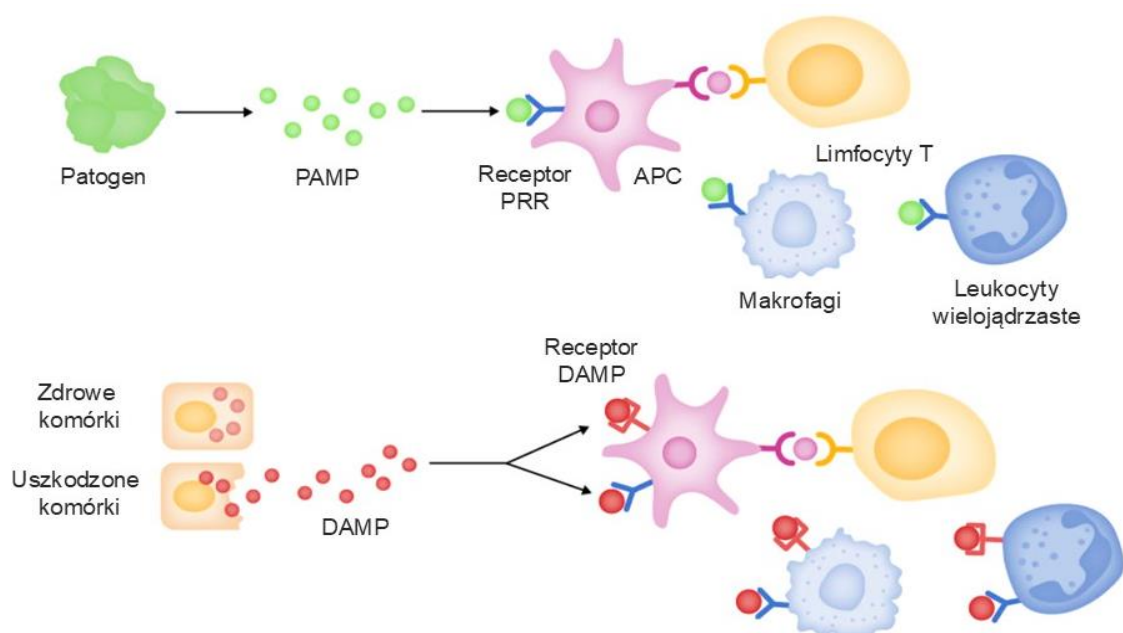
Rysunek 15. Różne role białek CAF1 i CCR4 (kompleksu CNOT) w procesie deadenylacji. Górny schemat przedstawia działanie CAF1, które usuwa ogon poli(A) z regionu wolnego od PABPC, natomiast dolny schemat pokazuje aktywność CCR4, które może degradować ogon poli(A) związany z PABPC, wykazując odmienny mechanizm usuwania sekwencji poli(A) w zależności od obecności PABPC. Rysunek na podstawie pracy Yi et al.⁸¹

Kompleks CCR4-NOT jest rekrutowany do mRNA przez różne białka regulatorowe, w tym czynniki wiążące RNA (RBPs) oraz mikroRNA, które decydują o specyficzności jego działania.⁹¹ Deadenylacja przez kompleks CCR4-NOT rozpoczyna się od przyłączenia do końca 3' mRNA, gdzie CCR4 i CAF1 współdziałają, skracając ogon poli(A) (Rys. 15). Podjednostka CCR4 jest głównym enzymem odpowiedzialnym za usuwanie adenozyń z krótszych ogonów poli(A), szczególnie po usunięciu białek PABP, które stabilizują mRNA.⁹² CAF1 natomiast odpowiada za inicjalne skracanie długich ogonów poli(A).⁹³ Proces deadenylacji zachodzi etapowo, z sekwencyjnym usuwaniem około 27 nukleotydów na raz, po którym kompleks napotyka na cząsteczki PABP, zatrzymując proces do momentu odłączenia białka.⁹⁴ Regulacja aktywności kompleksu CCR4-NOT odbywa się również przez modyfikacje post-translacyjne, takie jak fosforylacja, które modulują jego aktywność enzymatyczną i powinowactwo do mRNA. Dzięki swojemu szerokiemu zakresowi działania, CCR4-NOT pełni centralną rolę w kontroli stabilności mRNA, wpływając tym samym na jego translację oraz poziomy białek w komórce.

4. Wrodzony układ odpornościowy

Wrodzony układ odpornościowy stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed szerokim zakresem czynników chorobotwórczych, takich jak bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty.⁹⁵ Jego kluczową cechą jest zdolność do szybkiego rozpoznawania i reagowania na zagrożenia bez konieczności wcześniejszego kontaktu z patogenem. System ten obejmuje wielopoziomową ochronę, zaczynającą się od skóry, która stanowi fizyczną barierę, zapobiegającą wnikaniu patogenów. Kolejną warstwą obrony są naturalne wydzieliny, takie jak łzy i ślina, które dzięki zawartości enzymów (np. lizozymu) niszczą ściany komórkowe bakterii, natomiast pokryte śluzem błony śluzowe mechanicznie wychwytyują patogeny. Kluczową rolę w obronie pełnią jednak komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi i neutrofile, które eliminują patogeny poprzez fagocytozę oraz komórki dendrytyczne APC (ang. *antigen-presenting cells*), które prezentują antygeny i aktywują nabyty układ odpornościowy poprzez odpowiedź przeciwciał.⁹⁶ Ważną rolę odgrywają także komórki NK (ang. *natural killer*), które niszczą komórki zainfekowane wirusami, wykrywając zmiany w prezentowanym na ich powierzchni zestawie cząsteczek. Eozynofile i bazofile uczestniczą z kolei w reakcjach przeciw pasożytom oraz reakcjach alergicznych. Wspólnym elementem działania tych komórek jest obecność receptorów rozpoznających wzorce PRR (ang. *pattern recognition receptors*), które ułatwiają wykrywanie charakterystycznych dla patogenów struktur i uruchamianie odpowiedzi immunologicznej.⁹⁷

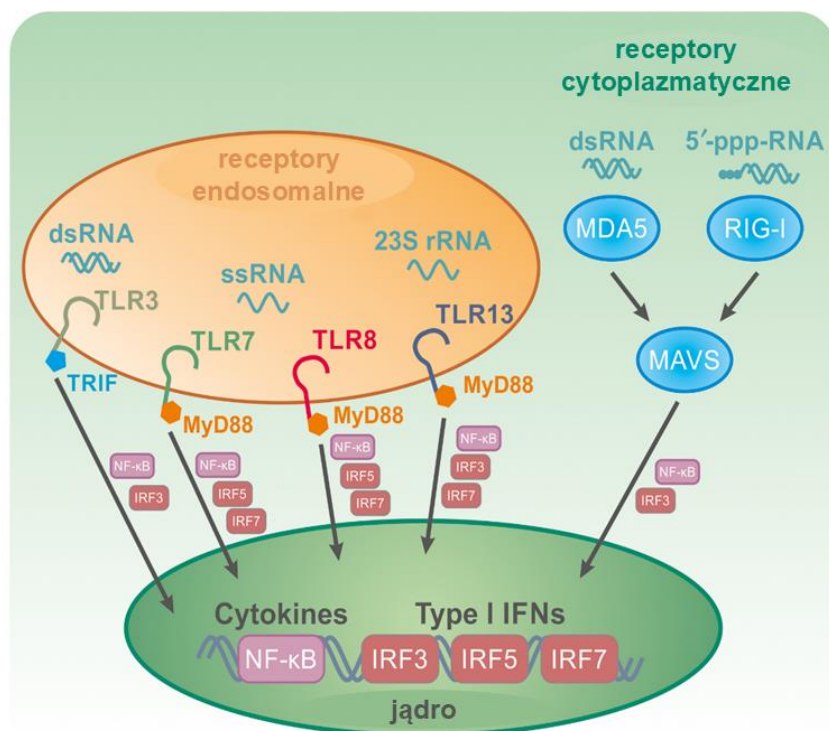
Receptory PRR odgrywają kluczową rolę we wrodzonym układzie odpornościowym, umożliwiając rozpoznawanie molekularnych wzorców związanych z patogenami PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) oraz wzorców związanych z uszkodzeniem komórek DAMP (ang. *damage-associated molecular patterns*).⁹⁸ Ich podstawową funkcją jest identyfikacja inwazyjnych mikroorganizmów i uruchamianie odpowiedzi immunologicznej, obejmującej fagocytozę, produkcję cytokin oraz aktywację układu dopełniacza, czyli grupy białek osocza wspomagających działanie przeciwciał i komórek fagocytarnych w eliminacji patogenów. Cytokiny, wytwarzane przez komórki wrodzonego układu odpornościowego, regulują aktywność komórek i rekrutują inne komórki odpornościowe do miejsc infekcji, promując stan zapalny, który wspomaga izolację i eliminację patogenów (Rys.16). Receptory PRR dzieli się na kilka głównych kategorii w zależności od ich lokalizacji i rozpoznawanych ligandów. W kontekście rozpoznawania cząsteczek RNA, kluczowe są receptory typu Toll (TLR, ang. *Toll-like receptors*), receptory NOD-podobne (NLR, ang. *NOD-like receptors*), receptory RIG-I-podobne (RLR, ang. *RIG-I-like receptors*), takie jak RIG-I (ang. *retinoic acid-Inducible gene I*) i MDA-5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*), a także białko STING (ang. *stimulator of interferon genes*).⁹⁹ W kolejnych podrozdziałach szczegółowo omówię każdą z tych klas receptorów oraz ich rolę w rozpoznawaniu egzogennych cząsteczek RNA.



Rysunek 16 Schemat aktywacji wrodzonego układu odpornościowego poprzez rozpoznanie patogenów (PAMP) i sygnałów z uszkodzonych komórek (DAMP). Komórki prezentujące antygen (APC) za pomocą receptorów PRR i DAMP, aktywują limfocyty T, makrofagi i leukocyty wielojądrzaste, inicjując odpowiedź immunologiczną organizmu. Rysunek zaadaptowano z Anders¹⁰⁰

4.1 Receptory typu Toll-podobne

Jedną z najbardziej charakterystycznych i najlepiej zbadanych klas receptorów rozpoznających wzorce (PRR) są receptory typu Toll (TLR), które odgrywają kluczową rolę w wykrywaniu patogenów i inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez rozpoznawanie specyficznych wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP) oraz z uszkodzeniami komórek (DAMP).¹⁰¹ Spośród białek rodziny Toll, receptory TLR3, TLR7 i TLR8 są wyspecjalizowane w rozpoznawaniu egzogenego RNA, co jest szczególnie istotne w obronie przeciwwirusowej.¹⁰² TLR3 identyfikuje dwuniciowe RNA (dsRNA), które powstaje jako pośredni produkt replikacji wielu wirusów RNA lub może być wprowadzone sztucznie, na przykład w ramach terapii RNA.¹⁰³ Po związaniu dsRNA, TLR3 aktywuje szlaki sygnałowe, które prowadzą do produkcji interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych, wspierających stan zapalny i aktywujących inne komórki układu odpornościowego. Receptory TLR7 i TLR8 są odpowiedzialne za rozpoznawanie jednociowego RNA (ssRNA) pochodzącego z wirusów.¹⁰⁴ Białka te są zlokalizowane głównie w endosomach, gdzie ssRNA wirusowe może być wykrywane po endocytozie komórki zakażonej wirusem. Aktywacja TLR7 i TLR8 prowadzi również do indukcji interferonów typu I i innych cytokin prozapalnych, które ograniczają replikację wirusów i aktywują odpowiedź nabytą.¹⁰⁵ Po rozpoznaniu RNA przez TLR3, TLR7 lub TLR8, receptory te inicjują kaskady sygnałowe za pośrednictwem białek adaptorowych, takich jak MyD88 (dla TLR7 i TLR8) oraz TRIF (dla TLR3), co aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak NF- κ B, IRF3 i IRF7.¹⁰⁶ Czynniki te z kolei indukują ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję interferonów typu I, cytokin prozapalnych oraz chemokin, które wspomagają reakcję obronną organizmu. Rozpoznawanie egzogenego RNA przez TLR jest kluczowe dla wczesnej detekcji infekcji wirusowych i uruchomienia szybkiej odpowiedzi immunologicznej, co może zapobiec rozprzestrzenianiu się patogenu (Rys. 17).



Rysunek 17 Główne receptory wrodzonego układu odpornościowego wykrywające RNA różnią się lokalizacją i specyficznością ligandów. TLR3, TLR7, TLR8, i TLR13 w endosomach wiążą dsRNA lub ssRNA, aktywując NF-κB (ang. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i IRFs (ang. Interferon Regulatory Factor 3/7). Cytoplazmatyczne receptory MDA5 i RIG-I po związaniu RNA dają sygnał przez MAVS (ang. Mitochondrial Antiviral Signaling Protein) do produkcji cytokin i interferonów. Rysunek zapożyczony z Vierbuchen¹⁰⁷

4.2 Receptory NOD-podobne

Cytoplazmatyczne receptory NOD-podobne (NLR) są odpowiedzialne za rozpoznawanie bakteryjnych składników oraz sygnałów związanych z uszkodzeniem komórek, które pojawiają się wewnątrz komórki.¹⁰⁸ NLR pełnią kluczową rolę w detekcji szerokiego spektrum sygnałów związanych z infekcjami, stresem komórkowym i uszkodzeniami, jednak ich głównym zadaniem jest wykrywanie zagrożeń w cytoplazmie komórek. W odróżnieniu od receptorów typu Toll, które rozpoznają egzogenne RNA w endosomach lub na powierzchni komórki, NLR są wysoce specyficzne wobec sygnałów endogennych, takich jak elementy komórek gospodarza lub patogenów, które przedostały się do cytoplazmy.¹⁰⁹ Choć ich rola w wykrywaniu egzogennej RNA jest mniej bezpośrednia niż w przypadku TLR, badania wskazują, że kompleksy NLR mogą uczestniczyć w odpowiedzi na infekcje wirusowe poprzez mechanizmy pośrednie, np. wykrywanie zmian w cytoplazmie komórki gospodarza indukowanych przez wirusowe RNA.¹¹⁰ To działanie może prowadzić do aktywacji cytoplazmatycznych kompleksów białkowych, które są zdolne do indukcji produkcji prozapalnych cytokin, takich jak interleukina-1 β (IL-1 β) i interleukina-18 (IL-18), co ma istotne znaczenie dla rozwoju odpowiedzi zapalnej przeciw infekcjom.¹¹¹

4.3 Receptory RIG-I-podobne

Receptory typu RIG-I-podobne (RLR) odgrywają istotną rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, odpowiadając za wykrywanie wirusowego RNA i innych egzogennych cząsteczek RNA w cytoplazmie komórek.¹¹² Do rodziny RLR należą trzy główne receptory: RIG-I, MDA5 oraz LGP2 (ang. *laboratory of genetics and physiology 2*).¹¹³ Te cytoplazmatyczne czujniki są niezbędne do rozpoznawania wirusowego RNA, a ich aktywacja uruchamia szlaki sygnałowe prowadzące do produkcji interferonów typu I oraz innych cytokin prozapalnych, wspierających reakcję

przeciwwirusową. RIG-I rozpoznaje krótkie dwuniciowe fragmenty RNA zawierające 5'-trifosforan (5'-pppRNA), które są charakterystycznymi molekularnymi wzorcami patogenów (PAMPs) pochodzącymi od wirusów.¹¹⁴ Po związaniu z takim RNA, RIG-I aktywuje białko MAVS (ang. *mitochondrial antiviral signaling*), co prowadzi do kaskady sygnałowej, zakończonej indukcją genów odpowiedzialnych za odpowiedź przeciwwirusową, w tym interferonów typu I.¹¹⁵ Z kolei MDA5 działa w podobny sposób, lecz jest wyspecjalizowane w rozpoznawaniu dłuższych, dwuniciowych cząsteczek RNA, co czyni go kluczowym w detekcji picornawirusów, takich jak wirus polio.¹¹⁶ Po aktywacji, MDA5 również oddziałuje z MAVS, prowadząc do indukcji interferonów typu I i innych prozapalnych mediatorów. Różnice w specyficzności pomiędzy RIG-I, a MDA5 pozwalają na rozpoznawanie szerokiego spektrum wirusowych RNA. Receptor LGP2, pomimo strukturalnych podobieństw do RIG-I i MDA5, nie posiada domen umożliwiających bezpośrednią interakcję z białkami sygnalizacyjnymi, przez co pełni głównie rolę regulatora aktywności RIG-I i MDA5, wspierając ich działanie, zamiast bezpośredniego udziału w sygnalizacji.¹¹⁷ Zdolność receptorów RLR do szybkiego i specyficznego rozpoznawania egzogenego RNA czyni je fundamentalnymi we wczesnej fazie obrony przeciwwirusowej. Ich aktywacja i produkcja interferonów typu I są kluczowe dla ograniczenia replikacji wirusów, alarmowania sąsiednich komórek o zagrożeniu oraz rekrutacji i aktywacji komórek odpornościowych, takich jak komórki NK i makrofagi, które eliminują zainfekowane komórki.

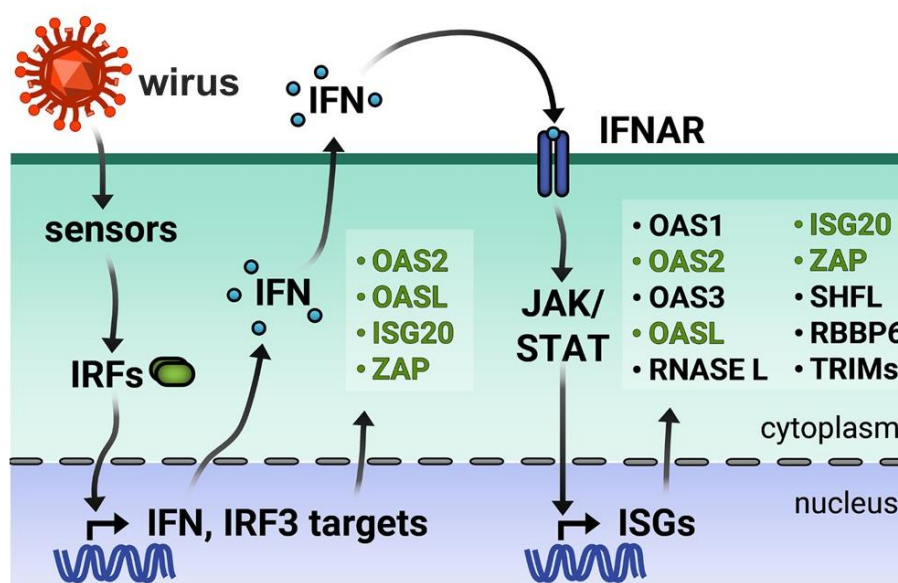
4.4 Białko STING

Białka STING są endoplazmatycznymi molekułami, które odgrywają centralną rolę w sygnalizacji prowadzącej do indukcji interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych w odpowiedzi na wykrycie wirusowego i bakteryjnego DNA w cytoplazmie.¹¹⁸ Chociaż ich podstawową funkcją jest rozpoznawanie cytoplazmatycznego DNA, mają również pośredni udział w odpowiedzi na egzogenne RNA poprzez interakcje z innymi szlakami sygnalizacyjnymi wrodzonego układu odpornościowego. Białko STING znajduje się w błonie wewnętrznej retikulum endoplazmatycznego (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) i aktywuje się po związaniu z cyklicznymi dinukleotydami, takimi jak cykliczny GMP-AMP (cGAMP), syntetyzowanymi przez cGAS (ang. *cyclic GMP-AMP synthase*) w odpowiedzi na obecność dwuniciowego DNA w cytoplazmie.¹¹⁹ Po rozpoznaniu dsDNA, cGAS produkuje cGAMP, który wiąże się z STING, prowadząc do jego aktywacji.¹²⁰ Chociaż STING jest bezpośrednio zaangażowany w odpowiedź na DNA, może modulować sygnalizację odpowiedzi na RNA poprzez współpracę z receptorami RIG-I-podobnymi (RLR). Ponadto, STING odgrywa rolę w procesach autofagii, wspierając degradację wirusowych komponentów oraz prezentację antygenów poprzez MHC klasy I i II, co z kolei wzmacnia odpowiedź adaptacyjną.¹²¹ Białka STING współpracują również ze szlakami sygnalizacyjnymi aktywowanymi przez receptory Toll-podobne (TLR), co prowadzi do synergistycznej odpowiedzi przeciwzapalnej i przeciwwirusowej. Po aktywacji STING rekrutuje kinazy TBK1 (ang. *TANK-binding kinase 1*) i IKKε (ang. *I kappa B kinase epsilon*), które fosforylują czynniki transkrypcyjne IRF3 i NF-κB.¹²² Fosforylowane IRF3 oraz NF-κB migrują do jądra komórkowego, gdzie indukują ekspresję interferonów typu I oraz innych prozapalnych mediatorów, co jest kluczowe dla skutecznej odpowiedzi antywirusowej.

4.5 Geny stymulowane interferonem

Receptory omówione w poprzednich podrozdziałach są odpowiedzialne za bezpośrednie wykrywanie zagrożeń w postaci obcych kwasów nukleinowych i alarmowanie komórki o potencjalnym niebezpieczeństwie, co obejmuje inicjację sygnału do ekspresji interferonów (IFN). IFN to grupa białek z rodziny cytokin mających kluczowe znaczenie w obronie przeciwko infekcjom wirusowym, bakteryjnym i innym patogenom.¹²³ Interferony działają poprzez specyficzne receptory na powierzchni komórek. Po wykryciu wirusa, czujniki patogenów aktywują czynniki regulatorowe IRFs (ang.

interferon regulatory factors), co prowadzi do indukcji ekspresji interferonów.¹²⁴ Wydzielane IFN- α i IFN- β wiążą się z receptorami IFN typu I (IFNAR), co aktywuje szlaki sygnalizacyjne JAK-STAT (ang. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*), prowadzące do ekspresji genów stymulowanych interferonem ISG (ang. *interferon-stimulated genes*).¹²⁵ Geny te kodują białka o funkcjach regulacyjnych i przeciwwirusowych, które odgrywają bezpośrednią rolę w hamowaniu replikacji wirusów, takie jak OAS (ang. *2'-5'-oligoadenylate synthetase*) i PKR (ang. *protein kinase R*).¹²⁶ ISG nie tylko wspomagają walkę z wirusami, ale również modulują odpowiedź immunologiczną, aktywując komórki dendrytyczne i limfocyty T oraz regulując proces prezentacji antygenów (Rys. 18).



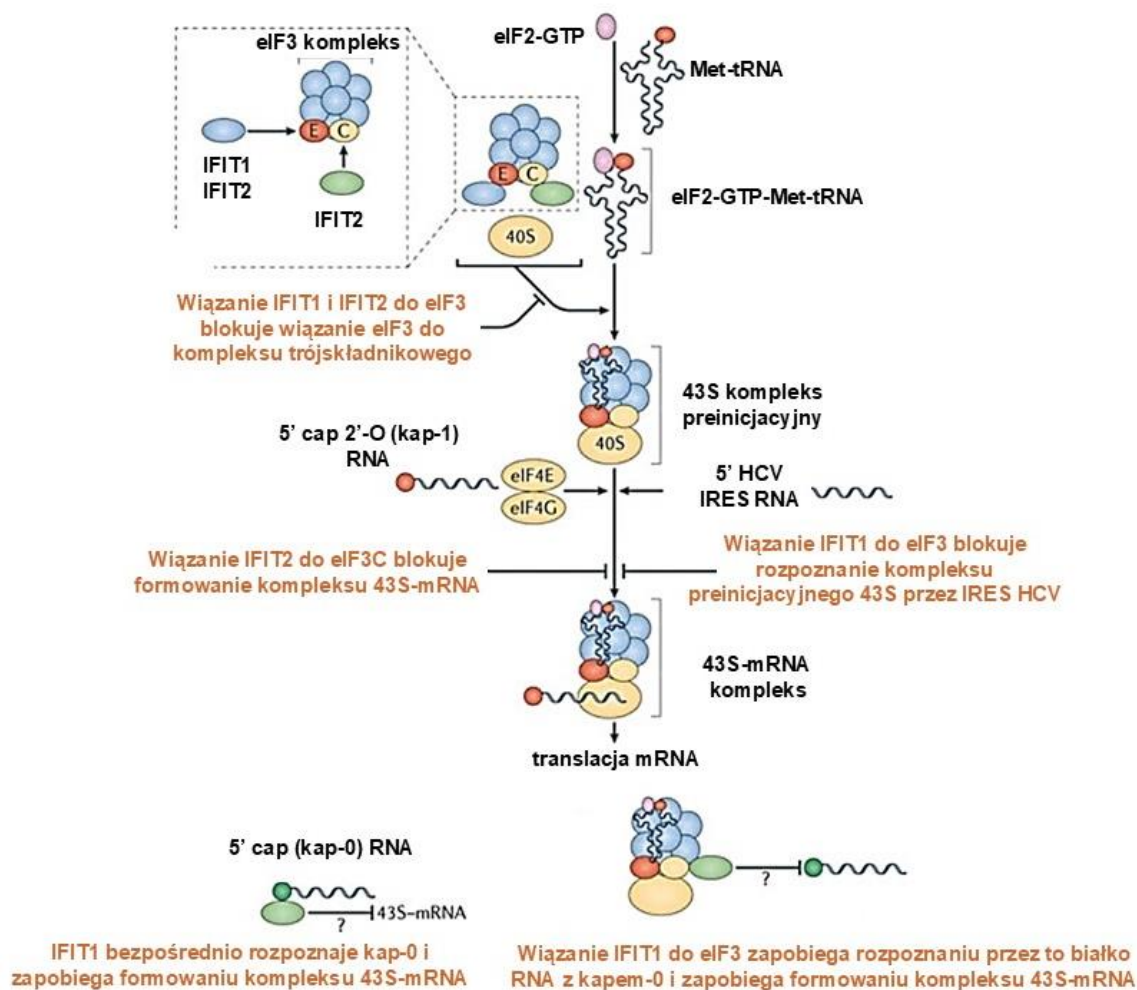
Rysunek 18 Schemat odpowiedzi komórki na infekcję wirusową. Po wnikięciu wirusa, czujniki patogenów aktywują czynniki transkrypcyjne IRFs, które indukują produkcję interferonu typu I (IFN). Wydzielany IFN wiąże się z receptorem IFNAR, aktywując szlak JAK/STAT, który prowadzi do ekspresji genów stymulowanych interferonem (ISGs). Geny zależne od IRF3, takie jak OAS2, OASL, ISG20 i ZAP, zaznaczono na zielono. Rysunek zapożyczony z Yang¹²⁷

Dodatkowo, niektóre geny stymulowane interferonem biorą udział w odpowiedzi na stres komórkowy i uszkodzenia DNA, co może mieć istotne znaczenie w obronie przed nowotworami. Mechanizmy te są kluczowe dla szybkiego i skutecznego rozpoznania oraz eliminacji patogenów, a także dla regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Wyróżniającymi się członkami tej grupy są białka IFIT (ang. *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*), które odgrywają istotną rolę w hamowaniu translacji wirusowej, rozpoznawaniu PAMP, proliferacji komórek oraz replikacji i sygnalizacji związanej z obecnością dwuniciowego RNA.¹²⁸

4.6 Białka IFIT

Białka indukowane interferonem z powtórzeniami tetracopeptydowymi IFIT stanowią rodzinę białek układu immunologicznego indukowanych przez interferony, które odgrywają fundamentalną rolę, jako natychmiastowe efekторы przeciwwirusowe podczas wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u ludzi i innych ssaków, wykazując zdolność do hamowania infekcji wirusowej poprzez bezpośrednie wiązanie się z nieswoistymi RNA, utrudniając w ten sposób ich replikację oraz translację.^{129,130} Geny IFIT zostały zidentyfikowane u wielu ssaków, ale liczba i skład rodziny genów IFIT może się znacznie różnić w zależności od gatunku.¹³¹ Ludzka rodzina składa się z czterech kanonicznych członków, a mianowicie IFIT1, IFIT2, IFIT3 i IFIT5, a także niescharakteryzowanego IFIT1B i pseudogenu IFIT1P1.^{132,133} Geny IFIT zazwyczaj pozostają wyciszone lub wykazują bardzo niski konstytutywny poziom ekspresji w normalnych warunkach. Po infekcji wirusowej, w wyniku oddziaływań z obcym

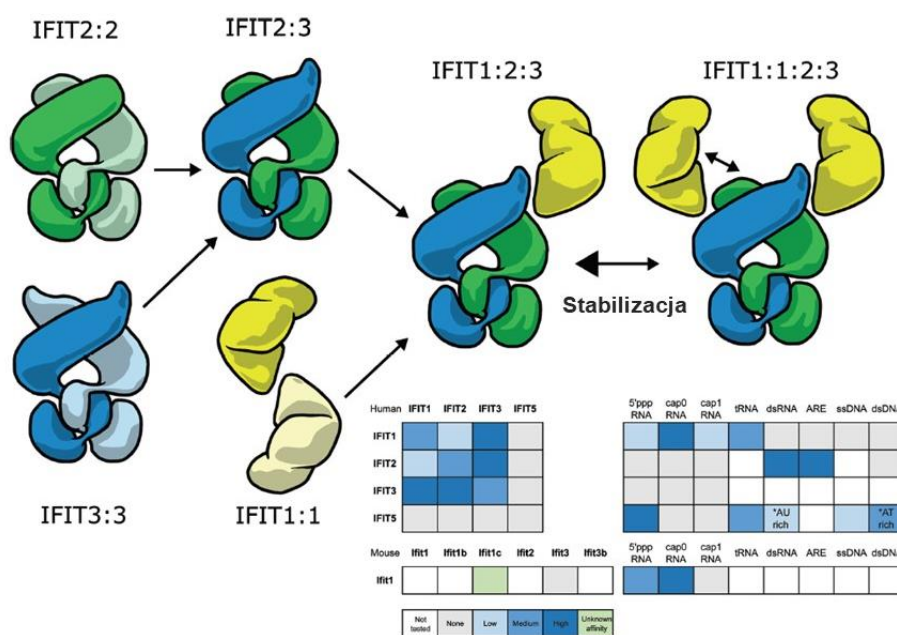
RNA, białka IFIT ulegają szybkiej ekspresji i ich stężenia stają się od 100 do 1000 razy wyższe.¹³⁴ Białka IFIT składają się z wielu powtórzeń tetracoptydowych (TPR, ang. *tetratricopeptide repeat*), które są motywami strukturalnymi typu helisa-obrót-helisa składającym się z 34 aminokwasów, odpowiadającymi za interakcje białko-białko.¹³⁵ Sekwencje TPR cechuje zdegenerowany układ, w którym jedynie 9 aminokwasów w specyficznych pozycjach zachowuje wysoki stopień konserwatywności.¹³⁶ W konsekwencji, pierwotne struktury różnych TPR w obrębie konkretnego białka IFIT lub wśród członków rodziny IFIT wykazują znaczną zmienność sekwencji.¹³⁷ Białka IFIT wykazują zdolność do selektywnego oddziaływania z różnymi komórkowymi RNA, wirusowymi RNA i białkami (Rys.19).



Rysunek 19 Rola białek IFIT w hamowaniu inicjacji translacji mRNA. Białka IFIT1 i IFIT2 wiążą się z kompleksem eIF3, blokując tworzenie kompleksu preinicjacyjnego 43S. IFIT1 rozpoznaje kap 5' typu 0 (bez 2'-O metylacji), co zapobiega tworzeniu kompleksu 43S-mRNA i zatrzymuje translację. Białka IFIT hamują również translację wirusowego RNA, blokując wiązanie wirusowego IRES (np. HCV) z kompleksem preinicjacyjnym 43S, co prowadzi do zahamowania replikacji wirusa. Rysunek zapożyczony z Diamond¹³⁸

IFIT mogą rozpoznawać i wiązać się z obcym RNA, szczególnie tym, które nie posiada grupy metylowej w pozycji 2'-O w strukturze kapu mRNA, co jest charakterystyczne dla wielu wirusów RNA.¹³⁹ Takie specyficzne wiązanie pozwala na rozróżnienie między RNA wirusowym, a RNA komórkowym. Interakcje te odgrywają kluczową rolę w ułatwianiu działania przeciwwirusowego tych molekuł. Badania biochemiczne wykazały, że niektórzy członkowie rodziny białek IFIT hamują efektywność translacji białek zależnej od struktury czapeczki RNA, poprzez wiązanie się z elementami kompleksu eIF3.¹⁴⁰ W szczególności, ludzkie IFIT1 i IFIT2 mogą wiązać się z wielopodjednostkowym eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji 3 (eIF3) i blokować tworzenie kompleksu 43S-

mRNA.^{141,142} Poprzez wiązanie się z RNA wirusa, białka IFIT mogą blokować jego translację, hamując w ten sposób produkcję białek wirusowych i replikację patogenów. Oprócz bezpośredniego działania antywirusowego, białka IFIT mogą również wpływać na inne aspekty odpowiedzi immunologicznej, takie jak modulacja aktywności cytokin i interakcje z innymi białkami sygnalizacyjnymi, co wpływa na ogólną obronę komórki. Najbardziej znanym członkiem rodziny jest IFIT1, który rozpoznaje RNA pozbawione metylacji w czapeczce mRNA (kap-0), a następnie hamuje ich translację.¹⁴³ Dokładnemu opisowi białka IFIT1 zostanie poświęcony kolejny podrozdział. Białko IFIT2 wykazuje silne działanie antywirusowe, głównie poprzez regulację procesu apoptozy oraz hamowanie replikacji wybranych wirusów.¹⁴⁴ W zależności od kontekstu komórkowego i rodzaju stresu, IFIT2 może promować bądź hamować apoptozę, co stanowi mechanizm obronny przeciwko infekcjom wirusowym, umożliwiając ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusów poprzez eliminację zainfekowanych komórek. IFIT2 wchodzi również w interakcje z innymi białkami komórkowymi, w tym z cząsteczkami sygnalizacyjnymi oraz czynnikami translacyjnymi, co wpływa na ogólną odpowiedź komórki na stres i infekcję.¹⁴⁵ Z kolei IFIT3 działa synergistycznie z IFIT1 i IFIT2, modulując sygnalizację antywirusową oraz wpływając na procesy komórkowe, takie jak odpowiedź na stres, sygnalizacja cytokin czy ekspresja genów antywirusowych.¹⁴⁶ IFIT3 może tworzyć kompleksy z innymi białkami rodziny IFIT, co wzmacnia ich działanie antywirusowe, umożliwiając bardziej efektywne wiązanie RNA wirusowego i blokowanie jego funkcji (Rys. 20).



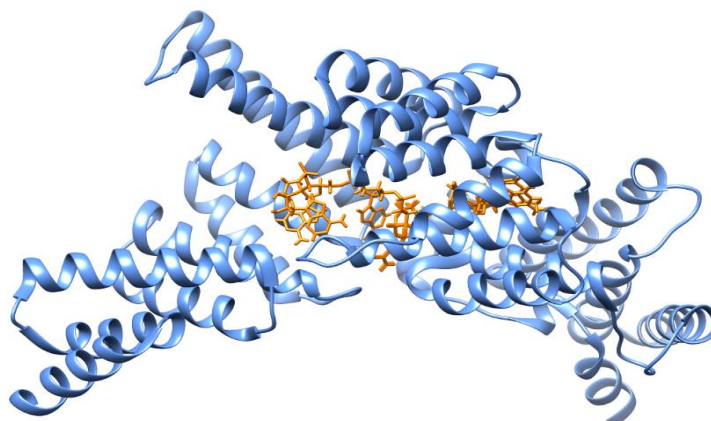
Rysunek 20 Schematyczna ścieżka składania kompleksów IFIT. Slabe interakcje zaznaczone są za pomocą odwracalnych strzałek. Mapa ciepła ilustruje względne powinowactwa ludzkich białek IFIT względem siebie oraz ich substratów RNA. Rysunek zapożyczony z Mears¹⁴⁵

Podobnie jak białko IFIT2, IFIT3 może wpływać na procesy apoptotyczne, modulując ekspresję i aktywność białek związanych z apoptozą, co jest istotne zarówno w kontekście odpowiedzi na infekcję, jak i regulacji procesów takich jak proliferacja i różnicowanie komórek.¹⁴⁷ IFIT5 specjalizuje się w rozpoznawaniu konkretnych struktur wirusowego RNA. Wykazuje powinowactwo do RNA posiadającego na swoim końcu 5' trifosforany (5'ppp), które są typowe dla wielu wirusowych RNA, ale nie występują w większości RNA eukariotycznych, gdzie 5' koniec jest zwykle chroniony przez kap.¹⁴⁸ IFIT5 może również rozpoznawać i wiązać się z RNA posiadającym specyficzne struktury drugorzędowe, które często występują w wirusowym RNA.¹³⁹ Jak już wspomniałem, IFIT1 i IFIT5 bezpośrednio wiążą się z RNA, hamując ich translację na etapie inicjacji. Strategia ta jest szczególnie

skuteczna, ponieważ RNA większości wirusów jest zwykle albo pozbawione czapeczki, albo posiada strukturę kap-0, zapobiegając przejściu przez wirusa maszyneryj translatablej gospodarka i hamując replikację wirusa.

4.6.1 Białko IFIT1

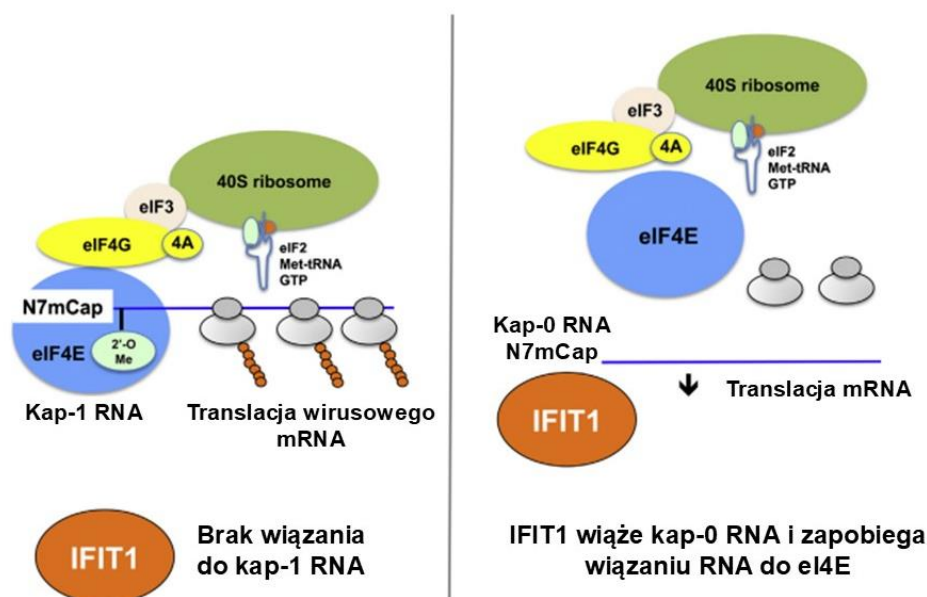
Najistotniejszym przedstawicielem rodziny IFIT w kontekście moich badań jest cząsteczka IFIT1, znana również jako ISG56 lub p56. Jest to białko efektorowe wrodzonego układu odpornościowego, które jest indukowane w odpowiedzi na infekcje wirusowe przez interferony IFN- α/β . Masa cząsteczki wynosi około 56 kDa.¹⁴⁹ Gen ISG56 zlokalizowany jest na chromosomie 10 (locus q23.3), a jego sekwencja składa się z dwóch egzonów, z których pierwszy koduje tylko 5'-UTR oraz kodon startowy. Drugi egzon, oddzielony intronem o długości kilku tysięcy zasad, koduje pozostałą część mRNA.¹³¹ Cząsteczka IFIT1 składa się z 478 aminokwasów, choć długość ta może się nieznacznie różnić w zależności od alternatywnego splicingu RNA lub polimorfizmów genetycznych.¹³⁶ Struktura IFIT1 wyróżnia się obecnością domen TPR, które odpowiadają za specyficzne interakcje białko-białko oraz białko-RNA, umożliwiając bezpośrednie rozpoznawanie wirusowego RNA. Drugorzędowa struktura tej cząsteczki zdominowana jest przez motywy alfa helisy, które występują 21 razy w jej sekwencji. Ponadto, IFIT1 zawiera trzy motywy helisa-zwrot-helisa oraz jeden motyw beta harmonijki. Wiązanie RNA możliwe jest dzięki domenom superhelikalnym, które obejmują 7 kluczowych reszt aminokwasowych (256-262) bezpośrednio oddziaływujących z RNA.¹³⁶ Region ten tworzy wysoce dodatnio naładowaną kieszeń z wyróżnionym miejscem wiązania końca 5' kwasu nukleinowego umożliwiającym wiązanie ligandów w postaci różnorodnie kapowanych RNA (Rys. 21).^{150,151}



Rysunek 21 Struktura krystaliczna ludzkiego białka IFIT1 (kolor niebieski) z cząsteczką kap-0-RNA w kieszeni wiążącej (kolor żółty). Rysunek przygotowany na podstawie struktury krystalograficznej (PDB 5UDI) zdeponowanej przez Abbas, Y.M.¹⁵²

Zarówno struktura jak i funkcja IFIT1 są skoncentrowane na rozpoznawaniu i zwalczaniu patogenów, w szczególności wirusów, wpływając na zahamowanie ich replikacji poprzez inhibicję translacji. IFIT1 zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie komórki, gdzie ta biomolekuła może oddziaływać na translację RNA wirusów. Ilość IFIT1 w komórce zależy od jej typu, stanu oraz od stymulacji interferonami. W większości typów komórek, bez stymulacji interferonem, poziomy IFIT1 są niewykrywalne.¹⁵³ Indukcja ekspresji tego genu jest zazwyczaj szybka i krótkotrwała, osiągając szczyt około 6 godzin po stymulacji IFN- α , a następnie gwałtownie maleje w ciągu 12-24 godzin.¹⁵⁴ Jednakże dynamika ekspresji tego białka może różnić się w zależności od rodzaju stymulacji i typu komórek. Mimo potencjalnej indukcji IFIT1 w różnorodnych typach komórek, najczęściej obserwuje się je w komórkach szczególnie narażonych na infekcje wirusowe, takich jak komórki nabłonkowe, dendrytyczne oraz limfocyty B i T.¹⁵⁵

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych funkcji białka IFIT1 na poziomie komórkowym jest jego zdolność do zatrzymywania procesu translacji przez wiązanie z konkretnymi podjednostkami eIF3.¹⁵⁶ Badania szczegółowo wykazały, że mechanizm ten polega na inhibicji co najmniej jednej z wielu funkcji eIF3 w fazie inicjacji translacji.¹⁴⁰ eIF3 to kompleks białkowy o masie około 800 kDa, składający się z 13 różnych podjednostek, znanych jako eIF3a-m.¹⁵⁷ Odpowiada on za szereg zadań na wstępnym etapie translacji, w tym za rozdzielenie podjednostek 60S/40S rybosomów 80S, wspieranie formowania kompleksu startowego eIF2/GTP/Met-tRNAi, łączenie się z eIF4F oraz za tworzenie kompleksu preinicjacyjnego 48S.¹⁵⁸ IFIT1 selektywnie zakłóca formowanie tego kompleksu startowego przez interakcję C-terminalnego fragmentu białka z podjednostką eIF3e (Rys. 22).

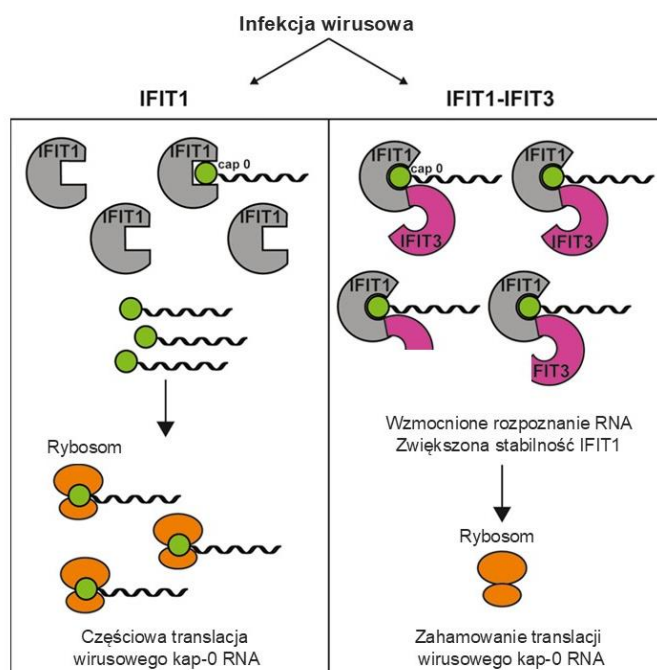


Rysunek 22 IFIT1 hamuje inicjację translacji, konkurując z eIF4E o wiązanie z wirusowym mRNA pozbawionym modyfikacji 2'-O metylacji. Po lewej stronie, mRNA z kapem-1 (z modyfikacją 2'-O) wiąże się z eIF4E, co prowadzi do skutecznej translacji wirusowego mRNA. Białko IFIT1 nie wiąże się z mRNA z kapem-1. Po prawej stronie, IFIT1 wiąże się z mRNA z kapem-0 (bez modyfikacji 2'-O), co zapobiega wiązaniu eIF4E i prowadzi do zahamowania translacji. Rysunek na zaopieczony z Diamond¹⁴³

Ogólne hamowanie translacji komórkowej za pośrednictwem IFIT1 można uznać za część niespecyficznego programu przeciwwirusowego wywołanego ekspozycją komórek na IFN lub wirusowe wzorce molekularne, które indukują skoordynowaną ekspresję tych i innych ISG. Jednak repertuar funkcji białek IFIT1 rozciąga się również na specyficzne oddziaływania z jednoniciowymi, egzogennymi RNA znajdującymi się w cytoplazmie w trakcie infekcji wirusowych. Bezpośrednie wiązanie białek IFIT do końca 5' wirusowego RNA zaburza replikację wirusa, hamując powstawanie kolejnych białek budujących wiriony już na poziomie mRNA.¹³⁹ Kluczowym elementem IFIT1, odpowiedzialnym za interakcje z kwasem nukleinowym, jest dodatnio naładowana kieszeń wiążąca RNA.¹⁴⁵ W porównaniu do IFIT5, jest ona wydłużona i posiada dodatkowe hydrofobowe zagłębienie, które może pomieścić cząsteczkę N7-metyloguanozyny w wielu różnych konformacjach.¹³⁶ Taka organizacja strukturalna sprawia, że specjalizujący się w wiązaniu kapowanych RNA IFIT1, może z różnym powinowactwem oddziaływać z RNA w zależności od struktury 5' końca (kapu) danej cząsteczki kwasu nukleinowego. Ten mechanizm pozwala IFIT1 na efektywne wykrywanie obcych molekuł RNA w cytoplazmie, wiązanie ich i hamowanie translacji wirusowych białek w ludzkich komórkach. Do tej pory badania nad specyficznością IFIT-RNA były prowadzone głównie przy użyciu technik biochemicznych, które dały przybliżone szacunki powinowactwa wiązania.¹⁴⁹ W układach eksperymentalnych wykorzystujących rekombinowane białka, IFIT1 wykazywał najsilniejszą preferencję wiązania kap-0-RNA w stosunku do kap-1-RNA (posiadającego 2'-O metyl na pierwszym transkrybowanym nukleotydzie) oraz niekapowanego (tj. 5'-trisforylowanego) RNA.¹³⁶ Interakcje IFIT1

z RNA badano do tej pory przy użyciu różnych metod, w tym hamowania wydłużania primerów (ang. *primer-extension inhibition*)¹²⁸, testu przesunięcia elektromobilności (EMSA, ang. *electromobility shift assays*)¹⁵⁹ oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*).¹⁴⁰ Badania te konsekwentnie wskazywały na wysokie powinowactwo IFIT1 do kapu-0-RNA, z wartościami stałej dysocjacji (K_D) w zakresie od 23 do 175 nM, niezależnie od pochodzenia RNA (wirusowego lub gospodarza) i sekwencji. Analogiczne badania wykazały, że IFIT1 wiąże się również z 5'-trifosforan-RNA i kap-1-RNA, aczkolwiek ze znacznie niższym powinowactwem ($K_D \sim 250$ nM do $>1 \mu\text{M}$ dla ppp-RNA i $K_D \sim 450$ do 710 nM dla kap1-RNA).^{149,160,161} Jak wynika z testów wydłużania starterów, elementem krytycznym cząsteczki RNA dla prawidłowego wiązania do IFIT1 jest kap RNA oraz co najmniej 4-5 nukleotydów poniżej struktury czapeczki.^{140,162} Te dodatkowe nukleotydy prawdopodobnie zwiększają stabilność wiązania IFIT1-RNA, blokując rekrutację dodatkowych ligandów do kieszeni wiążącej lub eliminując niespecyficzne interakcje poprzez indukowanie zmian w konformacji białka.¹⁶³ Skuteczność wykrywania obcego mRNA i zapobiegania rozwojowi infekcji jest jeszcze większa, gdy IFIT1 działa w kompleksie z IFIT3 (Rys.23).^{139,164,165}

Znacznie mniej wiadomo na temat rozpoznawania IFIT1 przez inne struktury kapu, np. niekanoniczne czapeczki występujące na niektórych endogennych, wirusowych i bakteryjnych RNA lub chemicznie modyfikowane kapy, które są syntezowane w celu modyfikacji transkrybowanych *in vitro* RNA. Opracowanie prostej, łatwo dostępnej, a także oszczędnej pod względem materiału i czasu metody oceny interakcji kapowanego RNA z IFIT1 znacząco przyspieszyłoby badania w tym obszarze. Wprowadzenie modyfikacji strukturalnych w obrębie czapeczki na 5' końcu RNA może korzystnie wpływać na poziom translacji mRNA w systemach biologicznych, takich jak linie komórkowe i modele mysie.¹⁶⁶ Jednocześnie niezmiernie istotne pozostaje określenie wpływu takich modyfikacji na układ

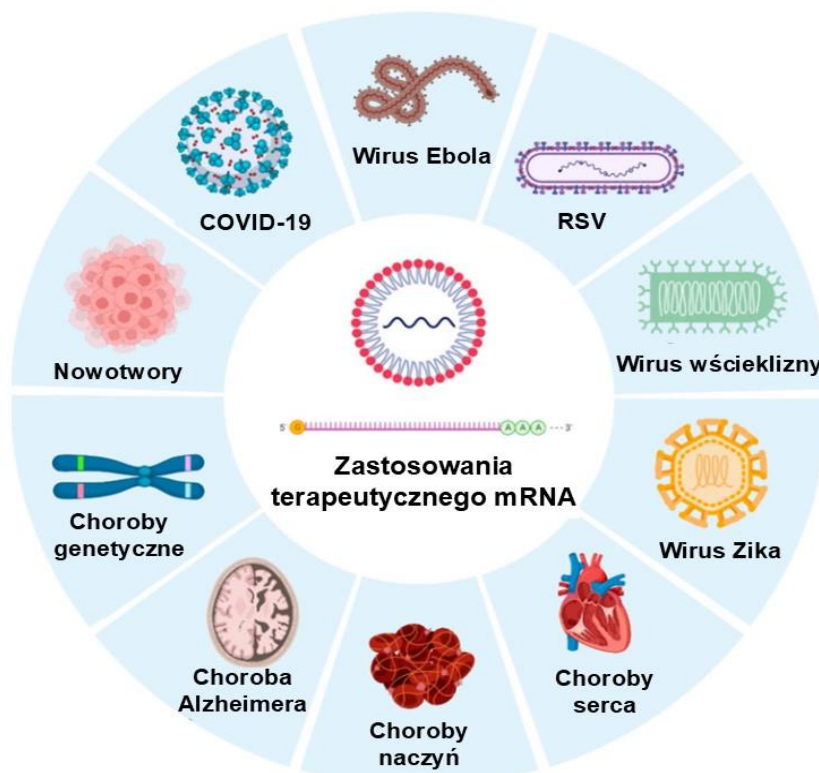


immunologiczny gospodarza, w tym białka bezpośrednio oddziałujące z egzogennym RNA, jak IFIT1. Ustalenie powinowactwa modyfikowanych na końcu 5' RNA o wysokim potencjale terapeutycznym względem IFIT1 może ułatwić ocenę potencjalnej odpowiedzi odpornościowej organizmu w kontakcie z takim egzogennym kwasem nukleinowym. Elastyczność kieszeni wiążącej IFIT1 wobec różnorodnych struktur 5' RNA stwarza możliwość ewaluacji szerokiego zakresu modyfikacji, co zwiększa szansę na wytypowanie wariantów o wyjątkowych właściwościach biochemicznych. Te warianty mogą z kolei przynieść przewagę biologiczną w porównaniu do naturalnych mRNA.

Rysunek 23 Wpływ białek IFIT1 oraz kompleksu IFIT1–IFIT3 na translację wirusowego RNA. Po lewej stronie, IFIT1 wiąże się z wirusowym kap-0 RNA, co prowadzi do częściowego zahamowania translacji. Po prawej, kompleks IFIT1–IFIT3 wzmacnia rozpoznanie wirusowego RNA oraz stabilizuje IFIT1, co skutkuje pełnym zahamowaniem translacji wirusowego kap-0 RNA. Rysunek na podstawie Johnson¹⁶⁵

5. Perspektywy terapeutycznego wykorzystania cząsteczek mRNA

Możliwość wykorzystania mRNA w medycynie stanowiła przedmiot badań naukowych już od lat 60. XX wieku. Jednak jej rozwój w kontekście zastosowań terapeutycznych zaczął nabierać tempa dopiero w ostatnich dekadach, głównie dzięki postępowi w dziedzinie biologii molekularnej i nanotechnologii. Zainteresowanie mRNA, jako potencjalnym narzędziem terapeutycznym datuje się na początek lat 90. XX wieku, kiedy to naukowcy zaczęli eksplorować możliwość wykorzystania syntetycznego mRNA do produkcji białek w komórkach.¹⁶⁷ Idea polegała na wprowadzeniu do komórek pacjenta mRNA kodującego pożądane białko, które mogłoby działać jako lek, np. poprzez uzupełnianie brakujących lub nieprawidłowych białek w genetycznie uwarunkowanych chorobach, stymulowanie układu odpornościowego w terapiach przeciwnowotworowych lub w produkcji szczepionek. Jednak wczesne próby zastosowania mRNA napotkały szereg wyzwań, takich jak niska stabilność cząsteczek mRNA, ich skłonność do degradacji przez enzymy (RNazy) oraz wywoływanie niepożądanych reakcji immunologicznych. Te problemy znacząco ograniczały efektywność terapii. Przełom nastąpił w ostatnich dwóch dekadach, głównie dzięki postępom w technologii inżynierii genetycznej cząsteczek mRNA oraz opracowaniu skutecznych metod dostarczania RNA do komórek. Nowatorskie metody terapeutycznego wykorzystania mRNA powstałego w procesie transkrypcji *in vitro* (IVT mRNA) umożliwiły zastosowanie takich molekuł, jako aktywnego składnika w szczepionkach przeciwko wirusom i nowotworom, a także w terapiach genowych. W krótkim czasie okazało się, że podejście oparte na mRNA oferuje liczne zalety w porównaniu z tradycyjnymi metodami terapeutycznymi.



Rysunek 24 Zastosowania terapii mRNA. Różnorodne zastosowania terapii opartych na mRNA, w tym zapobieganie COVID-19, wirusowi Ebola, RSV, wirusowi wściekliczny, wirusowi Zika oraz leczenie nowotworów. Dodatkowo, wskazuje na potencjalne zastosowania w leczeniu chorób genetycznych, choroby Alzheimera, chorób układu sercowo-naczyniowego, zaburzeń naczyniowych i innych schorzeń, które mogą skorzystać z technologii mRNA. Rysunek na podstawie pracy Chavda et al.¹⁶⁸

W przeciwieństwie do szczepionek bazujących na dezaktywowanych lub atenuowanych wirusach, szczepionki mRNA nie niosą ryzyka zakażenia i działają skutecznie, nawet jeśli pacjent ma już odporność na inne wirusy stosowane jako nośniki w tradycyjnych szczepionkach. W odróżnieniu od

DNA, mRNA nie niesie ryzyka mutagenyzy, ponieważ nie integruje się z genomowym DNA i jest naturalnie degradowane przez komórkę. Nowoczesne techniki modyfikacji mRNA umożliwiają zwiększenie jego stabilności, regulację immunogenności, poprawę efektywności translacji, a także precyzyjną kontrolę metabolizmu i czasu jego aktywności w komórkach. Przykładem takiej modyfikacji jest zastąpienie urydyny pseudourydyną lub jej pochodnymi¹⁶⁹, o czym więcej napiszę w dalszych podrozdziałach. Dzięki zastosowaniu syntetycznych nośników do efektywnego i bezpiecznego dostarczania mRNA do komórek docelowych, takich jak nanocząstki lipidowe (LNP, ang. *lipid nanoparticles*), znacząco poprawiły się możliwości terapeutycznego zastosowania technologii mRNA. Ponadto, mRNA można produkować stosunkowo tanio i efektywnie na dużą skalę metodą IVT, wykorzystując rozwiązania opracowane już w 1984 roku przez zespół Paula Kriega i Douglasa Meltona z Uniwersytetu Harwarda.¹⁷⁰ Ogromny postęp w tej dziedzinie technologii mRNA nastąpił w odpowiedzi na pandemię COVID-19, kiedy to szczepionki mRNA opracowane przez firmy takie jak Moderna i Pfizer we współpracy z BioNTech zostały szybko wprowadzone na rynek. Warto jednak podkreślić, że ten sukces nie byłby możliwy bez wieloletnich badań nad technologią mRNA, które obejmowały liczne badania kliniczne prowadzone na długo przed pandemią. Wykorzystanie mRNA do produkcji szczepionek przeciwko SARS-CoV-2 wykazało nie tylko ich skuteczność, ale także wysokie tempo opracowania takich preparatów i możliwość szybkiego dostosowania ich do nowych wariantów wirusa. Współcześnie technologia mRNA otwiera nowe możliwości w terapii wielu chorób, nie tylko infekcyjnych, ale także genetycznych, nowotworowych oraz w dziedzinie terapii regeneracyjnej (Rys. 24). Pomimo wyzwań, takich jak dostarczanie do specyficznych typów komórek oraz konieczność dalszej oceny efektów długotrwałego stosowania, szybki rozwój i sukcesy kliniczne wskazują na ogromny potencjał tej technologii w przyszłości medycyny.

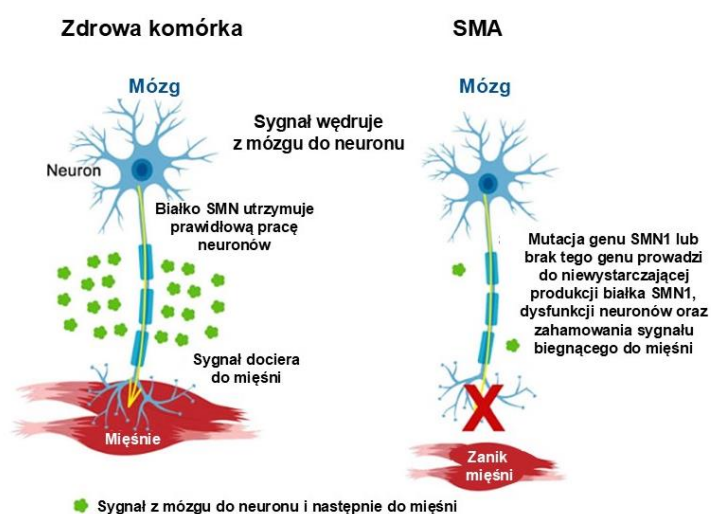
5.1 Terapie genowe

Celem terapii genowych opartych na DNA jest zastąpienie uszkodzonych lub brakujących genów poprzez dostarczenie prawidłowych sekwencji genetycznych. Dzięki temu możliwe jest wytworzenie brakujących lub funkcjonalnych białek, co umożliwia korektę zaburzeń genetycznych odpowiedzialnych za zakłócenia kluczowych procesów komórkowych. Rozwój wspomnianych metod leczenia skupiał się pierwotnie na tworzeniu terapii zastępujących białka (ang. *protein replacement therapies*), które wprowadzają do organizmu geny zdolne do syntezy nieprodukowanych naturalnie lub produkowanych w zniekształconej formie białek, bez potrzeby ingerencji leczniczej.¹⁷¹ Najszybszym sposobem osiągnięcia ekspresji białka jest bezpośrednie dostarczenie pożądanego białka do chorej tkanki. To podejście oferuje kilka korzyści, takich jak pominięcie procesu translacji w komórkach, co umożliwia precyzyjną regulację dawki, osiągnięcie wysokich stężeń białka w docelowej tkance oraz większą kontrolę nad terapią w porównaniu z metodami genowymi opartymi na wektorach wirusowych. Jednakże ma to również pewne ograniczenia, przez co nie jest odpowiednie w leczeniu wielu schorzeń. Głównym wyzwaniem jest konieczność zachowania trójwymiarowej struktury białek, która warunkuje ich aktywność biologiczną, a także ich wielkość, która utrudnia efektywną penetrację tkanek. Dodatkowo, podawane białka charakteryzują się krótkim okresem półtrwania, co w połączeniu z niestabilnością i potencjalną immunogennością ogranicza skuteczność tej metody. Kolejnym istotnym ograniczeniem jest brak możliwości dostarczania białek działających wewnątrz komórek, takich jak czynniki transkrypcyjne czy inne regulatory komórkowe, co dodatkowo ogranicza potencjał terapeutyczny tego podejścia.

Terapie genowe wykorzystujące kwasy nukleinowe pierwotnie opierały się na rekombinowanych cząsteczkach plazmidowego DNA, który podawano do wnętrza komórek poprzez transdukcję w wektorach wirusowych.¹⁷² Takie rozwiązanie pozwalało co prawda na dostarczenie sekwencji kodującej prawidłowe białko do cytoplazmy komórek chorego, jednak sama metoda okazała

się wysoce cytotoksyczna i immunogenna, co prowadziło do poważnych efektów ubocznych. Dodatkowo plazmidowe DNA z cytoplazmy musiało być przetransportowane do jądra komórkowego, wbudowane do genomu, ulec transkrypcji, a molekula mRNA ponownie trafić do cytoplazmy i uczestniczyć w biosyntezie pożądanego białka. Wieloetapowość tego podejścia skutkowałą niską efektywnością terapii oraz długim czasem oczekiwania na reakcję po zastosowaniu leczenia. Zastosowanie syntetycznych mRNA do powyższego zadania umożliwia ominięcie wielu krytycznych etapów, w tym integracji z DNA gospodarza, a to minimalizuje zagrożenie związane z mutagenezą i potencjalnie nieprzewidywalnymi efektami ubocznymi terapii. Z drugiej strony, warto zauważyć, że mRNA musi być regularnie dostarczane do organizmu, ponieważ jest ono szybko degradowane, podczas gdy DNA wbudowane w genom komórki pozostaje w nim na stałe i może stale produkować odpowiednie białko.

Obecnie liczne ośrodki badawcze oraz firmy prywatne intensywnie pracują nad rozwojem metod terapeutycznych opartych na terapii genowej.¹⁷³ Ta technologia stwarza nowe perspektywy w leczeniu chorób genetycznych, oferując potencjalną możliwość wyleczenia schorzeń, które do tej pory były uważane za nieuleczalne. Wykorzystanie RNA i DNA w terapiach genowych umożliwia precyzyjne ukierunkowanie na konkretne defekty genetyczne, co przynosi obiecujące rezultaty w badaniach klinicznych. Doskonałym przykładem może być zastosowanie dwóch różnych technik w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni SMA (ang. *spinal muscular atrophy*).¹⁷⁴ SMA jest chorobą genetyczną, która prowadzi do postępującego osłabienia mięśni, wynikającego z utraty motoneuronów w rdzeniu kręgowym. Motoneurony odpowiadają za kontrolę nad mięśniami szkieletowymi w obrębie rdzenia kręgowego, a postępująca choroba prowadzi do ich degeneracji i śmierci. Choroba ta jest spowodowana mutacją w genie SMN1, który jest kluczowy dla przetrwania motoneuronów (Rys. 25).



Rysunek 25 Porównanie funkcjonowania neuronów ruchowych w stanie normalnym i w rdzeniowym zaniku mięśni (SMA). Po lewej stronie, w warunkach normalnych, białko SMN utrzymuje prawidłowe funkcjonowanie neuronu, a sygnały z mózgu docierają do mięśni, co umożliwia ich skurcz. Po prawej stronie, w SMA, mutacja genu SMN1 lub jego brak prowadzi do niedoboru białka SMN, co powoduje dysfunkcję neuronu i brak przekazywania sygnału do mięśni, co skutkuje ich zanikiem. Rysunek na podstawie newbornscreening.info¹⁷⁵

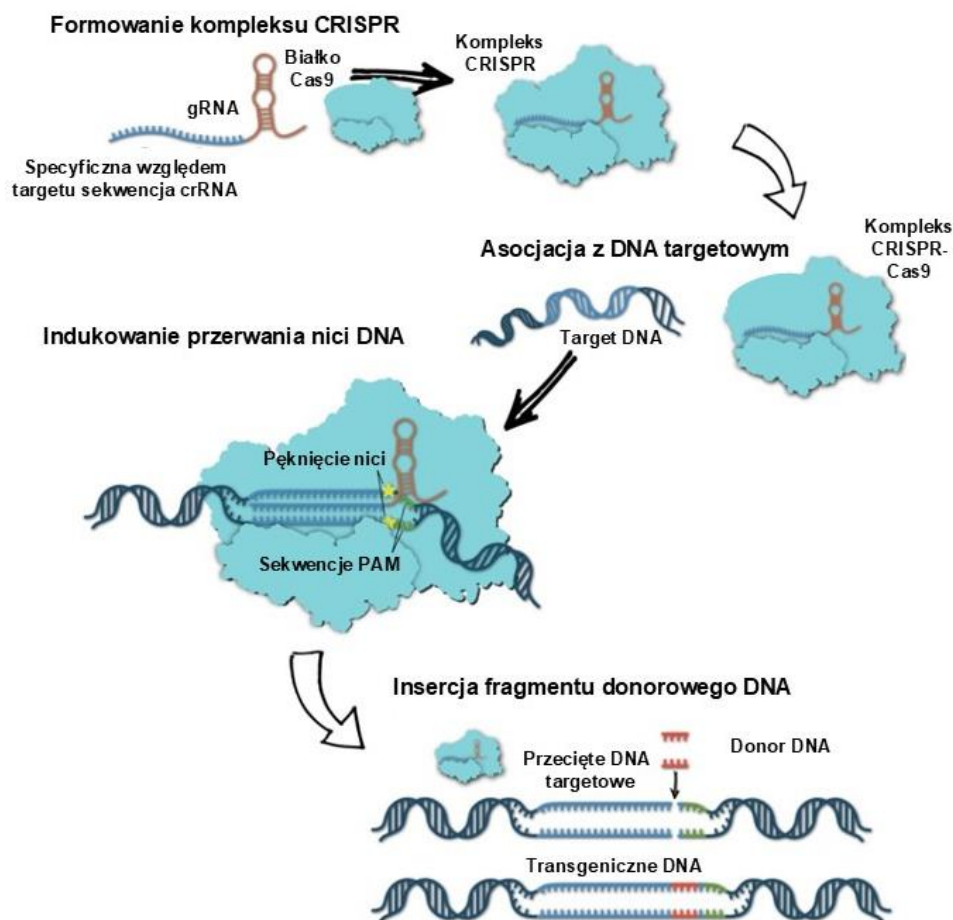
Jedną z obiecujących metod leczenia jest terapia oparta na mRNA, mająca na celu dostarczenie kopii mRNA kodującego białko SMN, które może ulegać translacji w komórkach pacjenta i zrekompensować niedobór białka SMN spowodowany przez mutacje genetyczne.¹⁷⁶ W ramach badań klinicznych, pacjentom z SMA podawano syntetyczne mRNA za pomocą wektorów wirusowych lub nanocząstek, co pozwoliło na bezpośredni transport mRNA do komórek docelowych. Ta strategia umożliwiła tymczasową ekspresję białka SMN, co może prowadzić do poprawy funkcji mięśniowej

i spowolnienia lub zatrzymania postępu choroby. Terapia ta pozwala na omijanie uszkodzonego genu SMN1 i bezpośrednie dostarczenie funkcjonalnego mRNA do komórek. Drugie podejście do leczenia atrofii mięśniowej rdzeniowej zakłada wykorzystanie terapii antysensownych oligonukleotydów ASO (ang. *antisense oligonucleotides*).¹⁷⁷ W jej trakcie pacjentom podawano poprzez bezpośrednie iniekcje dokanałowe cząsteczki nusinersenu (Spinrazy) do płynu mózgowo-rdzeniowego. Mechanizm działania nusinersenu polega na korekcji splicingu genu SMN2, który na skutek mutacji ulega alternatywnemu splicingowi, prowadzącemu do pominięcia egzonu 7 w transkrypcie SMN2. W efekcie powstaje skrócone i niefunkcjonalne białko, które nie jest w stanie wspierać neuronów ruchowych. Nusinersen, jako antysensowny oligonukleotyd, wiąże się z pre-mRNA genu SMN2 w okolicy eksonu 7. Dzięki temu stabilizuje miejsce splicingowe, zapobiegając jego pominięciu w procesie obróbki mRNA. W rezultacie powstaje prawidłowy transkrypt mRNA, który umożliwia produkcję pełnowartościowego białka SMN. Ten mechanizm działania pozwala na częściowe przywrócenie funkcji białka SMN, co spowalnia postęp choroby i poprawia funkcje motoryczne u pacjentów z SMA. Terapia ta wykazała znaczącą poprawę w zakresie siły mięśniowej i funkcji motorycznych u pacjentów z SMA w różnych badaniach klinicznych, włączając niemowlęta, dzieci oraz dorosłych. Nusinersen był pierwszym lekiem zatwierdzonym przez amerykańską agencję żywności i leków FDA (ang. *food and drug administration*) dla pacjentów cierpiących na SMA. Terapia ta stanowi ważny postęp w dziedzinie medycyny molekularnej, oferując nową nadzieję dla pacjentów z chorobami dotychczas uważanymi za nieuleczalne.

5.2 Edycja genów

Dziedziną terapii genowych o szczególnie interesujących możliwościach jest z pewnością edycja genów (ang. *genome editing*).¹⁷⁸ Jest to proces biotechnologiczny, który umożliwia dokonywanie precyzyjnych zmian w DNA organizmów żywych. Metoda ta pozwala na dodawanie, usuwanie lub modyfikowanie konkretnych sekwencji genetycznych w genomie, co otwiera szerokie możliwości w zakresie badań naukowych i medycyny, w tym leczenie chorób genetycznych poprzez korygowanie mutacji oraz rozwój nowych terapii. Edycja genów odbywa się za pomocą różnych narzędzi i metod, wśród których najbardziej znane to CRISPR-Cas9 (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9*), ZFN (ang. *zinc finger nucleases*) i TALEN (ang. *transcription activator-like effector nucleases*).^{179,180} Każda z tych technologii wykorzystuje specjalnie zaprojektowane białka lub RNA do celowania w określone miejsca w genomie, gdzie mogą indukować cięcie DNA. Aktywuje to naturalne mechanizmy naprawcze komórki, które mogą zostać wykorzystane do wprowadzenia zmian w DNA. Najbardziej powszechnie stosowaną metodą jest CRISPR-Cas9, która wykorzystuje system obrony bakteryjnej przeciwko wirusom (Rys. 26). CRISPR oznaczający skupione regularnie rozmieszczone krótkie palindromiczne powtórzenia odnosi się do unikalnej organizacji sekwencji DNA znajdujących się w genomach wielu bakterii i archeonów. System CRISPR służy jako rodzaj pamięci immunologicznej, umożliwiając bakteriom rozpoznanie i obronę przed ponownymi atakami tych samych wirusów. Cas9 to endonukleaza, które odgrywa kluczową rolę efektorową w tym systemie.¹⁸¹ Mechanizm działania CRISPR-Cas9 rozpoczyna się od zaprojektowania przewodnika RNA, gRNA (ang. *guide RNA*), który jest specyficznie dostosowany do celowania w określoną sekwencję genetyczną w ludzkim genomie. Sekwencja gRNA musi być komplementarna do regionu docelowego, aby zapewnić wysoką specyficzność interakcji z DNA. gRNA łączy się z białkiem Cas9, tworząc kompleks zdolny do przeszukiwania genomu w celu odnalezienia konkretnej sekwencji DNA. Kluczowe dla działania kompleksu jest również rozpoznanie sekwencji PAM (ang. *protospacer adjacent motif*), co zapewnia dodatkową specyficzność i ochronę przed cięciem niezamierzonych miejsc w genomie. Dostarczenie kompleksu CRISPR-Cas9 do ludzkich komórek może być realizowane na różne sposoby, w tym za pomocą wektorów wirusowych, liposomów,

elektroporacji, iniekcji mikrostrzykawką czy też cząsteczek mRNA.¹⁸² Po dostarczeniu do komórek, kompleks gRNA-Cas9 lokalizuje specyficzną sekwencję docelową w DNA i indukuje podwójne pęknięcie nici DNA w tym miejscu. Cięcie to jest precyzyjne i kontrolowane przez komplementarność między gRNA, a sekwencją docelową. Pęknięcia DNA aktywują naturalne mechanizmy naprawcze komórki. W zależności od kontekstu, może zostać wykorzystany mechanizm niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) lub homologiczna rekombinacja (HR).¹⁸³ NHEJ często prowadzi do insercji lub delecji, co może wyłączyć gen, natomiast HR, w obecności matrycy DNA, umożliwia wprowadzenie specyficznych zmian lub dodanie nowych sekwencji.



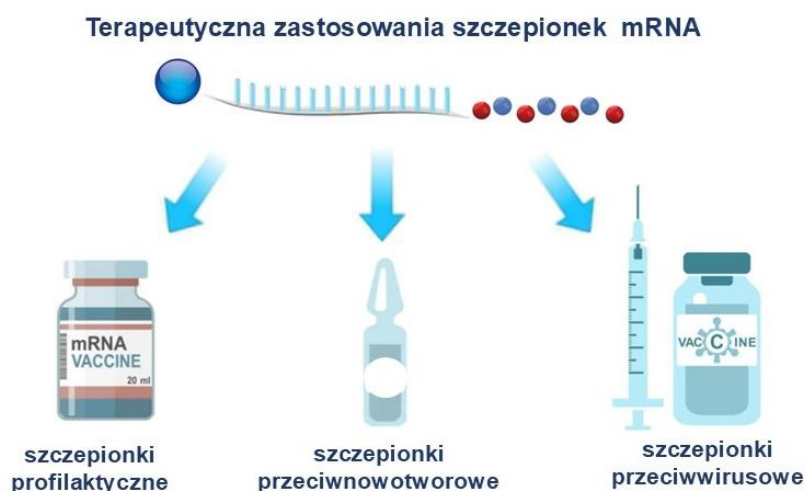
Rysunek 26 Mechanizm edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9. Metoda ta wykorzystuje RNA przewodnik (gRNA), który prowadzi enzym Cas9 do określonego fragmentu DNA w genomie, powodując przerwanie obu nici. Jeśli dostarczony zostanie fragment DNA dawcy, możliwe jest wprowadzenie nowego materiału genetycznego. W przypadku braku takiego fragmentu, komórka samodzielnie naprawia uszkodzenie, co może skutkować wstawieniem lub usunięciem fragmentu DNA, co z kolei może zmienić ramkę odczytu genu i wpłynąć na jego funkcję. Rysunek na podstawie pracy Costa et al.¹⁸⁴

Ciekawym przykładem wykorzystania systemu CRISPR-Cas9 jest zastosowanie tej techniki w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD ang. *Duchenne muscular dystrophy*).¹⁸⁵ DMD jest ciężką chorobą genetyczną charakteryzującą się postępującym osłabieniem i degeneracją mięśni. Choroba ta jest spowodowana mutacjami w genie dystrofiny, która odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności i funkcji mięśni szkieletowych. Terapia genowa oparta na technice CRISPR-Cas9 miała na celu naprawę tych mutacji bezpośrednio w komórkach pacjenta. W badaniach klinicznych system CRISPR-Cas9 został dostarczony do komórek mięśniowych za pomocą wektorów wirusowych, co umożliwiło precyzyjne usunięcie uszkodzonej sekwencji genu dystrofiny i wstawienie prawidłowej sekwencji. Taki zabieg przywrócił produkcję funkcjonalnego białka, co znacząco poprawiło jakość

życia pacjentów. W niektórych przypadkach terapia ta doprowadziła do spowolnienia postępu choroby lub nawet jej częściowego odwrócenia.

5.3 Szczepionki mRNA

Szczepionki oparte na mRNA stanowią przełomową technologię w prewencji chorób zakaźnych oraz leczeniu chorób nowotworowych.¹⁸⁶ W zależności od wykorzystywanej sekwencji genu, można podzielić je na dwie główne kategorie: szczepionki profilaktyczne oraz szczepionki terapeutyczne. Obydwie kategorie wykorzystują molekularne mechanizmy działania mRNA do indukowania odpowiedzi immunologicznej, ale mają różne cele i zastosowania (Rys. 27).

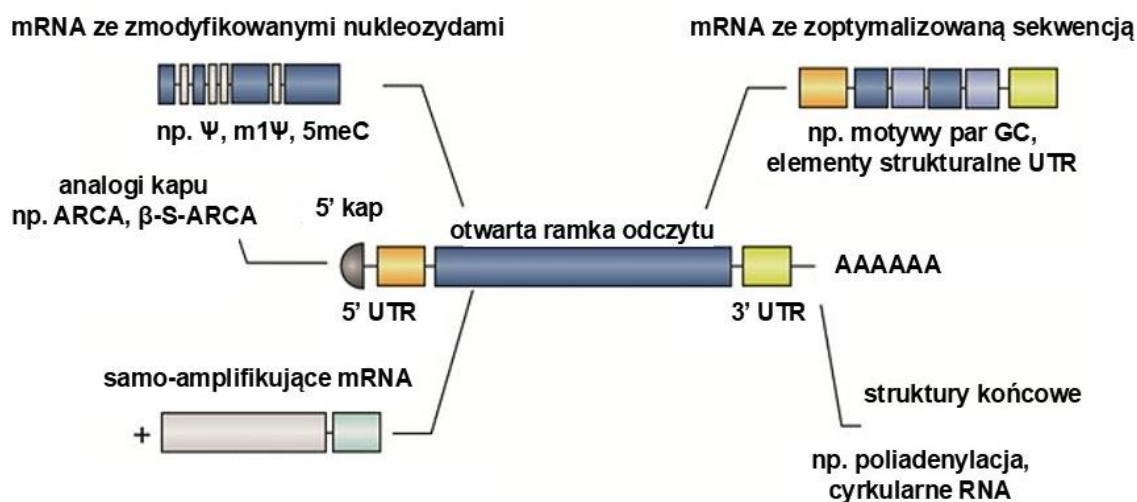


Rysunek 27 Potencjalne terapeutyczne zastosowania szczepionek mRNA

Szczepionki profilaktyczne oparte na mRNA mają na celu zapobieganie chorobom zakaźnym poprzez naukę systemu odpornościowego rozpoznawania i zwalczania konkretnych patogenów.¹⁸⁷ Działają one poprzez dostarczenie syntetycznego mRNA kodującego białko lub fragmenty białek specyficznych dla danego wirusa lub bakterii. Po wprowadzeniu do organizmu, mRNA jest wykorzystywany przez komórki do produkcji tych białek, które następnie są prezentowane układowi odpornościowemu. Nie prowadzi to do infekcji, ale imituje atak patogenu, co skutkuje rozwinięciem specyficznej odporności. Przykładem takiej szczepionki są szczepionki przeciwko COVID-19, takie jak te opracowane przez firmy Pfizer/BioNTech i Moderna, które kodują białko kolca S (ang. *spike*) wirusa SARS-CoV-2, umożliwiając organizmowi rozpoznanie i zwalczanie wirusa.¹⁸⁸ Badania nad profilaktycznymi szczepionkami mRNA obejmują również inne choroby, takie jak grypa, Zika, czy cytomegalia.¹⁸⁹ Warto również wspomnieć o drugiej szczepionce mRNA (Moderna) zatwierdzonej przez FDA przeciw wirusowi RSV (ang. *respiratory syncytial virus*).¹⁹⁰

Szczepionki terapeutyczne oparte na mRNA, mają na celu leczenie istniejących chorób, a nie ich zapobieganie. Są one szczególnie obiecujące w onkologii, gdzie mogą być wykorzystane do indukowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym. Szczepionki te dostarczają mRNA kodujące antygeny nowotworowe, np. takie które są prezentowane na powierzchni komórek nowotworowych, ale nie na zdrowych komórkach. Po dostarczeniu mRNA i produkcji antygenów nowotworowych, system odpornościowy jest w stanie rozpoznać i zniszczyć komórki nowotworowe prezentujące te antygeny. W ten sposób, szczepionki terapeutyczne oparte na mRNA mogą wspomagać leczenie raka poprzez aktywację układu odpornościowego przeciwko komórkom nowotworowym.

Nad rozwojem szczepionek mRNA pracują zarówno instytucje akademickie, jak i firmy biotechnologiczne i farmaceutyczne na całym świecie. Liderami w tej dziedzinie są m.in. firmy Pfizer/BioNTech, CureVac oraz Moderna, które opracowały pierwsze na świecie szczepionki mRNA przeciwko COVID-19. Tworzenie efektywnej szczepionki na bazie mRNA wymaga szczególnego uwzględnienia unikalnych właściwości tej cząsteczki. Preparaty tego typu muszą spełniać kilka kluczowych kryteriów, aby zapewnić skuteczność i bezpieczeństwo terapii. Jednym z głównych wyzwań jest nietrwałość cząsteczek mRNA, które są podatne na szybką degradację przez enzymy obecne w organizmie. Dlatego kluczowe znaczenie ma odpowiednie zaprojektowanie syntetycznego transkryptu, którego struktura – w tym optymalizacja sekwencji, stabilizacja końców mRNA oraz odpowiednia modyfikacja chemiczna – pozwala na zwiększenie trwałości cząsteczki i efektywność jej translacji. Dzięki tym zabiegom możliwe jest zapewnienie odpowiedniego poziomu produkcji terapeutycznego białka, co przekłada się na skuteczność działania szczepionki (Rys. 28).



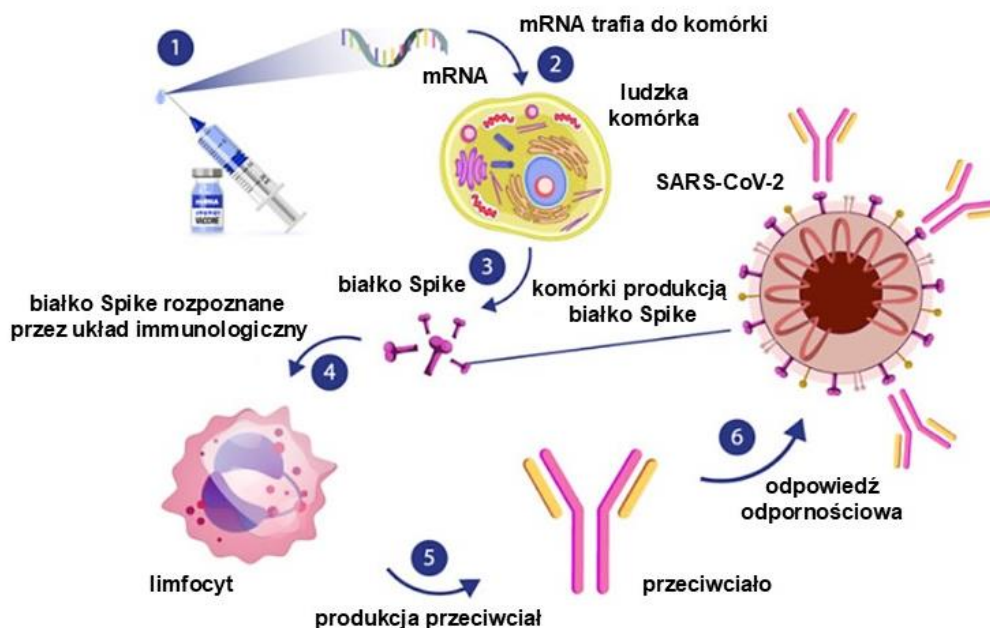
Rysunek 28 Schemat modyfikacji i elementów strukturalnych syntetycznego mRNA stosowanych w terapiach. Przedstawiono nukleozydowe modyfikacje mRNA, analogi kapu, zoptymalizowane sekwencje kodujące, strukturalne elementy UTR, a także modyfikacje końca 3', takie jak ogon poli(A) oraz koliste mRNA. Każdy z tych elementów może być zoptymalizowany i modyfikowany w celu modulowania stabilności, aktywności biologicznej oraz wpływu na układ immunologiczny gospodarza. Rysunek na podstawie pracy Verbeke et al.¹⁹¹

Sekwencja kodująca ORF (ang. *open reading frame*) zawiera pełny zapis nukleotydowy danego genu. Projektując ten element należy zwrócić szczególną uwagę na optymalizację sekwencji pod względem występowania danych kodonów – trójek nukleotydowych kodujących dany aminokwas, struktury drugorzędowej molekuly mRNA oraz zawartości urydyn, które mogą prowadzić do powstawania reakcji odpornościowych organizmu, ze względu na wysokie powinowactwo do receptorów TLR.¹⁹² Celem tej optymalizacji jest minimalizacja reaktogenności mRNA i dostosowanie sekwencji nukleotydowej do parametrów najlepiej odpowiadających wydajnej translacji białka w organizmie docelowym. Warto zaznaczyć, że w zależności od gatunku, wykorzystanie konkretnych kodonów jest różne, co przekłada się na odmienny optymalny układ sekwencji kodującej ten sam gen w dwóch różnych organizmach, np. u człowieka i myszy.¹⁹³ Struktura drugorzędowa cząsteczki mRNA również znacząco wpływa na ekspresję białek. Otwarta struktura wyższego rzędu cząsteczki, cechująca się niską wartością minimalnej energii swobodnej MFE (ang. *minimal free energy*), sprzyja efektywnemu przetwarzaniu nici mRNA przez maszynę translacyjną komórki.¹⁹⁴ Procentowa zawartość urydyn w sekwencji kodującej mRNA przekłada się na immunogenność takiej cząsteczki w organizmie pacjenta. Wynika to z aktywacji receptorów (TLR7) znajdujących się w endosomach komórek odpornościowych, które specyficznie rozpoznają pojedyncze nici RNA bogate w urydynę.¹⁹⁵ Dodatkowo sekwencje bogate w urydynę mogą tworzyć specyficzne struktury wyższego rzędu, jak

pętle, czy spinki do włosów w transkryptach mRNA, dodatkowo zwiększając ich immunogenność poprzez ułatwienie ich rozpoznawania przez system immunologiczny.¹⁹⁶ Optymalizacja zawartości urydyn (U%) polega na ograniczaniu wykorzystania tej zasady azotowej na trzeciej pozycji w kodonach. Umożliwia to redukcję U% do kilkunastu procent (optymalnie ~ 12–14 %).¹⁹⁷ Niemniej istotne od samego ORF są regiony niekodujące UTR (ang. *untranslated region*) zlokalizowane na obu końcach otwartej ramki odczytu. 5' UTR jest to sekwencja znajdująca się przed startowym kodonem AUG w mRNA. 5' UTR odgrywa ważną rolę w inicjacji translacji, ponieważ zawiera sekwencje regulatorowe, które mogą wiązać czynniki inicjujące translację oraz rybosomy, wpływając tym samym na szybkość i efektywność, z jaką dane mRNA jest tłumaczone na białko.¹⁹⁸ 3' UTR znajduje się za kodonem stop ORF i jest ważny dla regulacji stabilności mRNA oraz jego degradacji. 3' UTR zawiera miejsca wiązania dla białek oraz mikroRNA, które mogą hamować translację lub promować degradację mRNA.¹⁹⁹ Długość i skład sekwencji 3' UTR mogą znacznie wpływać na czas życia mRNA i efektywność, z jaką białko jest produkowane w komórce. Projektując terapeutyczne mRNA, należy skupić się na sekwencjach UTR, które występują w genach charakteryzujących się naturalnie wysoką ekspresją. Przykładem są dobrze zbadane i wykorzystywane sekwencje UTR pochodzące z ludzkiej β -globiny HBB. (ang. *human β -globin*).²⁰⁰ Niezbędny element stanowi również struktura czapeczki RNA, która zwiększa efektywność syntezy białek. Kap może być dodany do mRNA w trakcie transkrypcji za pomocą syntetycznego analogu lub po transkrypcji przez specjalne enzymy. Nie mniej istotny jest drugi koniec cząsteczki RNA (3') i obecny tam ogon poli(A). Odpowiednia długość łańcucha reszt adeninowych jest kluczowa dla stabilności mRNA oraz sprzyja procesowi translacji. Ogon poli(A) może być dodany zarówno w trakcie transkrypcji *in vitro*, jak i po niej za pomocą enzymu polimerazy poli(A). Należy jednak pamiętać, że każda modyfikacja naturalnej sekwencji niesie ze sobą ryzyko wprowadzenia zmian struktury drugo- i trzeciorzędowej mRNA, a to bezpośrednio może przełożyć się na szybkość oraz wydajność powstawania białka.

5.3.1 Szczepionki mRNA przeciw wirusom

Współczesne epidemie wirusowe często wynikają ze złożonych interakcji między ludźmi a środowiskiem, w tym z intensyfikacji globalnych podróży, urbanizacji, zmian klimatycznych oraz niszczenia naturalnych siedlisk zwierząt. Przejście patogenów ze zwierząt na ludzi (zoonozy) jest kluczowym mechanizmem pojawiania się nowych chorób zakaźnych w populacjach ludzkich, szczególnie gdy ludzie coraz bardziej penetrują i zmieniają naturalne ekosystemy.²⁰¹ Profilaktyczne szczepionki stały się kluczowym narzędziem w walce z epidemiami.²⁰² Szczepionki mRNA mogą być projektowane i produkowane znacznie szybciej niż tradycyjne szczepionki, co jest kluczowe w sytuacji pojawienia się nowego wirusa lub jego wariantu. Ich unikalne właściwości i elastyczność w projektowaniu oferują nowe perspektywy w bezzwłocznym reagowaniu na zagrożenia epidemiczne. Proces ten polega na sekwencjonowaniu genetycznym patogenu i zaprojektowaniu odpowiadającego mu fragmentu mRNA bez potrzeby hodowli wirusów w laboratorium, co znacząco skraca czas potrzebny na rozwój takiego preparatu. Najbardziej znaczącym przykładem wykorzystania szczepionek mRNA jest globalna odpowiedź na pandemię COVID-19 (Rys. 29). Szczepionki takie jak Comirnaty (Pfizer-BioNTech) i Spikevax (Moderna) zostały opracowane, przetestowane i wprowadzone na rynek w rekordowym czasie, oferując skuteczną ochronę przed chorobą i pomagając ograniczyć jej rozprzestrzenianie.²⁰³ Badania nad szczepionkami mRNA obejmują również inne choroby wirusowe, takie jak grypa, HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), choroby wywołane przez wirusy Zika i Ebola oraz wirus RSV, dla którego szczepionka została już zatwierdzona do stosowania u ludzi, o czym pisałem wcześniej.²⁰⁴ Elastyczność tej technologii pozwala na szybkie dostosowanie do różnych patogenów, co jest szczególnie ważne w kontekście mutowania się patogenów, szybkiego przemieszczania się ludności i pojawiania się nowych ognisk chorób.

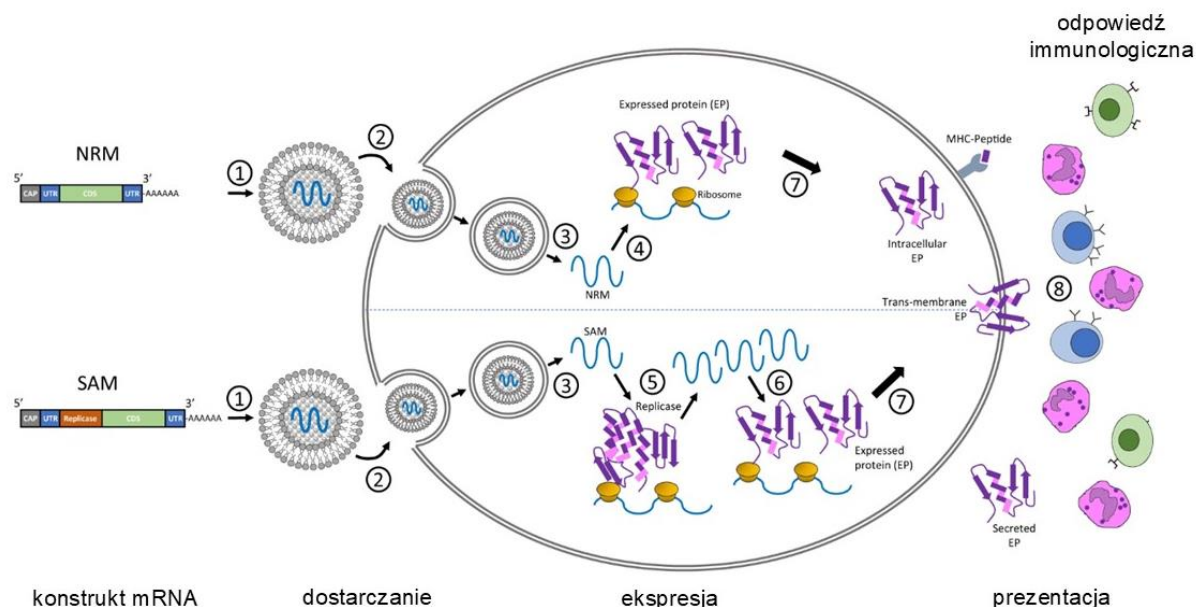


Rysunek 29 Schemat działania szczepionki mRNA przeciw wirusowi SARS-CoV-2. mRNA zamknięte w nanocząstkach lipidowych jest wstrzykiwane do organizmu. mRNA wnika do komórek, gdzie rozpoczyna produkcję białka kolca (Spike) wirusa SARS-CoV-2. Białko to jest rozpoznawane przez układ odpornościowy, co prowadzi do aktywacji limfocytów. W wyniku tego organizm zaczyna produkować przeciwciała, które wywołują odpowiedź immunologiczną, chroniąc przed wirusem.

Szczepionki oparte na mRNA, dzięki swojej innowacyjnej budowie, stanowią znaczący krok naprzód w dziedzinie immunologii. Kluczowym elementem tych szczepionek jest syntetyczny fragment RNA, który pełni funkcję kodowania białek specyficznych dla atakującego wirusa, w przypadku wirusa SARS-CoV-2 jest to białko kolca (S).²⁰⁵ Białko to odgrywa krytyczną rolę, umożliwiając wirusom przyłączenie się do receptorów na powierzchni komórki gospodarza, a następnie wniknięcie do jej wnętrza. Aby zapewnić ochronę i skuteczne dostarczenie mRNA do wnętrza komórek ludzkiego organizmu, szczepionka wykorzystuje nanocząstki lipidowe.²⁰⁶ Jest to szczególnie istotne ze względu na polarność mRNA, która uniemożliwia mu samodzielne przenikanie przez hydrofobowe błony komórkowe. Nanocząstki lipidowe nie tylko chronią mRNA przed degradacją w wymagającym środowisku biologicznym, ale także ułatwiają jego precyzyjny transport do komórek docelowych. Ponadto, szczepionka zawiera składniki stabilizujące, takie jak sole i cukry, które zapewniają jej trwałość i skuteczność zarówno podczas przechowywania, jak i transportu. Głównym celem szczepionek mRNA jest zainicjowanie produkcji specyficznych białek wirusowych w komórkach gospodarza, co nie powoduje choroby, ale prowokuje odpowiedź immunologiczną. Komórki gospodarza używają dostarczonego mRNA do produkcji białek, które następnie są prezentowane na powierzchni komórek przez białka głównego układu zgodności tkankowej klasy I, MHC-I (ang. *major histocompatibility complex class I*).²⁰⁷ Prezentacja białka wirusowego przez komórki prowadzi do aktywacji układu odpornościowego, w tym do produkcji przeciwciał specyficznych dla tego białka. Przeciwciała te wspólnie z komórkami pamięci (limfocytami B oraz T) pozostają w gotowości do szybkiej reakcji na rzeczywiste zakażenie wirusem. Oprócz przeciwciał, szczepionki mRNA aktywują także różne subpopulacje komórek T, w tym komórki T pomocnicze (CD4+) i cytotoksyczne komórki T (CD8+), które są zdolne do niszczenia zainfekowanych komórek. Szczepionki mRNA są wysoce efektywne, indukując mocną odpowiedź immunologiczną przy znacznie mniejszych dawkach w porównaniu do tradycyjnych szczepionek, takich jak te oparte na DNA.

Szczepionki mRNA można podzielić na podstawie mechanizmu działania na dwie główne kategorie: niereplikujące się szczepionki mRNA (NRM, ang. *non-replicating mRNA vaccines*) oraz

szczepionki mRNA ulegające samoreplikacji (SAM, ang. *self-amplifying mRNA vaccines*).²⁰⁸ Oba typy mają swoje unikalne właściwości i potencjalne zastosowania, ale różnią się znacząco sposobem działania i efektywnością (Rys. 30).

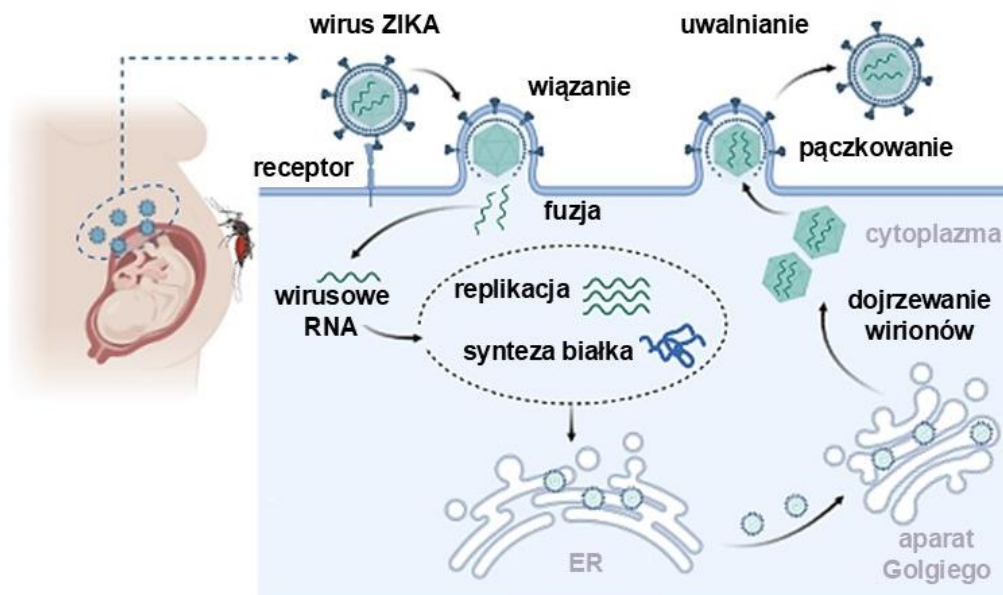


Rysunek 30 Porównanie funkcjonowania szczepionek nie-replikujących NRM i samoreplikujących SAM. NRM zawiera sekwencję kodującą (CDS) z otoczeniem 5' i 3' UTR, natomiast SAM dodatkowo koduje komponenty replikazy. Oba rodzaje mRNA są zamknięte w nanocząstkach lipidowych (LNP), co ułatwia dostarczenie do komórek (1, 2). Po dostaniu się do cytoplazmy (3), NRM bezpośrednio ulega translacji (4), podczas gdy SAM amplifikuje mRNA przed translacją (5, 6). Wyprodukowane białka są rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza (7, 8). Rysunek na podstawie pracy Jackson *et al.*²⁰⁹

Niereplikujące się szczepionki mRNA zawierają syntetyczne cząsteczki mRNA, które kodują białka antygenowe specyficzne dla danego patogenu, na przykład białko kolca SARS-CoV-2 w szczepionce firmy Pfizer-BioNTech (BNT162b2). Niereplikujące się szczepionki mRNA są jednorazowo odczytywane przez komórki gospodarza, a następnie degradowane przez naturalne mechanizmy komórkowe, co oznacza, że każda cząsteczka mRNA może wyprodukować ograniczoną ilość antygenów.²¹⁰ Samoreplikujące się szczepionki mRNA działają na zasadzie wprowadzenia do organizmu mRNA, które nie tylko koduje białko antygenowe, ale również posiada dodatkowe sekwencje umożliwiające jego replikację wewnątrz komórki gospodarza.²¹¹ To pozwala na wielokrotne kopie mRNA bez dodatkowej dawki szczepionki, co skutkuje silniejszą i dłużej trwającą odpowiedzią immunologiczną w porównaniu do niereplikujących się szczepionek mRNA. Mechanizm samoreplikacji pozwala na wydajniejszą produkcję antygenów i wymaga mniejszych dawek początkowych szczepionki do osiągnięcia wysokiego poziomu odporności. Dodatkowo, dłuższa ekspresja antygenów może lepiej naśladować naturalną infekcję, co potencjalnie prowadzi do bardziej kompleksowej odpowiedzi immunologicznej, w tym długotrwałej pamięci immunologicznej. Niższe dawki przy zachowaniu skuteczności mogą przełożyć się na niższe koszty produkcji i dystrybucji. Niemniej jednak, ze względu na ich złożoną strukturę, trudno jest przewidzieć i kontrolować poziom reakcji zapalnej organizmu wywołanej przez samoreplikujące się szczepionki.

