Vloga sekundarnih struktur DNK pri zdravljenju genetskega raka

Vpogled v G-kvadruplekse promotorja onkogena EGFR kot potencialne tarče za učinkovitejše zdravljenje raka, ki ga povzročajo genetske mutacije gena EGFR

Avtor: Živa Kocman[2]
Mentorji: Anita Kotar[1], Alenka Mozer[2]
Junij 2023 - Marec 2024
Ljubljana, Slovenija

[1] Kemijski inštitut

[2] Gimnazija Vič

1. Povzetek

G-kvadrupleksi so sekundarne strukture z gvaninom bogatih DNK oligonukleotidov. Take sekvence DNK so pogosto prisotne v promotorskih regijah genov, kar pomeni, da potencialno vplivajo na njihovo izražanje in bi lahko bile uporabljene za zdravljenje različnih bolezni, na primer raka. V tej raziskovalni nalogi smo se osredotočili na vpliv različnih G-kvadrupleksnih struktur na izražanje gena EGFR. Mutacije tega gena so neposredno povezane z nastankom nekaterih vrst raka. Promotorska regija EGFR vključuje osem sekvenc DNK, ki so bogate z gvaninom in zaradi tega lahko tvorijo G-kvadruplekse. Dovolj stabilni G-kvadrupleksi bi lahko vplivali na izražanje gena EGFR. Želeli smo ugotoviti, če bi bila ta G-bogata območja zmožna predstavljati tarčo za znižanje izražanja gena EGFR, kar bi bilo koristno pri zdravljenju raka, ki ga povzročajo mutacije na tem genu. To bi bilo še posebej pomembno pri rakavih celicah, ki so že razvile odpornost na trenutno dostopna zdravljenja. Sintetizirali smo oligonukleotide teh osmih sekvenc, jih testirali z in vitro testom ustavitve DNK polimeraze ter opazovali sestavljanje G-kvadrupleksov z NMR in CD spektroskopijo. Eksperimente smo izvedli pri 25°C in 37°C z različnimi časovnimi intervali. Opazili smo, da so nekateri oligonukleotidi tvorili G-kvadruplekse, ki so bili dovolj stabilni, da so ustavili proces podvajanja DNK vijačnice. Te G-kvadruplekse lahko destabilizira višja temperatura, kar omogoči DNK polimerazi sintetiziranje daljših produktov. Raziskava nam je omogočila globlje razumevanje konformacijske ureditve promotorske regije gena EGFR in bo primerno izhodišče za zasnovo personaliziranih ligandov, ki bodo modulirali njegovo izražanje.

Ključne besedne zveze: DNK, G-kvadrupleksi, EGFR, genetske mutacije, NMR spektroskopija, DNK polimeraza, rakava obolenja

Kazalo

1. Povzetek..... 2
2. Uvod..... 5
3. DNK..... 7
Struktura DNK..... 7
Kanonično združevanje baz..... 8
Ne kanonično bazno parjenje..... 9
Replikacija DNK..... 9
4. G-kvadrupleksne strukture..... 10
Kationi in G-kvadrupleksi..... 10
Različne strukture G-kvadrupleksov..... 11
G-kvadrupleks strukture pri transkripciji..... 11
G-kvadrupleks strukture pri replikaciji..... 11
G-kvadrupleksi kot nove tarče proti raku..... 11
5. Receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR)..... 12
7. Cilji raziskave in hipoteze..... 13
6. Metode..... 14
Sinteza DNK oligonukleotidov..... 14
Merjenje koncentracije DNK..... 15
NMR spektroskopija..... 15
Kapilarna elektroforeza..... 16
CD spektroskopija..... 16
8. Postopek eksperimenta..... 18
1. Sinteza DNK oligonukleotidov in priprava vzorcev..... 18
2. NMR spektroskopija..... 19
3. CD spektroskopija..... 19
4. In vitro test ustavitve DNK polimeraze..... 19
9. Rezultati..... 21
10. Zaključek..... 34
11. Viri..... 35