Ciekawym przykładem zastosowania samoreplikujących się szczepionek mRNA w walce z chorobami wirusowymi może być szczepionka przeciwko wirusowi Zika.²¹² Zika jest przenoszonym przez komary wirusem należącym do rodziny *Flaviviridae* – tej samej, co żółta febra i wirus gorączki Zachodniego Nilu. Został odkryty w 1947 roku w lesie Zika w Ugandzie u małpy rebus, a później, w 1952 roku, po raz pierwszy zidentyfikowano go u ludzi w Ugandzie i Tanzanii.²¹³ Chociaż infekcja

wirusem Zika często przebiega w sposób łagodny, istnieje ryzyko poważnych komplikacji neurologicznych, szczególnie dla płodów, w tym mikrocefalii (małogłowie) oraz jest powiązana z rzadkim zespołem Guillain-Barré, który może prowadzić do paraliżu. Szczególne obawy budzi zakażenie wśród kobiet ciężarnych, gdyż wirus może przeniknąć przez łożysko i wpłynąć na rozwój płodu (Rys. 31).²¹⁴

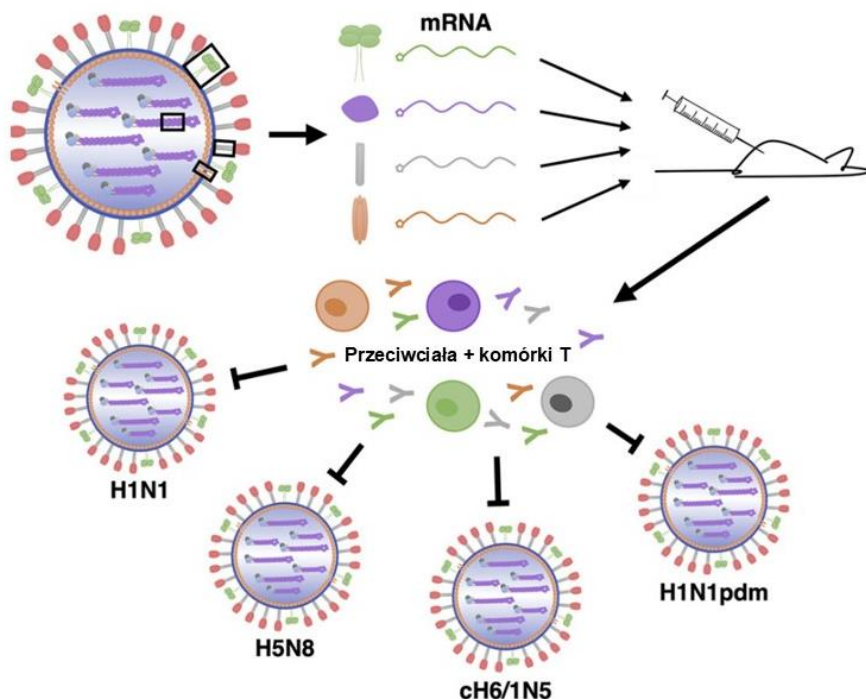


Rysunek 31 Cykl replikacyjny wirusa Zika. Wirus wiąże się z receptorami na powierzchni komórki, wnika do niej przez fuzję błon, a następnie uwalnia swoje RNA do cytoplazmy. RNA wirusa ulega replikacji i translacji, co prowadzi do syntezy białek wirusowych. Nowo zsintetyzowane cząsteczki wirusa dojrzewają w aparacie Golgiego, a następnie są uwalniane z komórki poprzez pączkowanie. Rysunek na podstawie pracy Ding et al.²¹⁵

Ostatnie badania przedkliniczne nad samoreplikującymi się szczepionkami mRNA, korzystające z atenuowanych wersji replikonów wirusa encefalopatii koni wenezuelskich VEE (ang. *Venezuelan equine encephalitis*), wykazały, że są one w stanie uodpornić myszy przeciwko wirusowi Zika.²¹⁶ Ochronna odpowiedź immunologiczna została uzyskana po domięśniowym podaniu myszom immunokompetentnym szczepionki mRNA w formułacji lipidowej. Dodatkowo, zastosowanie zmodyfikowanych nanocząsteczek dendrymerowych, czyli polimerów syntetycznych o złożonej strukturze, spowodowało wywołanie u myszy specyficznej dla antygeny odpowiedzi immunologicznej typu IgG. Wysoki poziom przeciwciał IgG wskazuje na skuteczne przetwarzanie mRNA przez komórki prezentujące antygen (APC) oraz na aktywację odpowiedzi immunologicznej na poziomie zarówno humoralnym, jak i komórkowym. Przykład ten podkreśla znaczenie formuły szczepionki dla osiągnięcia optymalnej skuteczności.

Szczepionki mRNA przeciwko wirusom, aplikowane bezpośrednio do tkanek pacjenta, cieszą się popularnością ze względu na prostotę ich konstrukcji i łatwość podania. Pomimo tego, że badania nad tymi preparatami rozpoczęły się już w latach 80. i 90. XX wieku, to dopiero ostatnie dwie dekady przyniosły przełom w postaci udanych badań klinicznych i warunkowych dopuszczeń tych innowacyjnych farmaceutyków. W czołówce badań nad szczepionkami mRNA znajdują się wiodące koncerny farmaceutyczne, takie jak Moderna, która opracowała szczepionki przeciw grypie, oznaczone jako mRNA-1010, mRNA-1020 i mRNA-1030, zapowiadając nową erę w profilaktyce tej sezonowej choroby.²¹⁷ Działają one poprzez dostarczenie do komórek gospodarza syntetycznego mRNA, które koduje białka antygenowe wirusa grypy. W odpowiedzi organizm produkuje te białka, co wywołuje odpowiedź immunologiczną, w tym produkcję specyficznych przeciwciał oraz aktywację komórek T. Te szczepionki, będące na różnych etapach rozwoju (mRNA-1010 znajduje się w fazie III badań

klinicznych, a mRNA-1020 i mRNA-1030 w fazie I/II badań klinicznych), mają na celu ochronę przed wieloma szczepami wirusa grypy, w tym H1N1, H3N2 oraz wirusami grypy typu B (Rys. 32).



Rysunek 32 Działanie szczepionek mRNA przeciwko różnym szczepom wirusa grypy, takim jak H1N1, H5N8, H1N1pdm i cH6/1N5. mRNA kodujące różne białka wirusowe są wprowadzane do organizmu, gdzie stymulują produkcję przeciwciał i aktywację komórek T, które wspólnie zapewniają ochronę przed infekcją wirusową. Rysunek zapożyczony z Freyn²¹⁸

Podobną technologię wykorzystuje szczepionka mRNA-1647, opracowana przez Modernę w celu zapobiegania infekcji cytomegalowirusem (CMV).²¹⁹ Zakażenie wirusem CMV, należącym do rodziny herpeswirusów, może prowadzić do poważnych komplikacji, zwłaszcza u noworodków oraz osób z osłabionym układem odpornościowym.²²⁰ Szczepionka ta zawiera mRNA kodujący białka antygenowe CMV, takie jak glikoproteina B i kompleks pentameru, co wywołuje produkcję przeciwciał neutralizujących oraz specyficzną odpowiedź komórkową, zapobiegając infekcji.

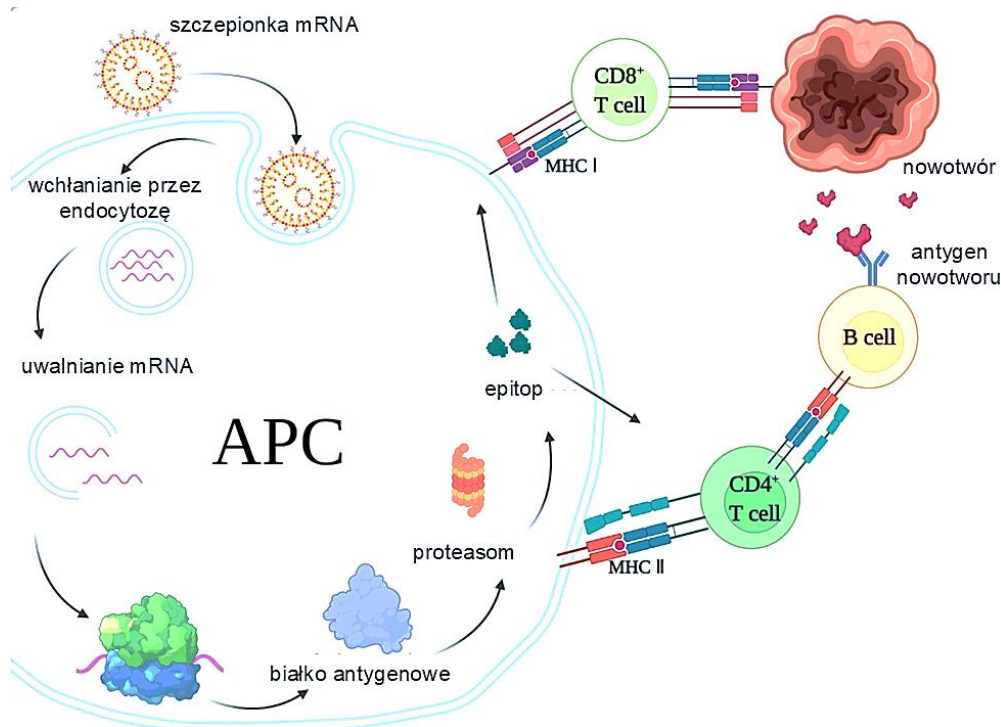
Firma CureVac, opracowując szczepionkę mRNA CV7202 przeciw wściekliznie, podejmuje walkę z jedną z najstarszych i najbardziej śmiertelnych chorób zakaźnych.²²¹ Szczepionka ta dostarcza syntetyczne mRNA kodujące białka antygenowe wirusa wścieklizny, w tym wirusową glikoproteinę, co inicjuje odpowiedź immunologiczną, zdolną do neutralizacji wirusa w przypadku narażenia na infekcję. Wstępne badania kliniczne wykazały, że CV7202 jest dobrze tolerowana i skutecznie indukuje silną odpowiedź immunologiczną, co daje nadzieję na skuteczną ochronę przed tą chorobą w przyszłości.

Szczepionki oparte na mRNA mają zdolność do indukowania zarówno aktywnej odpowiedzi komórkowej w układzie odpornościowym, jak i reakcji humoralnej, która jest kluczowa dla utrzymania długoterminowej pasywnej odporności. Odpowiedź humoralna angażuje przeciwciała produkowane przez limfocyty B. Po wprowadzeniu szczepionki mRNA i syntezie białek patogennych przez komórki gospodarza, układ odpornościowy identyfikuje te białka jako obce. W reakcji na to, limfocyty B produkują przeciwciała, które mogą specyficznie wiązać się z antygenami patogenu, neutralizując go lub oznaczając do zniszczenia przez inne komponenty układu odpornościowego. To prowadzi do wytworzenia pamięci immunologicznej, zapewniając długoterminową ochronę. Przykładem takiej szczepionki jest preparat firmy Moderna oznaczony jako mRNA-1345 przeciwko wirusowi RSV.²²² RSV jest wirusem odpowiedzialnym za infekcje dolnych dróg oddechowych, szczególnie niebezpieczne dla niemowląt, małych dzieci oraz osób starszych i z osłabionym układem odpornościowym. Może powodować ciężkie zapalenie oskrzeli oraz zapalenie płuc.²²³ Szczepionka mRNA-1345 zawiera

syntetyczne mRNA kodujące białko F (ang. *fusion protein*) wirusa RSV. To białko jest kluczowe dla zdolności wirusa do wnikania do komórek ludzkich i ich zakażenia. Po podaniu szczepionki, komórki gospodarza syntetyzują białko F, które następnie jest prezentowane na ich powierzchni. Prezentacja ta indukuje układ odpornościowy do wytworzenia specyficznych przeciwciał przeciwko białku F oraz aktywacji limfocytów T, co prowadzi do wykształcenia odporności na RSV.

5.3.2 Szczepionki mRNA przeciw nowotworom

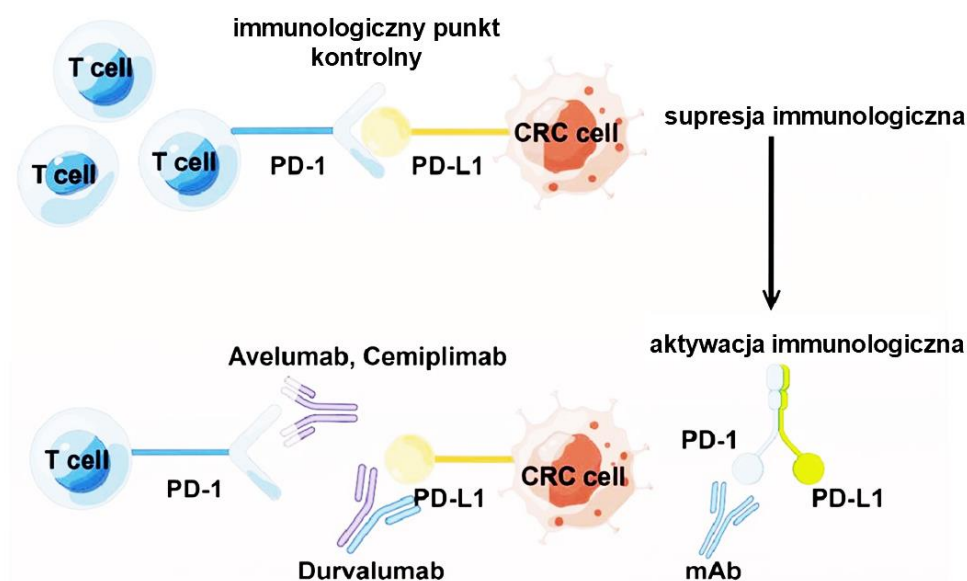
Zastosowanie szczepionek mRNA w kontekście terapii przeciwnowotworowych otwiera nowy rozdział w immunoterapii, stanowiąc obiecującą alternatywę dla tradycyjnych metod leczenia raka. Ich cel to mobilizacja układu odpornościowego pacjenta do rozpoznawania i eliminacji komórek nowotworowych. Wyjątkowość tych szczepionek polega na ich zdolności do precyzyjnego celowania w komórki guza z minimalnym wpływem na zdrowe tkanki. Mechanizm działania bazuje na wprowadzeniu do organizmu pacjenta syntetycznego mRNA, kodującego antygeny nowotworowe – specyficzne białka lub ich fragmenty, charakterystyczne lub nadmiernie wyrażane przez komórki nowotworowe, jak również neo-antygeny, czyli białka o zmienionej strukturze i funkcji.²²⁴ Po podaniu, mRNA dociera do komórek gospodarza, przede wszystkim do komórek prezentujących antygen APC (ang. *antigen-presenting cells*), takich jak komórki dendrytyczne. Komórki te wykorzystują mRNA do produkcji białek antygenowych nowotworu, które są później przetwarzane w cytoplazmie i ulegają ubikwitynoze i degradacji w proteasomie. Część powstałych w ten sposób krótkich peptydów może być następnie prezentowana na ich powierzchni w kompleksie z cząsteczkami MHC klasy I lub II. Ten proces prezentacji jest kluczowy dla aktywacji układu odpornościowego. Antygeny nowotworowe, rozpoznawane przez receptor TCR (ang. *T-cell receptor*) na limfocytach T, przy współdziale dodatkowych sygnałów kostymulacyjnych od komórek prezentujących antygen, aktywują limfocyty T.²²⁵ Aktywacja ta skutkuje ich różnicowaniem na limfocyty T cytotoksyczne - CTL (ang. *cytotoxic T lymphocytes*, *CD8+*), zdolne do bezpośredniego atakowania i niszczenia komórek nowotworowych prezentujących antygeny w kompleksie z MHC I oraz limfocyty T pomocnicze – Th (ang. *helper T lymphocytes*, *CD4+*), wspierające odpowiedź immunologiczną poprzez stymulację innych komórek odpornościowych, w tym CTL i limfocytów B, przez wydzielanie cytokin. Limfocyty T pomocnicze aktywują również limfocyty B do produkcji przeciwciał specyficznych dla antygenów nowotworowych. Te przeciwciała mogą neutralizować antygeny nowotworowe, zapobiegać ich rozprzestrzenianiu lub oznaczać komórki nowotworowe do zniszczenia przez inne elementy układu odpornościowego, jak komórki NK (ang. *natural killer*) i makrofagi (Rys. 33).²²⁶ Aktywacja układu odpornościowego przez szczepionkę mRNA nie ogranicza się do bezpośredniej walki z komórkami nowotworowymi, ale prowadzi także do rozwoju pamięci immunologicznej. Komórki pamięci, zarówno limfocyty T, jak i B, są zdolne do szybkiej reakcji na ponowne spotkanie z antygenami nowotworowymi, co zapewnia długotrwałą ochronę przed powrotem choroby.²²⁷ Jedną z największych zalet szczepionek mRNA jest możliwość personalizacji terapii. Sekwencjonowanie DNA guza pacjenta pozwala na identyfikację unikalnych mutacji i antygenów nowotworowych, które mogą być następnie użyte do stworzenia spersonalizowanej szczepionki mRNA.²²⁸ Takie podejście zapewnia, że terapia jest precyzyjnie ukierunkowana na konkretny nowotwór, zwiększając jej efektywność i zmniejszając ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek.



Rysunek 33 Mechanizm działania szczepionki mRNA w komórkach prezentujących antygen (APC), jako terapii przeciwnowotworowej. Po endocytozie mRNA szczepionki jest uwalniane w komórce APC, gdzie ulega translacji do białka antygenowego. Następnie antygen jest przetwarzany przez proteasom i prezentowany w formie epitopu na powierzchni komórki za pomocą cząsteczek MHC I i MHC II. CD8⁺ limfocyty T rozpoznają antygen przez MHC I, natomiast CD4⁺ limfocyty T przez MHC II. Proces ten aktywuje odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym. Rysunek na podstawie Song²²⁹

Dotychczas opracowano już kilka potencjalnych przeciwnowotworowych szczepionek mRNA, ale osiągnięcie wysokiej efektywności tych preparatów nadal stanowi kluczowe wyzwanie badawcze. Większość z tych preparatów bazuje na antygenach, które są uznawane za specyficzne dla poszczególnych rodzajów nowotworów. Firma BioNTech opracowała kilka kandydatów na szczepionki przeciwnowotworowe, w tym BNT111, które jest w fazie badań klinicznych jako terapia przeciwko zaawansowanemu czerniakowi.²³⁰ Czerniak jest agresywnym typem raka skóry, który powstaje z melanocytów – komórek odpowiedzialnych za produkcję melaniny.²³¹ Charakteryzuje się szybkim wzrostem i dużą tendencją do tworzenia przerzutów, co czyni go jednym z najbardziej niebezpiecznych typów nowotworów skóry. Szczepionka BNT111 działa na zasadzie dostarczenia syntetycznego mRNA kodującego cztery antygeny czerniaka: NY-ESO-1, MAGE-A3, tyrozynazę oraz TPTE. Te antygeny są często prezentowane na komórkach czerniaka i są rozpoznawane przez układ odpornościowy jako obce, co może wywołać silną odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym. Szczepionka BNT111 jest obecnie przedmiotem badań klinicznych zarówno jako monoterapia, jak i w połączeniu z inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem. Wstępne wyniki pokazują, że szczepionka jest dobrze tolerowana przez pacjentów i wykazuje obiecującą aktywność przeciwnowotworową. Kluczową zaletą BNT111, podobnie jak innych szczepionek mRNA, jest jej zdolność do indukowania silnej i celowanej odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi. Dodatkowo, zastosowanie szczepionki w połączeniu z terapiami hamującymi punkty kontrolne może zwiększać skuteczność leczenia, przełamując mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe. BioNTech opracowuje również szczepionki mRNA skierowane przeciwko innym rodzajom nowotworów. Projekt o nazwie BNT122 (obecnie II faza badań klinicznych) jest testowany w połączeniu z tradycyjnymi

metodami leczenia, takimi jak chemioterapia, aby wzmocnić odpowiedź immunologiczną organizmu na raka trzustki.²³² Istotnym aspektem tej szczepionki jest jej zdolność do dostosowania do unikalnego profilu genetycznego guza każdego pacjenta, co pozwala na precyzyjne ukierunkowanie na specyficzne dla nowotworu neoantygeny. Z kolei firma Moderna aktywnie bada potencjał szczepionek mRNA w leczeniu raka piersi, skupiając się szczególnie na nowotworach, które wykazują ekspresję HER2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*), białka często kojarzonego z agresywnymi formami tej choroby.²³³ Wśród tych projektów wyróżnia się szczepionka mRNA-4157, badana zarówno indywidualnie, jak i w kombinacji z inhibitorami punktów kontrolnych immunologicznych, aby zaoferować nowe opcje terapeutyczne pacjentom (Rys. 34).



Rysunek 34 Mechanizm działania punktu kontrolnego układu odpornościowego PD-1/PD-L1, który prowadzi do immunosupresji, gdy komórka nowotworowa (CRC) wiąże się z limfocytami T poprzez PD-L1. Dolna część rysunku pokazuje działanie przeciwciał monoklonalnych (mAb), takich jak pembrolizumab i durvalumab, które blokują interakcję PD-1/PD-L1, przywracając aktywację układu odpornościowego do zwalczania komórek nowotworowych. Rysunek na podstawie pracy Chen et al.²³⁴

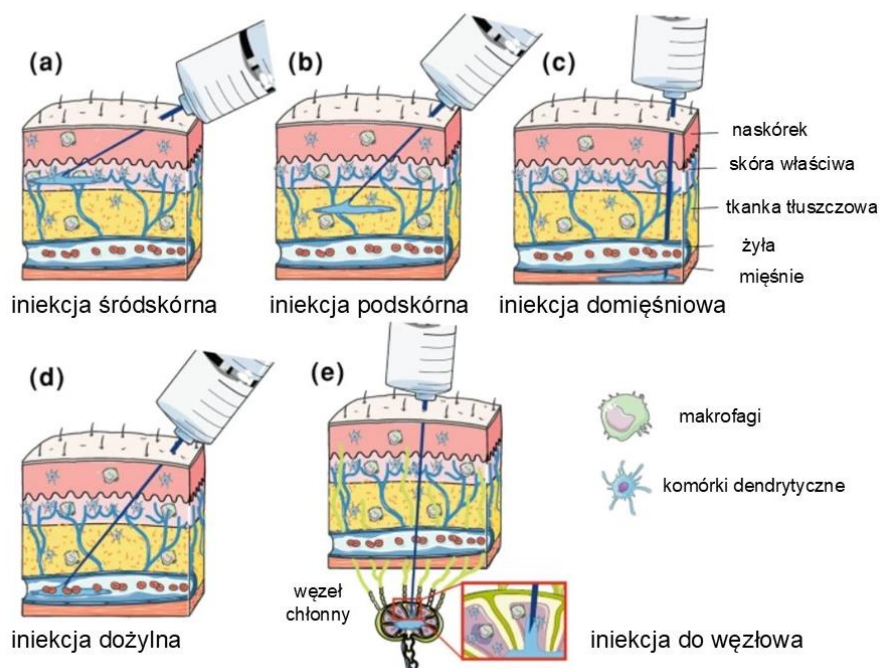
Szczepionka ta dostarcza syntetyczne mRNA kodujące zestaw antygenów nowotworowych, precyzyjnie dopasowanych do indywidualnych cech guza danego pacjenta. Taki mechanizm działania ma na celu aktywowanie układu odpornościowego do rozpoznania i eliminacji komórek nowotworowych, minimalizując jednocześnie ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek. mRNA-4157 jest obecnie testowane w różnych etapach badań klinicznych, zarówno jako samodzielna terapia, jak i w kombinacji z innymi lekami. Wśród nich szczególnie obiecujące wydaje się być połączenie z monoklonalnymi przeciwciałami specyficznymi wiążącymi receptor PD-1 (ang. *programmed death-1*), tj. pembrolizumab, jak również przeciwciałami wiążącymi jego ligand PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*), tj. durvalumab.²³⁵ Stymulują one odpowiedź immunologiczną komórki, zwiększając skuteczności terapii przeciwnowotworowej w przypadku np. raka piersi (Rys. 34).

Efektywność działania przeciwnowotworowych szczepionek mRNA w znaczącym stopniu zależy od metody, za pomocą której terapeutyczne mRNA jest wprowadzane do ciała pacjenta. Najczęściej stosowanym mediatorem są nanocząstki lipidowe (LNP), które mogą bezpiecznie otoczyć i chronić cząsteczki mRNA przed degradacją przez enzymy w organizmie oraz pomóc im w przejściu przez błonę komórkową do cytoplazmy.²³⁶ W niektórych badaniach eksplorowane jest bezpośrednie wstrzyknięcie czystego mRNA do organizmu bez wykorzystania nośników.²³⁷ Ta metoda wymaga ochrony mRNA przed szybką degradacją w organizmie i jest rzadziej stosowana ze względu na niższą

efektywność dostarczania mRNA do komórek docelowych. Inna metoda polega na użyciu zmodyfikowanych wirusów jako wektorów do dostarczania mRNA do komórek.²³⁸ Wirusy są pozbawione zdolności do wywoływania choroby, ale zachowują zdolność do infekowania komórek i dostarczania do nich genetycznego ładunku. Kolejna strategia polega na wykorzystaniu dojrzałych komórek dendrytycznych, które wcześniej zostały naładowane mRNA poza organizmem (metodą elektroporacji), a następnie są reintrodukowane do ciała pacjenta, aby wywołać odpowiedź immunologiczną.²³⁹ Elektroporacja, jako zaawansowana technika dostarczania szczepionek mRNA do wnętrza komórek, znajduje zastosowanie przede wszystkim w terapiach antynowotworowych. Technika ta opiera się na tymczasowym zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej za pomocą kontrolowanych impulsów elektrycznych, co umożliwia bezpośrednie wprowadzenie cząsteczek mRNA do cytoplazmy komórek dendrytycznych.²⁴⁰ Elektroporacja rozpoczyna się od izolacji i przygotowania komórek dendrytycznych z krwi pacjenta, które następnie są hodowane, by zwiększyć ich liczbę i przygotować do procesu. W kolejnym kroku, projektowana i syntetyzowana w laboratorium szczepionka mRNA, kodująca białka antygenowe specyficzne dla nowotworu, jest mieszana z komórkami dendrytycznymi. Podczas elektroporacji, na mieszaninę komórek i mRNA aplikowane są krótkie impulsy elektryczne o wysokim napięciu, tworząc mikropory w błonie komórkowej, przez które mRNA może wnikać do komórek. Następnie, komórki dendrytyczne prezentują antygeny na swojej powierzchni, co inicjuje odpowiedź immunologiczną po ich reinfuzji do organizmu pacjenta.

Głównym celem przy wyborze sposobu aplikacji szczepionki mRNA jest zachowanie jej stabilności i funkcjonalności do momentu przedostania się do wnętrza dojrzałych komórek układu odpornościowego, w których ma nastąpić translacja. Najczęściej preparaty mRNA podawane są naskórną, doskórną, domięśniową, donosową oraz bezpośrednio przez węzły chłonne.²⁴¹ Podanie podskórne polega na iniekcji szczepionki bezpośrednio pod skórę pacjenta. Metoda ta jest stosunkowo łatwa w wykonaniu i mniej bolesna. Szczepionka podana podskórnie może być skutecznie wchłonięta przez komórki prezentujące antygen, które następnie migrują do najbliższych węzłów chłonnych, aktywując odpowiedź immunologiczną.²⁴² Podanie domięśniowe szczepionki polega na iniekcji bezpośrednio do mięśnia. Ta metoda pozwala na szybką absorpcję szczepionki do krwioobiegu i jest często używana dla szczepionek, które wymagają silniejszej odpowiedzi immunologicznej, ponieważ mięśnie posiadają bogatą sieć naczyń krwionośnych i są miejscem obecności różnych komórek układu odpornościowego.²⁴³ Domięśniowe podanie szczepionek może indukować silniejszą odpowiedź immunologiczną. Iniekcja bezpośrednio do węzłów chłonnych jest bardziej zaawansowaną techniką, która wymaga precyzji i znajomości anatomii.²⁴⁴ Metoda ta umożliwia bezpośrednią prezentację antygenów komórkom układu odpornościowego znajdującym się w węzłach chłonnych, co może prowadzić do szybszej i silniejszej odpowiedzi immunologicznej (Rys. 35). Podanie szczepionki mRNA bezpośrednio do guza, znane jako iniekcja intratumoralna, koncentruje terapeutyczne cząsteczki mRNA w miejscu, gdzie są one najbardziej potrzebne, zwiększając skuteczność indukowania odpowiedzi immunologicznej.²⁴⁵ Ta lokalna aplikacja ogranicza ryzyko systemowych skutków ubocznych i efektywnie stymuluje komórki układu odpornościowego, np. komórki dendrytyczne, które są kluczowe dla aktywacji limfocytów T. Możliwość kombinacji tej metody z innymi terapiami, jak chemioterapia czy radioterapia, dodatkowo potęguje jej efektywność. Ponadto, jest to opcja mniej inwazyjna w porównaniu do niektórych tradycyjnych metod leczenia nowotworów, co sprawia, że stanowi mniej obciążające rozwiązanie dla pacjentów. Eksperymentalna szczepionka mRNA-2416, rozwijana przez Moderna, stanowi przykład preparatu mRNA podawanego bezpośrednio do guza.²⁴⁶ Zaprojektowana z myślą o leczeniu różnych typów nowotworów, dostarcza ona syntetyczne mRNA kodujące białko OXA1L (ang. *oxidase assembly 1-like*), które pełni funkcję stymulatora odpowiedzi immunologicznej. Celem aplikacji mRNA-2416 jest indukcja produkcji białka OXA1L w komórkach nowotworowych oraz w komórkach układu odpornościowego znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Produkowane białko ma za zadanie aktywować i przyciągać do guza limfocyty T oraz inne elementy

układu immunologicznego, co wzmacnia zdolność organizmu do rozpoznawania, atakowania i eliminowania komórek nowotworowych.



Rysunek 35 Najczęściej stosowane sposoby podawania szczepionek mRNA. (a) iniekcja śródskórna, (b) iniekcja podskórna, (c) iniekcja domięśniowa, (d) iniekcja dożylna oraz (e) iniekcja do węzła chłonnego. Każda metoda różni się głębokością wprowadzenia igły oraz rodzajem docelowej tkanki, co wpływa na działanie mRNA oraz odpowiedź układu odpornościowego. Rysunek na podstawie pracy Zeng et al.²⁴⁷

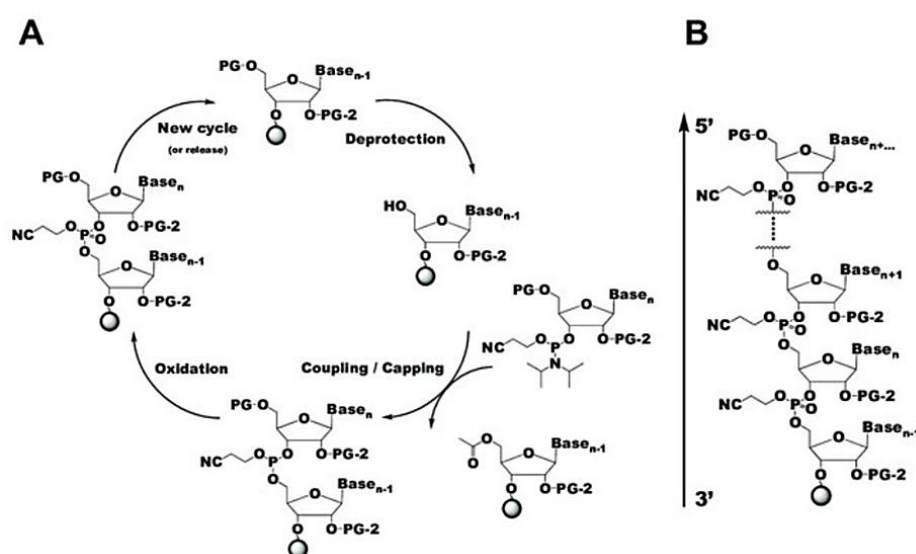
6. Metody otrzymywania syntetycznych cząsteczek mRNA

Opracowanie skutecznych metod syntezy mRNA, zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej, stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej biotechnologii. Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie głównych technik wykorzystywanych do otrzymywania syntetycznych cząsteczek mRNA, z uwzględnieniem ich zalet, ograniczeń oraz zastosowań w kontekście terapii oraz biotechnologii. Skupię się na omówieniu dwóch podstawowych metod otrzymywania syntetycznych cząsteczek RNA, w tym wykorzystywanej do generowania krótkich oligonukleotydów syntezy chemicznej oraz metody transkrypcji *in vitro*, jako uniwersalnego i szeroko wykorzystywanego podejścia do wytwarzania mRNA na większą skalę.

6.1 Syntezy RNA na podłożu stałym

Chemiczna synteza RNA jest metodą pozwalającą na precyzyjne wytwarzanie krótkich fragmentów RNA (oligonukleotydów) o zdefiniowanej sekwencji.²⁴⁸ Syntezę RNA rozpoczyna się od przyłączenia pierwszego nukleotydu do stałego podłoża, którym najczęściej jest szkło o kontrolowanej porowatości (CPG) lub sieciowany polistyren. Nukleotydy są przyłączane do nośnika stałego poprzez swoje grupy 3'-hydroksylowe, a łańcuch wydłużany jest w kierunku 5'. Proces elongacji polega na sekwencyjnym dodawaniu aktywowanych nukleotydów do rosnącego łańcucha RNA. Nukleotydy są wprowadzane w formie chronionych chemicznie monomerów, które są stopniowo odblokowywane w kontrolowanych warunkach. Po każdym cyklu dodawania nukleotydu konieczne jest usunięcie grupy ochronnej z końca 5', co pozwala na przyłączenie kolejnego nukleotydu. Proces ten jest powtarzany, aż do uzyskania pełnej sekwencji RNA (Rys. 36). Po zakończeniu syntezy łańcucha RNA mogą być

wprowadzane dodatkowe modyfikacje końcowe, takie jak dodanie struktury 5' czapeczki czy 3' poliadenylacja. Gotowy produkt jest poddawany procesom oczyszczania, aby usunąć wszelkie niepożądane produkty uboczne i zanieczyszczenia. Najczęściej stosowanymi metodami oczyszczania są chromatografia wysokosprawna (HPLC) oraz elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE). Chemiczna synteza RNA ma kilka istotnych zalet. Przede wszystkim pozwala na precyzyjne kontrolowanie sekwencji nukleotydowej i wprowadzenie modyfikacji chemicznych, które mogą poprawić stabilność RNA, jego odporność na degradację enzymatyczną oraz zmniejszyć immunogenność. Dodatkowo, synteza chemiczna jest skalowalna i może być dostosowana do produkcji na dużą skalę, co jest istotne dla zastosowań komercyjnych i terapeutycznych. Jednocześnie metoda ta posiada swoje wady. Synteza na fazie stałej ogranicza się do produkcji krótszych sekwencji, zazwyczaj poniżej 100 nukleotydów.²⁴⁹ Przy dłuższych cząsteczkach, wzrasta ryzyko błędów i znacznie spada wydajność. Podczas syntezy mogą powstawać produkty uboczne, takie jak niepełne lub nieprawidłowo zszytyzowane cząsteczki RNA, co utrudnia oczyszczanie i zmniejsza jakość produktu końcowego.



Rysunek 36 A) Schemat cyklu syntezy RNA w fazie stałej. B) Wydłużanie polimeru RNA zachodzi w kierunku od 3' do 5' (B). Rysunek zapożyczony z pracy Becette et al.²⁵⁰

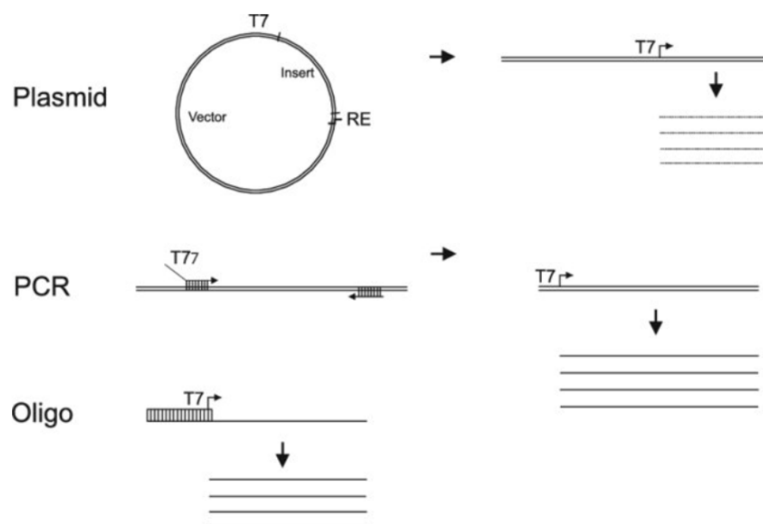
6.2 Otrzymywanie syntetycznych mRNA z wykorzystaniem transkrypcji *in vitro*

Transkrypcja *in vitro* (IVT) została opracowana i wdrożona w latach 70-tych i 80-tych ubiegłego wieku. Kluczowy wkład w jej rozwój miały badania nad polimerazą RNA z bakteriofaga T7, które opublikował David Baltimore i jego współpracownicy w 1969 roku.²⁵¹ Znaczący wkład miał również Walter Fiers i jego zespół, którzy w latach 70-tych szczegółowo zbadali mechanizm działania polimerazy T7 i opracowali pierwsze protokoły *transkrypcji in vitro*.²⁵² Obecnie IVT jest jedną z najczęściej stosowanych technik umożliwiających produkcję syntetycznego mRNA, które znajduje zastosowanie w badaniach naukowych, diagnostyce oraz rozwijających się technologiach terapeutycznych, takich jak szczepionki mRNA. Dzięki wysokiej efektywności, prostocie wykonania oraz możliwości skalowania reakcji do poziomu produkcji przemysłowej, IVT stała się nieodłącznym elementem w badaniach nad terapeutycznym mRNA zarówno w świecie akademickim, jak i w sektorze przemysłowym.

Metoda transkrypcji *in vitro* pozwala na syntezę cząsteczek RNA z wykorzystaniem matrycowego DNA oraz prostych cząsteczek budulcowych, stabilizatorów i enzymu polimerazy RNA przeprowadzaną w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych.²⁵³ Główną rolę w tym procesie

odgrywa polimeraza RNA o masie około 100 kDa, która jest wysoce specyficzna względem promotora o długości 23 nukleotydów. Dzięki tym dwóm składnikom możliwe jest tworzenie transkryptów o rozmiarach od niespełna 30 do ponad 10^4 nukleotydów, w skali produkcji od mikrogramów do setek miligramów. Większość wykorzystywanych systemów IVT bazuje na polimerazach pochodzących z bakteriofagów T3, T7 oraz SP6, z czego najszersze zastosowanie znajduje system T7 pochodzący z bakteriofaga T7 *E. coli*, który był również stosowany w trakcie realizacji opisanych w niniejszej rozprawie badań.²⁵⁴

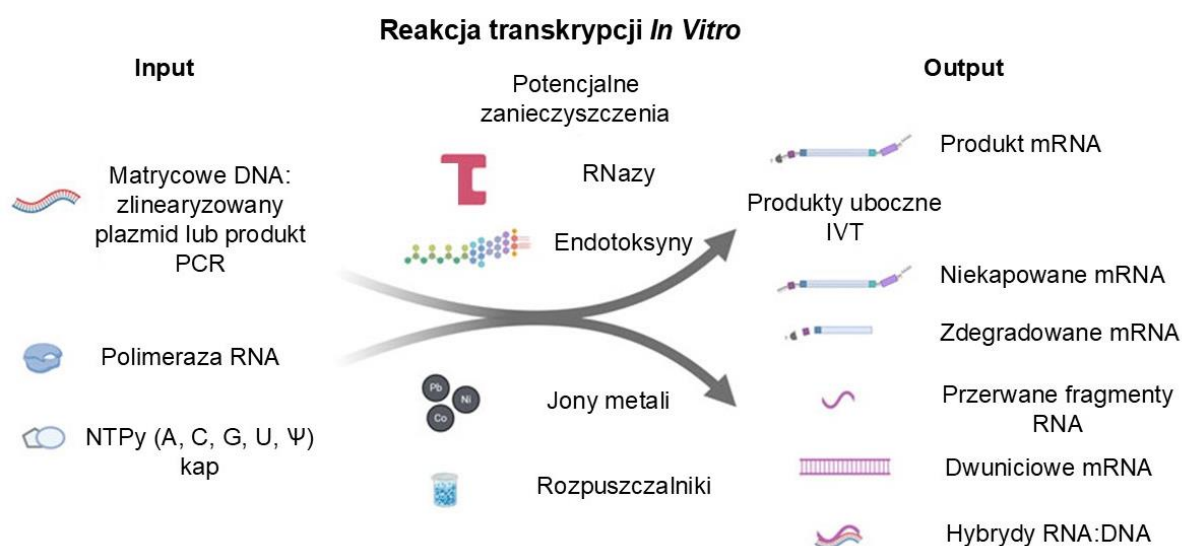
Strategia konstruowania matrycy DNA do IVT polega na umieszczeniu pożądanej sekwencji za promotorem. Promotor obejmuje sekwencję od pozycji -17 do +6, gdzie +1 to pierwszy nukleotyd ulegający transkrypcji.²⁵⁵ W związku z tym wybór sekwencji na samym 5'-końcu transkryptu *in vitro* jest częściowo ograniczony. Większość sekwencji promotorów, w tym promotory klasy III, w pozycjach +1, +2 i +3 posiadają guaninę (G), a pierwsze dwie reszty G są kluczowe dla wysokiej wydajności transkrypcji.²⁵⁶ Alternatywne promotory klasy II rozpoczynają transkrypcję od adeniny (A) i mają podobne preferencje co do G w pozycji +2. Matryce DNA do transkrypcji można podzielić na 3 rodzaje ze względu na ich pochodzenie. Najczęściej wykorzystywaną grupę stanowią plazmidy, które umożliwiają łatwe wklonowanie pożądanej sekwencji genu, zapewniają wysoką powtarzalność oraz nisko-kosztowe namnażanie w komórkach bakteryjnych (najczęściej *Escherichia coli*). Drugą grupę stanowią matryce DNA w postaci produktów reakcji PCR, które powstają przy użyciu odpowiednich starterów zawierających sekwencje promotorowe poprzez amplifikację fragmentów matrycy zawierających sekwencje pożądanego genu. Trzecią grupę stanowią syntetyczne fragmenty komplementarnego DNA, poddane hybrydyzacji oligonukleotydy, które zawierają wyłącznie sekwencję promotora T7 oraz sekwencję ulegającą transkrypcji (Rys. 37). Dobór optymalnego rodzaju matrycy DNA zależy w głównym stopniu od skali produkcji RNA. W przypadku dużej ilości RNA, preferowane jest zastosowanie matrycy opartej o wektory plazmidowe, z racji na prosty i ekonomiczny sposób namnażania takiej matrycy z wykorzystaniem hodowli bakteryjnych i ekstrakcji plazmidów. Z kolei w przypadku małej skali, produkty PCR są prawdopodobnie najwygodniejsze ze względu na elastyczność w projektowaniu, jak i łatwość w produkcji takich matryc.



Rysunek 37 Trzy różne typy matryc DNA do transkrypcji *in vitro*. Rysunek zapożyczony z pracy Beckert et al.²⁵³

Przeprowadzenie reakcji transkrypcji *in vitro* wymaga przygotowania mieszaniny reakcyjnej zawierającej wspomnianą matrycę DNA, odpowiednią polimerazę RNA, trifosforany nukleotydów (ATP, GTP, CTP, UTP/ ψ TP), bufor reakcyjny oraz inne składniki białkowe, takie jak pirofosfataza nieorganiczna, która zapobiega inhibicji reakcji przez gromadzenie się pirofosforanu, czy inhibitorów

RNaz, które mogłyby obniżyć wydajność procesu. Mieszaninę reakcyjną inkubuje się w odpowiedniej temperaturze (zazwyczaj 37°C) przez określony czas (zwykle 1–3 godzin), co pozwala na syntezę mRNA. Terminacja transkrypcji w naturalnych warunkach zachodzi poprzez tworzenie struktury spinki na końcu 3' mRNA o długości około 7–20 par zasad, bezpośrednio po której następuje region bogaty w U.²⁵⁷ Formowanie się spinki prowadzi do zatrzymania polimerazy RNA i rozbitcia kompleksu transkrypcyjnego. Jednakże w przypadku transkryptów *in vitro* terminacja zazwyczaj następuje przez odłączenie się polimerazy na samym końcu matrycy. W przypadku wektorów plazmidowych, osiąga się to poprzez linearyzację plazmidu za pomocą trawienia enzymami restrykcyjnymi poniżej pożądanej sekwencji. Z kolei dla matryc PCR, jak i zhybrydizowanych oligonukleotydów jest to zdefiniowane przez końce 3' zastosowanych fragmentów DNA. Po zakończeniu reakcji transkrypcji, uzyskane mRNA musi zostać oczyszczone z zanieczyszczeń, takich jak resztkowe trifosforany nukleotydów, białka oraz immunogenne dsRNA (Rys. 38). Proces oczyszczania mRNA można przeprowadzić za pomocą kilku metod. Jedną z najczęściej stosowanych jest oczyszczanie na złożu krzemionkowym, które umożliwia szybkie i efektywne usunięcie większości zanieczyszczeń. Kolejną powszechnie stosowaną techniką jest oczyszczanie na złożu oligo(dT)₂₅, które wykorzystuje specyficzne oddziaływanie pomiędzy ogonem poli(A) mRNA a oligonukleotydami dT unieruchomionymi na nośniku. Dzięki temu możliwe jest selektywne wyizolowanie pełnowartościowego mRNA o właściwej strukturze. Dodatkowo, w procesie oczyszczania często stosuje się metodę filtracji tangentowej (TFF, ang. *tangential flow filtration*), która pozwala na skuteczne usunięcie mniejszych cząsteczek zanieczyszczeń oraz zatężenie preparatu mRNA, jednocześnie minimalizując straty. Alternatywnie, mRNA można oczyszczać za pomocą wytrącania izopropanolem i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem dedykowanych kolumn, które umożliwiają separację zanieczyszczeń o bardzo zbliżonej budowie, jak i immunogennych cząsteczek dwuniciowego RNA. Finalnie mRNA poddawane jest kontroli jakości, aby potwierdzić odpowiednią homogenność i czystość. W tym celu wykorzystuje się techniki spektrofotometrii UV, sekwencjonowania RNA, jak również elektroforezy, wizualizując próbki RNA na żelach agarozowych oraz poliakrylamidowych. Kontrola jakości pozwala na wykrycie ewentualnych zanieczyszczeń, degradacji mRNA oraz potwierdzenie poprawności sekwencji nukleotydowej, stanowiąc nieodłączony etap przygotowania produktu mRNA.

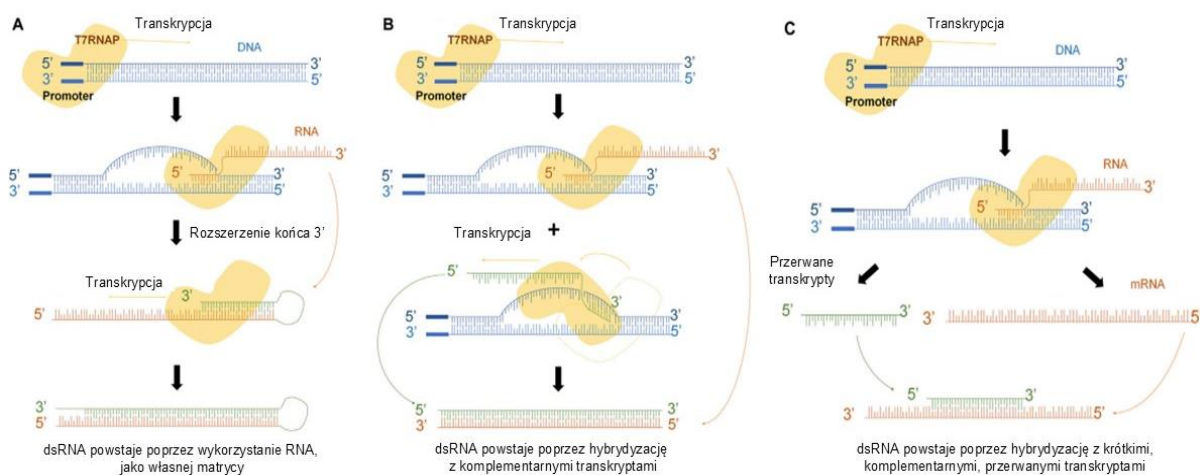


Rysunek 38 Schemat reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT), w której z wielu substratów wejściowych, takich jak liniowa matryca DNA, polimeraza RNA, nukleotydy (NTP) i kap, syntetyzowany jest mRNA. Potencjalne zanieczyszczenia wynikające z przygotowania mieszaniny obejmują RNazy, endotoksyny (LPS), jony metali i rozpuszczalniki, które mogą powodować powstawanie produktów ubocznych, takich jak mRNA bez kapu, zdegradowany RNA, fragmenty niefunkcjonalnego RNA, dsRNA oraz hybrydy RNA:DNA. Rysunek zapożyczony z pracy Lenk et al.²⁵⁸

6.3 Mechanizmy powstawania dsRNA podczas transkrypcji *in vitro*

Jednym z kluczowych problemów związanych z przygotowaniem mRNA jest obecność dwuniciowego RNA (dsRNA) jako produktu ubocznego technologii ich wytwarzania za pomocą IVT. Powstawanie dsRNA w preparatach mRNA jest niepożądane ze względu na jego wysoką immunogenność, która może aktywować procesy odpowiedzi immunologicznej organizmu. Dwuniciowy RNA jest silnym stymulatorem wrodzonego układu odpornościowego, aktywując wcześniej opisane receptory RIG-I i MDA5.²⁵⁹ Receptory te rozpoznają dsRNA jako sygnał alarmowy wskazujący na obecność wirusa, co prowadzi do indukcji szlaku interferonów typu I (IFN), wyzwalając odpowiedź przeciwwirusową. W kontekście zastosowań terapeutycznych, takich jak szczepionki mRNA, niepożądana aktywacja tych receptorów może prowadzić do stanów zapalnych, reakcji autoimmunologicznych oraz zmniejszenia skuteczności transkrybowanego mRNA. Zrozumienie mechanizmów powstawania dsRNA podczas IVT jest kluczowe dla opracowania strategii zmniejszających jego obecność w końcowych produktach. Poniżej przedstawiono główne mechanizmy, które prowadzą do formowania dsRNA podczas tego procesu.

Jednym z najczęstszych mechanizmów prowadzących do powstawania dsRNA jest rozszerzenie końca 3' ssRNA.²⁶⁰ Podczas transkrypcji, polimeraza RNA może kontynuować syntezę RNA, nawet po osiągnięciu końca zamierzonej sekwencji transkryptu. W wyniku tego zjawiska dochodzi do wydłużenia nici ssRNA, która może wiązać się z komplementarnymi sekwencjami obecnymi w innych cząsteczkach ssRNA lub w obrębie tej samej cząsteczki, tworząc struktury dwuniciowe. Mechanizm ten obejmuje zjawisko typu *cis*, występujące gdy koniec 3' ssRNA ulega hybrydyzacji z komplementarną sekwencją wewnątrz tej samej cząsteczki RNA, prowadząc do tworzenia dsRNA. W takim przypadku powstają struktury pętlowe (ang. *hairpin loops*). Z kolei w momencie, gdy dochodzi do hybrydyzacji pomiędzy końcem 3' jednej cząsteczki RNA, a komplementarną sekwencją w innej cząsteczce RNA, powstają struktury dwuniciowe pomiędzy różnymi cząsteczkami ssRNA i mamy do czynienia ze zjawiskiem typu *trans* (Rys. 39).



Rysunek 39 Mechanizmy generowania dsRNA podczas transkrypcji *in vitro*. (A) Nić matrycowa DNA jest transkrybowana na mRNA, tworząc pętle na końcu 3' z powodu komplementarności, a T7RNAP wykorzystuje mRNA jako matrycę do kontynuacji transkrypcji. (B) Polimeraza może przełączyć się na nić nie-matrycową i wytworzyć komplementarną nić do oryginalnego mRNA. (C) Niepełne fragmenty RNA powstałe podczas transkrypcji *in vitro*, które mają sekwencje komplementarne, mogą łączyć się z transkrypcją „run-off”. Rysunek zapożyczony z pracy Martinez et al.²⁶¹

Innym mechanizmem prowadzącym do powstawania dsRNA jest transkrypcja niezależna od promotora z końca 3' matrycy DNA.²⁶² Polimeraza T7 RNA może w wyjątkowych sytuacjach inicjować

syntezę RNA od końca 3' matrycy DNA, niezależnie od klasycznego promotora. W rezultacie, nowo powstałe cząsteczki RNA są transkrybowane w kierunku przeciwnym do głównej transkrypcji, co prowadzi do powstania pełnej długości antysensownego RNA. Taki antysensowny RNA może następnie hybrydyzować z oryginalną, sensowną nicią RNA, tworząc strukturę dsRNA. Mechanizm ten zależy od specyficznej sekwencji w regionie końca 3' matrycy DNA, co oznacza, że nie wszystkie sekwencje DNA są podatne na ten typ nieprawidłowej transkrypcji. Długość i struktura powstającego dsRNA mogą być bardzo zróżnicowane w zależności od warunków reakcji transkrypcji oraz użytej matrycy DNA.

Kolejnym mechanizmem prowadzącym do formowania dsRNA jest hybrydyzacja wewnątrz- i międzycząsteczkowa ssRNA.²⁶³ Powstawanie dsRNA może nastąpić, gdy obecne są sekwencje komplementarne w różnych fragmentach tej samej cząsteczki RNA (hybrydyzacja intramolekularna) lub w różnych cząsteczkach RNA (hybrydyzacja intermolekularna). Hybrydyzacja intramolekularna zachodzi, gdy komplementarne sekwencje w tej samej cząsteczce RNA tworzą dwuniciowe struktury wewnątrz jednej cząsteczki. Mogą to być krótkie odcinki komplementarne lub dłuższe struktury, które w dużym stopniu przypominają dsRNA, aktywując receptory immunologiczne. Hybrydyzacja intermolekularna z kolei występuje w przypadku hybrydyzacji międzycząsteczkowej, gdy dwie różne cząsteczki RNA ulegają połączeniu poprzez swoje komplementarne sekwencje, tworząc stabilne struktury dwuniciowe. Zjawisko to jest bardziej prawdopodobne w wysokich stężeniach RNA, co jest typowe dla warunków reakcji IVT. Ostatecznie, również niedokładna terminacja transkrypcji może prowadzić do powstawania skróconych transkryptów, które są komplementarne do sekwencji ssRNA i mogą tworzyć struktury dwuniciowe. Polimeraza T7 RNA jest szczególnie podatna na tego typu błędy, co prowadzi do produkcji różnych niekompletnych produktów RNA, które mogą hybrydyzować z pełnowymiarowymi cząsteczkami ssRNA, tworząc dsRNA.

Aby zredukować immunogenność dsRNA w szczepionkach mRNA, należy przeprowadzić optymalizację warunków prowadzenia syntezy.²⁶⁴ Zmiana warunków reakcji transkrypcji, takich jak temperatura i skład buforu, może zmniejszyć ilość dsRNA w końcowym produkcie. Zastosowanie wyższej temperatury reakcji (51–55°C) oraz polimeraz RNA z bakteriofagów psychrofilnych (zdolnych do aktywności w niskich temperaturach od -20°C do 10°C) mogą ograniczyć powstawanie dsRNA. Dodatkowo wprowadzenie chemicznych modyfikacji, takich jak pseudourydyna (ψ), 2'-O-metylowane nukleotydy lub 5-metylocytozyna, zmniejsza immunogenność mRNA.²⁶⁵ Modyfikacje te mogą ograniczać interakcję dsRNA z receptorami wrodzonej odporności (takimi jak RIG-I i MDA5) oraz zmniejszać aktywację kinazy PKR. Użycie zaawansowanych metod oczyszczania, takich jak chromatografia jonowymienna i powinowactwa oraz selektywne trawienie z użyciem RNaz specyficznych dla dsRNA, również pozwala na skuteczniejsze usunięcie dsRNA z preparatów mRNA. Wreszcie, stosowanie rekombinowanych polimeraz RNA, które mają zmniejszoną tendencję do produkcji dsRNA (wiele enzymów tego typu jest już handlowo dostępnych), może skutecznie ograniczyć powstawanie niepożądanych struktur dwuniciowego RNA, prowadząc do wytwarzania mRNA o wyższej czystości i niższej immunogenności.²⁶⁶

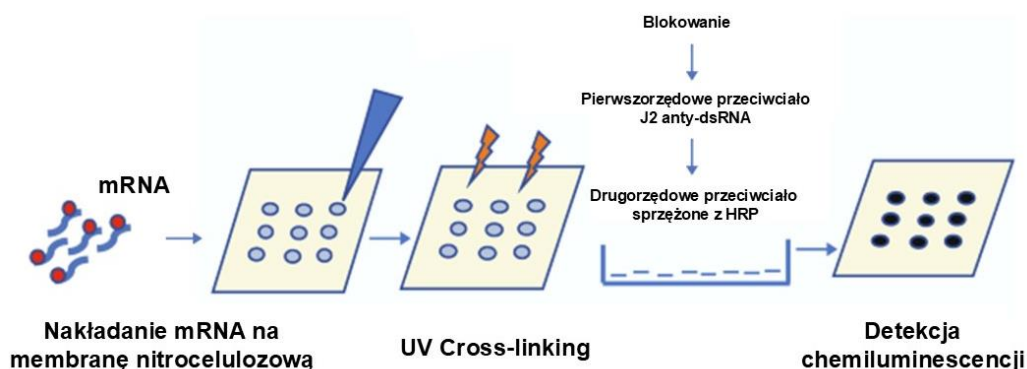
6.4 Metody detekcji dwuniciowych RNA w preparatach mRNA

Zapewnienie bezpieczeństwa i efektywności terapii opartych na mRNA, takich jak szczepionki i terapie genowe wymaga skutecznej detekcji i usuwania dwuniciowego RNA z produktów końcowych. W literaturze opisano wiele metod wykrywania dsRNA, które różnią się specyficznością, czułością i zastosowaniem.

Najszybsze zastosowanie w tym temacie znajdują immunotesty oparte na przeciwciałach. Immunoprecypitacja i Western blot są technikami, które wykorzystują specyficzne przeciwciała, takie jak J2, rozpoznające dsRNA.²⁶⁷ Przeciwciało J2 wiąże się z długimi odcinkami dsRNA (nie krótszymi niż 40 nukleotydów), niezależnie od ich sekwencji, co umożliwia wykrycie dsRNA w różnorodnych

preparatach mRNA. Immunoprecypitacja pozwala na selektywne wyodrębnienie dsRNA z mieszaniny RNA, natomiast Western blot umożliwia wizualizację dsRNA po elektroforetycznym rozdziale próbki RNA i transferze na membranę. Są to metody o wysokiej czułości, jednak wymagają dużych ilości materiału biologicznego i nie pozwalają na w pełni ilościową ocenę zawartości dsRNA w preparacie. Do ilościowej oceny dsRNA służy z kolei test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Używa się w nim dwóch przeciwciał – pierwszorzędowego monoklonalnego do wychwytywania dsRNA (J2) i drugorzędowego poliklonalnego, znakowanego enzymem, do detekcji. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością, a także umożliwia ilościowe określenie stężenia dsRNA w preparacie mRNA dla dużych serii analizowanych próbek.

Techniki hybrydyzacji molekularnej, takie jak dot-blot również doskonale nadają się do detekcji dsRNA w preparatach mRNA. Dot-blot to narzędzie analizy molekularnej stosowane do wykrywania i ilościowego określania obecności specyficznych białek, kwasów nukleinowych lub innych biomolekuł w próbce.²⁶⁸ Jest podobna do techniki Western blot lub Southern blot, ale różni się prostszym przygotowaniem próbki i brakiem etapu rozdziału elektroforetycznego, co umożliwia szybką analizę dużej ilości preparatów. W celu wykonania takiej analizy, należy nanieść preparat RNA prosto na membranę nitrocelulozową lub PVDF, kowalencyjnie przytwierdzić RNA do membrany za pomocą sieciowania UV, zablokować niezwiązane miejsca na membranie i przeprowadzić serię inkubacji i płukań z dwoma przeciwciałami, analogicznie jak w przypadku testu ELISA. Detekcja dsRNA odbywa się przy użyciu odpowiedniego systemu, w przypadku zastosowania przeciwciała J2, wykorzystuje się drugorzędowe przeciwciało sprzężone z enzymem, takim jak peroksydaza chrzanowa (HRP), wraz z odpowiednim substratem chemiluminescencyjnym, który emituje światło w miejscach związania dsRNA (Rys. 40). Sygnał wykryty podczas analizy jest przetwarzany za pomocą analizatora chemiluminescencyjnego lub densytometru. Intensywność sygnału jest proporcjonalna do ilości dwuniciowego RNA (dsRNA) w próbce, co umożliwia ilościową ocenę jego obecności. Metoda ta jest szybka i pozwala na precyzyjne oznaczenie dsRNA, jednak jej czułość może być ograniczona przy niskich stężeniach dsRNA. Dlatego konieczna jest optymalizacja i dostosowanie tej techniki do specyficznych wymagań eksperymentalnych i analitycznych danego preparatu mRNA.



Rysunek 40 Procedura detekcji dwuniciowego RNA (dsRNA) oparta na technice dot-blot. mRNA jest nakładane na membranę nitrocelulozową, a następnie wiązane z membraną za pomocą sieciowania UV. Membrana następnie jest blokowania i opłaszczana przeciwciałami. dsRNA wykrywane są za pomocą sygnału chemiluminescencji pochodzącego od sprzężonego z drugorzędowym przeciwciałem enzymem HRP- peroksydazą chrzanową.

Detekcja dsRNA może być przeprowadzona również za pomocą specyficznych RNaz, takich jak RNaza III, która tnie dwuniciowe RNA, oraz RNazy I, która degradowe jednoniciowe RNA.²⁶⁹ Zastosowanie kombinacji tych enzymów pozwala na określenie ilości i lokalizacji dsRNA w preparatach. Próbkę RNA może być najpierw trawiona RNazą I, aby usunąć ssRNA, a następnie analizowana pod kątem obecności pozostałych fragmentów dsRNA. Jest to metoda dokładna, jednak wymagająca starannego doboru warunków reakcji enzymatycznych.

7. Modyfikacje mRNA wpływające na efekt biologiczny cząsteczki

Chemiczna modyfikacja nukleotydów znacząco wpływa na właściwości fizykochemiczne zawierających je RNA oraz efektywność ich funkcjonowania w organizmie pacjenta. Przedstawione we wcześniejszych podrozdziałach zmiany wprowadzane w obręb naturalnych molekuł mRNA warto rozszerzyć o dodatkowe informacje pogłębiające zrozumienie ich istotności w kontekście zastosowań terapeutycznych. Wykorzystanie niemodyfikowanych cząsteczek mRNA, jako głównego narzędzia w leczeniu chorób jest znacząco utrudnione ze względu na cechy tych biomolekuł, w szczególności niską stabilność oraz wysoką immunogenność egzogennej mRNA. Podanie choremu niemodyfikowanego mRNA mogłoby teoretycznie umożliwić produkcję brakującego białka lub neoantygenów nowotworowych. Jednak kluczowym wyzwaniem pozostaje uzyskanie cząsteczki o odpowiedniej czystości, stabilności i jakości, które są niezbędne do jej skutecznego dostarczenia do komórek i osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego. W poniższych podrozdziałach pragnę skupić się właśnie na sposobach zwiększania stabilności cząsteczek mRNA, ograniczeniu ich immunogenności, ale również naturalnych elementach budowy tych biomolekuł, których optymalizacja strukturalna znacząco wpływa na udoskonalanie metod leczniczych opartych na platformie mRNA. Końcowym efektem zastosowania cząsteczek mRNA w organizmie pacjenta jest produkcja białka, z tego powodu potencjał translacyjny biomolekuł mRNA odgrywa jeden z najistotniejszych aspektów, na którym opiera się skuteczność terapeutyku. Co ważne, na ostateczny efekt biologiczny uzyskany dla danego preparatu mRNA wpływ oprócz bezpośredniej interakcji mRNA z maszyną translacyjną komórki mają również: sposób dostarczania, drogi przetwarzania oraz reakcje obronne organizmu na wprowadzone molekuly.²⁷⁰ Ze względu na tematykę mojej pracy doktorskiej, szczególną uwagę zwrócę na modyfikacje struktur ochronnych obu końców mRNA, czyli 5' kapu oraz 3' ogona poli(A).

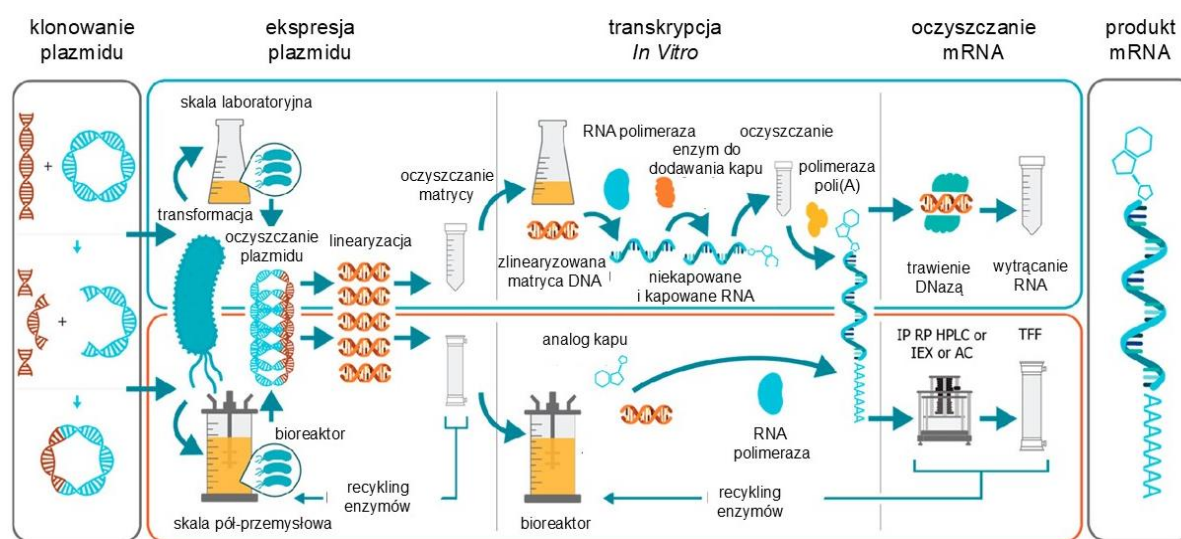
7.1 Regulacja immunogenności mRNA

Wprowadzanie egzogennej cząsteczki mRNA do organizmów żywych wiąże się z ryzykiem potencjalnej odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Reakcje naturalnych systemów obronnych organizmu w kontakcie z syntetycznym mRNA mogą przypominać te charakterystyczne dla wykrycia patogenów, a to skutkować może ostrym stanem zapalnym i pogorszeniem ogólnego stanu zdrowia. Po wykryciu syntetycznego RNA w organizmie, aktywacji ulegają receptory rozpoznające wzorce PRR, które wywołują odpowiedź wrodzonego układu immunologicznego. Zarówno jednociowe mRNA (ssRNA), jak i dwuniciowe cząsteczki mRNA (dsRNA) mogą aktywować mechanizmy nieswoistej odporności.²⁷¹ Dzieje się to poprzez rozpoznanie charakterystycznych struktur mRNA, tj. struktur drugorzędowych typu spinki do włosów (ang. *hairpin*), które lokalnie przypominają dsRNA pochodzenia wirusowego. Zaktywowane białka wchodzące w skład PRR rozpoczynają kaskadę sygnałową, skutkującą wydzielaniem cytokin prozapalnych oraz interferonów, o czym szczegółowo pisałem we wcześniejszych rozdziałach.

Odpowiedź immunologiczna organizmu, wywołana kontaktem mechanizmów obronnych z egzogennym mRNA, niesie zarówno korzyści wynikające z zastosowania technologii mRNA w leczeniu, jak i pewne zagrożenia. Wszystko jest zależne od celu terapeutycznego, jaki chce się osiągnąć. Jedną z głównych zalet naturalnej immunogenności (lub inaczej reaktywności) syntetycznych mRNA jest zdolność do indukowania silnej odpowiedzi odpornościowej, co jest pożądanym efektem w przypadku szczepionek przeciwwirusowych. mRNA mogą kodować białka, które po translacji są prezentowane przez komórki dendrytyczne, stymulując odpowiedź zarówno humoralną, jak i komórkową. Dodatkowo same cząsteczki mRNA mogą stanowić cel dla komórek odpornościowych, stając się własnym adiuwantem, czyli wzmacniaczem odpowiedzi obronnej.²⁷¹ Te właściwości są szczególnie korzystne w przypadku profilaktycznych szczepionek mRNA, gdzie indukcja silnej i trwałej odpowiedzi immunologicznej jest decydująca dla skuteczności szczepionki. Przykład mogą stanowić

szczepionki mRNA przeciwko SARS-CoV-2, które wykazały wysoką skuteczność w zapobieganiu COVID-19. Jednakże, naturalna immunogenność syntetycznych mRNA wiąże się również z pewnymi wyzwaniem. Jednym z głównych problemów jest ryzyko wywołania niepożądanego odpowiedzi immunologicznej, która może prowadzić do powstawania stanów zapalnych i uszkodzenia tkanek.²⁷² Naturalne mechanizmy obronne organizmu mogą rozpoznawać syntetyczne mRNA jako obce, co prowadzi do aktywacji receptorów Toll-podobnych (TLR) i innych ścieżek immunologicznych, powodując potencjalne skutki uboczne, a to mogłoby ograniczyć skuteczność oraz zakres stosowania wybranych terapii opartych na mRNA.

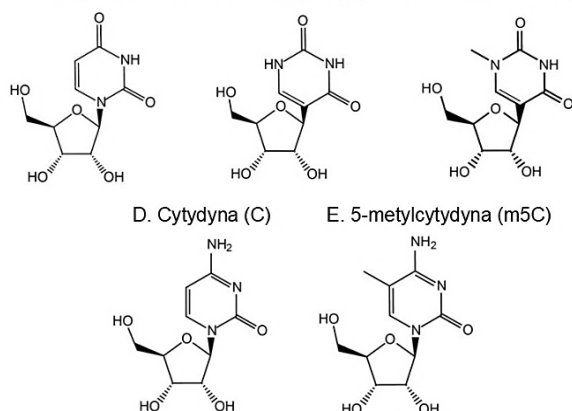
Istnieje wiele dróg umożliwiających regulację immunogenności mRNA, w dużej mierze poprzez optymalizację sekwencji kodowanych genów, regionów nieulegających translacji oraz pozostałych elementów budujących molekularne narzędzia mRNA.²⁷³ Duże znaczenie ma również dopracowywanie metod uzyskiwania finalnych preparatów mRNA poprzez optymalizację ich syntezy i procesu oczyszczania (Rys. 41).



Rysunek 41 Porównanie produkcji mRNA na małą oraz półprzemysłową skalę. Począwszy od klonowania plazmidu, poprzez ekspansję plazmidu, transkrypcję *in vitro*, oczyszczanie, aż po końcowy produkt mRNA. Proces obejmuje transformację bakterii, ekspansję plazmidu w bioreaktorach, linearyzację DNA, transkrypcję RNA, kapowanie oraz poliadenylację mRNA, a następnie oczyszczanie za pomocą różnych technik, takich jak chromatografia. Ostateczny produkt to oczyszczony mRNA gotowy do zastosowania terapeutycznego. Rysunek na podstawie pracy Webb et al.²⁷⁴

Wykorzystanie metody transkrypcji *in vitro* (IVT) umożliwia wydajną i stosunkowo taną produkcję materiału mRNA.²⁷⁵ Dodatkowo zastosowanie IVT umożliwia łatwe skalowanie syntezy, co jest szczególnie istotne w kontekście zwiększania produkcji do skali przemysłowej. Niemniej jednak efektem IVT jest powstanie kilku populacji cząsteczek mRNA. Końcowa mieszanina oprócz docelowych cząsteczek zawiera również cząsteczki o wysokim potencjale immunogennym, takich jak niekapowane mRNA oraz dwuniciowe mRNA (dsRNA). Bardzo dobre rezultaty w usuwaniu dsRNA wykazuje zastosowanie w trakcie oczyszczania technik HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) oraz FPLC (ang. *fast protein liquid chromatography*), które umożliwiają separację immunogennych cząsteczek i uzyskanie wysokiej czystości preparatów mRNA. Inną metodą ograniczania powstawania dsRNA w procesie IVT jest zastosowanie specjalnie zmodyfikowanej polimerazy T7 RNA, która dzięki zmianie kilku aminokwasów w centrum aktywnym znacząco ogranicza powstawanie dsRNA w trakcie transkrypcji mRNA.²⁷⁶ Najpowszechniej wykorzystywaną modyfikacją, która ogranicza immunogenność mRNA jest wprowadzenie do sekwencji cząsteczek mRNA modyfikowanych nukleotydów, takich jak pseudourydyna, 5-metylocytydyna oraz 2-tiourydyna czy N1-metylopseudourydyna (Rys. 42).²⁷⁷

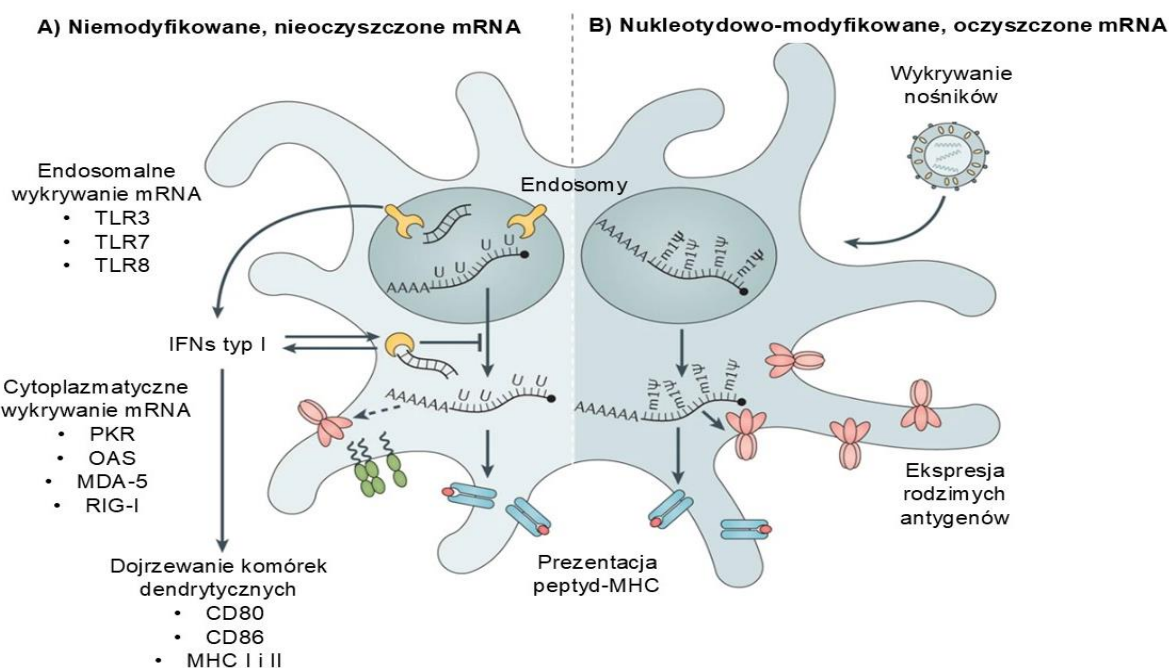
A. Urydyna (U) B. Pseudourydyna (Ψ) C. N¹-metylpseudourydyna (m¹Ψ)



Rysunek 42 Wzory strukturalne nukleozydów modyfikowanych i niemodyfikowanych. A. Urydyna (U), B. Pseudourydyna (Ψ), C. N¹-metylpseudourydyna (m¹Ψ), D. Cytydyna (C), E. 5-metylcytyna (m5C). Rysunek zapożyczony z pracy Andries *et al.*²⁷⁸

Pierwsze zastosowania pseudourydyny udokumentowano już w 2008 roku, kiedy badania pokazały, że włączenie pseudourydyny do sekwencji mRNA znacząco poprawia jego właściwości.²⁷⁹ Pseudourydyna zmniejszała niepożądaną odpowiedź immuno-

logiczną, co minimalizowało ryzyko powstania stanów zapalnych i innych skutków ubocznych, jak również stabilizowała mRNA, chroniąc je przed degradacją przez rybonukleazy. W wyniku mniejszej reaktogenności, mRNA zawierające pseudourydynę ulegało wydajniejszej translacji w komórkach niż mRNA pozbawione tej modyfikacji, co prowadziło do produkcji większej ilości białka terapeutycznego. Rozwojem tego podejścia jest zastosowanie N¹-metylpseudourydyny, która oprócz pełnienia identycznej roli w kontekście minimalizowania odpowiedzi odpornościowej, w niektórych układach eksperymentalnych wykazuje również kilkunastokrotnie wyższy potencjał translacyjny mRNA w porównaniu z transkryptami zawierającymi pseudourydynę (Rys. 43).²⁸⁰

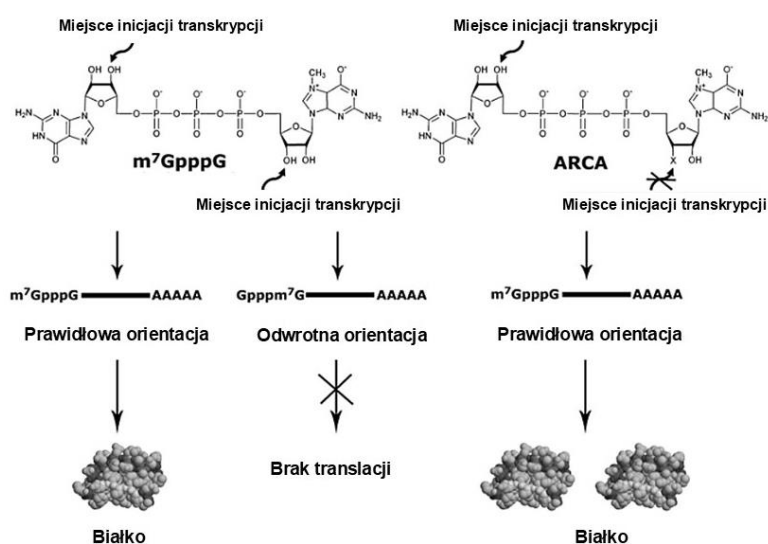


Rysunek 43 Różnice w odpowiedzi immunologicznej na mRNA niemodyfikowane i nieoczyszczone (a) oraz modyfikowane nukleotydowo i oczyszczone (b). W przypadku mRNA niemodyfikowanego aktywowane są receptory RNA w endosomach (TLR3, TLR7, TLR8) oraz w cytoplazmie (PKR, OAS, MDA5, RIG-I), co prowadzi do wydzielania interferonów typu I i dojrzewania komórek dendrytycznych (DC). W przypadku mRNA modyfikowanego nukleotydowo odpowiedź immunologiczna jest bardziej kontrolowana, z ekspresją natywnych antygenów i prezentacją peptydów przez cząsteczki MHC. Rysunek na podstawie pracy Wuebben *et al.*²⁸¹

7.2 Wpływ modyfikacji końca 5' na stabilność i potencjał translacyjny mRNA

Naturalna funkcja cząsteczek mRNA promuje ich niestabilność, dzięki temu w komórce ograniczana jest możliwość nadprogramowego zużycia energii i zasobów do produkcji białek. Jednakże

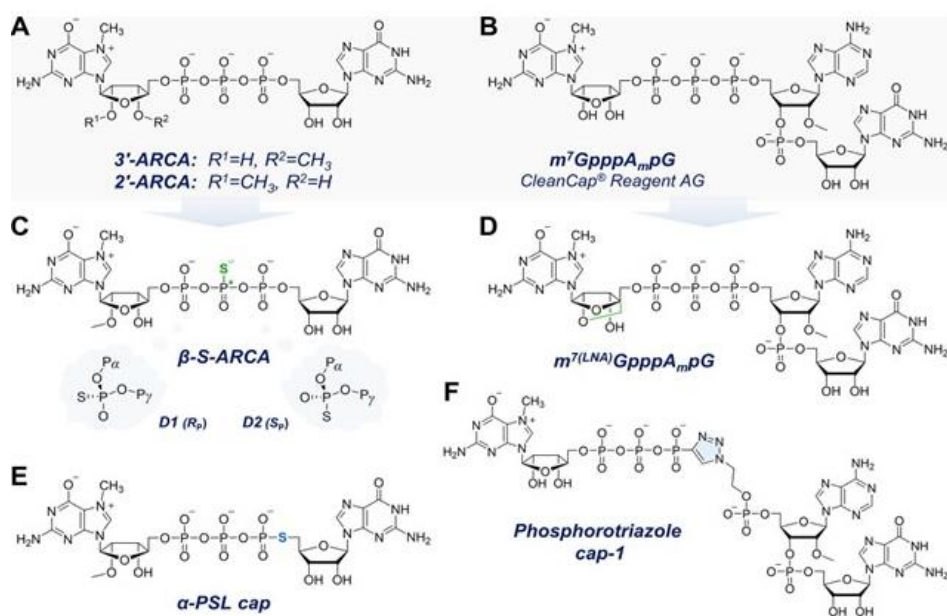
zastosowanie mRNA w terapiach medycznych wymaga zwiększenia ich trwałości. Główne elementy budujące mRNA, które wpływają na jego stabilność znajdują się na obu końcach tych cząsteczek i są to 5'-kap oraz 3'-ogon poli(A). Badania z ostatnich dziesięcioleci skupiające się nad ulepszaniu terapeutycznych mRNA znacząco rozwinęły sposoby stabilizowania obu tych końcowych struktur. W pierwszej kolejności skupie się na końcu 5' mRNA. Istnieją dwa główne sposoby wprowadzenia cząsteczki kapu do syntetycznego mRNA.²⁸² Tradycyjna metoda wykorzystuje rekombinowany kompleks enzymatyczny pochodzący z wirusa krowianki. Coraz powszechniej obecnie stosowaną metodą jest ko-transkrypcyjne kapowanie mRNA w trakcie IVT z wykorzystaniem gotowych analogów kapu.²⁸³ Zastosowanie drugiego rozwiązania dało możliwość wprowadzenia bardzo szerokiej gamy chemicznych modyfikacji końca 5' mRNA, dzięki przygotowaniu odpowiednich analogów czapeczki. Najprostszym rozwiązaniem kapingu ko-transkrypcyjnego mRNA jest zastosowanie dinukleotydowego analogu kapu-0 (m^7GpppN), jednakże poważnym ograniczeniem takiego podejścia jest możliwość odwrotnego wbudowania (inkorporacji) analogu na początku cząsteczki i powstania populacji molekuł mRNA, w których struktura m^7G znajduje się na pozycji pierwszego transkrybowanego nukleotydu (Rys. 44).²⁸⁴ Prowadzić to może do nierozpoznania takiej cząsteczki przez komórkową maszynę translacyjną, w tym białka wiążące kap i uniemożliwienie syntezy białka. Rozwiązaniem tego problemu stała się kolejna modyfikacja kapu, typu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*), która dzięki swojej budowie uniemożliwia odwrotne wbudowanie molekuły mRNA do kapu (Rys. 44).²⁸⁵



Rysunek 44 Schemat przedstawiający różnice między klasycznym kapem mRNA (m^7GpppG), a analogiem kapu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*). Klasyczny kap mRNA może być włączony w odwrotnej orientacji, co uniemożliwia translację. ARCA, dzięki modyfikacji chemicznej, zapobiega włączeniu w odwrotnej orientacji, zapewniając prawidłowy kierunek inicjacji translacji i zwiększając efektywność syntezy białka

Obecność grupy metylowej w pozycji 3'-O rybozy przyłączonej do podjednostki m^7G blokuje jej wykorzystanie, jako pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Zastosowanie kapu ARCA, ogranicza ilość biologicznie nieaktywnego mRNA z odwrotnie przyłączonym kapem, co zwiększa dostępność aktywnych cząsteczek mRNA dla białek wiążących kap (eIF4E) w komórkach eukariotycznych, a to poprawia efektywność inicjacji translacji i prowadzi do wyższej produkcji białek. Preparaty mRNA z kapem ARCA są również mniej podatne na degradację. To pozwala na dłuższe istnienie mRNA w komórkach, co jest kluczowe dla terapeutycznego wykorzystania mRNA. Ta modyfikacja jednak nie rozwiązuje problemu konkurencji analogu kapu z cząsteczką GTP o pierwszą pozycję w łańcuchu RNA podczas inicjacji transkrypcji. Prowadzi to do powstawania w trakcie syntezy mRNA populacji niekapowanych cząsteczek mRNA, które na końcu 5' posiadają wolną grupę

trifosforanową, będącą silnym czynnikiem immunogennym.²⁸⁶ Aby zredukować negatywny wpływ niekapowanego mRNA, stosuje się enzymatyczną ścieżkę usuwania tych molekuł po procesie IVT, jednakże jest to kosztowna metoda, która wpływa negatywnie na ogólną wydajność produkcji mRNA. Aktualnie najszerzej stosowane są trinukleotydowe analogi kapu, które skomercjalizowane zostały przez firmę TriLink, jako cząsteczka $m^7GpppA_{mp}G$ sprzedawana pod nazwą CleanCap.²⁸⁷ Molekuły $m^7GpppA_{mp}G$ zyskały popularność dzięki korzystnemu działaniu w kilku kluczowych aspektach. Ich struktura zapewnia prawidłowe wbudowywanie się na końcu 5' mRNA, a wydajność ko-transkrypcyjnego kapowania z ich udziałem przekracza 90%, co eliminuje problem powstawania niekapowanego mRNA w procesie IVT.²⁷⁵ Dodatkowo, grupa metylowa w pozycji 2'-*O* pierwszego transkrybowanego nukleotydu pozwala uniknąć wywołania odpowiedzi immunologicznej organizmu w kontakcie z tymi cząsteczkami. Warto w tym miejscu przypomnieć, że eukariotyczne mRNA obecne naturalnie w komórkach nigdy nie zawiera na końcu 5' struktury kapu-0 (bez grupy 2'-*O*-metylowej). Wykorzystanie cząsteczek będących analogami kapu-1 zapewnia wydajną translację i ogranicza cytotoksyczność egzogenne mRNA (Rys. 45).

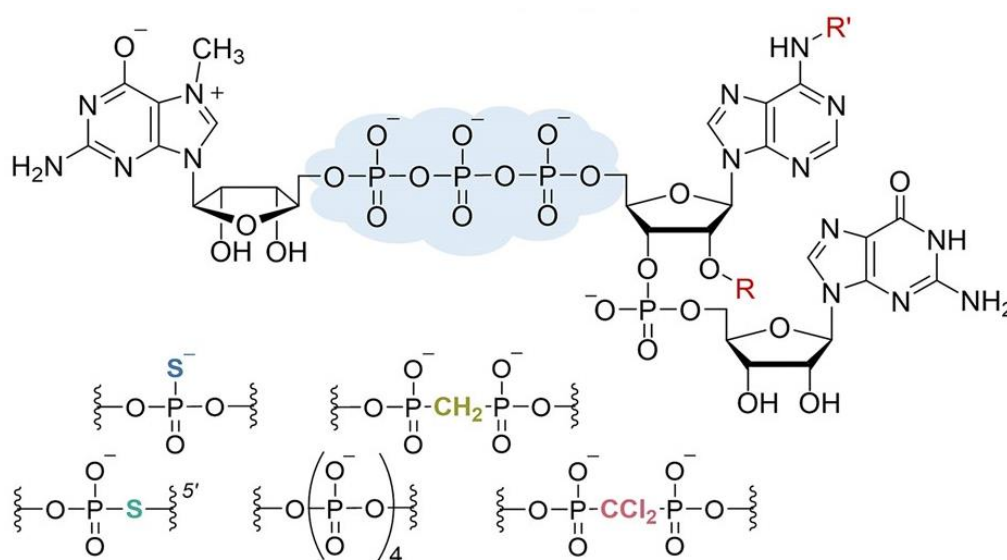


Rysunek 45 Schemat różnorodnych struktur analogów kapu stosowanych w mRNA. (A) 3'-ARCA i 2'-ARCA, (B) CleanCap® $m^7GpppA_{mp}G$ analog, (C) β -S-ARCA z wiązaniem tiofosforanowym, (D) $m^7(LNA)GpppA_{mp}G$ analog, (E) α -PSL kap z modyfikacjami siarkowymi oraz (F) fosfortriazolowy kap-1. Przedstawione modyfikacje kapu są stosowane komercyjnie w celu zwiększenia stabilności mRNA i poprawy efektywności translacji. Rysunek zapożyczony z pracy Warmiński et al.²⁸⁸

Projektując narzędzia oparte na mRNA, szczególną uwagę należy zwrócić na stabilność syntetycznych cząsteczek, ponieważ im dłużej przetrwają one w komórce, tym dłużej będzie trwała aktywna synteza pożądanego białka. Głównym wyzwaniem w zapewnieniu stabilności jest zwiększenie odporności mRNA na degradację przez enzymy. Z tego powodu wiele modyfikacji strukturalnych i chemicznych mRNA koncentruje się na zmniejszeniu podatności transkryptów na enzymatyczną degradację.