Kazalo slik

Slika 1: Dušikove baze v DNK so gvanin, adenin, citozin in timin. R predstavlja sladkor deoksiribozo in fosfatno skupino, prikazani na sliki 2 7
Slika 2: Sladkor deoksiriboza in fosfatna skupina 7
DNK veriga je oštevilčena v smer 5’ → 3’ 7
Slika 3: B-DNK struktura.20 8
Slika 4: Kanonični bazni pari G•C (levo) in A•T (desno) 8
Slika 5: WC in Hoogsteen rob purina (na sliki gvanin) 9
Slika 6: Shema G-kvarteta. Vijolični krog na sredini G-kvarteta predstavlja kation 10
Slika 7: Zlaganje G-kvartetov, stabiliziranih s kationi (vijolični krogi) 10
Slika 8: DNK/RNA oligonukleotidni sintetizator na nacionalnem inštitutu Kemije, Slovenija 14
Slika 9: Shematski prikaz štirih stopenj sinteze oligonukleotidov z uporabo standardne fosforamiditne kemije na trdnem nosilcu.21 14
Slika 10: Spektrofotometer Thermo Scientific NanoDrop v laboratoriju na Kemijskem inštitutu, Slovenija 15
Slika 11: 600 MHz Brukerjev NMR spektrometer v Slovenskem centru za NMR, Kemijski inštitut, Slovenija 16
Slika 12: G-kvadrupleksne strukture z paralelno, antiparalelno in hibridno topologijo (zgoraj) ter njihovi CD spektri (spodaj) 17
Slika 13: Shematski prikaz zasnove predloge, zaporedja primerja in kemijske strukture fluorescenčnega barvila 6-FAM (6-karboksifluorescein), ki ima absorpcijsko valovno dolžino 495 nm in emisijsko valovno dolžino 517 nm 20
Slika 14: Shematski prikaz osmih domnevnih zaporedij, ki tvorijo G-kvadrupleks in se nahajajo pred začetnim mestom transkripcije (TSS) v promotorski regiji EGFR (zgoraj), z njihovimi oligonukleotidnimi zaporedji (spodaj) 21
Slika 15: Imino področje 1H NMR spektrov štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR. Spektri NMR so bili posneti pri koncentraciji ~0,3 mM oligonukleotidov na nit, 100 mM KCl, pH 7,4, 25 °C na 600 MHz NMR-spektrometru 22
Slika 16: Shema sekundarnih struktur, ki jih tvorijo EGFR-37, EGFR-114, EGFR-143, in EGFR-207 oligonukleotidi 22
Slika 17: CD spektri štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR, posneti v odsotnosti (črne črte) ali v prisotnosti (rdeče črte) 100 mM KCl v 10 mM TRIS, pufr pH 7,4 pri 25 °C 23
Slika 18: Iminska regija 1H NMR spektrov štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR v daljših DNK sekvencah. NMR spektri so bili posneti pri koncentraciji oligonukleotidov približno 0,2 mM na verigo, v 100 mM KCl, pH 7,4, pri temperaturi 25 °C, na 600 MHz spektrometru 24
Slika 19: Elektroferogram EGFR-37 pri kontroli pri 25 °C 25
Slika 20: Elektroferogram EGFR-37 pri kontroli pri 37 °C 25
Slika 21: Elektroferogram EGFR-37 pri 25 °C po 20 min reakcije 26
Slika 22: Elektroferogram EGFR-37 pri 37 °C po 20 min reakcije 26
Slika 23: Shema G-kvadrupleksa, ki ustavlja DNK polimerazo v vzorcu EGFR-37 26
Slika 24: Elektroferogram kontrole EGFR-207 pri 25 °C 27
Slika 25: Elektroferogram kontrole EGFR-207 pri 37 °C 27
Slika 27: Elektroferogram EGFR-207 pri 37 ° po 20 minutah reakcije 28
Slika 28: Shema G-kvadrupleksa, ki zaustavlja DNK polimerazo pri EGFR-207 28
Slika 29: Elektroferogram kontrole EGFR-143 pri 25 °C 29
Slika 30: Elektroferogram kontrole EGFR-143 pri 37 °C 29
Slika 31: Elektroferogram EGFR-143 pri 25 °C po 20 min reakcije 30
Slika 32: Elektroferogram EGFR-143 pri 37 °C po 20 min reakcije 30
Slika 33: Shema lasne strukture, ki zaustavlja DNK polimerazo v EGFR-143 30
Slika 34: Elektroferogram kontrole EGFR-114 pri 25 °C 31
Slika 35: Elektroferogram kontrole EGFR-114 pri 37 °C 31
Slika 36: Elektroferogram EGFR-114 pri 25 °C po 20 min reakcije 32
Slika 37: Elektroferogram EGFR-114 pri 37 °C po 20 min reakcije 32
Slika 38: Shema G-kvadrupleksa/hairpina pri ustavljanju DNK polimeraze v EGFR-114 32