W ostatnich dekadach opracowano szereg modyfikacji chemicznych kapu, mających na celu poprawę stabilności transkryptów i zwiększenie wydajności translacji. Pierwszym krokiem na drodze do poprawy funkcjonalności kapu było wprowadzenie wiązania β -tiofosforanowego.²⁸⁹ Analogi te charakteryzują się zwiększonym powinowactwem do czynnika eIF4E, który jest kluczowym elementem kompleksu inicjującego translację. Badania wykazały, że wprowadzenie grupy tiofosforanowej nie tylko zwiększa stabilność kapu wobec enzymów dekapujących, ale również prowadzi do znacznej

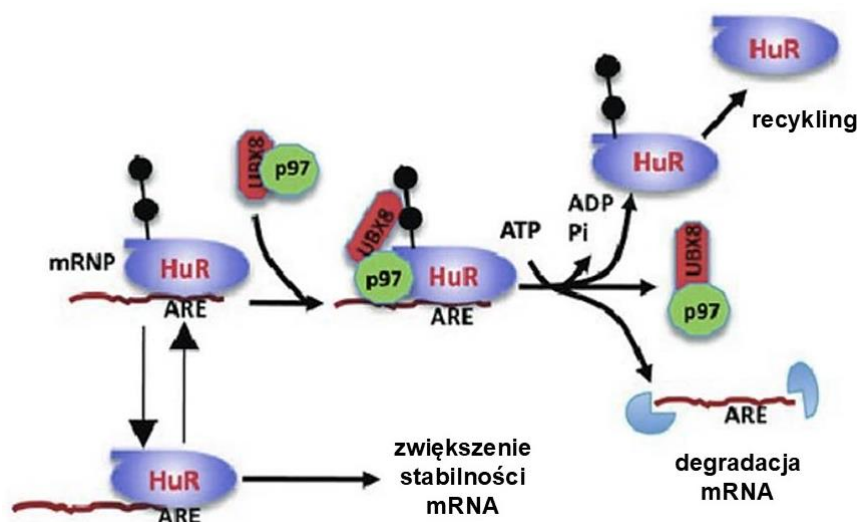
poprawy wydajności translacji. Mechanizm ten wynika z silniejszego wiązania kapu z eIF4E, co skutkuje efektywniejszą rekrutacją rybosomów. Pomimo swojej skuteczności, analogi te posiadają istotne ograniczenie w postaci obecności diastereoizomerów, których rozdział na skalę przemysłową jest trudny i kosztowny. Niemniej jednak, β -tiofosforanowe analogi kapu znalazły zastosowanie w badaniach nad terapeutycznym mRNA i są przedmiotem intensywnych prac rozwojowych. Alternatywą dla analogów β -tiofosforanowych są modyfikacje zawierające wiązania 5'-fosfotioestrowe, ujawnione w pracy Wojtczaka i wsp. (2018).²⁹⁰ Podobnie jak analogi β -tiofosforanowe, wiązania fosfotioestrowe wzmacniają stabilność mRNA wobec enzymatycznego usuwania kapu i zwiększają jego wydajność translacyjną poprzez poprawę powinowactwa do eIF4E. Jednocześnie, brak konieczności rozdzielania diastereoizomerów stanowi znaczącą zaletę w kontekście zastosowań przemysłowych i klinicznych. Analogi te są prostsze w syntezie i bardziej ekonomiczne w produkcji na dużą skalę, co czyni je atrakcyjną alternatywą dla bardziej skomplikowanych modyfikacji. Wykazano, że mRNA zawierające fosfotioestrowe kapy charakteryzuje się nie tylko większą stabilnością w cytoplazmie, ale również wyższym potencjałem terapeutycznym w modelach komórkowych. Jednym z najnowszych osiągnięć w dziedzinie modyfikacji kapu jest wprowadzenie zmodyfikowanych zasad azotowych, takich jak adenina z podstawnikiem benzylovym w pozycji N6 struktury m^6A_m (BnA_m),¹⁶⁶ która została dodatkowo zmodyfikowana w celu poprawy jej właściwości biochemicznych. Badania wykazały, że BnA_m wzmacnia wiązanie kapu z eIF4E i dodatkowo przyczynia się do modulacji stabilności mRNA oraz regulacji jego funkcji w odpowiedzi na sygnały komórkowe. Analogi te są obiecujące z punktu widzenia terapii mRNA, ponieważ oferują wyjątkowe połączenie stabilności, efektywności translacyjnej i potencjalnej zgodności z naturalnymi procesami komórkowymi. Modyfikacje końca 5' RNA stanowią jeden z kluczowych obszarów badań nad poprawą stabilności mRNA i translacji. Analogi β -tiofosforanowe, 5'-fosfotioestrowe oraz zmodyfikowane zasady azotowe, takie jak BnA_m , reprezentują trzy komplementarne podejścia do optymalizacji struktury kapu. Każda z tych klas modyfikacji wykazuje unikalne zalety i potencjał aplikacyjny, od zwiększonej stabilności transkryptów po uproszczenie procesów produkcyjnych (Rys. 46).²⁸⁵



Rysunek 46 Modyfikacje mostków polifosforanowych (w różnych kolorach) oraz naturalne warianty kapu mRNA. Modyfikacje te odgrywają kluczową rolę w optymalizacji stabilności mRNA, efektywności translacji oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej. Szkic ilustruje modyfikacje, takie jak siarka (S), grupa metylenowa (CH_2) oraz dichlorofosforan (CCl_2), a także ich włączenie do struktury mRNA. Rysunek zapożyczony z pracy Warminski et al.²⁹¹

7.3 Modyfikacje sekwencji niekodujących UTR

Sekwencje nieulegające translacji (UTR) odgrywają kluczową rolę w regulacji stabilności mRNA, a także wpływają na poziom ekspresji genów i dynamikę procesów komórkowych. Zarówno 5' UTR, jak i 3' UTR zawierają liczne elementy regulacyjne, które mogą wiązać specyficzne białka oraz miRNA, kontrolując stabilność i efektywność translacji mRNA.²⁹² Sekwencja 5' UTR obejmuje miejsca wiązania białek regulatorowych, które kontrolują proces inicjacji translacji. Złożone struktury drugorzędowe mogą hamować dostęp rybosomów do miejsca startu translacji, obniżając dynamikę syntezy białek. Natomiast region 3' UTR jest bardziej zaangażowany w regulację stabilności mRNA przez interakcje z białkami wiążącymi mRNA oraz z miRNA. Białka te mogą stabilizować mRNA, chroniąc je przed degradacją, lub – przeciwnie – rekrutować kompleksy degradacyjne. Sekwencje bogate w adeninę i uracyl – ARE (ang. *AU-rich elements*) w regionie 3' UTR są szczególnie istotne dla regulacji stabilności mRNA.²⁹³ Są one miejscem wiązania zarówno białek stabilizujących, jak i destabilizujących mRNA. Przykładem białka stabilizującego jest HuR (ang. *human antigen R*), które wiążąc się do ARE, chroni mRNA przed degradacją (Rys. 47).²⁹⁴ Sekwencja 3' UTR pełni również ważną rolę w procesowaniu nici mRNA. Region ten może wpływać na czas życia mRNA w komórce oraz jego efektywność translacyjną. Przykładem tego są sekwencje 3' UTR β -globiny, które zwiększają poziom ekspresji białek w mRNA, które je zawierają.²⁹⁵

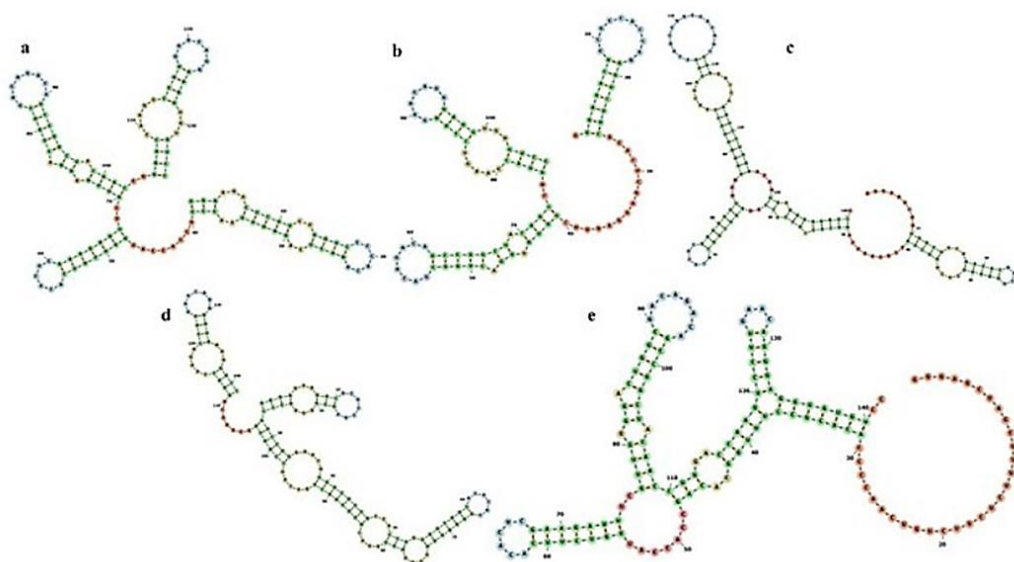


Rysunek 47 Rola białka HuR w regulacji stabilności mRNA. HuR wiąże się z regionami bogatymi w adeninę i uracyl (ARE) w mRNA, co zwiększa stabilność takich cząsteczek. Proces ten może być przerwany przez sygnalizację ubikwitynową, po związaniu białka p97 białko HuR oddysocjowuje, a mRNA trafia na drogę degradacji. Po zakończeniu procesu HuR jest odzyskiwane i może ponownie uczestniczyć w stabilizacji innych cząsteczek mRNA. Rysunek zapożyczony z pracy Zhou et al.²⁹⁶

Białka takie jak TTP (ang. *tristetraprolin*) przyspieszają degradację mRNA poprzez rekrutację kompleksów egzo- i endonukleazowych.²⁹⁷ Interakcje między 3' UTR a miRNA również odgrywają istotną rolę w regulacji stabilności mRNA. miRNA, poprzez komplementarne wiązanie się do sekwencji w 3' UTR, mogą prowadzić do represji translacyjnej lub degradacji mRNA.²⁹⁸ W celu zwiększenia stabilności mRNA oraz poziomu ekspresji białek, regiony UTR projektuje się na podstawie sekwencji pochodzących z genów ulegających wydajnej ekspresji, kodujących białka, które w organizmie stale powstają w dużej ilości. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi regionami 3' UTR są te pochodzące z genu ludzkiej hemoglobiny, zarówno podjednostka α (HBA), jak i podjednostka β (HBB).¹⁹⁹ Wykorzystuje się również sekwencje z genów albuminy (ALB), białka szoku cieplnego 70 (Hsp70), hydrolazy tyrozyny (TH) oraz kolagenu alfa 1 (COL1A1). Natomiast region 5' UTR jest najczęściej

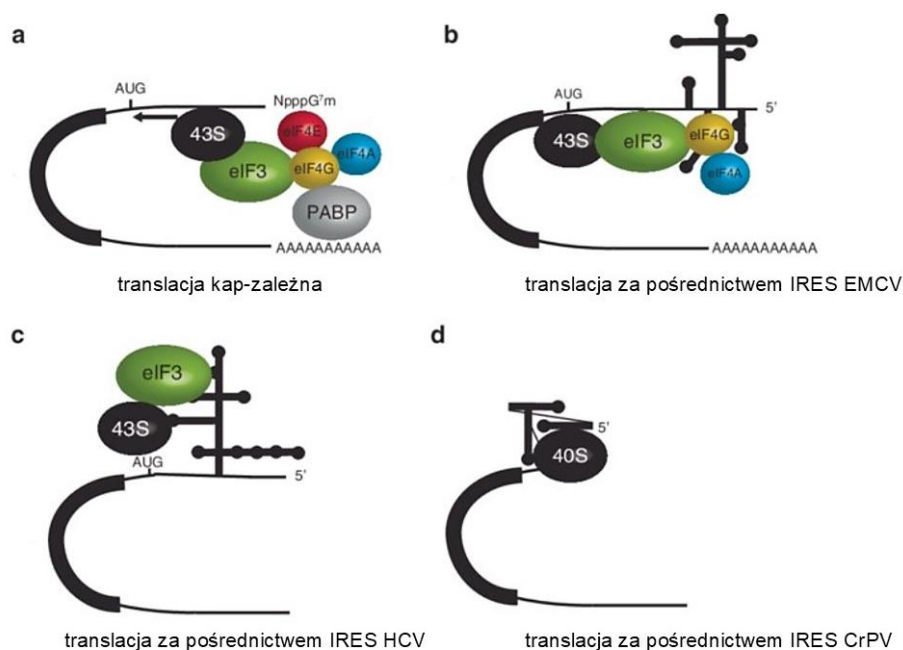
pozyskiwany z genów takich jak globina, Hsp70, ciężki łańcuch dyneiny aksonalnej 2 (DNAH2) oraz dehydrogenazy hydroksysteroidowej (3 β -HSD), ten ostatni znaleźć można w produktach firmy CureVac.^{299,300} Znaczącą zaletą mRNA jest jego dynamiczny charakter – po wprowadzeniu do komórki szybko podlega translacji, a następnie może równie szybko ulec degradacji. W celu uzyskania ograniczonej ekspresji białka można zastosować sekwencje UTR, szczególnie 3' UTR (ARE), które przyspieszą degradację syntetycznych cząsteczek mRNA.³⁰¹

Struktura 5' UTR również odgrywa kluczową rolę w regulacji potencjału translacyjnego mRNA, wpływając na etapie inicjacji translacji zarówno na stabilność mRNA, jak i na efektywność syntezy białek. Różnorodne elementy w obrębie 5' UTR mogą modulować te procesy, przyczyniając się do zwiększenia lub zmniejszenia translacji. Jednym z istotnych czynników jest długość 5' UTR (Rys. 48). Krótsze sekwencje 5' UTR zwykle ułatwiają dostęp rybosomów do miejsca startu translacji (AUG), co sprzyja efektywnej translacji.³⁰² Dłuższe 5' UTR mogą obejmować więcej elementów regulatorowych, które hamują translację poprzez tworzenie złożonych struktur drugorzędowych, takich jak pętle, G-kwadrupleksy czy inne stabilne formy, utrudniające procesowanie mRNA przez rybosomy.³⁰³ Struktury drugorzędowe w 5' UTR, zwłaszcza te o ujemnej entalpii swobodnej, mogą znacząco ograniczać dostęp rybosomów do sekwencji kodujących, co prowadzi do spowolnienia lub zatrzymania translacji. Regiony bogate w pary GC lub obecność struktur spinki do włosów mogą negatywnie wpływać na inicjację translacji.³⁰⁴ Z kolei destabilizacja tych struktur może ułatwić translację (Rys. 48). Dodatkowo, białka wiążące RNA- RBPs mogą stabilizować lub destabilizować struktury drugorzędowe w 5' UTR, modulując dostępność mRNA dla maszyneryi translacyjnej.³⁰⁵ Kluczowym elementem 5' UTR jest sekwencja Kozak, która ułatwia rozpoznanie miejsca startu przez rybosomy. Obecność sekwencji GCC(A/G)CCAUGG w pobliżu kodonu startowego (AUG) jest istotna dla efektywnej inicjacji translacji.³⁰⁶ Dodatkowe elementy w 5' UTR, takie jak sekwencje kodujące znajdujące się przed główną ramką odczytu – uORFs (ang. *upstream open reading frames*), mogą również regulować translację. uORFs są w stanie zatrzymywać procesowanie nici RNA przez rybosomy lub skierować je do ponownej reinicjacji, co zazwyczaj prowadzi do mniej efektywnej translacji głównego ORF.³⁰⁷



Rysunek 48 Struktury drugorzędowe sekwencji 5' UTR mRNA. (a) α -globina 5'UTR mRNA. (b) Minimalny 5'UTR mRNA. (c) β -globina 5'UTR mRNA. (d) CYBA 5'UTR mRNA. (e) albumina 5'UTR mRNA. Rysunek zapożyczono z Ma³⁰⁸

W warunkach stresu komórkowego, kiedy klasyczna ścieżka inicjacji translacji zależna od kapu jest hamowana, wewnętrzne miejsca wejścia rybosomów – IRES (ang. *internal ribosome entry sites*) mają znaczący wpływ na efektywność translacji. IRES to specyficzne sekwencje RNA, które umożliwiają rekrutację rybosomów niezależnie od kapu.³⁰⁹ Mechanizm ten jest szczególnie istotny dla wirusów oraz niektórych eukariotycznych mRNA, które muszą ulegać translacji w niekorzystnych warunkach. Sekwencje IRES są zazwyczaj bogate w struktury drugorzędowe, które mogą bezpośrednio wiązać się z małą podjednostką rybosomu (40S) oraz specyficznymi czynnikami inicjacji translacji, takimi jak eIF4G lub eIF4A, pomijając potrzebę wiązania eIF4E z kapem (Rys. 49).³¹⁰ Badania wykazały, że w warunkach, w których klasyczna ścieżka translacji jest nieaktywna, mRNA zawierające sekwencje IRES mogą nadal być efektywnie wykorzystywane, umożliwiając ciągłą syntezę białek niezbędnych do odpowiedzi komórkowej na stres.³¹¹ Sekwencje IRES mogą pochodzić z różnych źródeł. Wiele wirusów RNA wykorzystuje IRES do przejścia translacyjnej maszyny komórkowej, co pozwala im na efektywną replikację nawet wtedy, gdy translacja zależna od czapeczki jest zahamowana.³¹² Ponadto, niektóre eukariotyczne mRNA, zwłaszcza te kodujące białka zaangażowane w odpowiedź na stres, również zawierają IRES, co umożliwia im adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych.³¹³ Wykorzystanie sekwencji IRES w regionie 5' UTR często wiąże się z zastosowaniem chemicznie modyfikowanego kapu, co znacząco zwiększa translacyjny potencjał danego transkryptu.



Rysunek 49 Porównanie inicjacji translacji zależnej od kapu i od IRES. (a) Translacja zależna od czapeczki. (b) Translacja niezależna od czapeczki, w której pośredniczy EMCV IRES. (c) Translacja niezależna od czapeczki, w której pośredniczy IRES wirusa HCV. (d) Translacja niezależna od czapeczki, w której pośredniczy intergeniczny IRES CrPV. Otwarte ramki odczytu oznaczono jako grube zakrzywione czarne linie. Struktury drugorzędowe IRES są przedstawione jako grube czarne linie związane przez czynniki translacyjne i/lub podjednostki rybosomalne. Rysunek zapożyczono z Beilharz³¹⁴

7.4 Modyfikacje sekwencji kodującej CDS

Sekwencja kodująca CDS (ang. *coding sequence*) odgrywa kluczową rolę w procesie translacji, determinując rodzaj i jakość syntezowanego białka. Jednocześnie, sekwencja ta wpływa na stabilność cząsteczki mRNA oraz jej potencjał translacyjny. Współczesne strategie projektowania mRNA, szczególnie w kontekście terapeutycznym, skupiają się na modyfikacjach CDS, które umożliwiają

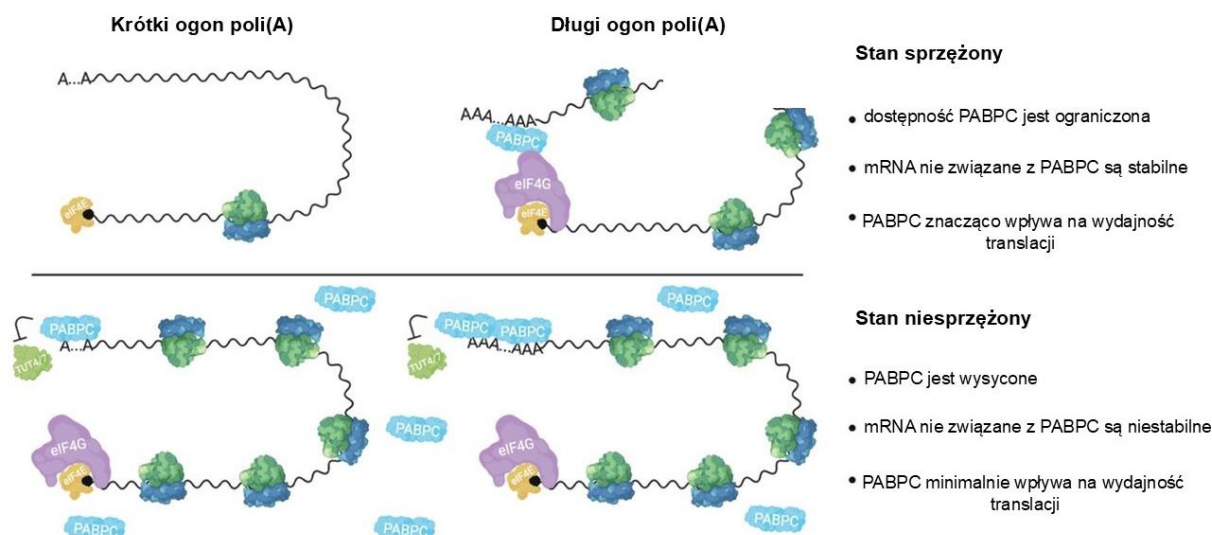
optymalizację translacji przy jednoczesnym zapewnieniu trwałości transkryptu w komórce. Optymalizacja kodonów stanowi jedno z podstawowych narzędzi poprawy wydajności translacji. Kodony są wybierane na podstawie ich częstości użycia w danym organizmie gospodarza, co zapewnia efektywniejsze wykorzystanie dostępnych tRNA. Substytucja rzadziej używanych kodonów na bardziej powszechne może znacznie zwiększyć efektywność translacji. Jednak nadmierna optymalizacja kodonów może prowadzić do utraty naturalnych mechanizmów regulacyjnych, takich jak zwolnienie translacji w regionach krytycznych dla prawidłowego fałdowania białka. Dlatego projektowanie sekwencji CDS powinno uwzględniać nie tylko częstość użycia kodonów, ale także ich rozmieszczenie wzdłuż transkryptu. Drugorzędowa struktura mRNA odgrywa kluczową rolę w procesie translacji. Stabilne struktury, takie jak spinki do włosów lub G-kwadrupleksy, mogą hamować procesowanie rybosomu, utrudniając translację. Projektowanie sekwencji CDS powinno uwzględniać minimalizację takich struktur w obszarach krytycznych, zwłaszcza w regionie początkowym translacji (tzw. Kozak sequence). Strategie projektowania obejmują również zastosowanie algorytmów bioinformatycznych, które przewidują skłonność sekwencji do tworzenia struktur drugorzędowych i umożliwiają ich modyfikację. Redukcja struktur stabilnych w regionach krytycznych może zwiększyć szybkość inicjacji translacji i efektywność syntezy białka. Synonimiczne mutacje, czyli zamiana jednego kodonu na inny kodujący ten sam aminokwas, mogą zmieniać dynamikę translacji bez wpływu na sekwencję aminokwasową białka. Badania wskazują, że wprowadzenie synonimicznych mutacji może wpływać na szybkość elongacji, co w konsekwencji moduluje fałdowanie białka.³¹⁵ Ponadto synonimiczne mutacje mogą wpływać na stabilność mRNA, zmieniając powinowactwo do specyficznych białek wiążących RNA oraz miRNA. Wprowadzenie odpowiednich mutacji synonimicznych może więc przyczynić się do poprawy trwałości mRNA w komórce. Wprowadzenie chemicznych modyfikacji nukleotydów w CDS, takich jak pseudourydyna (ψ) czy metylocytozyna, może wpływać na stabilność mRNA oraz wydajność translacji. Modyfikacje te zmniejszają immunogenność cząsteczki mRNA, co jest szczególnie istotne w zastosowaniach terapeutycznych, takich jak szczepionki mRNA. Chemiczne modyfikacje mogą również wpływać na interakcje mRNA z białkami rybosomalnymi oraz czynnikami inicjującymi translację, co w konsekwencji poprawia efektywność syntezy białka. Takie podejście znajduje szerokie zastosowanie w projektowaniu mRNA do celów terapeutycznych. Sekwencje CDS mogą zawierać motywy destabilizujące, takie jak bogate w AU regiony, które sprzyjają degradacji mRNA. Unikanie takich motywów podczas projektowania sekwencji CDS jest istotnym elementem optymalizacji stabilności transkryptu. W praktyce projektowania mRNA stosuje się narzędzia bioinformatyczne, które identyfikują potencjalne motywy destabilizujące i umożliwiają ich eliminację lub zamianę na bardziej stabilne sekwencje.

7.5 Wpływ modyfikacji ogona poli(A) na stabilność i potencjał translacyjny mRNA

Skuteczność wykorzystania cząsteczek RNA do celów leczniczych zależy od cech strukturalnych samego RNA, które wpływają zarówno na jego stabilność, jak i procesy metaboliczne regulujące przetwarzanie RNA w żywych komórkach. W poprzednich rozdziałach przedstawiłem wpływ modyfikacji chemicznych końca 5' RNA, sekwencji UTR oraz sekwencji kodującej CDS na terapeutyczne właściwości syntetycznych mRNA. W tym podrozdziale skupię się na modyfikacjach strukturalnych końca 3' mRNA, czyli ogona poli(A), którego udoskonalanie zyskało zainteresowanie naukowców dopiero w ostatnich latach.

Znajdujący się na końcu 3' większości eukariotycznych cząsteczek mRNA ogon poli(A), składa się z szeregu nukleotydów adeninowych (A) połączonych wiązaniami 3',5'-fosfodiestrowymi.³¹⁶ Chociaż dokładna długość ogona poli(A) może się różnić, zazwyczaj składa się on z 100 do 250 reszt adeninowych. Ta powtarzająca się sekwencja adeninowa nie zawiera informacji kodującej, ale odgrywa istotną rolę w kilku funkcjach komórkowych. Służy do regulacji stabilności mRNA poprzez ochronę

mRNA przed degradacją enzymatyczną, zachowując w ten sposób przenoszoną przez niego informację genetyczną.³¹⁷ Dodatkowo, ogon poli(A) odgrywa istotną rolę w procesie eksportu mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, bierze udział w inicjacji translacji, jak również ułatwia wiązanie rybosomów, co sprzyja syntezie białek.³¹⁸ Podczas inicjacji translacji mała podjednostka rybosomalna, wraz z innymi czynnikami inicjującymi, wiąże się z mRNA. Obecność ogona poli(A) wzmacnia ten proces wiązania, promując wydajną rekrutację rybosomów, a w konsekwencji zwiększoną produkcję białka (Rys. 50).³¹⁹



Rysunek 50 Schemat przedstawia wpływ długości ogona poli(A) i stanu wiązania z białkiem PABPC na stabilność mRNA i efektywność translacji (TE). Izoformy mRNA o krótszych ogonach poli(A), które słabiej konkurują o wiązanie PABPC, mają mniejsze prawdopodobieństwo przyłączenia PABPC do swoich końców 3', co osłabia ich translację. W warunkach nasycenia białkiem PABPC zarówno krótkie, jak i długie ogony są prawdopodobnie całkowicie pokryte cząsteczkami PABPC. mRNA z długimi ogonami mają więcej związanych cząsteczek PABPC, co wspomaga efektywność translacji względem krótkich form poli(A) posiadających pojedynczą cząsteczkę PABPC. Rysunek zapożyczony z pracy Xiang et al.³²⁰

Długość ogona poli(A) może być dynamicznie regulowana, a regulacja ta znacząco wpływa na stabilność i efektywność wykorzystania mRNA. Badania przeprowadzone przez Chang i wsp. (2014)³²¹ wykazały, że długość ogona poli(A) bezpośrednio koreluje z czasem półtrwania mRNA w komórkach ssaczych, co podkreśla kluczowe znaczenie tego elementu w ochronie transkryptu przed degradacją. W niektórych przypadkach, skrócenie ogona poli(A) może prowadzić do degradacji mRNA, ograniczając jego czas półtrwania i zmniejszając produkcję białka.³⁵ I odwrotnie, wydłużenie ogona poli(A) może stabilizować mRNA, przedłużając jego obecność w cytoplazmie i promując długotrwałą syntezę białek. Ta dynamiczna kontrola ogona poli(A) pozwala komórkom precyzyjnie dopasować poziom ekspresji genów w odpowiedzi na różne sygnały wewnętrzne i zewnętrzne.³²² Praca Eichhorn i wsp. (2016)³²³ wskazuje, że wprowadzenie modyfikacji chemicznych, takich jak 2'-O-metylowane nukleotydy, znacząco wydłuża stabilność transkryptów mRNA stosowanych w celach terapeutycznych, minimalizując ich degradację. Ogon poli(A) ułatwia także specyficzne interakcje między cząsteczkami mRNA a białkami, oddziałując bezpośrednio z PABP, co omówiłem szerzej w poprzednich rozdziałach.³²⁴ Badania Mattijssen i wsp. (2021)³²⁵ wykazały, że zastosowanie zmodyfikowanych ogonów poli(A) wydłuża czas wiązania PABP z transkryptem, co skutkuje zwiększeniem wydajności translacji. Wydłużenie ogona poli(A) lub wprowadzenie nietypowych nukleotydów wzmacnia interakcję z PABP, poprawiając tym samym efektywność translacyjną mRNA. Optymalizacja sekwencji ogona poli(A) powinna jednak uwzględniać eliminację motywów zakłócających, takich jak G-

kwadrupeksy, które mogą negatywnie wpływać na proces translacji poprzez zakłócanie interakcji z czynnikami błonowymi.

W kontekście terapeutycznym, modyfikacje ogona poli(A) mają szczególne znaczenie dla efektywności szczepionek i leków opartych na technologii mRNA. Stabilność transkryptu oraz jego potencjał translacyjny determinują poziom syntezy białka terapeutycznego w komórkach docelowych. Modyfikacje chemiczne ogona poli(A) mogą również minimalizować reakcje immunologiczne, co jest istotne dla ograniczenia efektów ubocznych terapii. Projektowanie ogona poli(A) powinno uwzględniać specyfikę komórek docelowych i warunki fizjologiczne, w jakich mRNA będzie działać. Jak podkreślają wyniki badań Zhang i wsp. (2023)²⁷³, wprowadzenie stabilniejszych wersji ogona poli(A) może być korzystne w terapii nowotworów, gdzie transkrypty są szczególnie narażone na degradację w agresywnym środowisku komórkowym.

Ze względu na istotną rolę w regulacji zarówno translacji jak i stabilności mRNA, modyfikacje ogona poli(A) wydają się mieć ogromny potencjał do modulowania aktywności terapeutycznych mRNA. Potencjał ten przez wiele lat pozostał jednak niewykorzystany. W momencie gdy rozpoczynałem badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej (2020 r), w literaturze niemal nieopisane były badania nad modyfikacjami tej części mRNA. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że precyzyjne badanie zarówno chemicznych jak i genetycznych modyfikacji tej struktury jest skomplikowane i wymaga dużych nakładów pracy. W ostatnich latach rozwój biologii molekularnej i chemii biologicznej oraz duże zainteresowanie tematyką terapeutycznych mRNA doprowadziły jednak do pojawienia się kilku prac opisujących wpływ różnorodnych modyfikacji ogona poli(A) na właściwości mRNA, co omawiam w rozdziałach poniżej.

8. Metody wprowadzania ogona poli(A) do mRNA powstałego na drodze IVT

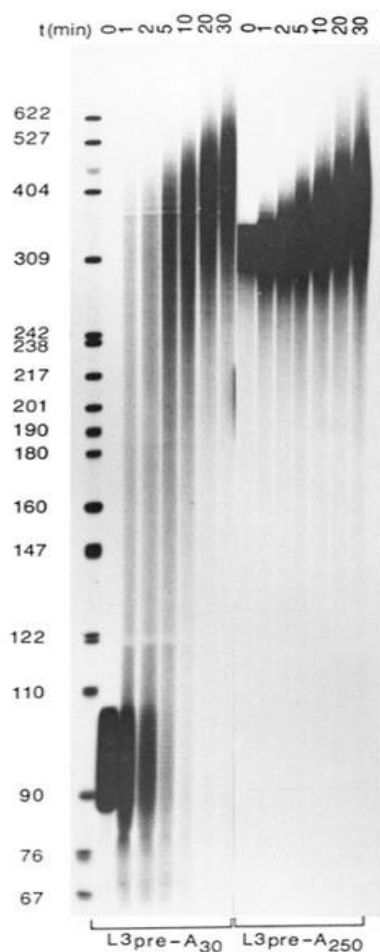
Ogon poli(A) jest kluczowym elementem strukturalnym mRNA, pełniącym istotną rolę w stabilizacji transkryptu, jego eksporcie z jądra komórkowego oraz efektywnej translacji w rybosomach. Wprowadzenie ogona poli(A) do mRNA może odbywać się na dwa główne sposoby: ko-transkrypcyjnie, czyli już podczas syntezy mRNA, oraz post-transkrypcyjnie, w osobnym etapie, przy użyciu enzymu polimerazy poli(A) PAP (ang. *poly(A) polymerase*). Oba podejścia mają swoje zalety i ograniczenia, które decydują o ich wyborze w kontekście konkretnych zastosowań badawczych lub terapeutycznych.

Poliadenylacja ko-transkrypcyjna polega na wprowadzeniu ogona poli(A) do cząsteczki mRNA już w trakcie procesu IVT. W metodzie tej ogon poli(A) jest bezpośrednio zakodowany w matrycy DNA, która służy jako szablon dla polimerazy RNA. Sekwencja poli(A) jest projektowana jako ciąg nukleotydów adeninowych, zazwyczaj o długości od 50 do 150 nukleotydów i umieszczana na końcu regionu kodującego białko, tuż przed sygnałem terminacji transkrypcji. W trakcie transkrypcji RNA polimeraza przepisuje całą sekwencję, łącznie z regionem poli(A), tworząc kompletny transkrypt zakończony ogonem poli(A). Kluczowym etapem jest staranne zaprojektowanie matrycy DNA, zawierającej odpowiednio zaprogramowany fragment poli(A), aby zapewnić jednorodność i stabilność końcowego produktu. Jedną z głównych zalet tego podejścia jest prostota oraz integracja procesu poliadenylacji z etapem transkrypcji, co eliminuje potrzebę dodatkowej enzymatycznej obróbki mRNA i zmniejsza ryzyko kontaminacji preparatu. Metoda ta jest mniej czasochłonna i tańsza niż podejście post-transkrypcyjne, głównie dlatego, że eliminuje potrzebę dodatkowych reakcji enzymatycznych i etapów oczyszczania po zakończeniu transkrypcji. Jednakże, pomimo tych zalet, podejście ko-transkrypcyjne nie jest pozbawione istotnych ograniczeń, które wynikają przede wszystkim z właściwości polimerazy RNA i specyfiki procesu transkrypcji. Jednym z kluczowych problemów jest trudność w uzyskaniu bardzo długich i jednorodnych ogonów poli(A) (powyżej 150 nukleotydów). Wynika to z faktu, że polimeraza RNA wykazuje tendencję do przedwczesnej terminacji transkrypcji

w rejonie sekwencji poli(A). Mechanizm ten jest związany z powtarzalnym charakterem sekwencji adeninowych, które tworzą niestabilny kompleks hybrydowy RNA-DNA podczas transkrypcji. Adenina słabiej wiąże się z tyminą (w przypadku hybryd RNA-DNA) niż guanina z cytozyną, co prowadzi do zwiększonego ryzyka dysocjacji polimerazy od matrycy w tym regionie. W rezultacie synteza RNA może zostać przerwana, zanim pełna sekwencja poli(A) zostanie przepisana, co skutkuje cząsteczkami mRNA o zróżnicowanej długości ogona poli(A). Dodatkowym problemem jest heterogenność długości ogona poli(A), która może wynikać nie tylko z przedwczesnego zakończenia transkrypcji, ale także z trudności w precyzyjnym kontrolowaniu liczby powtarzanych nukleotydów A w matrycy DNA. W praktyce polimeraza RNA może w różnym stopniu przechodzić przez region poli(A), w zależności od warunków reakcji transkrypcji oraz struktury samej matrycy. W efekcie uzyskane transkrypty mogą różnić się długością ogona poli(A), co prowadzi do heterogenności całej populacji mRNA. Konsekwencje tych zjawisk są istotne z perspektywy funkcjonalności i stabilności mRNA. Długość i jednorodność ogona poli(A) mają bezpośredni wpływ na efektywność translacji oraz czas życia cząsteczki mRNA w komórce. Krótsze ogony poli(A) są bardziej podatne na działanie rybonukleaz, co skutkuje szybszą degradacją mRNA i zmniejszoną wydajnością translacji. Z kolei dłuższe i bardziej jednorodne ogony poli(A) sprzyjają efektywnemu wiązaniu białek wiążących poli(A) (PABP) oraz inicjacji translacji, co przekłada się na większą stabilność i dłuższy okres aktywności biologicznej mRNA. Heterogenność ogonów poli(A) może również wpływać na powtarzalność wyników w eksperymentach oraz na skuteczność terapeutyczną mRNA w zastosowaniach klinicznych. Produkcja terapeutycznych cząsteczek mRNA wymaga niezwykle ścisłej kontroli nad jakością i jednorodnością końcowego produktu. Nawet niewielkie różnice w długości ogona poli(A) mogą prowadzić do zmienności w wydajności translacji oraz w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Ponadto, heterogeniczne ogony poli(A) mogą zakłócać interakcje z białkami regulatorowymi i wpływać na transport oraz lokalizację mRNA w komórkach. Pomimo tych ograniczeń poliadenylacja ko-transkrypcyjna znajduje szerokie zastosowanie w produkcji mRNA przeznaczonego do badań nad ekspresją białek, w szczepionkach opartych na mRNA oraz w badaniach nad strukturą i funkcją kwasów nukleinowych. Metoda ta jest szczególnie użyteczna w przypadkach, gdy wymagana jest szybka i zautomatyzowana produkcja dużych ilości mRNA o przewidywalnej strukturze i stabilności.

Poliadenylacja post-transkrypcyjna to metoda, w której ogon poli(A) jest dodawany do cząsteczki mRNA po zakończeniu procesu IVT. W tym podejściu, enzym polimeraza poli(A) PAP katalizuje przyłączanie nukleotydów adenozytowych do końca 3' mRNA, niezależnie od matrycy DNA. Jest to proces enzymatyczny, który naśladuje naturalną poliadenylację zachodzącą w komórkach eukariotycznych, jednak odbywa się w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Proces poliadenylacji post-transkrypcyjnej rozpoczyna się od syntezy mRNA metodą IVT, zazwyczaj bez ogona poli(A) lub z krótką, wstępną sekwencją adeninową. Następnie przeprowadza się reakcję enzymatyczną, w której polimeraza poli(A), w obecności ATP jako substratu, katalizuje przyłączanie nukleotydów adenozytowych do końca 3' cząsteczki mRNA. Reakcja ta może być kontrolowana przez stężenie ATP, ilość użytego enzymu, czas reakcji oraz warunki środowiskowe, takie jak temperatura i pH. W efekcie uzyskuje się mRNA z ogonem poli(A) o określonej długości i stosunkowo wysokiej jednorodności, co znacząco wpływa na stabilność i wydajność translacji mRNA w komórkach docelowych. Jednym z kluczowych atutów post-transkrypcyjnej poliadenylacji jest jej elastyczność. Możliwość dostosowania długości ogona poli(A) pozwala na optymalizację funkcji mRNA w zależności od konkretnego zastosowania terapeutycznego lub badawczego. Krótsze ogony poli(A) mogą być preferowane w aplikacjach wymagających szybszej degradacji transkryptu, natomiast dłuższe ogony poli(A) zapewniają większą stabilność mRNA oraz bardziej efektywną translację. Dodatkowo, reakcja poliadenylacji enzymatycznej umożliwia również wprowadzanie modyfikacji chemicznych do ogona poli(A), takich jak analogi nukleozydów (np. 2'-O-metyloadenozyna), co dodatkowo zwiększa odporność mRNA na enzymy degradacyjne oraz poprawia jego wydajność translacyjną.

Naturalny ogon poli(A) mRNA składa się z łańcucha nukleotydów adeninowych (A), który nie wykazuje charakterystycznych struktur wyższego rzędu, co wynika bezpośrednio z występowania sekwencji homoadeninowej. Brak różnorodności w sekwencji końca 3' mRNA uniemożliwia tworzenie skomplikowanych struktur przestrzennych, takich jak pętle czy spinki do włosów, które są często obecne w innych regionach mRNA. Z tego względu wprowadzanie ukierunkowanych modyfikacji w tym regionie jest trudne. Istnieje jednak kilka metod modyfikacji ogona poli(A), które pozwalają na manipulację jego długością, budową oraz funkcją. Najprostszym rozwiązaniem jest wykorzystanie zmodyfikowanych 5'-trifosforanów adenozyiny na etapie syntezy mRNA w reakcji IVT. Polimeraza RNA w trakcie transkrypcji dobudowuje zmodyfikowane nukleotydy na podstawie matrycy DNA, która zawiera sekwencję ogona poli(A). W efekcie uzyskiwane są cząsteczki mRNA ze zmodyfikowanymi nukleotydami w ogonie poli(A), jednak modyfikacje wprowadzane są również w sekwencji kodującej (ORF) w całym przebiegu tworzonej cząsteczki. Dodatkowo zastosowanie zmodyfikowanych 5'-



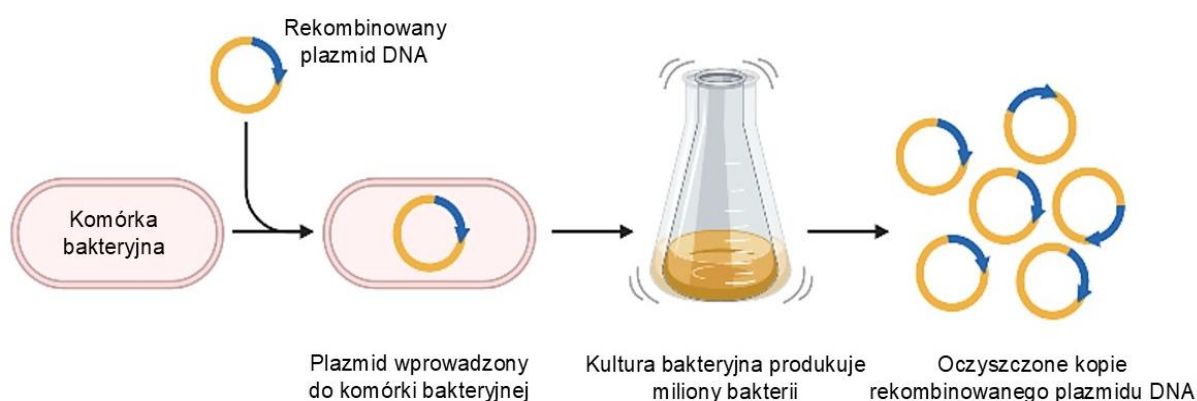
trifosforanów adenozyiny wpływa negatywnie na wydajność procesu IVT, a to jest związane ze zmniejszoną specyficznością substratową polimerazy RNA względem odmiennych konformacyjnie nukleotydów. Powyższe ograniczenia eliminują możliwość powszechnego wykorzystywania takiego rozwiązania w celu produkcji syntetycznych mRNA o potencjale terapeutycznym. Kolejny sposób wprowadzania modyfikacji w obrębie ogona poli(A) zakłada wykorzystanie zmodyfikowanych nukleotydów oraz polimerazy poli(A) (PAP) do procesu post-transkrypcyjnej poliadenylacji enzymatycznej bez udziału matrycowego DNA.³²⁶ To rozwiązanie zapewnia wprowadzenie modyfikacji jedynie w obrębie ogona poli(A), eliminując wcześniej opisany problem występowania modyfikowanych nukleotydów w całej cząsteczce mRNA. Jednak to podejście również posiada swoje wady. Produkty poliadenylacji przeprowadzonej przez polimerazę PAP charakteryzują się zmienną długością, co wynika z nierównomiernego czasu działania enzymu na poszczególnych cząsteczkach mRNA w mieszaninie reakcyjnej. Finalnie każda reakcja poliadenylacji PAP kończy się uzyskaniem ogonów poli(A) o innej średniej długości, co uniemożliwia powtarzalne przygotowywanie produktów mRNA (Rys. 51).

Rysunek 51 Wykorzystanie polimerazy PAP do poliadenylacji RNA in vitro prowadzi do uzyskania heterogennego rozkładu długości ogona poli(A) zależnego od czasu trwania reakcji. Rysunek zapożyczony z Wahle³²⁷

Zjawisko to można częściowo ograniczyć poprzez dokładne określenie warunków prowadzenia poliadenylacji (stężenia ATP oraz czasu inkubacji), aby uzyskać zakładane długości ogonów poli(A).³²⁷ Jednak finalnie i tak uzyskiwana jest mieszanina cząsteczek o zróżnicowanej długości ogona poli(A), a skrajne przypadki mogą różnić się długością łańcucha poli(A) nawet o kilkadziesiąt podjednostek. Wprowadzanie zmodyfikowanych nukleotydów z wykorzystaniem PAP może ograniczać wydajność tego procesu z powodu niskiej specyficzności substratowej enzymu PAP względem nienaturalnych nukleotydów, a to doprowadzi do spowolnienia lub zatrzymania poliadenylacji. Dodatkową trudność stanowi próba selektywnej modyfikacji ogona poli(A), realizowana poprzez zastosowanie mieszaniny ATP i jego analogu podczas reakcji poliadenylacji. W takich warunkach precyzyjne sterowanie liczbą oraz lokalizacją zmodyfikowanych nukleotydów w obrębie ogona poli(A) jest znacznie utrudnione, co

prowadzi do jego niejednorodnej struktury i zmniejsza przewidywalność właściwości biologicznych końcowego produktu. W konsekwencji, tego rodzaju heterogeniczność stanowi poważne wyzwanie w kontekście uzyskiwania jednorodnych cząsteczek mRNA o oczekiwanych właściwościach biologicznych, co ogranicza potencjał tej metody w zastosowaniach terapeutycznych i przemysłowych.

Wprowadzanie modyfikacji nukleotydowych w obrębie ogona poli(A) jest również możliwe poprzez zastosowanie odpowiedniej sekwencji końca 3' cząsteczki na poziomie matrycowego DNA. Jest to jednak możliwe wyłącznie w przypadku ko-transkrypcyjnego dodawania naturalnych nukleotydów w ciągu adeninowym łańcucha ogona poli(A), ponieważ zastosowanie odmiennych modyfikacji nukleotydowych skutkowałoby wprowadzaniem zmian w obszarze całej sekwencji mRNA. W tej metodzie sekwencja matrycowego DNA musi zawierać zmienione nukleotydy w pożądanym miejscu regionu ogona poli(A).²⁷⁵ Aby przygotować taką matrycę niezbędny jest etap klonowania DNA, w którym syntetyczne oligonukleotydy kodujące modyfikowaną sekwencję ogona poli(A) są dołączane do reszty genu. Matryca DNA jest następnie używana w reakcji IVT, w której polimeraza RNA przepisuje informację z DNA na cząsteczkę RNA, wprowadzając modyfikacje nukleotydowe w odpowiednich miejscach ogona poli(A) finalnych molekuł mRNA. Największym wyzwaniem w tym procesie jest uzyskanie jednorodnej matrycy DNA o założonej długości łańcucha poli(A), o czym dokładnie pisałem na początku tego rozdziału. Matryce DNA mogą być przygotowywane i amplifikowane za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) lub poprzez amplifikację wektora plazmidowego w systemie bakteryjnym (Rys. 52).



Rysunek 52 Schemat procesu amplifikacji plazmidowego DNA. Rekombinowany plazmid DNA jest wprowadzany do komórki bakteryjnej, która następnie jest hodowana w kulturze mikrobiologicznej, co prowadzi do powielenia milionów nowych bakterii zawierających plazmid. Na końcu uzyskuje się oczyszczone kopie rekombinowanego plazmidu DNA.

Stosowanie plazmidowego DNA jest zalecane ze względu na większą kontrolę i powtarzalność procesu amplifikacji, co jest szczególnie istotne przy zwiększaniu skali produkcji zgodnie z dobrymi praktykami wytwarzania - GMP (ang. *good manufacturing practice*). Jednak amplifikacja plazmidowego DNA w systemach bakteryjnych, pomimo zalet, takich jak wysoka kontrola procesu i niższy koszt produkcji na dużą skalę w porównaniu z PCR, ma swoje wady. Bakteryjna maszyna transkrypcyjna w *E. coli* ma tendencję do niedokładnej amplifikacji "trudnych" sekwencji, takich jak te zawierające powtarzające się elementy i niestabilne wstawki. Amplifikacja długich homosekwencji, przekraczających 80-100 nukleotydów, takich jak sekwencja ogona poli(A), jest szczególnie problematyczna.^{328,329} Rozległy łańcuch powtarzających się adenin sprawia, że polimeraza bakteryjna przeslizguje się przez tę sekwencję, nie replikując dokładnie pełnej długości fragmentu DNA. W efekcie dochodzi do skrócenia sekwencji ogona poli(A) podczas amplifikacji, redukując go do około 30 zasad adeninowych.³³⁰ Ta redukcja długości ogona poli(A) zwiększa heterogenność mRNA i zmniejsza jego

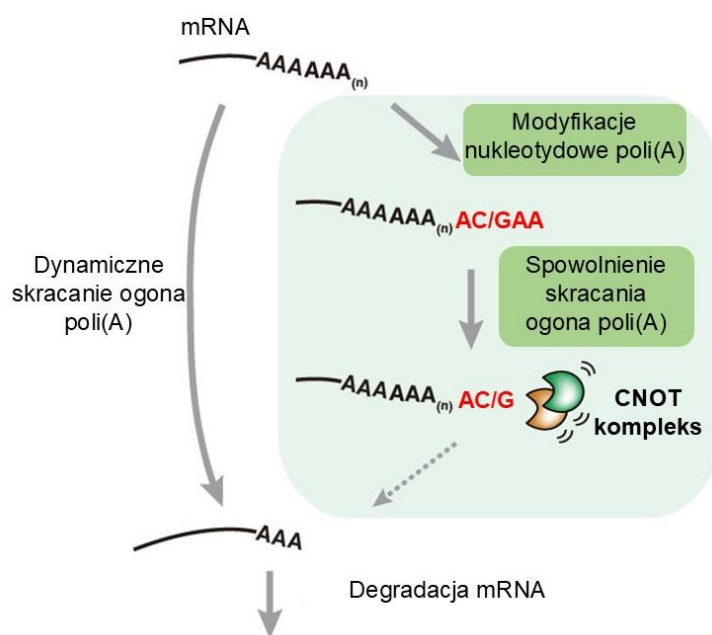
względnej aktywności biologicznej. W procesie amplifikacji plazmidowego DNA znaczącym problemem jest również zróżnicowany poziom replikacji w różnych komórkach bakteryjnych, co prowadzi do heterogenności populacji plazmidów. Komórki bakteryjne mogą preferencyjnie amplifikować plazmidy o uproszczonej strukturze, co zmniejsza udział plazmidów z długimi i powtarzalnymi sekwencjami, takimi jak poli(A), w końcowym preparacie. Ponadto, zastosowanie systemów bakteryjnych wiąże się z ryzykiem kontaminacji preparatu mRNA resztkami bakteryjnego DNA, endotoksynami oraz innymi składnikami bakteryjnymi. Wymaga to dodatkowych etapów oczyszczania, które mogą zwiększać koszt produkcji i czas trwania całego procesu. Częsteczki mRNA ze skróconymi ogonami poli(A) są bardziej podatne na degradację i mają krótszy okres półtrwania w żywych komórkach. Skrócony ogon poli(A) może również prowadzić do niższych poziomów ekspresji kodowanego białka z powodu mniej wydajnego procesu inicjacji translacji.³¹⁸ Częsteczki mRNA syntetyzowane z takich zmodyfikowanych matryc DNA z krótkimi ogonami poli(A) mają krótszy okres półtrwania, są szybciej degradowane i wykazują znacznie niższy poziom translacji białek w żywych komórkach.³⁰⁴ Taki efekt biologiczny jest skaraniem niepożądany, szczególnie w zastosowaniach terapeutycznych. Jednakże istnieją metody zapobiegania skracaniu ogonów poli(A) w trakcie ich amplifikacji w bakteriach. Do takich strategii należą: stosowanie szczepów bakteryjnych zoptymalizowanych pod kątem replikacji sekwencji powtarzalnych, modyfikacje wektorów plazmidowych w celu zwiększenia ich stabilności oraz użycie niskokopijnych plazmidów, które zmniejszają presję selekcyjną na amplifikację uproszczonych wariantów DNA. Coraz częściej rozważa się również alternatywy, takie jak amplifikacja w systemach eukariotycznych, które lepiej tolerują długie i powtarzalne sekwencje, czy zastosowanie technologii syntezy chemicznej DNA, eliminujących potrzebę replikacji w żywych organizmach.

8.1 Modyfikacje sekwencji nukleotydowej ogona poli(A)

Wraz z rozwojem technologii mRNA zrozumiano, że modyfikacje ogona poli(A) mogą znacząco wpłynąć na funkcjonalność cząsteczki mRNA, szczególnie w zastosowaniach terapeutycznych. Początkowe badania nad rolą ogona poli(A) w mRNA pojawiły się w latach 70. XX wieku, kiedy badacze, tacy jak Singer oraz Fraenkel (1970)³³¹, zaczęli opisywać jego strukturę i funkcje. Jednak intensywny rozwój w kierunku modyfikacji nukleotydowych ogona poli(A) nastąpił w ostatnich dwóch dekadach, głównie dzięki badaniom nad zastosowaniami mRNA w szczepionkach i terapiach genowych (Karikó i Weissman, 2005).³³² Jednym z podejść do modyfikacji ogona poli(A) jest wprowadzanie analogów nukleotydów. Zastępowanie naturalnych nukleotydów ich chemicznymi odpowiednikami, takimi jak metylowane adeniny (np. ^{m6}A), pozwala na zwiększenie stabilności mRNA oraz zmniejszenie jego podatności na działanie rybonukleaz. Karikó i Weissman wykazali, że takie modyfikacje nie tylko wydłużają okres półtrwania mRNA w komórkach, ale także zmniejszają jego immunogenność, co odegrało kluczową rolę w rozwoju szczepionek mRNA, takich jak te opracowane przez Pfizer/BioNTech i Moderna. Innym podejściem jest wykorzystanie zmodyfikowanych matryc DNA, które zawierają odpowiednio zaprojektowane sekwencje kodujące ogon poli(A). Dzięki zastosowaniu klonowania oligonukleotydów do wektorów plazmidowych, możliwe jest precyzyjne zaprojektowanie długości i struktury ogona poli(A). To podejście, choć obiecujące, wymaga precyzyjnej kontroli jakości matrycy DNA, ponieważ błędy podczas amplifikacji w systemach bakteryjnych mogą prowadzić do heterogennej długości ogona poli(A), co negatywnie wpływa na stabilność i wydajność translacji.

W komórkach somatycznych końce 3' ogonów poli(A) mogą naturalnie zawierać reszty uracylowe (U). Szacuje się, że około 5% ogonów poli(A) w połowie wszystkich mRNA kończy się właśnie tymi resztami. Za ten proces odpowiada urydylacja, polegająca na dodawaniu reszt urydylowych przez enzymy TUT4 i TUT7. Badania przeprowadzone przez Chang i współpracowników (2014)³²¹ wykazały, że urydylacja odgrywa kluczową rolę jako sygnał inicjujący degradację mRNA,

szczególnie w przypadku transkryptów z krótkimi ogonami poli(A). Z kolei reszty guaninowe (G) na końcu 3' ogona poli(A) zostały powiązane z większą stabilnością mRNA. Badania przedstawione przez Lim i współpracowników (2018)³³³ wskazują, że guanylowe zakończenie jest skutkiem mieszanej poliadenylacji katalizowanej przez enzymy TENT4A i TENT4B. Obecność G na końcu poli(A) może spowolnić proces deadenylacji przez kompleks CCR4-NOT, zwiększając tym samym czas życia mRNA i wydajność translacji (Rys. 53). Nie-adeninowe reszty w obrębie ogona poli(A) odgrywają również ważną rolę w regulacji translacji i stabilności mRNA. Na przykład, praca Jia et al. (2021)³⁰⁴ pokazała, że reszty cytozynowe (C) w obrębie ogona poli(A) mogą zwiększać stabilność mRNA poprzez redukcję tempa deadenylacji. W badaniach wykorzystano syntetyczne mRNA, w których celowo wprowadzono reszty C w poli(A). Wyniki wskazały, że takie modyfikacje mogą również poprawiać wydajność translacji, choć ich efektywność zależy od specyficznych warunków komórkowych.



Rysunek 53 Wpływ zastosowania modyfikacji nukleotydowych w obrębie ogona poli(A) mRNA na proces deadenylacji i degradacji mRNA. Modyfikacje nukleotydowe ogona poli(A) w postaci heteronukleotydów cytozynowych i guaninowych spowalniają proces skracania ogona poli(A) poprzez zmniejszenie oddziaływania łańcucha poli(A) z kompleksem CNOT. Rysunek zaadaptowany z pracy Lim et al.³³³

W pracy Trepotec et al. (2019)³³⁴ wykazano, że wprowadzenie (poprzez zastosowanie reakcji PCR) łączników nukleotydowych w sekwencję poli(A) stabilizuje konstrukty DNA podczas ich amplifikacji. Sekwencja końca 3' RNA składająca się z 120 adenin została przedzielona za pomocą łącznika mono- lub hekso-nukleotydowego w celu utworzenia segmentowanego ($A_{60_linker_A_{60}}$) systemu ogona poli(A).³³⁴ Testowano również wersje, które dzieliły cały ogon poli(A) na trzy fragmenty po 40 adenin, tworząc układ ($A_{40_linker_A_{40_linker_A_{40}}$). Tak pofragmentowane ogony poli(A) zmniejszyły występowanie zdarzeń rekombinacji w plazmidowym DNA. W większości badanych systemów, w tym *in vivo*, ogon $A_{60_linker_A_{60}}$ nie miał negatywnego wpływu na translację oraz stabilność mRNA. Praca Li et al. (2022)³³⁵ ukazała wpływ nukleotydów innych niż adenina w pobliżu końca 3' ogona mRNA na produkcję białka. Przygotowano serię mRNA kodujących EGFP z ogonami poli(A) o długości 40 nukleotydów, zawierającymi różne pojedyncze podstawienia nukleotydowe. Badanie wykazało, że podstawienia cytozyny (C) w pobliżu końca ogona zwiększały produkcję białka. Efekt podstawienia cytozyny (C) był spójny w różnych ludzkich liniach komórkowych, niezależnie od ich bazowych poziomów ekspresji białka. Badanie szczegółowo przeanalizowało mechanizmy

odpowiedzialne za te efekty i zidentyfikowało kompleks CCR4-NOT (CNOT), zaangażowany w degradację mRNA, jako kluczowy element. Zablokowanie wybranych białek CNOT ograniczyło efekt zwiększonej produkcji białek przez ogony zawierające cytozynę, wskazując na ich rolę w wydłużaniu okresu półtrwania mRNA.

Ogromny potencjał modyfikacji regionu końca 3' mRNA znajduje odzwierciedlenie w sukcesach sektora przemysłowego oraz ośrodków badawczych, które rozwijają te technologie na potrzeby zastosowań komercyjnych. Ujawnione prace badawczo-rozwojowe firmy BioNTech zidentyfikowały fragment 30-50 zasad od końca 5' ogona poli(A), jako krytyczny w procesie amplifikacji DNA w systemach bakteryjnych. W jednym z rozwiązań tej firmy zaproponowano wykorzystanie pojedynczego 10-nukleotydowego łącznika w sekwencji poli(A), jako elementu stabilizującego w procesie replikacji plazmidowych matryc DNA w bakteriach.³²⁹ Podejście to umożliwiło syntezę matryc DNA kodujących ogon poli(A) o długości do 110 zasad adeninowych, przy zachowaniu pełnej aktywności biologicznej kodowanego mRNA. Wyniki tych prac zostały ujęte w zgłoszeniu patentowym WO2016005004A1 i znalazły zastosowanie w szczepionce Comirnaty (Pfizer/BioNTech)³³⁶ przeciw wirusowi SARS-CoV-2. Kolejnym istotnym zastosowaniem przemysłowym zmodyfikowanej sekwencji ogona poli(A) jest szczepionka firmy Moderna (mRNA-1273), która również została zatwierdzona do użytku w trakcie pandemii SARS-CoV-2. Częsteczki mRNA w tej szczepionce zawierały regiony poli(A) składające się z 90 adenin, zakończonych pentamerem mΨCmΨAG. Badania nad tą szczepionką opublikowane na łamach czasopisma Nature w pracy Krawczyk et al. (2025), wykazały że pentamer mΨCmΨAG umożliwia łatwe rozróżnienie nienaruszonych i przetworzonych ogonów poli(A), co jest kluczowe dla analizy stabilności mRNA w różnych typach komórek. Okazało się, że szczególną rolę w tym procesie odgrywają makrofagi, które wykazują wysoki poziom ekspresji polimerazy TENT5A. Makrofagi były zdolne do re-adenylacji mRNA-1273, co dodatkowo zwiększyło stabilność mRNA i efektywność produkcji białka antygenowego. Część badań przedstawionych w niniejszej rozprawie również dotyczyła eksploracji „genetycznych” modyfikacji ogona poli(A) w kontekście ich wpływu na stabilność sekwencji plazmidowych, a także stabilności i aktywności translacyjnej samego mRNA.

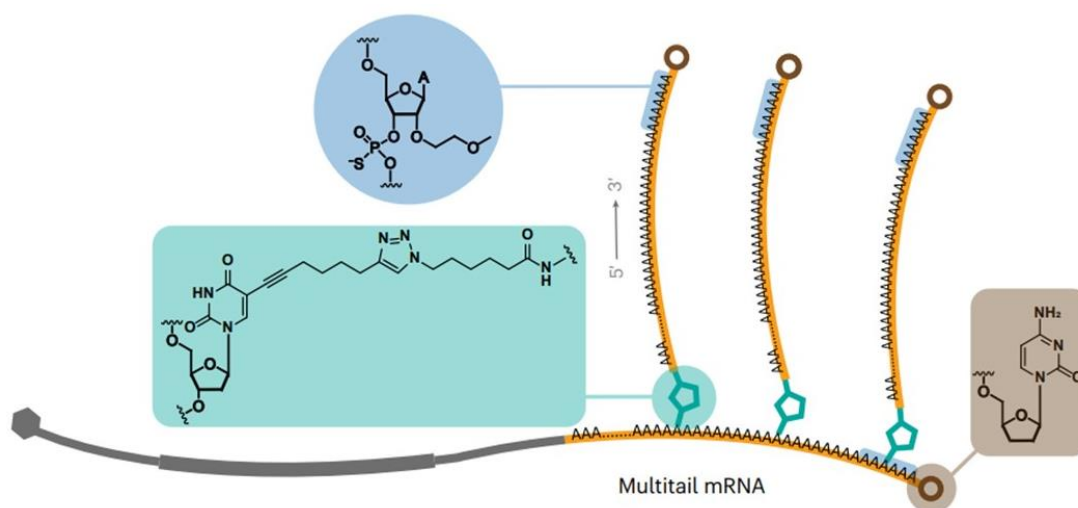
8.2 Chemiczne modyfikacje ogona poli(A)

W ostatnich latach pojawiły się również badania koncentrujące się na chemicznych modyfikacjach ogona poli(A), które mają na celu zwiększenie stabilności mRNA oraz poprawę efektywności translacyjnej, co jest kluczowe dla mRNA stosowanego w celach terapeutycznych. Pierwsze próby chemicznych modyfikacji ogona poli(A) skupiały się na jego wydłużeniu lub zastąpieniu poszczególnych nukleotydów analogami adenozyiny. Przykładem takich działań jest zastosowanie 3'-deoksyadenozyiny (kordycepiny) oraz 8-aza-adenozyiny, które stabilizowały mRNA w sposób analogiczny do wydłużenia naturalnego ogona poli(A). Niemniej jednak, jak zauważyli Rabinovich i wsp. (2006)³³⁷, wyniki tych modyfikacji nie przyniosły spodziewanych rezultatów pod względem poprawy efektywności translacyjnej. Mimo że kordycepina i 8-aza-adenozyina zwiększały stabilność mRNA, to nie wykazywały wyższego potencjału translacyjnego względem naturalnych poli(A).

Znacznie bardziej obiecujące rezultaty przyniosły modyfikacje tiofosforanowe ogona poli(A). Strzelecka i współpracownicy (2020)³³⁸ wykazali, że wprowadzenie modyfikacji tiofosforanowej na końcu 3' mRNA wpłynęło pozytywnie na stabilność cząsteczki. Tiofosforany zastępują jeden z atomów tlenu w grupie fosforanowej atomem siarki, co prowadzi do zwiększonej odporności mRNA na degradację enzymatyczną przez nukleazy. Dodatkowo, w niektórych systemach biologicznych mRNA zmodyfikowane tiofosforanami wykazywało wyższe wskaźniki translacji niż mRNA z naturalnym ogonem poli(A), co czyni tę strategię obiecującą w kontekście zastosowań terapeutycznych opartych na

mRNA. Alternatywne podejście stanowiło wprowadzenie modyfikacji boranofosforanowej. W tej strategii jeden z atomów tlenu w reszcie fosforanowej zostaje zastąpiony grupą boranową ($-BH_3^-$). Chociaż teoretycznie modyfikacja ta powinna prowadzić do zwiększonej stabilności mRNA, badania wykazały, że boranofosforany nie były tak skuteczne jak tiofosforany. Interesującym kierunkiem badań nad modyfikacjami ogona poli(A) była również próba przyłączenia małych cząsteczek fluorescencyjnych, takich jak sulforodamina B (SRB), za pomocą chemii "click" z wykorzystaniem 2'-azydo-2'-dATP. Anhäuser i wsp. (2019)³³⁹ pokazali, że przyłączenie SRB do końca 3' mRNA zaowocowało znacznym wzrostem wydajności translacyjnej, choć mechanizm tego zjawiska nie został w pełni wyjaśniony. Co ciekawe, modyfikacje fluorescencyjne, które teoretycznie miały jedynie służyć celom obrazowania, wykazały znaczący wpływ na poprawę translacji, co otwiera nowe możliwości dla dalszych badań.

W jednym z najnowszych badań nad modyfikacjami ogona poli(A), Chen i współpracownicy (2024)³⁴⁰ skupili się na projektowaniu wielogałęziowych (ang. *multitail*) struktur poli(A), które miały na celu zwiększenie stabilności mRNA oraz wydajności jego translacji (Rys. 54). Modyfikacje te były ukierunkowane na zwiększenie odporności na degradację przez egzonukleazy oraz zachowanie funkcji translacyjnej. Wielogałęziowe struktury poli(A) zaprojektowano w taki sposób, aby każda gałąź mogła pełnić funkcję naturalnego ogona poli(A), łącząc się z białkami PABPC, które stabilizują cząsteczkę mRNA i wspomagają translację. Każda z gałęzi poli(A) została dodatkowo zmodyfikowana chemicznie w celu zwiększenia odporności na degradację. Wprowadzono modyfikacje tiofosforanowe oraz 2'-metoksyetylowe w obrębie sześciu ostatnich nukleotydów, co znacząco poprawiło stabilność tej struktury. W celu oceny biologicznej aktywności *multitail* mRNA, naukowcy przeprowadzili badania w systemach komórkowych linii HEK293T oraz HeLa, używając dwóch białek reporterowych: lucyferazy Firefly (Fluc) oraz lucyferazy Renilla (Rluc). Wyniki wykazały, że wielogałęziowe struktury poli(A) znacząco zwiększały translacyjną wydajność mRNA, co obserwowano jako wzrost stosunku Fluc/Rluc w porównaniu do mRNA z tradycyjnym, liniowym ogonem poli(A). Dzięki zastosowaniu takich narzędzi jak STARmap (ang. *spatially-resolved transcript amplicon readout mapping*) możliwe było śledzenie translacji i stabilności mRNA w komórkach, co potwierdziło, że wielogałęziowe poli(A) poprawiło stabilność oraz efektywność translacyjną bez uszczerbku dla funkcji mRNA.



Rysunek 54 Schemat budowy rozgałęzionych ogonów poli(A). Rozgałęzione oligonukleotydy są sprzężone przez wiązania triazolowe. Modyfikacje odporne na nukleazy (fosforotioan i 2'-metoksyetyl) są włączone do ostatnich sześciu nukleotydów każdej gałęzi. Dideoksycytydyny kończące łańcuch są wprowadzane na końcu 3', aby zapobiec samoligacji. Rysunek zapożyczony z pracy Chen et al.³⁴⁰

Jednym z najbardziej obiecujących zastosowań *multitail* mRNA było jego wykorzystanie w systemach edycji genomu z wykorzystaniem technologii CRISPR. Zwiększona stabilność i translacyjna wydajność *multitail* mRNA umożliwiła poprawę efektywności edycji genów w systemie CRISPR przy minimalnych dawkach mRNA. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych oraz w modelach zwierzęcych wykazano, że *multitail* mRNA prowadzi do wyższej ekspresji białka Cas9 oraz bardziej efektywnej edycji docelowych genów w porównaniu do mRNA z tradycyjnym ogonem poli(A).

Warto wspomnieć, że modyfikacje sekwencji poli(A) eksplorowane były również w kontekście tworzenia inhibitorów translacji celujących w białko PABP. W pracy Perzanowska et al. (2022)³⁴¹ badano wpływ chemicznych modyfikacji ogona poli(A) na jego zdolność do wiązania się z białkiem PABP oraz na inhibicję translacji. Autorzy skupili się na analizie różnorodnych substytucji, w tym modyfikacji tiofosforanowych, 2'-*O*-metyloadenozyny (A_m), 2'-fluoroadenozyny (A^F), N6-metyloadenozyny (m^6A) oraz podstawienia guaninę (G) w poli(A). Przeprowadzono szereg testów wiązania z PABP za pomocą metody termoforezy mikroskalowej, która pozwoliła dokładnie zmierzyć zmiany w powinowactwie PABP do zmodyfikowanych sekwencji adeninowych w porównaniu do niezmodyfikowanego A12. Badania wykazały, że modyfikacje tiofosforanowe oraz 2'-fluoroadenozynowe miały najmniejszy wpływ na zdolność modyfikowanych oligomerów do wiązania PABP, jednocześnie zapewniając ochronę przed enzymatyczną degradacją, zwłaszcza gdy były umiejscowione na końcu łańcucha. Inne modyfikacje, takie jak m^6A oraz guanina, wprowadzone w środku oligonukleotydu, znacząco obniżały zdolność wiązania z PABP. Autorzy wykazali również, że modyfikacje te mogą wpływać na stabilność mRNA i jego podatność na degradację przez deadenylazy. W eksperymentach dotyczących inhibicji translacji autorzy wskazali, że strategiczne wprowadzenie grupy metylowej w odpowiedniej pozycji (A^{m5}), prowadziło do efektywnej inhibicji translacji w systemie RRL (ang. *reticulocyte lysate system*). Wyniki te sugerują, że zmodyfikowane sekwencje adeninowe mogą być użyteczne jako inhibitory translacji, co ma potencjalne zastosowania w kontrolowaniu syntezy białek w terapiach RNA.

9. Termoforeza mikroskalowa w badaniach interakcji kwasów nukleinowych z białkami

Metody fluorescencyjne stanowią niezwykle cenne narzędzie w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych ze względu na swoją wysoką czułość, specyficzność oraz zdolność monitorowania procesów w czasie rzeczywistym. Obejmują szeroki zakres zastosowań, takich jak precyzyjne śledzenie zmian konformacyjnych, tworzenia wiązań oraz oddziaływań między molekułami, w tym białkami, kwasami nukleinowymi i ligandami. Metody te umożliwiają również badanie kinetyki enzymatycznej oraz określanie stałych dysocjacji różnych kompleksów biomolekularnych. Niewątpliwą zaletą tych metod jest również zdolność do badania interakcji w szerokim zakresie stężeń oraz ich nieinwazyjność, co pozwala na przeprowadzanie eksperymentów w warunkach bliskich fizjologicznym. Techniki oparte na zjawisku fluorescencji stały się fundamentem w rozwoju biologii molekularnej i biofizyki, wykorzystując różnorodne zjawiska fizyczne oraz specyficzne właściwości biomolekuł. Większość z tych technik umożliwia precyzyjne określenie parametrów danej cząsteczki lub interakcji, w której bierze ona udział, jednakże ich zastosowanie wymaga spełnienia ściśle określonych warunków w danym układzie badawczym.

Jedną z pierwszych zastosowanych metod fluorescencyjnych była analiza wygaszania fluorescencji, która pozwalała na badanie oddziaływań molekuł poprzez monitorowanie zmian w intensywności emisji fluorescencyjnej w obecności wygaszaczy. Z czasem rozwinięto technikę Försterowskiego transferu energii rezonansowej FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*), umożliwiającą poznanie odległości między molekułami w skali nanometrów, co otworzyło nowe możliwości w badaniach struktury i dynamiki białek oraz kwasów nukleinowych.³⁴² Kolejnym

przełomem było wprowadzenie anizotropii fluorescencji, której istotą jest pomiar dyfuzji rotacyjnej cząsteczek.³⁴³ Metoda ta dostarcza informacji o wielkości i kształcie molekuł oraz dynamice ich ruchów rotacyjnych, co jest kluczowe w badaniach konformacyjnych białek. Równolegle rozwijana spektroskopia korelacji fluorescencji FCS (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*) umożliwiła badanie dyfuzji translacyjnej cząsteczek w roztworach, pozwalając na dokładne określanie stężeń i ruchliwości molekuł na poziomie pojedynczych cząsteczek.³⁴⁴ W kolejnych latach zaawansowane techniki fluorescencyjne zostały wzbogacone o izotermiczną kalorymetrię miareczkową ITC (ang. *isothermal titration calorimetry*), która choć nie opiera się na fluorescencji, stanowi cenny uzupełniający element w badaniach oddziaływań molekularnych.³⁴⁵ ITC mierzy ciepło generowane podczas reakcji wiązania, dostarczając bezpośrednich informacji o termodynamice oddziaływań, co w połączeniu z metodami fluorescencyjnymi pozwala na pełniejsze zrozumienie procesów biomolekularnych.

Termoforeza mikroskalowa MST (ang. *microscale thermophoresis*) jest unikalną techniką wśród metod fluorescencyjnych, wyróżniającą się szerokim zakresem zastosowań w badaniach interakcji biomolekularnych.³⁴⁶ W przeciwieństwie do tradycyjnych metod, takich jak FRET czy anizotropia fluorescencji, które często wymagają szczególnego przygotowania próbek i ściśle określonych warunków eksperymentalnych, MST oferuje większą elastyczność i możliwość badania różnych układów molekularnych bez konieczności stosowania zaawansowanego znakowania. Jej kluczową zaletą jest czułość na zmiany w rozmiarze, konformacji, ładunku oraz otoczce hydratacyjnej cząsteczek, co pozwala na dokładne monitorowanie zmian zachodzących podczas tworzenia się kompleksów biomolekularnych.³⁴⁷ Dzięki zdolności do precyzyjnego badania cząsteczek o bardzo różnych właściwościach, od małych ligandów po złożone kompleksy białkowe, MST stanowi narzędzie o szerokim spektrum zastosowań. Dodatkowo, metoda ta charakteryzuje się niewielkim zużyciem próbek, co jest szczególnie korzystne przy pracy z rzadkimi lub drogimi materiałami biologicznymi. Krótki czas pomiaru oraz stosunkowo prosta analiza danych sprawiają, że MST jest wygodnym i wydajnym rozwiązaniem, nawet w przypadku skomplikowanych układów eksperymentalnych.

9.1 Podstawy termoforezy mikroskalowej- badania kompleksów biomolekuł

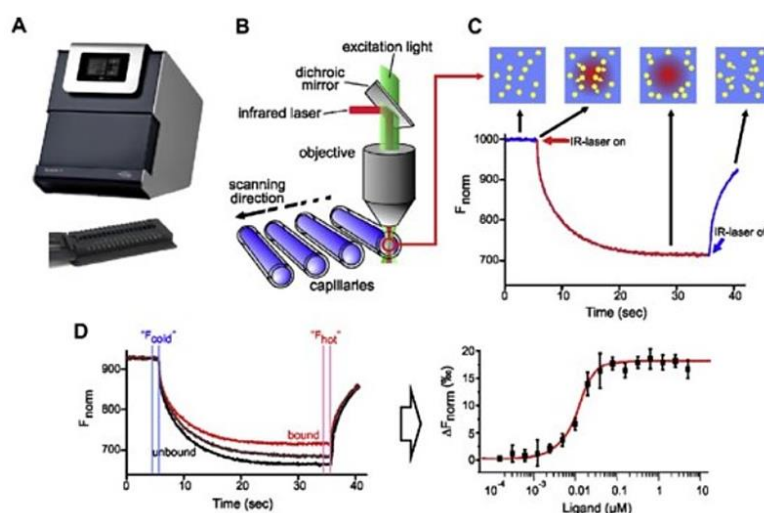
Zjawisko termoforezy opisuje ruch cząsteczek w gradiencie temperatury i choć zostało zaobserwowane już w połowie XIX wieku przez Ludwiga, wykorzystanie tego fenomenu w badaniach nastąpiło dopiero wiele dekad później.³⁴⁸ Kluczowym parametrem opisującym termoforezę jest stała Soreta (S_T), określająca w jaki sposób molekuly rozpuszczone w roztworze rozmieszczają się w odpowiedzi na różnice temperatury, i jest wyrażona przez zależność:

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

Stosunek stężeń cząsteczek w punktach o różnych temperaturach zależy wykładniczo od stałej Soreta (S_T) oraz różnicy temperatur (ΔT), określając ich rozkład w stanie równowagi w odpowiedzi na gradient temperatury.³⁴⁹ Stała Soreta określa, czy cząsteczki będą przemieszczać się w stronę wyższej temperatury (termoforeza ujemna) czy niższej temperatury (termoforeza dodatnia). Wartość S_T zależy od różnych właściwości molekularnych, takich jak rozmiar cząsteczek, ich ładunek, konformacja oraz charakterystyka otoczki hydratacyjnej. Zmiany tych właściwości, wynikające np. z oddziaływania cząsteczki z innymi molekułami mają bezpośrednie przełożenie na wartość tej stałej. W kontrolowanych warunkach buforowych termoforeza umożliwia badanie ładunku, rozmiaru oraz entropii solwatacji cząsteczek. Termoforeza wolnego białka znacząco różni się od termoforezy kompleksu białka z ligandem, co wynika z różnic w rozmiarze oraz ładunku. Nawet jeśli wiązanie nie wywiera istotnego wpływu na ładunek lub rozmiar kompleksu, termoforeza wciąż może wykryć tę interakcję dzięki

zmianom w entropii solwatacji, wynikającym z procesu wiązania.

Termoforeza mikroskalowa w typowym układzie eksperymentalnym jest indukowana i mierzona w szklanych kapilarach (Rys. 55).³⁴⁶ Wiązka lasera podczerwonego (IR) skupiana jest we wnętrzu kapilar, tworząc mikroskopijny gradient temperatury. W trakcie indukowania tego gradientu, fluorofory w roztworze są wzbudzone, a emitowana przez nie fluorescencja jest monitorowana, co umożliwia określanie zmian w stężeniu cząstek fluorescencyjnych w obszarze objętym zasięgiem lasera IR. Po początkowym skoku temperatury (ang. *MST temperature jump*, *T-Jump*), ciepło rozprasza się równomiernie w całej objętości próbki, a w wyniku zjawiska termoforezy powstaje gradient stężenia cząsteczek w badanym roztworze. Aby wyznaczyć stałe wiązania, przygotowuje się kilkanaście próbek (najczęściej 12 – 16) o niezmiennym stężeniu cząsteczki fluorescencyjnej oraz seryjne rozcieńczenie drugiego składnika kompleksu.



Rysunek 55 Schemat i przebieg eksperymentu MST. (A) Aparat Monolith NT.115 firmy NanoTemper Technologies GmbH z tacką kapilarną na 16 kapilar. (B) Schemat optyki MST: eksperymenty są prowadzone w kapilarach o objętości około 4 μL , gdzie fluorescencja jest wzbudzana i wykrywana za pomocą tego samego obiektywu. Lokalnie podgrzewany obszar próbki za pomocą skoncentrowanego lasera IR powoduje termoforesję fluoroforów przez gradient temperatury. (C) Typowy sygnał eksperymentu MST: po aktywacji lasera IR obserwuje się skok temperatury („T-Jump”), po czym fluorofory przemieszczają się termoforycznie. Fluorescencja jest mierzona przez 30 s, a po wyłączeniu lasera zachodzi proces dyfuzji powrotnej. (D) Typowy eksperyment wiązania: ruch termoforyczny cząsteczki fluorescencyjnej zmienia się po związaniu z niefluorescencyjnym ligandem, co skutkuje odmiennymi śladami sygnału. Analiza zmian termoforesji jako ΔF_{norm} ($F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$) pozwala na wyznaczenie krzywej wiązania oraz stałych wiązania (K_D). Rysunek zapożyczony z pracy Jerabek-Willemsen et al.³⁴⁶

Obserwowane zmiany w termoforezie cząsteczek fluorescencyjnych powstałe w wyniku wiązania ligandu są następnie wykorzystywane do obliczania stałych równowagi wiązania, w tym stałej dysocjacji K_D . Pomiar MST składa się z kilku faz, które rozróżnić można na podstawie ich kolejności względem trybu pracy lasera IR (włączony lub wyłączony).³⁵⁰ W początkowym stanie cząsteczki są równomiernie rozmieszczone, a rejestrowana jest stała fluorescencja początkowa w temperaturze pokojowej (25°C). W ciągu pierwszej sekundy po aktywacji lasera IR obserwuje się tzw. skok temperaturowy (T-Jump), gdzie zmiana intensywności fluorescencji jest wynikiem podwyższenia temperatury, zanim nastąpi ruch cząsteczek wywołany termoforezą. W ciągu kolejnych kilku sekund działania lasera IR, temperatura w próbce stabilizuje się, co umożliwia obserwację termoforetycznego ruchu fluorescencyjnie znakowanych cząsteczek. Zmiana fluorescencji jest zazwyczaj mierzona przez około 30 sekund, co pozwala na ustalenie równowagi gradientu stężeń molekuł. Wyłączenie lasera IR powoduje ochłodzenie próbki, czego efektem jest odwrotny skok temperaturowy (ang. *inverse T-Jump*), prowadzący do krótkiego okresu bezwładności układu. Następnie, na skutek dyfuzji, cząsteczki rozprzestrzeniają się równomiernie w roztworze.

W kontekście pomiarów MST możliwe jest zastosowanie liniowego przybliżenia stałej Soreta, co upraszcza interpretację wyników. Standardowo stosowane równanie opisujące stosunek stężeń cząsteczek w gorącej i zimnej części kapilary, przedstawione we wcześniejszym paragrafie, może być przybliżone do postaci:

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

Przybliżenie to jest uzasadnione w sytuacjach, gdy wartość $S_T \Delta T$ jest niewielka, co odpowiada małym różnicom temperatur (ΔT) i umiarkowanym wartościom stałej Soreta (S_T). Dokładnie taka sytuacja występuje w trakcie pomiarów MST, ponieważ różnice w stosunku stężeń c_{hot}/c_{cold} są bardzo niewielkie. Pomiar standardowo prowadzony jest w temperaturze 298K, a laser IR tworzy gradient temperatury w przedziale 2-6 K, przez co dyfuzja powodowana termoforezą cząstek nie powoduje znaczących zmian w lokalnym stężeniu. Taki liniowy model ułatwia analizę danych i pozwala na prostszą ocenę zmian stężenia cząsteczek w wyniku termoforezy. W celu analizy zmian stężeń wywołanych termoforezą wyznacza się znormalizowane wartości fluorescencji (ΔF_{norm}), definiowanej jako stosunek F_{hot}/F_{cold} , gdzie wartości F odpowiadają średnim wartościom fluorescencji w określonym momencie.

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

Wartość F_{cold} odpowiada początkowej fluorescencji próbki przed włączeniem lasera IR, natomiast F_{hot} to fluorescencja mierzona w wybranym momencie po uruchomieniu lasera. W celu dokładniejszego opisu tej zależności należy uwzględnić również wpływ skoku temperatury na intensywność fluorescencji wyrażonej jako $\partial F / \partial T$. Tę zmianę fluorescencji fluoroforu w odpowiedzi na jednostkową zmianę temperatury można wyznaczyć na podstawie zmian fluorescencji zaobserwowanych w fazie T-Jump. Uwzględniając powyższy parametr, liniowe przybliżenie znormalizowanej fluorescencji w momencie, gdy ustali się równowaga termoforezy, można wyrazić w następująco:

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

Pomiary MST w fazie T-Jump polegają na monitorowaniu natychmiastowej zmiany fluorescencji cząsteczek po nagłym skoku temperatury wywołanym przez laser IR. Faza T-Jump występuje w ciągu pierwszej sekundy po włączeniu lasera. W tym okresie termoforeza jeszcze się nie rozpoczyna, jednak obserwuje się zmiany właściwości fluorescencyjnych fluoroforu, takich jak intensywność czy wydajność kwantowa. Zmiany te są spowodowane wpływem temperatury na strukturę molekularną i mikrośrodowisko fluoroforu. Różnice w czasie występowania fazy T-Jump i następującej po niej termoforezy umożliwiają bardziej szczegółową analizę dynamiki i mechanizmów oddziaływań międzycząsteczkowych. Ponadto, wpływ samego wiązania na właściwości oznakowanych cząsteczek może być najlepiej widoczny właśnie w fazie T-Jump. Pomiary MST wymagają przygotowania zestawu próbek z seryjnie rozcieńczonym nieoznakowanym składnikiem kompleksu. Aby określić zależność między F_{norm} (znormalizowaną wartością fluorescencji), a stężeniem nieoznakowanych cząsteczek w próbce można posłużyć się odpowiednim wzorem:

$$F_{norm} = (1 - x)F_{norm(związane)} + x * F_{norm(niezwiązane)}$$

W tym równaniu parametr x stanowi frakcję cząsteczek znajdujących się w stanie związanym, czyli proporcję oznakowanych cząsteczek, które są częścią kompleksu. F_{norm} stanowi znormalizowaną wartość fluorescencji znakowanej cząsteczki w stanie związanym, czyli w kompleksie, z kolei $*F_{norm}$ to

znormalizowana wartość fluorescencji znakowanej cząsteczki w stanie wolnym, czyli bez związania z ligandem lub inną molekułą, która stanowi punkt odniesienia pomiaru. Równanie to pozwala na obliczenie znormalizowanej fluorescencji próbki jako sumy znormalizowanych fluorescencji cząsteczek w stanie wolnym i związanym. Wartość parametru x zmienia się w zależności od stężenia ligandu, co wpływa na rozkład znakowanych cząsteczek między stanem wolnym i związanym. Poprzez analizę tych wartości można określić, jak duża część znakowanych cząsteczek tworzy kompleksy, co w połączeniu z odpowiednimi danymi pomiarowymi pozwala na wyznaczenie stałych wiązania i dysocjacji (K_D) dla badanego układu.

Wyznaczenie wartości stałej dysocjacji K_D w pomiarach MST³⁵¹, czyli stężenia liganda, przy którym połowa oznakowanego białka jest związana w kompleksie jest możliwe na podstawie poniższego równania:

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B^*]}{[AB^*]}$$

Wzór ten opisuje równowagę pomiędzy wolnymi cząsteczkami znakowanego białka (B^*), wolnymi cząsteczkami liganda (A), a kompleksem (AB^*), który te cząsteczki tworzą. Wartość K_D jest więc ilorazem iloczynu stężeń wolnych cząsteczek białka i liganda oraz stężenia kompleksu. Im niższa wartość K_D , tym silniejsze jest powinowactwo wiązania między białkiem a ligandem. Aby wyznaczyć stałą dysocjacji K_D dla modelu wiązania 1:1 w termoforezie mikroskalowej, należy przeanalizować zmianę znormalizowanej fluorescencji F_n w zależności od stężenia cząsteczki nieznakowanej (A), dodawanej do próbki zawierającej znakowaną cząsteczkę (B^*). Dla każdej próbki mierzy się znormalizowaną fluorescencję F_n , która jest sumą fluorescencji wolnej cząsteczki (B^*) i kompleksu (AB^*) zgodnie z równaniem:

$$F_n = \left(\frac{B^*}{B^*_{tot}} \cdot F_{n,B^*} \right) + \left(\frac{AB^*}{B^*_{tot}} \cdot F_{n,AB^*} \right)$$

Zależność ta pokazuje, że całkowita fluorescencja F_n jest sumą fluorescencji pochodzącej od wolnych cząsteczek ($B^*/B^*_{tot} \cdot F_{n,B^*}$) oraz fluorescencji pochodzącej od kompleksów ($AB^*/B^*_{tot} \cdot F_{n,AB^*}$). Każdy z tych składników jest proporcjonalny do udziału danej formy cząsteczki w całkowitym stężeniu znakowanego białka. Aby dokładnie obliczyć stężenie kompleksu AB^* , należy skorzystać z bardziej zaawansowanego równania, które uwzględnia całkowite stężenia białka (B^*_{tot}) i liganda (A_{tot}).³⁵² Jest ono wynikiem rozwiązania równania kwadratowego i przedstawia się następująco:

$$AB^* = \frac{(K_D + A_{tot} + B^*_{tot}) - \sqrt{(K_D + A_{tot} + B^*_{tot})^2 - 4 \cdot A_{tot} B^*_{tot}}}{2}$$

Równanie to pozwala uzależnić rzeczywiste stężenie kompleksu AB^* w badanym układzie od stężeń całkowitych (analitycznych) składników tego kompleksu, a jednym z parametrów tego równania jest stała dysocjacji K_D . Jest to niezbędne do precyzyjnego określenia stopnia związania w danym momencie pomiaru. Stałą tę można wyznaczyć na podstawie zależności między stężeniem składnika A (ligandu) a stopniem wysycenia składnika B (receptora), często poprzez analizę krzywej wiązania, uzyskanej na drodze technik takich jak spektroskopia fluorescencyjna, termoforeza mikroskalowa lub inne metody ilościowe. Dzięki znajomości stężenia kompleksu AB^* w danej próbce i wyliczeniu K_D , można precyzyjnie określić powinowactwo między cząsteczkami A i B oraz przewidzieć stabilność ich interakcji w różnych warunkach środowiskowych.

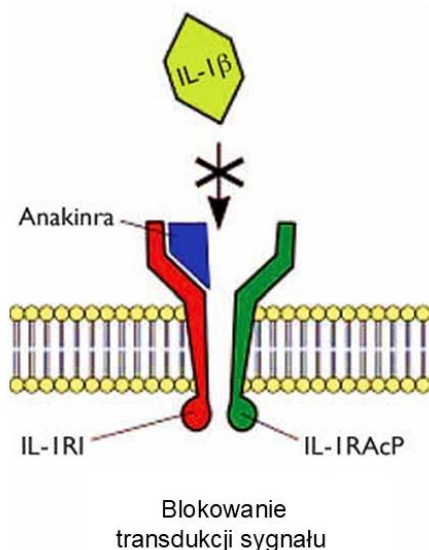
Termoforeza mikroskalowa (MST) jest niezwykle czułą metodą umożliwiającą badanie interakcji biomolekularnych, jednak jak każda technika, posiada swoje ograniczenia. W kontekście

wyznaczania stałych dysocjacji K_D dla kompleksów molekularnych, głównym ograniczeniem jest zakres wykrywalności zależny od rodzaju używanego urządzenia. Standardowe urządzenia MST, takie jak Monolith NT.115, pozwalają na pomiary K_D w przedziale od 1 nM do około 10 μ M.³⁵³ Oznacza to, że są one skuteczne w badaniach umiarkowanie silnych oddziaływań molekularnych, jednak nie nadają się do analizy bardzo silnych interakcji, których wartość K_D leży poniżej 1 nM. Aby sprostać wymaganiom badań układów o bardzo wysokim powinowactwie, opracowano bardziej czułe instrumenty, takie jak Monolith NT.Pico, które umożliwiają pomiary w zakresie K_D od 1 pM do 10 nM.³⁵⁴ Dzięki tak niskiej dolnej granicy wykrywalności, urządzenia te pozwalają na dokładną analizę silnych oddziaływań molekularnych, takich jak interakcje białko-ligand czy kompleksowanie przeciwciał. Jednak mimo wysokiej czułości, badania w tym zakresie wymagają stosowania bardzo niskich stężeń znakowanych cząsteczek, co może wpływać na precyzję pomiaru w warunkach niskiego stosunku sygnału do szumu. Z drugiej strony, wyznaczanie wysokich wartości K_D (powyżej 10 μ M) może być ograniczone przez konieczność stosowania wysokich stężeń składników kompleksu, co może prowadzić do agregacji cząsteczek oraz zaburzeń w ich ruchliwości termoforetycznej. Ponadto, obecność нефизjologicznych stężeń białka w roztworze może wpływać na stabilność układu oraz wiarygodność uzyskanych wyników. Wysokie stężenia są również trudne do osiągnięcia w przypadku rzadkich lub drogich biomolekuł, co dodatkowo ogranicza możliwość pomiaru wysokich wartości K_D . Niemniej jednak MST oferuje szeroki zakres czułości, który umożliwia badanie bardzo różnorodnych zjawisk tworzenia kompleksów molekularnych. Wybrane przykłady zastosowań tej techniki opisano w następnych podrozdziałach.

9.2 Pomiary tworzenia kompleksów za pomocą termoforezy mikroskalowej

MST umożliwia precyzyjną analizę interakcji białko-DNA o wysokim powinowactwie. W jednym z przykładów wykorzystania MST przeanalizowano wiązanie białka EcoSSB z *Escherichia coli* do jednoniciowego oligonukleotydu ssDNA oligo(dT)₇₀, które odgrywa kluczową rolę w procesie replikacji DNA.³⁵⁵ EcoSSB wiąże ssDNA, zapobiegając ponownemu połączeniu się nici, co umożliwia dalszą pracę enzymów replikacyjnych – prymaz oraz polimeraz DNA. Dotychczasowe badania wykazały, że jeden tetramer EcoSSB wiąże 70-nukleotydowy fragment ssDNA, a stała dysocjacji K_D dla tej interakcji jest bardzo niska, w zakresie pM lub nawet fM. Z powodu ograniczeń czułości konwencjonalnych metod nie udało się precyzyjnie zmierzyć tej wartości. Dzięki MST, przy użyciu oligo(dT)₇₀ znakowanego Cy5 w niskim stężeniu 20 pM i miareczkowaniu EcoSSB od 5 nM do 10 fM, udało się uzyskać dokładną krzywą wiązania i wyznaczyć K_D na poziomie $1 \pm 0,1$ pM.

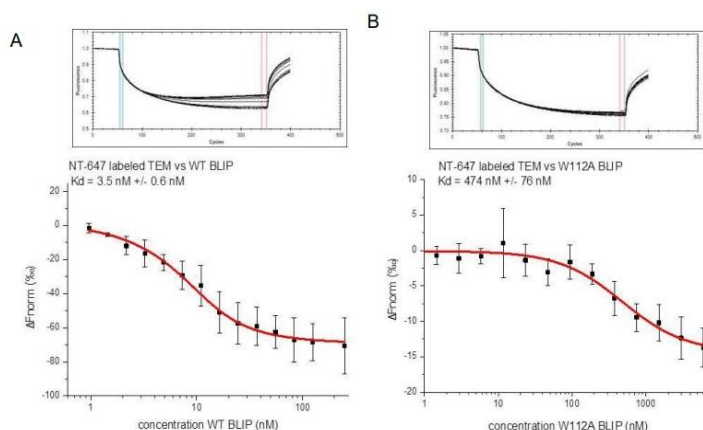
Termoforeza mikroskalowa jest skuteczną metodą do wykrywania i ilościowego określania oddziaływań białko-białko o wysokim powinowactwie, co ma istotne znaczenie w badaniach biomedycznych. Takie białka są często modyfikowane, aby skuteczniej leczyć choroby, takie jak nowotwory czy schorzenia autoimmunologiczne. Znajomość dokładnego powinowactwa białka terapeutycznego do jego celu molekularnego jest kluczowa przy projektowaniu nowych leków oraz ocenie wpływu wprowadzanych modyfikacji. Przykładem jest białko anakinra, antagonist receptor interleukiny-1 (IL-1), który blokuje jego działanie i łagodzi objawy reumatoidalnego zapalenia stawów (Rys. 56).³⁵⁶ Wykorzystując technikę MST, przeprowadzono miareczkowanie natywnego białka anakinra względem 500 pM fluorescencyjnie znakowanego fragmentu IL-1 i wyznaczono wartość K_D dla tej interakcji, uzyskując wynik 620 ± 61 pM, co potwierdza wysokie powinowactwo anakinry do tej cytokiny. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi danymi i podkreśla skuteczność MST w badaniu takich oddziaływań w porównaniu z innymi metodami biofizycznymi, jak również wskazuje na możliwość wykorzystania tej techniki do szybkiego testowania modyfikacji białek terapeutycznych, umożliwiając walidację wpływu wprowadzonych zmian na ich stabilność oraz efektywność biologiczną.



Rysunek 56 Mechanizm działania anakinry jako inhibitora sygnalizacji IL-1 β . Anakinra wiąże się z receptorem IL-1RI, blokując interakcję z koreceptorem IL-1RAcP, co uniemożliwia transdukcję sygnału i hamuje aktywację szlaku zapalnego

W badaniach biomedycznych istotna jest nie tylko analiza równowagi molekularnej, ale również analiza kinetyki enzymatycznej, aby lepiej zrozumieć, jak różne związki wpływają na procesy zachodzące w komórkach. Technika MST została zastosowana do analizy kinetyki działania DNazy I, enzymu zależnego od Mg²⁺, który niespecyficznie rozkłada DNA, tworząc fragmenty di-, tri- i oligonukleotydowe.³⁴⁶ W badaniu monitorowano degradację DNA znakowanego SybrGold w obecności DNazy I, mierząc zmiany termoforezy co 3 sekundy. Próbką kontrolna zawierała EDTA, który hamuje aktywność DNazy I. W obecności DNazy I sygnał termoforezy wyraźnie się zmieniał, podczas gdy w próbie kontrolnej pozostawał stały. Wyniki te potwierdzają, że MST skutecznie monitoruje fragmentację DNA, a analiza zależności stopnia fragmentacji od czasu wykazała kinetykę o stałej czasowej $\tau = 247$ sekund, co dokładnie odzwierciedla tempo degradacji DNA przez DNazę I.

Tradycyjne metody badania oddziaływań białko-białko, które są kluczowe dla wielu procesów biologicznych zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórek, wymagają stosowania uproszczonych układów z jednorodnymi roztworami, znacząco odbiegającymi od warunków panujących w żywych tkankach. Środowisko komórkowe charakteryzuje się bardzo wysokim zagęszczeniem biomolekuł, takich jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy oraz inne cząsteczki, które wpływają zarówno na dyfuzję molekuł, jak i lepkość środowiska. Mnogość cząstek wpływa na wzajemne interakcje molekuł, obejmujące oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, czy oddziaływania hydrofobowe. Najlepszy wgląd w łączny efekt oddziaływań badanych cząsteczek można uzyskać, mierząc te zależności w warunkach jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych. Niestety, większość standardowych technik, takich jak ITC czy SPR, ze względu na swoje ograniczenia, nie nadaje się do oceny interakcji w złożonych płynach biologicznych. MST w odróżnieniu od tych technik, umożliwia szybką i precyzyjną analizę interakcji w środowisku wysokiego zatłoczenia białek i uzyskanie parametrów termodynamicznych w warunkach bliskich fizjologicznym z pominięciem znakowania fluorescencyjnego. Przykładem zastosowania techniki MST jest analiza wiązania β -laktamazy TEM1 z jej inhibitorem, białkiem BLIP (Rys. 57).³⁵⁷ Białko TEM1 zostało znakowane kowalencyjnie na resztach lizyny i użyte w stałym stężeniu 5 nM, podczas gdy stężenie BLIP było zmienne. Wyznaczona wartość K_D wyniosła $4,2 \pm 0,8$ nM, co było zgodne z wcześniejszymi wynikami. W kolejnych eksperymentach wyznaczono K_D dla interakcji białek fuzyjnych mCherry-TEM1 i Ypet-BLIP, uzyskując wartość $17,7 \pm 4$ nM, co wskazało na niewielki wpływ fluorescencyjnych tagów na wiązanie biomolekuł. Ostatecznie zbadano tę samą interakcję w zatłoczonym lizacie komórek HEK293, uzyskując K_D na poziomie $13,8 \pm 3,6$ nM, co potwierdziło, że stałe K_D uzyskane w eksperymencie MST są zbliżone do wartości tych stałych w warunkach bliskich fizjologicznym. Ponadto, technika termoforezy mikroskalowej umożliwia precyzyjne badanie interakcji białko-białko na poziomie komórkowym i molekularnym, nawet bez konieczności oczyszczania białek czy znajomości ich stężenia w komórkach.



Rysunek 57 Wiązanie NT-647 znakowanego TEM1 z białkiem BLIP. (A) Wiązanie BLIP-WT z NT-647 znakowanym TEM1-WT, gdzie wyznaczono K_d równy $3,5 \text{ nM} \pm 0,6 \text{ nM}$ dla tej interakcji. (B) Wiązanie BLIP-W112A z NT-647 znakowanym TEM1-WT, gdzie wyznaczono K_d równy $474 \text{ nM} \pm 76 \text{ nM}$ dla tej interakcji. Rysunek zapożyczony z pracy Eiamphungporn et al.³⁵⁷

Wykorzystanie MST oprócz badania interakcji molekularnych może służyć również do analizy właściwości fałdowania białek, stanowiąc alternatywę dla metod takich jak

dichroizm kołowy, czy pomiary fluorescencji tryptofanu. Termoforeza mikroskalowa umożliwia skuteczne śledzenie procesu rozwijania białka, jak i identyfikację występujących w trakcie stanów pośrednich. Podczas badań przeprowadzonych z wykorzystaniem urządzenia NT.LabelFree sprawdzano wpływ stężenia chlorku guanidyny (GdnCl) na zmiany termoforezy białka konkanawaliny A (ConA), które należy do lektyn wykorzystywanych tym.in. w badaniu stanu glikozylacji komórek czy badań nad komórkami nowotworowymi.³⁴⁶ ConA rozwija się zgodnie z trójstopniowym mechanizmem, co wcześniej wykazano w eksperymentach denaturacji chemicznej. Pod wpływem GdnCl białko ConA przechodzi przez dwa stany przejściowe, przy stężeniach około 0,8 i 1,8 M GdnCl. W zakresie stężeń od 1 do 1,6 M GdnCl pojawia się stabilny stan pośredni, który charakteryzuje się wyższą termoforezą niż białko w stanie natywnym lub całkowicie rozwiniętym. Te stany przejściowe oraz pośredni zostały wcześniej potwierdzone za pomocą pomiarów fluorescencji tryptofanu. Wyniki te dowodzą, że MST skutecznie odwzorowuje złożone mechanizmy rozwijania białek i stanowi atrakcyjną metodę do analizy denaturacji, szczególnie dzięki niskiej ilości wymaganych próbek i krótkim czasom pomiaru.

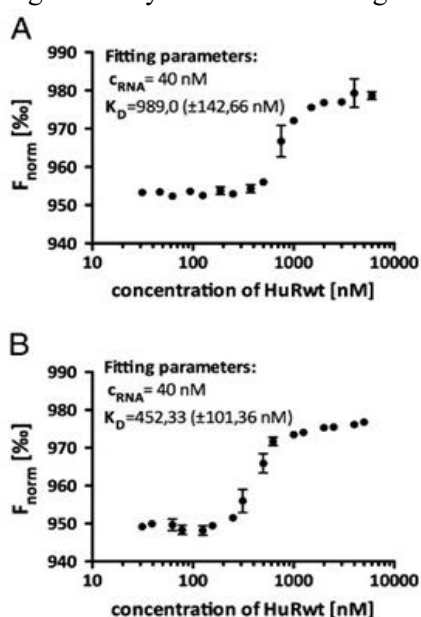
9.3 Zastosowania termoforezy mikroskalowej w badaniach oddziaływań białek z RNA

Początkowo uważano, że RNA pełni jedynie funkcję kodowania białek i wspomagania ich syntezy w rybosomach. Obecnie wiadomo, że RNA odgrywa znacznie szerszą rolę, regulując liczne procesy biologiczne i homeostatyczne. Ma również kluczowe znaczenie w wielu schorzeniach, infekcjach wirusowych oraz mutacjach w mRNA, które zaburzają proces splicingu i prowadzą do powstawania nieprawidłowych białek. Poniższy podrozdział przedstawia szerokie możliwości wykorzystania techniki MST w badaniach nad cząsteczkami RNA, ilustrując to na przykładach zastosowania termoforezy mikroskalowej do analizy interakcji RNA z białkami o różnorodnych funkcjach.

W pracy autorstwa Schulz, et al. (2013)³⁵⁸ użyto techniki MST w celu ilościowego określenia powinowactwa wiązania białka HuR typu dzikiego (HuRwt) oraz jego fosfomimetycznych wariantów do różnych klas motywów ARE w RNA. Białko HuR pełni istotną rolę w kontroli ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedzi na stres, różnicowanie komórek, proliferację oraz procesy nowotworowe. Wiąże się z sekwencjami bogatymi w adenozyne i urydynę (ARE) w regionie 3'UTR wielu mRNA, chroniąc je przed degradacją oraz wpływając na ich translację. Celem eksperymentu było porównanie w warunkach *in vitro* powinowactwa białka HuRwt do sekwencji typu I i II-ARE, jak również do motywu typu III-ARE, który jest bogaty w uracyl i występuje w 3' UTR docelowych mRNA dla białka HuR. W pierwszej serii eksperymentów badano specyficzność wiązania HuRwt do oligonukleotydów RNA o długości 21 nukleotydów, zawierających charakterystyczne sekwencje pentamerowe typowe dla motywów ARE typu I i II. Dodatkowo, testowano wiązanie HuRwt do oligonukleotydu RNA zawierającego sekwencję bogatą w uracyl (ang. *U-rich*) z 3' UTR genu Cox-2

(ang. *cyclooxygenase-2*), co odpowiada motywowi typu III-ARE. W każdej analizie stosowano 40 nM fluorescencyjnie znakowanych, jednoniciowych oligonukleotydów RNA, które inkubowano z różnymi stężeniami rekombinowanego białka HuRwt. Wyniki eksperymentów wykazały typową, sigmoidalną krzywą wiązania dla białka HuRwt z każdym z trzech typów motywów ARE, a wartości K_D znajdowały się w wysokim zakresie nanomolarnym, przy czym najwyższe powinowactwo odnotowano dla motywu typu II-ARE (Rys. 58). W kolejnej serii badań porównano wiązanie białka HuRwt do RNA z mutacjami w kluczowych miejscach sekwencji ARE. Wprowadzenie kilku mutacji punktowych do motywów typu II i III-ARE znacząco zaburzyło wiązanie HuR, co odzwierciedliło się spłaszczeniem krzywych wiązania oraz wzrostem wartości K_D powyżej 4000 nM. Z kolei mutacja w motywie typu I-ARE spowodowała umiarkowany spadek powinowactwa wiązania, co potwierdzają wartości K_D wynoszące 1690 ± 364 nM oraz zachowanie sigmoidalnej krzywej wiązania, wskazując, że zmiany w tej sekwencji nie wpływają tak znacząco na interakcję z białkiem HuR. Technika MST umożliwiła szczegółową analizę interakcji białek z różnymi typami motywów ARE w RNA, a wyniki te dostarczyły istotnych informacji na temat mechanizmów wiązania HuR do jego docelowych sekwencji w mRNA

W pracy autorstwa Schulz, et al. (2013)³⁵⁸ użyto techniki MST w celu ilościowego określenia powinowactwa wiązania białka HuR typu dzikiego (HuRwt) oraz jego fosfomimetycznych wariantów do różnych klas motywów ARE w RNA. Białko HuR pełni istotną rolę w kontroli ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedzi na stres, różnicowanie komórek, proliferację oraz procesy nowotworowe. Wiąże się z sekwencjami bogatymi w adenozyne i urydine (ARE) w regionie 3'UTR wielu mRNA, chroniąc je przed degradacją oraz wpływając na ich translację. Celem eksperymentu było porównanie w warunkach *in vitro* powinowactwa białka HuRwt do sekwencji typu I i II-ARE, jak również do motywu typu III-ARE, który jest bogaty w uracyl i występuje w 3' UTR docelowych mRNA dla białka HuR. W pierwszej serii eksperymentów badano specyficzność wiązania HuRwt do oligonukleotydów RNA o długości 21 nukleotydów, zawierających charakterystyczne sekwencje



pentamerowe typowe dla motywów ARE typu I i II. Dodatkowo, testowano wiązanie HuRwt do oligonukleotydu RNA zawierającego sekwencję bogatą w uracyl (ang. *U-rich*) z 3' UTR genu Cox-2 (ang. *cyclooxygenase-2*), co odpowiada motywowi typu III-ARE. W każdej analizie stosowano 40 nM fluorescencyjnie znakowanych, jednoniciowych oligonukleotydów RNA, które inkubowano z różnymi stężeniami rekombinowanego białka HuRwt. Wyniki eksperymentów wykazały typową, sigmoidalną krzywą wiązania dla białka HuRwt z każdym z trzech typów motywów ARE, a wartości K_D znajdowały się w wysokim zakresie nanomolarnym, przy czym najwyższe powinowactwo odnotowano dla motywu typu II-ARE (Rys. 58). W kolejnej serii badań porównano wiązanie białka HuRwt do RNA z mutacjami w kluczowych miejscach sekwencji ARE.