2. Uvod

Rak je široko razširjena skupina bolezni, ki lahko vpliva na katerikoli del telesa in letno povzroči milijone smrti.[1] Povzroča hitro in nenadzorovano rast abnormalnih celic, te pa presegajo svoje običajne meje in se lahko širijo na druge organe. Bolezen se manifestira ob transformaciji zdravih celic v tumorne, kot posledica zunanjih ali notranjih vplivov, npr.: sevanje, virusi, kemikalije, hormoni, avtoimune bolezni in genetske mutacije.[2] Prav tako so raziskave pokazale, da rak inducirajo nekatere vsakdanje navade kot so kajenje, pretirano sončenje, prekomerna telesna masa in uživanje alkohola.[3]

Rak so različni zdravniki opisovali skozi vso zgodovino, še preden so ga znali poimenovati. Eden izmed najstarejših zapisov je bil najden v starodavni Egipčanski knjigi "*Papirus Edwina Smitha"*, okoli leta 3000 pr.Kr in opisuje osem primerov tumorov, za katere niso poznali zdravila.[2] Ključne napredke v znanju o raku in razvoju terapij lahko pripišemo Watsonovem in Crickovem odkritju dvojne vijačne strukture DNK (l. 1953).[2] Boljše razumevanje osnovne mehanike življenja je razkrilo, da mnogo bolezni nastane zaradi sprememb DNK kode, kar se največkrat manifestira pri abnormalnih proteinih.[2]

Kljub izjemnemu napredku ostaja zdravljenje raka težavno, v mnogih primerih celo nemogoče.[4] Ker rak izvira iz bolnikovih lastnih celic, je tako raznolik kot ljudje in terapije morajo biti zelo specifične, da so uspešne. Število bolnikov raka trenutno neprestano narašča in povzroča izzive pri zagotavljanju optimalne nege. Zato je onkologija (študij raka) aktualno področje, še posebej ko išče drugačne, boljše pristope k zdravljenju raka.[4]

Poleti 2021 sem imela priložnost opravljati študentsko delo v NMR oddelku na Kemijskem inštitutu. Glavni fokus raziskovalne skupine je študij strukture in dinamike biološko pomembnih makromolekul in njihovih interakcij, najpogosteje z uporabo nukleo magnetne resonance (NMR) spektroskopije. V tem času sem v njihovem laboratoriju spoznala laboratorijsko opremo in nekatere dele procesa eksperimentov. Ponudili so mi možnost opravljanja raziskovalne naloge in leta 2023 sem se odločila to priložnost sprejeti. Pod mentorstvom Dr. Anite Kotar sem začela raziskovalno nalogo, ki se osredotoča na potencialni antitumorski efekt G-kvadrupleksov v promotorski regiji onkogena EGFR (epidermalni rastni faktor receptor).

Hormonski mehanizmi, ki nadzorujejo hitrost celične delitve, diferenciacije in število dovzetnih celic pogosto vplivajo na tveganja nastanka raka. Eden izmed teh mehanizmov je EGF (epidermalni rastni faktor), polipeptidni hormon, ki povzroča širjenje in keratinizacijo vrhnje plasti naše kože.[5] Mutacije na EGF receptorju promovirjajo širitev, rast in aktivacijo rakavih celic.[5] Raziskave družine EGFR genov in povezanih signalnih poti so povzročile napredek v našem razumevanju raka, izvirajočega iz epitelnega tkiva telesa in vodile v razvoj odobrenih terapij ciljanih na EGFR.[5] Nekateri aspekti pa še vedno ostajajo nejasni ter povzročajo nastanek odpora na terapije. Trenutne terapije uporabljajo monoklonska protitelesa in tirozin kinazne inhibitorje, ki selektivno targetirajo celice, ki rastejo pretirano in nenadzorovano.[5] Reverzibilni tirozin kinazni inhibitorji se soočajo s problemi nezadostne specifičnosti in razvojom odpornosti, čeprav kažejo trajno učinkovitost.[5]

Pred kratkim so raziskovalci v proksimalni promotorski regiji EGFR onkogena identificirali G-kvadrupleks z unikatno "snap-back" zanko. Ta zanka predstavlja potencialno tarčo za razvoj terapije proti raku.[5] Razrešena G-kvadrupleksna struktura EGFR je zelo stabilna in za razliko od drugih "snap-back" zank v G-kvadrupleksih se v njej naravno pojavljajo bočni ostanki.[5] Zavira DNK polimerazo in zagotavlja obetavno molekularno tarčo za razvoj alternativnih zaviralcev signalizacije EGFR pri terapiji raka.[5]

Cilji raziskave

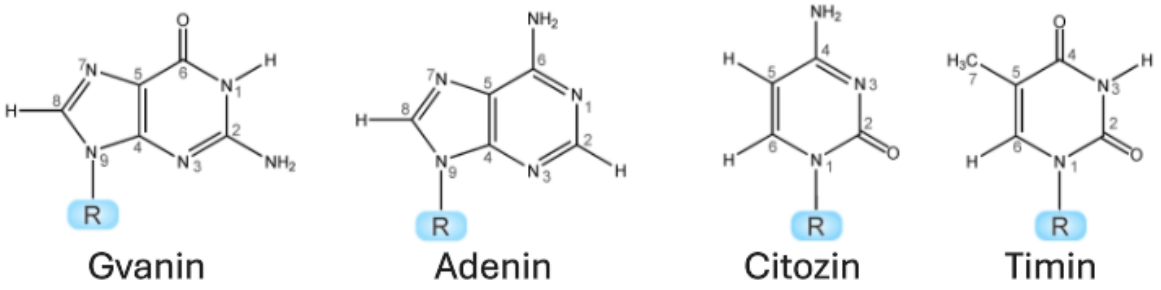
V našem raziskovalnem projektu smo želeli razširiti idejo o G-kvadrupleksih kot možnih tarčah pri zdravljenju raka. Mnogo promotorskih regij v genih je bogatih z gvaninom, kar kaže na potencialno vlogo G-kvadrupleksov pri regulaciji genov.[5] Osredotočili smo se na protoonkogene EGFR, ki kodirajo tirozin kinazni receptor, kjučen v terapiji proti raku.[5] Promotorska regija gena EGFR vsebuje osem regij bogatih z gvaninom, ki predstavljajo še neraziskovane možnosti za utišanje genov. Z uporabo NMR in CD spektroskopije smo ocenili zmožnost oligonukleotidov, ki vsebujejo štiri sekvence iz G-bogatih regij EGFR promotorja, da tvorijo G-kvadruplekse. Želeli smo ovrednotiti ali oligonukleotidi tvorijo dovolj stabilne G-kvadruplekse, da vplivajo na podvojevanje DNK molekule. To smo storili s postopkom ustavitve DNK polimeraze. Regije, ki tvorijo dovolj stabilne G-kvadruplekse bi lahko potencialno bile tarča pri regulaciji izražanja EGFR receptorja in nudile alternativni pristop k zdravljenju pacientov raka z že razvito odpornostjo na konvencionalne terapije. Bolj personalizirani, individualen in trajen pristop bi lahko pomenil tudi redukcijo cene in porabe materialov.

3. DNK

Struktura DNK

Genetsko informacijo organizma nosi molekula deoksiribonukleinske kisline (DNK).[6] Vsebuje navodila potrebna za razvoj, preživetje in razmnoževanje organizma.[6] Specifične regije genoma so kopirane v molekulo ribonukleinske kisline (RNK), ki je v citoplazmi prevedena v proteine.