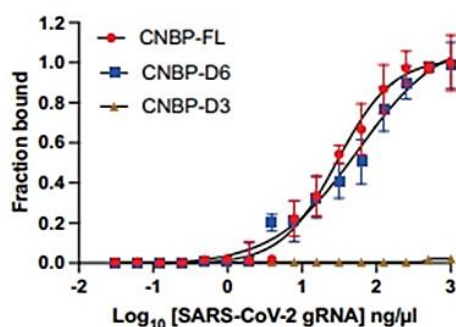
Rysunek 58 Powinowactwo wiązania dzikiego typu białka HuR do różnych typów elementów bogatych w AU (ARE), analizowane metodą mikroskalowej termoforezy (MST). Stałe stężenie (c_{RNA}) 40 nM znakowanego Dy647 jednoniciowego (ss)RNA inkubowano przez 30 minut w 25°C z rosnącymi ilościami HuR, od 31,1 nM do 5 μ M. Przedstawiono kinetykę wiązania dzikiego typu HuR z ssRNA-oligonukleotydami zawierającymi odpowiednio typ I-ARE (A), typ II-ARE (B) oraz typ III-ARE. Rysunek zapożyczony z pracy Schulz et al.³⁵⁸

Wprowadzenie kilku mutacji punktowych do motywów typu II i III-ARE znacząco zaburzyło wiązanie HuR, co odzwierciedliło się spłaszczeniem krzywych wiązania oraz wzrostem wartości K_D powyżej 4000 nM. Z kolei mutacja w motywie typu I-ARE spowodowała umiarkowany spadek powinowactwa wiązania, co potwierdzają wartości K_D wynoszące 1690 ± 364 nM oraz zachowanie sigmoidalnej krzywej wiązania, wskazując, że zmiany w tej sekwencji nie wpływają tak znacząco na interakcję z białkiem HuR. Technika MST umożliwiła szczegółową analizę interakcji białek z różnymi typami motywów ARE w RNA, a wyniki te dostarczyły istotnych informacji na temat mechanizmów wiązania HuR do jego docelowych sekwencji w mRNA.

W pracy Moon i współpracowników (2018)³⁵⁹ wykorzystano technikę MST do badania interakcji pomiędzy fragmentami RNA wirusa HIV-1 (ang. *HIV Rev response element*) a różnymi ligandami, w tym peptydem pochodzącym z białka Rev oraz neomycyną. W pierwszej części pracy skupiono się na badaniu kompleksu RNA-Rev, wykorzystując wyznakowany fluoresceiną peptyd Rev (Fl-Rev) oraz nieoznakowane RRE RNA. W eksperymentach zauważono, że wolny peptyd Fl-Rev migruje w kierunku wyższej temperatury, co odpowiadało ujemnemu efektowi termoforezy. Natomiast po związaniu z RRE RNA kompleks wykazywał dodatnią termoforezę, co umożliwiło jednoznaczne wykrycie procesu wiązania i określenie stałej dysocjacji K_D na poziomie 4,8 nM, a uzyskany wynik był zgodny z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Kolejnym etapem było zbadanie interakcji neomycyny z RRE RNA. Neomycyna, znana z właściwości wiązania do RNA i zdolności do wypierania peptydu Rev, została zastosowana do oceny bezpośredniego wiązania RRE RNA ze znacznikiem fluorescencyjnym DY647. Pomiary MST pozwoliły na obliczenie wartości K_D wynoszącej 1,5 μ M, co było zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi dotyczącymi fizjologicznie istotnych miejsc wiązania neomycyny. Dodatkowo, przeprowadzono eksperymenty wiązania kompetycyjnego, w których stopniowo zwiększano stężenie neomycyny w roztworach zawierających kompleks Fl-Rev i RRE RNA, obserwując wypieranie peptydu przez neomycynę. Wyniki te pozwoliły na określenie wartości K_D zarówno dla interakcji RNA-Rev, jak i RNA-neomycyna, co potwierdziło skuteczność MST w badaniach nad konkurencyjnym wiązaniem różnych ligandów. Dalsze badania w pracy skupiały się na analizie oddziaływania dwóch ryboprzełączników z bakteryjnym metabolitem preQ1 (ang. *pre-queuosine 1*). Oba ryboprzełączniki, choć strukturalnie podobne, wykazują różne mechanizmy regulacyjne: jeden reguluje biosyntezę preQ1 na poziomie transkrypcji, a drugi na poziomie translacji. Dzięki technice MST udało się zaobserwować różnice w zmianach konformacyjnych obu ryboprzełączników po związaniu z preQ1. Jeden z nich wykazywał ujemną termoforezę, podczas gdy drugi dodatnią, co wskazuje na odmienną struktur przestrzenną powstających kompleksów, mimo ich podobnej budowy początkowej. Wyniki te potwierdzają przydatność MST w badaniu złożonych interakcji RNA z małymi cząsteczkami i peptydami, co może mieć istotne znaczenie w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na specyficzne oddziaływania RNA-ligand.

Na zakończenie przedstawię zastosowanie techniki MST w badaniach podstawowych dotyczących globalnego zagrożenia, jakim są choroby zakaźne. Ukazuje to wszechstronne możliwości termoforezy mikroskalowej jako narzędzia biologii molekularnej również w walce z najgroźniejszymi patogenami. W przeprowadzonych eksperymentach z 2023 roku, autorzy Chen³⁶⁰ i współpracownicy badali zdolność białka CNBP (ang. *cellular nucleic acid-binding protein*) do wiązania RNA wirusa SARS-CoV-2 przy użyciu MST. CNBP to białko wiążące kwasy nukleinowe, a jego główną funkcją jest ich stabilizacja oraz regulacja ich metabolizmu. CNBP występuje w sześciu izoformach, które różnią się sekwencjami w regionach wiążących kwasy nukleinowe, co może wpływać na specyficzność ich oddziaływań z docelowymi RNA. Autorzy skupili się na zbadaniu, która z izoform ma największe powinowactwo do wirusowego RNA oraz jak różnice w budowie białka wpływają na jego aktywność przeciwwirusową. Najpierw autorzy użyli techniki RIP-qPCR (ang. *RNA immunoprecipitation coupled with quantitative PCR*) do wykazania, że izoformy CNBP 1–3 mają wyższe powinowactwo do wiązania RNA wirusa SARS-CoV-2, niż izoformy 4–6. Następnie, przeprowadzono analizy MST, aby dokładnie

zmierzyć powinowactwo białka CNBP i jego mutantów do RNA wirusa (Rys. 59). Użyto rekombinowanego białka CNBP o pełnej sekwencji oraz jego mutantów, które zostały fluorescencyjnie wyznakowane i inkubowane z różnymi stężeniami RNA wirusa SARS-CoV-2. Badania MST wykazały, że CNBP wiązało się z RNA wirusa SARS-CoV-2 z wartością K_D wynoszącą 29,66 nM. Mutant D6, który posiadał większość charakterystycznych dla CNBP domen, wykazywał podobne powinowactwo do białka o pełnej sekwencji. Natomiast mutant D3, który nie posiadał dwóch regionów, praktycznie nie wiązał się z wirusowym RNA, co potwierdziło kluczową rolę tych domen w wiązaniu RNA wirusa. W kolejnym etapie zaprojektowano małe peptydy, które naśladowały brakujące regiony białka CNBP. Peptydy te zostały sprzężone z sekwencją umożliwiającą ich transport do komórek, co pozwoliło na ocenę ich zdolności do inhibicji replikacji SARS-CoV-2. W testach przeprowadzonych na komórkach A549 wykazano, że obecność jednego z tych peptydów znacząco hamowała replikację SARS-CoV-2



z wartością EC_{50} wynoszącą 669 μM. Peptyd ten nie wykazywał jednak żadnego efektu przeciwwirusowego wobec wirusów RSV i SeV (ang. *sendai virus*), co sugeruje specyficzność działania wobec SARS-CoV-2. Przeprowadzone badania dowodzą, że zaprojektowane peptydy naśladowujące kluczowe regiony CNBP skutecznie hamowały replikację wirusa, co otworzyło nowe możliwości terapeutyczne w leczeniu infekcji SARS-CoV-2, a zdolność wiązania RNA przez CNBP koreluje z jego aktywnością przeciwwirusową.

Rysunek 59 Powinowactwo wiązania RNA przez pełnej długości CNBP oraz jego mutanty mierzone za pomocą testów MST. RNA genomu SARS-CoV-2 testowano z użyciem pełnej długości lub zmutowanego białka CNBP znakowanego REDTris-NTA. Rysunek zapożyczono z pracy Chen et al.³⁶⁰

Podsumowując, przedstawione przykłady zastosowań termoforezy mikroskalowej ukazują zarówno szerokie spektrum możliwych do analizy oddziaływań, jak i dużą elastyczność tej techniki. Dotychczas jednak interakcje pełnowymiarowych cząsteczek mRNA nie były badane za pomocą MST. W ramach prac badawczych opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej przeprowadziłem takie pomiary, których szczegółowe wyniki przedstawiono w rozdziale poświęconym badaniom własnym.

III. Badania własne

1. Cele i plan badań

Wykorzystanie cząsteczek mRNA jako narzędzi molekularnych wymaga modyfikacji ich naturalnej struktury, aby zapewnić optymalny efekt terapeutyczny. Działanie mRNA w organizmie człowieka opiera się na dynamicznej równowadze między translacją a degradacją, co pozwala utrzymać prawidłową homeostazę komórkową. Dlatego kluczowe jest opracowywanie metod wydłużających trwałość mRNA oraz sposobów oceny ich wpływu na funkcjonowanie organizmu.

Głównym celem realizowanego prze mnie wdrożeniowego projektu doktorskiego był kilkupoziomowy rozwój technologii wytwarzania oraz kontroli jakości preparatów mRNA w kontekście ich zastosowań terapeutycznych. Badania podzielono na trzy główne zadania. W pierwszym kroku opracowałem biofizyczną metodę oceny wpływu zastosowania różnych modyfikacji na końcu 5' RNA (analogów kapu RNA) na interakcje RNA z białkiem IFIT1, które to jest częścią ludzkiego wrodzonego układu odpornościowego. Struktura kapu 5' RNA pełni istotną rolę w ochronie cząsteczek mRNA przed degradacją. Odpowiednie modyfikacje tego regionu mogą wydłużyć okres półtrwania mRNA w komórce, co przekłada się na dłuższą translację i ostatecznie wyższą produkcję białek w porównaniu z mRNA posiadającym naturalny kap. Jednocześnie wprowadzenie do organizmów żywych syntetycznych cząsteczek może doprowadzić do reakcji immunologicznej i efektów ubocznych takiej kuracji. Dlatego poznanie konsekwencji związanych z wykorzystaniem modyfikowanych struktur końca 5' mRNA na funkcjonowanie systemów obronnych człowieka stanowi ważny aspekt rozwoju tych narzędzi molekularnych. Podstawą opracowania wspomnianej metody badawczej była technika termoforezy mikroskalowej (MST) opisana w części literaturowej. Stworzona przeze mnie metoda pozwoliła na precyzyjne określenie różnic w powinowactwie ludzkiego białka immunologicznego IFIT1 do ligandów RNA o zróżnicowanych strukturach końca 5', zarówno naturalnych, jak i syntetycznie modyfikowanych. Stanowi to pierwszy krok w kierunku oceny ryzyka związanego z zastosowaniem danego analogu czapeczki RNA w kontekście aktywacji interferonowej ścieżki odpowiedzi immunologicznej. Dotychczas opublikowane badania dotyczące IFIT1 koncentrowały się na kluczowej roli tego białka w odpowiedzi przeciwwirusowej. Dowiedziono, że IFIT1 wykazuje wysokie powinowactwo do RNA ze strukturą kap-0 (charakterystyczną dla wirusowego RNA), ze stałą dysocjacji K_D wynoszącą 4-23 nM oraz znacząco niższe powinowactwo do RNA ze strukturą kap-1 (ludzką strukturą 5' RNA), ze stałą K_D wynoszącą około 440 nM. Do przeprowadzenia powyższych badań wykorzystano metody półilościowe tj. EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*) oraz test wydłużania starterów (ang. *primer extension assay*), cechujących się niską rozdzielczością oraz wysokim zużyciem odczynników. Zastosowanie MST, jako metody badawczej umożliwiło mi dokładniejszy wgląd w specyfikę oddziaływań IFIT1-RNA i zdobycie wiedzy na temat oddziaływań wielu niezbadanych wcześniej ligandów. Opracowanie tej metody badawczej odbywało się w kilku etapach. Pracę rozpocząłem od zaprojektowania konstruktu genetycznego białka IFIT1, ekspresji oraz oczyszczanie tego białka rekombinowanego. Wyselekcjonowałem syntetyczne trinukleotydowe analogi kapu do badań, przeprowadziłem syntezę kapowanego RNA, wykonałem wstępne pomiary dla struktur referencyjnych oraz zoptymalizowałem sekwencję nukleotydową ligandów RNA. Następnie przeprowadziłem optymalizację metody pomiarowej poprzez: wybór buforu dla badanego układu, czasu inkubacji oraz stężeń ligandów, co umożliwiło powtarzalną obserwację tworzenia kompleksów molekularnych. Wybrane warunki umożliwiły pomiary powinowactwa biblioteki RNA zakończonych różnorodnymi analogami kapu do IFIT1. W skład badanych modyfikacji wchodziły 43 ligandy RNA, reprezentujące struktury końca 5' RNA naturalnie występując w organizmach żywych, jak i chemiczne modyfikacje zawierające dodatkowe podstawniki w pozycjach 2'- oraz N6-adenozyny, pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Wyniki przeprowadzonych badań doprowadziły do ujawnienia nowych

celów molekularnych białka IFIT1, a opracowaną metodę wdrożono w firmie Explorna Therapeutics, wykorzystując ją w charakterystyce syntetycznych analogów końca 5' mRNA.

Drugim podjętym w pracy wyzwaniem było udoskonalenie metody wykrywania immunogennych, dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) w preparatach mRNA. Molekuły dsRNA mogą powstawać, jako produkt uboczny w procesie syntezy mRNA i prowadzić do silnej odpowiedzi immunologicznej. Cząsteczki dsRNA wywołując stres komórkowy i hamują translację, dlatego też wykrywanie poziomów takich zanieczyszczeń w preparatach jest kluczowe. Metodę służącą do szacowania zawartości dsRNA oparłem o immunotest typu dot-blot, wykorzystujący chemiluminescencyjną detekcję specyficznych względem dsRNA przeciwciał. Początkowo skupiłem się na doborze techniki wykonania testu dot-blot oraz selekcji odpowiedniej kontroli pozytywnej w postaci handlowo dostępnych preparatów dsRNA. Następnie optymalizowałem warunki przygotowania próbek, czas inkubacji, ilość analizowanego materiału oraz dobór krzywej wzorcowej dla kontrolnego dsRNA. Ostatecznie metodę analizy dot-blot dsRNA wdrożono jako rutynową procedurę w firmie Explorna Therapeutics, wykorzystywaną do badania zanieczyszczeń dla każdej syntezy mRNA.

Ostatnim celem pracy było zbadanie wpływu modyfikacji strukturalnych ogona poli(A) na końcu 3' RNA na wybrane właściwości matryc DNA oraz kodujących je cząsteczek mRNA. W szczególności skupiłem się na zwiększeniu stabilności regionu sekwencji poli(A) na poziomie matryc DNA poprzez ograniczeniu jego skracania podczas amplifikacji wektorów plazmidowych w bakteriach. Dodatkowo, celem było poprawienie potencjału translacyjnego cząsteczek mRNA z wprowadzonymi modyfikacjami, szczególnie w kontekście ich zastosowań terapeutycznych. Ogon poli(A) odgrywa bardzo istotną rolę w ochronie cząsteczki przed degradacją oraz przyczynia się do prawidłowej i wydajnej translacji. Długość ogon poli(A), stanowiącego ciąg kilkudziesięciu do nawet kilkuset nukleotydów adeninowych stanowi punkt krytyczny prawidłowego funkcjonowania cząsteczki mRNA. Moim zadaniem było opracowanie modyfikacji sekwencji nukleotydowej ogona poli(A), umożliwiających uzyskiwanie ogonów poli(A) dłuższych niż ~100 adenozyń i nadających mRNA korzystne właściwości biologiczne. W tym celu zaprojektowałem zestaw modyfikacji nukleotydowych w obrębie struktury ogona poli(A), zawierających heteronukleotydowe linkery między fragmentami adeninowymi. Następnie, za pomocą metod klonowania na tępe końce, wprowadziłem zmodyfikowane sekwencje poli(A) do wektorów plazmidowych DNA kodujących geny reporterowe: lucyferazy, białka czerwonej fluorescencji mKate2 oraz erytropoetyny. Uzyskane matryce DNA wykorzystałem do syntezy cząsteczek mRNA, które poddano kilkustopniowej kontroli jakości. Wszystkie preparaty mRNA posłużyły do oceny poziomu ekspresji białek w porównaniu z cząsteczkami referencyjnymi zawierającymi naturalne lub komercyjnie wykorzystywane ogony poli(A). Aktywność biologiczną zmodyfikowanych mRNA testowano na czterech zróżnicowanych liniach komórkowych. Cząsteczki mRNA ze zmodyfikowanymi ogonami poli(A) wykazały istotnie wyższy poziom ekspresji białek reporterowych w porównaniu z mRNA zawierającymi naturalne ogony poli(A). Warianty ogona poli(A), które cechowały się najwyższym poziomem ekspresji białek w liniach komórkowych, poddano dalszym testom w modelu mysim. Jedna z modyfikacji, zawierająca linkery cytozynowe co 15 adenin, wykazała znacząco wyższy poziom ekspresji zarówno białka lucyferazy, jak i erytropoetyny w tym modelu. Uzyskane wyniki potwierdziły pozytywny wpływ wprowadzenia modyfikacji nukleotydowych do sekwencji ogona poli(A) na poziom produkcji białka z takich cząsteczek mRNA. Dodatkowo, wyniki uzyskane dla modyfikacji ogona poli(A) stały się podstawą do złożenia zgłoszenia patentowego (PCT/PL2024/050093).

2. Wybór układu pomiarowego i otrzymywanie reagentów do badań

Zastosowanie metody termoforezy mikroskalowej do badania powinowactwa wymaga obecności znacznika fluorescencyjnego w jednej z tworzących kompleks biomolekuł. Pomiar bezpośredniej interakcji białka z cząsteczką RNA zakładał wyznakowanie jednej z dwóch składowych kompleksu. Pierwszą możliwością było wyznakowanie małych cząsteczek RNA. Jednak dodanie dużego znacznika fluorescencyjnego do kilkudziesięcionukleotydowego ligandu mogłoby wpłynąć na oddziaływanie z białkiem, utrudniając prawidłową interakcję z kieszenią wiążącą. Wprowadzenie znacznika fluorescencyjnego do cząsteczki RNA mogłoby negatywnie wpłynąć na wydajność jej syntezy w procesie IVT, zwiększając zapotrzebowanie na trinukleotydowe analogi kapu. Ponadto, proces znakowania RNA jest pracochłonny i kosztowny, a dodatkowo wymaga miareczkowania ligandów za pomocą wzrastających stężeń białka, co wiąże się z istotnym ryzykiem agregacji. Drugą możliwością było wyznakowanie białka, które można przeprowadzić na kilka sposobów. Jednym z nich jest kowalencyjne przyłączenie barwnika do reszt lizyny obecnych w białku. Taki rodzaj znakowania może jednak wpływać na konformację białka, co jest szczególnie niekorzystne w przypadku reszt lizyny znajdujących się w obrębie kieszeni wiążącej białka. Innym sposobem, który wykorzystałem w swoich badaniach polega na związaniu barwnika z polihistydynową sekwencją (His-Tag) rekombinowanego białka na jednym z jego końców. Zastosowanie IFIT1 z histydynową metką na N-końcu pozwoliło na wydajne znakowanie fluorescencyjne białka.

Opracowanie metody badania oddziaływań między IFIT1 a RNA wymagało stworzenia procedury umożliwiającej efektywne pozyskiwanie zarówno rekombinowanego białka IFIT1, jak i ligandów RNA o odpowiednio wysokiej czystości. W celu pozyskania białka IFIT1 wykorzystałem wektor plazmidowy kodujący konstrukt pET28a_6xHis_IFIT1 przeznaczony do ekspresji w prokariotycznym systemie opartym na *Escherichia coli*. Po ekspresji w bakteriach, białko oczyściłem metodami chromatograficznymi wykorzystując chromatografię powinowactwa, kolumnę heparynową oraz sączenie molekularne. Do określenia powinowactwa potrzebne były również odpowiednie ligandy, dlatego pierwszym etapem mojej pracy było przygotowanie kapowanych cząsteczek RNA, które pełniły tę funkcję. W tym celu zamówiłem oligonukleotydowe sekwencje DNA, które posłużyły za matryce do syntezy cząsteczek RNA w procesie IVT. Uzyskane w ten sposób preparaty były następnie poddawane oczyszczaniu z wykorzystaniem złoża krzemionkowych, enzymatycznego wytrawiania niekapowanego RNA oraz metody chromatografii HPLC, co dokładniej przedstawiam w następnym podrozdziale.

3. Synteza kapowanych cząsteczek RNA

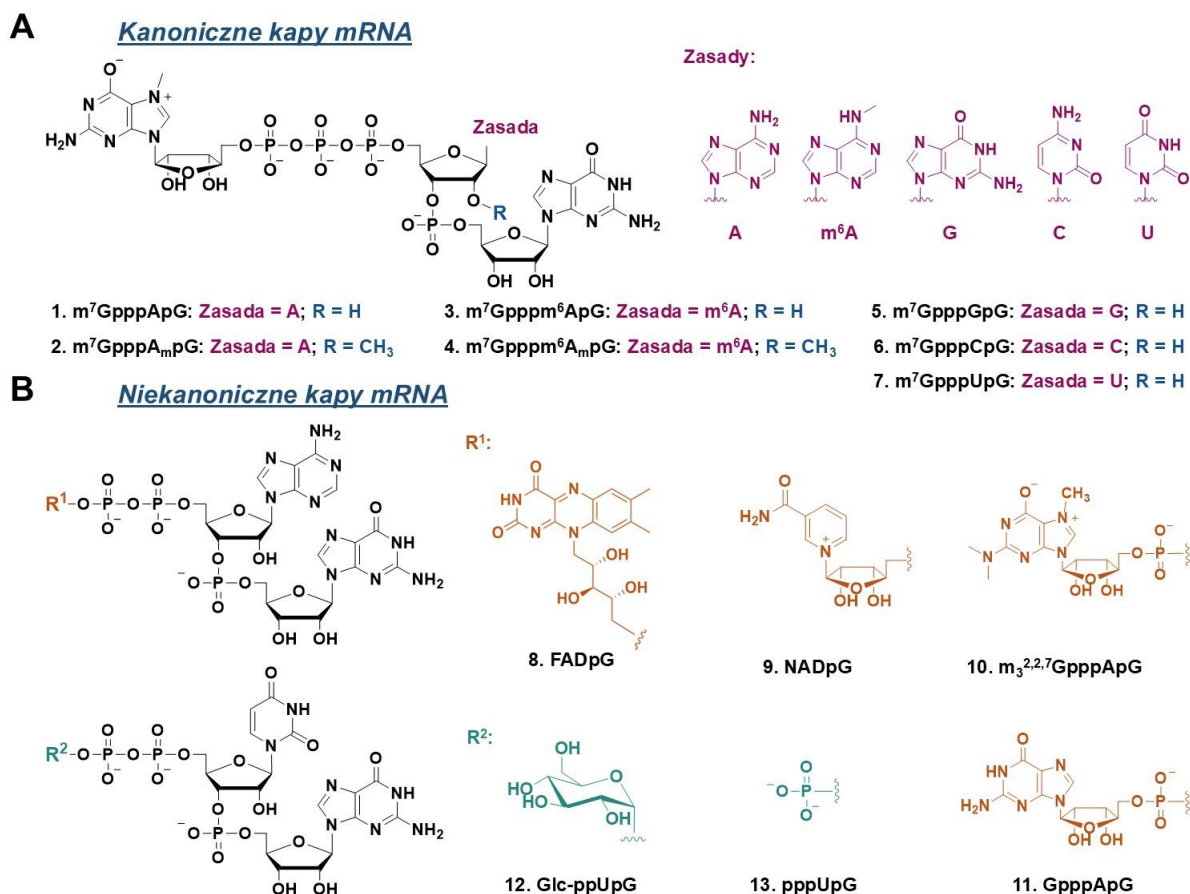
Otrzymanie ligandów RNA posiadających zróżnicowane modyfikacje 5' RNA było możliwe dzięki wykorzystaniu inicjatorów transkrypcji w postaci trinukleotydowych analogów kapu. Syntezy chemiczne zostały przeprowadzone przez koleżanki oraz kolegów z Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT, w tym dr Marcina Warmińskiego, dr Anais Depaix, mgr Katarzynę Grab, mgr Kamila Ziemkiewicza oraz pracowników firmy Explorna Therapeutics. Aby uzyskać wysokiej jakości ligandy, przygotowanie wszystkich kapowanych cząsteczek RNA przeprowadziłem w dwuetapowym procesie. W pierwszym etapie zsyntezowałem RNA metodą transkrypcji *in vitro* (IVT), wykorzystując trinukleotydowe analogi kapu, syntetyczną matrycę DNA, trifosforany nukleozydów oraz inne niezbędne składniki opisane w części eksperymentalnej. W wyniku tego procesu, oprócz cząsteczek RNA z pożądaną modyfikacją na końcu 5', powstawały również produkty uboczne w postaci RNA niezakończonego kapem (tzw. niekapowanego RNA), zawierającego na końcu 5'-trifosforan. Obecność niekapowanego RNA w finalnych preparatach ligandów mogłaby prowadzić do zakłóceń w obserwowanym powinowactwie do białka IFIT1. Struktura trifosforanowa na 5' końcu (ppp), charakterystyczna dla niektórych egzogennych cząsteczek RNA, takich jak te wykorzystywane przez

wirusy, może być rozpoznawana i wiązana przez białko IFIT1. Występowanie heterogennej mieszaniny RNA zawierającej zarówno RNA ze zmodyfikowanym końcem 5' jak i niekapowane RNA uniemożliwiłoby przeprowadzenie wiarygodnych pomiarów i wyciągnięcie prawidłowych wniosków. Z tych powodów drugi etap przygotowania kapowanych cząsteczek RNA polegał na dwustopniowym, enzymatycznym usunięciu niekapowanych molekuł z preparatów RNA. W pierwszej reakcji wykorzystano enzym polifosfatazę 5' RNA, który wytrawia grupy fosforanowe γ i β z 5'-trifosforylowanego RNA, pozostawiając monofosforan na końcu 5'. W drugim etapie, 5'-monofosforylowane RNA zostało poddane degradacji przez enzym Xrn-1, będący wysoce procesywną 5'→3' egzorybonukleazą. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznych, RNA oczyszczono przy użyciu handlowo dostępnych zestawów do oczyszczania kwasów nukleinowych. Ostatecznie oczekiwany produkt RNA został oddzielony od zanieczyszczeń za pomocą chromatografii RP-HPLC (ang. *reversed phase high-performance liquid chromatography*).

3.1 Kanoniczne analogi końca 5' RNA

W pierwszej kolejności jako ligandy w pomiarach MST użyłem RNA zawierające kanoniczne struktury kapu (tzw. kap-0 i kap-1). Z tego też powodu do badań przygotowano cząsteczki RNA posiadające strukturę kap-0 ($m^7GpppNpG$) na końcu 5' RNA, charakterystyczną dla wielu wirusów RNA. Wykorzystano wszystkie cztery analogi struktury kap-0, różniące się pierwszą transkrybowaną zasadą, otrzymując referencyjny wariant $m^7GpppApG$ zawierający adenozyne w pierwszej pozycji, wariant $m^7GpppGpG$ zawierający guanozyne, wariant $m^7GpppCpG$ zawierający cytozynę oraz $m^7GpppUpG$, w której skład wchodzi urydyna. Dodatkową referencję stanowił występujący najczęściej w ludzkich RNA analog kap-1 ($m^7GpppA_{mp}G$), posiadający metylację w pozycji 2'-*O* pierwszej transkrybowanej zasady. Przygotowano również inne warianty umożliwiające ocenę wpływu metylacji pierwszej transkrybowanej zasady analogu kapu na oddziaływanie z IFIT1. W tym celu otrzymano molekuly RNA zawierające na końcu 5' wariant kap-0 z metylacją w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej zasady ($m^7Gppp^{m6}ApG$) oraz strukturę zawierającą metylację zarówno w pozycji 2'-*O*, jak i N6 w pierwszej transkrybowanej zasadzie ($m^7Gppp^{m6}A_{mp}G$) (Rys. 60).

Do przeprowadzenia syntezy powyższych 7 wariantów kapowanych RNA w procesie IVT wykorzystałem sekwencję promotora T7 $\Phi 6.5$ (TAATACGACTCACTATAGGG) zawartą na syntetycznej matrycy kodującej 5'UTR oraz początek sekwencji kodującej ludzkiej beta globiny (HBB). Warunki IVT dla określonych analogów zostały odpowiednio zbalansowane w celu zapewnienia wysokiej wydajności włączania analogu na końcu 5' RNA (wydajność kapowania), opierając się na wcześniejszych badaniach.^{361,362} Optymalizacja polegała na odpowiednim doborze stosunku stężeń pomiędzy trinukleotydowym analogiem kapu, a guanozyno-5'-trifosforanem (GTP) wykorzystywanym do reakcji IVT. Dla analogów $m^7GpppApG$, $m^7GpppGpG$, $m^7GpppA_{mp}G$, $m^7Gppp^{m6}ApG$ i $m^7Gppp^{m6}A_{mp}G$ zastosowano 2.5 krotnie wyższe stężenie trinukleotydowego analogu kapu nad GTP, a dla wariantów $m^7GpppCpG$ i $m^7GpppUpG$ przygotowano 4 krotnie wyższe stężenie analogu kapu nad GTP. Te stosunki molowe kluczowych składników IVT umożliwiły uzyskanie wydajności reakcji IVT na poziomie około 2.5 – 3.2 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT oraz wydajność kapowania na poziomie powyżej 85% dla wszystkich badanych analogów. Po reakcji IVT preparaty RNA poddano dwustopniowemu trawieniu enzymatycznemu, degradując niekapowane RNA oraz oczyszczono za pomocą RP-HPLC wykorzystując kolumnę do oczyszczania oligonukleotydów (Phenomenex Clarity® 3 μM Oligo-RP), uzyskując produkty w postaci soli trietyloamoniowych. RNA następnie wytrącono solami sodowymi (3M NaOAc pH 5,2, izopropanol) i rozpuszczono w wodzie, uzyskując średnio około 8 – 10 nmoli końcowego produktu. Ilość ta była wystarczająca do przeprowadzenia kontroli jakości w postaci żelu poliakrylamidowego (przykładowy elektroforegram oraz profile HPLC przedstawiono dla modyfikacji 2'-adenozyne), jak również wykonania trzech niezależnych pomiarów interakcji z białkiem IFIT1.



Rysunek 60 Struktury kanonicznych i niekanonicznych kapów RNA badanych w tej pracy. Struktury A) kanonicznych oraz B) niekanonicznych analogów kapu RNA na końcu 5', używanych do przygotowania RNA metodą transkrypcji *in vitro*

3.2 Niekanoniczne analogi końca 5' RNA

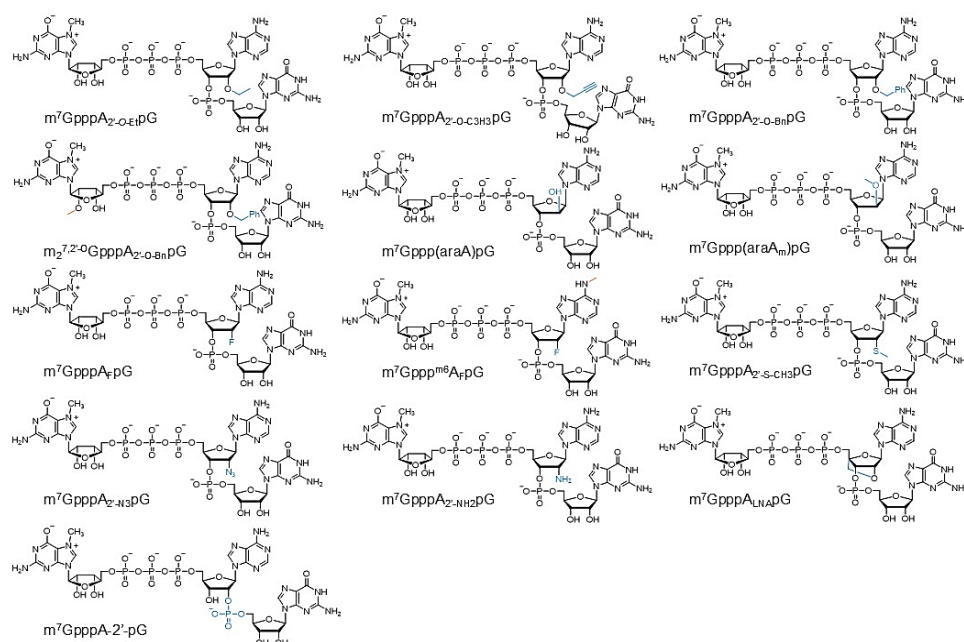
W celu pełniejszego zrozumienia wpływu różnorodnych modyfikacji czapeczki 5' RNA na oddziaływanie z IFIT1 przygotowano również cząsteczki RNA zawierające niekanoniczne struktury końca 5' RNA (Rys. 60). Zsyntezowano dwa warianty różniące poziom metylacji struktury 7-metylguanozyny, w tym: modyfikację pozbawioną metylacji (GpppApG), która jest związana z nieprawidłowym procesem inicjacji translacji oraz wersję trimetylowaną (m₃^{2,2,7}GpppApG, skrótowno nazywaną TMG) obecną w snRNA, ale występującą również na niektórych RNA HIV-1 zależnych od Rev/RRE.³⁶³ Kolejne warianty RNA posiadały na końcu 5' dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), występujący na części RNA wielu organizmów oraz dinukleotyd flawino-adeninowy (FAD), który został niedawno zidentyfikowany jako główna cząsteczka modyfikująca koniec 5' HCV RNA.³⁶⁴ Otrzymano również RNA zakończone nukleotydocukrem (Glc-ppUpG), jak również odpowiadającą mu wersję niekapowanego RNA z urydynam w pierwszej transkrybowanej pozycji (pppUpG) (Rys. 60).

Do syntezy 6 powyższych wariantów niekanonicznych, kapowanych RNA wykorzystałem analogiczną procedurę do przedstawionej dla kanonicznych wariantów, zwiększając jedynie stężenie molowe analogów kapów do 4-krotnego nadmiaru względem stężeń GTP w procesie IVT, co umożliwiło utrzymanie wysokiej wydajności kapowania RNA. Zastosowanie wyższych stężeń analogów kapu względem GTP umożliwiło utrzymanie wydajności reakcji IVT na akceptowalnym poziomie około 2–2.5 µg RNA/ 1 µl reakcji IVT oraz zachowanie odpowiedniego stopnia kapowania, który pozostał na poziomie około 85% dla wszystkich badanych analogów. Po reakcji IVT preparaty RNA poddano

dwustopniowemu trawieniu enzymatycznemu, degradując niekapowane RNA oraz oczyszczono za pomocą RP-HPLC, analogicznie jak dla kanonicznych analogów. Ostatecznie uzyskano średnio około 6 – 8 nmoli końcowego produktu. Taka ilość była wystarczająca do przeprowadzenia kontroli homogenności w postaci żelu poliakrylamidowego, jak również wykonania trzech niezależnych pomiarów interakcji z białkiem IFIT1.

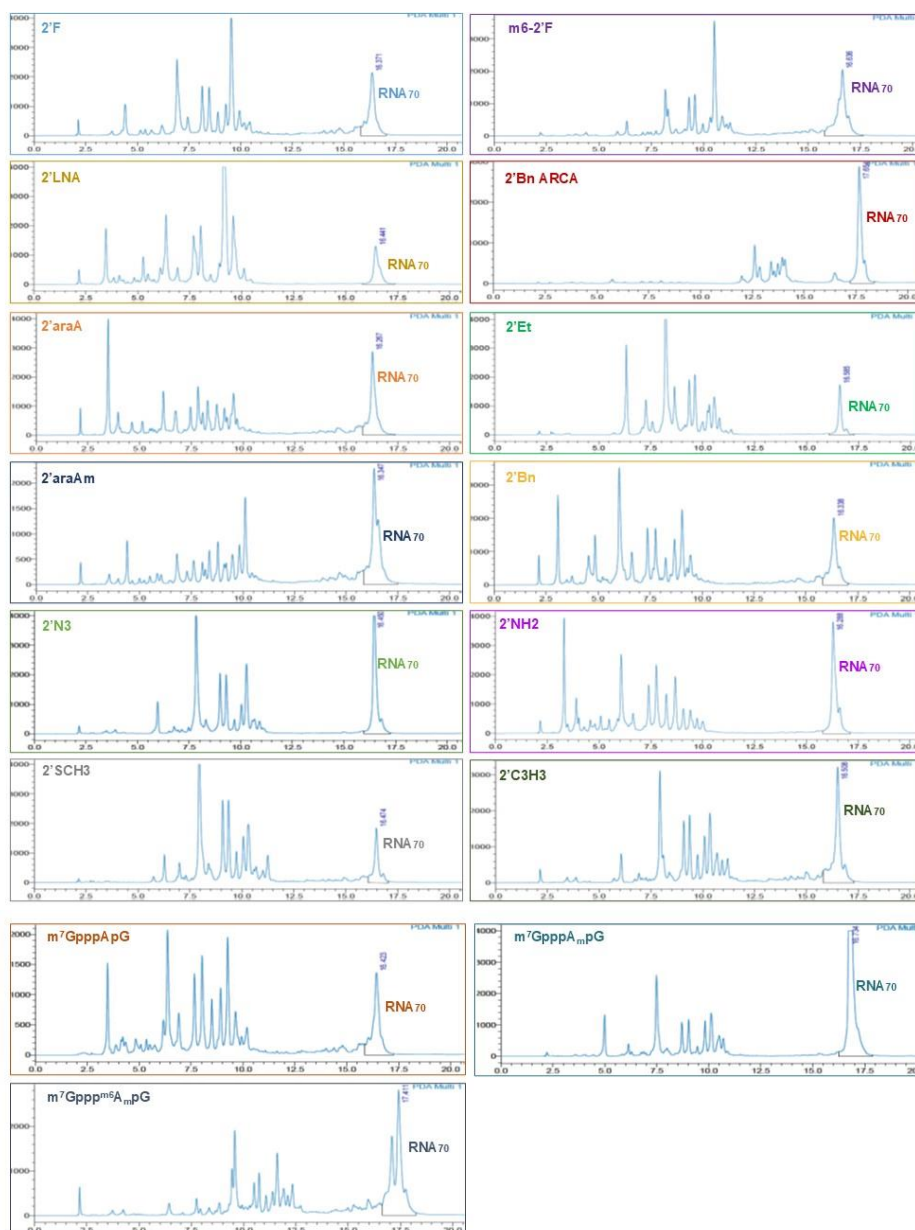
3.3 Modyfikacje w obrębie reszty 2'-adenozyny

Modyfikacje w pozycji 2' reszty cukrowej adenozyiny zwiększają chemiczną stabilność cząsteczek RNA oraz ich odporność na enzymatyczną degradację prowadzoną przez rybonukleazy. Z tego powodu wykorzystywane są często do tworzenia syntetycznych molekuł RNA o potencjale terapeutycznym. Dzięki współpracy z mgr Kamilem Ziemkiewiczem, który przeprowadził chemiczną syntezę zestawu zawierającego 13 trinukleotydowych analogów kapu 5' RNA z modyfikacjami w obrębie 2'-adenozyny, będącej pierwszym transkrybowanym nukleozydem ($m^7GpppA_{2'}-NpG$), możliwe było zbadanie powinowactwa tych struktur do IFIT1. Zestaw zawierał bardzo zróżnicowane podstawniki w pozycji 2'- obejmujące pojedyncze atomy, jak np. wariant zawierający fluor ($m^7GpppA_{2'}-FpG$) oraz 2'-F w połączeniu z dodatkową metylacją zasady azotowej w pozycji N6 ($m^7GpppA_{2'}-N^6-FpG$). Zbadano również warianty zawierające w pozycji 2': grupę *O*-etylową ($m^7GpppA_{2'}-O-EtPpG$), grupę *O*-(2-propynylową) ($m^7GpppA_{2'}-O-C_3H_3PpG$), grupę aminową ($m^7GpppA_{2'}-NH_2PpG$), grupę azydkową ($m^7GpppA_{2'}-N_3PpG$), grupę 2'-metanotiolową ($m^7GpppA_{2'}-S-CH_3PpG$), grupę *O*-benzylową ($m^7GpppA_{2'}-O-BnPpG$), jak również wariant benzylowy w wersji ARCA ($m_2^{7,2'-O}GpppA_{2'}-O-BnPpG$). Dodatkowo zestaw zawierał modyfikację: LNA (ang. *locked nucleic acid*) w pozycji 2'-*O* ($m^7GpppA_{2'}-LNApG$), grupę fosforanową tworzącą wiązanie 2',5'-fosfodiesterowe z kolejną zasadą ($m^7GpppA_{2'}-2'-pG$), jak również modyfikacje pentozy, polegające na zamianie rybozy na arabinozę w wariantach bez 2'-*O* metylacji ($m^7Gppp(araA)pG$) oraz z metylacją w pozycji 2'-*O* ($m^7Gppp(araA_m)pG$) (Rys. 61).



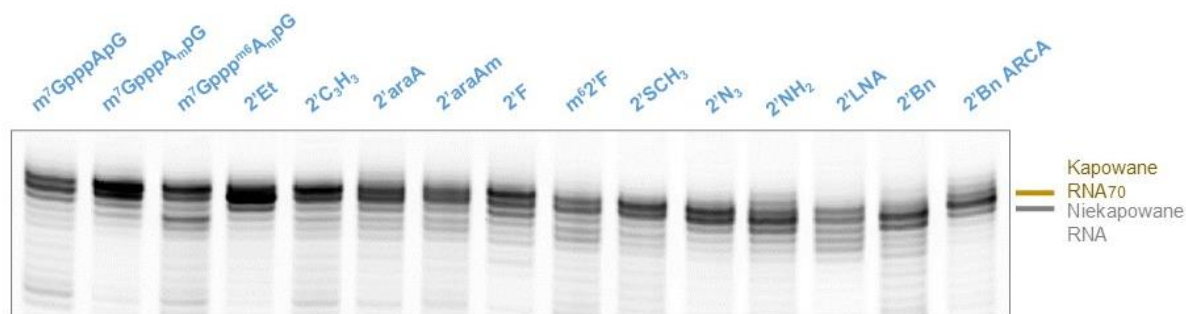
Rysunek 61 Struktury badanych w tej pracy kapów RNA z modyfikacjami w pozycji 2' pierwszej transkrybowanej zasady

Przeprowadziłem syntezę 13 wariantów RNA zawierających powyższe modyfikacje w obrębie pozycji 2' reszty cukrowej adenozyiny w sposób analogiczny do wyżej opisanej procedury dla kanonicznych RNA, stosując 4-krotny nadmiar trinukleotydowych analogów kapu względem GTP. Zastosowanie takich proporcji kluczowych składników IVT umożliwiło uzyskanie wydajności reakcji IVT na zadawalającym poziomie około 2.5 – 3.0 μg / 1 μl reakcji IVT oraz utrzymaniu stopnia kapowania, powyżej poziomu 85% dla wszystkich badanych analogów. Po reakcji IVT preparaty RNA poddano dwuetapowemu trawieniu enzymatycznemu, degradując niekapowane RNA oraz oczyszczono za pomocą RP-HPLC, analogicznie jak dla kanonicznych analogów. Ostatecznie uzyskano średnio około 8 – 10 nmoli końcowego produktu. Taka ilość była wystarczająca do przeprowadzenia kontroli jakości w postaci żelu poliakrylamidowego, jak również wykonania trzech niezależnych pomiarów interakcji z białkiem IFIT1. Profile HPLC uzyskane dla zestawu modyfikacji 2'-adenozyny przedstawiono poniżej (Rys. 62).



Rysunek 62. Chromatogramy HPLC przedstawiające profile czystości i integralności całego zestawu syntetyzowanych ligandów RNA zawierających różnorodne modyfikacje 2'-adenozyny.

Widoczne różnice w czasach retencji dla poszczególnych modyfikacji (Rys. 62) wskazują na wpływ zastosowanych analogów na właściwości fizykochemiczne RNA. Wszystkie próbki wykazywały wyraźny sygnał dla RNA₇₀, co potwierdzało efektywną syntezę oczekiwanego produktu oraz wysoką czystość końcowego RNA. Frakcje głównego pikę (RNA₇₀) zebrano, wytrącono i rozpuszczono w wodzie. Chromatogramy ujawniły również obecność zanieczyszczeń w postaci krótszych form RNA, powstałych podczas procesu IVT, które zostały w zdecydowanej większości usunięte dzięki zastosowaniu metody oczyszczania z wykorzystaniem HPLC. Dla finalnych próbek RNA przygotowano również żel poliakrylamidowy (Rys. 63).



Rysunek 63 Elektroforegram dla badanego zestawu ligandów RNA z modyfikacjami w pozycji 2'-adenozyny. Widoczne są odrębne pasma dla kapowanych i niekapowanych form RNA. Intensywne pasmo odpowiadające kapowanemu RNA₇₀ (kolor żółty) potwierdza wysoką efektywność reakcji IVT dla badanych modyfikacji, podczas gdy pasmo niekapowanego RNA (kolor szary), zlokalizowanego poniżej najintensywniejszego sygnału RNA₇₀, wskazuje na niewielką ilość produktu bez kapu. Widoczne są również krótsze formy RNA, które w śladowej ilości pozostały w preparatach.

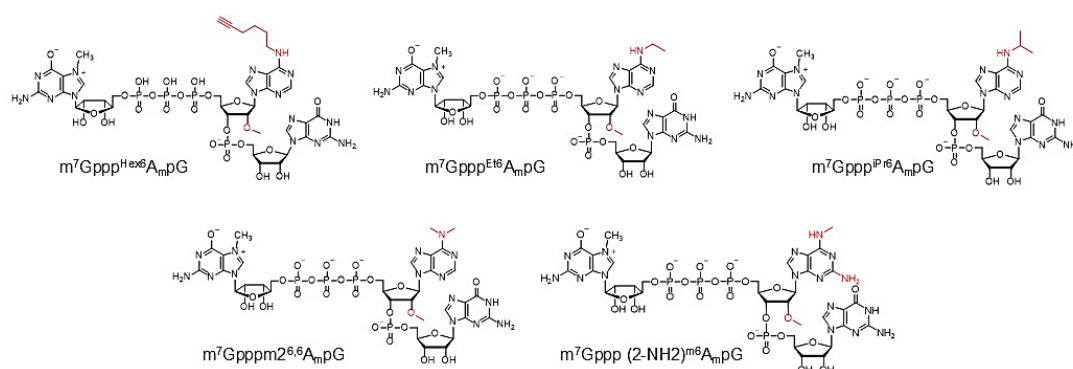
Przedstawiony elektroforegram (Rys. 63) wskazał na wysoką czystość wszystkich badanych wariantów RNA z modyfikacjami w pozycji 2' reszty cukrowej adenozy. Wyraźne pasma kapowanego RNA₇₀ świadczą o efektywności reakcji IVT oraz procesu wbudowywania modyfikowanych form kapu. Obecność słabszych pasm niekapowanego RNA poniżej głównego sygnału w niektórych próbkach może wynikać z różnic w wydajności reakcji IVT, potencjalnie związanych z właściwościami fizykochemicznymi modyfikacji. Analiza densytometryczna wykonana na podstawie elektroforegramu wskazała na ponad 85% zawartość frakcji kapowanej we wszystkich końcowych produktach RNA. Dla większości wariantów RNA odnotowano również krótsze formy RNA powstałe w trakcie IVT, które w nieznacznym ilości pozostały w finalnych preparatach. Wyniki te potwierdzają, że zastosowane modyfikacje nukleozydowe nie wpływają negatywnie na syntezę oraz kapowanie RNA, umożliwiając uzyskanie wysokiej jakości preparatów RNA, co czyni uzyskane końcowo produkty RNA odpowiednimi do dalszych zastosowań biofizycznych.

3.4 Modyfikacje N6-adenozyny

Modyfikacja N6-adenozyny (m⁶A) zaliczana jest do najczęściej występujących naturalnych modyfikacji mRNA, pełniąc bardzo ważną rolę w procesie regulacji translacji oraz degradacji cząsteczki RNA.¹⁶⁶ Zmiany konformacyjne molekuł RNA wywołane modyfikacjami m⁶A mogą wpływać na energię oddziaływania takiego RNA z białkami, jak i same właściwości biochemiczne cząsteczki. Współpraca z mgr Kamilem Ziemkiewiczem umożliwiła zbadanie zsyntezowanego przez Niego zestawu trinukleotydowych analogów kapu-1 RNA zawierających modyfikacje w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej adenozy. Zbiór składał się z 5 wariantów zawierających w pozycji N6: grupę etylową (m⁷Gppp^{Et6}AmpG), izopropylową (m⁷Gppp^{iPr6}AmpG), dimetylową (m⁷Gppp(m^{2,6}A_m)pG), grupę metylową w połączeniu z dodatkową grupą aminową w pozycji C2 zasady azotowej (m⁷Gppp(2-

NH₂)^{m6}A_mpG) oraz grupę 1-(heks-5-ynylową) (m⁷Gppp^{Hex6}A_mpG) (Rys. 64).

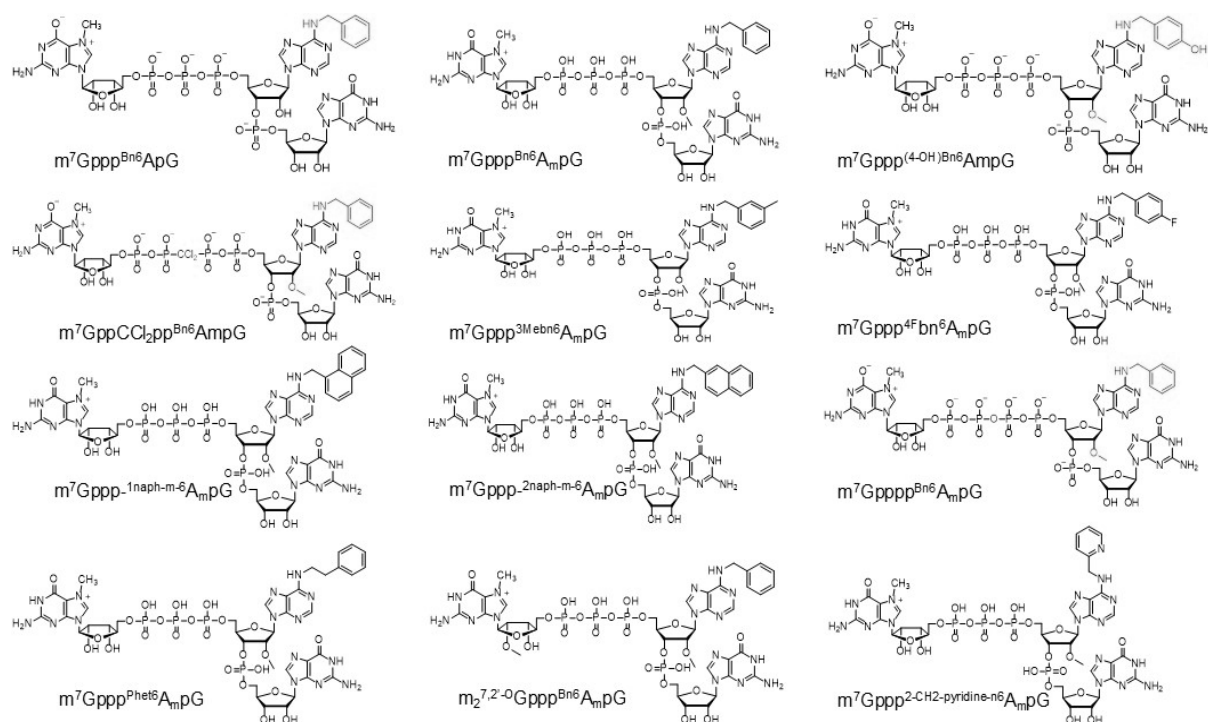
Łącznie otrzymałem 5 wariantów kapowanego RNA zawierającego powyższe modyfikacje w procesie IVT, stosując ponownie 4-krotnie wyższe stężenie molowe trinukleotydydowych analogów końca 5' RNA względem GTP. Uzyskane RNA poddano trawieniu enzymatycznemu oraz oczyszczaniu za pomocą RP-HPLC, analogicznie do powyższych zestawów. Zastosowanie 4-krotnego nadmiaru trinukleotydydowych analogów kapu względem GTP w reakcji IVT umożliwiło uzyskanie wydajności na zadawalającym poziomie około 2.5 – 3.0 µg / 1 µl reakcji IVT oraz frakcji kapowanego RNA powyżej poziomu 85% dla wszystkich badanych analogów. Po przeprowadzeniu reakcji IVT, preparaty RNA poddano dwustopniowemu trawieniu enzymatycznemu, które miało na celu degradację niekapowanego RNA, a następnie oczyszczono je za pomocą RP-HPLC, stosując tę samą metodę jak w przypadku kanonicznych analogów. W rezultacie uzyskano średnio około 8 – 10 nmoli produktu końcowego. Taka ilość była wystarczająca do przeprowadzenia kontroli jakości za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz wykonania trzech niezależnych pomiarów oddziaływania z białkiem IFIT1.



Rysunek 64 Struktury badanych w tej pracy kapów RNA z modyfikacjami w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej zasady

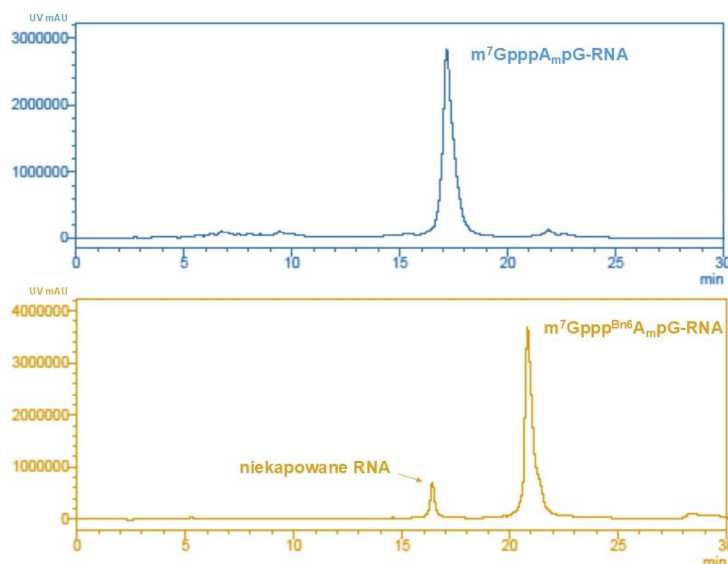
3.5 Aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny

Zastąpienie grupy N6-metyowej aromatycznym podstawnikiem benzylovym, prowadzące do uzyskania analogu kapu: m⁷Gppp^{Bn6}A_mpG¹⁶⁶ prowadzi do zmiany właściwości biochemicznych cząsteczek RNA obdarzonych taką modyfikacją. Badania ekspresji białek reporterowych prowadzone w hodowlach komórkowych (*in vitro*) i w modelach mysich (*in vivo*), wskazały na wysoki potencjał translacyjny cząsteczek RNA zakończonych analogiem m⁷Gppp^{Bn6}A_mpG względem struktur referencyjnych A_m oraz ^{m6}A_m. Obserwowany efekt w układach biologicznych oraz możliwa zwiększona odporność na demetylazę ^{m6}A świadczy o wysokim potencjale wykorzystania takich modyfikacji w kontekście terapeutycznego mRNA. Zespół chemiczny firmy Explora Therapeutics, dr Marcin Warmiński oraz mgr Kamil Ziemkiewicz przygotowali zestaw 13 trinukleotydydowych analogów kapu RNA zawierający aromatyczne podstawniki w pozycji N6-adenozyny, jako pierwszej transkrybowanej zasady. Podstawowymi modyfikacjami tego zbioru były: analog z grupą N6-benzylovą w wariacie kap-0 (m⁷Gppp^{Bn6}A_mpG) i kap-1 (m⁷Gppp^{Bn6}A_mpG). Zbadano również analogi posiadające: grupę N6 *p*-hydroksybenzylovą (m⁷Gppp^{(4-OH)Bn6}A_mpG), wersję z grupą N6 benzylovą w wersji ARCA (m₂^{7,2'}-O⁶Gppp^{Bn6}A_mpG), grupę N6 *m*-metylobenzylovą (m⁷Gppp^{3MeBn6}A_mpG), grupę N6 *p*-fluorobenzylovą (m⁷Gppp^{4FBn6}A_mpG), grupę N6 (1-naftylo)metylenową (m⁷Gppp^{1naph-m-6}A_mpG), grupę N6 (2-naftylo)metylenową (m⁷Gppp^{2naph-m-6}A_mpG), grupę N6 2-pirymidynometylenową (m⁷Gppp^{2-CH2-pyridine-n6}A_mpG), grupę N6 2-feniloetylovą (m⁷Gppp^{Phet6}A_mpG), analog zawierający modyfikację N6 benzylovą posiadający mostek tetrafosforanowy (m⁷Gpppp^{Bn6}A_mpG), jak również analog z grupą CCl₂ wewnątrz takiego mostka tetrafosforanowego (m⁷GppCCl₂pp^{Bn6}A_mpG) (Rys. 65).



Rysunek 65 Struktury badanych w tej pracy kapów RNA z modyfikacjami aromatycznymi w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej zasady

Używając powyższych trinukleotydowych analogów przeprowadziłem syntezę 13 kapowanych RNA zawierających aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny analogicznie do wariantów kanonicznych. Synteza ponownie polegała na przeprowadzeniu reakcji IVT z 4-krotnie wyższym stężeniem analogu kapu nad stężenie GTP. Dzięki zastosowaniu hydrofobowych podstawników w pozycji N6, różnice w czasach retencji pomiędzy niekapowanym RNA, a kapowanym RNA była wystarczająco duża, aby możliwa była skuteczna separacja tych populacji cząstek wyłącznie na podstawie rozdziału chromatograficznego RP-HPLC (Rys. 66). Umożliwiło to pominięcie etapu enzymatycznej degradacji niekapowanego RNA, ograniczając straty związane z tym procesem, jednocześnie wpływając na wyższe wydajności produkcji ligandów opartych o aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny. Zastosowanie 4-krotnego nadmiar trinukleotydowych analogów kapu względem GTP w reakcji IVT, analogicznie jak dla kanonicznych modyfikacji 5' RNA, umożliwiło uzyskanie wydajności syntezy na zadawalającym poziomie około 2.5 – 3.2 μg / 1 μl reakcji IVT oraz kapowania RNA > 85% dla wszystkich badanych analogów. Dzięki separacji kapowanego RNA na podstawie oczyszczania z użyciem HPLC, pomijając reakcje enzymatyczne, uzyskano średnio około 10 – 13 nmoli produktu końcowego. Taka ilość była ponownie wystarczająca do przeprowadzenia kontroli jakości za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz wykonania trzech niezależnych pomiarów interakcji RNA z białkiem IFIT1.



Rysunek 66 Profile HPLC dla ligandów RNA₇₀ z modyfikacjami 5' RNA: *m*⁷GpppAmpG (*kap-1*) – kolor niebieski, oraz *m*⁷Gppp^{Bn6}AmpG (aromatyczny podstawnik w pozycji N6) – kolor żółty. Różnica w czasie retencji głównych pików zawierających kapowane RNA dla przedstawionych modyfikacji jest znaczna (kilka minut). Wynika to z zastosowania hydrofobowego podstawnika w modyfikacji *m*⁷Gppp^{Bn6}AmpG, który wydłuża czas retencji RNA. Dzięki temu, na podstawie oczyszczania przy użyciu HPLC, możliwa jest separacja frakcji kapowanego i niekapowanego RNA dla modyfikacji zawierających podobne, hydrofobowe podstawniki.

4. Przygotowanie fluorescencyjnie znakowanego białka IFIT1

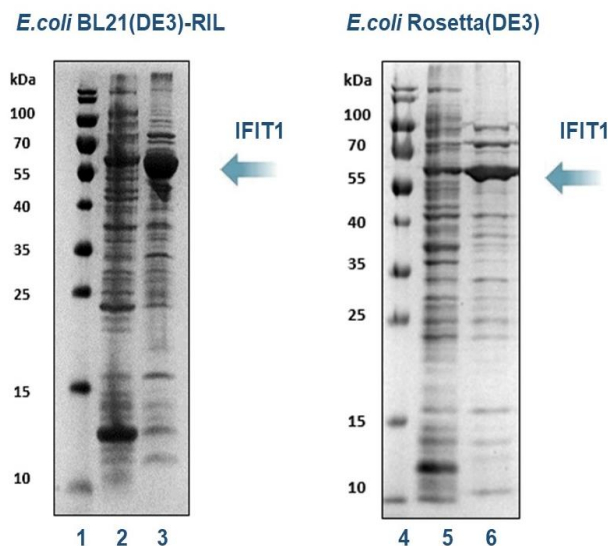
Wykonanie wiarygodnych pomiarów powinowactwa z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej w dużej mierze zależy od jakości preparatów białkowych użytych do badań. Dlatego też przygotowanie homogennych roztworów białek, pozbawionych agregatów i zanieczyszczeń niebiałkowych było szczególnie istotne. Budowa białka IFIT1 umożliwia wykorzystanie prostych i wydajnych systemów bakteryjnych do jego produkcji. Przekłada się to na niski koszt uzyskania, jednak wpływa na zawartość niepożądanych biomolekuł bakteryjnych w preparatach białka, które należy usunąć. Aby tego dokonać, szczególną uwagę poświęciłem doborowi szczepów bakteryjnych służących do ekspresji białek oraz zaprojektowałem proces kilkuetapowego oczyszczania białka IFIT1. Skupiłem się na usunięciu z preparatów zanieczyszczeń białkowych jak i bakteryjnych kwasów nukleinowych, mogących potencjalnie wpływać na oddziaływanie IFIT1 z RNA. Znakowanie fluorescencyjne przeprowadziłem wykorzystując zlokalizowaną na N-końcu IFIT1 metkę histydynową wiążącą w sposób specyficzny, handlowo dostępny barwnik RED-tris-NTA.

4.1 Ekspresja białka IFIT1

Do ekspresji IFIT1 wykorzystano wektor plazmidowy pET28a_IFIT1 zawierający sekwencję nukleotydową kodującą rekombinowane białko IFIT1 z N-końcową metką histydynową. Wektor pET28a_ dzięki swojej budowie (gen oporności na antybiotyk, operon laktozowy) umożliwia wydajną, indukowaną ekspresję różnorodnych białek w systemach bakteryjnych. W celu optymalizacji ekspresji IFIT1, transformowano plazmidem pET28_IFIT1 dwa różne szczepy bakterii *Escherichia coli* służące do ekspresji białek: BL21(DE3)-RIL oraz Rosetta(DE3), jak opisano w części eksperymentalnej. Następnie bakterie wysiano na płytki agarozowe z antybiotykiem (kanamycyna), inkubowano do momentu uzyskania pojedynczych kolonii bakteryjnych, które wykorzystano do inokulacji płynnych hodowli. Po osiągnięciu przez kultury bakteryjne odpowiedniej gęstości optycznej (OD~0.6), dodano roztwór analogu laktozy – IPTG (Izopropyl β-D-1-tiogalaktopiranozyd), indukując produkcję białka

IFIT1. Finalnie bakterie zwirowano i wykonano uproszczoną procedurę oczyszczania, po której zmierzono stężenia i nałożono równą objętość próbek dla obu testowanych szczepów na żel poliakrylamidowy (Rys. 67).

Szacowane stężenie białek w oczyszczonej próbce na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych na urządzeniu NanoDrop dla szczepu BL21(DE3)RIL wyniosło 0.91 mg/ml,



Rysunek 67 SDS-PAGE dla testowanego białka IFIT1. 1,4- marker białkowy (#26616(Thermo)), 2,5- IFIT1 lizat, 3,6- eluat IFIT1

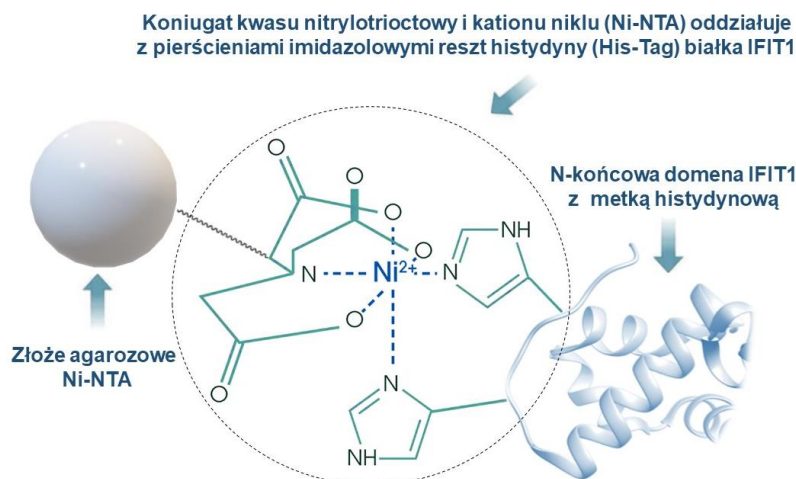
natomiast dla próbki uzyskanej ze szczepu Rosetta(DE3) 0.59 mg/ml. Analizując uzyskane elektroforegramy dla białek oczyszczonych z obu szczepów bakteryjnych (Rys. 67) odnotowano intensywny prążek na wysokości około 56 kDa, który odpowiada masie białka IFIT1. Intensywność sygnału pochodzącego od IFIT1 uzyskana dla szczepu BL21(DE3)-RIL była znacząco wyższa w porównaniu do szczepu Rosetta (DE3), co sugeruje bardziej wydajną produkcję tego białka w układzie indukowanej ekspresji opartym na BL21(DE3)-RIL. Na podstawie oszacowanych stężeń i zawartości pożądanego białka zdecydowano o wyborze szczepu BL21(DE3)-RIL do ekspresji na większą skalę. Bakterie tego szczepu, po transformacji plazmidem pET28a IFIT1, posłużyły do zaszczepienia

2000 ml płynnego medium hodowlanego LB. Jak opisano dokładniej w części eksperymentalnej, hodowlę prowadzono w temperaturze optymalnej dla wzrostu bakterii (37°C) do uzyskania gęstości optycznej OD~0.6, po czym temperaturę obniżono do 16°C i dodano induktor ekspresji (IPTG). Proces ekspresji białka prowadzony przez 16 godzin w niższej temperaturze spowolnił fałdowanie białek, co przyczyniło się do uzyskania białka rekombinowanego o mniejszej zawartości agregatów. Po zakończeniu ekspresji bakterie schłodzono i zwirowano, a powstały pelet bakteryjny, zawierający pożądaną białko, wykorzystano do dalszych etapów oczyszczania.

4.2 Oczyszczanie białka IFIT1

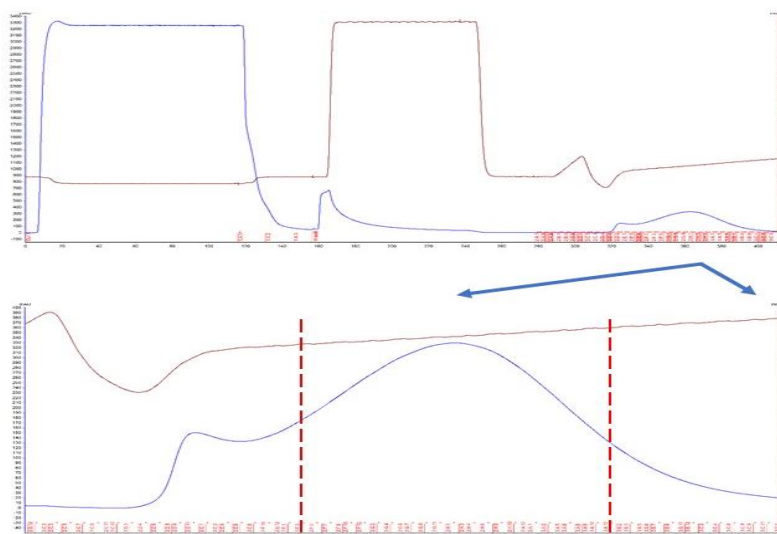
Proces oczyszczania IFIT1, który dokładnie opisałem w części eksperymentalnej, podzielono na trzy etapy zgodnie z wykorzystywanymi do tego celu metodami chromatograficznymi FPLC. W pierwszym kroku pelet bakteryjny rozpuszczono w buforze zawierającym między innymi lizozym, który umożliwił wstępną lizę błon komórkowych bakterii, jednocześnie utrzymując natywne warunki środowiskowe, niezbędne do zachowania prawidłowej struktury białek. Do mieszaniny dodano również cztery różne inhibitory proteaz, które miały za zadanie dezaktywować bakteryjne molekuly odpowiedzialne za degradację białek. Miało to na celu ochronę pożądanego białka przed bakteryjnymi systemami proteolitycznymi. Rozpuszczony pelet bakteryjny poddano działaniu ultradźwięków, co umożliwiło fragmentację błony komórkowej i uwolnienie zawartości komórki wraz z białkami. Następnie roztwór zwirowano, rozdzielając mieszaninę na frakcję nierozpuszczalną (osad) oraz frakcję rozpuszczalną (supernatant). Zastosowane warunki prowadzenia ekspresji, poparte wcześniejszymi badaniami nad tymi molekułami, umożliwiły lokalizowanie się znaczącej większości cząsteczek IFIT1 we frakcji rozpuszczalnej, co ułatwiło oczyszczanie i pozytywnie wpłynęło na wydajność tego procesu. Z tego powodu do dalszej preparatyki wykorzystano supernatant, który rozdzielono z wykorzystaniem kolumny do chromatografii powinowactwa ze złożem niklowym HisTrap FF (Cytiva) systemu IMAC

(ang. *immobilized metal affinity chromatography*). Zawarte w złożu jony niklu tworzące koniugaty Ni-NTA (kation niklu- kwas nitrylotrioctowy) umożliwiły specyficzne wiązanie rekombinowanego białka IFIT1 poprzez N-kończącą metkę histydynową (His-Tag). Proces ten opierał się o oddziaływanie kationów niklu z pierścieniami imidazolowymi reszt histydyny białka (Rys. 68).



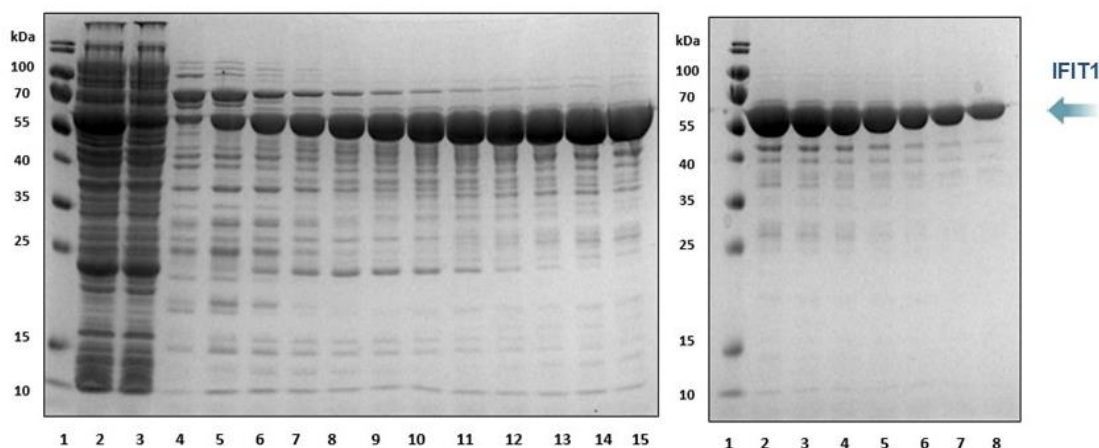
Rysunek 68. Schemat oddziaływania koniugatu Ni-NTA (kation niklu- kwas nitrylotrioctowy) z pierścieniem imidazolowymi reszt histydyny (His-Tag) białka IFIT1

Zastosowanie kolumny ze złożem niklowym umożliwiło wstępną izolację IFIT1 z mieszaniny różnorodnych białek wchodzących w skład supernatantu, zatrzymując białka z metką His-Tag w kolumnie i przepuszczając pozostałe molekuly pochodzenia bakteryjnego. W celu odzyskania związanych białek wykorzystano 300 mM roztwór imidazolu, który wykazując wyższe powinowactwo do kationów niklowych, wyparł grupy imidazolowe reszt histydyny do roztworu, umożliwiając elucję frakcji zawierających IFIT1. Uzyskane chromatogramy z procesu oczyszczania wykazały dwa piki po elucji na kolumnach HisTrap FF (Rys. 69). Aby potwierdzić obecność białka IFIT1 w głównym pikie (oznaczonym czerwonymi liniami przerywanymi), pobrano próbki z frakcji całego przebiegu elucji i przeprowadzono elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) (Rys. 70).



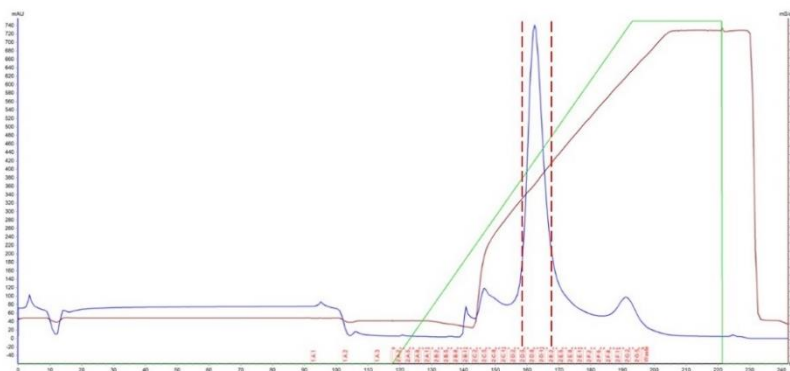
Rysunek 69. Chromatogram uzyskany po oczyszczaniu białka IFIT1 na kolumnie HisTrap® FF

Analiza elektroforegramu (Rys. 70) wykazała obecność intensywnych sygnałów białkowych dla frakcji z głównego pik, co świadczyło o ekspresji białka o masie około 56 kDa, odpowiadającej białku IFIT1. Frakcje eluowane wcześniej, niż główny pik zawierały inne białka o masach przekraczających 70 kDa. Próbkę z głównego pik połączono, uzyskując roztwór zawierający około 20 mg białka. Pomimo stosunkowo wysokiego odzysku białka po tym etapie, zastosowana metoda oczyszczania nie doprowadziła do pełnego rozdzielania różnych cząsteczek. Wszystkie frakcje zawierały zanieczyszczenia bakteryjne, które musiały zostać usunięte w kolejnych etapach oczyszczania.



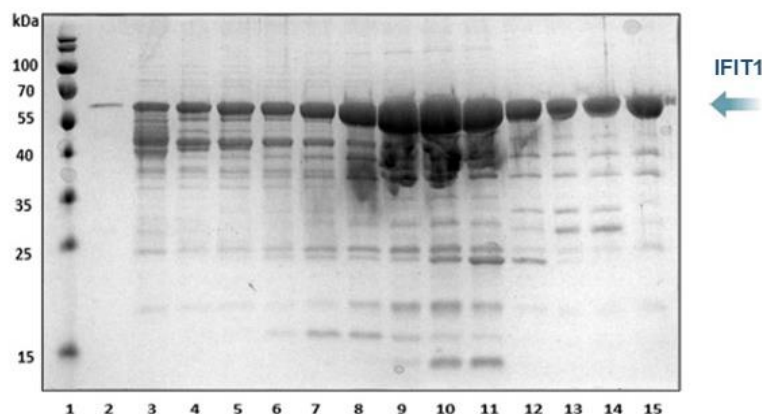
Rysunek 70. Elektroforegram dla kolejnych etapów oczyszczania białka IFIT1. 1- marker białkowy (#26616 (Thermo)), 2- supernatant po lizie, 3- frakcja niezwiązana do kolumny, 4-15 i 2-8 (drugi żel- kontynuacja pik) frakcje z całego przebiegu elucji

Kluczowym etapem oczyszczania białka IFIT1 było zastosowanie kolumny ze złożem heparynowym HiTrap® Heparin HP (Cytiva). Heparyna, będąca silnie usiarczanowanym glikozaminoglikanem, wykazuje zdolność wiązania biomolekuł charakteryzujących się wypadkowym ładunkiem dodatnim, co wynika z ich punktu izoelektrycznego przewyższającego pH stosowanego buforu. Mechanizm interakcji z białkami wiążącymi DNA/RNA opiera się na tym, że cząsteczki heparyny naśladują polianionową strukturę kwasu nukleinowego, wypierając go do roztworu. To wiązanie może zostać osłabione poprzez wzrost siły jonowej, co jest wykorzystywane podczas elucji białka. Frakcje IFIT1, zebrane po etapie chromatografii IMAC, nałożono na kolumnę HiTrap® Heparin HP, używając buforu o niskiej sile jonowej (100 mM NaCl). Pozwoliło to na usunięcie kwasów nukleinowych pochodzenia bakteryjnego, które mogły niespecyficznie wiązać się z IFIT1. Białko odzyskano z kolumny, stosując gradient stężenia NaCl, stopniowo zwiększając siłę jonową do poziomu 1000 mM, czyli dziesięciokrotnie wyższego niż na początku. Poniżej przedstawiono chromatogram z przebiegu oczyszczania (Rys. 71).



Rysunek 71. Chromatogram uzyskany po oczyszczaniu białka IFIT1 na kolumnie HiTrap® Heparin HP

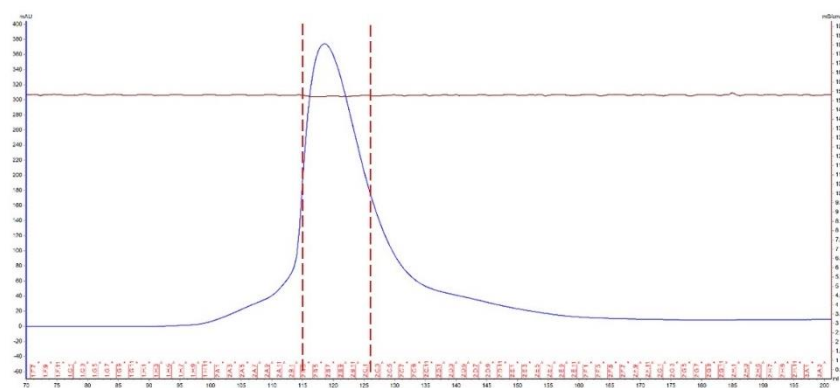
Uzyskany chromatogram (Rys. 71) ukazał dominujący główny pik (oznaczony czerwonymi liniami przerywanymi), zawierający pożądane białko oraz trzy mniejsze piki, pochodzące od zanieczyszczeń białkowych. Zieloną linią zaznaczono gradient stężeń, wskazujący na wzrost siły jonowej w zastosowanym układzie buforowym. Frakcje odpowiadające głównemu pikowi poddano analizie na żelu poliakrylamidowym przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE (Rys. 72).



Rysunek 72. Elektroforegram dla białka IFIT1 po oczyszczaniu na kolumnie HiTrapHeparin. 1- marker białkowy (#26610 (Thermo)), 2- 15 kolejne frakcje etapu elucji

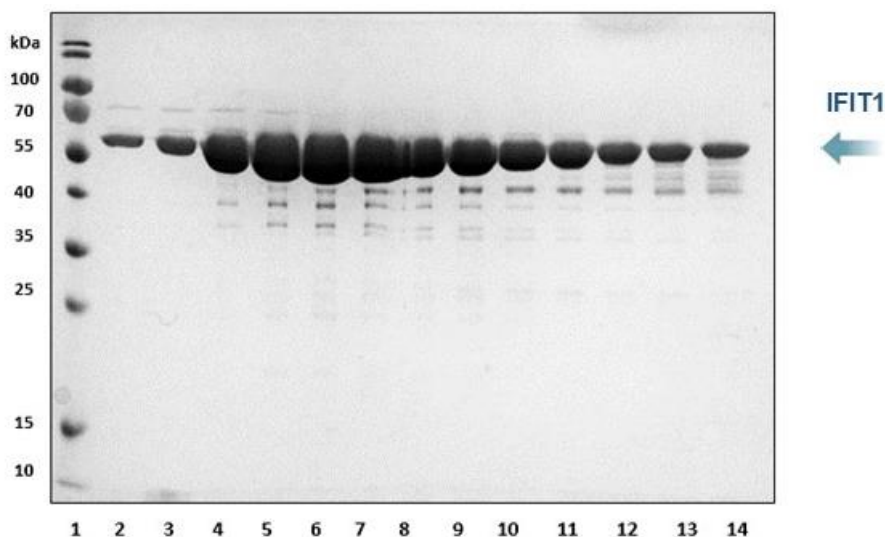
Analizując elektroforegram (Rys. 72) odnotowano wyraźne sygnały na wysokości około 56 kDa pochodzące od białka IFIT1. Za pozostałe prążki odpowiedzialne były zanieczyszczenia białkowe nadal obecne w preparatach. Frakcje pików głównego połączono, a następnie zatężono roztwór białka z wykorzystaniem filtrów wirowniczych uzyskując stężenie około 2.5 mg/ml.

Finalnym etapem oczyszczania było zastosowanie kolumny do filtracji żelowej HiLoad Superdex 26/600 75 pg, służącej do rozdzielania białek na podstawie ich właściwości hydrodynamicznych, w szczególności rozmiaru. Złoże Superdex składa się z porowatych ziaren kompozytu agarozowo-dekstranowego o kontrolowanych wymiarach molekularnych i wąskim zakresie rozmiarów porów. Gdy roztwór białek zawierający cząsteczki o różnych rozmiarach przepuszczany jest przez kolumnę, większe makromolekuły, które nie mieszczą się w porach żelu, przemieszczają się szybciej omijając je. Mniejsze cząsteczki, które wnikają w pory medium filtracyjnego, przez co poruszają się wolniej względem kolumny. W efekcie białka eluowane są w kolejności od największych do najmniejszych cząsteczek. Jakość rozdzielania zależy od objętości nakładanej próbki, która nie powinna przekraczać 3 – 5 % wewnętrznej objętości kolumny. W przypadku białka IFIT1, zatężone frakcje ($V = 8$ ml) zostały nałożone na kolumnę HiLoad Superdex 26/600 75 pg ($V_{\text{martwa}} = 320$ ml). Poniżej przedstawiono chromatogram z przebiegu oczyszczania (Rys. 73).



Rysunek 73 Chromatogram uzyskany po oczyszczaniu białka IFIT1 na kolumnie HiLoad 26/600 75 pg

Uzyskany chromatogram (Rys. 73) przedstawiał pojedynczy pik pochodzący od IFIT1. Analiza elektroforetyczna zebranych frakcji ukazała wyraźne sygnały na wysokości około 56 kDa odpowiadające masie białka IFIT1 (Rys. 74). Zgodnie z oczekiwaniami zastosowanie sączenia molekularnego umożliwiło znaczącą redukcję białek bakteryjnych w finalnych preparatach. Badane frakcje zawierające rekombinowane IFIT1 charakteryzowały się szacunkową czystością >95% (analiza densytometryczna) i akceptowalną zawartością zanieczyszczeń białkowych. Zebrane próbki połączono, dodano glicerol (10 %) pełniący rolę krioprotektanta i wykorzystując współczynnik ekstynkcji dla tego białka wynoszący $E_{280} = 53290$, określono stężenie. Uzyskano 11 mg czystego IFIT1, którego roztwór poporcjowano, zamrożono w ciekłym azocie (ang. *flash freeze*) i przechowywano w zamrażarce (-80 °C) do momentu pomiarów.



Rysunek 74 Elektroforegram dla białka IFIT1 po oczyszczaniu na kolumnie HiLoad 26/600 75 pg. 1- marker białkowy (#26616 (Thermo)), 2- 14- frakcje białka IFIT1 po filtracji żelowej

4.3 Identyfikacja białka IFIT1 metodą spektrometrii mas

W celu potwierdzenia obecności rekombinowanego białka IFIT1 w oczyszczonych preparatach białkowych, zamówiono zewnętrzną analizę identyfikacji białka MASCOT (IBB, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN) bazującą na metodzie spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*). Próbkę oczyszczonego białka w ilości 200 µg nałożono na żel poliakrylamidowy i przeprowadzono elektroforezę SDS-PAGE, analogicznie jak w trakcie oczyszczania. Następnie wycięto skalpelem prążek odpowiadający masą białku IFIT1 (~ 56 kDa) i oddano do analizy. Przygotowanie próbki do identyfikacji polegało na enzymatycznej fragmentacji łańcucha polipeptydu za pomocą trypsyny, do uzyskania peptydów o długości kilku do kilkunastu reszt aminokwasowych. Powstałe fragmenty były następnie analizowane za pomocą spektrometrii mas, a uzyskane wyniki porównano z bazą sekwencji genów NCBI. Powstałe dopasowanie przedstawiono w postaci dwukolorowej sekwencji aminokwasowej ludzkiego białka IFIT1 (Rys. 75). Na czarno przedstawiono sekwencję kodującą IFIT1 pochodzącą z bazy danych, na którą nałożono czerwonym kolorem fragmenty sekwencji potwierdzone za pomocą identyfikacji MS dla oczyszczonego przeze mnie białka IFIT1.

1	MSTNGDDHQV	KDSLEQLRCH	FTWELSIDDD	EMPDLENRVL	DQIEFLDTKY
51	SVGIHNLLAY	VKHLKGQNEE	ALKSLKEAEN	LMQEEHDNQA	NVRSLVTWGN
101	FAWMYYHMGR	LAEAQTYLDK	VENICKKLSN	PFRYRMECPE	IDCEEGWALL
151	KCGGKNYERA	KACFEKVLEV	DPENPESSAG	YAISAYRLDG	FKLATKNHKP
201	FSLPLRQAV	RLNPDNGYIK	VLLALKLQDE	GQEAEGEKYI	EEALANMSSQ
251	TYVFRYAARKF	YRRKGSVDKA	LELLKKALQE	TPTSVLLHHQ	IGLCYKAQMI
301	QIKEATKGQP	RGQNREKLDK	MIRSAIFHFE	SAVEKKPTFE	VAHLDLARMY
351	IEAGNHRKAE	ENFQKLLCMK	PVVEETMQDI	HFHYGRFQEF	QKKSDVNAII
401	HYLKAIKIEQ	ASLTRDKSIN	SLKKLVLRKL	RRKALDLESL	SLLGFVYKLE
451	GNMNEALEYY	ERALRLAADF	ENSVRQGP		

Rysunek 75 Analiza dopasowania sekwencji aminokwasowej białka IFIT1 (NCBI) do IFIT1, które zostało użyte w naszych badaniach. Peptydy zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas (MS) zostały oznaczone na czerwono. Stopień pokrycia wynosi 0,81

Obliczony stopień pokrycia sekwencji referencyjnej IFIT1 (baza NCBI) za pomocą zidentyfikowanych fragmentów wyniósł 81%, co pozwoliło z wysoką dozą pewnością stwierdzić, że oczyszczonym białkiem było ludzkie rekombinowane białko IFIT1. Powyższa analiza potwierdziła również zasadność wykorzystania uzyskanych preparatów IFIT1 do pomiarów powinowactwa metodą MST.

4.4 Fluorescencyjne znakowanie białka IFIT1

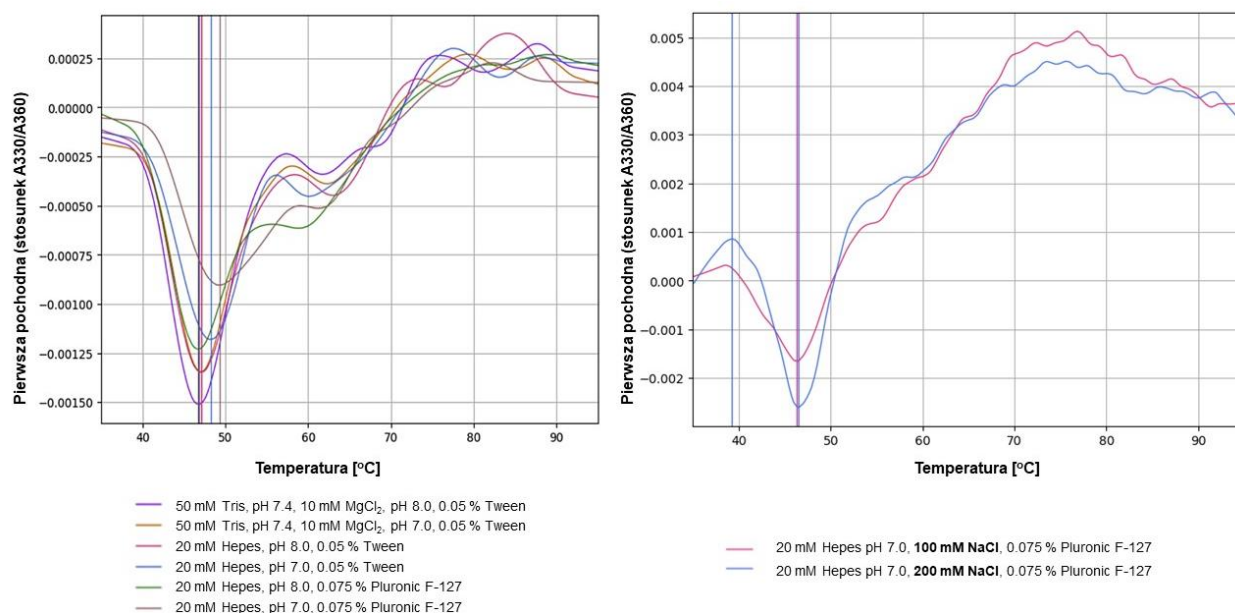
Ostatnim etapem przygotowania białka do badań z wykorzystaniem MST było jego fluorescencyjne znakowanie, które prowadzono za każdym razem bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiarów. Po rozmrożeniu próbki zawierającą IFIT1 wirowano, aby usunąć agregaty i rozcieńczano do stężenia 200 nM w buforze zawierającym detergent Pluronic-F, jak opisano w części eksperymentalnej. Do fluorescencyjnego znakowania wykorzystywano barwnik RED-tris-NTA (NT-647, Nano Temper Technologies), który dedykowany jest do białek posiadających His-Tag. Dzięki N-końcowej metce histydynowej IFIT1 możliwe było wykorzystanie tej wydajnej i szybkiej metody znakowania. Roztwór białka mieszano w stosunku molowym 1:1 z barwnikiem, a następnie inkubując przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed pomiarem roztwory znakowanego IFIT1 ponownie wirowano w celu usunięcia potencjalnych agregatów, które mogłyby uniemożliwić przeprowadzenie wiarygodnych pomiarów.

5. Badanie oddziaływania kapowanych cząstek RNA z IFIT1 metodą termoforezy mikroskalowej

5.1 Optymalizacja warunków pomiarowych

Projektując metodę badawczą, służącą do oceny wpływu modyfikacji RNA na mechanizm ludzkiej odpowiedzi wrodzonej, niezbędne było przeprowadzenie optymalizacji kluczowych warunków pomiarowych na wczesnym etapie badań. W kontekście pomiarów aktywności białek metodami biofizycznymi, prawidłowy dobór podstawowych parametrów takich jak zastosowany bufor, temperatura oraz czas inkubacji, bezpośrednio przekładają się na wiarygodność uzyskiwanych wyników. W celu określenia optymalnego buforu do badań aktywności białka IFIT1 wykonałem pomiary stabilności termicznej białka IFIT1 w buforach o różnym składzie. Pomiary stabilności białka wykonałem przy użyciu urządzenia Tycho NT.6 (Nanotemper), które służy do wyznaczania temperatur topnienia makromolekuł, bazując na metodzie różnicowej fluorymetrii skaningowej DSF (ang.

differential scanning fluorometry). DSF jest techniką stosowaną do oceny stabilności termicznej białek poprzez monitorowanie zmian ich struktury podczas stopniowego podgrzewania (temperatur topnienia- T_m ang. *melting temperature*) próbek w roztworach, ciałach stałych oraz fazach mieszanych. W moim przypadku do pomiarów przygotowałem roztwory IFIT1 o stężeniu $1,5 \mu\text{M}$ w trzech różnych buforach: I. bufor MST (50 mM Tris, pH 7,4, 10 mM MgCl_2) — rekomendowany przez Nanotemper do pomiarów MST, w dwóch wariantach różniących się użytym detergentem (0,05% Tween20 lub 0,075% Pluronic F-127); II. bufor HEPES o niższym pH (20 mM HEPES, pH 7,0); oraz III. bufor HEPES o wyższym pH (20 mM HEPES, pH 8,0). Bufory HEPES (II i III) również przygotowano w dwóch wariantach z różnymi detergentami (0,05% Tween20 lub 0,075% Pluronic F-127), co łącznie przełożyło się na 6 odmiennych warunków buforowych testowanych w eksperymencie. Pomiar przeprowadzono w szklanych kapilarach, które były kontrolowanie nagrzewane światłem lasera, co powodowało stopniowy wzrost temperatury próbki. Wynik przedstawiono jako wykres zależności absorbancji (A_{330}/A_{360}), mierzonej przy długościach fal 330 nm i 360 nm, w funkcji rosnącej temperatury, zaprezentowanej w postaci pierwszej pochodnej (Rys. 76).

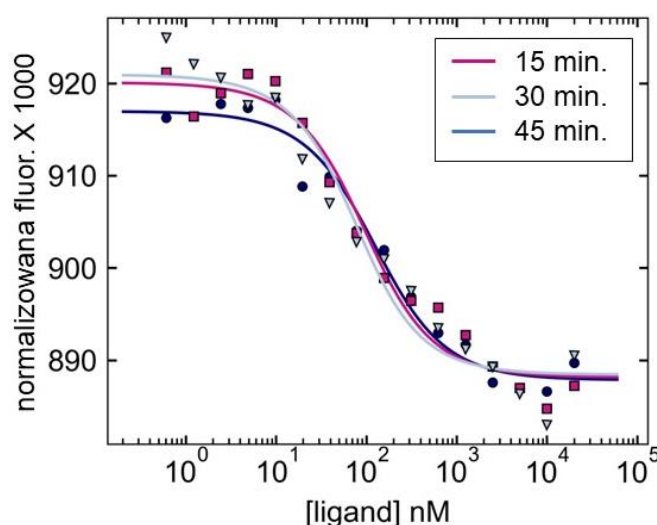


Rysunek 76 Pomiar różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSF) uzyskane dla białka IFIT1 w 6 odmiennych buforach (wykres po lewej) oraz pomiary DSF dla białka IFIT1 w buforze HEPES o różnej sile jonowej (wykres po prawej)

Na podstawie uzyskanych krzywych odnotowano znikome różnice w wyznaczonych temperaturach topnienia pomiędzy badanymi buforami. Dla wszystkich 6 warunków białko wykazało podobną T_m oscylującą w okolicy 47 – 48°C. Nieznacznie wyższe T_m uzyskano dla buforu HEPES w niższym pH, przy czym bufor 20 mM HEPES, pH 7,0, 0,075% Pluronic wykazał najwyższą temperaturę topnienia i to ten skład buforowy wybrałem do kolejnych badań. W drugim przeprowadzonym pomiarze chciałem określić wpływ siły jonowej (zawartości soli) na stabilność białka w wytypowanym buforze. W tym celu przygotowałem dwie próbki wybranego buforu różniące się stężeniem soli (100 mM NaCl oraz 200 mM NaCl). Temperatury topnienia wyznaczone dla obu próbek były niemal identyczne, dlatego też na podstawie uzyskanych krzywych nie stwierdzono istotnego wpływu testowanych stężeń soli na stabilność białka IFIT1, co umożliwiło wykorzystanie obu wariantów do badań stabilności kompleksów metodą MST. Przeprowadzono także test interakcji wolnego barwnika RED-tris-NTA z ligandem RNA, aby wykluczyć możliwość niespecyficznych oddziaływań między tymi cząsteczkami. Barwnik (10 nM) miareczkowano RNA typu kap-0 V5x3 (240 nt) przy maksymalnym stężeniu 20 μM .

W wyniku eksperymentu nie zaobserwowano zmian w profilu termoforezy przy żadnym stężeniu, a tym samym nie uzyskano krzywej ani wartości K_D . Wynik ten wskazuje na brak bezpośrednich interakcji między barwnikiem, a cząsteczkami RNA.

W kolejnym etapie optymalizacji określiłem czas inkubacji układu białko-ligand. Jest to bardzo istotny parametr ze względu na odmienną dynamikę tworzenia różnych kompleksów molekularnych, jak i na stabilność tworzących go cząsteczek w czasie pomiaru. Do określenia tego parametru wykorzystałem pomiary termoforezy mikroskalowej dla kompleksu IFIT1 z trinukleotydowym analogiem kap-0 ($m^7GpppApG$). Przygotowałem 16 roztworów ze stałym stężeniem IFIT1 (25 nM) oraz różnych stężeniach ligandu 0.3 nM – 10 μ M. Roztwory inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej w czasie 15, 30 i 45 minut, a następnie wykonano pomiary MST (Rys. 77). Już przy minimalnym okresie inkubacji, wynoszącym 15 minut, zaobserwowano pełne wysycenie białka oraz prawidłową krzywą wiązania kompleksu IFIT1- $m^7GpppApG$. Z tego powodu czas 15 minut uznano za wystarczający na utworzenie stabilnego kompleksu badanych molekuł (Rys. 77).



Rysunek 77. Krzywe wiązania kompleksu molekularnego między białkiem IFIT1 oraz trinukleotydowym analogiem kap-0 ($m^7GpppApG$). Roztwory o stałym stężeniu białka oraz rosnącym stężeniu liganda inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, w czasie 15, 30 oraz 60 minut. Krzywe zostały wyznaczone na podstawie wartości fluorescencji zarejestrowanych podczas fazy pomiaru T-Jump. Do punktów pomiarowych dopasowano model wiązania 1:1 przy użyciu programu Palmist.