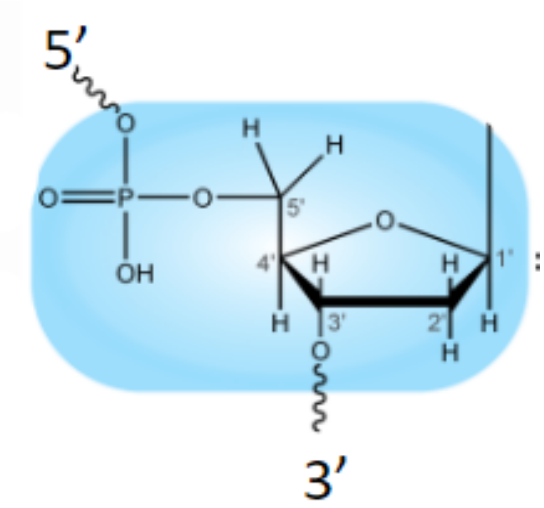
DNK molekulo lahko vidimo tudi kot polimer nukleotidov. Nukleotidi so monomeri sestavljeni iz petogljičnega sladkorja deoksiriboze, fosfatne skupine in dušikove baze.[6] Obstajajo štiri dušikove baze: Adenin (A), citozin (C), gvanin (G) in timin (T).[7] (slika 1 in 2)[7]



Slika 1: Dušikove baze v DNK so gvanin, adenin, citozin in timin. R predstavlja sladkor deoksiribozo in fosfatno skupino, prikazani na sliki 2.

Fosfatna skupina je sestavljena iz fosforjevih in kisikovih atomov.[7] Nukleotidi so povezani s kovalentno vezjo imenovano fosfodiestrska vez, ki poveže sladkor enega nukleotida s fosfatno skupino drugega in tvori "hrbtenico" izmenjajočih se sladkorjev in fosfatnih skupin.[7]

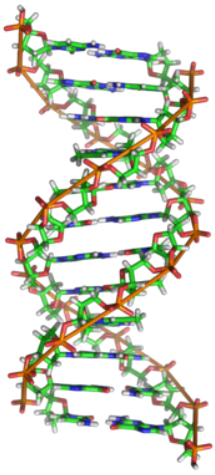
Molekula DNK ima dva različna konca (slika 2), 3' in 5' konec, ki se nanašata na ogljikove atome v sladkornem obroču nukleotidov. 3' konec se zaključi s hidroksilno skupino, vezano na tretji ogljik, 5' konec pa s fosfatno skupino, vezano na peti ogljik molekule sladkorja. Usmerjenost teh koncev je ključna pri procesih replikacije in transkripcije DNK.[7] Encimi kot na primer DNK polimeraza, ki so vključeni v te procese preberejo DNK molekulo v določeni smeri in vedno sintetizirajo nove verige v smeri 5' proti 3'.[7] Razlika teh dveh glavnih koncev je zelo pomembna za razumevanje in manipulacijo genetske informacije.[7]



Slika 2: Sladkor deoksiriboza in fosfatna skupina. DNK veriga je oštevilčena v smer 5' → 3'