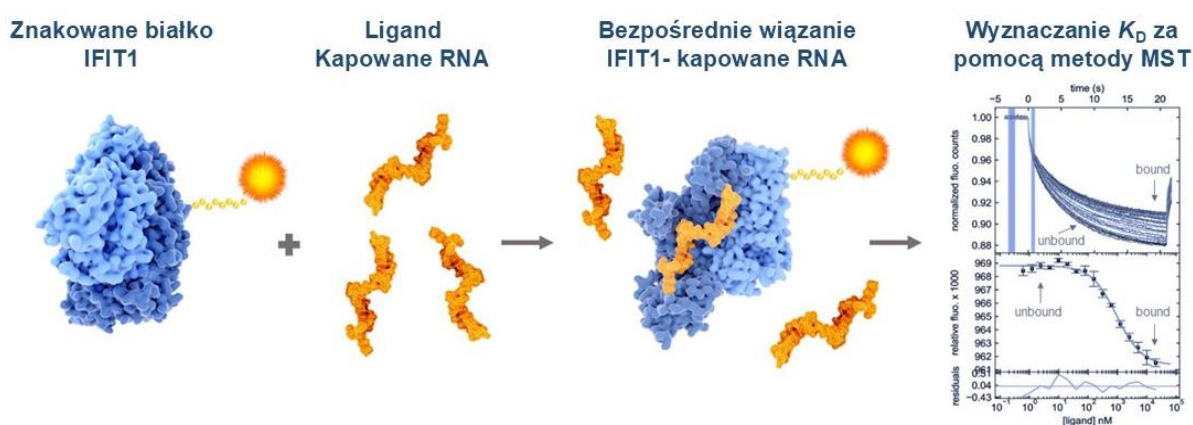
5.2 Optymalizacja sekwencji nukleotydowej ligandów RNA

Białko IFIT1 oddziałuje z cząsteczką kwasu nukleinowego poprzez kieszeń wiążącą, zdolną pomieścić do pięciu nukleotydów zlokalizowanych na 5' końcu RNA, co zostało omówione w części literaturowej. Cząsteczki RNA spontanicznie tworzą struktury drugorzędowe zależne od sekwencji nukleotydowej, które mogą wpływać na interakcje RNA z innymi biomolekułami. Z tego powodu dobór odpowiedniej sekwencji nukleotydowej liganda RNA jest kluczowy dla opracowania wiarygodnej metody oceny powinowactwa do IFIT1. Aby znaleźć odpowiedni model RNA do porównania wariantów kapu, przebadłem cztery różne sekwencje RNA jako ligandy dla białka IFIT1, w tym dwie sekwencje RNA o długości 35 nukleotydów (nt), różniące się strukturą drugorzędową, 70 nt fragment ludzkiego mRNA kodującego β -globinę oraz 240 nt mRNA kodujące tag V5x3 (Tabela 1, Rys. 79).³⁶⁵

Tabela 1. Sekwencje komplementarnych oligonukleotydów DNA dla modeli ligandów RNA (I-IV) użyte do optymalizacji pomiaru powinowactwa kompleksu IFIT1-RNA za pomocą metody MST.

	Sekwencja nukleotydowa
RNA I	GTGTAATACGACTCACTATAGGGACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAA
	TTGCTAGTGAACACAGTTGTGTCAGAAGCAAATGTCCCTATAGTGAGTCGTATTACAC
RNA II	GTGTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACATTGCTTCTGACACA
	TGTGTCAGAAGCAAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTACAC
RNA III	GTGTAATACGACTCACTATAGGGACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAAC
	CTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCT
RNA IV	AGGAGTCAGATGCACCATGGTGTCTGTTGAGGTTGCTAGTGAACACAGTTGTGTCAG
	AAGCAAATGTCCCTATAGTGAGTCGTATTACAC
RNA IV	GTGTAATACGACTCACTATAGGGGTACGCCACCATGGAAGGTAAGCCTATCCCTAACC
	CTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGGCAGCAGCGGCGGCAAACCGATTCCGAACCCGCT
RNA IV	GCTGGGCCTGGATAGCACCGGTAGCAGCGGCGGTAAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTC
	GGTCTCGATTCTACGGTTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
RNA IV	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	TTTGTGTTA
RNA IV	AACCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTATAGGATAGGCTTACCGCCGCTGCTA
	CCGGTGCTATCCAGGCCAGCAGCGGGTTCGGAATCGGTTTGCCGCCGCTGCTGCCCG
RNA IV	TAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTATAGGATAGGCTTACCTCCATGGTGGCGTACCC
	CTATAGTGAGTCGTATTACAC

Dla każdej z tych sekwencji cząsteczki RNA kapowane m⁷GpppApG (kap-0) lub m⁷GpppA_mpG (kap-1) zsyntetyzowano w reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT). Aby zapewnić wysoką czystość próbek RNA, niekapowane cząsteczki RNA zostały usunięte za pomocą trawienia enzymatycznego, a pozostały materiał oczyszczono metodą RP-HPLC, jak opisano w części eksperymentalnej. Następnie fluorescencyjnie znakowane IFIT1 mieszało z ligandami RNA dla każdego z badanych modeli sekwencji, inkubowano bez dostępu światła i analizowano metodą MST, schemat eksperymentu przedstawiono poniżej (Rys. 78).



Rysunek 78 Schemat postępowania w celu określenia wartości K_D dla interakcji IFIT1 z kapowanym RNA za pomocą testu wiązania opartego na metodzie MST. Fluorescencyjnie znakowane białko IFIT1 mieszało z ligandem RNA w 16 różnych stężeniach, a następnie inkubowano przez 15 minut przed analizą metodą MST. Zaobserwowane zmiany intensywności fluorescencji przedstawiono jako funkcję stężenia ligandu, a dopasowana teoretyczna krzywa wiązania pozwoliła na określenie stałych dysocjacji (K_D)

Wstępne analizy wykazały istotne różnice w powinowactwie ligandów RNA do IFIT1 w porównaniu z odpowiadającymi im trinukleotydowymi analogami kapu, dlatego zmieniono siłę jonową buforów dla obu typów ligandów, aby przesunąć wartości K_D na wyższe zakresy (Tabela 2A). Ostateczny skład buforu pomiarowego dla kapowanych RNA zawierał 200 mM NaCl, natomiast dla wolnych analogów kapu – 100 mM. Opracowana metoda badawcza zakładała zastosowanie stałego stężenia białka na poziomie 25 nM we wszystkich pomiarach. Wyznaczanie stałych dysocjacji poniżej tego zakresu roboczego (1 – 10 nM) nie zapewniłoby dostatecznej wiarygodności wyników. Dodatkowo, urządzenie MST (Monolith NT.115, NanoTemper) było zoptymalizowane do badania oddziaływań w zakresie nano- do mikromolarnym, co ograniczało możliwość precyzyjnych pomiarów w niższym przedziale stężeń. Aby umożliwić określenie stałych K_D powyżej 25 nM, zastosowano 200 mM sól w układzie pomiarowym dla kapowanych RNA, co przesunęło wartości K_D w stronę wyższych stężeń. Dzięki temu poprawiła się ogólna wiarygodność wyników. W każdej analizie MST krzywe wiązania odpowiadały modelowi 1:1. Pomiary przeprowadzono w postaci tryplikatów dla każdego testowanego wariantu, a wynik stanowiły wartości stałej dysocjacji [nM] wraz ze statystycznie określonymi przedziałami ufności C.I. (ang. *confidence intervals*).

Tabela 2A. Powinowactwo wiązania IFIT1, określone metodą MST dla struktur kap-0 i kap-1, w zależności od sekwencji RNA.

Struktura kapu	K_D (C.I.) / [nM]				
	RNA I ^{[a],[c]}	RNA II ^{[a],[c]}	RNA III ^{[a],[c]}	RNA IV ^{[a],[c]}	Wolny kap ^[b]
m⁷GpppApG	8 (1–19)	15 (8–25)	100 (60–170)	150 (90–230)	100 (60–150)
m⁷GpppAmpG	34 (19–59)	60 (42–84)	520 (350–770)	41 (26–70) ·10 ²	380 (190–610) ·10 ³

Tabela 2B. Stosunek wartości K_D kap-1/ K_D kap-0 dla wszystkich testowanych wariantów sekwencji.

K_D kap-1/ K_D kap-0	RNA I ^[a]	RNA II ^[a]	RNA III ^[a]	RNA IV ^{[a],[c]}	Wolny kap ^[b]
kap-1 / kap-0	4.2	4.0	5.2	27.3	3800

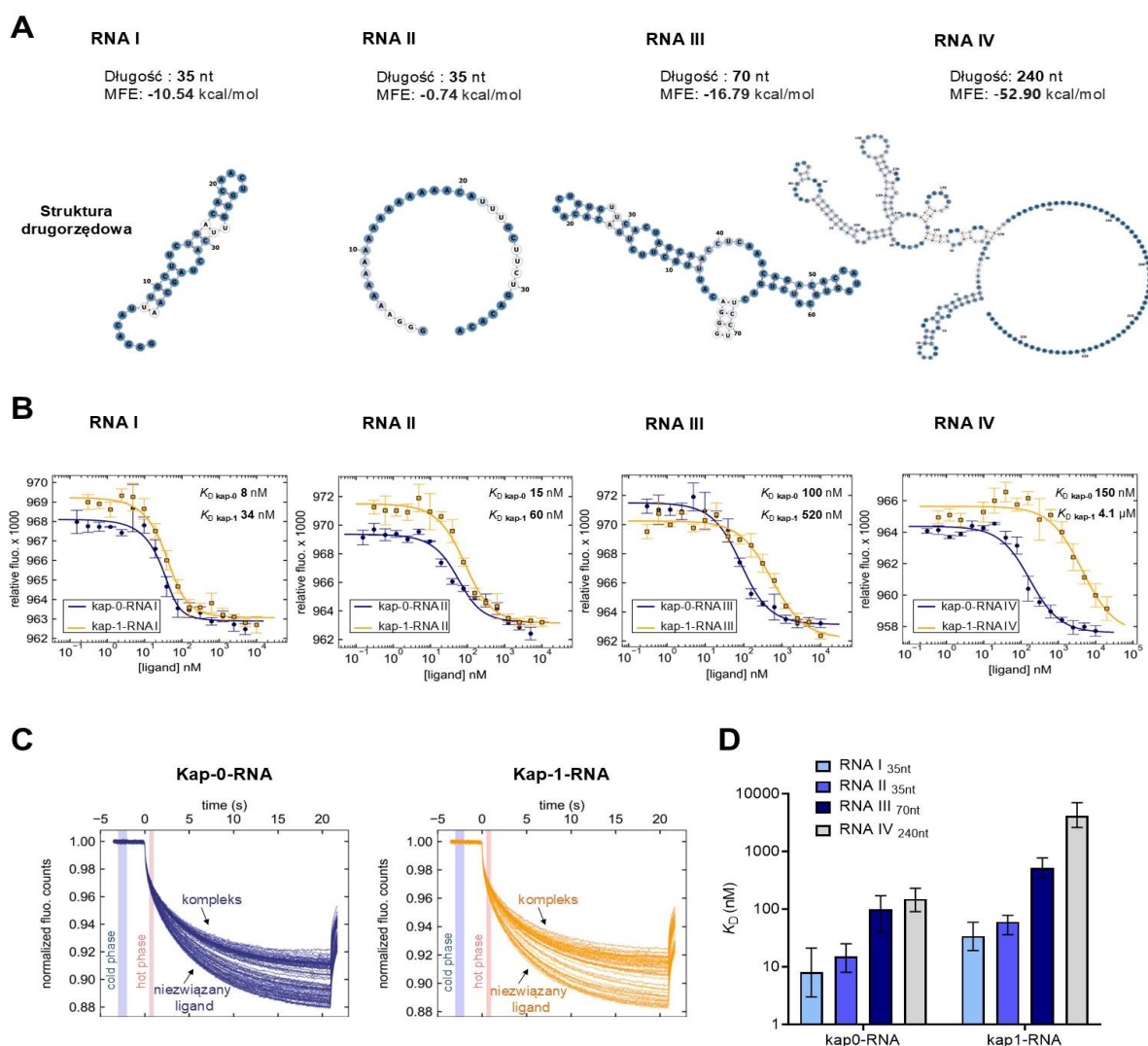
[a]] warunki buforowe: 20 mM HEPES (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.075% Pluronic F-127, średnie wartości z trzech powtórzonych eksperymentów z przedziałami ufności (C.I.).

[b]] warunki buforowe: 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.075% Pluronic F-127, średnie wartości z trzech powtórzonych eksperymentów z przedziałami ufności (C.I.).

[c] Sekwencje RNA przedstawiono na Rysunku 79

Sekwencja RNA I, tworząca strukturę spinki do włosów (Rys. 79), wiązała się z IFIT1 z wartościami K_D wynoszącymi 8 nM dla kap-0 i 34 nM dla kap-1. RNA II (wariant nieustrukturyzowany, 35 nt), zaprojektowano tak, aby unikać tworzenia struktur drugorzędowych, wiązało się z IFIT1 z nieco wyższymi wartościami K_D : 15 nM dla kap-0 i 60 nM dla kap-1. W przypadku trzeciego wariantu sekwencji, RNA III (wariant ustrukturyzowany, 70 nt), zaobserwowano wyraźnie słabsze oddziaływanie niż dla krótszych RNA, z wartościami K_D wynoszącymi 100 nM dla kap-0 i 520 nM dla kap-1. RNA IV reprezentowało model mRNA kodujący tag V5x3 (wariant ustrukturyzowany,

240 nt) i zostało użyte do weryfikacji, czy metoda nadaje się do pomiaru funkcjonalnych cząsteczek mRNA. Dla tego RNA zaobserwowano jeszcze słabsze wiązanie w porównaniu do krótszych ligandów, z wartościami K_D wynoszącymi 150 nM dla kap-0 i 4,1 μ M dla kap-1. Dla krótszych ligandów powinowactwo IFIT1 do kap-0 RNA było 4–5 razy wyższe niż do RNA z kap-1 (Tabela 2B), co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami i pośrednio potwierdza, że różnicowanie struktur na końcu 5' RNA przez IFIT1 jest niezależne od ich sekwencji. W przypadku dłuższego ligandu (RNA IV) różnica między strukturami kap-0 i kap-1 była bardziej wyraźna (~30-krotna), co sugeruje potencjalny udział pełnej cząsteczki mRNA w rozpoznawaniu ligandu. Różnice w powinowactwie wykazywane przez odmienne sekwencje RNA mogą być przypisane oddziaływaniom elektrostatycznym między cząsteczką RNA, a powierzchnią białka. RNA III o długości 70 nt (dalej nazywane RNA₇₀) zostało wybrane jako optymalny kompromis pomiędzy siłą oddziaływania, a dostępnością materiału (wydajnością syntezy ligandów). Jego długość oraz wartości stałych dysocjacji (K_D) dla obu ligandów mieściły się w roboczym zakresie stosowanej metody, co pozwoliło na precyzyjną ocenę wpływu różnych modyfikacji struktury kapu na powinowactwo RNA do IFIT1.



Rysunek 79 Określenie wartości K_D dla czterech różnych wariantów sekwencji RNA z kap-0 i kap-1 za pomocą metody MST. A) Przewidywane struktury drugorzędowe analizowanych sekwencji RNA (model Vienna RNAfold) oraz ich MFE -minimalna energia swobodna (ang. minimum free energy). B) Wyznaczone krzywe wiązania MST z trzech powtórzonych eksperymentów (punkty danych reprezentują średnie wartości $\pm$ SD. Krzywe wiązania zgodne z modelem wiązania 1:1). C) Reprezentatywne ślady MST dla dwóch krzywych pokazanych na wykresie B (RNAIII). Pionowe znaczniki (niebieskie i czerwone podświetlenia) wskazują zimne i gorące obszary użyte do dalszej analizy (Tjump). D) Porównanie wyznaczonych wartości K_D (średnie wartości z trzech powtórzonych eksperymentów z przedziałami ufności)

5.3 Oddziaływanie kanonicznych analogów kapu RNA z IFIT1

Pomiary powinowactwa kanonicznych analogów kapu 5'RNA do IFIT1 prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w części eksperymentalnej, wykorzystując kapowane RNA o długości 70 nt (RNA₇₀) powstałe na matrycy sekwencji RNA III. Molekuły RNA otrzymano przez transkrypcję *in vitro* i oczyszczono przy użyciu standardowych protokołów, które opisano w rozdziale 2 badań własnych. Wyznaczone wartości K_D zestawiono w Tabeli 3, a uzyskany zestaw danych umożliwił określenie wpływu różnorodnych modyfikacji strukturalnych w obrębie kapu RNA na interakcję IFIT1-RNA.

Tabela 3. Wartości K_D wiązania pomiędzy IFIT1 i kapowanymi RNA₇₀ lub wolnymi analogami kapu RNA dla struktur kanonicznych oraz niekanonicznych.

Analog kapu 5' RNA	Kapowane RNA ₇₀ K_D [nM]	Kapowane RNA ₇₀ C.I. [nM]	Trinukleotydowy kap K_D [nM]	Trinukleotydowy kap C.I. [nM]
m⁷GpppApG	100	(60, 170)	100	(60, 150)
m⁷GpppAmpG	520	(350, 770)	$380 \cdot 10^3$	$(190, 610) \cdot 10^3$
m⁷GpppCpG	230	(150, 360)	$13 \cdot 10^3$	$(10, 15) \cdot 10^3$
m⁷GpppGpG	330	(220, 480)	$23 \cdot 10^3$	$(14, 39) \cdot 10^3$
m⁷GpppUpG	130	(70, 250)	$390 \cdot 10^3$	$(330, 440) \cdot 10^3$
m⁷Gpppm⁶ApG	230	(140, 370)	$50 \cdot 10^3$	$(20, 100) \cdot 10^3$
m⁷Gpppm⁶AmpG	900	(730, 1100)	$380 \cdot 10^4$	$(210, 780) \cdot 10^4$
GpppApG	11	(6, 20)	$370 \cdot 10^4$	$(210, 660) \cdot 10^4$
NADpG	1000	(800, 1400)	$430 \cdot 10^6$	$(200, 540) \cdot 10^6$
m₃^{2,2,7}GpppApG	23	(10, 46)	30	(19, 47)
FADpG	80	(60, 110)	$21 \cdot 10^3$	$(13, 32) \cdot 10^3$
pppUpG	270	(200, 370)	$26 \cdot 10^6$	$(14, 112) \cdot 10^6$
Glucose-ppUpG	8 200	(6 200, 10 00)	n/b	n/b

[a] Warunki: 20 mM HEPES (pH 7,5), 200 mM NaCl, 0,075% Pluronic F-127, średnie wartości z trzech powtórzonych eksperymentów.

[b] Warunki: 20 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,075% Pluronic F-127, średnie wartości z trzech powtórzonych eksperymentów.

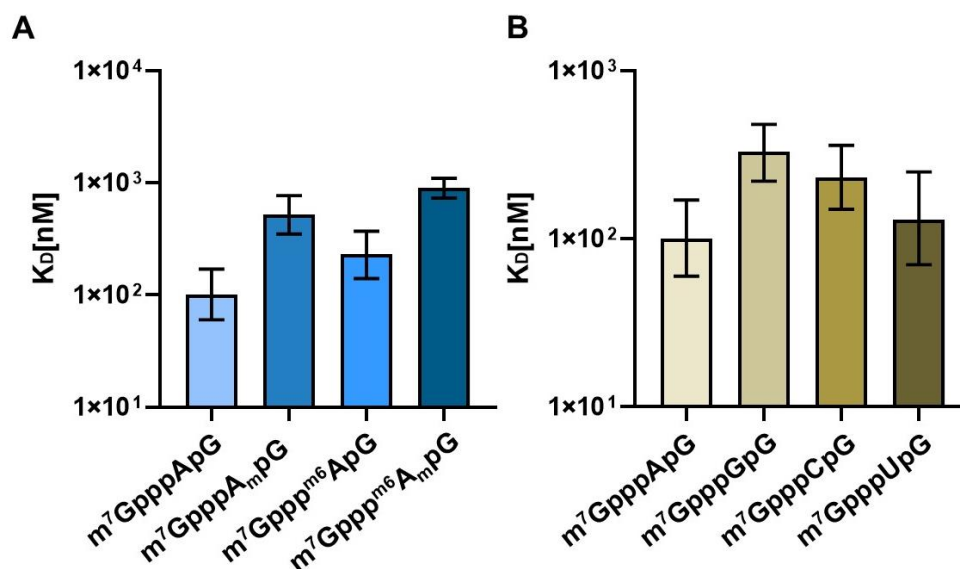
[c] Sekwencja RNA to RNA III przedstawiona na Rysunku 3 i opisana w sekcji Eksperymentalnej.

[d] Wartości przedziału ufności (C.I.) oszacowane automatycznie przez procedurę PALMIST-ESP (Error Surface Projection). Poziom ufności ustawiony na 68,3% (odpowiednik $\pm 1\sigma$ w krzywej Gaussa).

[e] n/b - brak obserwowanego wiązania przy stężeniu ligandu do 40 mM.

Badania rozpoczęto od porównania czterech analogów kapu-0, różniących się pierwszą transkrybowaną zasadą azotową (A, G, C, U). Zgodnie z oczekiwaniami, wszystkie te RNA silnie oddziaływały z IFIT1, aczkolwiek z nieco innymi wartościami K_D (Tabela 3). Najwyższe powinowactwo odnotowano dla struktury m⁷GpppApG z K_D na poziomie 100 nM, podobny wynik uzyskano dla m⁷GpppUpG-RNA₇₀ z K_D równym 130 nM (Rys. 80). Niższe powinowactwa otrzymano z kolei dla m⁷GpppCpG (K_D 230 nM), kończąc na najslabiej oddziałującym z IFIT1 w tym zestawieniu m⁷GpppGpG z K_D około 330 nM. Następnie skupiono się na analizie wpływu grupy metylowej w pozycjach 2' oraz N6 pierwszej transkrybowanej zasady na interakcję z IFIT1. Zastosowanie grupy metylowej w strukturze kap-0 w pozycji N6 adenozy (m⁷Gpppm⁶ApG-RNA) obniżyła powinowactwo

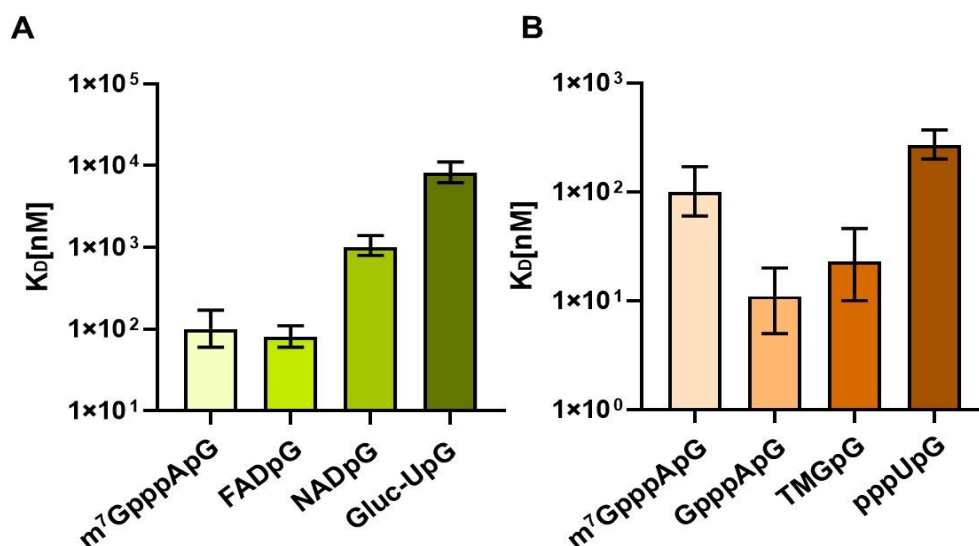
RNA do IFIT1, choć nie w takim stopniu jak grupa metylowa w pozycji 2'-O (wartość K_D dla $m^7Gppp^{m6}ApG$ -RNA była 2,3-krotnie wyższa niż dla $m^7GpppApG$ -RNA, ale 2,2-krotnie niższa niż dla $m^7GpppA_m pG$ -RNA). Warto zauważyć, że efekty tych dwóch grup metylowych były addytywne, ponieważ sonda RNA z kapem $m^7Gppp^{m6}A_m pG$ wykazywała 9-krotnie niższe powinowactwo w porównaniu do ligandu RNA z kap-0. Sugeruje to, że grupa metylowa w pozycji N6-adenozyny na końcu 5' stanowi dodatkową warstwę ochrony przed wiązaniem RNA przez IFIT1.



Rysunek 80 Graficzne porównanie (A) wartości K_D uzyskanych dla RNA₇₀ z kap-0 na końcu 5' - $m^7GpppApG$, kap-1 (z metylacją w pozycji 2'-O) - $m^7GpppA_m pG$, $m^7G^{m6}ApG$ (kap-0 z N6-metyladenozyną) oraz $m^7G^{m6}A_m pG$ (kap-1 z N6-metyladenozyną). Oś Y przedstawiona w postaci logarytmu dziesiętnego. Graficzne przedstawienie (B) wartości K_D dla wszystkich czterech wariantów kap-0 RNA₇₀, tj. $m^7GpppApG$, $m^7GpppGpG$, $m^7GpppCpG$, $m^7GpppUpG$.

5.4 Wiązanie niekanonicznych analogów kapu RNA z IFIT1

Badane niekanoniczne kapy miały bardzo zróżnicowany wpływ na interakcję IFIT1-RNA. Wartości K_D określone dla RNA z niekanonicznymi czapeczkami wykazywały szerokie spektrum powinowactwa, obejmujące trzy rzędy wielkości (Tabela 3, Rys. 81). FADpG-RNA wiązało się z IFIT1 z powinowactwem porównywalnym do RNA z kap-0 (K_D 80 nM). GpppApG-RNA było wiązane przez IFIT1 nawet silniej niż RNA z kap-0 (K_D 11 nM). Co zaskakujące, RNA zawierające hipermetylowaną grupę m^7G , czyli tzw. kap trimetyloguanozynowy ($m_3^{2,2,7}GpppApG$ -RNA), również wykazywało bardzo wysokie powinowactwo do IFIT1 (K_D 23 nM). Chociaż obie te struktury powstają podczas biosyntezy lub dojrzewania niektórych endogennych RNA³⁶⁶, wyjątkowo wysokie powinowactwo IFIT1 do tej hipermetylowanej struktury sugeruje, że mogą one stanowić kolejną klasę komórkowych celów IFIT1. NADpG-RNA wiązało się ponad 10 razy słabiej względem kap-0 (K_D 1,0 μ M), natomiast czapeczka UDP-glukozy wykazywała wyraźny efekt „ochronny” wobec IFIT1 (K_D 8,2 μ M), znacznie słabiej oddziałując z białkiem niż odpowiadające mu niekapowane RNA (K_D 270 nM). Wyniki te mogą sugerować, że IFIT1 jest zdolne do rozpoznawania większej liczby struktur na końcu 5' RNA, niż wcześniej przypuszczano, a niektóre niekanoniczne modyfikacje końca 5' mogą chronić RNA przed wiązaniem przez IFIT1. Co ciekawe, wszystkie struktury zidentyfikowane w tym badaniu jako silnie wiążące się z IFIT1, były wcześniej powiązane z wirusowym RNA. Ponieważ mRNA jest kapowane w jądrze, GpppApG-RNA normalnie nie występuje w cytoplazmie, ale powstaje tam w trakcie niektórych wirusowych szlaków kapowania RNA. Oprócz swojej obecności na endogennych RNA, czapeczka trimetyloguanozynowa została również zidentyfikowana na niektórych RNA związanych z HIV.³⁶⁷ Czapeczka FAD na końcu 5' została znaleziona na około 75% RNA HCV.³⁶⁸



Rysunek 81 A) Graficzne porównanie wartości K_D uzyskanych dla kapowanych RNA₇₀ z niekanonicznymi analogami końca 5' RNA, w tym. FADpG, NADpG, Glucose-ppUpG oraz referencyjnym kap-0. B) Wartości K_D dla RNA₇₀ bez m⁷G – GpppApG, z hipermetylacją - TMGpG, niekapowanego RNA - pppUpG oraz referencyjnego kap-0

5.5 Pomiary dla trinukleotydomowych analogów kapu RNA z IFIT1

Oceniono również potencjał stosowania krótkich, trinukleotydomowych analogów kapu jako ligandów dla IFIT1 w kontekście uzyskiwania wartościowych danych na temat względnego powinowactwa różnych wariantów kapów. Mogłoby to znacząco skrócić czas analizy i zmniejszyć jej całkowity koszt. Wartości K_D określone dla m⁷GpppApG (kap-0) i m⁷GpppA_mpG (kap-1) sugerowały, że IFIT1 jest w stanie jeszcze silniej różnicować czapeczki, gdy nie są one częścią pełnej cząsteczki RNA (Tabela 2, Tabela 3). Jednak bezpośrednie porównanie wszystkich wartości K_D wyznaczonych dla ligandów RNA z kapem i wolnych związków (Tabela 3) sugeruje, że pomiary dla wolnych analogów kapu RNA nie dostarczają wiarygodnych danych ilościowych, choć w pewnym stopniu są zgodne jakościowo z danymi uzyskanymi dla ligandów RNA. W trakcie prowadzonych eksperymentów zaobserwowano wysokie powinowactwo wiązania dla niektórych szczególnie silnie oddziałujących końców 5' RNA, nawet dla „wolnych” kapów (m⁷GpppApG, m₃^{2,2,7}GpppApG). Może to sugerować, że te struktury specyficznie oddziałują z IFIT1 i odgrywają szczególnie istotną rolę jako jego komórkowe cele.

5.6 Wiązanie analogów zawierających modyfikacje w pozycji 2'-adenozyny

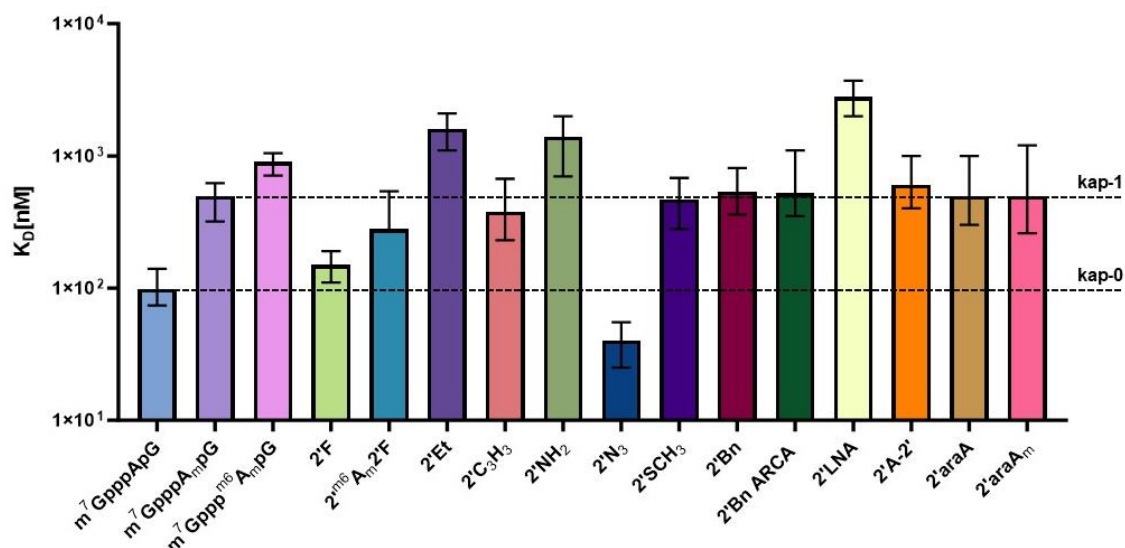
Badanie powinowactwa kompleksu IFIT1-RNA dla zestawu modyfikacji w pozycji 2' rybozy adenozyny, będącej pierwszą transkrybowaną zasadą, przeprowadzono dla ligandów w postaci kapowanych RNA. Jako kontrolę poprawności metody oraz punkt odniesienia umożliwiającą porównanie nowych danych z wcześniejszymi wynikami dla kanonicznych i niekanonicznych analogów, ponownie zmierzono interakcje dla referencyjnych wariantów m⁷GpppApG (kap-0), m⁷GpppA_mpG (kap-1) oraz m⁷Gppp^{m6}A_mpG kap (^{m6}A_m). Wszystkie kapowane RNA dla zestawu modyfikacji 2' reszty cukrowej adenozyny przygotowano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą. Wartości stałych dysocjacji, uzyskane dla wspomnianych referencji, odpowiednio K_D 98 nM dla m⁷GpppApG, K_D 550 nM dla m⁷GpppA_mpG i K_D = 930 nM dla m⁷Gppp^{m6}A_mpG, były zgodne z wcześniejszymi pomiarami. Potwierdziło to powtarzalność uzyskiwanych wyników oraz wiarygodność pierwotnie zmierzonych interakcji, co świadczy o precyzji i powtarzalności opracowanej metody (Tabela 4).

Tabela 4. Wartości K_D wiązania pomiędzy IFIT1 i kapowanymi RNA₇₀ dla modyfikacji 2' reszty cukrowej adenozyiny.

Analog kapu 5' RNA	Kapowane RNA ₇₀ K_D [nM]	Kapowane RNA ₇₀ C.I. [nM]
m⁷GpppApG	98	(72, 140)
m⁷GpppAmpG	550	(370, 810)
m⁷Gpppm⁶ApG	930	(710, 1070)
m⁷GpppAfpG	150	(110, 190)
m⁷Gpppm⁶AfpG	280	(90, 540)
m⁷GpppA_{2'}-O-EtP	1600	(1100, 2100)
m⁷GpppA_{2'}-O-CH₃pG	380	(230, 670)
m⁷GpppA_{2'}-NH₂pG	1400	(700, 2000)
m⁷GpppA_{2'}-N₃pG	40	(10, 90)
m⁷GpppA_{2'}-S-CH₃pG	470	(280, 680)
m⁷GpppA_{2'}-O-BnApG	540	(360, 810)
m₂^{7,2'}-O-GpppA_{2'}-O-BnApG	520	(350, 1100)
m⁷GpppA_{LNA}pG	2800	(2000, 3700)
m⁷GpppA-2'-pG	600	(400, 1000)
m⁷Gppp(araA)pG	500	(300, 1000)
m⁷Gppp(araA_m)pG	500	(260, 1200)

Modyfikacje zawierające w pozycji 2'-adenozyiny atom fluoru wykazywały nieznacznie niższe powinowactwo do IFIT1 względem kap-0, uzyskując K_D 150 nM dla m⁷GpppAfpG oraz K_D 260 nM dla m⁷Gpppm⁶AfpG, wariantu z dodatkową metylacją w pozycji N6 (Rys. 82). Jednak w porównaniu z kap-1 obserwowano 2-3-krotny wzrost powinowactwa, co podkreśla istotną rolę grupy metylowej w pozycji 2' w osłabianiu oddziaływania z IFIT1. Jednocześnie wskazuje to, że analogi 2'-fluoro nie mogą funkcjonalnie zastąpić kap-1. Z kolei grupa etoksylova oraz aminowa znacząco obniżyły powinowactwo do IFIT1, ukazując około 3-krotnie wyższe wartości stałej dysocjacji względem kap-1 z K_D 1600 nM dla m⁷GpppA_{2'}-O-EtP i K_D 1400 nM dla m⁷GpppA_{2'}-NH₂pG. Wskazuje to na ich potencjał w obniżaniu powinowactwa do IFIT1, stanowiąc jednocześnie funkcjonalną alternatywę dla naturalnego kap-1. Zastosowanie grupy 2'-metanotiolowej (m⁷GpppA_{2'}-S-CH₃pG), podobnie jak podstawnika *O*-benzylowego (m⁷GpppA_{2'}-O-BnApG) oraz podstawnika *O*-benzylowego w wersji ARCA (m₂^{7,2'}-O-GpppA_{2'}-O-BnApG) skutkowało oddziaływaniem bardzo zbliżonym do referencyjnej wartości kap-1 (m⁷GpppAmpG, K_D 550 nM). Co ciekawe, wariant zawierający grupę azydkową (m⁷GpppA_{2'}-N₃pG) znacząco zwiększył powinowactwo liganda RNA do IFIT1, uzyskując ponad 2-krotnie niższą wartość stałej dysocjacji względem referencyjnego kap-0. Z kolei obie modyfikacje posiadające arabinozę w strukturze pierwszego nukleozydu (m⁷Gppp(araA)pG i m⁷Gppp(araA_m)pG) wykazały identyczną stałą powinowactwa do IFIT1 równą K_D 500 nM. Dodatkowa grupa metylowa w obrębie arabinozy nie wpłynęła na osłabienie oddziaływania, jak obserwowano dla analogów z rybozą, co może sugerować

odmienny mechanizm rozpoznawania przez IFIT1 nukleozydów zawierających arabinozę zamiast naturalnej rybozy w sekwencji RNA. Wariant tworzący wiązanie 2',5'-fosfodiesterowe z kolejną zasadą łańcucha RNA ($m^7GpppA-2'-pG$) wykazał 6-krotnie wyższą wartość stałej dysocjacji w porównaniu z referencyjnym kap-0, posiadającym naturalne wiązania 3',5'-fosfodiesterowe, osiągając poziom porównywalny z ludzkim kap-1. Najniższe powinowactwo do IFIT1 z tego zestawu uzyskano dla analogu $m^7GpppALNpG$, którego wartość $K_D = 2800$ nM była ponad pięciokrotnie wyższa niż referencyjnego analogu kap-1. Podstawnik LNA w pozycji 2' (zamknięty kwas nukleinowy), poprzez swoją zamkniętą strukturę, skutecznie utrudnił rozpoznawanie i wiązanie IFIT1 do RNA zawierającego tę modyfikację.



Rysunek 82 Graficzne porównanie wartości K_D uzyskanych dla RNA₇₀ z modyfikacjami 2'-adenozyny, jako pierwszej transkrybowanej zasady: $m^7GpppAFpG$, $m^7Gppp^{m6}AFpG$, $m^7GpppA2'-O-EtpG$, $m^7GpppA2'-O-C3H3pG$, $m^7GpppA2'-NH2pG$, $m^7GpppA2'-N3pG$, $m^7GpppA2'-S-CH3pG$, $m^7GpppA2'-O-BnpApG$, $m^7GpppA2'-O-BnpApG$, $m^7GpppALNpG$, $m^7GpppA-2'-pG$, $m^7Gppp(araA)pG$ oraz $m^7Gppp(araAm)pG$ w odniesieniu do referencyjnych analogów kap-0 ($m^7GpppApG$), kap-1 ($m^7GpppAmpG$) i m^6A_m ($m^7Gppp^{m6}AmpG$). Przerywanymi liniami zaznaczono poziomy wartości stałych dysocjacji dla RNA-kap-0 oraz RNA-kap1.

5.7 Wiązanie analogów zawierających modyfikacje w pozycji N6-adenozyny

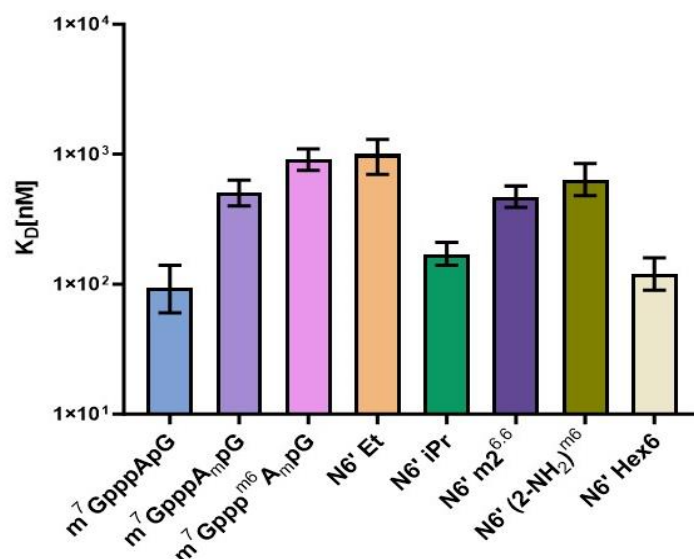
Naturalna modyfikacja analogów kapu RNA (m^6A_m) odgrywa istotną rolę w regulacji stabilności oraz translacji niektórych RNA występujących u ludzi. Modyfikacja ta polega na metylacji adenozyny zarówno w pozycji N6, jak i na grupie 2'-O rybozy, co wpływa na zdolność RNA do interakcji z białkami odpowiedzialnymi za jego przetwarzanie. m^6A_m często znajduje się w pierwszej nukleotydowej pozycji RNA i może regulować procesy takie jak inicjacja translacji, ochrona przed degradacją przez egzonukleazy oraz rozpoznawanie przez białka wiążące RNA. Wpływa również na ekspresję genów i jest zaangażowana w adaptacyjne odpowiedzi komórkowe na zmieniające się warunki środowiskowe, odgrywając istotną rolę w procesach takich jak różnicowanie komórek, odpowiedź na stres i rozwój nowotworów. Dlatego też poznanie efektu innych podstawników w pozycji N6 pierwszego transkrybowanego nukleozydu (adenozyny) może dostarczyć cennych informacji w kontekście zastosowanie takich modyfikacji w terapiach mRNA.

Pomiary wykonano analogiczną do wyżej opisanej metodą, stosując kapowane RNA jako ligandy. Jako punkt odniesienia dla nowych wariantów, przeprowadzono pomiary dla świeżo przygotowanego zestawu RNA zawierającego referencyjne struktury: $m^7GpppApG$ (kap-0), $m^7GpppAmpG$ (kap-1) oraz $m^7Gppp^{m6}AmpG$ kap (m^6A_m), uzyskując wyniki zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dla tych analogów (Tabela 5).

Tabela 5. Wartości K_D wiązania pomiędzy IFIT1 i kapowanymi RNA₇₀ dla modyfikacji N6 adenozyiny.

Analog kapu 5' RNA	Kapowane RNA ₇₀ K_D [nM]	Kapowane RNA ₇₀ C.I. [nM]
m⁷GpppApG	93	(60, 140)
m⁷GpppAmpG	510	(400, 630)
m⁷Gpppm⁶AmpG	910	(750, 1100)
m⁷Gppp^{Et6}AmpG	1000	(700, 1300)
m⁷Gppp^{iPr6}AmpG	170	(210, 140)
m⁷Gpppm^{2,6}AmpG	470	(390, 570)
m⁷Gppp(2-NH2)^{m6}AmpG	640	(480, 850)
m⁷Gppp^{Hex6}AmpG	120	(90, 160)

Zastosowanie grupy etylowej w pozycji N6 (m⁷Gppp^{Et6}AmpG, K_D 1000 nM) skutkowało zbliżonym powinowactwem do IFIT1 względem referencyjnego wariantu z metylem (m⁶A_m). Z drugiej strony dla wariantu z dwiema grupami metylowymi w pozycji N6 (m⁷Gpppm^{2,6}AmpG) obserwowano dwukrotnie niższą wartość stałej dysocjacji (Rys. 83). Co ciekawe, izopropyl w tej pozycji (m⁷Gppp^{iPr6}AmpG) doprowadził do znaczącego wzrostu powinowactwa do IFIT1, dając wartość stałej dysocjacji K_D 170 nM zbliżoną do charakterystycznego dla części wirusów, referencyjnego kap-0. Podobny efekt obserwowano również dla podstawnika 1-(heksyn-5-yłowego) (m⁷Gppp^{Hex6}AmpG). RNA z tą modyfikacją wykazywało jeszcze wyższe powinowactwo, porównywalne z oddziaływaniem IFIT1-kap-0. Z kolei wariant zawierający dodatkową grupę aminową (m⁷Gppp(2-NH2)^{m6}AmpG) wiązał się do IFIT1 nieznacznie lepiej niż referencyjny m⁶A_m, a wartość jego stałej wiązania plasowała się pomiędzy wariantem kap1, a wspomnianym m⁶A_m. Powyższy zestaw modyfikacji N6-adenozyny wykazały złożony charakter interakcji takich ligandów RNA z IFIT1. Wyłaniająca się zależność w oddziaływaniach dla zbliżonych strukturalnie grup funkcyjnych wskazuje, że małe podstawniki, takie jak metyl czy etyl, mogą chronić przed wiązaniem z IFIT1, podczas gdy większe, takie jak izopropyl czy heksynyl, tej ochrony nie zapewniają. Może to sugerować obecność hydrofobowej kieszeni w sąsiedztwie kieszeni wiążącej kap, w której dodatkowe oddziaływania hydrofobowe między dużymi podstawnikami, a białkiem mogą kompensować zmniejszenie energii oddziaływania wynikające z zatłoczenia sterycznego. Z tego też wynika konieczność przeprowadzania pomiarów dla każdego uzyskanego wariantu, jako najlepszej metody oceny wpływu danej modyfikacji na mechanizm działania ludzkiego wrodzonego układu odpornościowego zależnego od IFIT1.



Rysunek 83 Graficzne porównanie wartości K_D uzyskanych dla RNA_{70} z modyfikacjami N6 adenozyiny, jako pierwszej transkrybowanej zasady: $m^7GpppEt6A_mPG$, $m^7GpppiPr6A_mPG$, $m^7Gpppm26,6A_mPG$, $m^7Gppp(2-NH_2)^{m6}A_mPG$, $m^7GpppHex6A_mPG$ w odniesieniu do referencyjnych analogów kap-0 ($m^7GpppApG$), kap-1 (m^7GpppA_mPG) i $^{m6}A_m$ ($m^7Gppp^{m6}A_mPG$)

5.8 Wiązanie analogów zawierających aromatyczne modyfikacje w pozycji N6-adenozyny

Szczególną grupę badanych analogów czapeczki RNA stanowią warianty zawierające grupy aromatyczne w pozycji N6-adenozyny. Tego rodzaju modyfikacje zostały niedawno zidentyfikowane jako skutecznie zwiększające translację mRNA w układach *in vivo*, co podkreśla ich istotny potencjał terapeutyczny. Z uwagi na te obiecujące właściwości, podjęto badania nad ich wpływem na mechanizm działania ludzkiego układu odpornościowego, w szczególności na zależność od białka IFIT1. Jako ligandy zastosowano kapowane cząsteczki RNA, a kontrolę stanowił standardowy zestaw referencyjny: kap-0, kap-1 oraz $^{m6}A_m$. Uzyskane dla nich wartości K_D były bardzo zbliżone do wyników z wcześniejszych analiz (Tabela 6).

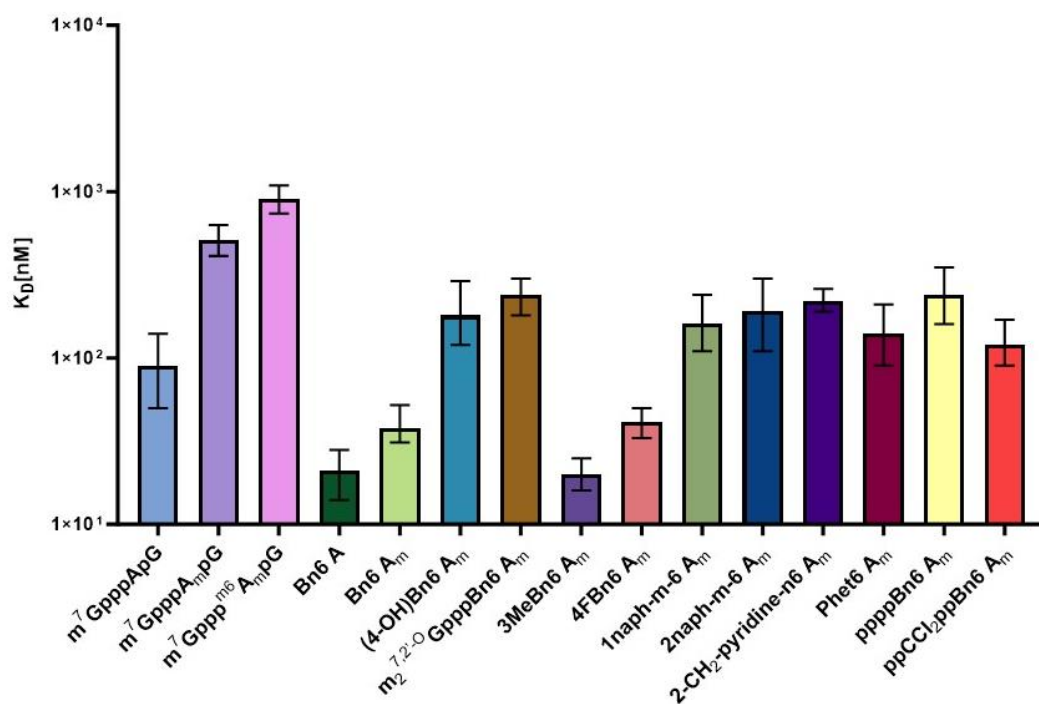
Badania rozpoczęto od najprostszych podstawników zawierających jedynie grupę N6-benzylową w wariantcie kap-0 ($m^7Gppp^{Bn6}A_mPG$), dla którego, co zaskakujące, odnotowano wysokie powinowactwo, z wartością K_D wynoszącą 21 nM. Stała ta była około czterokrotnie wyższa niż wynik uzyskany dla naturalnego ligandu IFIT1, jakim jest kap-0-RNA. Grupa metylowa w pozycji 2'-O-adenozyny ($m^7Gppp^{Bn6}A_mPG$) ponownie skutkowała nieznacznie wyższą wartością stałej dysocjacji K_D wynoszącą 38 nM, co było zgodne z wcześniejszymi wynikami. Porównanie tej wartości z referencyjnym kap-1 uwidocznilo trzynastokrotny wzrost powinowactwa dla N6-benzylowego odpowiednika modyfikacji A_m (Rys. 84). Wyniki te sugerowały, że struktura aromatycznego podstawnika w pozycji N6 ma znaczący wpływ na energię oddziaływania z kieszenią wiążącą IFIT1. Rodzaj oraz ładunek dodatkowych grup funkcyjnych związanych z podstawnikiem benzylowym w pozycji N6 ma bardzo duży wpływ na oddziaływanie z IFIT1. Pomiary wiązania dla modyfikacji posiadającej grupę *p*-hydroksybenzylową ($m^7Gppp^{(4-OH)Bn6}A_mPG$) oraz wariant podstawnika benzylowego A_m w wersji ARCA ($m2^{7,2'-O}Gppp^{Bn6}A_mPG$) wykazały obniżenie powinowactwa względem podstawowych analogów benzylowych. Zastosowanie grupy hydroksylowej ponad czterokrotnie zredukowało energię oddziaływania z IFIT1, z kolei wariant ARCA przełożył się na sześciokrotne obniżenie powinowactwa badanego układu (Tabela 6).

Tabela 6. Wartości K_D wiązania pomiędzy IFIT1 i kapowanymi RNA₇₀ dla aromatycznych modyfikacji N6 adenozyiny.

Analog kapu 5' RNA	Kapowane RNA ₇₀ K_D [nM]	Kapowane RNA ₇₀ C.I. [nM]
m⁷GpppApG	95	(65, 140)
m⁷GpppAmpG	510	(400, 620)
m⁷Gpppm⁶ApG	890	(720, 1050)
m⁷Gppp^{Bn6}ApG	21	(14, 28)
m⁷Gppp^{Bn6}AmpG	38	(31, 52)
m⁷Gppp^{(4-OH)Bn6}AmpG	180	(120, 290)
m₂^{7,2'-O}Gppp^{Bn6}AmpG	240	(180, 300)
m⁷Gppp^{3MeBn6}AmpG	20	(16, 25)
m⁷Gppp^{4FBn6}AmpG	41	(33, 50)
m⁷Gppp^{1naph-m-6}AmpG	160	(110, 240)
m⁷Gppp^{2naph-m-6}AmpG	190	(110, 300)
m⁷Gppp^{2-CH2-pyridine-n6}AmpG	220	(190, 260)
m⁷Gppp^{Phet6}AmpG	140	(90, 210)
m⁷Gpppp^{Bn6}AmpG	240	(160, 350)
m⁷GppCCl₂pp^{Bn6}AmpG	120	(90, 170)

Modyfikacje zawierające grupę *m*-metylenobenzylową (m⁷Gppp^{3MeBn6}AmpG) oraz grupę N6 *p*-fluorobenzylową (m⁷Gppp^{4FBn6}AmpG) wykazywały bardzo wysokie powinowactwo względem IFIT1. Uzyskane wartości stałych dysocjacji dla wariantu ^{3MeBn6}A_m były dwukrotnie niższe w porównaniu do podstawowej modyfikacji benzylowej ^{Bn6}A_m, natomiast dla analogu ^{4FBn6}A_m nie odnotowano istotnych różnic. Co ciekawe, większe aromatyczne podstawniki naftylometylenowe nie wiązały się z IFIT1 w takim stopniu, jak grupy benzylowe. Badane warianty z grupą N6 1-naftylometylenową (m⁷Gppp^{1naph-m-6}AmpG) oraz grupą N6 2-naftylometylenową (m⁷Gppp^{2naph-m-6}AmpG) wykazywały około czterokrotnie słabsze powinowactwo do IFIT1 niż struktura ^{Bn6}A_m, co może być spowodowane zbyt dużym rozmiarem podstawnika naftalenowego i tworzoną przez tą grupę zawadą steryczną w kieszeni wiążącej białka. Analog z grupą N6 2-pirymidynometylenową (m⁷Gppp^{2-CH2-pyridine-n6}AmpG) wykazywał podobne powinowactwo do IFIT1 jak warianty naftalenowe, z wartością K_D na poziomie 220 nM. Natomiast wydłużenie łańcucha o jeden metyl w przypadku wariantu z grupą N6 2-fenyletylową (m⁷Gppp^{Phet6}AmpG) doprowadziło do dwukrotnego obniżenia wartości stałej dysocjacji, co może być związane z większą elastycznością dłuższego łańcucha węglowego w tym podstawniku. Ostatecznie zmierzono oddziaływania dla dwóch analogów zawierających wydłużony o jeden fosforan mostek łączący m⁷G z resztą łańcucha RNA, tworząc tym samym mostek tetrafosforanowy. Wariant z dodatkowym fosforanem w mostku (m⁷Gpppp^{Bn6}AmpG) wykazywał sześciokrotnie niższe powinowactwo w porównaniu do struktury ^{Bn6}A_m, z wartością K_D wynoszącą 240 nM. Natomiast wprowadzenie dodatkowej grupy CCl₂ wewnątrz mostka tetrafosforanowego (m⁷GppCCl₂pp^{Bn6}AmpG) spowodowało dwukrotny wzrost energii oddziaływania liganda RNA z IFIT1, osiągając wartość K_D

równą 120 nM. Fakt, że warianty z grupą benzyłową w pozycji N6-adenozyny wykazują wysokie powinowactwo do IFIT1, wspiera hipotezę o istnieniu dodatkowej hydrofobowej kieszeni w strukturze białka, zdolnej do interakcji z niewielkimi podstawnikami aromatycznymi. Zdolność tej kieszeni do wiązania jest jednak ograniczona, co tłumaczy, dlaczego większe podstawniki, takie jak metylonaftyl, nie wykazują podobnych właściwości wiążących. Z punktu widzenia terapeutycznego, wysokie powinowactwo do IFIT1 nie jest korzystne dla RNA, dlatego interesująca jest obserwacja, że niektóre podstawniki w pierścieniu aromatycznym, takie jak fluor (F) czy grupa metylowa (CH₃), nie wpływają istotnie na powinowactwo do IFIT1, podczas gdy inne, o zbliżonych rozmiarach, takie jak grupa hydroksylowa (OH), znacząco je zmniejszają. Te różnice w oddziaływaniach mogą dostarczyć cennych informacji do weryfikacji hipotez dotyczących mechanizmów działania białek IFIT oraz projektowania analogów kapu o optymalnych właściwościach. Dalsze badania strukturalne kompleksu IFIT1 z IFIT3 mogą być kluczowe dla lepszego zrozumienia funkcji hydrofobowej kieszeni. Jeśli okaże się, że jest ona zaangażowana w interakcje międzybiałkowe, konieczne będzie również zbadanie oddziaływań RNA z kompleksem IFIT1-IFIT3, co może pomóc w określeniu znaczenia tej struktury w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Tego rodzaju analizy mogą stanowić istotny wkład w rozwój technologii RNA o właściwościach terapeutycznych.

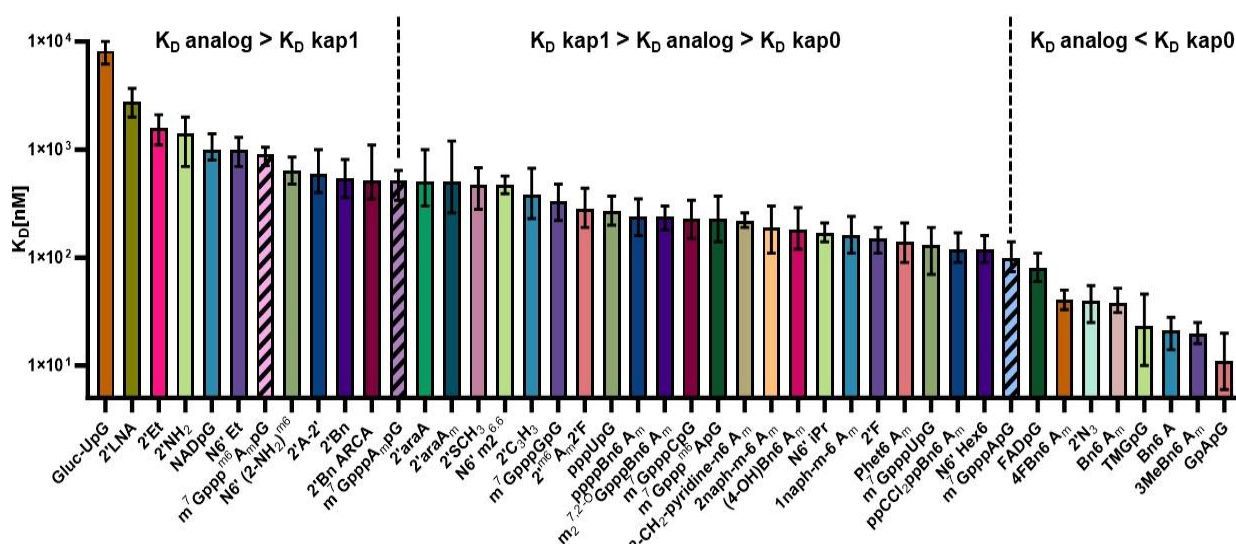


Rysunek 84 Graficzne porównanie wartości K_D uzyskanych dla RNA₇₀ z modyfikacjami aromatycznymi N6 adenosyny, jako pierwszej transkrybowanej zasady: $m^7GpppBn6ApG$, $m^7GpppBn6AmpG$, $m^7Gppp(4-OH)Bn6AmpG$, $m^{2,7,2'-O}GpppBn6AmpG$, $m^7Gppp3MeBn6AmpG$, $m^7Gppp4FBn6AmpG$, $m^7Gppp-1naph-m-6AmpG$, $m^7Gppp2naph-m-6AmpG$, $m^7Gppp2-CH_2-pyridine-n6AmpG$, $m^7GpppPhet6AmpG$, $m^7GpppBn6AmpG$, $m^7GppCCl_2ppBn6AmpG$ w odniesieniu do referencyjnych analogów kap-0 ($m^7GpppApG$), kap-1 ($m^7GpppAmpG$) i m^6A_m ($m^7Gppp^{m^6}AmpG$)

5.9 Podsumowanie

Ciągły wzrost liczby potencjalnych zastosowań cząsteczek RNA podkreśla konieczność opracowania skuteczniejszych metod badania zależności między strukturą, a funkcją oraz biologicznych efektów różnych modyfikacji RNA. W trakcie realizacji powyższego zadania badawczego opracowałem powtarzalny test, który umożliwił ocenę powinowactwa różnych kapów RNA do białka IFIT1. Metoda oparta na pomiarze termoforezy mikroskalowej (MST) białka znakowanego fluorescencyjnie w obecności rosnących stężeń ligandu, pozwoliła na bardziej efektywną analizę interakcji IFIT1 z RNA

w porównaniu do wcześniej stosowanych metod, dzięki niskiemu zużyciu próbek, prostemu przebiegowi oraz łatwej analizie ilościowej wyników. Wykazano, że test jest odpowiedni do analizy ligandów RNA o długości 35–240 nt, w tym funkcjonalnych mRNA, przy użyciu RNA oczyszczonych metodą HPLC. Choć zaobserwowano różnice w powinowactwie między RNA kap-0 a kap-1 dla wszystkich badanych długości, bezwzględne wartości K_D silnie zależały od długości RNA, co podkreśla wagę stosowania wysokiej jakości, jednorodnych próbek RNA w tego rodzaju pomiarach. Pokazano również, że analiza małowartościowych analogów czapek jest technicznie możliwa przy użyciu metody MST, jednakże uzyskane wyniki nie zawsze w pełni odzwierciedlają właściwości dłuższych RNA. Niemniej jednak, pewne jakościowe trendy w relacji między strukturą a powinowactwem, zaobserwowane dla ligandów RNA, są również widoczne dla trinukleotydowych analogów kapów, co sugeruje, że metoda ta może być stosowana do odkrywania małowartościowych ligandów o wysokim powinowactwie do IFIT1. Wykorzystałem opracowany test do bezpośredniego porównania łącznie 43 ligandów RNA zawierających różne naturalne, kanoniczne i niekanoniczne struktury czapek. Uzyskane dane, przedstawiające wartości stałych dysocjacji K_D dla wszystkich badanych modyfikacji, zostały zaprezentowane poniżej (Rys. 85).



Rysunek 85 Zestawienie wartości powinowactwa analogów kapu 5' RNA względem IFIT1 w postaci stałych dysocjacji (K_D), ułożone w porządku malejącym. Stałe dysocjacji poszczególnych modyfikacji podzielono na trzy przedziały względem referencji: kap-0 oraz kap-1. Lewy przedział zawierał analogi o wyższych K_D niż kap-1, czyli o niższym powinowactwie do IFIT1. W środkowym przedziale znalazły się analogi z K_D pomiędzy kap-0 i kap-1, a w prawym – te o wyższym powinowactwie niż kap-0. Na osi Y zaznaczono wartości K_D w nanomolach (nM), w skali logarytmicznej. Dane uzyskano na podstawie trzech niezależnych eksperymentów

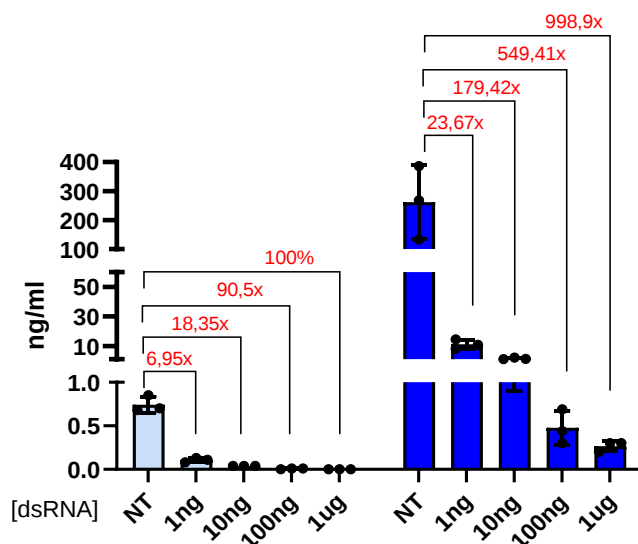
Całościowe zestawienie wyników uzyskanych dla wszystkich badanych modyfikacji (Rys. 85) zostało przedstawione w układzie malejących wartości stałych dysocjacji kompleksów. Przerywane linie wyznaczają trzy orientacyjne przedziały, ilustrujące różnice w powinowactwie poszczególnych wariantów względem głównych referencji: kap-0, naturalnego liganda IFIT1 występującego w wirusach oraz kap-1, analogu występującego u ludzi. Na podstawie tych zależności można wyciągnąć kilka ogólnych wniosków dotyczących specyfiki kompleksów formowanych przez IFIT1 z kapowanymi RNA. Po pierwsze, warto zwrócić uwagę na identyfikację ligandów, które wiążą się z badanym białkiem znacznie silniej niż referencyjny kap-0. Grupa tych związków jest strukturalnie bardzo różnorodna, obejmując modyfikacje zarówno w obrębie 7-metyloguanozyny, jak i w pozycjach 2'- oraz N6-adenozyny. Zmiana statusu metylacji struktury m⁷G znacząco zwiększa oddziaływanie z białkiem IFIT1, podobnie jak niektóre aromatyczne podstawniki w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej zasady.

Największą grupę badanych związków stanowiły warianty wykazujące pośrednie wartości stałych dysocjacji, mieszczące się pomiędzy kap-0, a kap-1. Zbiór ten zawierał wszystkie rodzaje sprawdzanych modyfikacji, a obserwowane wartości K_D były uzależnione od konkretnej grupy funkcyjnej oraz przestrzennej konformacji, wpływającej na oddziaływanie z kieszenią wiążącą IFIT1. Zestaw analogów wykazujących niższe powinowactwo niż ludzki kap-1 składał się w dużej mierze z modyfikacji 2' reszty cukrowej adenozy. Wskazuje to na wysoki potencjał tego typu modyfikacji w kontekście modulowania reaktogenności cząsteczek mRNA o charakterze terapeutycznym i ich podatności na mechanizmy odpowiedzi interferonowej. Należy jednak podkreślić, że stałe dysocjacji dla niektórych wariantów o podobnych grupach funkcyjnych mogły znacznie się od siebie różnić, co podkreśla kluczową rolę struktury przestrzennej analogu oraz ładunku w oddziaływaniu z IFIT1. Warto również zauważyć, że układ immunologiczny człowieka składa się z wielu mechanizmów zapewniających kompleksową ochronę przed patogenami. Aby dogłębnie zbadać wpływ modyfikacji modulujących oddziaływanie z IFIT1 na biologiczną aktywność mRNA, potrzebne są dodatkowe eksperymenty w układach biologicznych. Niemniej jednak, opracowana metoda znajduje zastosowanie w badaniach mających na celu ustalenie zależności struktura-aktywność dla analogów kapu RNA o potencjale terapeutycznym i została wdrożona do procedur określania charakterystyki nowych analogów syntezowanych w firmie Explorna Therapeutics.

6. Wykrywanie dwuniciowych RNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem testu dot-blot

Terapeutyczne zastosowanie preparatów mRNA wymaga utrzymania najwyższych standardów w procesie syntezy RNA oraz kontroli jakości końcowych produktów. Jednym z głównych zagrożeń związanych z produkcją mRNA podczas transkrypcji *in vitro* (IVT) jest powstawanie ubocznych produktów w postaci dwuniciowego RNA (dsRNA). Zanieczyszczenia dsRNA, rozpoznawane przez układ odpornościowy jako obce i niebezpieczne, mogą wywoływać reakcje immunologiczne, w tym indukcję ekspresji cytokin (np. interferonu typu I), co może skutkować indukowaną odpowiedzią immunologiczną zahamowaniem translacji w komórce i znacząco obniżyć aktywność terapeutycznego mRNA. Cząsteczki dsRNA mogą powstawać podczas syntezy IVT na kilka sposobów, o czym więcej pisałem w części literaturowej. Aby ograniczyć ich rozpoznawanie przez receptory układu odpornościowego, takie jak TLR, stosuje się modyfikowane nukleotydy, takie jak 1-metylo-pseudourydyna, które skutecznie zmniejszają immunogenność dwuniciowych zanieczyszczeń. Dodatkowo, odpowiednie metody oczyszczania mRNA pozwalają na redukcję ilości dsRNA, minimalizując ryzyko aktywacji niepożądanych ścieżek immunologicznych. Jednak nawet mimo zastosowania tych środków, ocena zawartości dsRNA w końcowym produkcie mRNA jest niezbędna, aby zagwarantować jego bezpieczeństwo i skuteczność terapeutyczną.

Potrzeba kontrolowania zawartości dsRNA w preparatach mRNA została potwierdzona eksperymentem przeprowadzonym w firmie Explorna Therapeutics, w którym badano wpływ dsRNA na ekspresję białka ludzkiej erytropoetyny (hEPO) w modelu mysim (*in vivo*). Cząsteczki mRNA kodującego EPO, jak i dsRNA nie zawierały modyfikowanych nukleotydów. Zwierzęta podzielono na pięć grup: pierwsza otrzymała mRNA kodujące hEPO pozbawione dsRNA w ilości 1 µg, druga grupa otrzymała preparat zawierający 1 ng dsRNA i 1 µg mRNA, trzecia grupa 10 ng dsRNA i 1 µg mRNA, czwarta 100 ng dsRNA i 1 µg mRNA, natomiast piąta grupa otrzymała 1 µg dsRNA i 1 µg mRNA. Cztery godziny po dożylnym podaniu mRNA sformułowanego w LNP, pobrano krew od zwierząt i przeprowadzono ilościowy test ELISA w celu wykrycia ludzkiej erytropoetyny. Wyniki eksperymentu przedstawiono poniżej (Rys. 86).

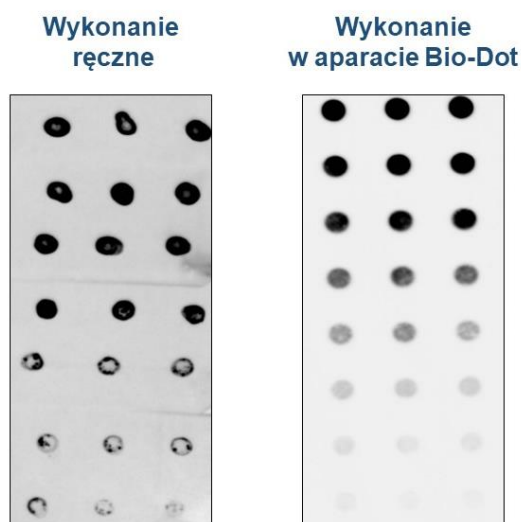


Rysunek 86. Wpływ obecności dsRNA w preparatach mRNA na poziom ekspresji białka erytropoetyny (EPO) u myszy po dożylnym podaniu mRNA sformułowanego w LNP. Jasnoniebieski kolor reprezentuje naturalny koniec 5' RNA, a granatowy kolor reprezentuje zmodyfikowany kap 5' RNA (m7Gppp^{Bn}AmpG). Kolumny przedstawiają ilościową ekspresję EPO, a wartości procentowe (w kolorze czerwonym) odnoszą się do poziomu ekspresji w grupie kontrolnej (mRNA bez dsRNA, ustalonej jako 100%)

Na podstawie przedstawionych wyników (Rys. 86) zaobserwowano wyraźny wpływ obecności dsRNA w preparatach mRNA na poziom ekspresji białka erytropoetyny (EPO) u myszy. W grupie kontrolnej, która otrzymała mRNA całkowicie pozbawione dsRNA, odnotowano najwyższą ekspresję EPO, przyjętą za 100%. W grupie, w której stosunek dsRNA do mRNA wynosił 1 ng dsRNA na 1 µg mRNA, ekspresja EPO dla mRNA z modyfikowanym końcem 5' RNA (granatowe kolumny po prawej stronie rysunku) spadła ponad 23-krotnie, co wskazuje na istotny wpływ nawet niewielkich ilości dsRNA na efektywność translacji w komórkach. Przy stosunku 10 ng dsRNA na 1 µg mRNA ekspresja obniżyła się 180-krotnie, natomiast przy 100 ng dsRNA na 1 µg mRNA ekspresja spadła ponad 550-krotnie. W przypadku grupy, w której zawartość dsRNA wynosiła 1 µg na 1 µg mRNA, ekspresja EPO była niemal niewykrywalna, co wskazuje, że nadmiar dsRNA praktycznie całkowicie blokuje syntezę białka. Wyniki te wyraźnie pokazują, że nawet śladowe ilości dsRNA w preparatach mRNA mogą znacząco obniżać wydajność translacji, a obecność większych ilości dsRNA praktycznie uniemożliwia ekspresję białka. Podkreśla to kluczowe znaczenie eliminacji zanieczyszczeń dsRNA z preparatów mRNA w celu zapewnienia wysokiej wydajności ekspresji białka oraz minimalizacji odpowiedzi immunologicznej, która może znacząco obniżać skuteczność terapii opartych na mRNA.

6.1 Optymalizacja procedury wykrywania dsRNA za pomocą testu dot-blot

W celu opracowania szybkiej i wiarygodnej metody oceny zanieczyszczeń dsRNA w preparatach mRNA, wybrałem technikę dot-blot. Jest to metoda hybrydyzacji, stosowana do detekcji białek oraz kwasów nukleinowych. Polega na unieruchomieniu badanego materiału na membranie, specyficznej hybrydyzacji z przeciwciałem lub sondą molekularną oraz detekcji sygnału chemiluminescencyjnego, który pojawia się w postaci kropek na membranie nitrocelulozowej lub nylonowej. Aby dostosować tę technikę do wykrywania dwuniciowych cząsteczek RNA, przeprowadziłem optymalizację procedury, uwzględniając dostosowanie ilości materiału RNA, wybór metody detekcji oraz odpowiedniego typu kontroli pozytywnej. Do detekcji zastosowano komercyjnie dostępne przeciwciała monoklonalne (anty-dsRNA J2), które specyficznie rozpoznają fragmenty

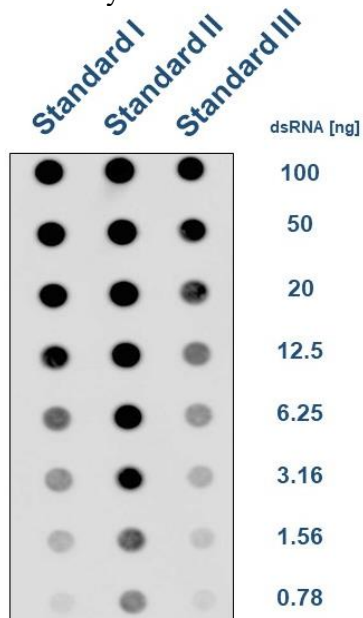


dsRNA o długości co najmniej 40 nukleotydów. Początkowo materiał RNA наносzono na membranę nylonową ręcznie, jednak w miarę rozwoju procedury zastosowano aparat Bio-Dot (Bio-Rad) z systemem wspomagania próżniowego. Wprowadzenie tego aparatu poprawiło powtarzalność analiz i zapewniło równomierne rozmieszczenie próbki RNA w określonych miejscach na membranie, a to przełożyło się na dokładniejsze szacowanie gęstości optycznej obrazu podczas detekcji oraz skróciło czas potrzebny do uzyskania wyniku (Rys. 87).

Rysunek 87 Porównanie metod nakładania próbek do testu dot-blot. Po lewej wykonanie ręczne, po prawej wykonanie przy użyciu aparatu Bio-Dot

6.2 Dobór kontroli pozytywnej w postaci markera dsRNA

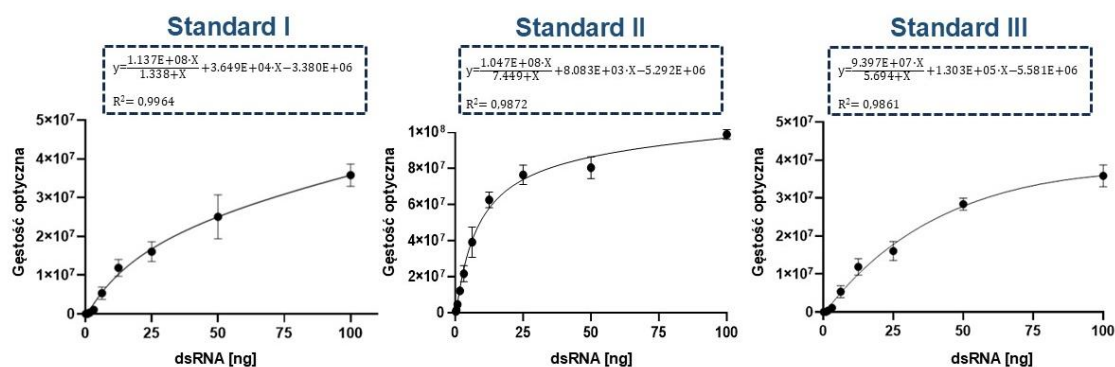
Opracowana metoda oceny jakości preparatów mRNA pod kątem zawartości immunogennych zanieczyszczeń wymagała zastosowania wewnętrznej kontroli, która potwierdziłaby prawidłowe działanie immunotestu oraz umożliwiła oszacowanie ilości dsRNA w badanych próbkach. W tym celu przeanalizowano trzy komercyjnie dostępne roztwory zawierające dwuniciowe RNA. Standard I (Abnova) składał się z mieszaniny 10 rodzajów dsRNA o długościach od 10 do 1000 nukleotydów, Standard II (NEB) zawierał mieszaninę 7 cząsteczek dsRNA o długościach od 20 do 500 nukleotydów, natomiast Standard III (Scicons) zawierał (poli(I:C)), syntetyczny analog dsRNA, powszechnie stosowany w badaniach nad układem immunologicznym. Dla wszystkich trzech kontroli przygotowano



8 roztworów poprzez seryjne, dwukrotne rozcieńczenia, zaczynając od 100 ng każdego standardu. Otrzymane roztwory, zawierające odpowiednio: 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,26 ng, 1,56 ng i 0,78 ng dsRNA, nałożono na membranę nylonową i utrwalono za pomocą światła UV, co indukowało tworzenie wiązań kowalencyjnych między RNA. Następnie membranę inkubowano z monoklonalnymi przeciwciałami J2 oraz przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP), która została wykorzystana do chemiluminescencyjnej detekcji dsRNA. Obraz membrany testu dot-blot uzyskany dla trzech badanych standardów dsRNA przedstawiono poniżej (Rys. 88).

Rysunek 88 Obraz membrany testu dot-blot, wykrywającego obecność dsRNA w trzech różnych standardach: Standard I (mieszanina 10 rodzajów dsRNA o długościach 10–1000 nt), Standard II (mieszanina 7 rozmiarów dsRNA 20–500 nt) oraz Standard III (syntetyczny analog dsRNA poli(I:C)). Na membranę naniesiono próbki dsRNA w zakresie od 100 ng do 0,78 ng, a następnie wykrywano przy użyciu przeciwciał oraz detekcji chemiluminescencyjnej

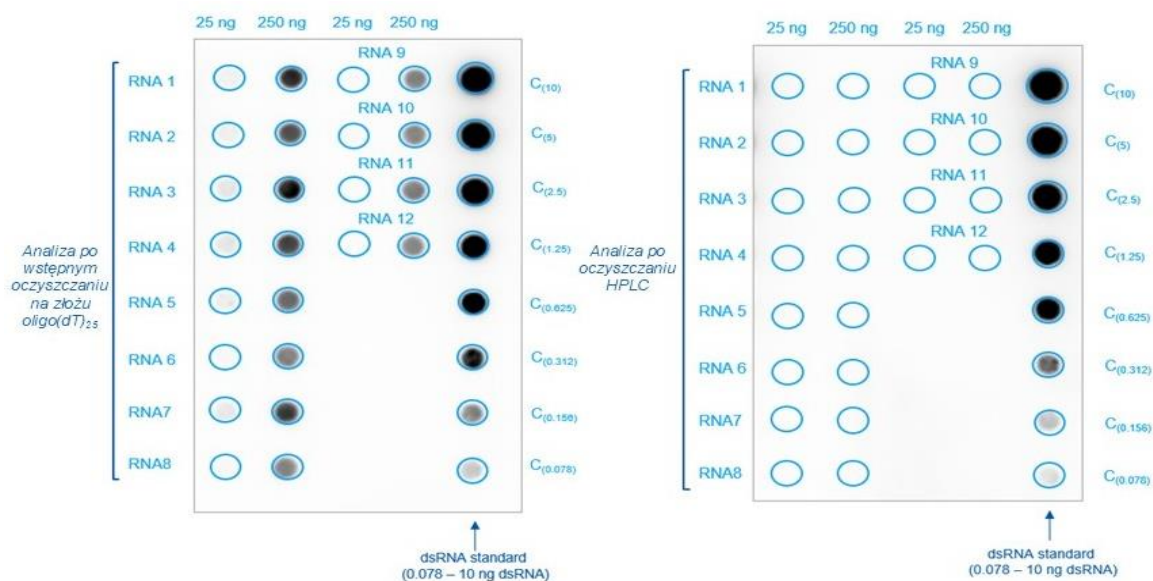
Wyraźne sygnały w postaci ciemnych kropek świadczą o skutecznym wykryciu struktur dwuniciowego RNA przez przeciwciała we wszystkich próbach kontrolnych. Malejące stężenia dsRNA były dobrze widoczne w gradiencie malejącej intensywności sygnałów. Aby dokładniej ocenić uzyskane wyniki, przeprowadzono cyfrowy pomiar gęstości optycznej przy użyciu programu CLIQS. Wyniki zostały zaprezentowane jako zależność uzyskanej intensywności sygnału od ilości dsRNA (0,78–100 ng) (Rys. 89).



Rysunek 89 Zależność intensywności sygnału chemiluminescencji od ilości dwuniciowego RNA (dsRNA) dla trzech standardów: Standard I (mieszanina dsRNA o długości 10–1000 nt), Standard II (mieszanina dsRNA o długości 20–500 nt) oraz Standard III (syntetyczny poli(I:C)). Wzrost gęstości optycznej świadczy o rosnącej ilości wykrywanego dsRNA

Dla wszystkich kontroli odnotowano krzywą wiązania z wysyceniem sygnału dla punktów zawierających najwyższe stężenia dsRNA ($R^2 > 0.98$) bazując na modelu wiązania z uwzględnieniem niespecyficznych oddziaływań oraz tła. Standard II wykazywał najwyższą intensywność sygnałów oraz zachowywał liniowy charakter dopasowania krzywej w zakresie punktów pomiarowych obejmujących najniższe stężenia dsRNA, co było kluczowe w detekcji nieznacznych ilości zanieczyszczeń w preparatach mRNA. Dlatego też kontrolę Standard II wybrano do rutynowych oznaczeń zawartości dsRNA w preparatach mRNA. Ze względu na wysycenie sygnału dla górnych punktów pomiarowych, zdecydowano o obniżeniu największej nakładanej ilości dsRNA do 10 ng, a to przełożyło się na obniżenie dolnej, testowanej ilości dsRNA do 0.078 ng. W trakcie rutynowych pomiarów próbek mRNA, obok stosowanej serii rozcieńczeń wzorca (Standard II), nakładano próbki RNA w ilości 25 ng oraz 250 ng, a uzyskane sygnały porównywano densytometrycznie z wartościami poszczególnych punktów pomiarowych standardu.

Przykład zastosowania opracowanej metody przedstawiono poniżej (Rys. 90). Dla serii 12 mRNA kodujących lucyferazę Firefly (Fluc) różniących się modyfikacją końca 5' RNA wykonano analizę zawartości dwuniciowego RNA (dsRNA) w próbkach zawierających 25 ng i 250 ng RNA. Preparaty były poddane wstępnemu oczyszczaniu na złożu oligo(dT)₂₅ lub pełnemu oczyszczaniu z wykorzystaniem oligo(dT)₂₅ oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wartości dsRNA porównano z krzywą wzorcową przygotowaną dla standardu dsRNA w zakresie wykrywalności wynoszącym 0,078–10 ng. Wyniki dla każdej próbki przedstawiono w przeliczeniu na procentową zawartość dsRNA w stosunku do całkowitej masy mRNA. Uzyskane rezultaty pozwoliły stwierdzić, że mRNA poddane wstępnemu oczyszczaniu na złożu oligo(dT)₂₅ zawierały zauważalne ilości dsRNA, szczególnie w próbkach o wyższej masie (250 ng), co wskazuje na obecność znaczących zanieczyszczeń w preparatach mRNA po IVT. Analiza próbek po oczyszczaniu HPLC wykazała znaczną redukcję zawartości dsRNA. W wielu przypadkach zawartość dsRNA była poniżej granicy wykrywalności (<0,078 ng dsRNA). Zastosowanie HPLC do oczyszczania jest kluczowe dla przygotowania wysokiej jakości mRNA, wolnego od dsRNA, co ma istotne znaczenie dla minimalizacji odpowiedzi immunologicznej i zapewnienia efektywności translacji w kontekście terapeutycznym.



mRNA	(dT) ₂₅ 25 ng mRNA	(dT) ₂₅ 250 ng mRNA	HPLC 25 ng mRNA	HPLC 250 ng mRNA
RNA1	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.312 ng dsRNA 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA2	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA3	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.312 – 0.625 ng dsRNA 1.25 – 2.50‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA4	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.312 ng dsRNA 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA5	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA6	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA7	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.312 ng dsRNA 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA8	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA9	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA10	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA11	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰
RNA12	<0.078 ng dsRNA <3.12‰	0.156 – 0.312 ng dsRNA 0.62 – 1.25‰	n.d. * <3.12‰	n.d. ** <0.31‰

n.d. – (nie wykryto) dsRNA nie występuje w analizowanej próbce lub jego zawartość jest poniżej granicy wykrywalności tej metody

* <0.078 ng dsRNA/25 ng naniesionego mRNA (<3.12‰)

** <0.078 ng dsRNA/250 ng naniesionego mRNA (<0.31‰)

Rysunek 90 Wyniki testu dot-blot wykrywającego dsRNA w próbkach mRNA poddanych wstępnemu oczyszczeniu na złożu (dT)₂₅ oraz oczyszczeniu za pomocą HPLC. Różne warianty mRNA oznaczono jako RNA1–RNA12. Poziomy dsRNA wyznaczano na podstawie zakresu krzywej wzorcowej standardu dsRNA (0.078–10 ng dsRNA). W tabeli przedstawiono ilościowe wyniki dla próbek o masie 25 ng i 250 ng mRNA, w tym limity wykrywalności (<0.078 ng dsRNA) oraz wyniki wyrażone w procentach względem całkowitej masy mRNA. Wyniki wskazują, że zawartość dsRNA w próbkach po oczyszczeniu HPLC była znacząco zredukowana.

6.3 Podsumowanie

Opracowana metoda szybkiej i taniej detekcji dwuniciowych cząsteczek RNA bazująca na teście dot-blot umożliwiła szacunkowe określanie zawartości dsRNA w syntezowanych roztworach mRNA. Przeprowadzone badania potwierdziły, że obecność zanieczyszczeń dsRNA w preparatach mRNA znacząco obniża efektywność translacji, co może wpływać na skuteczność terapii opartych na

mRNA. Usprawnienie procedury testu dot-blot poprzez wprowadzenie aparatu Bio-Dot poprawiło powtarzalność wyników i skróciło czas analizy. Ważnym aspektem metody było dobranie odpowiednich standardów dsRNA, które umożliwiały precyzyjne określanie zawartości dsRNA w badanych próbkach mRNA. Standard II (NEB), ze względu na najwyższą intensywność sygnałów i liniowy charakter dopasowania krzywej w zakresie niskich stężeń dsRNA, został wybrany jako referencja do rutynowych analiz. Metoda ta, dzięki swojej prostocie, wiarygodności i niezawodności, stała się kluczowym narzędziem do monitorowania jakości preparatów mRNA pod kątem immunogennych zanieczyszczeń dsRNA. Została również wdrożona na stałe do procedur kontroli jakości finalnych produktów mRNA w firmie Explorna Therapeutics.

7. Modyfikowane sekwencje ogona poli(A), jako element rozwoju technologii mRNA do zastosowań terapeutycznych

Skuteczność terapeutycznego zastosowania cząsteczek informacyjnego RNA (mRNA) zależy od cech strukturalnych, które wpływają zarówno na stabilność, jak i na procesy metaboliczne regulujące ich przetwarzanie w komórkach. Jednym z najistotniejszych elementów strukturalnych mRNA jest ogon poli(A), zlokalizowany na końcu 3' większości eukariotycznych cząsteczek mRNA. Ogon poli(A) pełni szereg funkcji, z których najważniejsze to ochrona mRNA przed enzymatyczną degradacją oraz wspomaganie inicjacji translacji poprzez ułatwienie wiązania rybosomów i syntezy białek. Jak dokładnie opisano w części literaturowej, długość ogona poli(A) jest dynamicznie regulowana i wpływa na stabilność mRNA oraz jego funkcjonowanie w komórce. Skrócenie ogona prowadzi do degradacji mRNA, zmniejszając tym samym produkcję białka, natomiast wydłużenie stabilizuje mRNA, wspierając dalszą syntezę białek. Z tego powodu rozwój narzędzi mRNA do zastosowań terapeutycznych wymaga szczególnej uwagi poświęconej modyfikacjom ogona poli(A).

Klasyczne podejście, oparte na wykorzystaniu długich sekwencji homoadeninowych na końcu 3' mRNA, ma pewne ograniczenia, w tym problemy związane z niestabilnością plazmidów kodujących mRNA oraz często niedostateczną wydajnością translacyjną w przypadku zastosowań leczniczych. Głównym celem moich badań skupionych wokół modyfikacji ogona poli(A) było opracowanie modyfikacji końca 3' cząsteczek mRNA, które umożliwiłyby rozwiązanie problemu niestabilności długich sekwencji homoadeninowych w matrycowym DNA kodujących mRNA oraz zwiększyły wydajność translacyjną transkrybowanych *in vitro* mRNA. Badania rozpocząłem od opracowania metody klonowania, umożliwiającej efektywne wydłużanie i modyfikację ogonów poli(A) w sekwencji plazmidowego DNA. Następnie zaprojektowałem trzynaście różnych modyfikacji nukleotydowych poli(A) mRNA, które wklonowałem do genów reporterowych Firefly lucyferazy (Fluc), białka fluorescencyjnego Kate2_PEST oraz ludzkiej erytropoetyny (EPO). Dodatkowo przygotowałem sześć wariantów referencyjnych, obejmujących: naturalny ogon poli(A) złożony wyłącznie z nukleotydów adeninowych, dwie sekwencje ogona poli(A) stosowane komercyjnie w szczepionkach przeciw wirusowi SARS-CoV2 (Pfizer-BioNTech oraz Moderna) zawierające wstawki dziesięcio- i pięcionukleotydowe, dwie modyfikacje opisane w literaturze, w których wprowadzono mononukleotydowy linker w środku ogona poli(A)³³⁴ oraz wariant z G-kwadrupleksem w końcowym fragmencie ogona poli(A). Matryce DNA zawierające wszystkie modyfikacje wykorzystałem do syntezy mRNA metodą transkrypcji *in vitro* (IVT). Otrzymane mRNA poddałem następnie analizom biofizycznym oraz badaniom w układach biologicznych *in vitro* w liniach komórkowych. Na podstawie uzyskanych rezultatów wytypowałem modyfikacje o najwyższym potencjale terapeutycznym, które następnie zostały przetestowane w organizmach żywych *in vivo* (model myszy).

7.1 Synteza cząsteczek mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poli(A)

Opracowanie strukturalnych modyfikacji mRNA, mających na celu poprawę stabilności na poziomie matryc DNA oraz zwiększenie efektywności ekspresji białek w organizmach żywych, wymagało przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań nad różnymi wariantami sekwencji ogona poli(A). W tym celu zaprojektowano 13 różnych modyfikacji oraz 6 konstruktów referencyjnych, które umożliwiły wielopoziomowe porównanie wyników uzyskanych dla nowych modyfikacji względem naturalnych oraz komercyjnie stosowanych, modyfikowanych wariantów końca 3' mRNA. Zaprojektowane modyfikowane sekwencje 3'-końcowe zakupiono w postaci syntetycznych fragmentów DNA, które następnie wklonowano do wektorów plazmidowych pJet oraz pUC57 kodujących trzy geny reporterowe i poddano sekwencjonowaniu DNA metodą Sangera. Pierwszym białkiem była lucyferaza Firefly (Fluc) o krótkim czasie półtrwania wynoszącym około 4 godzin, która umożliwia badania poziomów ekspresji białek w układach biologicznych z wykorzystaniem pomiarów chemiluminescencyjnych. Drugim reporterem było białko czerwonej fluorescencji mKate2, zawierające dodatkową sekwencję PEST, która kierowała białko na szlak degradacji w peroksysomach, co znacząco skracało jego czas półtrwania w komórkach. Zastosowanie białek o krótkim czasie półtrwania miało na celu dostarczenie bardziej szczegółowych informacji na temat dynamiki i efektywności działania cząsteczek mRNA w układach biologicznych, co jest kluczowe w kontekście ich terapeutycznego zastosowania. Poziom ekspresji białka mKate2 w komórkach monitorowano za pomocą przyżyciowych pomiarów fluorescencyjnych. Matryce DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poddano analizom stabilności w dwóch szczepach bakteryjnych. Celem tych badań było ustalenie, czy wprowadzone zmiany strukturalne wpłyną na stabilizację konstruktów zawierających sekwencje homoadeninowe podczas amplifikacji plazmidowych wektorów DNA w bakteriach. Po zakończeniu syntezy, czystość uzyskanych mRNA została przeanalizowana za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym oraz chromatografii HPLC, co umożliwiło dokładną ocenę profili oczyszczonych preparatów. Dodatkowo, wykorzystując opracowaną metodę wykrywania dwuniciowych zanieczyszczeń mRNA (dsRNA) za pomocą immunotestu dot-blot, omówioną w drugim zadaniu badawczym (Rozdział 6), przeprowadzono kontrolę jakości wszystkich syntezowanych wariantów mRNA pod kątem immunogennych zanieczyszczeń dsRNA. Ostatecznie, próbki mRNA dla wszystkich modyfikacji zostały poddane sekwencjonowaniu metodą NanoPore DRS, co pozwoliło na weryfikację pełnej zgodności modyfikacji 3'-końcowych mRNA z zaprojektowanymi strukturami na poziomie matryc DNA.

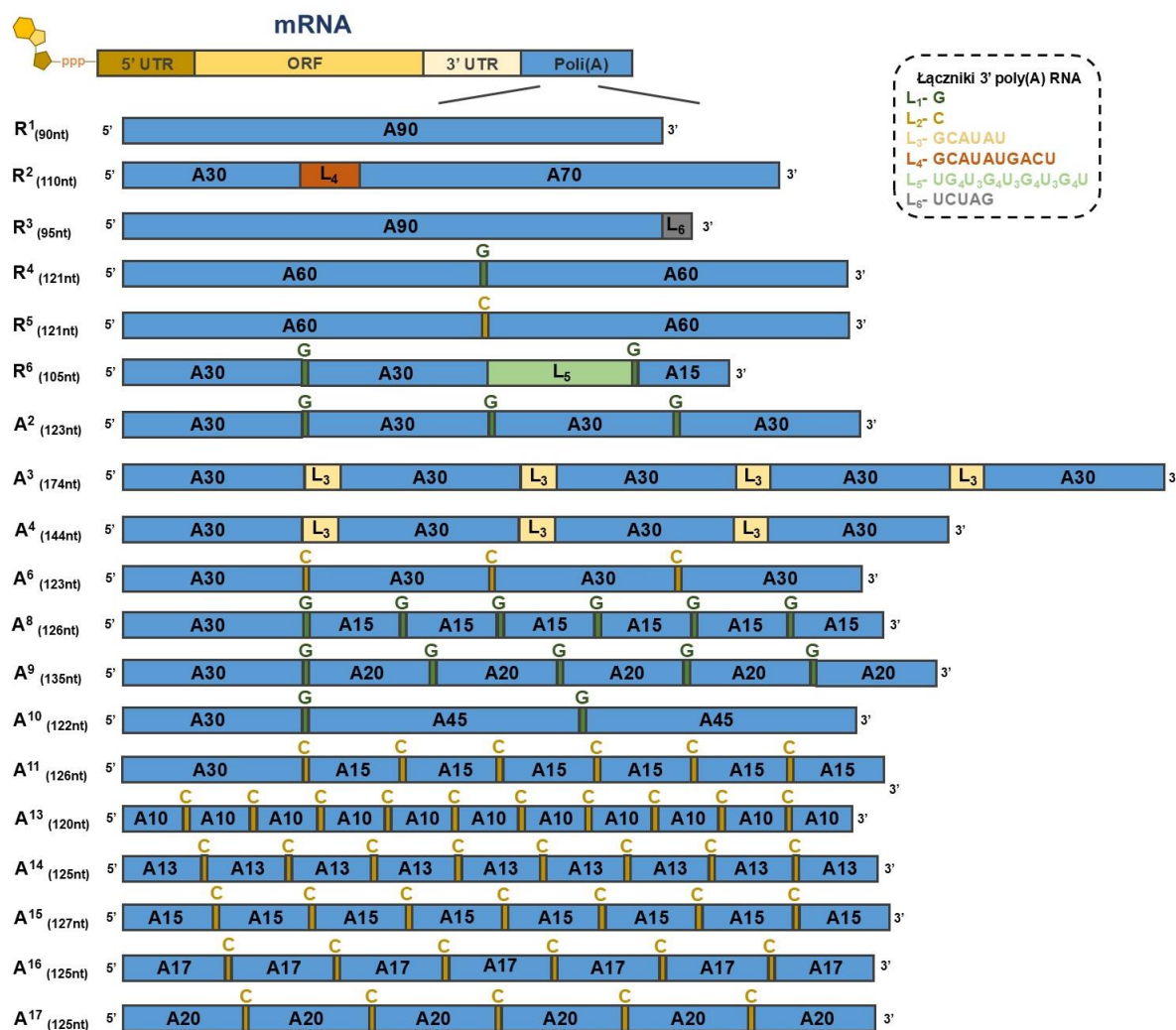
7.1.1 Projektowanie konstruktów genetycznych dla zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych

Przygotowanie wszystkich wariantów końca 3' mRNA rozpoczęto od konstrukcji 19 sekwencji oligonukleotydowych, które wykorzystano następnie do wbudowania pożądanych modyfikacji w obręb wektorów plazmidowych DNA. Zaprojektowane sekwencje 3'-końcowe cząsteczek mRNA przedstawiono skrótowo na poniżej (Rys. 91).



Rysunek 91 Schemat struktury modyfikowanej sekwencji 3'-końcowej mRNA. Elementy oznaczone jako M, M¹, M², M³ i M⁴ (kolor niebieski) reprezentują motywy adeninowe o długości od 10 do 35 nukleotydów, natomiast elementy oznaczone jako L¹, L², L³ i Lⁿ (kolor żółty) symbolizują łączniki heteronukleotydowe o długości od 1 do 6 nukleotydów. Segmenty w nawiasach n wskazują powtarzalne elementy sekwencji, których liczba wynosi od 0 do 15.

Każda 3'-końcowa sekwencja cząsteczki mRNA składała się z 10 do 35 nukleotydów adeninowych, oddzielonych łącznikami heteronukleotydowymi złożonymi z jednego do sześciu nukleotydów. Taki układ tworzył segmentowane sekwencje 3'-terminalne składające się z trzech do osiemnastu fragmentów (Rys. 91). Przykładowa budowa modyfikacji 3'-końcowej dla wariantu oznaczonego jako A² obejmowała: fragment 30 kolejnych adenin, po którym następował łącznik składający się z mononukleotydu guaniny (G), 30 kolejnych adenin, drugi łącznik guaninowy (G), 30 kolejnych adenin, trzeci łącznik guaninowy (G) kończący się 30 kolejnymi adeninami. Pozostałe warianty zostały utworzone analogicznie do powyższego opisu ze zmianą liczby kolejnych adenin w każdym motywie i liczby nukleotydowych łączników (Rys. 92).



Rysunek 92 Schemat przedstawiający różne modyfikacje sekwencji poli(A) na końcu 3' cząsteczek mRNA. Warianty różnią się liczbą reszt adeninowych oraz obecnością różnorodnych łączników między segmentami ogona poli(A). Konstrukty zawierają zarówno standardowe homosekwencje poli(A), jak i heterosekwencje z wprowadzonymi łącznikami mononukleotydowymi (L₁-L₆) lub G-kwadrupleksem (L₃), umożliwiającymi badanie stabilności i efektywności translacyjnej mRNA. Szczegóły dotyczące łączników i długości poszczególnych fragmentów adeninowych przedstawiono w legendzie po prawej stronie

Wybór takich sekwencji był podyktowany założeniem, że segmentowane struktury ogona poli(A), zawierające adeninowe motywy o różnej długości, przedzielone heteronukleotydowymi łącznikami, mogą pozytywnie wpłynąć na stabilność cząsteczek mRNA oraz ich potencjał translacyjny. Hipoteza badawcza opierała się na wcześniejszych doniesieniach literaturowych wskazujących, że zmiany w długości ogona poli(A) oraz obecność dodatkowych elementów strukturalnych, takich jak linkery heteronukleotydowe, mogą modyfikować interakcje mRNA z białkami wiążącymi poli(A),

takimi jak PABP. Zakładano, że takie sekwencje mogłyby zwiększać stabilność mRNA w cytoplazmie, minimalizując procesy deadenyacji, jednocześnie poprawiając wydajność translacji poprzez optymalizację wiązania z rybosomami. Ostateczny wybór zakresu długości motywów adeninowych (10–35 A) oraz łączników heteronukleotydowych (1–6 nt) został dokonany w celu zachowania równowagi między stabilnością, a ograniczeniem możliwości powstawania niekorzystnych struktur drugorzędowych. Taka konstrukcja pozwalała na ocenę zależności między długością oraz kompozycją poszczególnych fragmentów a funkcjonalnymi właściwościami mRNA, co mogłoby dostarczyć praktycznych wskazówek dla projektowania cząsteczek mRNA o zwiększonej efektywności terapeutycznej.