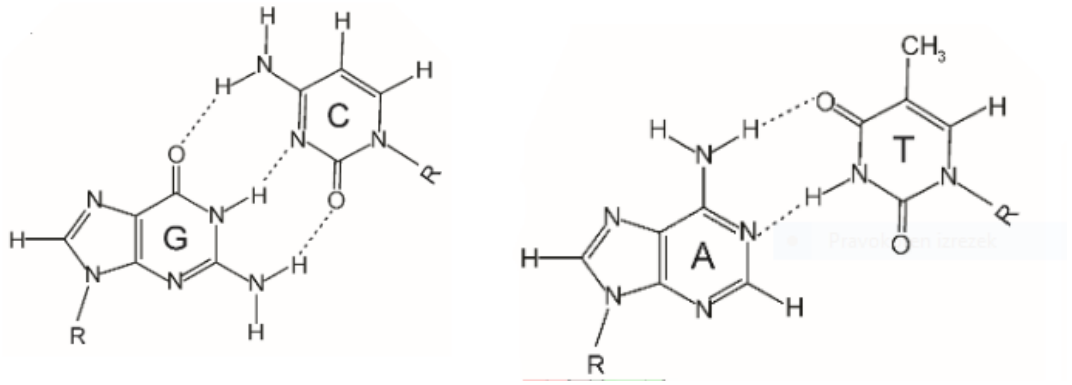
Kanonično združevanje baz

Obstaja veliko različnih strukturnih geometrij, ki jih lahko prevzame DNK, identificiranih kot A, B, C itd. Njihovo strukturo lahko sprožijo na primer specifične koncentracije soli, sestava zaporedja nukleotidov in ravni hidracije.[8] Vse črke razen F, Q, U, V in Y so že bile uporabljene za poimenovanje različnih struktur DNK molekule.[8] Toda najbolj pogosta struktura, ki jo v genomu prevzame DNK pod fiziološkimi pogoji je desnosučna oblika B-DNK (slika 3). Prvič sta jo opisala James Watson in Francis Crick leta 1953.[8] B-DNK je dvojno vijačna struktura, kjer se dve vijačnici vijeta okoli skupne osi in sta povezani z vodikovimi vezmi. Vsak obrat vijačnice v strukturi vsebuje 10 baznih parov.[8]



Slika 3: B-DNK struktura.[20]

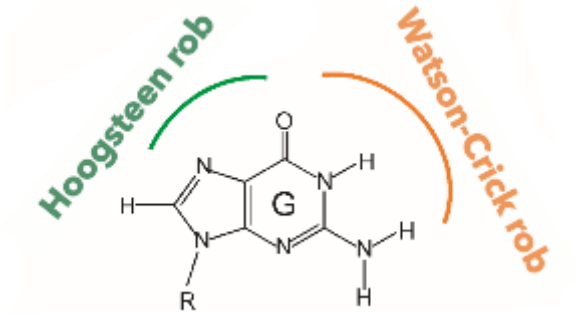
Specifični vzorec vodikovih vezi povezuje purinske in pirimidinske baze oziroma pare adenina s timinom (A•T) in pare gvanina s citozinom (G•C) (slika 4) ter je običajno označen kot Watson-Crickov (WC) ali kanonični način povezovanja nukleotidov.[8]



Slika 4: Kanonični bazni pari G•C (levo) in A•T (desno).

Ne kanonično bazno parjenje

DNK je strukturno zelo kompleksna in lahko tvori mnoge med sabo drugačne ureditve poleg kanoničnih Watson-Crick baznih parov.[8,9] Purine (gvanin in adenin) tvorita Watson-Crick rob in Hoogsteen rob. (Slika 5).[9]



Slika 5: WC in Hoogsteen rob purina (na sliki gvanin).

Orientacija baz v WC baznih parih je antiparalelna, kar pomeni da teče ena veriga v smer 5’ proti 3’ , druga pa v smer 3’ proti 5’. Vodikove vezi, ki se tvorijo med bazami so specifične in vedno povezujejo A in T z dvema vodikovima vezema in G in C z tremi vodikovimi vezmi. Baze so planarne. Medtem pa Hoogsteenovo bazno parjenje ni antiparalelno. V standardnem Hoogsteenovem baznem paru pirimidin uporablja svoj Watson-Crickov rob za vezavo na strani N1, C6 in N7 purinske baze. Premik pirimidina za 180° povzroči nastanek inverznega Hoogsteenovega baznega para.[9] Sposobnost molekule DNK, da tvori nekanonične pare, kot so homopurinski in homopirimidinski bazni pari, ima pomembno vlogo pri tvorbi trojčkov in četvork, ki so osnovne strukturne enote tripleksnih in kvadrupleksnih struktur, kot so G-kvadrupleksi.