Oprócz modyfikowanych cząsteczek mRNA zawierających zmienione sekwencje 3'-końcowe, przygotowałem również cząsteczki referencyjne, reprezentujące obecnie stosowane w komercyjnie dostępnych szczepionkach modyfikacje ogona poli(A). Zawierały one mRNA z ogonem poli(A) składającym się z 90 nukleotydów adeninowych (R¹), co stanowiło najdłuższą niezmodyfikowaną sekwencję poli(A), którą udało się powtarzalnie amplifikować w plazmidowym DNA w moich badaniach, bez obserwowalnego skracania ogona poli(A). Innym odniesieniem była modyfikacja zbudowana z sekwencji 30 kolejnych adenin, po której następował 10-nukleotydowy łącznik (GCATATGACT), a następnie 70 kolejnych adenin (R²), która została zastosowana w szczepionce Comirnaty Pfizer-BioNTech BNT162b2 anty-COVID mRNA.³²⁹ Trzecia zastosowana referencja (R³) to sekwencja 90 kolejnych adenin zakończona motywem pentanukleotydowym (TCTAG), która została zastosowana w szczepionce Moderna mRNA-1273 anty-COVID mRNA.³⁶⁹ Przygotowano również dwie modyfikacje referencyjne zawierające pojedynczy łącznik w środku ogona poli(A). Wariant R⁴ składał się z 60 kolejnych adenin, po których następował mononukleotydowy łącznik guaniny (G), a następnie 60 kolejnych adenin, podczas gdy wariant R⁵ (Rys. 85) składał się z 60 kolejnych adenin, po których następował mononukleotydowy łącznik cytozyny (C), zakończony przez 60 kolejnych adenin, jak opisano w pracy Trepotec et al. (2019).³³⁴ Dodatkowy wariant (R⁶) reprezentował alternatywną modyfikację zawierającą wewnątrzcząsteczkową strukturę G-kwadrupleksu. Wariant R6 składał się z sekwencji 30 kolejnych reszt adeninowych, mononukleotydowego łącznika guaninowego, 30 kolejnych adenin oraz struktury G-kwadrupleksu, zakończonej 15 adeninami na końcu 3'. Zastosowanie takiego układu pozwalało na porównanie efektu biologicznego zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych z bardziej ustrukturyzowanym ogonem poli(A) (Rys. 92).³⁷⁰

7.1.2 Przygotowanie plazmidowych matryc DNA dla zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych

Matryce DNA, które posłużyły do syntezy mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi, przygotowano na bazie plazmidowych wektorów DNA. W tym celu wykorzystano syntetyczne dwuniciowe oligonukleotydy (Tabela 7) oraz matryce DNA kodujące geny Fluc, mKate2 oraz EPO.

Tabela 7. Zestawienie komplementarnych sekwencji oligonukleotydów DNA użytych do przygotowania modyfikowanych sekwencji poli(A) w wariantach mRNA.

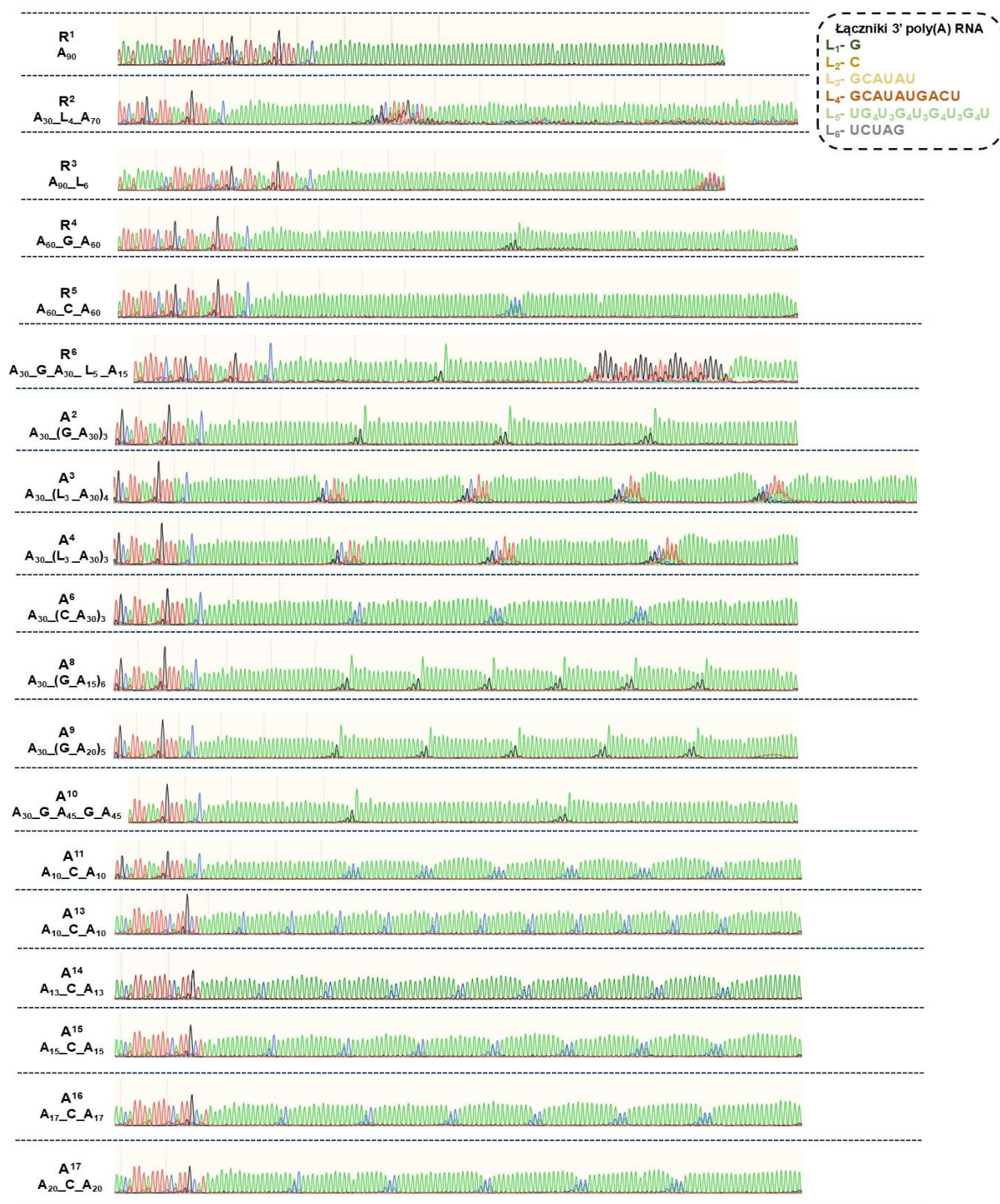
Mod	Sekwencja oligonukleotydów DNA	
R ¹	Starter F	AA
	Starter R	TT
R ²	Starter F	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA
	Starter R	TTTAGTCATATGCTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
R ³	Starter F	AATCTAG
	Starter R	CTAGATTT
R ⁴	Starter F	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTT
R ⁵	Starter F	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTT
R ⁶	Starter F	AAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGGGTT TGGGGTTGGGGTTGGGGTAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTT
A ²	Starter F	AAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTCTT
A ³	Starter F	AAGCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG CATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATA TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATGCTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTATATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATGCTT
A ⁴	Starter F	AAGCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG CATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATGCTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTATATGCTT
A ⁶	Starter F	AACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTGT
A ⁸	Starter F	AAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA AAAAAAGAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTT TTTTTTCTT
A ⁹	Starter F	AAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAA AAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAA AAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTCTTTT TTTTTTTTTTTTTTCTT
A ¹⁰	Starter F	AAGAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTCTT
A ¹¹	Starter F	AACAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAACAAAAAA AAAAAACAAAAAAAAAAAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTT TTTTTTTGT
A ¹³	Starter F	TAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA AACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTT GTTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTT
A ¹⁴	Starter F	TAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA AAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTT TTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTT
A ¹⁵	Starter F	TAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA AAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTT TTTTTTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT
A ¹⁶	Starter F	TAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAA AAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGT TTGTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT
A ¹⁷	Starter F	TAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAA AAAAAACAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACAAAA
	Starter R	TTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTGT TTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT

Oba składniki zostały sklonowane metodą tępych końców oraz ligacji, a uzyskana mieszanina reakcyjna wykorzystana do transformacji stabilnych, chemokompetentnych bakterii. W wyniku transformacji otrzymano pojedyncze kolonie bakteryjne, które posłużyły do izolacji docelowych plazmidów zawierających sekwencje kodujące modyfikacje 3'-końcowe, zgodnie z procedurą opisaną w części eksperymentalnej. Ogólny schemat procesu otrzymywania plazmidowych wektorów DNA z pożądanymi modyfikacjami przedstawiono poniżej (Rys. 93).



Rysunek 93 Schemat procesu klonowania modyfikowanych sekwencji 3'-terminalnych: ligacja DNA, selekcja klonów, analiza żelu agarozowego oraz końcowe sekwencjonowanie DNA

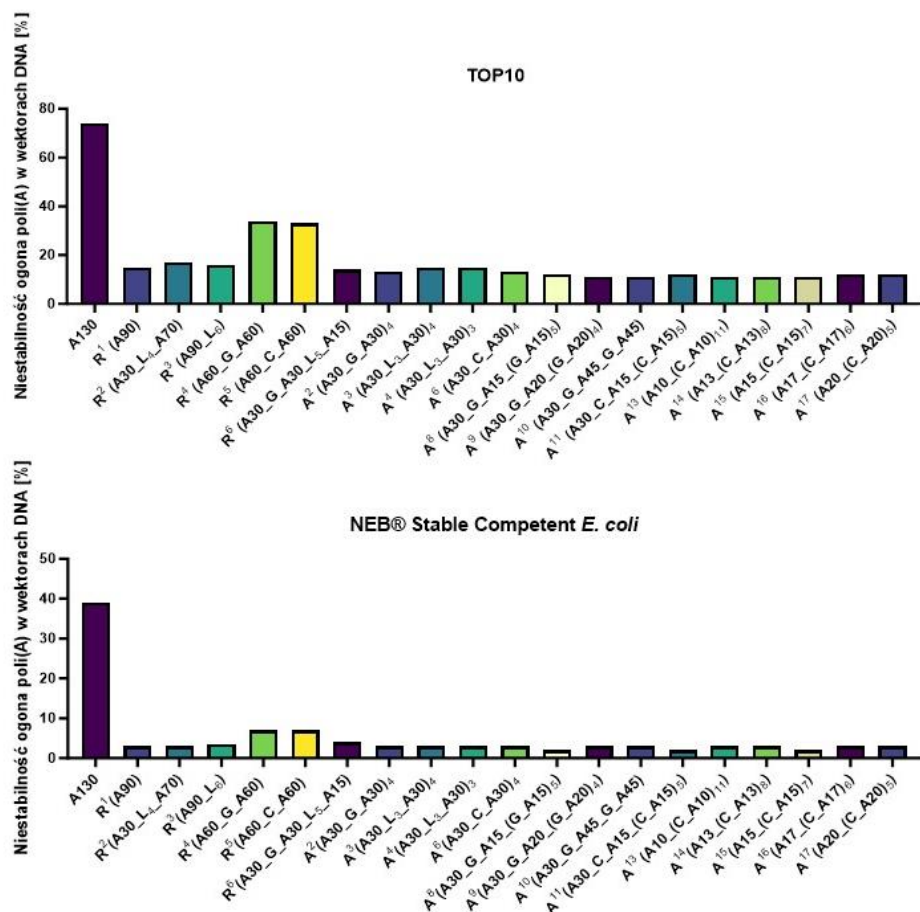
Zastosowana metoda klonowania tępych końców umożliwiła wprowadzenie wszystkich zaprojektowanych wstawek oligonukleotydowych do sekwencji genów reporterowych. Jednakże, wydajność tego procesu była niska i wynosiła około 8%. Było to spowodowane nieprawidłowym zamykaniem się części wektorów, które nie przyjęły wstawki, odwrotnym wbudowywaniem wstawek, prowadzącym do uzyskiwania sekwencji ogonów poli(T) na poziomie DNA, jak również wbudowywaniem dwóch lub więcej wstawek, co prowadziło do nadmiernego wydłużenia ogona poli(A). Oczyszczone z pojedynczych kolonii bakteryjnych plazmidy, po etapie selekcji klonów, trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI i AarI, a następnie analizowano na żelu agarozowym. Uzyskane fragmenty DNA, w zależności od obecności dodatkowej wstawki, różniły się swoją pozycją na żelu względem markera. Pozwoliło to na wstępny wybór potencjalnych pozytywnych transformantów. Dokładność wbudowania sekwencji DNA potwierdzono poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger (zlecanie w firmie Genomed). Metoda Sanger polega na syntezie różnych długości DNA na bazie jednoniciowych DNA (ssDNA) uzyskiwanych poprzez denaturację nici DNA. Do ssDNA dołączany jest starter, a cały proces zachodzi z udziałem polimerazy DNA, która włącza dideoksynukleotydy (ddNTP), znakowane odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi, które pozwalają na identyfikację nukleotydu, na którym zakończyła się synteza nici DNA. Wynik stanowiły chromatogramy przedstawiające szereg pików w czterech kolorach, odpowiadających zidentyfikowanym nukleotydów. Przedstawione rezultaty sekwencjonowania (Rys. 94) dla wszystkich referencyjnych oraz modyfikowanych ogonów poli(A) wyraźnie ukazują wbudowane łączniki heteronukleotydowe, jak również umożliwiają dokładne określenie długości zarówno poszczególnych motywów adeninowych, jak i całego zmodyfikowanego ogona poli(A).



Rysunek 94. Elektroferogramy przedstawiają profile sekwencji badanych wariantów ogonów poli(A), zawierających modyfikacje strukturalne, takie jak wstawki nukleotydowe i struktury G-kwadrupleksu. Warianty R¹–R⁶ to referencyjne sekwencje ogona poli(A), natomiast A²–A¹⁷ obejmują różne wstawki i modyfikacje. Kolorowe piki odpowiadają zasadom nukleotydowym: adeninie (zielony), cytozynie (niebieski), guaninie (czarny) i tyminie (czerwony).

7.1.3 Analiza stabilności plazmidowych wektorów DNA kodujących modyfikowane sekwencje 3'-końcowe ogonów poli(A)

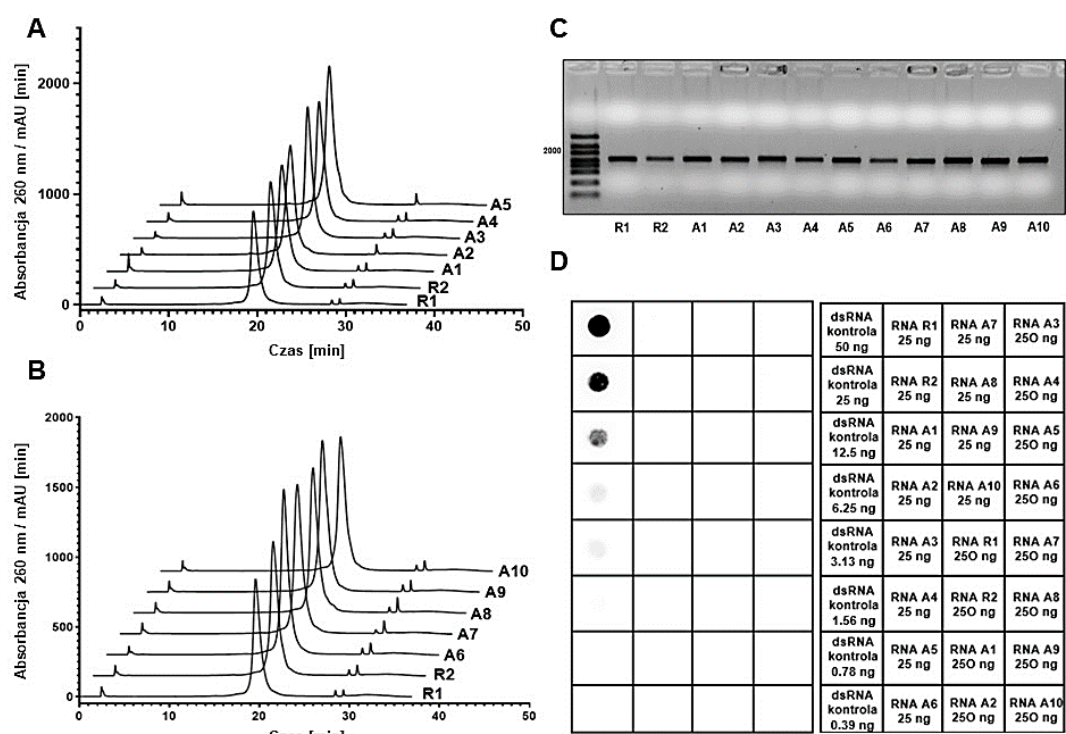
Wektory plazmidowe DNA kodujące geny reporterowe wraz ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poddano szczegółowej analizie pod kątem potencjalnego skracania ogonów poli(A) podczas amplifikacji w systemach bakteryjnych. Stabilność konstruktyw na poziomie DNA ma kluczowe znaczenie, ponieważ wszelkie zmiany sekwencji na etapie namnażania matrycy mogą bezpośrednio wpłynąć na jakość i funkcjonalność uzyskanego następnie mRNA. Zjawisko skracania ogonów poli(A), najczęściej wynikające z błędów polimerazy DNA, prowadzi do powstawania konstrukcji z krótszymi ogonami poli(A), zwykle o długości około 30 reszt adeninowych, co może negatywnie wpłynąć na wydajność translacyjną mRNA. Wykorzystanie tak powstałej matrycy do syntezy mRNA prowadzi do otrzymania heterogennego produktu mRNA oraz uniemożliwia wiarygodne badania biologiczne takich preparatów. Dlatego też modyfikacje projektowane były pod kątem zwiększenia ich stabilności w systemach do namnażania plazmidowego DNA. Oceny stabilności dokonano poprzez analizę sekwencji DNA (Sanger) plazmidów oczyszczonych z trzydziestu niezależnie wyizolowanych pojedynczych kolonii bakteryjnych uzyskanych po transformacji dla każdego ze zmodyfikowanych wariantów oraz referencji w dwóch różnych systemach bakteryjnych. Wyniki przedstawiono, jako odsetek kolonii ze zmienionymi (skróconymi) sekwencjami względem oryginalnej sekwencji kodującej modyfikację 3'-końcową mRNA (Rys. 95). Zgodnie z oczekiwaniami, plazmid zawierający poli(A) ogon składający się wyłącznie z adenin (o długości około 130 reszt A) wykazał największą liczbę kolonii zmutowanych pod względem długości lub sekwencji ogona w porównaniu do oryginalnego konstruktów. To zjawisko uniemożliwiło uzyskanie stabilnego plazmidu o pożądanej długości ogona poli(A). W przeciwieństwie do tego, klasyczny ogon poli(A) reprezentowany przez referencję R¹ (o długości 90 A), a także referencje R² i R³, wykazywały bardzo podobny poziom stabilności, z prawidłową sekwencją ogona poli(A) zachowaną w znacznie większej proporcji klonów w porównaniu do plazmidu zawierającego 130 adenin w ogonie poli(A). Z drugiej strony, referencje R⁴ i R⁵, które reprezentowały ogony poli(A) zawierające pojedynczy heteronukleotyd w środku sekwencji 3'-końcowej, wykazywały zmniejszoną stabilność w porównaniu do referencji R¹-R³. Wstawienie pojedynczego heteronukleotydu po 60 kolejnych adeninach w sekwencji ogona poli(A), zastosowane w wariantach R⁴ i R⁵, obniżyło stabilność konstruktyw, co potwierdziła liczba klonów zmutowanych, ze skróconymi lub zmienionymi sekwencjami poli(A). Z kolei amplifikacja plazmidowego DNA zawierającego sekwencje kodujące mRNA z innymi zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi (A², A³, A⁴, A⁶, A⁸, A⁹, A¹⁰, A¹¹, A¹³, A¹⁴, A¹⁵, A¹⁶, A¹⁷) wykazała wysoką zgodność powstałych cząsteczek z oryginalnymi konstrukcjami. Stabilność tych plazmidów była istotnie wyższa niż w przypadku konstruktyw R⁴, R⁵ oraz porównywalna względem referencji R¹, R² i R³. Problem niestabilności plazmidów był nadal obserwowany w pewnym stopniu w standardowym szczepie *E.coli* Top10. Jednak zastosowanie handlowo dostępnych bakterii NEB® Stable Competent *E.coli* (High Efficiency) doprowadziło do niemal całkowitego wyeliminowania zjawiska utraty pełnej długości ogona poli(A) podczas amplifikacji DNA w bakteriach dla większości zmodyfikowanych wariantów (Rys. 95).



Rysunek 95 Porównanie poziomu niestabilności ogona poli(A) w wektorach plazmidowych DNA w dwóch szczepach bakterii: TOP10 oraz NEB® Stable Competent E. coli. Wartości niestabilności przedstawiono jako procentowy udział klonów o zmienionej długości lub sekwencji poli(A) w stosunku do oryginalnej sekwencji

5.1.4 Transkrypcja *in vitro* i oczyszczanie mRNA zawierających zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe

Namnożone w procesie amplifikacji plazmidy DNA zostały oczyszczone i zlinearyzowane, a następnie wykorzystane do syntezy cząsteczek mRNA kodujących geny Fluc, mKate2 oraz EPO w procesie transkrypcji *in vitro* (IVT). Uzyskane mRNA oczyszczono wstępnie z wykorzystaniem handlowo dostępnego złoża powinowactwa Poros oligo dT₍₂₅₎, które selektywnie wychwytyje mRNA posiadające poliadenylowany ogon poli(A) przy użyciu prostych etapów oczyszczania i elucji z użyciem soli i wody. Finalnie preparaty oczyszczono z wykorzystaniem systemu RP-HPLC, jak opisano w części eksperymentalnej. Na podstawie uzyskanych wyników syntezy i oczyszczania oraz przeprowadzonych analiz kontroli jakości stwierdzono, że zastosowanie zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych nie wpłynęło negatywnie na wydajność reakcji transkrypcji IVT; uzyskano podobne ilości mRNA dla wszystkich testowanych wariantów ze średnią wydajnością 3,2 µg mRNA na 1 µl reakcji IVT. Podobnie, modyfikacje nie miały wpływu na proces oczyszczania RNA przy użyciu żywicy oligo (dT)₂₅ i HPLC. Proces ten pozwolił uzyskać dobrej jakości preparaty mRNA charakteryzujące się wysoką czystością oraz całkowitym brakiem dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA). Zostało to potwierdzone podczas oczyszczania HPLC, poprzez analizę żelu agarozowego i analizę dsRNA dot-blot dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi, jak również wariantami referencyjnymi (Rys. 96).

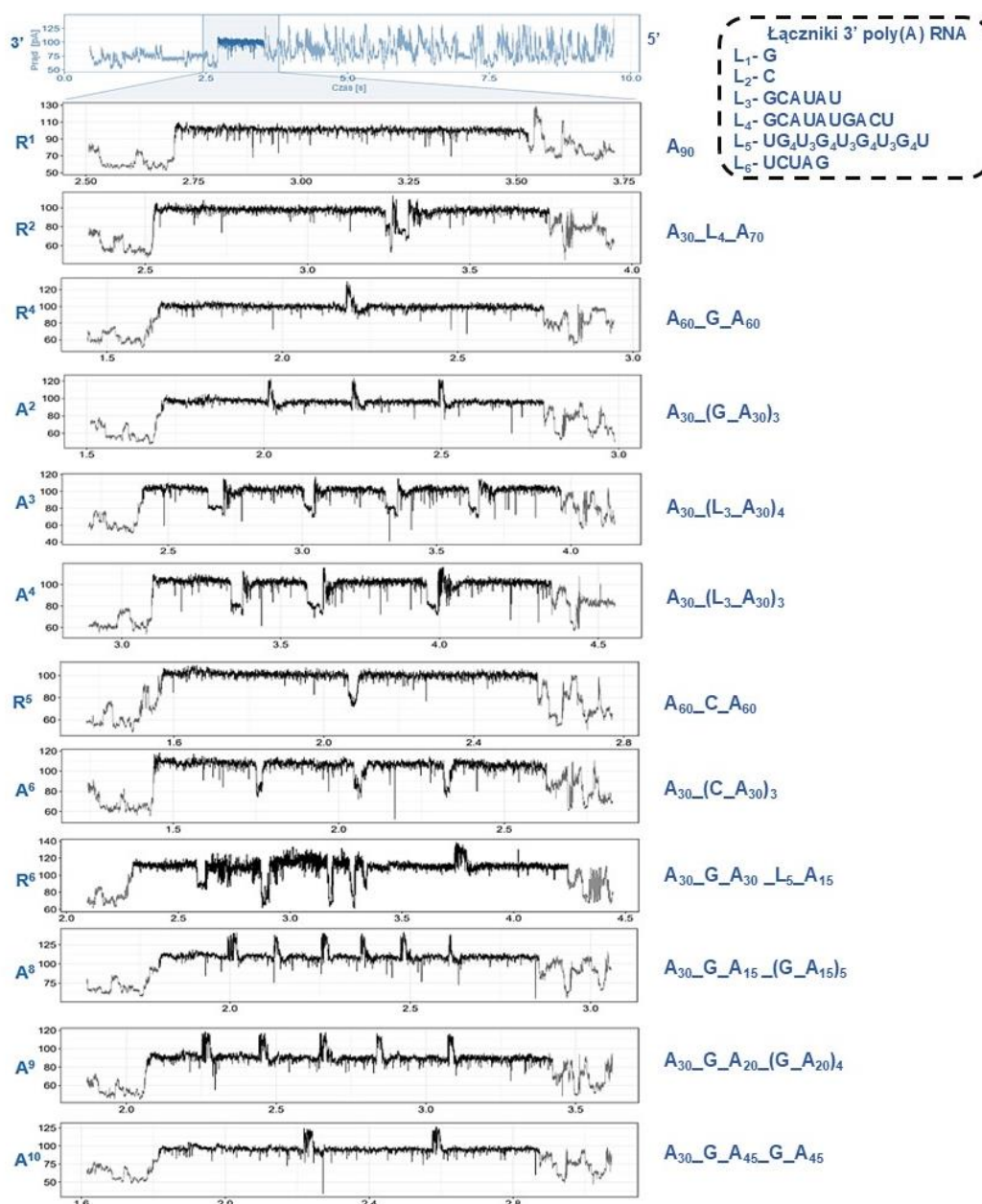


Rysunek 96 Profil oczyszczania i analiza czystości mRNA. (A, B) Chromatogramy HPLC oczyszczanych cząsteczek mRNA z różnymi modyfikacjami 3'-końcowymi, przedstawiające czas retencji dla wariantów R1-R2 oraz A1-A10. (C) Analiza czystości preparatów mRNA przeprowadzona na żelu agarozowym. (D) Test dot-blot wykrywający dwuniciowe zanieczyszczenia dsRNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem przeciwciała J2

7.1.5 Sekwencjonowanie NanoPore DRS zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych mRNA

Preparaty mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi dla wszystkich wariantów Fluc i mKate2 zostały poddane sekwencjonowaniu metodą bezpośredniego sekwencjonowania RNA NanoPore DRS (ang. *direct RNA sequencing*), które przeprowadził dr Paweł Krawczyk (IIMCB), zgodnie z opisem w części eksperymentalnej. Sekwencjonowanie NanoPore DRS opiera się na regulowanym przez helikazę ruchu natywnego RNA przez nanopor białkowy. Identyfikacja poszczególnych nukleotydów następuje poprzez zmiany prądu występujące w porach pod wpływem przyłożonego napięcia przy przepływającym RNA. Ta sygnatura jest następnie przekształcana w sekwencję nukleotydów RNA dla poszczególnych nici przez sieć neuronową wyszkoloną na różnych próbkach RNA. Wykorzystanie metody Nanopore do analizy sekwencji RNA umożliwiło bezpośredni i bardzo dokładny pomiar składu sekwencji ogona poli(A) w każdym wariantcie mRNA (Rys. 97). Wynik stanowiły wykresy odzwierciedlające zmiany natężenia prądu (oś odciętych) w czasie (oś rzędnych) powodowane przez kolejne analizowane nukleotydy. Sekwencjonowanie potwierdziło obecność długiego łańcucha adeninowego w mRNA z ogonem A₉₀ (R¹) dając postać niezaburzonego natężenia prądu w całym analizowanym zakresie. Z kolei dla wariantu R² uzyskano obraz składający się z dwóch motywów adeninowych przedzielonych linkerem, na co wskazuje wyraźne i długie zaburzenie natężenia prądu, pokrywające się z zaplanowaną sekwencją DNA tego modelu. Analizując warianty A² oraz A⁶ odnotowano trzy pojedyncze skokowe zmiany natężenia prądu dla obu modyfikacji, jednak różniły się one zwrotem powstałego zaburzenia. Doskonale koresponduje to z zastosowanymi łącznikami, gdyż dla A² stosowano nukleozyd guaninowy, a dla A⁶ nukleozyd cytozynowy. Metoda

dowodnia obecności zaprojektowanych łączników nukleotydowych w obrębie 3'-końcowych sekwencji mRNA wszystkich badanych zmodyfikowanych wariantów (A^2 - A^{10}) oraz potwierdziła prawidłowe sekwencje pozostałych referencji. Wprowadzenie heteronukleotydów do sekwencji poli(A) spowodowało charakterystyczne zmiany w natężeniu prądu, co umożliwiło precyzyjne określenie rodzaju oraz długości łącznika w każdej z sekwencji. Analiza odczytów sekwencjonowania metodą DRS potwierdziła pełną zgodność sekwencji mRNA zawierających zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe z sekwencjami matryc DNA. Wyniki dla badanych wariantów (R^1 - R^6 oraz A^2 - A^{10}) przedstawiono poniżej (Rys. 97).



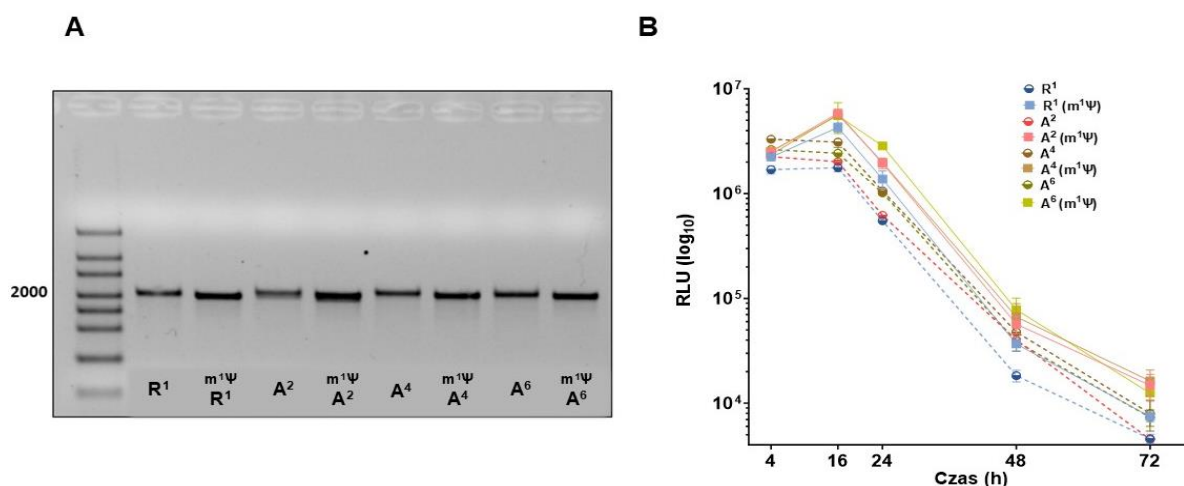
Rysunek 97 Odczyty sekwencjonowania DRS dla wybranych wariantów mRNA zawierających zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe. Każdy wykres przedstawia zmiany natężenia prądu w czasie dla różnych wariantów ogonów poli(A) z wbudowanymi heteronukleotydami. Wartości skokowe w natężeniu odzwierciedlają obecność heteronukleotydów w strukturze ogona poli(A), co umożliwiło dokładną identyfikację typów i długości łączników w poszczególnych wariantach mRNA. Oznaczenia L₃-L₅ odnoszą się do linkerów heteronukleotydowych.

7.2 Funkcjonalna charakterystyka *in vitro*, badanie poziomu ekspresji białka zmodyfikowanych 3'-końcowych mRNA w liniach komórkowych

Preparaty mRNA zawierające zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe, jak również wszystkie warianty referencyjne, poddano badaniom efektów biologicznych w modelu komórkowym (*in vitro*). Wstępną charakterystykę testowanych modyfikacji w połączeniu z genem reporterowym Fluc przeprowadziłem z wykorzystaniem czterech różnych linii komórkowych (A549, HEK293T, HepG2 i Jaws II), obejmujących zarówno mysie (JAWSII), jak i ludzkie komórki (A549, HEK293T, HepG2), w tym komórki nowotworowe (HepG2, A549, HEK293T) oraz komórki układu odpornościowego (JAWS II) we współpracy z dr Karolem Czubakiem (Warszawski Uniwersytet Medyczny). Badania w linii komórkowej HEK293T przeprowadzono także dla genu mKate2_PEST we współpracy z grupą badawczą prof. Andrzeja Dziembowskiego (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej). Eksperymenty obejmowały transfekcję cząsteczek mRNA do komórek, po której następował pomiar poziomu białka reporterowego w określonych punktach czasowych (najczęściej po 4 h, 16 h, 24 h i 48 h), co szczegółowo opisano w części eksperymentalnej. W przypadku genu Fluc pomiary polegały na odczycie sygnału chemiluminescencji powstałego poprzez dodanie do komórek substratu BrightGlo (zawierającego syntetyczny analog lucyferyny), umożliwiającego powstawanie emisji świetlnej w reakcji z lucyferazą kodowaną przez mRNA. Dla genu mKate2_PEST pomiary były wykonywane poprzez rejestrowanie sygnału fluorescencji emitowanej przez białko czerwonej fluorescencji mKate2, syntetyzowane w komórkach na podstawie wprowadzonego mRNA.

7.2.1 Badanie wpływu 1-metylo-pseudourydyny na poziom ekspresji białka w HEK293T

W pierwszym eksperymencie, z wykorzystaniem mRNA kodującego Fluc, zbadano wpływ powszechnie stosowanej w terapeutycznych preparatach RNA 1-metylo-pseudourydyny ($m^1\Psi$) jako zamiennika klasycznej urydyny (U) na proces oczyszczania oraz poziom ekspresji białka Fluc w ludzkiej linii komórek nabłonkowych nerki HEK293T. Zastosowanie $m^1\Psi$ ogranicza powstawanie dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) w trakcie IVT, jak również utrudnia rozpoznanie cząsteczki mRNA przez elementy układu odpornościowego. To z kolei bezpośrednio przekłada się na obniżenie odpowiedzi immunologicznej pacjenta w kontakcie z takim materiałem, a to znacząco zmniejsza ryzyko wystąpienia działań niepożądanych w trakcie terapii. Do realizacji eksperymentu przygotowano mRNA dla czterech wariantów: R^1 , A^2 , A^4 i A^6 w wersji z urydyną oraz z $m^1\Psi$. Podczas procesu oczyszczania, próbki zawierające $m^1\Psi$ wykazywały wyższą czystość na poszczególnych etapach, co ostatecznie przełożyło się na wyższą wydajność uzyskaną dla wariantów zawierających 1-metylo-pseudourydynę. Widoczne na elektroforegramie (Rys. 98) różnice w migracji odpowiadających sobie próbek dla wariantów z urydyną i 1-metylo-pseudourydyną wynikają z różnic w wypadkowym ładunku cząsteczek mRNA zawierających U i $m^1\Psi$. Jest to konsekwencja różnic w kwasowości tych nukleozydów – uracyl wykazuje wyższą kwasowość, co związane jest z obecnością bardziej reaktywnej grupy NH w jego pierścieniu.



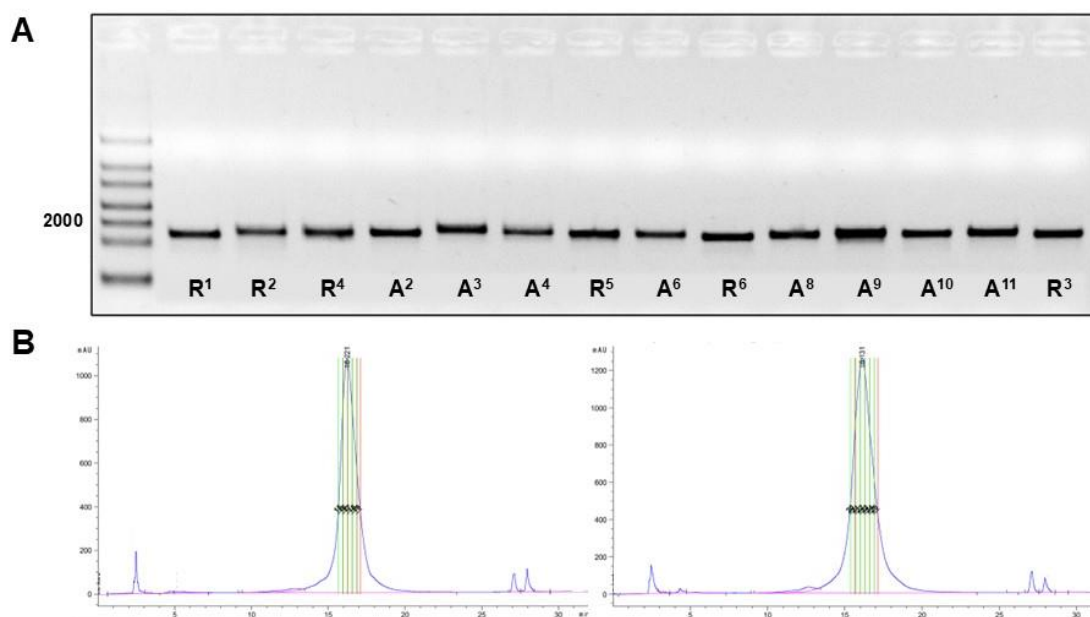
Rysunek 98 Analiza czystości i ekspresji białka dla wariantów mRNA zawierających 1-metylo-pseudourydynę ($m^1\Psi$) i urydynę (U). A) Elektroforegram dla badanych próbek mRNA po oczyszczaniu, potwierdzający ich wysoką homogenność oraz integrację $m^1\Psi$ (o czym świadczy przesunięcie sygnałów na żelu dla RNA z $m^1\Psi$, względem odpowiadających im modyfikacji z U). B) Wykres przedstawiający kinetykę ekspresji białka Fluc w komórkach HEK293T mierzoną w jednostkach RLU (ang. relative light units) w określonych punktach czasowych (4 h, 16 h, 24 h, 48 h i 72 h)

Poziom ekspresji białka Fluc określono w pięciu punktach czasowych pomiędzy 4 a 72 godziną od momentu transfekcji. Wykres B (Rys, 98) przedstawia kinetykę poziomu białka Fluc dla poszczególnych wariantów mRNA zawierających U i $m^1\Psi$. Uzyskane dane jednoznacznie wskazały na wyższy poziom ekspresji białka Fluc w przypadku modyfikacji zawierających 1-metylo-pseudourydynę. Efekt ten zaobserwowano dla wszystkich czterech badanych modyfikacji ogona poli(A). Mimo uzyskania porównywalnych poziomów sygnału po 4 godzinach dla wszystkich badanych mRNA, dalsze punkty czasowe wykazały wyraźną przewagę w ilości syntetyzowanego białka na korzyść wariantów zawierających 1-metylo-pseudourydynę. Warto dodać, że mimo wyższej produkcji białka dla mRNA z $m^1\Psi$ w późniejszych punktach czasowych, ogólny trend kinetyki dla wszystkich mRNA pozostawał bardzo podobny. Zastosowanie $m^1\Psi$ zamiast urydyny pozwoliło zminimalizować ryzyko artefaktów wynikających z obecności śladowych ilości zanieczyszczeń, które w przypadku urydyny mogą powodować efekty biologiczne, takie jak inhibicja procesu translacji. Takie zaburzenia znacząco obniżają wiarygodność wyników, ponieważ różnice w profilach zanieczyszczeń badanych RNA mogą prowadzić do błędnych interpretacji. Biorąc pod uwagę te ograniczenia oraz dominujące trendy w badaniach naukowych, w których 1-metylo-pseudourydyna jest powszechnie stosowana w opracowywanych terapiach mRNA, do dalszych eksperymentów wykorzystano wyłącznie mRNA zawierające $m^1\Psi$.

7.2.2 Badanie stabilności mKate2_PEST mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w HEK293T

Kluczowym elementem skutecznej terapii opartej na mRNA jest odpowiedni czas półtrwania cząsteczek mRNA w komórkach. Tylko mRNA, które zachowuje stabilność i pozostaje dostępne do procesu translacji przez odpowiednio długi czas, może zagwarantować ekspresję białka na poziomie zapewniającym wystarczający efekt terapeutyczny. W celu określenia czasu funkcjonowania mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w żywych komórkach, zaprojektowano eksperyment wykorzystujący gen reporterowy mKate2_PEST. Sekwencja PEST odpowiada za kierowanie białka mKate2 z cytoplazmy do peroksysomów, gdzie ulega degradacji, co przekłada się na bardzo krótki czas półtrwania tych białek w komórce (liczący około 2 godzin). Umożliwia to oszacowanie czasu półtrwania

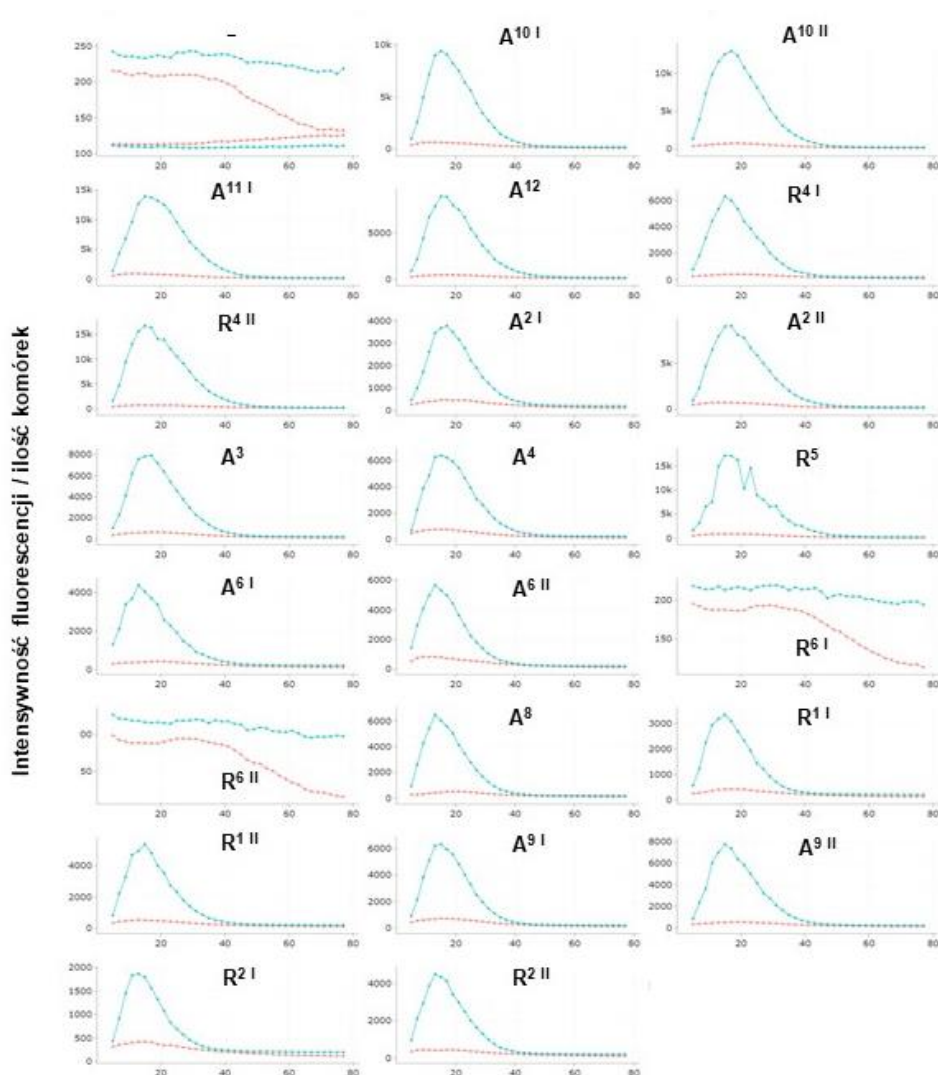
cząsteczek mRNA kodujących to fluorescencyjne białko. Do realizacji eksperymentu przygotowano mRNA dla sześciu wariantów referencyjnych (R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6) oraz ośmiu modyfikacji (A^2 , A^3 , A^4 , A^6 , A^8 , A^9 , A^{10} , A^{11}). Syntezę molekuł mRNA przeprowadzono za pomocą IVT, a następnie oczyszczono standardowym protokołem z wykorzystaniem złoża oligo (dT)₂₅ i RP-HPLC, jak opisano w części eksperymentalnej. Elektroforegram dla finalnych próbek (Rys. 99) potwierdził wysoką jednorodność wszystkich preparatów. Dodatkowo, przedstawiono również przykładowe chromatogramy z procesu oczyszczania za pomocą HPLC z zaznaczonymi na zielono frakcjami, które zostały wybrane i połączone po zakończeniu rozdzału.



Rysunek 99 A) Elektroforegram dla finalnych próbek mRNA, potwierdzająca ich wysoką jednorodność. B) Przykładowe chromatogramy z procesu oczyszczania HPLC, z zaznaczonymi frakcjami (zielone linie), które zostały wybrane i połączone po zakończeniu rozdzału

Gotowe preparaty mRNA kodujące mKate2_PEST wprowadzono do ludzkich komórek epitelialnych nerki (HEK293T). Poziom ekspresji białka badano w punktach czasowych pomiędzy 4 a 72 godziną od momentu transfekcji. Detekcję przeprowadzono poprzez zautomatyzowane, mikroskopowe pomiary fluorescencji. Wynik stanowiły zależności intensywności fluorescencji białka mKate2 powstałego w badanych komórkach, uwzględniające ilość analizowanych komórek w funkcji czasu. Pomiary przeprowadzono czterokrotnie, wykonując za każdym razem niezależną transfekcję komórek. Reprezentatywne przykłady wyników dla wszystkich analizowanych modyfikacji przedstawiono poniżej (Rys. 100). Dla wybranych wariantów przedstawiono również wyniki pochodzące z dwóch niezależnych syntez mRNA. Uzyskane dane wskazywały na wyraźną ekspresję białka mKate2_PEST we wszystkich badanych wariantach z wyłączeniem referencji R⁶, posiadającej strukturę G-kwadrupeksu na końcu 3' mRNA, która wpłynęła negatywnie na proces translacji. Co ciekawe, najwyższy poziom białka czerwonej fluorescencji dla wszystkich modyfikacji obserwowano po 18 godzinach od transfekcji, a całkowity zanik sygnału następował po upływie około 40 godzin. Pomimo istotnych różnic w intensywności obserwowanej fluorescencji pomiędzy poszczególnymi modyfikacjami a referencjami, nie zaobserwowano wyraźnych różnic w czasie zaniku sygnału pomiędzy nimi. Sugeruje to zbliżony czas półtrwania badanych cząsteczek mRNA w komórkach HEK293T oraz porównywalne tempo degradacji wszystkich wariantów mRNA. Wyniki te wskazują, że wprowadzone modyfikacje sekwencji 3'-końcowych mRNA nie miały istotnego wpływu na stabilność

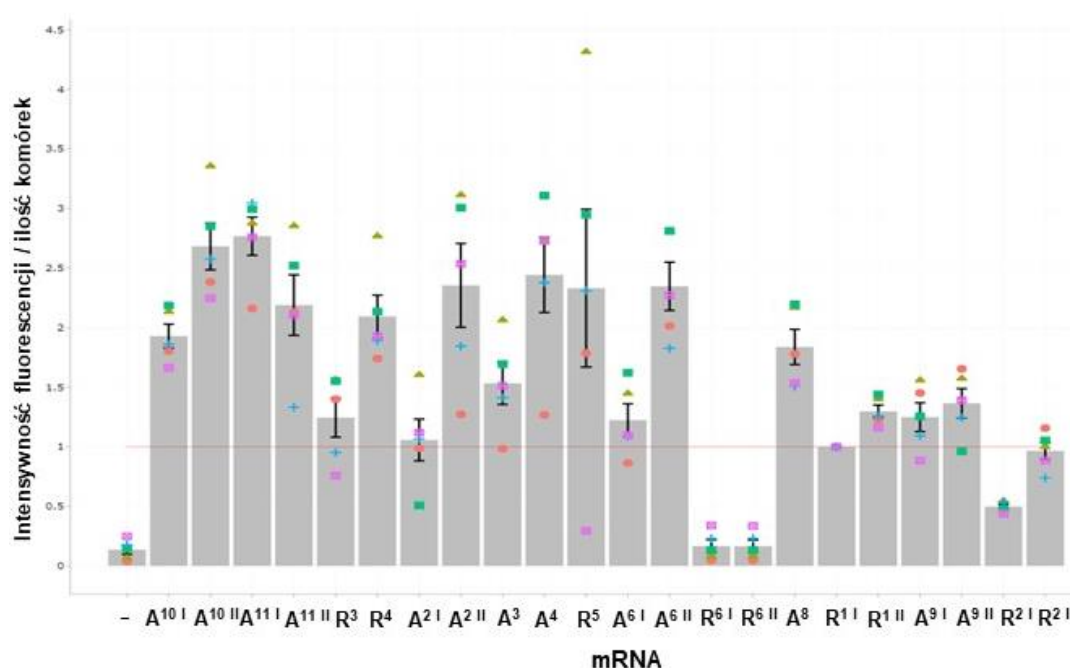
transkryptów w żywych komórkach. Niemniej jednak, analiza wydajności translacji wykazała, że niektóre warianty znacząco poprawiły efektywność syntezy białka w porównaniu z referencyjnymi cząsteczkami mRNA (R). W szczególności warianty oznaczone jako A³, A¹⁰ i A¹¹ wykazały najbardziej korzystny efekt, generując odpowiednio 2-krotnie, 2,5-krotnie oraz 3,5-krotnie większą ilość białka w porównaniu z mRNA referencyjnymi (R¹ i R²). Wariant A¹¹ okazał się najwydajniejszy, co sugeruje, że zastosowana modyfikacja sekwencji 3'-końcowej może przyspieszać proces translacji, zwiększając efektywność wykorzystania mRNA w syntezie białka (Rys. 100).



Rysunek 100 Rozkład poziomu białka mKate2_PEST w czasie (oś x to czas wyrażony w godzinach) w komórkach HEK293T od momentu transfekcji dla różnych modyfikacji 3'-terminalnych sekwencji mRNA. Wykresy przedstawiają intensywność fluorescencji, odzwierciedlającą poziom białka mKate2_PEST (linia niebieska) w różnych punktach czasowych dla wszystkich analizowanych wariantów mRNA. Wyniki uzyskano przez dr Kamilę Afek (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej) na aparacie FLUOstar Omega.

Wyniki uzyskane dla czterech powtórzeń eksperymentu przedstawiono w postaci całkowitego sygnału uzyskanego dla poszczególnych modyfikacji (Rys. 101). Analiza danych wykazała znaczącą przewagę w intensywności sygnału dla wariantów modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych, w szczególności dla A¹⁰ oraz A¹¹, które osiągnęły najwyższe poziomy ekspresji białka w porównaniu z pozostałymi wariantami oraz referencjami. Wariant A¹⁰ wykazał 2,1-krotnie wyższą intensywność fluorescencji w stosunku do referencji R¹, natomiast wariant A¹¹ osiągnął 2,3-krotnie wyższy poziom,

co podkreśla ich wyjątkową wydajność w procesie translacji. Dodatkowo, oba warianty (A^{10} i A^{11}) przewyższały wyniki uzyskane dla referencji komercyjnych R^2 i R^3 , a także wykazywały istotną przewagę nad wariantami referencyjnymi R^4 i R^5 , które posiadały pojedyncze heteronukleotydy w środku ogona poli(A). Warto jednak zauważyć, że referencja R^5 uzyskała wyniki porównywalne z niektórymi modyfikowanymi wariantami, takimi jak A^4 i A^6 , co może sugerować, że specyficzne struktury ogona poli(A) odgrywają istotną rolę w procesie translacji. W przypadku niektórych wariantów, takich jak A^2 i R^5 , odnotowano znaczne rozrzuty w intensywności fluorescencji, które mogły być spowodowane zarówno czasem przechowywania preparatów mRNA przed pomiarami, jak i samą metodą detekcji. Zastosowanie automatycznej mikroskopii fluorescencyjnej wymagało użycia płytek wielodołkowych (384-dołkowych), co mogło zwiększyć margines błędu związanego z rozcieńczeniami mRNA oraz wielkością próby. Mimo tych ograniczeń, eksperyment ten potwierdził wysoki potencjał modyfikowanych 3'-końcowo cząsteczek mRNA w kontekście zwiększenia poziomu ekspresji białek w układach biologicznych (Rys. 101).

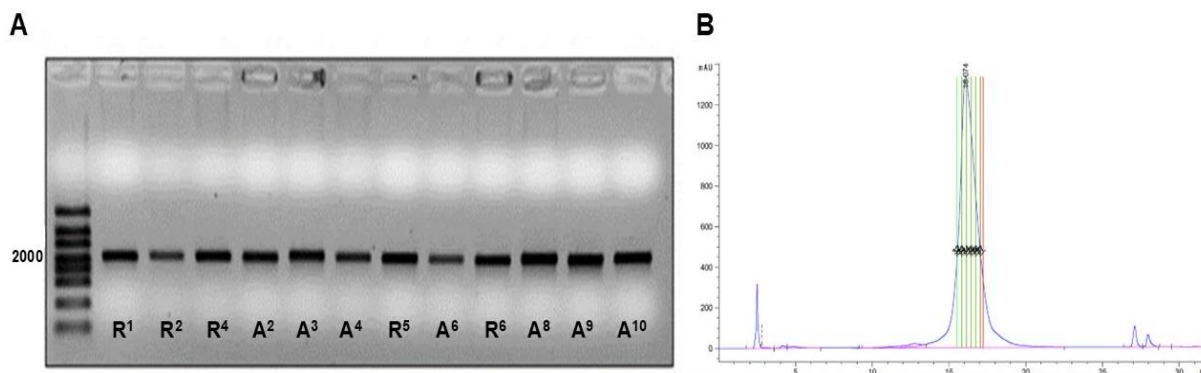


Rysunek 101 Porównanie intensywności fluorescencji mKate2_PEST (w przeliczeniu na liczbę komórek) dla różnych wariantów mRNA w czterech powtórzeniach eksperymentu. Kolumny przedstawiają średnie wartości intensywności fluorescencji uzyskane dla poszczególnych wariantów mRNA, natomiast punkty reprezentują wyniki indywidualnych powtórzeń. Oznaczenia I i II odnoszą się do dwóch niezależnych syntez mRNA dla poszczególnych wariantów, które zostały przeprowadzone i analizowane jako odrębne próby w ramach tego eksperymentu.

7.2.3 Badanie poziomu ekspresji białka z zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w liniach A549, HEK293T, HepG2 oraz JAWS II

Kolejnym etapem badań funkcjonalnych *in vitro* były eksperymenty określające poziom ekspresji białka reporterowego Fluc dla wszystkich zaprojektowanych mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w czterech liniach komórkowych. Do badań wybrano ludzkie komórki raka płuc (A549), ludzkie komórki epitelialne nerki (HEK293T), ludzkie komórki nowotworu wątrobowo-komórkowego (HepG2) oraz mysie niedojrzałe komórki dendrytyczne (JAWS II). Dobór tak szerokiego spektrum badanych komórek umożliwił dokładną analizę wpływu stosowanych modyfikacji na odmienne strukturalnie oraz funkcjonalnie układy żywych komórek. Badania składały się z trzech eksperymentów, w pierwszym określono poziom białka Fluc dla pierwotnego zestawu modyfikacji (A^2

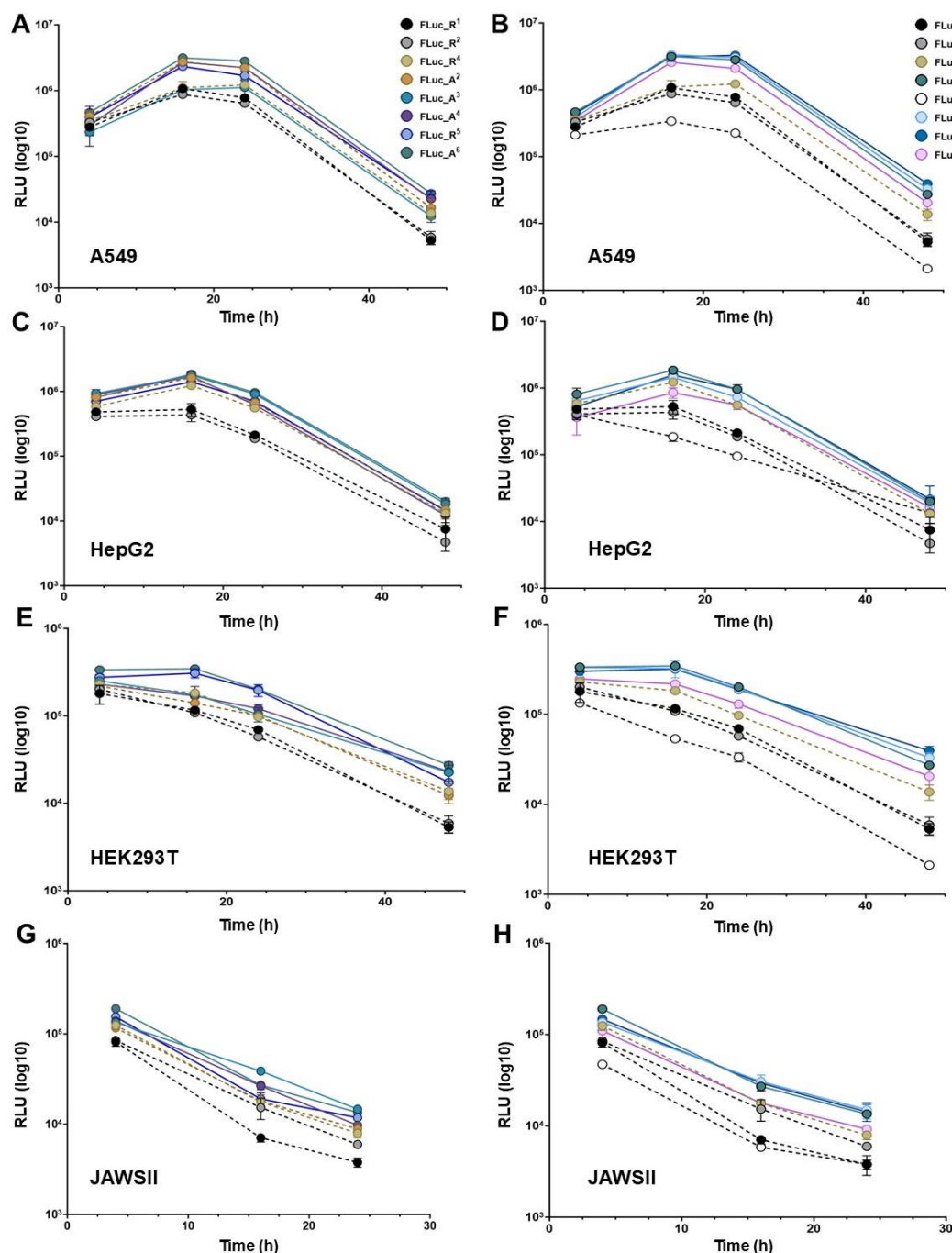
- A¹⁰), w drugim porównano wyróżniające się modyfikacje z uzyskanym w późniejszym czasie wariantem A¹¹, a w trzecim poddano analizie ostatni zestaw modyfikacji (A¹³ - A¹⁷), posiadający zmienioną sekwencją 5' końca ogona poli(A). Dla wszystkich eksperymentów mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-terminalnymi przygotowano w procesie IVT i oczyszczono zgodnie z protokołem opisanym w części eksperymentalnej. Elektroforegram uzyskany dla wariantów (A² - A¹⁰) oraz przykładowy chromatogram z oczyszczania metodą RP-HPLC, które potwierdziły wysoką czystość badanych preparatów przedstawiono poniżej (Rys. 102). Cząsteczki mRNA wprowadzono do komórek wszystkich czterech linii komórkowych, a detekcję przeprowadzano za pomocą pomiarów chemiluminescencyjnych wykonywanych 4, 16, 24, 48 i 72 godziny od transfekcji.



Rysunek 102 Analiza czystości preparatów Fluc mRNA ze zmodyfikowanymi ogonami poli(A). A) Żel agarozowy przedstawiający profil elektroforetyczny mRNA dla różnych wariantów, potwierdzający ich wysoką homogenność. B) Chromatogram HPLC z zaznaczonymi frakcjami (kolor zielony), które zostały wybrane i połączone po zakończeniu procesu rozdzielania, świadczący o wysokiej czystości analizowanych próbek mRNA

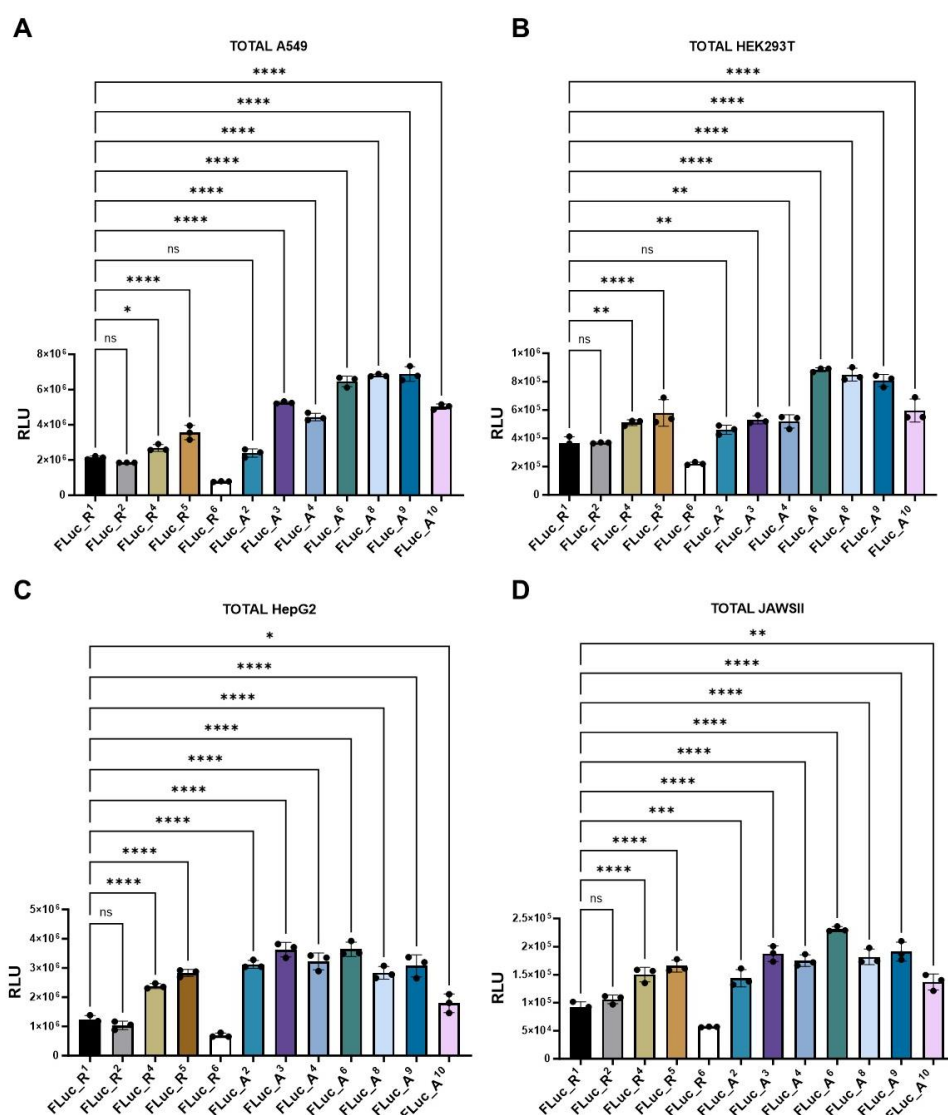
Dane liczbowe dotyczące kinetyki ekspresji białka Fluc dla modyfikacji A² - A¹⁰ przedstawiono poniżej (Rys. 103) w postaci wykresów intensywności sygnału względnej chemiluminescencji określanej w jednostkach RLU (*ang. relative luminescence unit*) w funkcji czasu. Dynamika produkcji białka dla poszczególnych modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych była podobna we wszystkich liniach komórkowych, przy czym najwyższe poziomy białka reporterowego odnotowywano najczęściej po 16 i 24 godzinach od transfekcji. Analiza wyników wykazała, że zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe (w szczególności warianty A³, A⁶, A⁸, A⁹ i A¹⁰) znacznie przewyższały poziom ekspresji białka w porównaniu z wariantami referencyjnymi R¹ i R², niezależnie od linii komórkowej i momentu pomiaru. Najwyższe poziomy ekspresji białka reporterowego w linii A549 były obserwowane dla wariantów A⁸ i A⁹, które po 16 i 24 godzinach od transfekcji wykazywały 2-3-krotnie wyższe poziomy sygnału w stosunku do referencji R¹. W komórkach JAWS II kinetyka produkcji białka wykazywała pewne różnice – najwyższe poziomy odnotowano już w najwcześniejszym punkcie czasowym (4 godziny po transfekcji), co podkreśla dynamiczniejszy charakter ekspresji w tej linii. Warianty A³, A⁶ oraz A⁹ ponownie wykazały wyraźną przewagę, osiągając wyższe poziomy fluorescencji w porównaniu do wszystkich referencji. Sekwencje zmodyfikowane, takie jak A⁶ i A⁹, wykazywały stabilniejszą ekspresję białka przez cały okres trwania eksperymentu, co sugeruje, że zastosowane modyfikacje sprzyjają zarówno wydajności translacji, jak i stabilności mRNA. Chociaż referencyjne warianty R⁴ i R⁵, zawierające pojedyncze heteronukleotydy, wykazywały wyższe poziomy ekspresji białka niż R¹ i R², ich wydajność pozostawała niższa w porównaniu z większością zmodyfikowanych wariantów, szczególnie w późniejszych punktach czasowych. Wariant R⁶, zawierający strukturę G-kwadrupleksu, wykazywał natomiast wyraźnie niższą wydajność translacji, co podkreśla ograniczenia tej struktury w kontekście efektywności translacji mRNA. Najbardziej efektywne warianty zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych, takie jak A⁶, A⁸ i A⁹, przewyższały pozostałe pod

względem zarówno poziomu ekspresji białka, jak i jego stabilności w czasie. W szczególności, w późniejszych etapach eksperymentu (24 i 48 godzin od transfekcji), różnice między zmodyfikowanymi wariantami, a referencjami stawały się jeszcze bardziej widoczne. Warianty referencyjne R¹, R², R⁴ i R⁵ wykazywały stopniowy spadek wydajności, podczas gdy warianty zmodyfikowane, takie jak A⁶, A⁸ i A⁹ utrzymywały wysoki poziom ekspresji białka. Wyniki te wskazały na przewagę modyfikowanych ogonów poli(A) nad obecnie stosowanymi rozwiązaniami, pod względem efektywności produkcji białka reporterowego (Rys . 103).



Rysunek 103 Krzywe dynamiki produkcji białka Fluc w czterech różnych liniach komórkowych (A549- A, B; HepG2- C, D; HEK293T- E, F; JAWS II- G, H) po transfekcji mRNA kodującego Fluc z modyfikowanymi sekwencjami 3'-kończowymi (A², A³, A⁴, A⁶, A⁸, A⁹, A¹⁰) oraz dla referencyjnych wariantów R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶. Pomiar poziomu białka Fluc wyrażony jako RLU w funkcji czasu (4 h, 16 h, 24 h, 48 h) wskazały na wyższą i stabilniejszą produkcję białka dla modyfikowanych sekwencji 3'-kończowych w porównaniu z referencjami

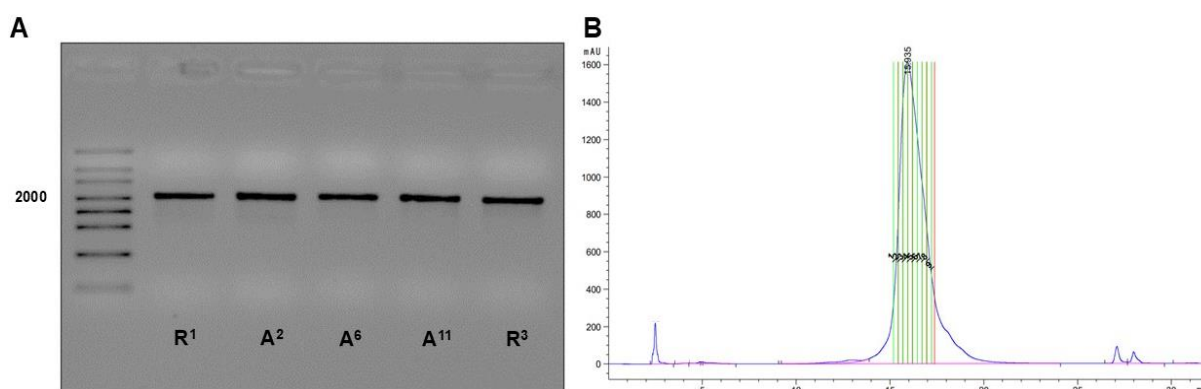
Porównanie całkowitej ilości białka wyprodukowanego z różnych wariantów mRNA w poszczególnych liniach komórkowych dodatkowo uwypukliło zalety zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych (Rys. 104). Analiza aktywności Fluc wykazała, że warianty referencyjne R¹ i R² generowały najniższe poziomy ekspresji białka we wszystkich badanych liniach komórkowych. Wariant referencyjny R⁴ wykazywał 1,5- do 2-krotnie wyższe całkowite poziomy białka Fluc w porównaniu z R¹ i R², a R⁵ osiągał wyniki jeszcze wyższe niż R⁴, podobnie jak wykazano w poprzednich badaniach. Zmodyfikowane warianty mRNA z sekwencjami 3'-końcowymi znacząco przewyższały referencje pod względem wydajności translacji. Warianty A³, A⁶, A⁸, A⁹ oraz A¹⁰ wykazywały od 2- do 3,5-krotnie wyższe całkowite poziomy białka w porównaniu z referencjami R¹ i R², w zależności od linii komórkowej, przy czym A⁶ i A⁹ osiągały najwyższe wartości w każdej z analizowanych linii. W linii A549 wariant A⁹ generował aż 3-krotnie wyższą aktywność Fluc niż referencja R¹, podczas gdy w linii HEK293T poziom białka dla A⁹ był 2-krotnie wyższy. W linii Hep G2 wariant A⁶ przewyższał referencję R¹ 3,5-krotnie, a w linii JAWS II 2-krotnie (Rys. 104).



Rysunek 104 Porównanie poziomów całkowitej ekspresji białka Fluc w różnych liniach komórkowych (A549, HEK293T, HepG2, JAWSII) dla mRNA zawierającego zmodyfikowane sekwencje 3'-terminalne oraz referencyjnych ogonów poli(A). Oznaczenia statystyczne (wyznaczone za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji One-way Abnova, ns-brak istotności statystycznej, * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, (p) p-value) wskazują poziom istotności różnic w ekspresji białka badanych wariantów w porównaniu do klasycznego ogona poli(A) o długości 90A (R¹)

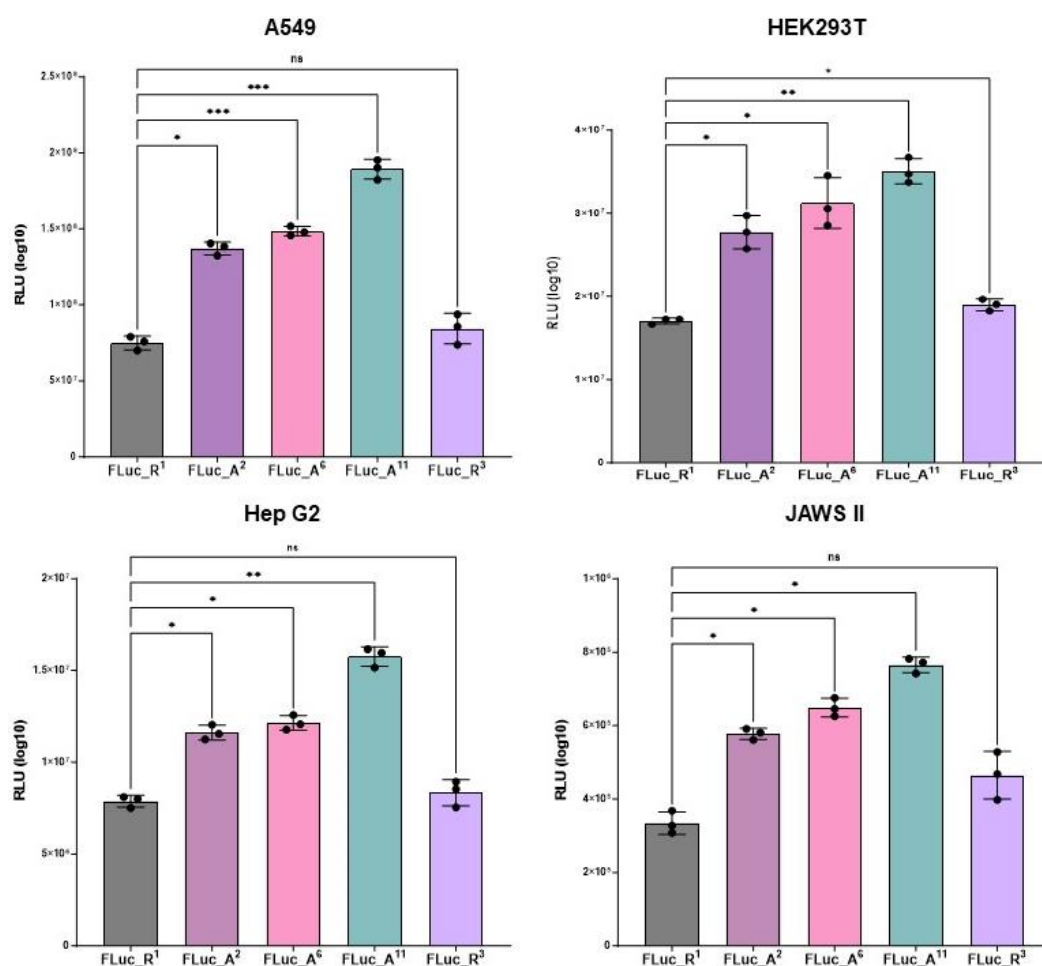
Analiza statystyczna przeprowadzonych eksperymentów wykazała, że różnice między zmodyfikowanymi wariantami, a referencjami były istotne statystycznie ($p < 0,01$). Warianty A³, A⁶, A⁸, A⁹ wykazywały największy potencjał biologiczny, przewyższając także wariant R⁵, który charakteryzował się najwyższą wydajnością translacyjną spośród referencji. Podsumowując, wyniki te jednoznacznie wskazują na przewagę zmodyfikowanych wariantów 3'-końcowych nad obecnie stosowanymi rozwiązaniami ogona poli(A), zarówno pod względem wydajności, jak i stabilności translacji. Szczególnie warianty A⁶, A⁸ oraz A⁹ mogą stanowić podstawę dla projektowania bardziej efektywnych terapeutycznych mRNA, oferując znacznie wyższy poziom ekspresji białka w porównaniu do referencji, takich jak R¹ i R², czy nawet R⁵.

W drugim eksperymencie poszerzono zbiór analizowanych wariantów o modyfikację A¹¹ (układ A30_(C_A15_C_A15)₃). Wariant ten został zaprojektowany jako połączenie dwóch pozytywnych cech zaobserwowanych w modyfikowanych sekwencjach 3'-końcowych, które wykazywały najwyższy poziom ekspresji białka, tj. A⁶, A⁸ i A⁹. Były to: mononukleotydowe linkery cytozynowe (A⁶) oraz gęste upakowanie linkerów w regionie ogona poli(A) (A⁸ i A⁹). W rezultacie powstała modyfikacja, która zawierała sześć linkerów cytozynowych, rozdzielających fragmenty: 30 początkowych adenin oraz sześć segmentów po 15 adenin. Modyfikacja A¹¹ wykazywała podczas badań stabilności bardzo wysokie poziomy ekspresji białka mKate2_PEST w komórkach HEK293T (Rys. 101). Z tego powodu przygotowano nowy zestaw mRNA zawierający, oprócz wyróżniającego się gęstym rozmieszczeniem łączników heteronukleotydowych wariantu A¹¹ (układ A30_(C_A15_C_A15)₃), również najbardziej podobne do niego modyfikacje testowane wcześniej: A² (układ A30_G_A30_G_A30_G_A30) i A⁶ (układ A30_C_A30_C_A30_C_A30). Do analizy dołączono także klasyczną referencję R¹ oraz wariant referencyjny R³, wykorzystywany komercyjnie w szczepionkach firmy Moderna. Preparaty mRNA ponownie przygotowano z wykorzystaniem IVT i oczyszczono za pomocą HPLC. Elektroforegram uzyskany dla ostatecznych próbek potwierdzający wysoką czystość wszystkich cząsteczek mRNA, jak również przykładowy profil RP-HPLC z zaznaczonymi frakcjami, które finalnie połączono przedstawiono poniżej (Rys. 105). Molekuły mRNA dla wszystkich badanych modyfikacji wykorzystano do transfekcji czterech linii komórkowych (A549, HEK293T, Hep G2, JAWS II), a detekcję ponownie przeprowadzono na podstawie pomiarów chemiluminescencji w punktach czasowych między 4 a 72 godziną od podania. Uzyskane dane przedstawiono w postaci całkowitych ilości białka Fluc dla danej modyfikacji, wyrażonej w jednostkach RLU.



Rysunek 105 Analiza czystości i integralności mRNA dla wybranych wariantów (R¹, A², A⁶, A¹¹, R³) przy elektroforegramu (A) oraz chromatografii RP-HPLC (B). Elektroforegram przedstawia wyraźne, pojedyncze sygnały dla każdego z badanych mRNA, potwierdzając ich jednorodność i odpowiednią długość. Chromatogram HPLC ukazał dobrze zdefiniowany pik, świadczący o wysokiej czystości i integralności badanych cząsteczek mRNA

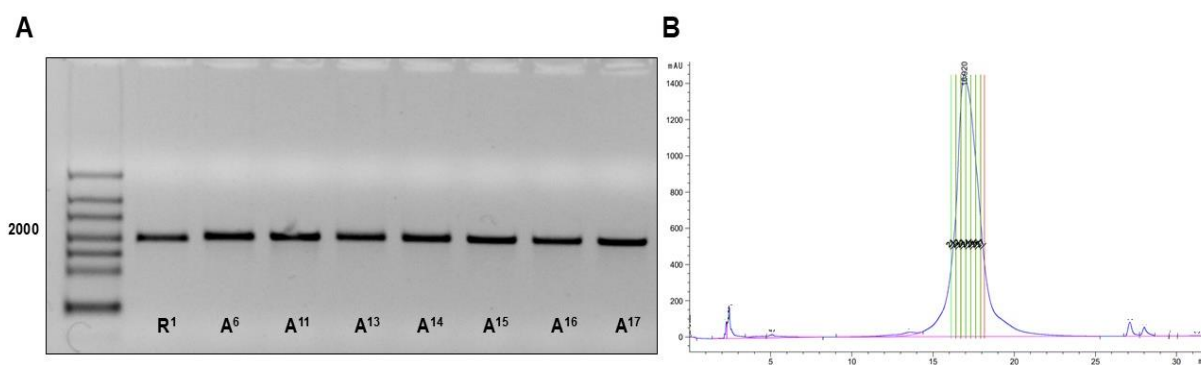
W wyniku przeprowadzonego eksperymentu z nowym zestawem mRNA odnotowano najwyższy poziom ekspresji białka Fluc dla wariantu A¹¹ we wszystkich czterech badanych liniach komórkowych (A549, HEK293T, Hep G2 i JAWS II), co potwierdza wyjątkowy potencjał tego wariantu. Zarówno w komórkach ludzkich, jak i mysich, dla modyfikacji A¹¹ obserwowano ponad dwukrotnie wyższą intensywność sygnału w porównaniu z referencjami R¹ oraz R³ (Rys. 106). Analiza porównawcza wariantów A², A⁶ i A¹¹ wykazała wyraźną przewagę wariantu A¹¹. Całkowita ilość białka Fluc dla A² i A⁶ była mniejsza o średnio 20–25% w porównaniu do A¹¹, co wskazuje na kluczową rolę zastosowania gęstszego rozmieszczenia łączników heteronukleotydowych w sekwencji końca 3' RNA. Wariant A⁶, zawierający regularne mononukleotydowe linkery cytozynowe, osiągał stabilne wyniki, uzyskując średnio 1,5-krotnie wyższy poziom produkcji białka względem R¹, jednak ich przewaga nad referencjami była mniej wyraźna niż w przypadku A¹¹. Wariant A², mimo strukturalnego podobieństwa do A¹¹, charakteryzował się niższą wydajnością, co może być związane z zastosowaniem linkerów guaninowych, które nie wpływały tak pozytywnie na dynamikę translacji, jak linkery cytozynowe. Z kolei analiza referencji R³, stosowanej komercyjnie w szczepionkach, wykazała, że jej poziom ekspresji białka Fluc były wyższe niż dla referencji klasycznej R¹, ale pozostawały istotnie niższe w porównaniu do zmodyfikowanych wariantów, szczególnie A¹¹ i A⁶ (Rys. 106).



Rysunek 106 Porównanie poziomów ekspresji białka FLuc w czterech różnych liniach komórkowych (A549, HEK293T, HepG2, JAWS II) dla referencyjnych wariantów mRNA (R¹, R³) oraz zmodyfikowanych wariantów (A², A⁶, A¹¹). Statystyczna istotność różnic w ekspresji białka zaznaczona za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji (One-way ANOVA) z oznaczeniem poziomów istotności: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Wyniki te podkreślają ograniczenia obecnie stosowanych rozwiązań opartych na standardowych ogonach poli(A). Wszystkie zmodyfikowane warianty (A^2 , A^6 , A^{11}) wykazywały wyższą efektywność niż referencje, co jednoznacznie wskazuje na trend, że wprowadzenie heteronukleotydowych linkerów do sekwencji końca 3' mRNA poprawia wydajność translacji. Zastosowanie gęstszego rozmieszczenia łączników, jak w przypadku A^{11} , dodatkowo zwiększa wydajność translacji, co czyni ten wariant najbardziej obiecującym kandydatem do dalszych badań. Analiza statystyczna potwierdziła istotność zaobserwowanych różnic między zmodyfikowanymi wariantami, a referencją R^1 ($p < 0,01$). Na podstawie uzyskanych wyników wariant A^{11} dołączył do grona modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych o najwyższym potencjale terapeutycznym (A^6 , A^8 , A^9), dla których kontynuowano badania.

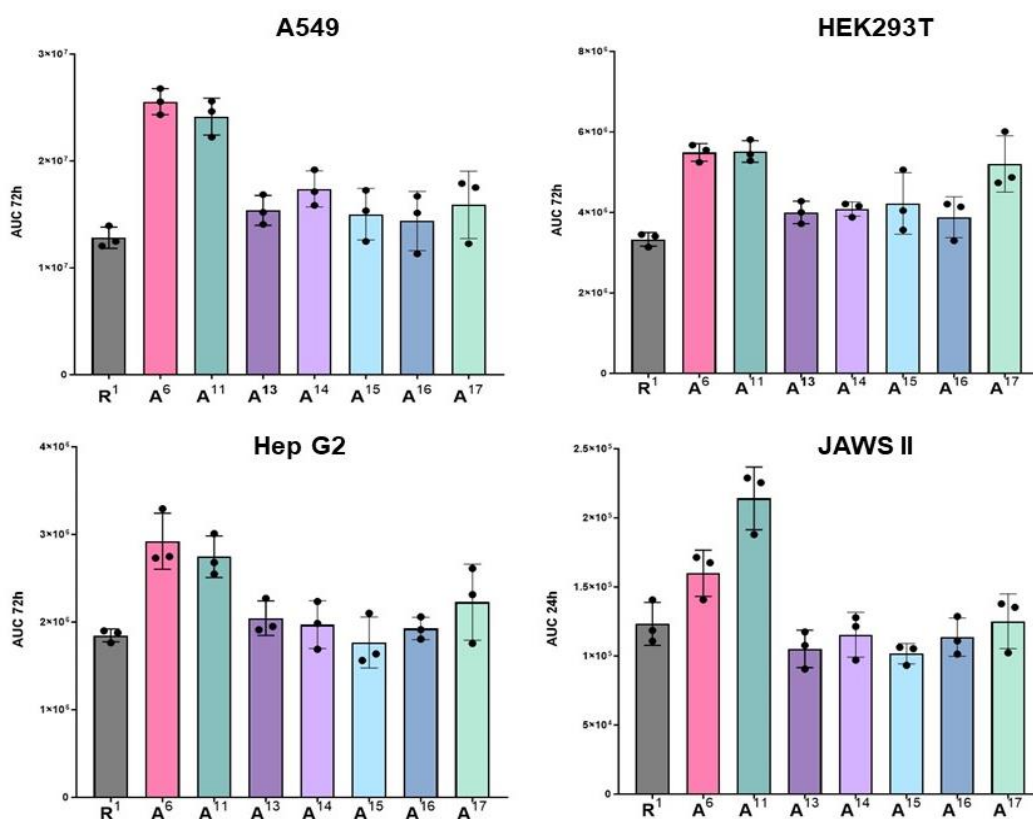
Opisane od tej pory modyfikacje 3'-końcowe zawierały na końcu 5' regionu poli(A) fragment składający się z 30 kolejnych adenin. Ta długość była wystarczająca, aby zapewnić efektywne wiązanie białka PABP, które teoretycznie oddziałuje z około 27 nukleotydami w łańcuchu poliadenylowym. W trzecim eksperymencie poddano weryfikacji modyfikacje A^{13} - A^{17} posiadające identyczną liczbę adenin w każdym fragmencie, przedzielonym z różną częstością przez mononukleotydowe linkery cytozynowe (Rys. 92). Badanie ponownie przeprowadzono na czterech liniach komórkowych, syntezując i oczyszczając wszystkie mRNA Fluc w analogiczny sposób. Referencję stanowił klasyczny ogon A_{90} (R^1), a za dodatkowe punkty odniesienia posłużyły najbardziej podobne, sprawdzone wcześniej warianty A^6 oraz A^{11} . Molekuły mRNA wykorzystano do transfekcji komórek wszystkich linii, a detekcję przeprowadzono z wykorzystaniem chemiluminescencji, analogicznie do wcześniejszych eksperymentów. Wynik zaprezentowano za pomocą wykresów obrazujących całkowity poziom białka Fluc uzyskany dla danej modyfikacji w postaci obliczonego pola powierzchni pod krzywą funkcji intensywności sygnału od czasu (AUC - ang. *area under curve*). Elektroforegram dla badanych mRNA, świadczący o wysokiej czystości analizowanych próbek oraz przykładowy chromatogram z oczyszczania preparatów mRNA na HPLC przedstawiono poniżej (Rys. 107).



Rysunek 107 Analiza czystości produktów mRNA za pomocą elektroforegramu (A) oraz chromatogramu RP-HPLC (B) dla wariantów modyfikacji 3'-terminalnych (A^6 , A^{11} , A^{13} , A^{14} , A^{15} , A^{16} , A^{17}) w porównaniu do referencyjnego ogona poli(A) o długości 90 adenin (R^1)

Warianty A^{13} , A^{14} , A^{15} , A^{16} i A^{17} charakteryzujące się identyczną liczbą adenin w każdym motywie (bez kluczowego fragmentu 30 kolejnych adenin od końca 5' ogona poli(A)) wykazywały poziomy ekspresji białka zbliżone lub nieznacznie wyższe w porównaniu do klasycznego ogona A_{90} (Rys. 108). Wariant A^{13} składał się z 9 powtórzeń motywu A_{10} , przedzielonych łącznikami cytozynowymi, co dawało łączną długość 120 nt. Wariant A^{14} zbudowano z 7 powtórzeń motywu A_{13} , również przedzielonych łącznikami cytozynowymi, co skutkowało sumaryczną długością 125. Podobnie wariant A^{15} zawierał 6 powtórzeń motywu A_{15} z łącznikami cytozynowymi, osiągając długość 125 nt. Wariant A^{16} , składający się z 5 powtórzeń motywu A^{17} , także wykorzystał łączniki cytozynowe

i miał długość 125 nt. Wariant A¹⁷ oparto na 4 powtórzeniach motywu A20 z łącznikami cytozynowymi, co dało sumaryczną długość 125 nt. Wprowadzone modyfikacje nie tylko zmniejszyły liczbę adenin w ogonie poli(A), ale także wpłynęły na jego całkowitą długość. W porównaniu z najbardziej zbliżonymi wariantami zawierającymi kluczowy motyw 30 kolejnych adenin (A⁶ i A¹¹), warianty te wykazywały istotnie niższe poziomy ekspresji białka, mimo że ich aktywność biologiczna pozostawała stosunkowo wysoka. Odkrycie, że nawet silnie zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe, takie jak A¹³ i A¹⁴ zawierające heteronukleotyd co 10 lub 13 adenin, zachowują wysoką aktywność translacyjną, jest nieoczekiwane w oparciu o obecną wiedzę na temat interakcji PABP z poli(A). Ostatnie badania wykazały, że modyfikacje fragmentów oligoadeninowych heteronukleotydami, takimi jak guanina, obniżają powinowactwo do białka PABP, co sugerowało, że takie modyfikacje ogona poli(A) mogłyby negatywnie wpływać na aktywność translacyjną mRNA.³⁴¹ W związku z tym większość nowoczesnych technologii modyfikacji ogona poli(A) koncentrowała się na zmianach w obrębie samego końca 3' lub na wstawianiu pojedynczych heterosekwencji w ogon poli(A), jak ma to miejsce w szczepionce Comirnaty Pfizer-BioNTech BNT162b2 przeciwko COVID-19.^{329,334,371} Wyniki moich badań pokazały jednak, że gęste umieszczanie heteronukleotydów nie tylko nie osłabia aktywności translacyjnej mRNA, ale wręcz ją zwiększa. Tak silnie zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe łączą dwie kluczowe cechy pożądane w kontekście terapeutycznego mRNA: większą stabilność plazmidowego DNA kodującego te cząsteczki oraz wysoką aktywność translacyjną mRNA.



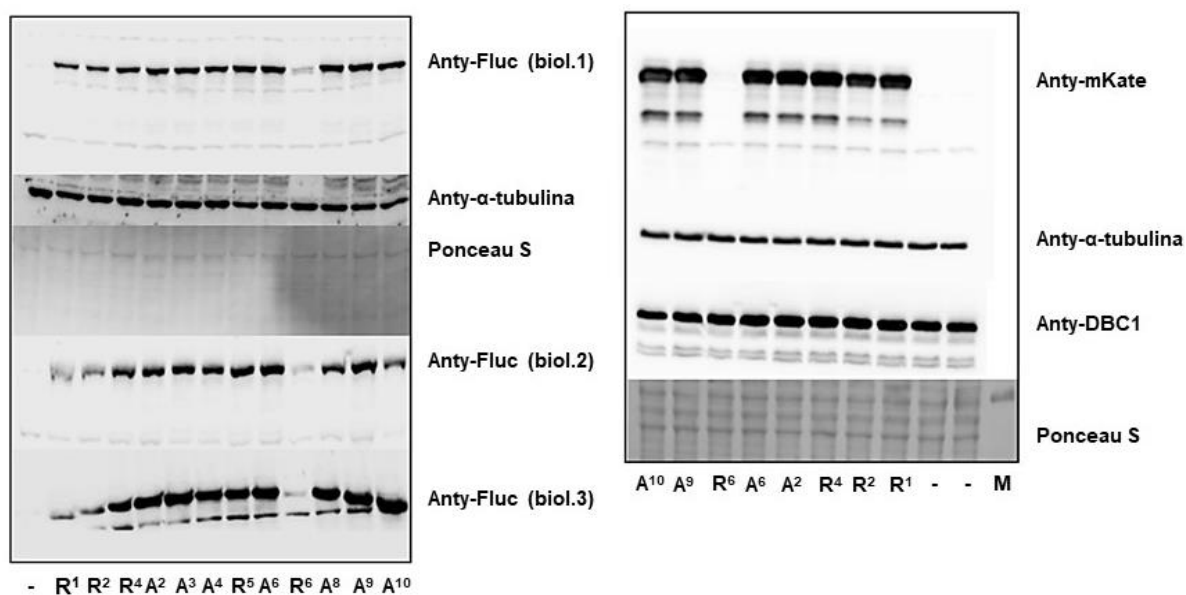
Rysunek 108 Porównanie całkowitej ilości białka Fluc (AUC) wyprodukowanego w czasie 72 godzin w czterech liniach komórkowych (A549, HEK293T, HepG2, JAWSII) dla zmodyfikowanych wariantów 3'-terminalnych (A⁶, A¹¹, A¹³-A¹⁷) oraz referencji R¹

Na uwagę zasługuje obserwacja, że najwyższe poziomy ekspresji białka w komórkach odnotowano dla modyfikacji zawierających motyw z kluczowym fragmentem 30 kolejnych adenin na początku sekwencji 3'-końcowej (A⁶, A⁸, A¹¹). Natomiast warianty o podobnej długości, ale pozbawione

tego kluczowego fragmentu ($A^{13} - A^{17}$) wykazywały znacznie niższą wydajność ekspresji białka (Rys.108). Prawie dwukrotnie niższa aktywność lucyferazy dla wariantów mRNA pozbawionych nieprzerwanego fragmentu adeninowego ($A^{13} - A^{17}$) w porównaniu z najbardziej podobną modyfikacją zawierającą ten motyw (A^{11}) sugeruje, że 5'-końcowa część ogona poli(A) odgrywa krytyczną rolę w wydajnej translacji. Może to wskazywać, że wiązanie pierwszego białka PABPC z ogonem poli(A) mRNA jest szczególnie ważne dla inicjacji translacji lub stabilności mRNA. Częstotliwość występowania łączników w dalszej części sekwencji 3'-końcowej po kluczowym fragmencie 30 adenin na końcu 5' nie wpływa tak znacząco na aktywność translacyjną mRNA, pozwalając na większą elastyczność w doborze długości kolejnych fragmentów adeninowych. Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że najlepszy efekt biologiczny na poziomie linii komórkowych można uzyskać, łącząc kluczowy fragment 30 adenin na początku ogona poli(A) z kolejnymi motywami o długości 15 - 30 adenin, oddzielonymi pojedynczymi heteronukleotydami cytozynowymi.

7.3 Analiza Western blot dla zmodyfikowanych 3'-końcowych mRNA

Preparaty mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poddano również badaniom w komórkach mysich makrofagów uzyskiwanych ze szpiku kostnego BMDM (ang. *bone marrow -derived macrophage*), których izolację przeprowadził dr Seweryn Mroczek (IIMCB). Uzyskane mysie makrofagi poddano transfekcji wszystkimi zmodyfikowanymi mRNA i po 24 godzinach inkubacji przeprowadzono jakościową analizę obecności białek reporterowych Fluc i mKate2_PEST przy użyciu techniki Western blot, jak opisano w części eksperymentalnej. Wykonano trzy niezależne powtórzenia biologiczne, które wykazały obecność Fluc we wszystkich badanych modyfikacjach z wyjątkiem R^6 - zawierającej strukturę G-kwadrupleksu (Rys. 109).



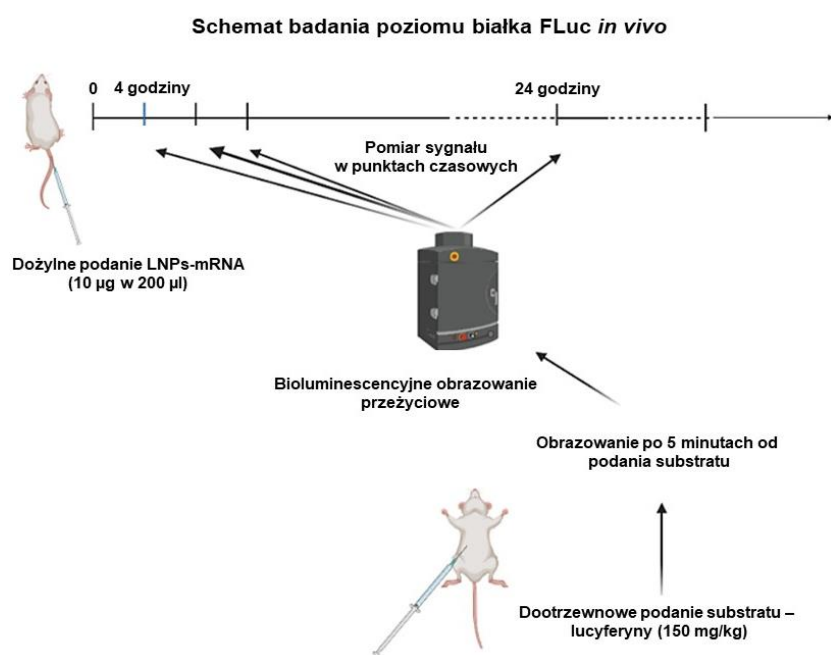
Rysunek 109 Analiza Western blot przedstawiająca poziomy ekspresji białek Fluc (biol.1, 2, 3) oraz mKate2 w makrofagach transfekowanych różnymi mRNA (R^1 , R^2 , R^4 , A^2 , A^3 , A^4 , R^5 , A^6 , A^8 , A^9 , A^{10}). Membranę wybarwiono przeciwciałami przeciwko białkom Fluc, mKate2, α-tubulinie oraz DBC1. Barwienie Ponceau S zostało wykorzystane jako kontrola załadunku w celu potwierdzenia równego nałożenia białek w poszczególnych ścieżkach

Intensywność sygnału chemiluminescencji we wszystkich powtórzeniach była znacznie wyższa dla większości zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych w porównaniu do sekwencji referencyjnych. Podobne rezultaty uzyskano dla białka mKate2_PEST, które również było wykrywane

we wszystkich badanych modyfikacjach z wyłączeniem R⁶. Wysoka intensywność prążków może świadczyć o efektywnej ekspresji obu białek reporterowych w badanych makrofagach, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Skuteczne wykrywanie białek Fluc i mKate2 za pomocą specyficznych przeciwciał przy użyciu techniki Western blot potwierdza poprawną ekspresję oraz prawidłowe fałdowanie tych białek w komórkach makrofagów. To z kolei dostarcza kolejnych przesłanek świadczących o efektywności tworzonych przez nas narzędzi molekularnych mRNA, których funkcjonowanie w komórkach odpornościowych ma szczególne znaczenie dla opracowania terapii leczniczej.

7.4 Funkcjonalna charakterystyka zmodyfikowanych 3'-końcowych mRNA *in vivo* w modelu mysim

Dzięki współpracy z Grupą Badawczą Zakładu Immunologii WUM realizowaną w obrębie projektu WIB HERO (Sieć Badawcza Łukasiewicz) możliwe było wykonanie badań dla najbardziej perspektywicznych, modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych w modelu mysim. Badania *in vivo* przygotowanych przeze mnie mRNA-LNP zostały wykonane przez dr Zofię Pilch (WUM). Eksperymenty rozpoczęto od standardowej syntezy i oczyszczania mRNA kodujących lucyferazę (Fluc) z wybranymi wariantami ogonów poli(A). Po pozytywnej ocenie jakości, preparaty mRNA poddano procesowi formulacji, tworząc nanocząsteczki lipidowe (LNPs), w których mRNA zostało zamknięte. Następnie LNPs z mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-terminalnymi podawano dożylnie myszom szczepu BALB/c. Każdej myszy podawano po 10 µg mRNA w postaci LNP. Całkowity sygnał bioluminescencji ciała rejestrowano przyżyciowo po 4, 8 i 16 lub 24 godzinach od momentu podania mRNA za pomocą systemu obrazowania IVISSpectrum (Perkin-Elmer). Przed obrazowaniem myszom podawano dootrzewnowo substrat, lucyferynę, w ilości 150 mg na kilogram masy zwierzęcia, a po 5 minutach inkubacji przystępowano do bioluminescencyjnego obrazowania przyżyciowego, schemat eksperymentu przedstawiono poniżej (Rys. 110). Uzyskane dane, szczegółowo opisane w następnych podrozdziałach, przedstawiano w postaci dwuwymiarowych zdjęć obrazowanych myszy w kolorowym spektrum intensywności sygnału oraz w postaci wykresów całosciowej bioluminescencji dla danej modyfikacji, oznaczanej jako FLux.

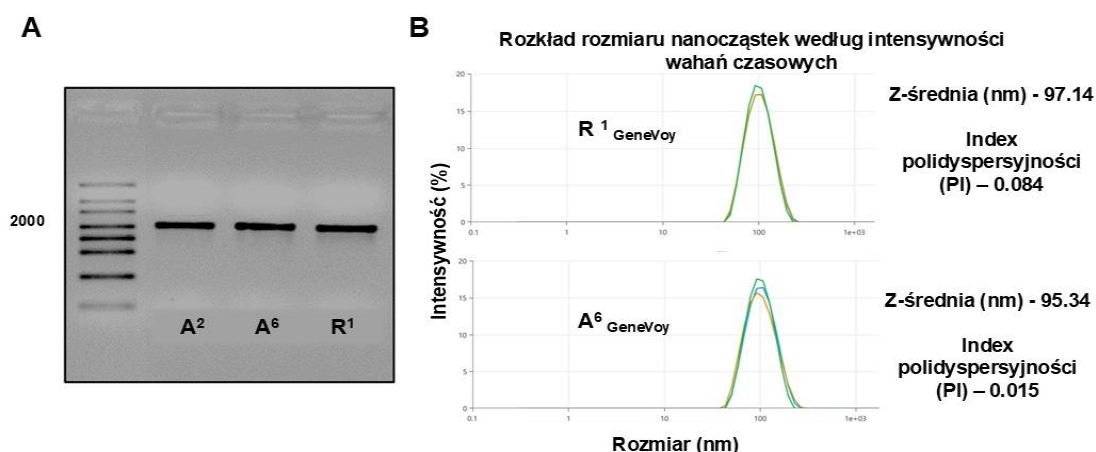


*Rysunek 110 Schemat badania poziomu białka FLuc *in vivo*. Dożylne podanie nanocząsteczek lipidowych (LNPs) zawierających mRNA kodującą lucyferazę (Fluc) myszom szczepu BALB/c (10 µg w 200 µl). Po podaniu przeprowadzono pomiary sygnału bioluminescencyjnego w wybranych punktach czasowych (po 4 i 24 godzinach) z wykorzystaniem obrazowania przeżyciowego. Obrazowanie wykonano 5 minut po dootrzewnowym podaniu substratu – lucyferyny (150 mg/kg)*

7.4.1 Badanie poziomów ekspresji białka Fluc *in vivo* dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w formulacji GeneVoy

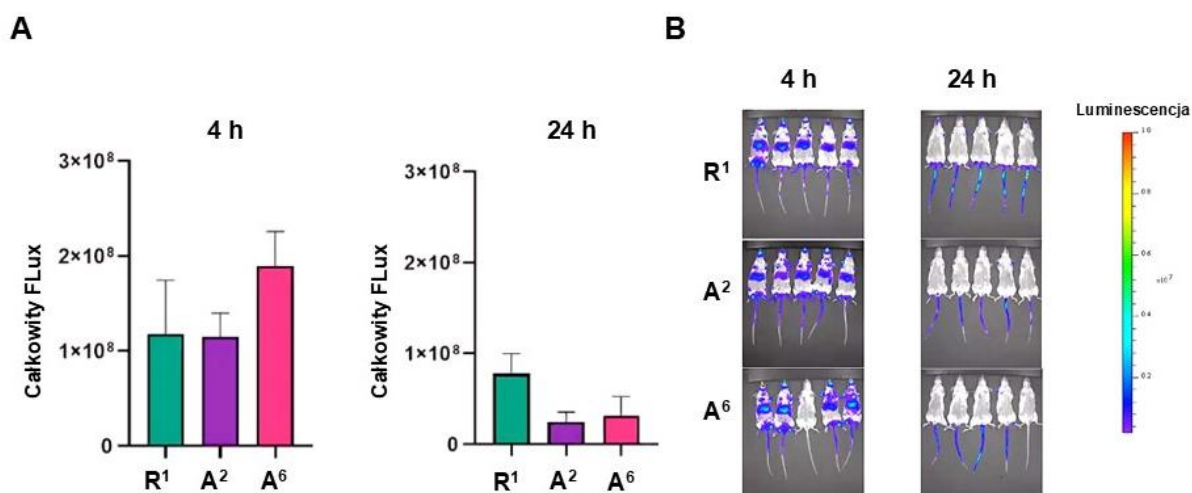
Badania funkcjonalne *in vivo* rozpoczęto od przetestowania dostępnej metody formulacji mRNA Fluc dla klasycznej referencji R¹ oraz dwóch wariantów modyfikacji: A² oraz A⁶, które wykazywały przewagę w ilości uzyskiwanego białka we wstępnych eksperymentach *in vitro*. Preparaty mRNA zsintezowano i oczyszczono w standardowy sposób, po czym sformułowano w nanocząstki lipidowe. LNPs są kulistymi pęcherzykami zbudowanymi z przynajmniej jednej dwuwarstwy lipidowej oraz rdzenia o dużej gęstości elektronowej, w którym zjonizowane lipidy kationowe formują odwrócone micelle wokół kapsułkowanego RNA. Taki sposób transportu mRNA do wnętrza organizmów żywych zapewnia znakomitą ochronę tych molekuł oraz zwiększa ich biodostępność poprzez kontrolowanie rozpuszczalności, przepuszczalności, wchłaniania i metabolizmu w komórkach docelowych. Z tego powodu dobór odpowiedniej mieszanki lipidów do przeprowadzenia formulacji, czyli procesu tworzenia nanocząstek lipidowych wokół cząsteczek mRNA jest niezwykle ważny w kontekście tworzenia skutecznych terapii opartych na kwasach nukleinowych.

Do pierwszego eksperymentu wykorzystano handlowo dostępną mieszanę lipidów GeneVoy (Precision Nano Systems). Proces formulacji przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia Ignite (Precision Nano Systems). Cząsteczki Fluc mRNA dla wszystkich badanych wariantów połączono z mieszaniną lipidów GeneVoy za pośrednictwem jednorazowych układów mieszalniczych systemu Ignite, stosując czterokrotny molowy nadmiar mRNA względem lipidów. Przepływ mieszanych roztworów ustalono na 12 ml / minutę, a wyliczony na podstawie sekwencji genu stosunek N/P, czyli stosunek dodatnio naładowanych grup aminowych polimeru (N - azot) do ujemnie naładowanych grup fosforanowych kwasu nukleinowego (P) wynosił 6. Następnie zmierzono stężenie mRNA dla uzyskanych LNPs za pomocą testu RiboGreen, jak opisano w części eksperymentalnej. Sformułowane mRNA poddano kontroli jakości, sprawdzającej rozmiar uzyskanych nanocząstek (nm) oraz określono homogenność próbek za pomocą parametru polidispersyjności PI (ang. *polidispersity index*). Do prawidłowego działania nanocząstek lipidowych w organizmach żywych, wskazane jest uzyskanie rozmiarów cząstek nie większych niż 200 nm, optymalnie 60 - 100 nm. Z kolei uzyskanie parametru PI poniżej wartości 0.2 świadczy o odpowiednio wysokiej homogenności badanej próbki. Ocenę uzyskanych LNPs przeprowadził dr Marek Baranowski z wykorzystaniem metody dynamicznego rozpraszania światła DLS (ang. *dynamic light scattering*). Metoda DLS umożliwia pomiar fluktuacji intensywności rozproszonego światła, spowodowanych chaotycznymi ruchami cząstek w roztworze (ruchy Browna). Analiza oparta jest na zależnościach wielkości cząstek oraz szybkości fluktuacji. Na podstawie otrzymanych wzorów rozproszonego światła, DLS oblicza hydrodynamiczny rozkład wielkości nanocząstek w roztworze. Elektroforegram dla próbek mRNA po etapie oczyszczania, wskazujący wysoką jakość wszystkich preparatów oraz przykładowe wyniki DLS dla badanych mRNA przedstawiono poniżej (Rys. 111). Dla wszystkich trzech modyfikacji uzyskano zbliżone rozmiary nanocząstek, wynoszące około 95–97 nm, co wskazuje na dużą powtarzalność procesu ich tworzenia. Parametry polidispersyjności (PI) dla wszystkich badanych mRNA nie przekraczały wartości PI = 0,1, co świadczy o wysokiej czystości i homogenności otrzymanych lipidowych nanocząstek. Tak niskie wartości PI potwierdzają jednorodny rozkład wielkości cząstek, co jest kluczowym wskaźnikiem jakości nanocząstek. Co więcej, uzyskane parametry były na tyle zbliżone, że ewentualne różnice w obserwowanej aktywności biologicznej mRNA można z dużą pewnością przypisać różnicom w strukturze RNA, a nie odmiennościom w jakości otrzymanych LNPs. Wynik ten dodatkowo podkreśla precyzję zastosowanej metody enkapsulacji oraz umożliwia rzetelną ocenę wpływu modyfikacji RNA na aktywność biologiczną, eliminując potencjalny wpływ zmiennych związanych z właściwościami fizykochemicznymi nanocząstek.



Rysunek 111 A) Analiza czystości preparatów mRNA na elektroforegramie oraz B) analiza rozkładu rozmiaru nanocząstek lipidowych (LNPs) zawierających Fluc mRNA dla wariantów A², A⁶ i R¹, na podstawie intensywności wahań czasowych metodą DLS. Parametr Z-średnia odnosi się do szacowanej wielkości nanocząstek lipidowych (nm). Indeks polidispersyjności (PI) wskazuje na poziom heterogenności badanych nanocząstek, który w tym wypadku był niski, co świadczy o wysokiej czystości próbek

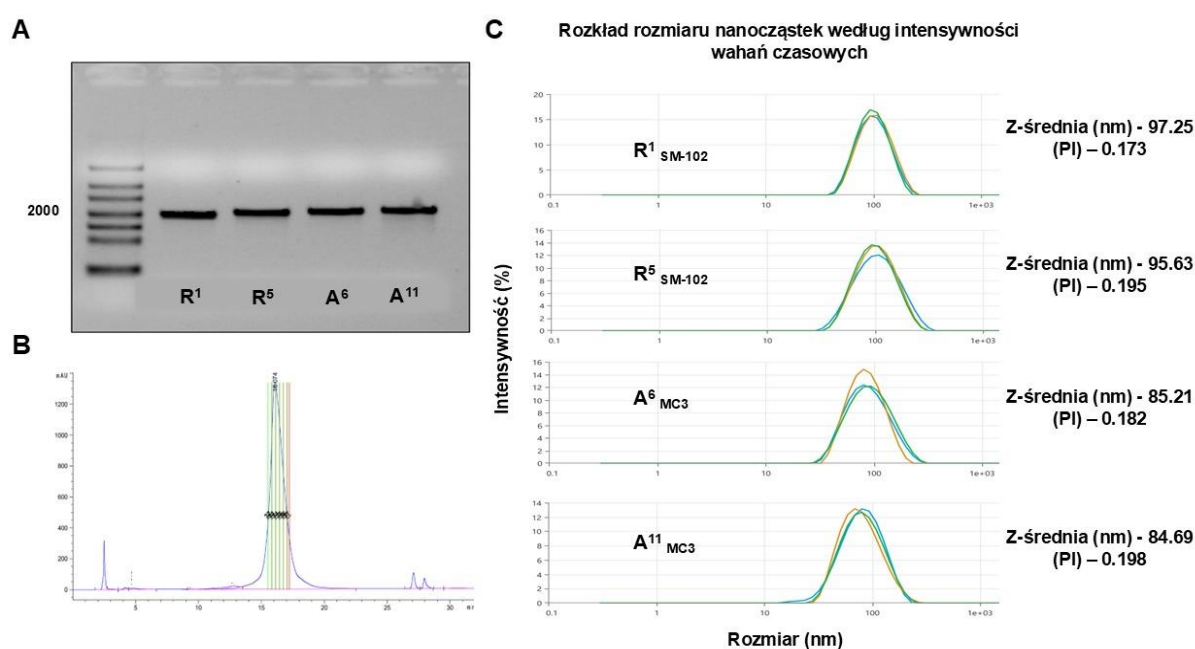
Preparaty LNPs-mRNA zostały następnie podane myszom dożylnie. Dla każdego wariantu mRNA zastosowano pięć zwierząt, aby zapewnić odpowiednią reprezentatywność wyników. Obrazowanie przyżyciowe przeprowadzono po 4 i 24 godzinach od podania (Rys. 112). Analiza uzyskanych wyników wykazała wyraźne sygnały bioluminescencji zarówno dla mRNA z klasycznym ogonem A₉₀ (R¹), jak i dla obu badanych mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi (A² i A⁶). Wyniki te potwierdziły skuteczność opracowanego mRNA pod względem zastosowanych metod syntezy, oczyszczania i formulacji oraz zweryfikowało technologię podawania i przyżyciowej detekcji sygnału w modelu mysim. Intensywności sygnałów uzyskane po 4 godzinach od podania wskazywały na dwukrotną przewagę ilości produkowanego białka Fluc dla modyfikacji A⁶ względem zarówno referencji R¹ jak i wariantu A² (Rys. 112). Jednak w drugim punkcie pomiarowym, po dobie od podania, intensywność sygnałów wielokrotnie zmalała, a trendy odwróciły się, wskazując na najwyższy poziom białka dla referencyjnego R¹ mRNA. Wynik ten był zaskakujący i skłonił nas do przeprowadzenia kolejnych pomiarów uwzględniających dodatkowe punkty pomiarowe i z wykorzystaniem innych formulacji mRNA.



Rysunek 112 A) Porównanie poziomów całkowitej luminescencji (Fluc) w modelu mysim po 4 i 24 godzinach od podania LNPs-mRNA zawierających zmodyfikowane sekwencje 3'-terminalne (A², A⁶) oraz referencyjne R¹. B) Obrazowanie bioluminescencyjne przyżyciowe u myszy (rozkład sygnału w badanych punktach czasowych)

7.4.2 Badanie poziomów ekspresji białka Fluc *in vivo* dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w formulacji SM-102 i MC3

Dobór odpowiedniej formulacji stanowi jedno z największych wyzwań związanych z opracowaniem skutecznych terapii mRNA, ponieważ właściwości lipidowych nanocząstek (LNPs) bezpośrednio wpływają na stabilność, efektywność dostarczania i translację mRNA. Testowana pierwotnie mieszanka GeneVoy została oceniona pod kątem jej zdolności enkapsulacji mRNA oraz efektywności translacyjnej. Chociaż GeneVoy zapewniała skuteczną enkapsulację i stabilność nanocząstek, dalsze analizy wykazały ograniczoną wydajność translacyjną enkapsulowanego mRNA, co mogło wynikać z charakterystyki lipidów tej formulacji, w tym interakcji między jej składnikami a mRNA. W związku z tym, w kolejnych badaniach zdecydowano się zastosować alternatywne mieszanki lipidowe, SM-102 (Moderna) oraz MC3 (BroadPharm), które są szeroko stosowane i dobrze udokumentowane w kontekście skutecznego dostarczania mRNA. Do eksperymentu przygotowano mRNA Fluc dla referencji R¹ i R⁵ oraz dwóch modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych o najwyższym potencjale terapeutycznym, czyli A⁶ i A¹¹. Molekuły mRNA zsyntezowano i oczyszczono w standardowy sposób, a następnie preparaty poddano formulacji z dwoma zestawami lipidów: SM-102 oraz MC3 w urządzeniu Ignite. Dla obu mieszanin lipidów wykorzystano identyczne warunki i stężenia procesu enkapsulacji mRNA, stosując czterokrotnie wyższe stężenie masowe mRNA względem lipidów, stosunek N/P=6, a przepływ przez układ mieszalniczy systemu Ignite wynosił 12 ml na minutę. Gotowe preparaty LNPs-mRNA poddano testowi RiboGreen w celu określenia stężenia sformułowanego mRNA oraz oceniono jakość powstałych nanocząstek z wykorzystaniem DLS. Elektroforegram dla uzyskanych próbek mRNA po oczyszczaniu oraz przykładowe wyniki dla LNPs formulacji SM-102 oraz MC3 przedstawiono poniżej (Rys. 113).

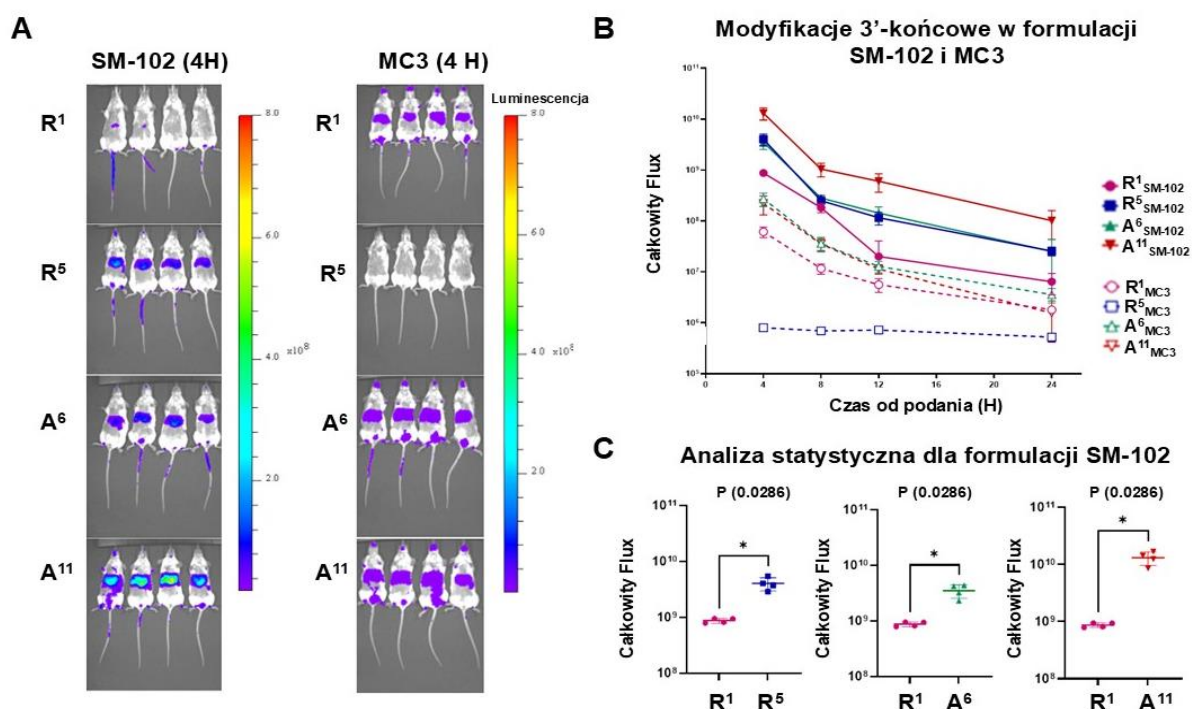


Rysunek 113 Analiza wielkości i rozkładu nanocząstek lipidowych (LNPs) zawierających mRNA z sekwencjami 3'-terminalnymi (A⁶, A¹¹) oraz referencyjnymi (R¹, R⁵). A) Elektroforegram oraz B) chromatogram RP-HPLC po oczyszczaniu preparatów mRNA. C) Rozkład wielkości nanocząstek wyznaczony na podstawie intensywności wahań czasowych oraz wartości Z-średnich i indeksu polidispersyjności (PI) dla każdego wariantu mRNA wyznaczone za pomocą metody DLS

Metoda DLS umożliwiła precyzyjne określenie rozmiarów nanocząstek dla wszystkich badanych próbek obu formulacji. LNPs w formulacji SM-102 charakteryzowały się rozmiarami w zakresie 95 – 97 nm dla wszystkich czterech próbek, co pokrywa się z rozmiarami nanocząstek

uzyskanymi dla formulacji GeneVoy. Ocena polidispersyjności wskazała dla wszystkich 4 wariantów wartości poniżej 0.2, co świadczy o homogenności badanych preparatów. Formulacja MC3 skutkowała uzyskaniem nieco mniejszych rozmiarów nanocząstek lipidowych o średnim rozmiarze około 85 nm. Wartości współczynnika polidispersyjności dla próbek MC3 również nie przekraczały poziomu 0.2, co dowodzi homogenności całego zestawu preparatów uzyskanych dla obu testowanych formulacji. Ogólnym wnioskiem płynącym z tych analiz jest fakt, iż zastosowany system Ignite umożliwił uzyskiwanie wysokiej jakości LNPs niezależnie od użytej mieszanki lipidowej. Pozwoliło to na precyzyjne określanie różnic pomiędzy konkretnymi rozwiązaniami bez obaw o błędy wynikające z jakości poszczególnych roztworów lipidów.

Nanocząstki lipidowe dla wszystkich badanych wariantów w obu formacjach zostały następnie podane myszom. Każda grupa liczyła 4 zwierzęta. Przyżyciowe obrazowanie bioluminescencji prowadzono w punktach czasowych po 4, 8, 12 i 24 godzinach od momentu dożylnego podania mRNA. Uzyskane rezultaty przedstawiały wyraźne sygnały bioluminescencji dla formulacji SM-102 oraz MC3 we wszystkich badanych wariantach z wyłączeniem referencji R⁵ dla mieszanki MC3 (Rys. 114). Brak sygnału dla tej konkretnej próby był najprawdopodobniej spowodowany błędami w trakcie dożylnego podawania mRNA do badanych myszy. Wykorzystanie bocznej żyły ogonowej do wprowadzania mRNA niesie ze sobą ryzyko wystąpienia pęknięcia naczynia, związanego z delikatnym charakterem tych struktur. Z tego też powodu wariant R⁵ w formulacji MC3 został wyłączony z analizy porównawczej wyników dla tego eksperymentu. Warianty mRNA w formulacji SM-102 charakteryzowały się wyższymi sygnałami w porównaniu z preparatami w formulacji MC3. Częsteczki mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi wykazywały znacząco wyższy poziom ekspresji białka Fluc w porównaniu z referencyjnym R¹. W szczególności wariant A¹¹_{SM-102} charakteryzował się bardzo wysokim poziomem bioluminescencji we wszystkich badanych punktach czasowych, co przełożyło się na znaczącą przewagę w całkowitym sygnale uzyskanym dla tej modyfikacji względem obu referencji (Rys. 114).

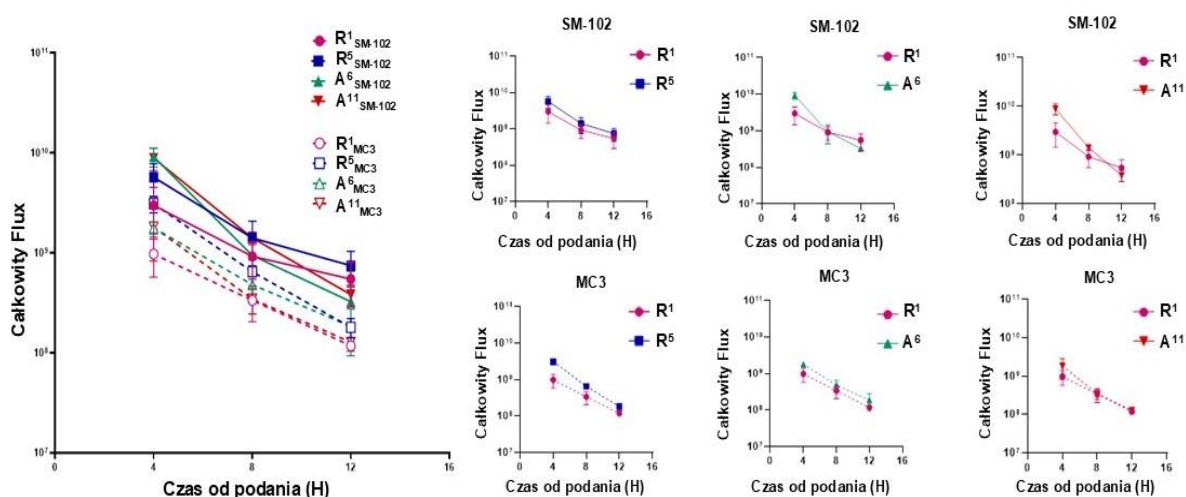


Rysunek 114 Analiza bioluminescencyjna poziomu białka FLuc w modelu myszy BALB/c dla LNPs zawierających mRNA z modyfikowanymi sekwencjami 3'-terminalnymi (A⁶, A¹¹) oraz referencyjnymi (R¹, R⁵). A) Obrazy luminescencji 4 godziny po podaniu formulacji SM-102 i MC3. B) Analiza zmian całkowitego sygnału luminescencyjnego w czasie dla formulacji SM-102 i MC3. C) Analiza statystyczna wyników dla formulacji SM-102 po 4 godzinach od podania, z uwzględnieniem poziomu istotności $p < 0.05$ dla porównywanych wariantów mRNA

Wariant A^6_{SM-102} oraz referencyjny R^5_{SM-102} uzyskały bardzo zbliżone rezultaty, utrzymując jednak znaczącą przewagę w ilości białka Fluc względem klasycznego ogona poli(A)- R^1_{SM-102} . Wyniki uzyskane dla formulacji MC3 były porównywalne z danymi dla formulacji SM-102. Warianty A^{11}_{MC3} oraz A^6_{MC3} wykazywały znaczącą przewagę w intensywności bioluminescencji względem referencyjnego R^1_{MC3} . Jednak w punkcie czasowym po 24 godzinach od podania, sygnał dla A^{11}_{MC3} zrównał się z sygnałem dla R^1_{MC3} , z kolei modyfikacja A^6_{MC3} utrzymała wyższe wartości do końca trwania eksperymentu. Ze względu na różnice w intensywności sygnału, zastosowano inne zakresy skali spektrum kolorów do wizualizacji dwuwymiarowych obrazów myszy w formulacji SM-102 i MC3 (Rys. 114). Analiza statystyczna potwierdziła istotność różnic w całkowitym sygnale bioluminescencji uzyskanym dla modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych A^6_{SM-102} i A^{11}_{SM-102} , względem referencyjnego R^1_{SM-102} . Przewaga w intensywności bioluminescencji dla wariantów w formulacji SM-102 skłoniła nas do dalszych prac z tą mieszkanką lipidów i uzyskania większej ilości danych dla modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych w tego rodzaju nanocząstkach lipidowych.

W celu weryfikacji danych uzyskanych dla formulacji SM-102 oraz MC3 postanowiono przygotować kolejne powtórzenie eksperymentu *in vivo* dla obu tych mieszanek lipidów. Zestaw testowanych wariantów nie uległ zmianie, kolejny raz badano dwie referencje R^1 i R^5 oraz dwie modyfikacje A^6 i A^{11} . Częsteczki mRNA zsyntezowano, oczyszczono i sformułowano w analogiczny sposób względem poprzednich testów, ponownie uzyskując zadawalające rezultaty dotyczące jakości wszystkich wykonanych preparatów. LNPs-mRNA podano myszom, a każda z grup liczyła cztery zwierzęta. Obrazowanie wykonano po 4, 8 i 12 godzinach od momentu podania mRNA. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono obecność wyraźnych sygnałów dla wszystkich modyfikacji w obu formacjach (Rys. 115). Tym razem wariant R^5_{MC3} wykazywał prawidłowy mechanizm dostarczania mRNA (LNPs) i translacji, a wyniki ekspresji białka Fluc uzyskane dla tej referencji były najwyższe dla całego zestawu formulacji MC3. Modyfikacje A^6_{MC3} i A^{11}_{MC3} wykazywały wyższe sygnały względem referencyjnego R^1_{MC3} , choć w późniejszych punktach czasowych różnice między A^{11}_{MC3} , a R^1_{MC3} zupełnie zanikły. Wynikało to z bardzo stabilnego sygnału uzyskanego dla R^1_{MC3} , który tylko nieznacznie spadał z czasem. Najwyższe całkowite wartości intensywności bioluminescencji ponownie uzyskano dla modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych w formulacji SM-102 (Rys. 115).

Modyfikacje 3'-końcowe w formulacji SM-102 i MC3

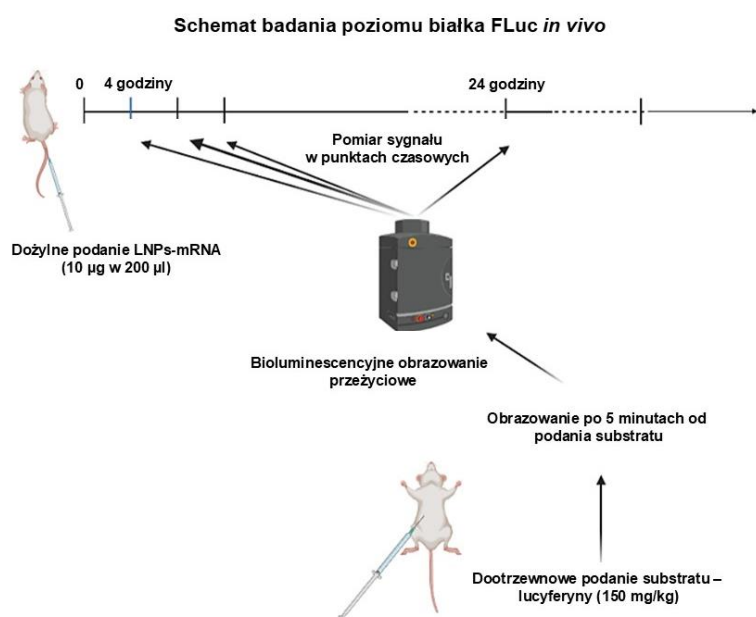


Rysunek 115 Porównanie całkowitego flux dla modyfikacji 3'-końcowych w formulacjach SM-102 i MC3. Wykres po lewej przedstawia dynamikę zmian całkowitego flux dla wariantów mRNA (R^1 , R^5 , A^6 , A^{11}) w obydwu formulacjach. Wykresy po prawej pokazują szczegółowe porównania ekspresji dla każdego wariantu względem R^1 , w zależności od formulacji, w punktach czasowych 4, 8 i 16 godzin po podaniu LNPs-mRNA

Warianty A⁶_{SM-102} i A¹¹_{SM-102} charakteryzowały się znacząco wyższym poziomem produkcji białka Fluc w porównaniu z R¹_{SM-102} po 4 godzinach od podania mRNA. Trend ten odwrócił się jednak w późniejszych punktach pomiarowych, w których referencja R⁵_{SM-102} wykazywała wyższe sygnały, a klasyczny wariant R¹_{SM-102} ponownie utrzymywał stabilny poziom ekspresji białka Fluc. Uzyskane dane potwierdziły przewagę w całkowitym sygnale bioluminescencji białka Fluc, uzyskiwaną dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w porównaniu z klasycznym ogonem poli(A). Niemniej jednak istniejące rozbieżności w obserwowanych zależnościach dla poszczególnych powtórzeń badań *in vivo* wskazały na wysoki poziom złożoności i skomplikowania technologii mRNA.

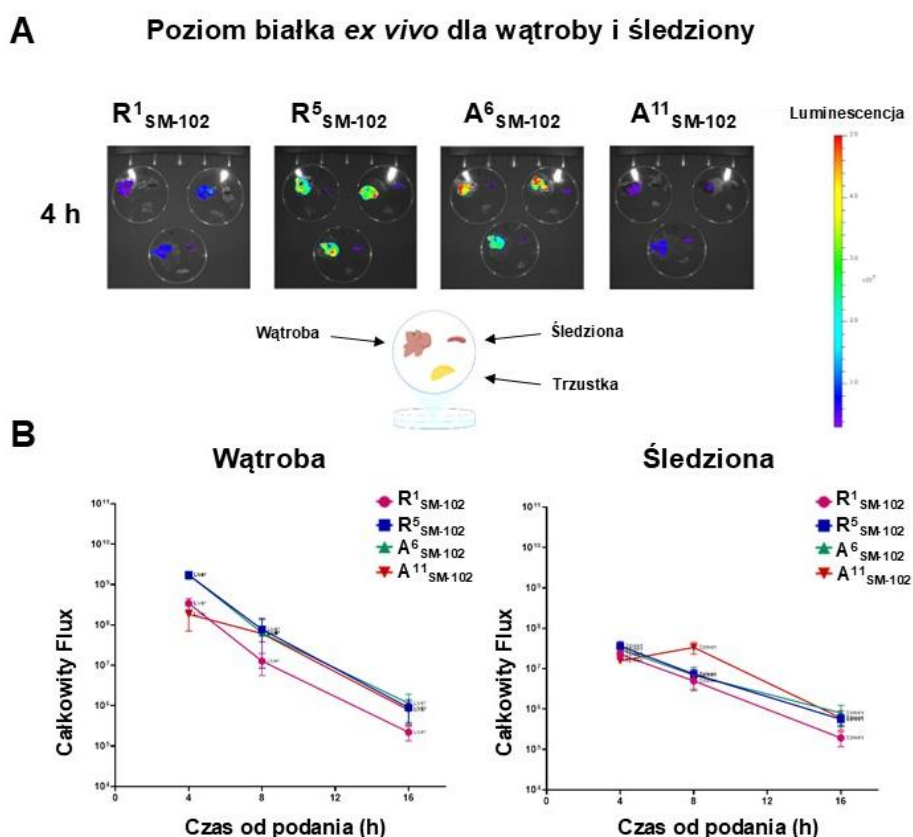
7.4.3 Badanie poziomów ekspresji białka Fluc w organach *ex vivo* dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w formulacji SM-102

Przyżyciowe pomiary bioluminescencji umożliwiły wgląd w poziom ekspresji białka reporterowego Fluc w żywych organizmach, jednak dokładne określenie miejsca kumulacji sygnału, a więc lokalizacji cząsteczek powstałego białka nie było możliwe za pośrednictwem tej metody. Terapeutyczne zastosowanie mRNA wymaga precyzyjnego dostarczania cząsteczek mRNA do wybranych organów, gdzie mogą one inicjować syntezę kluczowych białek niezbędnych dla skutecznej terapii. Różne przeznaczenie kuracji leczniczych wymaga efektywnego działania mRNA w odmiennych tkankach i narządach. Dlatego też poznanie wpływu zastosowanych modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych na lokalizację oraz intensywność sygnału od powstałego białka dla poszczególnych organów badanych zwierząt było niezwykle istotne. W celu przeprowadzenia badania poziomu ekspresji białka Fluc w organach myszy *ex vivo* wykorzystano zwierzęta obrazowane w drugim powtórzaniu biologicznym dla eksperymentu *in vivo* dla formulacji SM-102. Pomiary *ex vivo* wykonała dr Zofia Pilch. Po przeprowadzeniu pierwotnego obrazowania przyżyciowego, myszy poświęcano i izolowano z nich organy: wątroby, śledziony i trzustki, a następnie same narządy ponownie poddawano obrazowaniu w tym samym urządzeniu. Do każdego punktu pomiarowego wykorzystano 3 zwierzęta, badając intensywność bioluminescencji organów po 4, 8 i 16 godzinach od momentu podania mRNA. Wyniki przedstawiono w formie dwuwymiarowych obrazów z kolorowym spektrum intensywności luminescencji danych organów oraz w postaci wykresów całkowitego sygnału luminescencji uzyskanego dla poszczególnych wariantów mRNA w narządach. Schemat badania poziomu białka Fluc w narządach *ex vivo* przedstawiono poniżej (Rys. 116).



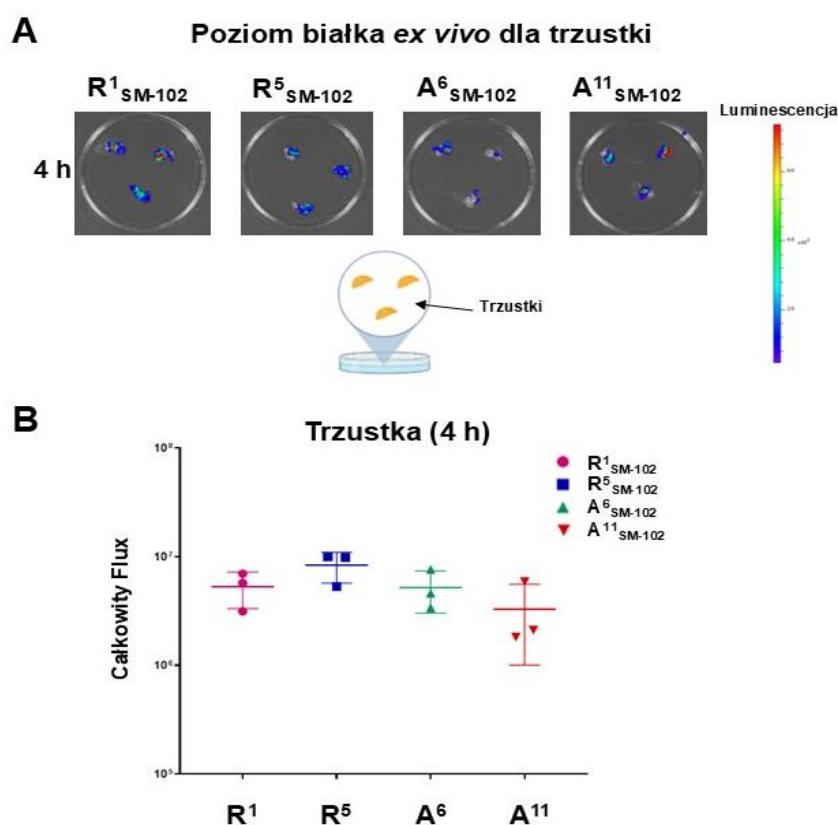
Rysunek 116 Schemat badania poziomu białka Fluc w organach *ex vivo* u myszy po dożylnym podaniu nanocząsteczek lipidowych (LNPs) z zamkniętym mRNA kodującym lucyferazę (Fluc). Myszom szczepu BALB/c podano dożylnie LNPs-mRNA (10 µg w 200 µl), po czym przeprowadzono bioluminescencyjne obrazowanie przeżyciowe w określonych punktach czasowych (4 godziny i 16 godzin po podaniu). Po 5 minutach od dootrzewnowego podania substratu lucyferyny (150 mg/kg), dokonano kolejnego obrazowania w celu detekcji bioluminescencji w żywych organizmach. Następnie myszy poddano eutanazji, a izolowane organy (wątroba, śledziona, trzustka) poddano obrazowaniu *ex vivo* w celu oceny lokalnej ekspresji białka Fluc w poszczególnych narządach

Efektywna detekcja sygnału luminescencji z wnętrza zwierząt jest znacząco utrudniona przez grubą warstwę materii organicznej (ciała), którą światło musi pokonać, aby zostało wykryte. W przypadku sygnałów o niskiej intensywności wykorzystane obrazowania przyżyciowego nie wystarcza do wykrycia obecności lucyferazy w badanych tkankach. Obrazowanie konkretnych narządów umożliwia dokładniejsze określanie poziomów ekspresji w konkretnych strukturach. W naszym przypadku badano wątroby, śledziony oraz trzustki myszy. Zestaw trzech narządów danego zwierzęcia był umieszczany na jednej szklanej szalce, a następnie obrazowano komplety organów trzech zwierząt. Analizując uzyskane wyniki obserwowano wyraźne sygnały luminescencji w badanych wątrobach oraz śledzionach dla wszystkich testowanych modyfikacji (Rys. 117). Intensywności sygnałów w wątrobach były wyższe niż w innych narządach. Zarówno warianty ze modyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi A^6_{SM-102} i A^{11}_{SM-102} , jak i referencja R^5_{SM-102} znacząco przewyższały klasyczny R^1_{SM-102} w ilości białka Fluc w wątrobie. Podobny efekt obserwowano w śledzionach, w których pomimo generalnie niższych odczytów luminescencji, modyfikacje A^6_{SM-102} , A^{11}_{SM-102} , jak i referencja R^5_{SM-102} charakteryzowały się wyższymi sygnałami luminescencji w porównaniu z R^1_{SM-102} . Na uwagę zasługuje wariant A^{11}_{SM-102} , który pomimo niskich wartości uzyskanych w tym powtórzeniu dla całkowitych odczytów bioluminescencji przyżyciowych, wykazywał najwyższe ilości białka Fluc w śledzionach badanych myszy (Rys.117). Może to świadczyć o dodatkowej przewodzie gęstego rozmieszczenia heteronukleotydowych łączników w sekwencji ogona poli(A) mRNA modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych na efektywną ekspresję pożądanego białka w śledzionie.



Rysunek 117 Poziom białka *Fluc* *ex vivo* w wątrobie i śledzionie u myszy po 4 godzinach od dożylnego podania LNPs-mRNA z różnymi modyfikacjami 3'-terminalnymi (R^1 , R^5 , A^6 , A^{11}). A) Rozkład bioluminescencji w wyizolowanych organach (wątroba, śledziona, trzustka). Obrazy umożliwiają wizualną ocenę poziomu białka *Fluc* w badanych tkankach. B) Wykresy zmiany całkowitej luminescencji (Flux) w czasie dla wątroby i śledziony w różnych punktach czasowych (4, 8 i 16 godzin), umożliwiające porównanie dynamiki ekspresji białka *Fluc* w zależności od zastosowanych wariantów mRNA

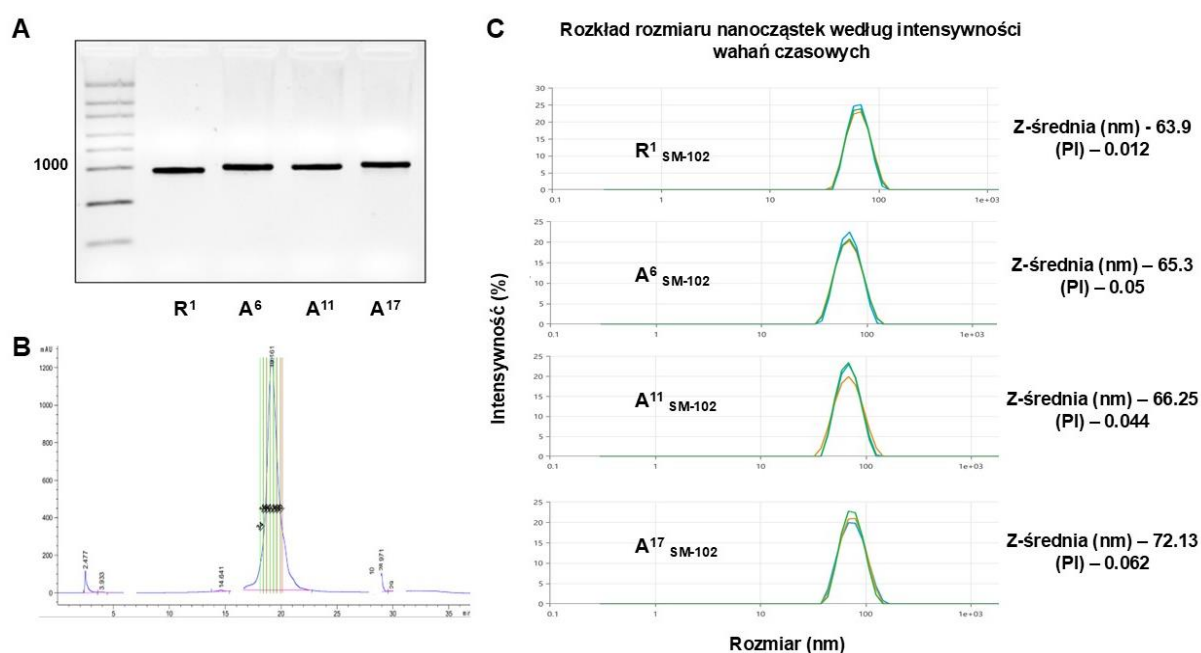
Sygnały luminescencji uzyskane dla trzustek były zbyt niskie, aby możliwe było wspólne obrazowanie tych organów z wątrobami oraz śledzionami. Z tego powodu powtórzono pomiary dla wyłącznie tych narządów, układając wszystkie trzy trzustki dla danego wariantu mRNA na jednym szkiełku. Analizując uzyskane dane, odnotowano sygnały luminescencji dla każdego z badanych organów (Rys. 118). Pomimo niskich wartości luminescencji, białko Fluc powstawało we wszystkich badanych trzustkach, choć sygnał nie pochodził z całej powierzchni narządów i w większości kumulował się w obrębie jedynie części organu. Na podstawie całkowitego sygnału luminescencji określono poziom białka Fluc w tych narządach, który był zbliżony dla wszystkich badanych wariantów. Zarówno referencje R^1_{SM-102} i R^5_{SM-102} , jak i warianty ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-terminalnymi, A^6_{SM-102} i A^{11}_{SM-102} , wykazywały porównywalną ilość białka Fluc w trzustkach. Uwzględniając obliczone odchylenia, nie odnotowano istotnych różnic. Wyniki te sugerują, że zastosowane modyfikacje nie miały wpływu na poziom ekspresji białka reporterowego Fluc w trzustkach badanych zwierząt. Jest to również bardzo ważna informacja w kontekście terapeutycznego wykorzystania narzędzi mRNA do leczenia chorób. Powyższe dane sugerują, że zastosowanie badanych modyfikacji nukleotydowych w obrębie ogona poli(A) cząsteczek mRNA może nie przynieść znaczącej przewagi względem klasycznych rozwiązań w kontekście terapii celowanej w komórki trzustki pacjenta. Jednakże, bez dokładnej wiedzy na temat ilości mRNA dostarczonego do poszczególnych komórek, wniosek ten należy traktować ostrożnie i wymaga on dalszej weryfikacji eksperymentalnej.



Rysunek 118 Poziom białka Fluc ex vivo w trzustce po 4 godzinach od podania LNPs-mRNA z różnymi wariantami sekwencji 3'-terminalnych ($R^1_{Moderna}$, $R^5_{Moderna}$, $A^6_{Moderna}$, $A^{11}_{Moderna}$). Obrazy luminescencyjne ukazują sygnał z trzustek badanych myszy, a poniższy wykres przedstawia całkowity flux dla różnych wariantów mRNA. Wyniki wskazują na porównywalny poziom ekspresji białka Fluc we wszystkich analizowanych wariantach, co sugeruje brak istotnych różnic w poziomie ekspresji białka w trzustkach myszy niezależnie od zastosowanych modyfikacji sekwencji 3'-końcowych

7.4.4 Analiza poziomów ekspresji białka hEPO *in vivo* dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w formulacji SM-102

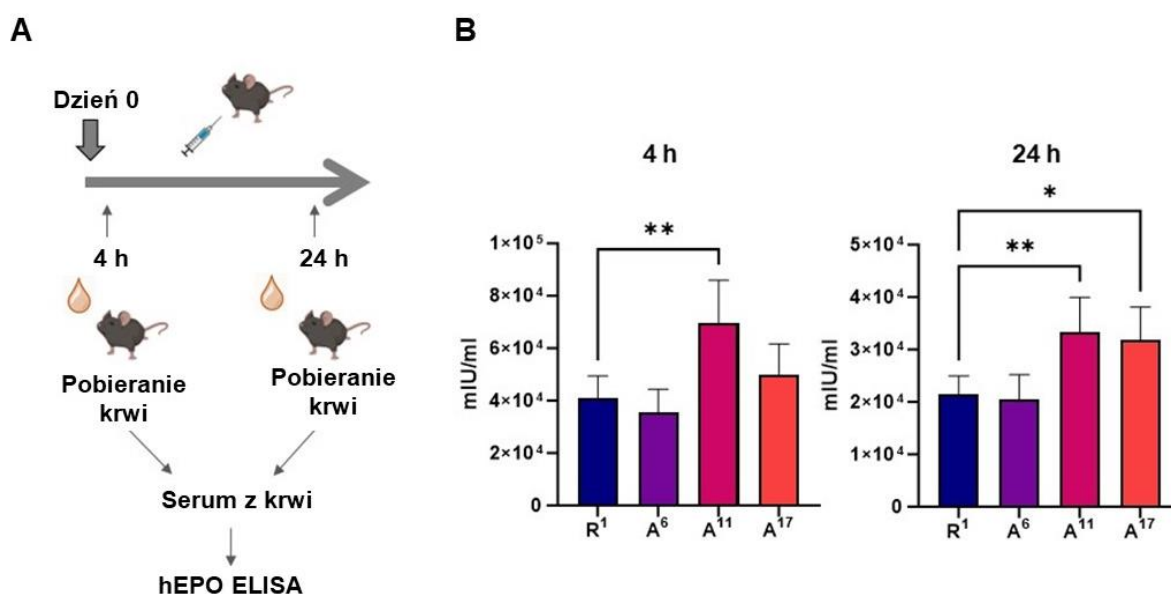
Dotychczas opisane badania *in vivo* przeprowadzone w ramach projektu koncentrowały się na genie lucyferazy (Fluc), którego ekspresja była monitorowana za pomocą pomiarów luminescencji. W celu zweryfikowania uzyskanych wyników na innym białku reporterowym, przygotowałem cząsteczki mRNA z wybranymi zmodyfikowanymi sekwencjami poli(A), kodującymi ludzką erytropoetynę (hEPO), której detekcja odbywa się za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Do eksperymentu wybrano klasyczną referencję R¹, wcześniej badane warianty A⁶ i A¹¹, a także wariant A¹⁷, który charakteryzował się najwyższym poziomem ekspresji białka *in vitro* spośród modyfikacji z zestawu A¹³ - A¹⁷. Przygotowano cząsteczki mRNA z wyżej wymienionymi modyfikacjami, stosując wcześniej opisaną metodykę. Uzyskane preparaty poddano kontroli jakości. Elektroforegram oraz profile oczyszczania RP-HPLC potwierdziły wysoką czystość wszystkich próbek (Rys. 119). Następnie sformułowano cząsteczki mRNA z lipidami SM-102 przy użyciu urządzenia Ignite i zbadano ich rozmiar oraz homogenność. Powstałe nanocząstki lipidowe miały rozmiar w przedziale 64–72 nm, co oznacza, że były nieco mniejsze w porównaniu z LNPs uzyskanymi dla Fluc. Należy jednak zauważyć, że mRNA kodujące hEPO jest niemal dwukrotnie krótsze niż mRNA Fluc, co mogło wpłynąć na finalny rozmiar nanocząsteczek. Współczynniki polidispersyjności dla każdej z modyfikacji były bardzo niskie (PI<0.1), co wskazuje na wysoką jednorodność roztworów badanych nanocząsteczek (Rys. 119).



Rysunek 119 Analiza wielkości i rozkładu nanocząsteczek lipidowych (LNPs) zawierających hEPO mRNA z sekwencjami 3'-terminalnymi (A⁶, A¹¹, A¹⁷) oraz referencji (R¹). A) Elektroforegram oraz B) chromatogram RP-HPLC po oczyszczeniu dla badanych mRNA. C) Rozkład wielkości nanocząsteczek wyznaczony na podstawie intensywności wahań czasowych oraz wartości Z-średnich i indeksu polidispersyjności (PI) dla każdego wariantu mRNA, wyznaczone za pomocą metody DLS

Uzyskane LNPs zawierające hEPO mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi (A⁶, A¹¹, A¹⁷) oraz referencją R¹ podano myszom dożylnie, każda grupa zawierała 5 zwierząt (eksperyment *in vivo* przeprowadziła dr Zofia Pilch). Po 4 i 24 godzinach od podania mRNA, myszom pobierano krew, z której przygotowywano surowicę. Surowica ta była następnie wykorzystywana do ilościowego oznaczenia poziomu ludzkiej erytropoetyny (hEPO) za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Rys. 120). W wyniku przeprowadzonych analiz odnotowano najwyższy poziom białka hEPO po 4 godzinach dla wariantu A¹¹. Ekspresja białka dla modyfikacji A¹⁷

była nieznacznie wyższa w porównaniu do referencji R^1 , jednak różnice między A^6 i R^1 nie były statystycznie istotne. Po 24 godzinach modyfikacja A^{11} nadal wykazywała statystycznie istotną przewagę w produkcji białka względem kontroli. Co ciekawe, w późniejszym punkcie czasowym również wariant A^{17} wykazał istotnie wyższy poziom ekspresji hEPO w porównaniu do R^1 (Rys. 120). Wyniki te wskazały, że mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi, szczególnie A^{11} i A^{17} , podniosły poziom produkcji hEPO w modelu mysim w porównaniu do klasycznej sekwencji ogona poli(A) - R^1 . Efekt ten wzmocnił się w późniejszym punkcie czasowym, co dowodzi dłuższej ekspresji dla zmodyfikowanych mRNA. Przeprowadzony eksperyment potwierdził również, że obserwowane efekty mogą mieć charakter uniwersalny. Niezależnie od stosowanego białka reporterowego, mRNA zawierające odpowiednio zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe mogą znacząco zwiększać ekspresję białka, co ma istotne znaczenie w kontekście zastosowań terapeutycznych, gdzie dobór konkretnego białka odgrywa kluczową rolę w sukcesie leczenia.



Rysunek 120 A) Ogólny schemat eksperymentu: mRNA hEPO z niemodyfikowanym poli(A) (R^1) lub jednym z trzech wariantów poli(A) (A^6 , A^{11} , A^{17}) sformułowane z lipidami SM-102 podano dożylnie, a następnie pobrano krew po 4 i 24 godzinach. Poziomy białka w surowicy krwi określono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. B) Wykresy przedstawiające poziom hEPO (mIU/ml) w surowicy krwi po 4 godzinach i 24 godzinach dla różnych wariantów mRNA (R^1 , A^6 , A^{11} , A^{17}). Warianty A^{11} i A^{17} wykazywały znacząco wyższe poziomy hEPO w porównaniu do referencyjnego R^1 , co zaznaczono istotnością statystyczną (* p < 0.05, ** p < 0.01)

7.5 Podsumowanie

W ramach przeprowadzonych badań zaprojektowałem, otrzymałem i przetestowałem 41 różnych konstruktyw genetycznych, które różniły się sekwencją ogona poli(A) dla trzech kluczowych białek reporterowych: lucyferazy Firefly (Fluc), białka czerwonej fluorescencji mKate2_PEST oraz ludzkiej erytropoetyny (hEPO). Te konstrukty genetyczne miały na celu zbadanie, jak różne modyfikacje sekwencji ogona poli(A) wpływają na stabilność mRNA, efektywność translacji i wydajność ekspresji białek w różnych układach biologicznych. W toku badań zastosowano zarówno klasyczne, jak i nowe, zmodyfikowane sekwencje poli(A), których potencjał terapeutyczny oceniano w różnych systemach biologicznych *in vitro* oraz w badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym. Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów biochemicznych i molekularnych zidentyfikowałem najbardziej obiecujące modyfikacje sekwencji 3'-końcowych, które mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnych terapiach mRNA. Szczególnie istotnym odkryciem była identyfikacja

kluczowego motywu 30 kolejnych adenin znajdujących się na 5' końcu ogona poli(A). Modyfikacje, które pozbawione były tego fragmentu lub posiadały skróconą wersję tego motywu, wykazywały znacząco niższą efektywność translacyjną. Oznacza to, że ten konkretny fragment sekwencji poli(A) odgrywa krytyczną rolę w inicjacji i utrzymaniu translacji białek z mRNA, co czyni go nieodzownym elementem do projektowania efektywnych sekwencji ogona poli(A) w aplikacjach terapeutycznych. Spośród szerokiej gamy testowanych modyfikacji, wybrane warianty, takie jak A⁶, A¹¹ i A¹⁷, wykazywały szczególnie korzystne właściwości pod względem wydajności translacji. Zastosowanie tych modyfikacji umożliwiło nie tylko dłuższą i bardziej stabilną ekspresję białka, ale również poprawiło stabilność samych konstruktów plazmidowych na poziomie DNA. Warianty te nie wykazywały tendencji do skracania ogona poli(A) podczas amplifikacji, co jest kluczowym aspektem dla utrzymania funkcjonalności cząsteczek mRNA w dłuższym czasie. Co więcej, badania *in vivo* na modelu mysim, gdzie wprowadzono lipidowe nanocząsteczki (LNP) zawierające mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami poli(A), potwierdziły wyniki uzyskane w testach *in vitro*. Warianty mRNA takie jak A¹¹ wykazywały wyraźnie wyższy poziom ekspresji białek Fluc oraz EPO w porównaniu z klasycznymi i komercyjnie stosowanymi wariantami sekwencji poli(A), jak R¹ (niezmodyfikowany ogon poli(A)). Co istotne, ekspresja białka utrzymywała się przez dłuższy czas, co jest kluczowym aspektem w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych mRNA, gdzie pożądana jest długotrwała produkcja białka w organizmie. Ciekawą obserwacją była wysoka aktywność translacyjna modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych, które zawierały fragmenty adeninowe z kluczowym motywem 30 kolejnych adenin na 5' końcu ogona poli(A). Warianty takie jak A¹¹ charakteryzowały się nie tylko zwiększoną wydajnością produkcji białka, ale także zapewniały stabilność i integralność molekuł mRNA na poziomie komórkowym. Odkrycie to ma istotne znaczenie dla przyszłości terapii mRNA, w której długotrwała i stabilna ekspresja białek jest kluczowa dla uzyskania skutecznego efektu terapeutycznego. Nie wszystkie modyfikacje okazały się korzystne. Przykładowo, wprowadzenie struktur takich jak G-kwadrupleks całkowicie zahamowało translację, co sugeruje, że niektóre sekwencje mogą mieć negatywny wpływ na ekspresję białka, a ich zastosowanie w terapii mRNA wydaje się bezzasadne. Pozytywne wyniki uzyskane dla modyfikacji takich jak A⁶ i A¹¹ wskazują jednak, że optymalizacja struktur sekwencji 3'-końcowych może być skuteczną strategią zwiększania wydajności translacji mRNA. Warto w tym kontekście przywołać rozwiązania zastosowane w szczepionce CVnCoV firmy CureVac³⁷². Formuła ta opiera się na skróconym ogonie poli(A) o długości 64 nukleotydów (poli(A)₆₄), któremu towarzyszy odcinek 30 nukleotydów cytozynowych poly(C)₃₀ oraz struktura pętli histonowej. Takie podejście umożliwia modulację stabilności i translacji mRNA dzięki wprowadzeniu różnorodnych elementów strukturalnych. Choć niniejsze badania nie obejmowały bezpośrednio podobnych rozwiązań, uzyskane wyniki dla A⁶ i A¹¹ wskazują, że kontrola nad strukturą poli(A) i wprowadzenie specyficznych modyfikacji mogą być obiecującą strategią optymalizacji terapii mRNA.

Jednym z najciekawszych i zaskakujących wniosków z przeprowadzonych badań jest jednak to, że żadne z testowanych modyfikacji, poza G-kwadrupleksem, nie miały istotnego wpływu na stabilność mRNA. Wbrew pierwotnym założeniom, modyfikacje nie spowolniły procesu deadenylacji, co mogłoby wydłużyć czas półtrwania mRNA. Na podstawie dotychczasowej wiedzy o roli poli(A) oczekiwano, że wprowadzenie modyfikacji strukturalnych zwiększy trwałość mRNA, jednak uzyskane wyniki sugerują, że mechanizmy regulujące stabilność i degradację mRNA są bardziej złożone, niż pierwotnie przypuszczano. Fakt ten podkreśla, jak wiele pozostaje jeszcze do odkrycia w biologii mRNA, a jednocześnie skłania do dalszych badań w tym kierunku. Fakt, że większość modyfikacji nie wpływała na stabilność mRNA, pomimo ich oddziaływania na efektywność translacji, stanowi istotny wkład w pogłębianie wiedzy o biologii mRNA. Uzyskane wyniki wskazują, że zwiększenie wydajności translacji nie zawsze wiąże się z wydłużeniem trwałości mRNA. Odkrycie, iż mechanizmy te nie funkcjonują zgodnie z pierwotnymi założeniami, podkreśla złożoność procesów regulujących stabilność

i funkcję mRNA w komórkach oraz uwypukla potrzebę dalszych badań nad mechanizmami kontrolującymi te procesy.

Podsumowując, przeprowadzone badania dostarczyły cennych informacji o tym, jak zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe ogona poli(A) mogą poprawić stabilność i efektywność molekuł mRNA. Zidentyfikowane modyfikacje wykazały potencjał do zastosowania w terapii mRNA, oferując możliwość długotrwałej ekspresji terapeutycznych białek w organizmach, co stanowi istotny krok naprzód w rozwoju technologii opartych na mRNA. W szczególności, warianty takie jak A¹¹ mogą znacząco wpłynąć na przyszłe strategie terapeutyczne, oferując bardziej efektywne narzędzia do leczenia wielu schorzeń poprzez terapie genowe i molekularne.

IV. Podsumowanie badań własnych

Celem niniejszej pracy doktorskiej było kilkupoziomowe usprawnienie technologii wykorzystania cząsteczek mRNA w kontekście zastosowań terapeutycznych poprzez: I) opracowanie metody oceny podatności na odpowiedź immunologiczną syntetycznych analogów kapu RNA, bazując na ich oddziaływaniach z białkiem IFIT1, II) opracowanie metody detekcji dwuniciowych cząsteczek RNA w preparatach mRNA oraz III) opracowanie modyfikacji nukleotydowych ogona poli(A) mRNA, wykazujących zwiększoną stabilność na poziomie matrycy DNA oraz podwyższony potencjał translacyjny. Pierwszą część badań poświęciłem stworzeniu biofizycznej metody pozwalającej na badanie oddziaływania ludzkiego białka immunologicznego IFIT1 z różnorodnie kapowanymi cząsteczkami RNA. Metoda ta miała posłużyć, jako narzędzie do klasyfikacji syntetycznych analogów kapu RNA o potencjale terapeutycznym, oceniając ryzyko ich zdolności do aktywacji szlaku interferonowego wchodzącego w skład wrodzonej odpowiedzi immunologicznej człowieka. Druga część badań skupiała się na opracowaniu metody umożliwiającej detekcję immunogennych dsRNA w preparatach mRNA. Metoda ta, oparta na technice dot-blot wykorzystującej specyficzne względem dsRNA przeciwciała monoklonalne, miała służyć jako narzędzie do rutynowej analizy zawartości dsRNA w preparatach mRNA. Trzecią część badań poświęciłem na stworzenie metody klonowania umożliwiającej wprowadzanie modyfikacji nukleotydowych w obręb ogona poli(A) mRNA oraz skonstruowanie modyfikacji 3'-końcowych poli(A) mRNA wykazujących przewagę w stabilności na poziomie konstruktów DNA, jak i w samej aktywności biologicznej cząsteczek mRNA. Metoda klonowania oparta na technice tępych końców stała się skutecznym narzędziem do wprowadzania dowolnych sekwencji nukleotydowych w obrębie ogona poli(A), umożliwiając amplifikację plazmidowych wektorów DNA z zachowaniem długich, homogennych sekwencji ogona poli(A). Zastosowanie sekwencji 3'-końcowych mRNA umożliwiło z kolei dłuższą i bardziej wydajną ekspresję białek, jak również poprawiło stabilność samych konstruktów plazmidowych na poziomie DNA, co przełożyło się na wysoki potencjał terapeutyczny takich modyfikacji.

W pierwszej części projektu zrealizowałem następujące zadania i sformułowałem na ich podstawie odpowiednie wnioski:

- Synteza cząsteczek RNA ze modyfikowanymi analogami końca 5' RNA

W pierwszej kolejności zsyntezowałem 43 różne ligandy RNA zawierające na końcu 5' syntetyczne analogi struktury kapu przygotowane przez pracowników Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej CeNT UW oraz Wydział Fizyki UW. Wykorzystane modyfikacje zawierały kanoniczne i niekanoniczne analogi kapu RNA, modyfikacje 2'-adenozyny, jako pierwszego transkrybowanego nukleozydu, jak również modyfikacje N6-adenozyny oraz aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny. Syntezy wszystkich RNA dokonałem poprzez reakcję IVT oraz enzymatyczną reakcję wytrawiania niekapowanego RNA. Oczyszczanie RNA przeprowadziłem za pomocą złoża krzemionkowego (handlowo dostępny zestaw) oraz metodą RP-HPLC. Standardowa reakcja IVT, prowadzona w objętości 100 μ l, pozwalała na uzyskanie około 8–10 nmoli każdego z ligandów RNA, co było wystarczające do przeprowadzenia trzech niezależnych pomiarów oddziaływania z IFIT1. Wydajność syntezy RNA oraz kappingu była nieznacznie wyższa w przypadku kanonicznych analogów kapu RNA w porównaniu z niekanonicznymi, co prawdopodobnie wynikało z mniejszych różnic strukturalnych tych modyfikacji względem naturalnych kap-0 i kap-1. Dla modyfikacji 2'-adenozyny oraz N6-adenozyny nie obserwowano znaczących różnic w wydajności oraz kappingu względem kap-1. Warto podkreślić, że protokół IVT nie był optymalizowany dla każdej konkretnej modyfikacji, lecz stanowił kompromis, umożliwiający uzyskanie odpowiedniej ilości materiału badawczego w krótkim czasie. Wszystkie uzyskane ligandy RNA charakteryzowały się

wysoką czystością oraz niską zawartością frakcji niekapowanego RNA, co umożliwiło ich wykorzystanie do badań oddziaływań z białkiem IFIT1.

- Ekspresja i oczyszczanie ludzkiego białka IFIT1

Wykorzystując prokariotycznym system bakteryjny oparty na *E. coli* przeprowadziłem ekspresję białka IFIT1. W celu oczyszczenia IFIT1 z lizatu bakteryjnego zastosowałem trzy etapy chromatograficzne z wykorzystaniem systemu FPLC. W pierwszym etapie przeprowadziłem chromatografię powinowactwa na złożu niklowym, następnie użyłem kolumny heparynowej, a na końcu rozdzieliłem białka za pomocą filtracji żelowej. Otrzymane białko zostało scharakteryzowane za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym oraz poddane identyfikacji za pomocą metody spektrometrii masowej (MS). Finalne preparaty IFIT1 cechowały się wysoką czystością, z zawartością zanieczyszczeń białkowych poniżej 5% oraz wykazywały wysoką stabilność. Takie właściwości umożliwiły wykorzystanie uzyskanego białka w badaniach biofizycznych interakcji z różnorodnymi ligandami RNA.

- Badania oddziaływania kapowanych RNA z IFIT1

Wykorzystałem technikę termoforezy mikroskalowej do opracowania metody oceny powinowactwa różnorodnie kapowanych cząsteczek RNA do białka IFIT1. Na podstawie analizy czterech odmiennych sekwencji RNA, wytypowałem model o długości 70 nukleotydów, jako najodpowiedniejszy do testowania pełnego zestawu modyfikacji. Dzięki pomiarom kompleksów molekularnych IFIT1-RNA, wykonywanych metodą MST, przeprowadziłem ocenę wpływu poszczególnych modyfikacji końca 5' RNA na energię oddziaływania z białkiem IFIT1. Wyniki tych pomiarów umożliwiły głębsze zrozumienie efektu badanych syntetycznych analogów kapu RNA na mechanizm wrodzonej odpowiedzi odpornościowej zależnej od IFIT1. Na podstawie uzyskanych danych, dla wszystkich badanych wariantów, dokonałem selekcji modyfikacji charakteryzujących się najniższym powinowactwem do IFIT1, jako kandydatów o szczególnie wysokim potencjale terapeutycznym, minimalizujących negatywną odpowiedź immunologiczną komórek gospodarza.

Druga część mojego projektu, dotycząca opracowania metody detekcji dwuniciowych RNA w preparatach mRNA obejmowała następujące działania:

- Opracowanie procedury wykrywania dsRNA bazującej na technice dot-blot

Przeprowadziłem optymalizację procedury testu dot-blot, dostosowując ją do wymagań technologii badanych preparatów mRNA poprzez wybór specyficznego przeciwciała monoklonalnego, dobór ilości nanoszonego materiału RNA na membranę, metody detekcji oraz odpowiedniego typu kontroli pozytywnej. Wprowadziłem również aparat Bio-Dot, który zapewnił równomierne nakładanie próbek RNA, a także przełożył się na dokładniejszą analizę densytometryczną uzyskanego po detekcji obrazu.

- Dobór kontroli pozytywnej w postaci markera dsRNA

Z wykorzystaniem przeciwciał (J2) specyficznie wykrywających dsRNA przeprowadziłem selekcję różnorodnych zsyntezowanych wzorców dsRNA o zmiennej długości i zawartości cząsteczek dwuniciowych, jako kontroli pozytywnych testu. Wyznażyłem krzywe wiązania dla wszystkich analizowanych wariantów dsRNA i dostosowałem procedurę wykonania testu w celu maksymalizacji czułości detekcji sygnału chemiluminescencyjnego. Dzięki swojej prostocie, wiarygodności oraz niezawodności, metoda ta stała się istotnym narzędziem w monitorowaniu jakości preparatów mRNA pod względem immunogennych zanieczyszczeń dsRNA. Dodatkowo, została na stałe włączona do

procedur kontroli jakości końcowych produktów mRNA w firmie Explora Therapeutics.

W trzeciej części projektu, która skupiała się na modyfikacjach nukleotydowych sekwencji ogona poli(A) zrealizowałem następujące punkty:

- Opracowanie metody klonowania umożliwiającej wprowadzenie modyfikacji w obręb ogona poli(A) mRNA

Bazując na technice klonowania tępych końców, opracowałem kilkuetapową, enzymatyczną metodę klonowania DNA, która dzięki zastosowaniu specjalnie dobranych szczepów bakteryjnych oraz warunków prowadzenia ich hodowli, umożliwiła amplifikację plazmidowych wektorów DNA z zachowaniem długich, homogennych sekwencji ogona poli(A). Metoda okazała się być bardzo skuteczna, umożliwiając wprowadzanie dowolnych modyfikacji nukleotydowych w obręb końca 3' mRNA.

- Przygotowanie matryc DNA kodujących modyfikowane sekwencje 3'-końcowe

Zaprojektowałem 13 odmiennych modyfikacji nukleotydowych ogona poli(A) mRNA i wykorzystując opracowaną metodę klonowania, wprowadziłem wszystkie te modyfikacje w obręb genów kodujących białka reporterowe Fluc, mKate2 oraz EPO na poziomie matryc DNA. Charakteryzowały się one modularnym układem regionu poli(A), składającym się z fragmentów adeninowych połączonych linkerami zbudowanymi z heterozasad (cytozyny lub guaniny) o całkowitej długości przekraczającej 120 nukleotydów. Uzyskane plazmidowe matryce zostały poddane analizie stabilności w trakcie amplifikacji w systemach bakteryjnych, która wykazała wzrost stabilności tak zmodyfikowanych struktur względem naturalnych oraz komercyjnie wykorzystywanych rozwiązań ogona poli(A).

- Synteza mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi

Uzyskane matryce DNA posłużyły mi do przygotowania mRNA ze wszystkimi zmodyfikowanymi sekwencjami ogona poli(A), kodującymi trzy geny reporterowe. Syntezę przeprowadziłem za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT), a uzyskane mRNA oczyszczono przy użyciu złoża oligo(dT)₂₅ oraz metodą RP-HPLC. Jakość mRNA oceniono za pomocą analizy elektroforetycznej (żele agarozowe) oraz testów dot-blot dsRNA, które potwierdziły bardzo wysoką czystość preparatów i brak immunogennych zanieczyszczeń dsRNA.

- Sekwencjonowanie mRNA metodą Nanopore DRS

Oczyszczone cząsteczki mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi poddano sekwencjonowaniu RNA przy użyciu technologii Nanopore DRS, przeprowadzone przez dr Pawła Krawczyka, które potwierdziło pełną zgodność sekwencji badanych mRNA z sekwencjami zakodowanymi na poziomie matryc DNA.

- Badania aktywności translacyjnej modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych *in vitro*

Cząsteczki mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi kodujące Fluc oraz mKate-2 poddałem następnie badaniom wydajności ekspresji białek w różnorodnych liniach komórkowych (*in vitro*). Wszystkie warianty mRNA ze zmodyfikowanymi ogonami poli(A) transfekowano do czterech linii komórkowych (A549, JAWS II, HEK 293T, HepG2) i badano poziom ekspresji białek w punktach czasowych. Badania *in vitro* przeprowadzone we współpracy z dr Karolem Czubakiem wskazały, że zastosowanie części zaprojektowanych modyfikacji skutkowało długą i bardziej stabilną ekspresją białka w porównaniu z naturalnymi oraz komercyjnie wykorzystywanymi rozwiązaniami końca 3' RNA. Różnice te były szczególnie wyraźne w późniejszych punktach

czasowych, co sugeruje istotne korzyści wynikające ze stosowania tych modyfikacji w kontekście terapeutycznym, gdzie wydłużony czas syntezy białka odgrywa kluczową rolę w osiągnięciu pożądanego efektu leczniczego. Najciekawszą obserwacją była wysoka aktywność translacyjna modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych, zawierających fragmenty adeninowe z kluczowym motywem 30 kolejnych adenin na końcu 5' ogona poli(A). Wyniki te sugerują potencjalny związek między pierwszym białkiem PABP wiążącym się z ogonem poli(A), a wydajną translacją danej nici mRNA.

- Badania aktywności translacyjnej modyfikowanych sekwencji 3'-końcowych *in vivo*

Na podstawie wyników uzyskanych w modelach komórkowych wyselekcjonowałem modyfikacje, które wykazywały najwyższą i najstabilniejszą ekspresję białek, w celu zweryfikowania ich skuteczności w organizmach żywych, na modelu myszy (*in vivo*). Dla tych wybranych wariantów ponownie zsyntetyzowałem mRNA, a następnie, przy użyciu różnych mieszanek lipidowych, sformułowałem mRNA w nanocząstki lipidowe (LNPs). Powstałe LNPs poddano kontroli jakości, która dowiodła wysokiej homogenności oraz prawidłowych rozmiarów wszystkich nanocząstek. mRNA-LNPs podawano następnie myszom i w określonych punktach czasowych przeprowadzano, w zależności od genu reporterowego, pomiary chemiluminescencji dla Fluc lub ilościowe oznaczania za pomocą testu ELISA dla białka EPO. Eksperymenty *in vivo* wykonała dr Zofia Pilch. Wyniki eksperymentów dla Fluc oraz EPO jednoznacznie potwierdziły znaczną przewagę mRNA zawierających wybrane zmodyfikowane sekwencje 3'-końcowe w porównaniu z klasycznym ogonem poli(A) pod względem produkcji białka, ponownie utrzymując wyższy poziom ekspresji również w późniejszych punktach czasowych. Dodatkowo przeprowadzono eksperyment *ex vivo*, analizując poziom ekspresji Fluc w wybranych organach myszy – wątrobie, śledzionie i trzustce. Wyniki te wykazały podwyższony poziom ekspresji Fluc w wątrobie i śledzionie zwierząt, co może sugerować potencjalne zastosowanie tych modyfikacji w terapiach ukierunkowanych na te organy. Potwierdzenie wysokiego potencjału translacyjnego mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi zarówno w modelach komórkowych, jak i zwierzęcych, stanowi pozytywną prognozę dla dalszego rozwijania tych modyfikacji w kontekście zastosowań terapeutycznych.

Podsumowując, mój projekt łączy metody stosowane w biotechnologii i biologii molekularnej z metodami biofizycznymi. Połączenie tych dziedzin nauki umożliwiło mi kompleksowe podejście do badania mRNA, łącząc precyzyjne modyfikacje genetyczne z analizą ich oddziaływań strukturalnych. Jednym z najważniejszych dokonań niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metody badania powinowactwa różnorodnie kapowanych cząsteczek RNA do ludzkiego białka odpornościowego IFIT1. Opracowana metoda oddziaływań z IFIT1 umożliwiła pogłębienie wiedzy na temat wpływu poszczególnych modyfikacji grup funkcyjnych kapu RNA na zależną od interferonu ścieżkę aktywacji wrodzonego układu immunologicznego człowieka. Dodatkowo uzyskane dane poszerzyły charakterystykę nowo syntezowanych analogów końca 5' RNA, umożliwiając pogłębione badania zależności struktura-aktywność i późniejszą weryfikację ich potencjału terapeutycznego pod kątem immunogenności. Drugim istotnym rezultatem było opracowanie szybkiej i niedrożej metody detekcji dwuniciowych RNA w preparatach mRNA. Dzięki zastosowaniu techniki dot-blot, oznaczanie immunogennych dsRNA mogło stać się rutynową praktyką podczas każdej syntezy mRNA, co zwiększyło zakres kontroli jakości finalnych preparatów mRNA. Największym osiągnięciem z perspektywy biologii molekularnej było z kolei opracowanie metody umożliwiającej wprowadzanie dowolnych modyfikacji nukleotydowych w obręb ogona poli(A). Badane modyfikacje nukleotydowe ogona poli(A) mRNA wykazały wysoki potencjał translacyjny w modelach zwierzęcych, zwiększając ekspresję białek od 2- do 4-krotnie w porównaniu do naturalnej sekwencji ogona poli(A). Stabilna i efektywna produkcja białek jest kluczowa dla uzyskania zadowalających rezultatów w terapiach

opartych na mRNA. Zaprezentowane modyfikacje ogona poli(A) mogą znacząco przyczynić się do zwiększenia skuteczności narzędzi molekularnych mRNA w zastosowaniach leczniczych, w tym walce z nowotworami. Planowane są dalsze badania *in vivo*, jak i projektowane są kolejne modyfikowane sekwencje 3'-końcowe, w tym również takie o długości przekraczającej 200 nukleotydów. Jeśli wyniki tych badań potwierdzą potencjał zaproponowanych modyfikacji, wiedza zdobyta w trakcie realizacji tego projektu doktorskiego może odegrać kluczową rolę w projektowaniu bardziej efektywnych leków opartych na mRNA. Może to znaleźć zastosowanie zarówno w terapiach genowych, jak i w opracowywaniu szczepionek mRNA zarówno o charakterze profilaktycznym - przeciwko chorobom wirusowym, jak i szczepionek terapeutycznych stosowanych w walce z nowotworami.

V. Część eksperymentalna

Synteza kapowanych cząsteczek mRNA

Informacje ogólne

Wszystkie handlowo dostępne odczynniki, wykorzystane do syntezy kapowanych cząsteczek mRNA zostały zakupione w firmach Thermo Fisher Scientific (wolne nukleotydy, enzymy), New England Biolabs (enzymy), Sigma-Aldrich (odczynniki chemiczne), Lucigen (enzymy). W eksperymentach użyto filtrowanej wody miliQ. Bufory do HPLC były sporządzane z użyciem metanolu oraz acetonitrylu (HPLC Gradient Grade for LC-MS). Do przygotowania buforujących roztworów octanu trietyloaminy użyto trietyloaminy oraz bezwodnego kwasu octowego. Bufory zostały przefiltrowane oraz odgazowane. Bufory zawierające metanol oraz acetonitryl były przechowywane w temperaturze pokojowej, a bufory pozbawione dodatku rozpuszczalnika organicznego przechowywane były w temperaturze 4°C.

Analizę RP-HPLC prowadzono na urządzeniu Shimadzu LC-40 użyciem kolumny Phenomenex Clarity® 3 µM Oligo-RP 150 x 4,6 mm (przepływ 0.9 ml/min) z zastosowaniem gradientu liniowych acetonitrylu w 0,1 M buforze octanu trietyloaminy (pH 7.0) przy użyciu metody: A: 100 mM TEAAc, B: 200 mM TEAAc/ACN; 10-35% eluentu B w 32 min. Detekcję absorpcji wykonywano przy długości fali 260 nm.

Wszystkie cząsteczki kapowanych RNA zostały zsyntetyzowane poprzez transkrypcję *in vitro* (IVT) z wykorzystaniem promotora T7 Φ6.5 (TAATACGACTCACTATAGGGG, gdzie podkreślony nukleotyd oznacza miejsce rozpoczęcia transkrypcji). Standardowa reakcja transkrypcji (100 µL) była prowadzona przez 1 godzinę w temperaturze 37°C i zawierała stężenia nukleotydów (NTP) i analogów kapów RNA określone na podstawie optymalizacji przeprowadzonej w celu zapewnienia efektywnego włączenia analogu na końcu 5' RNA (wydajnego kapowania). Po syntezie w procesie IVT, cząsteczki RNA zostały wstępnie oczyszczone przy użyciu zestawu Monarch RNA Clean-up (New England Biolabs) zgodnie z protokołem producenta. Następnie wykonano dwuetapowe trawienie enzymatyczne przy użyciu enzymów 5' polifosfatazy (Lucigen) i Xrn-1 (New England Biolabs) w celu usunięcia frakcji niekapowanych RNA. Zawartość niekapowanego RNA (w µg) oszacowano na podstawie ilości materiału RNA i procentowej wydajności kapowania dla poszczególnych analogów. W pierwszym etapie trawienia, reakcja z 5' polifosfatazą pozwoliła na usunięcie grup fosforanowych γ i β z 5'-trifosforanu molekuł RNA. Typowa reakcja (100 µL) była prowadzona przez 1 h w 37°C i zawierała: RNA, 1 U/µL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), bufor 5' polifosfatazy (Lucigen) i 5' polifosfatazę (Lucigen), przy użyciu 1 µL enzymu na 5 µg niekapowanego RNA. Próbkę RNA ponownie oczyszczono za pomocą Monarch RNA Clean-up (New England Biolabs). W drugim etapie trawienia, do degradacji RNA z monofosforanem na końcu 5' użyto wysoce procesywnej 5'→3' egzorybonukleazy Xrn-1. Mieszanina reakcyjna (200 µL) była inkubowana przez 2 godziny w 37°C i zawierała: RNA, 1 U/µL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), bufor Xrn-1 (New England Biolabs) i Xrn-1 (New England Biolabs), przy użyciu 1 µL enzymu na 1 µg niekapowanego RNA. Następnie RNA oczyszczono za pomocą Monarch RNA Clean-Up (New England Biolabs). Wszystkie warianty RNA oczyszczono za pomocą RP-HPLC, wytrącono solami sodowymi (3M NaOAc pH 5,2, izopropanol) i rozpuszczono w wodzie. Mikromolarne stężenia próbek RNA określono przy użyciu NanoDrop (Thermo). Czystość produktów analizowano na podstawie chromatogramów HPLC.

Synteza kapowanych RNA- kanoniczne analogi końca 5' RNA

Syntezę kapowanych cząsteczek RNA dla kanonicznych analogów 5' RNA przeprowadzono za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT). Dla analogów kapów m⁷GpppApG, m⁷GpppA_mpG, m⁷Gppp^{m6}ApG

i $m^7Gppp^{m6}A_{mp}G$, mieszanina transkrypcyjna zawierała 5 mM stężenia UTP/ATP/CTP, 4 mM GTP i 10 mM trinukleotydowego analogu kapu. Dla analogów $m^7GpppGpG$, $m^7GpppCpG$ i $m^7GpppUpG$, mieszanina transkrypcyjna zawierała 4 mM UTP/ATP/CTP, 2 mM GTP i 8 mM trinukleotydowego analogu kapu. Mieszaniny reakcyjne uzupełniono: buforem polimerazy RNA (Thermo), 20 mM $MgCl_2$, 1U/ μL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), 0,002 U/ μL pirofosfatazę nieorganiczną (Thermo), polimerazą T7 RNA (20 U/ μL , Thermo) i 40 ng/ μL matrycą DNA w postaci dwuniciowych oligonukleotydów (Genomed). Aby zatrzymać reakcję, dodano 10 μl 500 mM wodnego roztworu Na_2EDTA . Następnie próbki RNA oczyszczono, a niekapowane RNA enzymatycznie usunięto, zgodnie z ogólną procedurą, uzyskując finalnie wydajności reakcji IVT na poziomie około 2.5- 3.2 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT.

Synteza kapowanych RNA- niekanoniczne analogi końca 5' RNA

Syntezę kapowanych cząsteczek RNA dla niekanonicznych analogów 5' RNA przeprowadzono za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT). Dla analogów kapów (NADpG, FADpG, Glc-ppUpG, $m_3^{2,2,7}GpppApG$, GpppApG i pppUpG) mieszaniny transkrypcyjne zawierały 4 mM UTP/ATP/CTP, 2 mM GTP i 12 mM analogu trinukleotydu/dinukleotydu. Mieszaniny reakcyjne uzupełniono: buforem polimerazy RNA (Thermo), 20 mM $MgCl_2$, 1U/ μL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), 0,002 U/ μL pirofosfatazę nieorganiczną (Thermo), polimerazą T7 RNA (20 U/ μL , Thermo) i 40 ng/ μL matrycą DNA w postaci dwuniciowych oligonukleotydów (Genomed). Aby zatrzymać reakcję, dodano 10 μl 500 mM wodnego roztworu Na_2EDTA . Następnie próbki RNA oczyszczono, a niekapowane RNA enzymatycznie usunięto, zgodnie z procedurą ogólną, uzyskując finalnie wydajności reakcji IVT na poziomie około 2 - 2.5 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT. Wydajności reakcji były niższe ze względu na większy procentowy udział cząsteczek niekapowanego RNA w mieszaninie potranskrypcyjnej, które usunięto za pomocą dwuetapowej reakcji enzymatycznej, opisaną w procedurze ogólnej.

Synteza kapowanych RNA- modyfikacje 2'-adenozyny

Syntezę kapowanych cząsteczek RNA dla analogów 5' RNA z modyfikacjami 2'-adenozyny, pierwszej transkrybowanej zasady przeprowadzono za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT). Dla analogów kapów ($m^7GpppA_{Fp}G$, $m^7Gppp^{m6}A_{Fp}G$, $m^7GpppA_{2'-O-Et}pG$, $m^7GpppA_{2'-O-C_3H_3}pG$, $m^7GpppA_{2'-NH_2}pG$, $m^7GpppA_{2'-N_3}pG$, $m^7GpppA_{2'-S-CH_3}pG$, $m^7GpppA_{2'-O-Bn}pApG$, $m_2^{7,2'-O}GpppA_{2'-O-Bn}pApG$, $m^7GpppA_{LNA}pG$, $m^7GpppA-2'-pG$, $m^7Gppp(araA)pG$, $m^7Gppp(araA_m)pG$) mieszanina transkrypcyjna zawierała 4 mM UTP/ATP/CTP, 2 mM GTP i 8 mM trinukleotydowego analogu kapu. Mieszaniny reakcyjne uzupełniono buforem polimerazy RNA (Thermo), 20 mM $MgCl_2$, 1U/ μL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), 0,002 U/ μL pirofosfatazę nieorganiczną (Thermo), polimerazą T7 RNA (20 U/ μL , Thermo) i 40 ng/ μL matrycą DNA w postaci dwuniciowych oligonukleotydów (Genomed). Aby zatrzymać reakcję, dodano 10 μl 500 mM wodnego roztworu Na_2EDTA . Następnie próbki RNA oczyszczono, a niekapowane RNA enzymatycznie usunięto, zgodnie z procedurą ogólną, uzyskując finalnie wydajności reakcji IVT na poziomie około 2.5-3 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT. Zastosowane modyfikacje nie wpływały na wydajność reakcji względem referencyjnych, kanonicznych analogów kapów 5' RNA.

Synteza kapowanych RNA- modyfikacje N6-adenozyny

Syntezę kapowanych cząsteczek RNA dla analogów 5' RNA z modyfikacjami N6-adenozyny, pierwszej transkrybowanej zasady przeprowadzono za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT). Dla analogów kapów ($m^7Gppp^{Et6}A_{mp}G$, $m^7Gppp^{iPr6}A_{mp}G$, $m^7Gpppm2^{6,6}A_{mp}G$, $m^7Gppp(2-NH_2)^{m6}A_{mp}G$,

m⁷Gppp^{Hex6}A_{mp}G) mieszanina transkrypcyjna zawierała 4 mM UTP/ATP/CTP, 2 mM GTP i 8 mM trinukleotydowego analogu kapu. Mieszaniny reakcyjne uzupełniono buforem polimerazy RNA (Thermo), 20 mM MgCl₂, 1U/μL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), 0,002 U/μL pirofosfatazę nieorganiczną (Thermo), polimerazą T7 RNA (20 U/μL, Thermo) i 40 ng/μL matrycą DNA w postaci dwuniciowych oligonukleotydów (Genomed). Aby zatrzymać reakcję, dodano 10 μl 500 mM wodnego roztworu Na₂EDTA. Następnie próbki RNA oczyszczono, a niekapowane RNA enzymatycznie usunięto, zgodnie z procedurą ogólną, uzyskując finalnie wydajności reakcji IVT na poziomie około 2.5-3 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT. Zastosowane modyfikacje nie wpływały na wydajność reakcji względem referencyjnych, kanonicznych analogów kapów RNA.

Synteza kapowanych RNA- aromatyczne modyfikacje N6-adenozyny

Syntezę kapowanych cząsteczek RNA dla analogów 5' RNA z aromatycznymi modyfikacjami N6-adenozyny, pierwszej transkrybowanej zasady przeprowadzono za pomocą transkrypcji *in vitro* (IVT). Dla analogów kapów (m⁷Gppp^{Bn6}ApG, m⁷Gppp^{Bn6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{(4-OH)Bn6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{7,2'-O}Gppp^{Bn6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{3MeBn6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{4FBn6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{1naph-m-6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{2naph-m-6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{2-CH2-pyridine-n6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{Phet6}A_{mp}G, m⁷Gppp^{Bn6}A_{mp}G, m⁷GppCCl₂pp^{Bn6}A_{mp}G) mieszanina transkrypcyjna zawierała 4 mM UTP/ATP/CTP, 2 mM GTP i 8 mM trinukleotydowego analogu kapu. Mieszaniny reakcyjne uzupełniono buforem polimerazy RNA (Thermo), 20 mM MgCl₂, 1U/μL RiboLock RNase Inhibitor (Thermo), 0,002 U/μL pirofosfatazę nieorganiczną (Thermo), polimerazą T7 RNA (20 U/μL, Thermo) i 40 ng/μL matrycą DNA w postaci dwuniciowych oligonukleotydów (Genomed). Aby zatrzymać reakcję, dodano 10 μl 500 mM wodnego roztworu Na₂EDTA. Następnie próbki RNA oczyszczono, a ze względu na znaczącą zmianę w czasie retencji, powodowaną wysoce hydrofobowymi podstawnikami benzyłowymi oraz innymi pochodnymi aromatycznymi, oczyszczanie za pomocą RP-HPLC umożliwiło całkowity rozdział cząsteczek kapowanego RNA od frakcji niekapowanej. Umożliwiło to pominięcie dla tych modyfikacji etapu enzymatycznego usuwania frakcji niekapowanego RNA. Uzyskane finalne wydajności oczyszczania RNA na poziomie około 2.5 - 3.2 μg RNA/ 1 μl reakcji IVT były nieznacznie wyższe względem kanonicznych analogów 5' RNA. Wpłynęła na to zmiana procedury związana z brakiem konieczności przeprowadzania reakcji enzymatycznych oraz następujących po nich oczyszczania, które prowadziły do strat materiału RNA.

Ekspresja i oczyszczanie białka IFIT1

Optymalizacja ekspresji białka IFIT1

Do procesu optymalizacji ekspresji białka IFIT1 w prokariotycznym systemie bakteryjnym wykorzystano dwa komercyjnie dostępne szczepy *Escherichia coli* : szczep *E. coli* BL21 (DE3)- RIL (Novagen) oraz szczep *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen). Szczep BL21 jest często wykorzystywany do ekspresji białek ze względu na genetyczny deficyt proteaz w tych bakteriach, co przekłada się na wysoką wydajność procesu powstawania rekombinowanych białek. Szczep Rosetta jest rozwinięciem BL21, zaprojektowanym w celu zwiększenia ekspresji białek eukariotycznych (poprzez dodatkowy plazmid), które zawierają kodony rzadko używane w *E. coli*. Plazmid pET28a_IFIT1 (100 ng) dodano do roztworów (50 μl, 100 mM CaCl₂, 10% glicerol) chemokompetentnych bakterii obu szczepów BL21(DE3)- RIL oraz Rosetta (DE3) i inkubowano na lodzie przez 30 minut, następnie zawiesiny bakteryjne przeniesiono do 42°C (szok cieplny) i ponownie inkubowano na lodzie przez dwie minuty. Do bakterii dodano 450 μl płynnego medium SOB (Roth) i inkubowano z wytrząsaniem (1 godzina, 37°C, 350 rpm). Następnie bakterie wysiano na płytki z kanamycyną (30 μg/ml) i inkubowano (16 godzin, 37°C). Pojedynczymi koloniami bakteryjnymi z płytek dla obu szczepów inokulowano płynne media hodowlane LB (Roth) z kanamycyną (30 μg/ml) i prowadzono hodowle do uzyskania

odpowiedniej gęstości optycznej roztworu ($OD_{600} \sim 0.6$). Bakterie następnie schłodzono do temperatury 18°C i indukowano ekspresję 0,5 mM roztworem izopropylu b-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG). Hodowle prowadzono przez 16 godzin, po czym bakterie zwirowano, a uzyskane pelety poddano skróconemu oczyszczaniu z wykorzystaniem złoża niklowego HisPur™ Ni-NTA Resin (Cytiva). Pelety bakteryjne dla obu szczepów zawieszono w 2 ml buforu do lizy (50 mM NaH_2PO_4 pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM imidazol), dodano lizozym (Thermo) w stężeniu końcowym 0.1 mg/ml i inkubowano na lodzie 10 minut. Następnie próbki poddano sonikacji (2.5 min, moc 50%, 30 sekund on/off). Do lizatów dodano 100 μ l złoża niklowego HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo) zawieszonego w buforze do lizy i inkubowano (10 min, 4 °C, rotacja). Próbkę zwirowano (3 min, 4 °C, 4000 rpm) i odrzucono supernatant. Dodano 750 μ l buforu do lizy, zawieszono osad, przeniesiono całość na kolumny Mini Bio-Spin™ Chromatography Columns (Sigma) i zwirowano (3 min, 4°C, 4000 rpm), odrzucono supernatant. Dodano kolejne 750 μ l buforu do lizy (niska sól) i powtórzono zawieszanie i wirowanie na kolumnach pięciokrotnie. Po ostatnim wirowaniu dodano 66 μ l buforu elucyjnego (50 mM NaH_2PO_4 pH 7.5, 250 mM NaCl, 500 mM imidazol), inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej i zwirowano (15 min, 4 °C, 4000 rpm). Finalnie zmierzono stężenie białek w uzyskanych roztworach i pobrano po 6 μ l obu do elektroforezy. Rozdział SDS-PAGE przeprowadzono w buforze 1x Tris-Glicyna-SDS bufor (25 mM Tris - HCl pH 8.3, 190 mM glicyna, 3.5 mM SDS), napięcie wynosiło 200 V, a czas prowadzenia elektroforezy wyniósł około 75 minut.

Ekspresja i oczyszczanie IFIT1

Ludzkie białko IFIT1 zaprojektowano i zamówiono w wektorze plazmidowym przeznaczonym do ekspresji białka pET28a_IFIT1 z serwisu Addgene. Białko IFIT1 (~55 kDa) z metką histydynową na 5'-końcu (ang. *His-tag*) uzyskano z wykorzystaniem prokariotycznego systemu do ekspresji opartej na bakteriiach *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL (Invitrogen) w pożywce LB uzupełnionej antybiotykiem kanamycyną (30 μ g/ml). Komórki bakterii hodowano w temperaturze 37°C do momentu uzyskania zawiesiny o wartości gęstości optycznej roztworu na poziomie $OD_{600} \sim 0.7$ (długość fali $\lambda = 600$ nm), a następnie bakterie schłodzono do temperatury 18°C. Ekspresję białka indukowano 0,5 mM roztworem izopropylu b-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG), prowadząc hodowle przez kolejne 16 godzin. Zawiesinę bakteryjną zwirowano, a uzyskany pelet bakteryjny poddano lizie z wykorzystaniem buforu zawierającego 20 mM HEPES (pH = 7,5), 250 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM β -merkaptioetanol (2-ME), 5% glicerol, 1 mg/ml lizozymu i mieszaninę inhibitorów proteazy (aprotynina, pepstatyna, PMSF, leupeptyna). Lizat bakteryjny poddano sonikacji (15 min, amplituda 50%, 15 s on/off) i odwirowano. Supernatant zawierający białko IFIT1 oczyszczono następnie za pomocą trzech metod chromatograficznych chromatografii cieczowej systemu FPLC. Pierwszym etapem oczyszczania było wykorzystanie chromatografii powinowactwa na immobilizowanych jonach metali (IMAC). Roztwór białka nałożono na kolumnę HisTrap FFTM (Cytiva) uprzednio zrównoważoną buforem zawierającym 20 mM HEPES (pH = 7,5), 250 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM β -merkaptioetanol (2-ME) i 10% glicerol. Białko IFIT1 przepłukano buforem zawierającym 1 M NaCl i eluowano buforem: 20 mM HEPES (pH= 7,5), 250 mM NaCl, 300 mM imidazol, 5 mM β -Merkaptioetanol i 10% glicerol. Następnie zastosowano chromatografię powinowactwa na kolumnie heparynowej w celu usunięcia pozostałych endogennych kwasów nukleinowych i niektórych zanieczyszczeń białkowych z preparatu (po IMAC). Zebrane frakcje białkowe rozcieńczono 20 mM HEPES (pH = 7,5), 1 mM DTT do końcowego stężenia soli ~ 100 mM NaCl i załadowano na kolumnę HiTrap Heparin HP TM (Cytiva) uprzednio zrównoważoną buforem zawierającym 20 mM HEPES (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT (faza A). Metodę przeprowadzono przy stałym wzrastającym udziale fazy B stosując parametr wzrostu 1% fazy B na minutę od 0 do 100% (faza B: 20 mM HEPES, 1000 mM NaCl, 1 mM DTT). Ostatnim etapem oczyszczania białek była filtracja żelowa. Eluowane frakcje nałożono na kolumnę do

filtracji żelowej 75 pg HiLoad 26/600 TM (Cytiva). Próbkę zawierającą IFIT1 odwirowano (10 min, 14 000 RCF, 4°C) w celu usunięcia wszelkich agregatów, zatężono do końcowego stężenia 12 µM, zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C w buforze zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol. Analizę czystości przeprowadzano na podstawie rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Rozdział przeprowadzono w buforze 1x Tris-Glicyna-SDS bufor (25 mM Tris - HCl pH 8.3, 190 mM glicyna, 3.5 mM SDS), napięcie wynosiło 200 V, a czas prowadzenia elektroforezy wyniósł około 85 minut.

Fluorescencyjne znakowanie białka IFIT1

Roztwór IFIT1 (12 µM) odwirowano (10 min, 14 000 RCF, 4°C) i rozcieńczono do stężenia 200 nM w buforze MST zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,5), NaCl, 0,075% Pluronic F-127. Dla ligandów trinukleotydowych analogów kapu RNA bufor zawierał 100 mM NaCl, natomiast dla ligandów kapowanych RNA - 200 mM NaCl. Barwnik RED-tris-NTA (NT-647, Nano Temper Technologies) rozcieńczono w tym samym buforze do stężenia 100 nM. Białko i barwnik zmieszano w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Przed pomiarami MST każdą próbkę znakowanego białka odwirowano w celu usunięcia potencjalnych agregatów (10 min, 14 000 RCF, 4°C).

Termoforeza mikroskalowa MST

Optymalizacja warunków pomiarowych

Przeprowadzono pomiary stabilności termicznej białka IFIT1 metodą DSF na urządzeniu Tychon NT.6 (NanoTemper). W celu uzyskania stabilnych warunków dla prawidłowej interakcji pomiędzy białkiem i ligandami, testowano różne rodzaje buforów. Dodatkowo, aby uniknąć agregacji oraz wytłumić niespecyficzną adsorpcję białek na ścianach kapilar, przetestowano dwa różne detergenty. Badane bufony zawierały: MST bufor I (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween20), MST bufor II (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.075% Pluronic F-127), 20 mM HEPES pH 7.0, 0.05% Tween20, 20 mM HEPES pH 7.0, 0.075% Pluronic F-127, 20 mM HEPES pH 8.0, 0.05% Tween20 oraz 20 mM HEPES pH 8.0, 0.075% Pluronic F-127. Białko IFIT1 zwirowano i doprowadzono do stężenia 1.5 µM wykorzystując wszystkie sześć testowanych buforów. Przygotowane roztwory białka wprowadzono do szklanych kapilar, które były następnie podgrzewane w trakcie pomiarów DSF. Wynik stanowiła pierwsza pochodna obliczona ze stosunku absorbancji (A₃₃₀/A₃₆₀) mierzonej przy długości fali A=330 nm oraz A=360 nm w funkcji wzrastającej temperatury. Następnie przygotowano dwa dodatkowe bufony zawierające NaCl: Bufor I- 20 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl 0.075% Pluronic F-127 oraz Bufor II- 20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM NaCl, 0.075% Pluronic F-127 i wykorzystano do przygotowania kolejnych roztworów IFIT1 o stężeniu 1.5 µM, które ponownie poddano analizie DSF. W obu testowanych warunkach znakowane białko było stabilne; nie zaobserwowano agregacji, adsorpcji, fotobłaknięcia ani foto-wzmocnienia. Do przeprowadzenia optymalizacji czasu inkubacji próbek przygotowano 16 seryjnych podwójnych rozcieńczeń trinukleotydowego analogu kapu RNA (m⁷GpppApG), w buforze: 20 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl 0.075% Pluronic F-127, uzyskując zakres stężeń 10 µM- 0.3 nM. Do wszystkich przygotowanych próbek zawierających kolejne rozcieńczenia liganda dodano roztwory znakowanego białka IFIT1 ze stałym stężeniem (50 nM) w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano 15 minut, 30 minut i 45 minut, a następnie wykonano pomiary MST.

Pomiary bezpośredniego wiązania białko-ligand

Pomiary interakcji białka IFIT1 z analogami kapów RNA oraz kapowanym RNA przeprowadzono na urządzeniu Monolith NT.115 firmy NanoTemper Technologies, w kapilarach Monolith NT.115 Premium Capillaries. We wszystkich eksperymentach MST końcowe stężenie znakowanych białek wynosiło 25 nM. Przygotowano 16 roztworów ligandów o malejących stężeniach metodą seryjnego podwójnego rozcieńczenia. W przypadku analogów kapów RNA, pomiary przeprowadzono w buforze (20 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.075% Pluronic F-127) przy zakresie stężeń ligandu wynoszących zazwyczaj od 10 mM do 305 pM. W przypadku kapowanego RNA, pomiary przeprowadzono w buforze (20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM NaCl, 0.075% Pluronic F-127) i przy stężeniach ligandu w zakresie od 20 μ M do 610 pM. Próbkę końcową przygotowywano przez zmieszanie równej objętości (10 μ l) 100 nM znakowanego białka z ligandem o określonym stężeniu. Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej kapilary wypełniano roztworami i mierzono MST (moc laser 40%).

Analiza danych dla pomiarów MST

Dane termoforetyczne zostały zanalizowane z wykorzystaniem oprogramowania PALMIST v1.5.8, wykorzystano punkty pomiarowe uzyskane w fazie II termoforezy- T-Jump. Krzywa wiązania została dopasowana przy użyciu modelu bezpośredniego wiązania 1:1. Wartości K_D zostały obliczone jako średnie wartości z trzech pomiarów $\pm$ C.I. (przedziały ufności). Wartości fluorescencji zostały znormalizowane i zastosowano logarytmiczną skalę stężenia. Wykresy zostały przygotowane przy użyciu programu GUSSI v1.4.2.

Analiza dwuniciowych cząsteczek RNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem testu dot-blot

Przygotowanie testu dot-blot do wykrywania dwuniciowych RNA

Roztwory mRNA (25 ng, 250 ng) przygotowano w temperaturze 4°C z wykorzystaniem wody wolnej od nukleaz (Thermo) w objętości 25 μ l. Jako kontrolę pozytywną zastosowano komercyjną mieszaninę dwuniciowych RNA (Standard II, dsRNA, NEB) przygotowaną w seryjnym podwójnym rozcieńczeniu w ilościach 50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.12 ng, 1.56 ng i 0.78 ng. Membranę Hybond N+ (Sigma) aktywowano w buforze 1 x TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) i umieszczono w 96-dółkowym aparacie do mikrofiltracji Bio-Dot® (BioRad). Dółki przemyto 50 μ l buforu 1 x TBST, a następnie naniesiono próbki RNA, osuszono membranę próżniowo i usieciowiono z wykorzystaniem promieni UV w urządzeniu Crosslinker UV (energia = 150 000 μ J/cm²). Usieciowaną membranę blokowano (1 godzina, 25°C, 60 ruchów kołysania/min) roztworem odtłuszczonego mleka 5% w buforze 1x TBST. Następnie membranę inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem J2 anti-dsRNA (1:5000, 2% odtłuszczone mleko w 1 x TBST, 16 godzin, 4°C, 10 ruchów kołysania/min), przemyto trzykrotnie buforem 1 x TBST (5 min, 60 ruchów kołysania/min), inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (1:3000, 2% odtłuszczone mleko w 1 x TBST, 1 godzinę, 25°C, 10 ruchów kołysania/min) i ponownie przemyto trzykrotnie buforem 1 x TBST (5 min, 60 ruchów kołysania/min). Detekcję przeprowadzono z wykorzystaniem Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Merck Millipore) i urządzenia Amersham ImageQuant 800 (Thermo).

Modyfikowane sekwencje 3'-końcowe ogona poli(A) mRNA

Przygotowanie wektorów plazmidowych DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi

Informacje ogólne

Plazmidowe wektory DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi przygotowano poprzez zaprojektowanie odpowiednich wstawek jako dwuniciowych oligonukleotydów DNA (Tabela 7) i dodanie każdego zmodyfikowanego wariantu 3'-końcowego do wektora plazmidowego pJet oraz pUC57 kodującego białko lucyferazę Firefly (Fluc), jak również białko mKate2-PEST i ludzką erytropoetynę (EPO). Do tego procesu wykorzystano metodę klonowania tępych końców. Metoda ta umożliwia łączenie dwuniciowych fragmentów DNA o dowolnej długości i sekwencji, co czyni takie podejście niezmiernie elastycznym i pozwalającym na wprowadzenie wielu typów modyfikacji w regionie końca 3' sekwencji DNA. Zastosowanie tej metody umożliwiło otrzymanie wszystkich zaprojektowanych wariantów ogona poli(A).

Przygotowanie oligonukleotydowych wstawek dla zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowymi

Modyfikacja R¹

Dwuniciową wstawkę DNA dla R¹ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencji: A60 (nić kodująca); T60 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 µM każdej nici DNA) i ustawiono reakcję enzymatyczną w celu fosforylacji końców 5' oligonukleotydów przez dodanie kinazy polinukleotydowej T4 (NEB) i buforu 10x dla kinazy polinukleotydowej T4 (NEB). Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie nici hybrydizowano przez ogrzewanie do 95°C i powolne chłodzenie do 25°C przez 2 godziny, gradient temperatury ~2 °C/~3min. Materiał DNA kodujący sekwencję wstawki oczyszczono przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania DNA (Macherey-Nagel) zgodnie z protokołem. Sekwencje wszystkich zastosowanych oligonukleotydów przedstawia Tabela 7.

Modyfikacja R²

Wstawkę DNA dla R² przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencji: A30GCATATGACTA70 (nić kodująca); T70AGTCATATGCT30 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 µM każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja R³

Wstawkę DNA dla R³ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencji: A60TCTAG (nić kodująca); CTAGAT60 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 µM każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja R⁴

Wstawkę DNA dla R⁴ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencji: A28GA60 (nić kodująca); T60CT28 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 µM każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja R⁵

Wstawkę DNA dla R⁵ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów

DNA (Genomed) o sekwencjach: A28CA60 (nić kodująca); T60GT28 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja R⁶

Wstawkę DNA dla R⁶ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) zawierających sekwencję G-kwarupleksu: A2GA30(GGGGTTT)₃GGGGTA15 (nić kodująca); T15ACCCC₃(AAACCCC)T30CT2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A²

Wstawkę DNA dla A² przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GA30)₃ (nić kodująca); (T30C)₃T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A³

Wstawkę DNA dla A³ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GCATATA30)₄ (nić kodująca); (T30ATATGCT)₄T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A⁴

Wstawkę DNA dla A⁴ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GCATATA30)₃ (nić kodująca); (T30ATATGCT)₃T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A⁶

Wstawkę DNA dla A⁶ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(CA30)₃ (nić kodująca); (T30G)₃T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A⁸

Wstawkę DNA dla A⁸ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GA15)₆ (nić kodująca); (T15C)₆T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A⁹

Wstawkę DNA dla A⁹ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GA20)₅ (nić kodująca); (T20C)₅T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹⁰

Wstawkę DNA dla A¹⁰ przygotowano w następujący sposób: roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(GA45)₂ (nić kodująca); (T45C)₂T2 (nić

matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹¹

Wstawkę DNA dla A¹¹ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: A2(CA15)₆ (nić kodująca); (T15G)₆T2 (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹³

Wstawkę DNA dla A¹³ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: T(CA10)₁₁ (nić kodująca); (T10G)₁₁A (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹⁴

Wstawkę DNA dla A¹⁴ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: T(CA13)₈ (nić kodująca); (T13G)₈A (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹⁵

Wstawkę DNA dla A¹⁵ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: T(CA15)₇ (nić kodująca); (T15G)₇A (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹⁶

Wstawkę DNA dla A¹⁶ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: T(CA17)₆ (nić kodująca); (T17G)₆A (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Modyfikacja A¹⁷

Wstawkę DNA dla A¹⁷ przygotowano w następujący sposób: Roztwory dwóch oligonukleotydów DNA (Genomed) o sekwencjach: T(CA20)₅ (nić kodująca); (T20G)₅A (nić matrycowa) zmieszano w stosunku 1:1 (końcowe 60 μ M każdej nici DNA) i kontynuowano jak dla wariantu R¹.

Przygotowanie wektorów plazmidowych do klonowania metodą na tępe końce

Kolisty plazmid kodujący lucyferazę Firefly, mKate2-PEST lub hEPO (5 μ g) linearyzowano (16 godzin, 37°C) enzymem restrykcyjnym AarI (Thermo), 10x buforem AarI (Thermo) i 50x oligo (Thermo) i oczyszczano przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania DNA (Macherey-Nagel). Dodatkowo dla modyfikacji A¹³-A¹⁷ plazmidy trawiono enzymem BcuI w celu usunięcia fragmentu początkowych 30 adenin ogona poli(A), prowadząc reakcję (30 min, 37°C) z enzymem FastDigest BcuI (Thermo) i 10 x FastDigest Buffer (Thermo) i ponownie oczyszczając DNA przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania kwasów nukleinowych (Macherey-Nagel). Następnie przygotowano reakcję

enzymatyczną z polimerazą DNA I, Large Fragment (Klenow), 10x buforem 3 (NEB) i 10 mM NTP (Thermo) usuwając nawisy 3' i wypełniając nawisy 5' dwuniciowej sekwencji, w celu utworzenia tępych końców (15 min, 25°C) i ponownie oczyszczono wektor przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania DNA (Macherey-Nagel). Reakcję defosforylacji przeprowadzono przy użyciu termoczułej fosfatazy alkalicznej FastAP (Thermo) i 10 x buforu Fast AP (Thermo) przez inkubację (10 min, 37°C) i oczyszczenie końcowego wektora (V1) przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania DNA (Macherey-Nagel).

Reakcja ligacji, transformacja bakterii kompetentnych i selekcja pojedynczych klonów

Końcowy roztwór wektora (V1) zawierający 100 ng DNA zmieszano ze wstawkami dla wszystkich wariantów ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$) w stosunku molowym 1:3 (wektor - insert), dodano 10x bufor ligazy (Thermo), PEG 2000 (Thermo), ATP (Thermo) oraz ligazę DNA T4 (Thermo) i inkubowano (1 godzinę, 25 °C), a następnie mieszaninę reakcyjną (20 μ l) schłodzono do 4 °C i inkubowano dodatkowo 1 godzinę. Połowę mieszaniny ligacyjnej (10 μ l) zmieszano z rozmrożonymi na lodzie komercyjnie dostępnymi chemokompetentnymi bakteriami (50 μ L) Stable Competent *E. coli* (NEB) i inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie mieszaninę przeniesiono do 42°C (szok termiczny) i schłodzono na lodzie przez 2 minuty. Następnie dodano 500 μ L pożywki NEB Stable Outgrowth (NEB) i inkubowano w temperaturze 30°C przez 1 godzinę z wytrząsaniem (300 obrotów na minutę). Mieszaninę transformacyjną (200 μ L) rozprowadzono na płytce LB-agar (Roth) z dodatkiem 100 μ g/mL ampicyliny (Roth) i inkubowano (30°C, 16 godzin). Następnie wybrano pojedyncze kolonie dla każdego wariantu ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$) i zaszczerpiono nimi płynne podłoże LB (Roth) w objętości 5 mL i uzupełniono ampicyliną (Roth) w stężeniu 100 μ g/mL, a hodowle inkubowano (30°C, 16 godzin). Następnie hodowle bakteryjne odwirowano (4000g, 10 minut) i plazmidy wszystkich wariantów ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$) oczyszczono przy użyciu handlowo dostępnego zestawu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo). Stężenie zmierzono za pomocą spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo), a plazmidy wysłano do sekwencjonowania DNA metodą Sangera (Genomed). Na podstawie wyników sekwencjonowania potwierdzono włączenie prawidłowych sekwencji kodujących wszystkie zaprojektowane modyfikacje ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$). Roztwory plazmidów zawierające wszystkie warianty ogonów poli(A) wykorzystano do transformacji świeżych chemokompetentnych bakterii (analogicznie do poprzedniej procedury), a następnie wybrano pojedynczą kolonię z płytki agarowej LB (Roth) i zaszczerpiono 200 mL pożywki LB (Roth) z ampicyliną (Roth) w stężeniu 100 μ g/mL i inkubowano (30°C, 16 godzin). Następnie bakterie odwirowano (4000g, 10 minut), a plazmidy oczyszczono na dużą skalę przy użyciu komercyjnego zestawu E.Z.N.A.® FastFilter Plasmid DNA Maxi Kit (Omega) dla wszystkich wariantów ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$).

Przygotowanie matryc DNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi do reakcji transkrypcji *in vitro*

Wektory plazmidowe kodujące lucyferazę Firefly, mKate2-PEST oraz hEPO z różnymi zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi ($A^2 - A^{17}$) oraz referencje ($R^1 - R^6$) linearyzowano przez zmieszanie ich roztworów zawierających 30 μ g DNA z enzymem AarI (Thermo), 10x buforem AarI (Thermo), 50x Oligo (Thermo) i inkubowano (16 godzin, 37°C). Matryce DNA do transkrypcji RNA *in vitro* zostały następnie oczyszczone przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania DNA (Macherey-Nagel). Ponadto, w celu kontroli jednorodności matrycy, wykonano 1% żel agarozowy DNA (VWR), stosując ~ 100 ng matryc DNA dla każdego wariantu ($R^1 - R^6$, $A^2 - A^{17}$) i 6x barwnik obciążający (Thermo). Elektroforezę przeprowadzono w warunkach (1x TAE (40 mM Tris - octan pH 8.0, 1mM EDTA), 140 V, 25 min).

Analiza niestabilności ogonów poli(A) w wektorach plazmidowego DNA

Chemokompetentne bakterie *E.coli* Top10 i bakterie NEB NEB® Stable Competent *E.coli* (High Efficiency) transformowano jak opisano powyżej plazmidami zawierającymi wszystkie modyfikacje ogonów poli(A) (A^2 - A^{17}) i plazmidami zawierającymi referencyjne ogony poli(A) (R^1 - R^6). 30 pojedynczych kolonii dla każdej modyfikacji i referencji wybrano z szalek bakteryjnych, utworzono płynne kultury bakteryjne i oczyszczono plazmidy, analogicznie do procedury opisanej powyżej. Oczyszczone zestawy plazmidów były następnie sekwencjonowane (Saneger) i oceniano długość i poprawność sekwencji ogonów poli(A) po amplifikacji. Na podstawie wyników policzono liczbę kolonii, które wykazywały odchylenia od początkowych parametrów sekwencji (długość, jednorodność) i przedstawiono je w formie procentowego udziału klonów bakteryjnych, w których sekwencja ogona poli(A) została skrócona podczas amplifikacji plazmidu względem ogółu badanych klonów bakteryjnych.

Transkrypcja *in vitro* i oczyszczanie mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi

Mieszaninę do transkrypcji *in vitro* (100 μ l) dla każdego wariantu zmodyfikowanych sekwencji 3'-końcowych przygotowano przez zmieszanie: 4 μ g linearyzowanej matrycy DNA dla każdego wariantu (R^1 - R^6 , A^2 - A^{17}), buforu do transkrypcji (1x, Thermo), GTP (4.0 mM, Thermo), CTP (5.0 mM, Thermo), ATP (5.0 mM, Thermo), Ψ -UTP (5.0 mM, Jena Bioscience), m^7 GpppA_{mp}G-cap1 (10 mM), $MgCl_2$ (15 mM), Ribolock (1U/ μ L, Thermo), pirofosfatazy nieorganicznej (0,002U/ μ L, Thermo) oraz polimerazy RNA T7 (0,125 mg/ml). Po inkubacji przez 1 godzinę w 37°C dodano DNazę I (6 μ L, Thermo) i kontynuowano inkubację przez kolejne 30 minut. Następnie mieszaninę rozcieńczono dwukrotnie wodą i dodano roztwór EDTA (9 μ l, 500 mM, VWR), w celu zahamowania reakcji. Powstałe RNA dla wszystkich wariantów (R^1 - R^6 , A^2 - A^{17}) oczyszczono po IVT przy użyciu POROSTM oligo (dT)₂₅ Affinity Resin (Thermo), nakładając całą objętość reakcji na wcześniej kondycjonowaną żywicę (2 ml) oligo (dT)₂₅ (20 mM Tris pH 7,4, 800 mM NaCl) i inkubowano (10 minut, 25°C). Następnie żywicę przepłukano buforem równoważącym (5 objętości, 20 mM Tris pH 7,4, 800 mM NaCl) i buforem płuczącym (5 objętości, 20 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl). Elucję przeprowadzono przez inkubację żywicy z wodą (2 razy po 3 objętości, 5 minut, 65°C). Wszystkie roztwory mRNA (R^1 - R^6 , A^2 - A^{17}) zostały kolejno przefiltrowane przez sterylny filtr 0,22 μ m i zatężone (Amicon 100 kDa, 15 minut, 5000 RCF, 4°C) do objętości 100 μ l. Końcowym etapem oczyszczania była separacja za pomocą HPLC przy użyciu RNASepTM Prep - RNA Purification Column (ADC Biotec). Bufory A: 100 mM TEAA, B: 100 mM TEAA, 100 mM MeCN. Program: 20% B przez 5 minut, 20-29 % B w ciągu 20 minut, 29-100 % B w ciągu 1 minuty, 100 % B przez 4 minuty, przepływ 5,0 mL/min, 55 °C (RT ~ 35 min). Zebrane frakcje mRNA dla wszystkich wariantów (R^1 - R^6 , A^2 - A^{17}) wytrącono (0,1 objętości 3M NaOAc, 0,7 objętości izopropanolu, 30 minut, -80°C), odwirowano (20 minut, 15 000 RCF, 4°C), ponownie zawieszono w 3 ml 80% EtOH, odwirowano (10 minut, 15 000 RCF, 4°C) i ponownie rozpuszczono w wodzie (120 μ L). Jako kontrolę jakości wykonano żel agarozowy klasy RNA (1%, Thermo), stosując ~ 100 ng każdego wariantu RNA (R^1 - R^6 , A^2 - A^{17}) wraz z 2x barwnikiem RNA (Thermo). Elektroforezę przeprowadzono w warunkach: (1x TBE (90 mM Tris pH 8.3 90 mM kwas boranowy, 2 mM EDTA), 140V, 20 minut). Dodatkowo przeprowadzono analizę typu dot-blot w celu sprawdzenia obecności dwuniciowych cząsteczek RNA (ds-RNA).

Sekwencjonowanie NanoPore DRS

Sekwencjonowanie NanoPore DRS przeprowadził dr Paweł Krawczyk (MOSaIC IIMCB). Bezpośrednie sekwencjonowanie RNA umożliwiające potwierdzenie prawidłowych sekwencji

zaprojektowanych modyfikacji na poziomie finalnego produktu mRNA dla wariantów (R^1 - R^6 , A^2 - A^{10}), wykonane zgodnie z opisem Bilskiej.³⁷³ Do przygotowania biblioteki wykorzystano 50 - 100 ng mRNA dla każdej modyfikacji. Próbkę sporządzono z pomocą zestawu do bezpośredniego sekwencjonowania RNA (nr katalogowy SQK-RNA002, Oxford Nanopore Technologies) zgodnie z instrukcjami producenta. Sekwencjonowanie przeprowadzono przy użyciu R9.4 flow cells na urządzeniu MinION (ONT). Surowe dane zostały wywołane przy użyciu Guppy (ONT), a następnie dane sekwencjonowania (pliki fast5) zostały zdeponowane w Europejskim Archiwum Nukleotydów (ENA).

Formulacja mRNA w nanocząstkach lipidowych LNPs

Preparaty mRNA dla wszystkich badanych wariantów rozcieńczono w buforze do formulacji PNI (Precision NanoSystems) do stężenia ~ 180 ng/ μ l. Roztwory mieszanek lipidowych GeneVoy (Precision NanoSystems), SM-102 (Moderna) oraz MC3 (BroadPharm) rozcieńczono w bezwodnym etanolu (99%) do stężenia 12.5 mM. Przygotowane roztwory mRNA i lipidów przeniesiono do strzykawek i zamontowano wraz z jednorazowym układem mieszalniczym w urządzeniu Ignite (Precision NanoSystems). Parametry procesu formulacji dla wszystkich mieszanek lipidów były identyczne i wynosiły: przepływ składników przez wkład mikroprzepływowy- 12 ml/minutę, początkowa objętość odpadowa- 0.35 ml, stosunek stężeń molowych mRNA do lipidów- 4:1, stosunek N/P= 6 (stosunek dodatnio naładowanych grup aminowych polimeru (N -azot) do ujemnie naładowanych grup fosforanowych kwasu nukleinowego (P)). Uzyskane roztwory LNPs rozcieńczono czterdziestokrotnie w sterylnym buforze PBS (bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}) celem zmniejszenia proporcji rozpuszczalników i tym samym ustabilizowania nanocząstek, a następnie przeniesiono do wkładów filtrujących Amicon® Ultra-15 (Millipore) i wirowano (30 minut, 2 000 RCF, 20°C). Proces wirowania powtarzano do momentu zatężenia roztworu LNPs do objętości około 2 ml. Finalnie próbki przefiltrowano przez sterylny filtr Acrodisc® 0.2 μ m (Cytiva).

Kontrola jakości LNPs z wykorzystaniem metody DLS

Rozkład wielkości i wskaźnik polidispersyjności (PI) określono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) na urządzeniu Malvern Zetasizer Ultra Red (Malvern, UK) w buforze PBS w temperaturze 25°C w trybie rozpraszania wstecznego. Pomiary metodą DLS wykonał dr Marek Baranowski (CeNT UW). W tym celu pobrano 5 μ l każdej próbki LNPs-mRNA i rozcieńczono 200-krotnie w buforze 1x PBS, roztwory przeniesiono do plastikowych kuwet i umieszczono w komorze pomiarowej urządzenia. Pomiary wykonano w tryplikatach dla każdego badanego wariantu.

Pomiar stężenia mRNA w LNPs z wykorzystaniem testu RiboGreen

Na płytkę 96-dołkową naniesiono po 15 μ l każdego badanego LNPs-mRNA, po czym studzienki dopełniono buforem 1 x TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA) do objętości 250 μ l. Uzyskane roztwory zmieszano oddzielnie w stosunku 1:1 z buforem 1 x TE oraz buforem TE zawierającym detergent (2 % Triton-X100). W innych dołkach wykonano krzywą wzorcową RNA. Przygotowano 5 roztworów kontrolnego RNA (Thermo) w stężeniach 2.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, wykorzystując w zmiennej objętości bufor 1 x TE oraz w stałej objętości bufor TE z detergentem (2 % Triton-X100). Płytkę inkubowano 10 minut w 37°C, umożliwiając rozpad nanocząstek lipidowych w próbkach z detergentem i uwolnienie mRNA do roztworu. Następnie do wszystkich studzienek dodano 100 μ l odczynnika RiboGreen (Thermo) i przeprowadzono detekcję sygnału z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Synergy H1 (BioTek) przy długość fali wzbudzenia 485 nm. Dane liczbowe przeniesiono do przygotowanego przez producenta arkusza ilościowego oznaczania RNA (pakiet Excel)

i obliczono wydajność enkapsulacji oraz stężenie mRNA dla każdej badanej próbki.

Funkcjonalna charakterystyka mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi *in vitro*, na podstawie poziomu ekspresji białek Fluc i mKate2 w liniach komórkowych

Komórki A549 (ludzki nabłonkowy rak płuc, ATCC CCL-185), HEK293T (ludzki nabłonkowy rak nerki, ATCC CRL-3216) i HepG2 (ludzki nabłonkowy rak wątrobowo-komórkowy, ATCC HB-8065) hodowano w pożywce DMEM (Gibco) uzupełnionej 10% FBS (Sigma), GlutaMAX (Gibco) i 1% penicyliną/streptomycyną (Gibco) przy 5% CO₂ i 37°C, wilgotność nasycona. JAWS II (mysie niedojrzałe komórki dendrytyczne, ATCC CRL-11904) hodowano w medium RPMI 1640 (Gibco) uzupełnionym 10% FBS, pirogronianem sodu (Gibco), 1% penicyliną/streptomycyną i 5 ng/ml GM-CSF (PeproTech) w temperaturze 5% CO₂ i 37°C, wilgotność nasycona. Jeden dzień przed transfekcją komórki wysiano na 96-dółkową płytkę (10⁴ komórek na studzienkę). Następnego dnia komórki transfekowano mRNA zawierającymi różne warianty ogonów poli(A). Każdy wariant mRNA (R¹ - R⁶, A² - A¹⁷) był transfekowany w trzech powtórzeniach dla wszystkich linii komórkowych. Transfekcję przeprowadzono za pomocą Lipofectamine Messenger MAX (Invitrogen, Waltham, MA, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. W skrócie, dla każdej próbki RNA, 0,15 µL lipofectaminy najpierw rozcieńczono (Mix 1) w 5 µL pożywki Opti-MEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. W innej probówce 50 ng mRNA rozcieńczono w 5 µL pożywki Opti-MEM (Mix 2). Następnie zarówno Mix 1, jak i Mix 2 wymieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przeniesiono do odpowiedniej studzienki 96-dółkowej płytki zawierającej wcześniej wysiane komórki. Po transfekcji komórki inkubowano w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO₂, wilgotność nasycona). W odpowiednich punktach czasowych (4h, 16h, 24h, 48h, 72h) mierzono luminescencję przy użyciu Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. Luminescencję odczytywano na białych, nieprzezroczystych płytkach. Pomiary wykonano przy użyciu czytnika płytek EnVision (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Analiza Western blot dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi

W celu określenia ekspresji białek reporterowych Fluc i mKate2_PEST dla mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi, przeprowadzono transfekcję komórek BMDM z wykorzystaniem mRNA dla wszystkich zaprojektowanych wariantów (R¹ - R⁶, A² - A¹⁷), którą wykonał dr hab. Seweryn Mroczek (MOSAIC IIMCB). Dzień przed transfekcją wysiano 500 tysięcy komórek na 6-dółkową płytkę w podłożu IMDM. Komórki transfekowano 1 µg mRNA kodującym Fluc oraz mKate2_PEST. Wszystkie transfekcje przeprowadzono przy użyciu odczynnika do transfekcji Lipofectamine™ MessengerMAX™ (Invitrogen, LMRNA001) zgodnie z instrukcjami producenta. Komórki zebrano 24 godziny po transfekcji w celu dalszej analizy Western blot. Równą ilość komórek poddano lizie w PBS uzupełnionym 0,1% NP40, inhibitorami proteaz i wiskolazą (końcowe stężenie 0,1 U/ml; A&A Biotechnology, 1010-100) przez 30 minut w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 1200 rpm, a następnie dodano 3x bufor SDS Sample (187,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 150 mM DTT, 0,02 % błękitu bromofenolowego, 30% glicerolu, 3% 2-merkaptioetanolu) i gotowano próbki przez 10 minut. Próbki rozdzielano na 12-15% żelach SDS-PAGE, a następnie białka przenoszono na mokro na membrany nitrocelulozowe Protran (GE Healthcare) przy 400 mA w temperaturze 4°C przez 1,5 godziny w 1x buforze transferowym (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20 % metanol (v/v)). Następnie białka wizualizowano przez barwienie 0,3% w/v Ponceau S w 3% v/v kwasie octowym i digitalizowano. Membrany blokowano przez inkubację w 5 % mleku w buforze TBST przez 1 godzinę, a następnie inkubowano przez noc z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi 1:3000 (mKate2, lucyferaza Firefly), 1:5000 (aktyna, tubulina) w 5% mleku w buforze TBST. Membrany płukano

trzykrotnie w buforze TBST, po 10 minut, inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami króliczymi (anty-mysie) sprzężonymi z HRP (Millipore, 401215) rozcieńczonymi 1:5000 (Millipore, 401393) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Membrany płukano trzykrotnie w buforze 1x TBST, a białka wizualizowano przy użyciu systemu ChemiDoc.

Funkcjonalna charakterystyka mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi *in vivo*, na podstawie poziomu ekspresji białka Fluc w modelu mysim

Eksperymenty *in vivo* zostały wykonane przez dr Zofię Pilch (Zakład Immunologii WUM). Badania przeprowadzono na 10-12-tygodniowych (~25 g) samicach myszy C57BL/6, zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzone zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Myszy pozyskano z Zakładu Hodowli Instytutu Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie i utrzymywano w specyficznym środowisku wolnym od patogenów (SPF) w indywidualnie wentylowanych klatkach (IVC) w warunkach 12-godzinnej cyklu dzień/noc z nieograniczonym dostępem do pożywienia i wody pitnej. W celu określenia charakterystyki funkcjonalnej mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi *in vivo*, przygotowano dla wybranych wariantów roztwory LNPs-mRNA kodujące Fluc oraz hEPO i podawano dożylnie (i.v.) do bocznej żyły ogonowej myszy BALB/c. Każdej myszy zaszczepiono 10 µg mRNA w postaci LNP dla Fluc oraz 1 µg mRNA w postaci LNP dla hEPO. Całkowity sygnał bioluminescencji ciała rejestrowano przyżyciowo po 4 godzinach, 8 godzinach i 16 lub 24 godzinach po podaniu mRNA za pomocą systemu obrazowania IVISSpectrum (Perkin-Elmer). W skrócie, myszom podano dootrzewnowo 150 mg/kg D-lucyferyny (Sydlabs) i znieczulono je poprzez ciągłe wdychanie 3% mieszaniny izofluranu (Baxter) w 100% O₂. Warunki obrazowania były następujące: czas automatycznej akwizycji ustawiony na Auto (maks. 1 min), F/Stop 1 i binning mały. Wartości bioluminescencji w obszarach zainteresowania (ROI) analizowano za pomocą oprogramowania LivingIMAGE dostarczonego przez firmę Perkin-Elmer.

Badanie poziomu białka Fluc dla wyizolowanych organów *ex vivo*

Eksperymenty *ex vivo* zostały wykonane przez dr Zofię Pilch (Zakład Immunologii WUM). Dla badań *in vivo* cząsteczek mRNA ze zmodyfikowanymi sekwencjami 3'-końcowymi w formułacji SM-102 wykonano dodatkowe obrazowanie wyizolowanych z myszy organów: wątroby, śledziony oraz trzustki. Po obrazowaniu przyżyciowym w konkretnych punktach czasowych, zwierzęta poddano eutanazji przez przerwanie rdzenia kręgowego, a następnie izolowano organy. Następnie organy płukano roztworem 0.9 % NaCl i ponownie poddawano obrazowaniu z wykorzystaniem tych samych parametrów (system IVISSpectrum, oprogramowanie LivingIMAGE).

Materiały biologiczne

Białko Polimeraza RNA T7

Białko Polimerazę RNA T7, wykorzystywane w reakcji IVT, zaprojektowano i zamówiono w wektorze plazmidowym przeznaczonym do ekspresji białka pT7-911Q z serwisu Addgene. Ekspresję rozpoczęto od pobrania 1 µl plazmidu pT7-911Q i dodana do 100 µl chemicznie kompetentnych bakterii *E.coli* szczepu BL21 (DE3)-RIL. Bakterie inkubowano 20 minut na lodzie, 45 sekund w 42°C (szok cieplny) i 2 minuty na lodzie. Do zawiesiny bakteryjnej dodano 500 µl medium SOB i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (60 minut, 350 rpm). Uzyskaną hodowlę wysiano na szalki z podłożem LB-agar z dodatkiem ampicyliny (100 µg/mL). Przygotowaną płytkę pozostawiono w 37°C na 16 godzin. Do 25 mL medium LB dodano 25 µL 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 hodowle gęstości optycznej bliskiej OD₆₀₀~0.7 indukowano ekspresję w bakteriach roztworem 0.5 mM IPTG. Zawiesiny inkubowano w 37°C przez 4 godziny. Po hodowli zawiesiny 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 µM, Aprotinina 30 µM, lizozym 0.1 mg/mL) i inkubowano na lodzie 20 minut. Następnie próbki poddano sonikacji (25 min, 50%, 15s 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 500 mM imidazolem. Dla białka polimerazy RNA T7 również zastosowano kolumnę heparynową, umożliwiającą usunięcie kwasów nukleinowych oraz zanieczyszczeń białkowych z preparatu. 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), dodano 50% glicerolu, poporcjowano i przechowywano w temperaturze -20°C.

Makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego

Mysie makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego BMDM (ang. *bone marrow-derived macrophage*) zostały przygotowane przez dr hab. Seweryna Mrocza (MOSaIC IIMCB). Komórki BMDM zostały utworzone z monocytów szpiku kostnego wyizolowanych od dorosłych myszy typu dzikiego (w wieku 12-25 tygodni). Zwierzęta poddano eutanazji poprzez przerwanie rdzenia kręgowego, a następnie izolowano kości udowe i piszczelowe oraz pobierano szpik kostny za pomocą protokołu opartego na wirowaniu. Komórki szpiku kostnego umieszczono w pożywce IMDM (Thermo Fisher Scientific; 21980065) uzupełnionej 10% FBS (Gibco), 100 U/mL penicyliny/0,1 mg/mL roztworu streptomycyny (Sigma-Aldrich) i 10 ng/mL czynnika stymulującego kolonie makrofagów (M-CSF, Preprotech; 315-02) i hodowano w temperaturze 37°C w 5% CO₂, wilgotność nasyciona. Komórki wykorzystano do eksperymentów po 14 dniach różnicowania.

VI. Bibliografia

1. Liu C, Shi Q, Huang X, et al. mRNA-based cancer therapeutics. NATURE REVIEWS CANCER 2023;23(526-543, doi:10.1038/s41568-023-00586-2
2. Richard WC. The genetic code: The molecular basis for genetic expression. 1967.
3. Saito H. THE RNA WORLD 'HYPOTHESIS'. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2022;23(9):582-582, doi:10.1038/s41580-022-00514-6
4. Ball MP. DNA chemical structure.
5. Mehta S. INTRODUCTION TO MOLECULAR BIOLOGY, 2ND ED. INDIANA UNIVERSITY; 2011.
6. Palacio M, Taatjes D. Merging Established Mechanisms with New Insights: Condensates, Hubs, and the Regulation of RNA Polymerase II Transcription. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 2022;434(doi:10.1016/j.jmb.2021.167216
7. Butcher S, Grimes J, Makeyev E, et al. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. NATURE 2001;410(235-240
8. SALMOND G, WHITTENBURY R. BIOLOGY OF MICROORGANISMS, 4TH EDITION - BROCK,TD, SMITH,DW, MADIGAN,MT. NATURE 1985;314(49-49
9. Lewis J, Gunderson S, Mattaj I. The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism. JOURNAL OF CELL SCIENCE 1995;13-19
10. Kasprzyk R, Jemielity J. Enzymatic Assays to Explore Viral mRNA Capping Machinery. CHEMBIOCHEM 2021;22(3236-3253, doi:10.1002/cbic.202100291
11. Cao D, Gao Y, Liang B. Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes. VIRUSES-BASEL 2021;13(doi:10.3390/v13050834
12. Wei J, Liu F, Lu Z, et al. Differential m⁶A, m⁶A_m, and m¹A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. MOLECULAR CELL 2018;71(973-+, doi:10.1016/j.molcel.2018.08.011
13. Galloway A, Cowling V. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE REGULATORY MECHANISMS 2019;1862(270-279, doi:10.1016/j.bbagr.2018.09.011
14. ROGERS J, WALL R. A MECHANISM FOR RNA SPLICING. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA-BIOLOGICAL SCIENCES 1980;77(1877-1879
15. Wang Z, Burge C. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. RNA 2008;14(802-813, doi:10.1261/rna.876308
16. Rodríguez-Trelles F, Tarrio R, Ayala F. Origins and evolution of spliceosomal introns. ANNUAL REVIEW OF GENETICS 2006;40(47-76, doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090625
17. Sahebi M, Hanafi M, van Wijnen A, et al. Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins. GENE 2016;587(107-119, doi:10.1016/j.gene.2016.04.057
18. Lehmann K, Schmidt U. Group II introns: Structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 2003;38(249-303
19. BURMA D. FROM CELL BIOLOGY TO MOLECULAR-BIOLOGY. JOURNAL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH 1993;52(599-606
20. Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, et al. Function of alternative splicing. GENE 2013;514(1-30, doi:10.1016/j.gene.2012.07.083
21. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, et al. Function of alternative splicing. GENE 2005;344(1-20, doi:10.1016/j.gene.2004.10.022
22. Agus H, Bensen A. Mechanisms of mRNA polyadenylation. TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY 2016;40(529-538, doi:10.3906/biy-1505-94
23. Tian B, Graber J. Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2012;3(385-396, doi:10.1002/wrna.116
24. Sun Y, Zhang Y, Hamilton K, et al. Molecular basis for the recognition of the human AAUAAA polyadenylation signal. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 2018;115(E1419-E1428, doi:10.1073/pnas.1718723115
25. Cañadillas J, Varani G. Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. EMBO JOURNAL 2003;22(2821-2830
26. Dominski Z, Marzluff W. Formation of the 3' end of histone mRNA:: Getting closer to the end. GENE 2007;396(373-390, doi:10.1016/j.gene.2007.04.021
27. Laishram R. Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression - Star-PAP vs canonical PAP. FEBS LETTERS 2014;588(2185-2197, doi:10.1016/j.febslet.2014.05.029
28. Balbo P, Bohm A. Proton transfer in the mechanism of polyadenylate polymerase. BIOCHEMICAL JOURNAL 2009;420(229-238, doi:10.1042/BJ20082019
29. Neve J, Patel R, Wang Z, et al. Cleavage and polyadenylation: Ending the message expands gene regulation. RNA BIOLOGY 2017;14(865-890, doi:10.1080/15476286.2017.1306171
30. Tian B, Manley J. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2017;18(18-30, doi:10.1038/nrm.2016.116
31. Blake D, Lynch K. The three as: Alternative splicing, alternative polyadenylation and their impact on apoptosis in immune function*. IMMUNOLOGICAL REVIEWS 2021;304(30-50, doi:10.1111/imr.13018
32. Yuan F, Hankey W, Wagner E, et al. Alternative polyadenylation of mRNA and its role in cancer. GENES & DISEASES 2021;8(61-72, doi:10.1016/j.gendis.2019.10.011
33. Navarro E, Mallen A, Hueso M. Dynamic Variations of 3'UTR Length Reprogram the mRNA Regulatory Landscape. BIOMEDICINES 2021;9(doi:10.3390/biomedicines9111560
34. Qiao P, Zhang C, Shi Y, et al. The role of alternative polyadenylation in breast cancer. FRONTIERS IN GENETICS

2024;15(doi:10.3389/fgene.2024.1377275

35. Jalkanen A, Coleman S, Wilusz J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size - Does this protein make my tail look big? SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY 2014;34(24-32, doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.018
36. De Magistris P. The Great Escape: mRNA Export through the Nuclear Pore Complex. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2021;22(doi:10.3390/ijms22211767
37. Eckmann C, Rammelt C, Wahle E. Control of poly(A) tail length. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2011;2(348-361, doi:10.1002/wrna.56
38. MERRICK W. MECHANISM AND REGULATION OF EUKARYOTIC PROTEIN-SYNTHESIS. MICROBIOLOGICAL REVIEWS 1992;56(291-315
39. Lorsch J, Dever T. Molecular View of 43 S Complex Formation and Start Site Selection in Eukaryotic Translation Initiation. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2010;285(21203-21207, doi:10.1074/jbc.R110.119743
40. Gentry R, Ide N, Comunale V, et al. The mechanism of mRNA cap recognition. NATURE 2024, doi:10.1038/s41586-024-08304-0
41. Kapp L, Lorsch J. GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 2004;335(923-936, doi:10.1016/j.jmb.2003.11.025
42. Rodnina M. The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding. PROTEIN SCIENCE 2016;25(1390-1406, doi:10.1002/pro.2950
43. Polacek N, Mankin A. The ribosomal peptidyl transferase center: Structure, function, evolution, inhibition. CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 2005;40(285-311, doi:10.1080/10409230500326334
44. Voorhees R, Ramakrishnan V. Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. 2013.
45. Hellen C. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY 2018;10(doi:10.1101/cshperspect.a032656
46. Karen S. Browning JB-S. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. The Arabidopsis Book 2015;13
47. Niedzwiecka A, Darzynkiewicz E, Stolarski R. Thermodynamics of mRNA 5' cap binding by eukaryotic translation initiation factor eIF4E. BIOCHEMISTRY 2004;43(13305-13317, doi:10.1021/bi0491651
48. Merrick W. eIF4F: A Retrospective. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2015;290(24091-24099, doi:10.1074/jbc.R115.675280
49. Wang J, Shin B, Alvarado C, et al. Rapid 40S scanning and its regulation by mRNA structure during eukaryotic translation initiation. CELL 2022;185(4474-+, doi:10.1016/j.cell.2022.10.005
50. Rogers G, Lima W, Merrick W. Further characterization of the helicase activity of eIF4A - Substrate specificity. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2001;276(12598-12608
51. Siddiqui N, Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2015;43(763-772, doi:10.1042/BST20150126
52. Clemens M. Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins. JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE 2001;5(221-239
53. Newbury S. Control of mRNA stability in eukaryotes. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2006;34(30-34
54. Houseley J, Tollervy D. The Many Pathways of RNA Degradation. CELL 2009;136(763-776, doi:10.1016/j.cell.2009.01.019
55. Kühn U, Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE STRUCTURE AND EXPRESSION 2004;1678(67-84, doi:10.1016/j.bbaexp.2004.03.008
56. Brook M, Gray N. The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2012;40(856-864, doi:10.1042/BST20120100
57. Garneau N, Wilusz J, Wilusz C. The highways and byways of mRNA decay. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2007;8(113-126, doi:10.1038/nrm2104
58. He F, Jacobson A. Eukaryotic mRNA decapping factors: molecular mechanisms and activity. FEBS JOURNAL 2023;290(5057-5085, doi:10.1111/febs.16626
59. Pelletier J, Schmeing T, Sonenberg N. The multifaceted eukaryotic cap structure. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2021;12(doi:10.1002/wrna.1636
60. Mugridge J, Ziemniak M, Jemielity J, et al. Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1-Dcp2. NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY 2016;23(987-994, doi:10.1038/nsmb.3301
61. Jones C, Zabolotskaya M, Newbury S. The 5' 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2012;3(455-468, doi:10.1002/wrna.1109
62. Zinder J, Lima C. Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. GENES & DEVELOPMENT 2017;31(88-100, doi:10.1101/gad.294769.116
63. Schmid M, Jensen T. The Nuclear RNA Exosome and Its Cofactors. 2019.
64. Yao X, Kojima S, Chen J. Critical role of deadenylation in regulating poly(A) rhythms and circadian gene expression. PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY 2020;16(doi:10.1371/journal.pcbi.1007842.r004
65. Milac A, Bojarska E, Wypijewska del Nogal A. Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE REGULATORY MECHANISMS 2014;1839(452-462, doi:10.1016/j.bbagrm.2014.04.007
66. Kubacka D, Kozarski M, Baranowski M, et al. Substrate-Based Design of Cytosolic Nucleotidase IIIB Inhibitors and Structural Insights into Inhibition Mechanism. PHARMACEUTICALS 2022;15(5), doi:10.3390/ph15050554
67. Hwang H, Park Y, Kim Y. UPF1: From mRNA Surveillance to Protein Quality Control. BIOMEDICINES 2021;9(doi:10.3390/biomedicines9080995
68. Wen J, Brogna S. Nonsense-mediated mRNA decay. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2008;36(514-516, doi:10.1042/BST0360514
69. Gilbertson S, Federspiel J, Hartenian E, et al. Changes in mRNA abundance drive shuttling of RNA binding proteins, linking cytoplasmic RNA degradation to transcription. ELIFE 2018;7(doi:10.7554/eLife.37663

70. Goss D, Kleiman F. Poly(A) binding proteins: are they all created equal? WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2013;4(167-179, doi:10.1002/wrna.1151
71. Melo E, Dhalia R, de Sa C, et al. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain - Role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2003;278(46357-46368, doi:10.1074/jbc.M307624200
72. Samatanga B, Cléry A, Barraud P, et al. Comparative analyses of the thermodynamic RNA binding signatures of different types of RNA recognition motifs. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2017;45(6037-6050, doi:10.1093/nar/gkx136
73. Sawazaki R, Imai S, Yokogawa M, et al. Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail. Scientific Reports 2018;8(doi:10.1038/s41598-018-19659-6
74. Tritschler F, Huntzinger E, Izaurralde E. Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2010;11(379-384, doi:10.1038/nrm2885
75. BAER B, KORNBERG R. REPEATING STRUCTURE OF CYTOPLASMIC POLY(A)-RIBONUCLEOPROTEIN. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA-BIOLOGICAL SCIENCES 1980;77(1890-1892
76. Derry M, Yanagiya A, Martineau Y, et al. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. 2006.
77. Turowski T, Tollervey D. Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2015;6(129-139, doi:10.1002/wrna.1263
78. Wigington C, Williams K, Meers M, et al. Poly(A) RNA-binding proteins and polyadenosine RNA: new members and novel functions. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2014;5(601-622, doi:10.1002/wrna.1233
79. Liao X, Yan Y. Regulation of RNA Metabolism by Deadenylation. PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 2023;50(1002-1016, doi:10.16476/j.pibb.2023.0121
80. Balatsos N, Maragozidis P, Anastasakis D, et al. Modulation of Poly(A)-specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 2012;19(4838-4849
81. Yi H, Park J, Ha M, et al. PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. MOLECULAR CELL 2018;70(1081-+, doi:10.1016/j.molcel.2018.05.009
82. Liu Y, Ramkumar N, Vu L. RNA deadenylation complexes in development and diseases. BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY 2023;101(131-147, doi:10.1139/bcb-2022-0325
83. Mofayez A, Jadalila M, Zangeneh F, et al. Poly(A) tale: From A to A; RNA polyadenylation in prokaryotes and eukaryotes(vol 15, e1837, 2024). WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2024;15(doi:10.1002/wrna.1846
84. Wolf J, Passmore L. mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2014;42(184-187, doi:10.1042/BST20130211
85. Schäfer I, Yamashita M, Schuller J, et al. Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylation. CELL 2019;177(1619-+, doi:10.1016/j.cell.2019.04.013
86. Schäfer I, Rode M, Bonneau F, et al. The structure of the Pan2-Pan3 core complex reveals cross-talk between deadenylase and pseudokinase. NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY 2014;21(591-598, doi:10.1038/nsmb.2834
87. Goldstrohm A, Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2008;9(337-344, doi:10.1038/nrm2370
88. Nicholson AL, Pasquinelli AE. Tales of Detailed Poly(A) Tails. Trends in Cell Biology 2019;29(3):191-200, doi:10.1016/j.tcb.2018.11.002
89. Slobodin B, Bahat A, Schrawat U, et al. Transcription Dynamics Regulate Poly(A) Tails and Expression of the RNA Degradation Machinery to Balance mRNA Levels. MOLECULAR CELL 2020;78(434-+, doi:10.1016/j.molcel.2020.03.022
90. Bresson S, Tollervey D. Tailing Off: PABP and CNOT Generate Cycles of mRNA Deadenylation. MOLECULAR CELL 2018;70(987-988, doi:10.1016/j.molcel.2018.06.009
91. Ukleja M, Valpuesta J, Dziembowski A, et al. Beyond the known functions of the CCR4-NOT complex in gene expression regulatory mechanisms New structural insights to unravel CCR4-NOT mRNA processing machinery. BIOESSAYS 2016;38(1048-1058, doi:10.1002/bies.201600092
92. Webster MW, Chen YH, Stowell JAW, et al. mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. Molecular Cell 2018;70(6):1089-+, doi:10.1016/j.molcel.2018.05.033
93. Takahashi A, Takaoka S, Kobori S, et al. The CCR4-NOT Deadenylation Complex Maintains Adipocyte Identity. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2019;20(doi:10.3390/ijms20215274
94. Park J, Kim M, Yi H, et al. Short poly(A) tails are protected from deadenylation by the LARP1-PABP complex. NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY 2023, doi:10.1038/s41594-023-00930-y
95. Uthaisangsook S, Day N, Bahna S, et al. Innate immunity and its role against infections. ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY 2002;88(253-264
96. Lin A, Loré K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2017;8(doi:10.3389/fimmu.2017.01781
97. Janeway C, Medzhitov R. Innate immune recognition. ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY 2002;20(197-216
98. Santoni G, Cardinali C, Morelli M, et al. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION 2015;12(doi:10.1186/s12974-015-0239-2
99. Wicherska-Pawlowska K, Wrobel T, Rybka J. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2021;22(doi:10.3390/ijms222413397
100. Anders H, Schlondorff D. Innate immune receptors and autophagy: implications for autoimmune kidney injury. KIDNEY INTERNATIONAL 2010;78(1):29-37, doi:10.1038/ki.2010.111
101. Aluri J, Cooper M, Schuettelpelz L. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. CELLS 2021;10(doi:10.3390/cells10061374

102. Hernández J, Montoya C, Urcuqui-Inchima S. The role of toll-like receptors in viral infections:: HIV-1 as a model. *BIOMEDICA* 2007;27(280-293
103. Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY* 2011;21(67-77, doi:10.1002/rmv.680
104. Wang X, Chen Y, Zhang S, et al. Molecular dynamics simulations reveal the selectivity mechanism of structurally similar agonists to TLR7 and TLR8. *PLOS ONE* 2022;17(doi:10.1371/journal.pone.0260565
105. de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen A, et al. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *SCIENCE SIGNALING* 2019;12(doi:10.1126/scisignal.aaw1347
106. De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *CYTOKINE* 2015;74(181-189, doi:10.1016/j.cyto.2015.02.025
107. Vierbuchen T, Stein K, Heine H. RNA is taking its Toll: Impact of RNA-specific Toll-like receptors on health and disease. *ALLERGY* 2019;74(223-235, doi:10.1111/all.13680
108. Li N, Geng C, Hou S, et al. Damage-Associated Molecular Patterns and Their Signaling Pathways in Primary Blast Lung Injury: New Research Progress and Future Directions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 2020;21(doi:10.3390/ijms21176303
109. Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY* 2017;36(57-73, doi:10.1080/08830185.2016.1261318
110. Shaw M, Reimer T, Kim Y, et al. NOD-like receptors (NLRs):: bona fide intracellular microbial sensors. *CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY* 2008;20(377-382, doi:10.1016/j.coi.2008.06.001
111. Kanneganti T. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* 2010;10(688-698, doi:10.1038/nri2851
112. Hiscott J, Nakhaei P, Paz S, et al. RIG-I like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *CYTOKINE* 2010;52(7-7, doi:10.1016/j.cyto.2010.07.032
113. Kato H, Takahasi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *IMMUNOLOGICAL REVIEWS* 2011;243(91-98, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01052.x
114. Marq J, Hausmann S, Veillard N, et al. Short Double-stranded RNAs with an Overhanging 5' ppp-Nucleotide, as Found in Arenavirus Genomes, Act as RIG-I Decoys. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2011;286(6108-6116, doi:10.1074/jbc.M110.186262
115. Ren Z, Ding T, Zuo Z, et al. Regulation of MAVS Expression and Signaling Function in the Antiviral Innate Immune Response. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 2020;11(doi:10.3389/fimmu.2020.01030
116. Veazey J, Chapman T, Smyth T, et al. Distinct roles for MDA5 and TLR3 in the acute response to inhaled double-stranded RNA. *PLOS ONE* 2019;14(doi:10.1371/journal.pone.0216056
117. Rodriguez K, Bruns A, Horvath C. MDA5 and LGP2: Accomplices and Antagonists of Antiviral Signal Transduction. *JOURNAL OF VIROLOGY* 2014;88(8194-8200, doi:10.1128/JVI.00640-14
118. Guimaraes E, Marinho F, de Queiroz N, et al. Impact of STING Inflammatory Signaling during Intracellular Bacterial Infections. *CELLS* 2022;11(doi:10.3390/cells11010074
119. Hopfner K, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY* 2020;21(501-521, doi:10.1038/s41580-020-0244-x
120. Shinde O, Li P. The molecular mechanism of dsDNA sensing through the cGAS-STING pathway. 2024.
121. Zhang K, Huang Q, Li X, et al. The cGAS-STING pathway in viral infections: a promising link between inflammation, oxidative stress and autophagy. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 2024;15(doi:10.3389/fimmu.2024.1352479
122. Yum S, Li M, Fang Y, et al. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF-κB that mediate immune defense against tumors and viral infections. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 2021;118(doi:10.1073/pnas.2100225118
123. Bonjardim C. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses - and viruses counteract IFN action. *MICROBES AND INFECTION* 2005;7(569-578, doi:10.1016/j.micinf.2005.02.001
124. Feng H, Zhang Y, Gui J, et al. Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses. *PLOS PATHOGENS* 2021;17(doi:10.1371/journal.ppat.1009220
125. Nan Y, Wu C, Zhang Y. Interplay between Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Activated by type I Interferons and viral Antagonism. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 2017;8(doi:10.3389/fimmu.2017.01758
126. Hovanessian A. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS* 2007;18(351-361, doi:10.1016/j.cytogfr.2007.06.003
127. Yang E, Li M. All About the RNA: Interferon-Stimulated Genes That Interfere With Viral RNA Processes. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 2020;11(doi:10.3389/fimmu.2020.605024
128. Fleith RC, Mears HV, Leong XY, et al. IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic Acids Research* 2018;46(10):5269-5285, doi:10.1093/nar/gky191
129. Hyde JL, Diamond MS. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2 '-O methylation. *Virology* 2015;479(66-74, doi:10.1016/j.virol.2015.01.019
130. Daugherty MD, Schaller AM, Geballe AP, et al. Evolution-guided functional analyses reveal diverse antiviral specificities encoded by IFIT1 genes in mammals. *Elife* 2016;5(doi:10.7554/eLife.14228
131. Fensterl V, Sen GC. The <i>ISG56</i>/<i>IFIT1</i> Gene Family. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2011;31(1):71-78, doi:10.1089/jir.2010.0101
132. Pidugu VK, Pidugu HB, Wu MM, et al. Emerging Functions of Human IFIT Proteins in Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2019;6(doi:10.3389/fmolb.2019.00148
133. Pidugu VK, Wu MM, Pidugu HB, et al. IFIT1 and IFIT3 modulate the drug response in human oral squamous cell carcinoma through interaction and activation of Hsp90. *Cancer Research* 2019;79(13), doi:10.1158/1538-7445.sabcs18-2098

134. Fensterl V, Sen GC. Interferon-Induced Ifit Proteins: Their Role in Viral Pathogenesis. *Journal of Virology* 2015;89(5):2462-2468, doi:10.1128/jvi.02744-14
135. Wu Y, Xing J, Li X, et al. Roles of interferon induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) family in autoimmune disease. *AUTOIMMUNITY REVIEWS* 2023;22(doi:10.1016/j.autrev.2023.103453
136. Abbas YM, Laudenbach BT, Martinez-Montero S, et al. Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017;114(11):E2106-E2115, doi:10.1073/pnas.1612444114
137. Szretter KJ, Daniels BP, Cho H, et al. 2'-O Methylation of the Viral mRNA Cap by West Nile Virus Evades Ifit1-Dependent and -Independent Mechanisms of Host Restriction In Vivo. *Plos Pathogens* 2012;8(5), doi:10.1371/journal.ppat.1002698
138. Diamond M, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* 2013;13(46-57, doi:10.1038/nri3344
139. Abbas YM, Pichmair A, Gorna MW, et al. Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature* 2013;494(7435):60-64, doi:10.1038/nature11783
140. Kumar P, Sweeney TR, Skabkin MA, et al. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1-and 5' ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Research* 2014;42(5):3228-3245, doi:10.1093/nar/gkt1321
141. Hui DJ, Bhasker CR, Merrick WC, et al. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2•GTP•Met-tRNA_{Met}. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(41):39477-39482, doi:10.1074/jbc.M305038200
142. Terenzi F, Hui DJ, Merrick WC, et al. Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(45):34064-34071, doi:10.1074/jbc.M605771200
143. Diamond M. IFIT1: A dual sensor and effector molecule that detects non-2'-O-methylated viral RNA and inhibits its translation. *CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS* 2014;25(543-550, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.05.002
144. Tran V, Ledwith M, Thamamongood T, et al. Influenza virus repurposes the antiviral protein IFIT2 to promote translation of viral mRNAs. *NATURE MICROBIOLOGY* 2020;5(1490-+, doi:10.1038/s41564-020-0778-x
145. Mears H, Sweeney T. Better together: the role of IFIT protein-protein interactions in the antiviral response. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 2018;99(1463-1477, doi:10.1099/jgv.0.001149
146. Vladimer G, Gorna M, Superti-Furga G. IFITs: emerging roles as key anti-viral proteins. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 2014;5(doi:10.3389/fimmu.2014.00094
147. Wang Z, Qin J, Zhao J, et al. Inflammatory IFIT3 renders chemotherapy resistance by regulating post-translational modification of VDAC2 in pancreatic cancer. *THERANOSTICS* 2020;10(7178-7192, doi:10.7150/thno.43093
148. Zhang B, Liu X, Chen W, et al. IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA* 2013;45(867-874, doi:10.1093/abbs/gmt088
149. Pichlmair A, Lassnig C, Eberle CA, et al. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature Immunology* 2011;12(7):624-U177, doi:10.1038/ni.2048
150. Yang ZL, Liang HH, Zhou Q, et al. Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. *Cell Research* 2012;22(9):1328-1338, doi:10.1038/cr.2012.111
151. Choi YJ, Bowman JW, Jung JU. A Talented Duo: IFIT1 and IFIT3 Patrol Viral RNA Caps. *Immunity* 2018;48(3):474-476, doi:10.1016/j.immuni.2018.03.001
152. Y.M. A. PDB 5UDI. 2017. Available from: <https://doi.org/10.2210/pdb5UDI/pdb>.
153. Reynaud J, Kim D, Atasheva S, et al. IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon. *PLOS PATHOGENS* 2015;11(doi:10.1371/journal.ppat.1004863
154. KUSARI J, SEN G. REGULATION OF SYNTHESIS AND TURNOVER OF AN INTERFERON-INDUCIBLE MESSENGER-RNA. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 1986;6(2062-2067
155. Li D, Swaminathan S. Human IFIT proteins inhibit lytic replication of KSHV: A new feed-forward loop in the innate immune system. *PLOS PATHOGENS* 2019;15(doi:10.1371/journal.ppat.1007609
156. Li M, MacDonald M, Rice C. To translate, or not to translate: viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes. *TRENDS IN CELL BIOLOGY* 2015;25(320-329, doi:10.1016/j.tcb.2015.02.001
157. Gomes-Duarte A, Lacerda R, Menezes J, et al. eIF3: a factor for human health and disease. *RNA BIOLOGY* 2018;15(26-34, doi:10.1080/15476286.2017.1391437
158. Yin Y, Long J, Sun Y, et al. The function and clinical significance of eIF3 in cancer. *GENE* 2018;673(130-133, doi:10.1016/j.gene.2018.06.034
159. Habjan M, Hubel P, Lacerda L, et al. Sequestration by IFIT1 Impairs Translation of 2'-O-unmethylated Capped RNA. *Plos Pathogens* 2013;9(10), doi:10.1371/journal.ppat.1003663
160. Kimura T, Katoh H, Kayama H, et al. Ifit1 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication through Binding to 5' Capped 2'-O Unmethylated RNA. *Journal of Virology* 2013;87(18):9997-10003, doi:10.1128/jvi.00883-13
161. Miedziak B, Dobczynska A, Darzynkiewicz ZM, et al. Kinetic analysis of IFIT1 and IFIT5 interactions with different native and engineered RNAs and its consequences for designing mRNA-based therapeutics. *Rna* 2020;26(1):58-68, doi:10.1261/rna.073304.119
162. Chung TDY, Cianci C, Hagen M, et al. BIOCHEMICAL-STUDIES ON CAPPED RNA PRIMERS IDENTIFY A CLASS OF OLIGONUCLEOTIDE INHIBITORS OF THE INFLUENZA-VIRUS RNA-POLYMERASE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(6):2372-2376, doi:10.1073/pnas.91.6.2372
163. Zhang Y, Wei YW, Zhang XD, et al. Rational Design of Human Metapneumovirus Live Attenuated Vaccine Candidates by Inhibiting Viral mRNA Cap Methyltransferase. *Journal of Virology* 2014;88(19):11411-11429, doi:10.1128/jvi.00876-14
164. Katibah GE, Lee HJ, Huizar JP, et al. tRNA Binding, Structure, and Localization of the Human Interferon-Induced Protein IFIT5. *Molecular Cell* 2013;49(4):743-750, doi:10.1016/j.molcel.2012.12.015
165. Johnson B, VanBlargan LA, Xu W, et al. Human IFIT3 Modulates IFIT1 RNA Binding Specificity and Protein Stability.

- Immunity 2018;48(3):487-+, doi:10.1016/j.immuni.2018.01.014
166. Warminski M, Trepkowska E, Smietanski M, et al. Trinucleotide mRNA Cap Analogue *N*-6-Benzylated at the Site of Posttranscriptional ^{m6}A_m Mark Facilitates mRNA Purification and Confers Superior Translational Properties In Vitro and In Vivo. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2024;146(8):149-8163, doi:10.1021/jacs.3c12629
 167. Kim Y. RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE 2022;54(4):455-465, doi:10.1038/s12276-022-00757-5
 168. Chavda V, Soni S, Vora L, et al. mRNA-Based Vaccines and Therapeutics for COVID-19 and Future Pandemics. VACCINES 2022;10(doi:10.3390/vaccines10122150
 169. Zhao B, He C. Pseudouridine in a new era of RNA modifications. CELL RESEARCH 2015;25(1):153-154, doi:10.1038/cr.2014.143
 170. MELTON D, KRIEG P, REBAGLIATI M, et al. EFFICIENT INVITRO SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY-ACTIVE RNA AND RNA HYBRIDIZATION PROBES FROM PLASMIDS CONTAINING A BACTERIOPHAGE-SP6 PROMOTER. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 1984;12(7):7035-7056
 171. Leader B, Baca Q, Golan D. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY 2008;7(2):31-39, doi:10.1038/nrd2399
 172. Slade N. Viral vectors in gene therapy. PERIODICUM BIOLOGORUM 2001;103(1):139-143
 173. Hampson G, Towse A, Pearson S, et al. Gene therapy: evidence, value and affordability in the US health care system. JOURNAL OF COMPARATIVE EFFECTIVENESS RESEARCH 2018;7(1):15-28, doi:10.2217/ce-2017-0068
 174. Messina S, Sframeli M, Maggi L, et al. Spinal muscular atrophy: state of the art and new therapeutic strategies. NEUROLOGICAL SCIENCES 2022;43(6):615-624, doi:10.1007/s10072-021-05258-3
 175. www.newbornscreening.info. 2023. Available from: www.newbornscreening.info.
 176. Messina S, Sframeli M. New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE 2020;9(doi:10.3390/jcm9072222
 177. Prakash V. Spinraza-a rare disease success story. GENE THERAPY 2017;24(4):497-497, doi:10.1038/gt.2017.59
 178. Li H, Yang Y, Hong W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. SIGNAL TRANSDUCTION AND TARGETED THERAPY 2020;5(doi:10.1038/s41392-019-0089-y
 179. Jiang F, Doudna J. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. 2017.
 180. Sander J, Maeder M, Reyon D, et al. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2010;38(W462-W468, doi:10.1093/nar/gkq319
 181. Choi K, Lee S. CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. BIOTECHNOLOGY ADVANCES 2016;34(11):1180-1209, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.002
 182. Lino C, Harper J, Carney J, et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. DRUG DELIVERY 2018;25(12):1234-1257, doi:10.1080/10717544.2018.1474964
 183. Dueva R, Iliakis G. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. TRANSLATIONAL CANCER RESEARCH 2013;2(1):163-177, doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.05.02
 184. Costa JR BB. Genome editing using engineered nucleases and their use in genomic screening. Assay Guidance 2017;
 185. Lim K, Yoon C, Yokota T. Applications of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. JOURNAL OF PERSONALIZED MEDICINE 2018;8(doi:10.3390/jpm8040038
 186. Gu Y, Duan J, Yang N, et al. mRNA vaccines in the prevention and treatment of diseases. MEDCOMM 2022;3(doi:10.1002/mco2.167
 187. Wang Y, Zhang Z, Luo J, et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. MOLECULAR CANCER 2021;20(doi:10.1186/s12943-021-01311-z
 188. Mascellino M, Di Timoteo F, De Angelis M, et al. Overview of the Main Anti-SARS-CoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety. INFECTION AND DRUG RESISTANCE 2021;14(3):3459-3476, doi:10.2147/IDR.S315727
 189. Rzymiski P, Szuster-Ciesielska A, Dzieciatkowski T, et al. mRNA vaccines: The future of prevention of viral infections? JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2023;95(doi:10.1002/jmv.28572
 190. Moderna. Moderna Receives U.S. FDA Approval for RSV Vaccine mRESVIA(R). 2024. Available from: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2024/Moderna-Receives-U.S.-FDA-Approval-for-RSV-Vaccine-mRESVIAR/default.aspx>.
 191. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt S, et al. Three decades of messenger RNA vaccine development. NANO TODAY 2019;28(doi:10.1016/j.nantod.2019.100766
 192. Mauro V. Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. BIODRUGS 2018;32(1):69-81, doi:10.1007/s40259-018-0261-x
 193. Jorgensen F, Hobolth A, Hornshøj H, et al. Comparative analysis of protein coding sequences from human, mouse and the domesticated pig. BMC BIOLOGY 2005;3(doi:10.1186/1741-7007-3-2
 194. Blenke E, Ørnskov E, Schöneich C, et al. The Storage and In-Use Stability of mRNA Vaccines and Therapeutics: Not A Cold Case. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2023;112(3):386-403, doi:10.1016/j.xphs.2022.11.001
 195. Diebold S, Massacrier C, Akira S, et al. Nucleic acid agonists for toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 2006;36(3):3256-3267, doi:10.1002/eji.200636617
 196. Devoldere J, Dewitte H, De Smedt S, et al. Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger. DRUG DISCOVERY TODAY 2016;21(1):11-25, doi:10.1016/j.drudis.2015.07.009
 197. Vaidyanathan S, Azizian K, Haque A, et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase *Cas9* mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS 2018;12(5):530-542, doi:10.1016/j.omtn.2018.06.010
 198. Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them.

- NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2018;19(158-174, doi:10.1038/nrm.2017.103
199. Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY 2019;11(doi:10.1101/cshperspect.a034728
200. Perenkov A, Sergeeva A, Vedunova M, et al. In Vitro Transcribed RNA-Based Platform Vaccines: Past, Present, and Future. VACCINES 2023;11(doi:10.3390/vaccines11101600
201. Greger M. The human/animal interface: Emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY 2007;33(243-299, doi:10.1080/10408410701647594
202. Zhang C, Maruggi G, Shan H, et al. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2019;10(doi:10.3389/fimmu.2019.00594
203. Teo S. Review of COVID-19 mRNA Vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273. JOURNAL OF PHARMACY PRACTICE 2022;35(947-951, doi:10.1177/08971900211009650
204. Nitika, Wei J, Hui A. The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Recent Updates. INFECTION AND DRUG RESISTANCE 2021;14(5271-5285, doi:10.2147/IDR.S341694
205. Muhammed Y, Nadabo A, Pius M, et al. SARS-CoV-2 spike protein and RNA dependent RNA polymerase as targets for drug and vaccine development: A review. BIOSAFETY AND HEALTH 2021;3(249-263, doi:10.1016/j.bsheal.2021.07.003
206. Reichmuth A, Oberli M, Jaklenec A, et al. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. THERAPEUTIC DELIVERY 2016;7(319-334, doi:10.4155/tde-2016-0006
207. Kartikasari A, Prakash M, Cox M, et al. Therapeutic Cancer Vaccines - T Cell Responses and Epigenetic Modulation. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2019;9(doi:10.3389/fimmu.2018.03109
208. Chandra S, Wilson J, Good D, et al. mRNA vaccines: a new era in vaccine development. ONCOLOGY RESEARCH 2024;32(1543-1564, doi:10.32604/or.2024.043987
209. Jackson N, Kester K, Casimiro D, et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. NPJ VACCINES 2020;5(doi:10.1038/s41541-020-0159-8
210. Guo X, Liu D, Huang Y, et al. Revolutionizing viral disease vaccination: the promising clinical advancements of non-replicating mRNA vaccines. VIROLOGY JOURNAL 2023;20(doi:10.1186/s12985-023-02023-0
211. Schmidt C, Schnierle B. Self-Amplifying RNA Vaccine Candidates: Alternative Platforms for mRNA Vaccine Development. PATHOGENS 2023;12(doi:10.3390/pathogens12010138
212. Bloom K, van den Berg F, Arbutnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. GENE THERAPY 2021;28(117-129, doi:10.1038/s41434-020-00204-y
213. Vasudevan J, Skandhan A, Skandhan A, et al. Zika virus. REVIEWS IN MEDICAL MICROBIOLOGY 2018;29(43-50, doi:10.1097/MRM.0000000000000126
214. Marrs C, Olson G, Saade G, et al. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. AMERICAN JOURNAL OF PERINATOLOGY 2016;33(625-639, doi:10.1055/s-0036-1580089
215. Ding J, Aldo P, Roberts C, et al. Placenta-derived interferon-stimulated gene 20 controls ZIKA virus infection. EMBO REPORTS 2021;22(10), doi:10.15252/embr.202152450
216. Han L, Song S, Feng H, et al. A roadmap for developing Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) vaccines: Lessons from the past, strategies for the future. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2023;245(doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125514
217. Li X, Qi J, Wang J, et al. Nanoparticle technology for mRNA: Delivery strategy, clinical application and developmental landscape. THERANOSTICS 2024;14(738-760, doi:10.7150/thno.84291
218. Freyn A, da Silva J, Rosado V, et al. A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice. MOLECULAR THERAPY 2020;28(7):1569-1584, doi:10.1016/j.ymthe.2020.04.018
219. Fierro C, Brune D, Shaw M, et al. Safety and Immunogenicity of a Messenger RNA-Based Cytomegalovirus Vaccine in Healthy Adults: Results From a Phase 1 Randomized Clinical Trial. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 2024;230(E668-E678, doi:10.1093/infdis/jiae114
220. Sekigawa I, Nawata M, Seta N, et al. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2002;20(559-564
221. Huang Y, Zhu X, Guo X, et al. Advances in mRNA vaccines for viral diseases. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2023;95(doi:10.1002/jmv.28924
222. Qiu X, Xu S, Lu Y, et al. Development of mRNA vaccines against respiratory syncytial virus (RSV). CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS 2022;68(37-53, doi:10.1016/j.cytogfr.2022.10.001
223. Welliver R. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. JOURNAL OF PEDIATRICS 2003;143(S112-S117, doi:10.1067/S0022-3476(03)00508-0
224. Sotirov S, Dimitrov I. Tumor-Derived Antigenic Peptides as Potential Cancer Vaccines. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2024;25(doi:10.3390/ijms25094934
225. KAY J. MECHANISMS OF LYMPHOCYTE-T ACTIVATION. IMMUNOLOGY LETTERS 1991;29(51-54
226. Panda A, Bose S, Sarkar T, et al. Cancer-immune therapy: restoration of immune response in cancer by immune cell modulation. NUCLEUS-INDIA 2017;60(93-109, doi:10.1007/s13237-017-0194-7
227. Mateus J, Dan J, Zhang Z, et al. Low-dose mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells. SCIENCE 2021;374(420-+, doi:10.1126/science.abj9853
228. Blass E, Ott P. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY 2021;18(215-229, doi:10.1038/s41571-020-00460-2
229. Song J, Zhang Y, Zhou C, et al. The dawn of a new Era: mRNA vaccines in colorectal cancer immunotherapy. INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY 2024;132(doi:10.1016/j.intimp.2024.112037
230. Zhou H, Ma Y, Liu F, et al. Current advances in cancer vaccines targeting NY-ESO-1 for solid cancer treatment. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2023;14(doi:10.3389/fimmu.2023.1255799
231. Saud A, Sagineedu S, Ng H, et al. Melanoma metastasis: What role does melanin play? (Review). ONCOLOGY REPORTS

- 2022;48(doi:10.3892/or.2022.8432
232. Barbier A, Jiang A, Zhang P, et al. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. NATURE BIOTECHNOLOGY 2022;40(840-854, doi:10.1038/s41587-022-01294-2
233. Burris H, Patel M, Cho D, et al. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 2019;37(
234. Chen X, Chen L, Peng X, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer: Clinical implications and future considerations. TRANSLATIONAL ONCOLOGY 2024;40(doi:10.1016/j.tranon.2023.101851
235. Yang J, Hu L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. MEDICINAL RESEARCH REVIEWS 2019;39(265-301, doi:10.1002/med.21530
236. Han X, Alu A, Liu H, et al. Biomaterial-assisted biotherapy: A brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy. BIOACTIVE MATERIALS 2022;17(29-48, doi:10.1016/j.bioactmat.2022.01.011
237. Di J, Huang P, Chen X. Targeting Strategies for Site-Specific mRNA Delivery. BIOCONJUGATE CHEMISTRY 2024;35(453-456, doi:10.1021/acs.bioconjchem.4c00038
238. Wang Y, Su H, Yang Y, et al. Systemic Delivery of Modified mRNA Encoding Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase for Targeted Cancer Gene Therapy. MOLECULAR THERAPY 2013;21(358-367, doi:10.1038/mt.2012.250
239. Stephan M. Empowering patients patients from within: Emerging nanomedicines for *in vivo* immune cell reprogramming. SEMINARS IN IMMUNOLOGY 2021;56(doi:10.1016/j.smim.2021.101537
240. Rad D, Rad M, Bazaz S, et al. A Comprehensive Review on Intracellular Delivery. ADVANCED MATERIALS 2021;33(doi:10.1002/adma.202005363
241. Qin M, Du G, Sun X. Recent Advances in the Noninvasive Delivery of mRNA. ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH 2021;54(4262-4271, doi:10.1021/acs.accounts.1c00493
242. Nicolas J, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. EXPERT REVIEW OF VACCINES 2008;7(1201-1214, doi:10.1586/14760584.7.8.1201
243. Petousis-Harris H. Vaccine injection technique and reactogenicity-Evidence for practice. VACCINE 2008;26(6299-6304, doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.052
244. Jiang H, Wang Q, Sun X. Lymph node targeting strategies to improve vaccination efficacy. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE 2017;267(47-56, doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.009
245. Goyal F, Chattopadhyay A, Navik U, et al. Advancing Cancer Immunotherapy: The Potential of mRNA Vaccines As a Promising Therapeutic Approach. ADVANCED THERAPEUTICS 2024;7(doi:10.1002/adtp.202300255
246. Wei J, Hui A. The paradigm shift in treatment from Covid-19 to oncology with mRNA vaccines. CANCER TREATMENT REVIEWS 2022;107(doi:10.1016/j.ctrv.2022.102405
247. Zeng C, Zhang C, Walker P, et al. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. 2022.
248. USMAN N, CEDERGREN R. EXPLOITING THE CHEMICAL SYNTHESIS OF RNA. TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 1992;17(334-339
249. Van den Brulle J, Fischer M, Langmann T, et al. A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. BIOTECHNIQUES 2008;45(340-343
250. Becette O, Olenginski L, Dayie T. Solid-Phase Chemical Synthesis of Stable Isotope-Labeled RNA to Aid Structure and Dynamics Studies by NMR Spectroscopy. MOLECULES 2019;24(doi:10.3390/molecules24193476
251. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase (Reprinted from Nature vol 226, pg 1209-1211, 1970). REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY 1998;8(4-6
252. Muzaffar S, Prasad B. HISTORY OF BIOTECHNOLOGY. 2018.
253. Beckert B, Masquida B. Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. 2011.
254. CHAMBERLIN M, KINGSTON R, GILMAN M, et al. ISOLATION OF BACTERIAL AND BACTERIOPHAGE RNA-POLYMERASES AND THEIR USE IN SYNTHESIS OF RNA INVITRO. METHODS IN ENZYMOLOGY 1983;101(540-568
255. IKEDA R, LIGMAN C, WARSHAMANA S. T7 PROMOTER CONTACTS ESSENTIAL FOR PROMOTER ACTIVITY INVIVO. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 1992;20(2517-2524
256. Sastry S, Ross B. Probing the interaction of T7 RNA polymerase with promoter. BIOCHEMISTRY 1999;38(4972-4981
257. Uptain S, Kane C, Chamberlin M. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY 1997;66(117-172
258. Lenk R, Kleindienst W, Szabó G, et al. Understanding the impact of *in vitro* transcription byproducts and contaminants. FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES 2024;11(doi:10.3389/fmolb.2024.1426129
259. Li X, Lu C, Stewart M, et al. Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 2009;488(23-33, doi:10.1016/j.abb.2009.06.008
260. Chen Y, Hur S. Cellular origins of dsRNA, their recognition and consequences. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2022;23(286-301, doi:10.1038/s41580-021-00430-1
261. Martínez J, Lampaya V, Larraga A, et al. Purification of linearized template plasmid DNA decreases double-stranded RNA formation during IVT reaction. FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES 2023;10(doi:10.3389/fmolb.2023.1248511
262. Mu X, Greenwald E, Ahmad S, et al. An origin of the immunogenicity of *in vitro* transcribed RNA. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2018;46(5239-5249, doi:10.1093/nar/gky177
263. Flynt A. Insecticidal RNA interference, thinking beyond long dsRNA. PEST MANAGEMENT SCIENCE 2021;77(2179-2187, doi:10.1002/ps.6147
264. Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, et al. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from *In Vitro*-Transcribed mRNA. MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS 2019;15(26-35, doi:10.1016/j.omtn.2019.02.018
265. Roy B. Effects of mRNA Modifications on Translation: An Overview. 2021.

266. Dousis A, Ravichandran K, Hobert E, et al. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts. *NATURE BIOTECHNOLOGY* 2023;41(560-+, doi:10.1038/s41587-022-01525-6
267. de Faria I, Imler J, Marques J. Protocol for the analysis of double-stranded RNAs in virus-infected insect cells using anti-RNA antibodies. *STAR PROTOCOLS* 2023;4(doi:10.1016/j.xpro.2022.102033
268. Surti P, Kim M, Phan L, et al. Progress on dot-blot assay as a promising analytical tool: Detection from molecules to cells. *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY* 2022;157(doi:10.1016/j.trac.2022.116736
269. Glów D, Pianka D, Sulej A, et al. Sequence-specific cleavage of dsRNA by Mini-III RNase. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 2015;43(2864-2873, doi:10.1093/nar/gkv009
270. Xu SQ, Yang KP, Li RS, et al. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(18), doi:10.3390/ijms21186582
271. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevryev D, et al. The Dual Role of the Innate Immune System in the Effectiveness of mRNA Therapeutics. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 2023;24(doi:10.3390/ijms241914820
272. Heine A, Juranek S, Brossart P. Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases. *MOLECULAR CANCER* 2021;20(doi:10.1186/s12943-021-01339-1
273. Zhang H, Zhang L, Lin A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *NATURE* 2023;621(396-+, doi:10.1038/s41586-023-06127-z
274. Webb C, Ip S, Bathula N, et al. Current Status and Future Perspectives on MRNA Drug Manufacturing. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 2022;19(1047-1058, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.2c00010
275. Zhang J, Liu Y, Li C, et al. Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules. *PHARMACEUTICS* 2023;15(doi:10.3390/pharmaceutics15092182
276. Mu X, Hur S. Immunogenicity of *<i>In Vitro</i>*-Transcribed RNA. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH* 2021;54(4012-4023, doi:10.1021/acs.accounts.1c00521
277. Kauffman K, Mir F, Jhunjhunwala S, et al. Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles *<i>in vivo</i>*. *BIOMATERIALS* 2016;109(78-87, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.09.006
278. Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt S, et al. N^{¹-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE* 2015;217(337-344, doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.051}
279. Karikó K, Muramatsu H, Welsh F, et al. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *MOLECULAR THERAPY* 2008;16(1833-1840, doi:10.1038/mt.2008.200
280. Monroe J, Eyler D, Mitchell L, et al. N1-Methylpseudouridine and pseudouridine modifications modulate mRNA decoding during translation. *NATURE COMMUNICATIONS* 2024;15(doi:10.1038/s41467-024-51301-0
281. Wuebben C, Bartok E, Hartmann G. Innate sensing of mRNA vaccines. *CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY* 2022;79(doi:10.1016/j.coi.2022.102249
282. Grudzien E, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, et al. Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA* 2004;10(1479-1487, doi:10.1261/rna.7380904
283. VOS J, SASKER M, STUNNENBERG H. VACCINIA VIRUS CAPPING ENZYME IS A TRANSCRIPTION INITIATION-FACTOR. *EMBO JOURNAL* 1991;10(2553-2558
284. Jemielity J, Kowalska J, Rydzik A, et al. Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge - synthesis, applications and prospects. *NEW JOURNAL OF CHEMISTRY* 2010;34(829-844, doi:10.1039/c0nj00041h
285. Grudzien-Nogalska E, Stepinski J, Jemielity J, et al. Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCA) and their applications in mRNA translation and stability. 2007.
286. Ramanathan A, Robb G, Chan S. mRNA capping: biological functions and applications. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 2016;44(7511-7526, doi:10.1093/nar/gkw551
287. Henderson J, Ujita A, Hill E, et al. Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription (vol 1, e39, 2021). *CURRENT PROTOCOLS* 2021;1(doi:10.1002/cpz1.336
288. Warminski M, Mamot A, Depaix A, et al. Chemical Modifications of mRNA Ends for Therapeutic Applications. *Accounts of Chemical Research* 2023;56(20):2814-2826, doi:10.1021/acs.accounts.3c00442
289. Kowalska J, Lewdorowicz M, Zuberek 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* 2008;14(6):1119-1131, doi:10.1261/rna.990208
290. Wojtczak B, Sikorski P, Fac-Dabrowska K, et al. 5'-Phosphorothiolate Dinucleotide Cap Analogues: Reagents for Messenger RNA Modification and Potent Small-Molecular Inhibitors of Decapping Enzymes. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 2018;140(18):5987-5999, doi:10.1021/jacs.8b02597
291. Warminski M, Depaix A, Ziemkiewicz K, et al. Trinucleotide cap analogs with triphosphate chain modifications: synthesis, properties, and evaluation as mRNA capping reagents. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 2024, doi:10.1093/nar/gkae763
292. Gu W, Xu Y, Xie X, et al. The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA* 2014;20(1369-1375, doi:10.1261/rna.044792.114
293. Coppin L, Leclerc J, Vincent A, et al. Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 2018;19(doi:10.3390/ijms19030650
294. Zhang X, Zou T, Rao J, et al. Stabilization of XIAP mRNA through the RNA binding protein HuR regulated by cellular polyamines. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 2009;37(7623-7637, doi:10.1093/nar/gkp755
295. Mayr C, Bartel D. Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells. *CELL* 2009;138(673-684, doi:10.1016/j.cell.2009.06.016
296. Zhou H, Geng C, Luo G, et al. The p97-UBXD8 complex destabilizes mRNA by promoting release of ubiquitinated HuR from

- mRNP. GENES & DEVELOPMENT 2013;27(1046-1058, doi:10.1101/gad.215681.113
297. Sandler H, Stoecklin G. Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2008;36(491-496, doi:10.1042/BST0360491
298. Barman B, Bhattacharyya S. mRNA Targeting to Endoplasmic Reticulum Precedes Ago Protein Interaction and MicroRNA (miRNA)-mediated Translation Repression in Mammalian Cells. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2015;290(24650-24656, doi:10.1074/jbc.C115.661868
299. von Niessen A, Poleganov M, Rechner C, et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. MOLECULAR THERAPY 2019;27(824-836, doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
300. Mazumder B, Seshadri V, Fox P. Translational control by the 3'-UTR:: the ends specify the means. TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 2003;28(91-98, doi:10.1016/S0968-0004(03)00002-1
301. Rabani M, Pieper L, Chew G, et al. A Massively Parallel Reporter Assay of 3' UTR Sequences Identifies *In Vivo* Rules for mRNA Degradation (vol 68, pg 1083, 2017). MOLECULAR CELL 2018;70(565-565, doi:10.1016/j.molcel.2018.04.013
302. Hinnebusch A, Ivanov I, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. SCIENCE 2016;352(1413-1416, doi:10.1126/science.aad9868
303. Bugaut A, Balasubramanian S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2012;40(4727-4741, doi:10.1093/nar/gks068
304. Jia L, Qian S. Therapeutic mRNA Engineering from Head to Tail. ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH 2021;54(4272-4282, doi:10.1021/acs.accounts.1c00541
305. Pichon X, Wilson L, Stoneley M, et al. RNA Binding Protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation. CURRENT PROTEIN & PEPTIDE SCIENCE 2012;13(294-304
306. KOZAK M. AT LEAST 6 NUCLEOTIDES PRECEDING THE AUG INITIATOR CODON ENHANCE TRANSLATION IN MAMMALIAN-CELLS. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 1987;196(947-950
307. Morris D, Geballe A. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 2000;20(8635-8642
308. Ma Q, Zhang X, Yang J, et al. Optimization of the 5' untranslated region of mRNA vaccines. SCIENTIFIC REPORTS 2024;14(doi:10.1038/s41598-024-70792-x
309. Yang Y, Wang Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. JOURNAL OF MOLECULAR CELL BIOLOGY 2019;11(911-919, doi:10.1093/jmcb/mjz091
310. Lozano G, Martínez-Salas E. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. CURRENT OPINION IN VIROLOGY 2015;12(113-120, doi:10.1016/j.coviro.2015.04.008
311. Spriggs K, Bushell M, Willis A. Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. MOLECULAR CELL 2010;40(228-237, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.028
312. Jaafar Z, Kieft J. Viral RNA structure-based strategies to manipulate translation. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY 2019;17(110-123, doi:10.1038/s41579-018-0117-x
313. Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2005;6(318-327, doi:10.1038/nrm1618
314. Beilharz T, Humphreys D, Preiss T. miRNA Effects on mRNA Closed-Loop Formation During Translation Initiation. 2010.
315. Rauscher R, Ignatova Z. Timing during translation matters: synonymous mutations in human pathologies influence protein folding and function. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS 2018;46(937-944, doi:10.1042/BST20170422
316. Kumar A, Clerici M, Muckenfuss L, et al. Mechanistic insights into mRNA 3'-end processing. CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY 2019;59(143-150, doi:10.1016/j.sbi.2019.08.001
317. Wang Z, Kiledjian M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 2000;20(6334-6341
318. Passmore L, Collier J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY 2022;23(93-106, doi:10.1038/s41580-021-00417-y
319. Bradrick S, Dobrikova E, Kaiser C, et al. Poly(A)-binding protein is differentially required for translation mediated by viral internal ribosome entry sites. RNA 2007;13(1582-1593, doi:10.1261/rna.556107
320. Xiang K, Bartel D. The molecular basis of coupling between poly(A)-tail length and translational efficiency. ELIFE 2021;10(doi:10.7554/eLife.66493
321. Chang H, Lim J, Ha M, et al. TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications. MOLECULAR CELL 2014;53(6):1044-1052, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.007
322. Zarnack K, Balasubramanian S, Gantier MP, et al. Dynamic mRNP Remodeling in Response to Internal and External Stimuli. Biomolecules 2020;10(9), doi:10.3390/biom10091310
323. Eichhorn S, Subtelny A, Kronja I, et al. mRNA poly(A)-tail changes specified by deadenylation broadly reshape translation in Drosophila oocytes and early embryos. ELIFE 2016;5(doi:10.7554/eLife.16955
324. Idler RK, Yan W. Control of Messenger RNA Fate by RNA-Binding Proteins: An Emphasis on Mammalian Spermatogenesis. Journal of Andrology 2012;33(3):309-337, doi:10.2164/jandrol.111.014167
325. Mattijssen S, Kozlov G, Fonseca B, et al. LARP1 and LARP4: up close with PABP for mRNA 3' poly(A) protection and stabilization. RNA BIOLOGY 2021;18(2):259-274, doi:10.1080/15476286.2020.1868753
326. Bilska A, Krawczyk P, Dziembowski A, et al. Measuring the tail: Methods for poly(A) tail profiling. WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA 2023;14(doi:10.1002/wrna.1737
327. WAHLE E. POLY(A) TAIL LENGTH CONTROL IS CAUSED BY TERMINATION OF PROGRESSIVE SYNTHESIS. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1995;270(2800-2808
328. Trepotec Z, Geiger J, Plank C, et al. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. Rna 2019;25(4):507-518, doi:10.1261/rna.069286.118
329. Sahin U, Muik A, Vogler I, et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans.

- Nature 2021;595(7868):572-+, doi:10.1038/s41586-021-03653-6
330. Beverly M, Hagen C, Slack O. Poly A tail length analysis of in vitro transcribed mRNA by LC-MS. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 2018;410(1667-1677, doi:10.1007/s00216-017-0840-6
 331. SINGER B, FRAENKEL H. MESSENGER AND TEMPLATE ACTIVITIES OF CHEMICALLY MODIFIED POLYNUCLEOTIDES. BIOCHEMISTRY 1970;9(19):3694-&
 332. Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors:: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. IMMUNITY 2005;23(2):165-175, doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
 333. Lim J, Kim D, Lee Y, et al. Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. SCIENCE 2018;361(6403):701-+, doi:10.1126/science.aam5794
 334. Trepotec Z, Geiger J, Plank C, et al. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. RNA 2019;25(507-518, doi:10.1261/rna.069286.118
 335. Li CY, Liang ZH, Hu YX, et al. Cytidine-containing tails robustly enhance and prolong protein production of synthetic mRNA in cell and *in vivo*. Molecular Therapy-Nucleic Acids 2022;30(300-310, doi:10.1016/j.omtn.2022.10.003
 336. EBERLE Florian SU. Stabilization of poly(a) sequence encoding dna sequences. 2014.
 337. Rabinovich P, Komarovskaya M, Ye Z, et al. Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. HUMAN GENE THERAPY 2006;17(1027-1035
 338. Strzelecka D, Smietanski M, Sikorski P, et al. Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. RNA 2020;26(1815-1837, doi:10.1261/rna.077099.120
 339. Anhäuser L, Hüwel S, Zobel T, et al. Multiple covalent fluorescence labeling of eukaryotic mRNA at the poly(A) tail enhances translation and can be performed in living cells. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 2019;47(doi:10.1093/nar/gkz084
 340. Chen H, Liu D, Guo J, et al. Branched chemically modified poly(A) tails enhance the translation capacity of mRNA. NATURE BIOTECHNOLOGY 2024, doi:10.1038/s41587-024-02174-7
 341. Perzanowska O, Smietanski M, Jemielity J, et al. Chemically Modified Poly(A) Analogs Targeting PABP: Structure Activity Relationship and Translation Inhibitory Properties. Chemistry-a European Journal 2022;28(42), doi:10.1002/chem.202201115
 342. Kaur A, Kaur P, Ahuja S. Forster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof (vol 12, pg 5532, 2020). ANALYTICAL METHODS 2021;13(730-730, doi:10.1039/d1ay90011k
 343. KAWSKI A. FLUORESCENCE ANISOTROPY - THEORY AND APPLICATIONS OF ROTATIONAL DEPOLARIZATION. CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY 1993;23(459-529
 344. Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 2001;34(383-408
 345. FREIRE E, MAYORGA O, STRAUME M. ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY. ANALYTICAL CHEMISTRY 1990;62(A950-A959
 346. Jerabek-Willemsen M, Andre T, Wanner R, et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. Journal of Molecular Structure 2014;1077(101-113, doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
 347. Jerabek-Willemsen M, Wienken C, Braun D, et al. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. ASSAY AND DRUG DEVELOPMENT TECHNOLOGIES 2011;9(342-353, doi:10.1089/adt.2011.0380
 348. Das R, Pollack G. Charge-Based Forces at the Nafion-Water Interface. LANGMUIR 2013;29(2651-2658, doi:10.1021/la304418p
 349. Köhler W, Morozov K. The Soret Effect in Liquid Mixtures - A Review. JOURNAL OF NON-EQUILIBRIUM THERMODYNAMICS 2016;41(151-197, doi:10.1515/jnet-2016-0024
 350. Seidel S, Dijkman P, Lea W, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. METHODS 2013;59(301-315, doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.005
 351. Romain M, Thiroux B, Tardy M, et al. Measurement of Protein-Protein Interactions through Microscale Thermophoresis (MST). BIO-PROTOCOL 2020;10(doi:10.21769/BioProtoc.3574
 352. Tso S, Brautigam C. Measuring the K_D of Protein-Ligand Interactions Using Microscale Thermophoresis. 2021.
 353. Bartoschik T, Galinec S, Kleusch C, et al. Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis. SCIENTIFIC REPORTS 2018;8(doi:10.1038/s41598-018-23154-3
 354. Bouargalné Y, Raguenes-Nicol C, Guilbaud F, et al. New insights into chlorophyll-WSCP (water-soluble chlorophyll proteins) interactions : The case study of BnD22 (Brassica napus drought-induced 22 kDa). PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 2022;181(71-80, doi:10.1016/j.plaphy.2022.03.023
 355. Dennis B. Dissection of complex interaction mechanisms by binding mode dependent thermophoresis signals – ssDNA binding to EcoSSB. 2014;
 356. Liebner R, Mathaes R, Meyer M, et al. Protein HESylation for half-life extension: Synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS 2014;87(378-385, doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.010
 357. Eiamphungporn W, Schaduengrat N, Malik A, et al. Tackling the Antibiotic Resistance Caused by Class A β -Lactamases through the Use of β -Lactamase Inhibitory Protein. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2018;19(doi:10.3390/ijms19082222
 358. Schulz S, Doller A, Pardini N, et al. Domain-specific phosphomimetic mutation allows dissection of different protein kinase C (PKC) isotype-triggered activities of the RNA binding protein HuR. CELLULAR SIGNALLING 2013;25(2485-2495, doi:10.1016/j.cellsig.2013.08.003
 359. Moon M, Hilimire T, Sanders A, et al. Measuring RNA-Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis. BIOCHEMISTRY 2018;57(4638-4643, doi:10.1021/acs.biochem.7b01141
 360. Chen Y, Lei X, Jiang Z, et al. Cellular nucleic acid- binding protein restricts SARS-CoV-2 by regulating interferon and disrupting RNA-protein condensates. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED

- STATES OF AMERICA 2023;120(doi:10.1073/pnas.2308355120
361. Depaix A, Grudzien-Nogalska E, Fedorczyk B, et al. Preparation of RNAs with non-canonical 5' ends using novel di- and trinucleotide reagents for co-transcriptional capping. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2022;9(doi:10.3389/fmolb.2022.854170
 362. Sikorski PJ, Warminski M, Kubacka D, 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 Research* 2020;48(4):1607-1626, doi:10.1093/nar/gkaa032
 363. Yedavalli V, Jeang KT. Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(33):14787-14792, doi:10.1073/pnas.1009490107
 364. Potuznik J, Cahova H. If the 5' cap fits (wear it) - Non-canonical RNA capping. *RNA BIOLOGY* 2024;21(1):1-13, doi:10.1080/15476286.2024.2372138
 365. Ranawakage D, Takada T, Kamachi Y. HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions. *SCIENTIFIC REPORTS* 2019;9(doi:10.1038/s41598-019-43319-y
 366. Wurth L, Gribbling-Burrer AS, Verheggen C, et al. Hypermethylated-capped selenoprotein mRNAs in mammals. *Nucleic Acids Research* 2014;42(13):8663-8677, doi:10.1093/nar/gku580
 367. Boris-Lawrie K, Singh G, Osmer PS, et al. Anomalous HIV-1 RNA, How Cap-Methylation Segregates Viral Transcripts by Form and Function. *Viruses-Basel* 2022;14(5), doi:10.3390/v14050935
 368. Sherwood AV, Rivera-Rangel LR, Ryberg LA, et al. Hepatitis C virus RNA is 5'-capped with flavin adenine dinucleotide. *Nature* 2023;619(7971):811-+, doi:10.1038/s41586-023-06301-3
 369. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 2020;586(7830):567-+, doi:10.1038/s41586-020-2622-0
 370. Sagi J. G-quadruplexes incorporating modified constituents: a review. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 2014;32(3):477-511, doi:10.1080/07391102.2013.775074
 371. Li C, Liang Z, Hu Y, et al. Cytidine-containing tails robustly enhance and prolong protein production of synthetic mRNA in cell and*in vivo*. *MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS* 2022;30(300-310, doi:10.1016/j.omtn.2022.10.003
 372. Kremsner P, Guerrero R, Arana-Arri E, et al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *LANCET INFECTIOUS DISEASES* 2022;22(3):329-340, doi:10.1016/S1473-3099(21)00677
 373. Bilska A, Kusio-Kobialka M, Krawczyk PS, et al. Immunoglobulin expression and the humoral immune response is regulated by the non-canonical poly(A) polymerase TENT5C. *Nature Communications* 2020;11(1), doi:10.1038/s41467-020-15835-3