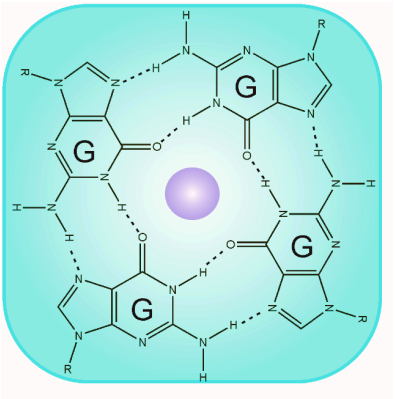
Replikacija DNK

In vivo je podvajanje DNK proces, pri katerem se genom molekule kopira v celici med delitvijo, kar zagotavlja dedovanje genetskih informacij.[10] Natančnost tega procesa je ključna, saj napake povzročajo mutacije. V začetni fazi se verigi dvojne vijačnice DNK ločita, pri čemer vsaka veriga služi kot matrica za sintezo nove, komplementarne verige. V proces je vključenih več beljakovin, med njimi tudi DNK-polimeraza, ki sintetizira nove verige DNK z vključevanjem nukleotidov, komplementarnih matrični verigi, v smeri od 5' proti 3'.[10] *In vitro* lahko podvajanje DNK izvedemo s pomočjo v laboratoriju pripravljenih začetnih oligonukleotidov (primerjev), ki sprožijo proces na matrični molekuli DNK.[11]

4. G-kvadrupleksne strukture

G-kvadrupleksi so štiri verižne strukture, ki nastanejo iz oligonukleotidov nukleinske kisline, bogatih z gvaninom, pod posebnimi pogoji visoke ionske moči kationov Na in K.[8] Najprej je veljalo, da nastajajo samo *in vitro* (zunaj živega organizma), leta 1987 pa je bilo predlagano, da bi štiriverižne strukture z G-tetradami lahko prevzele z G-bogate sekvence, ki jih najdemo v telomerih (regijah ponavljajočih se zaporedij DNK na koncu kromosoma) in v drugih funkcionalnih regijah.[8]

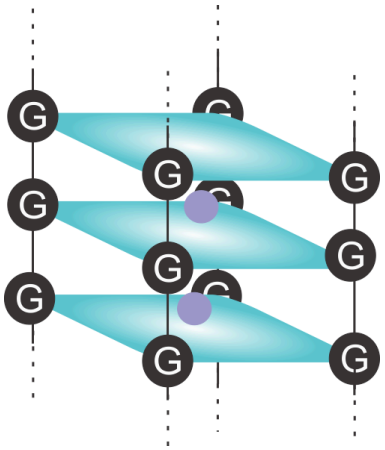
Glavni gradnik vseh G-kvadrupleksov je G-kvartet (slika 6), ki je struktura, sestavljena iz štirih gvaninskih baz, povezanih s Hoogsteenovo vodikovo vezjo.[8] Z zlaganjem drug na drugega tvorijo G-kvadruplekse (slika 7). Najpogostejši so G-kvadrupleksi s tremi G-kvarteti.[8]



Slika 6: Shema G-kvarteta. Vijolični krog na sredini G-kvarteta predstavlja kation.

Kationi in G-kvadrupleksi

Da se G-kvadrupleksi lahko oblikujejo, potrebujejo katione.[8] Skladi G-kvartetov ustvarijo votlino, ki je obdana z negativnim nabojem zaradi gvanin karbonilnih atomov kisika O6, ki določajo ravninske kvadrate v vsakem G-kvartetu.[8] Dehidrirani kationi medsebojno komunicirajo z gvanin karbonilnimi atomi kisika O6 in stabilizirajo strukturo (slika 6). Elektrostatični odboj med kationi je zaščiten z delnimi negativnimi naboji na kisiku 06. Najučinkovitejši pri stabilizaciji G-kvadrupleksov so kationi K+, Na+, NH4+, Sr2+ in Pb2+.8 Še posebej stabilne so strukture s K+ kationi.[8]



Slika 7: Zlaganje G-kvartetov, stabiliziranih s kationi (vijolični krogi).

Različne strukture G-kvadrupleksov

Strukture G-kvadrupleksa so lahko intermolekularne, kar pomeni, da nastanejo med štirimi molekulami (tetra molekularne) ali dvema verigama (bimolekularne).[8] Lahko se tvorijo tudi intramolekularno (unimolekularne).[8] Poleg tega jih je mogoče razlikovati po relativni 5' do 3' usmerjenosti hrbtenice DNK, ki povezujejo G-odseke, vključene v tvorbo G-kvartetov. G-kvadrupleksi so lahko vsi vzporedni (s štirimi verigami z isto orientacijo) ali antiparalelni (z dvema verigama v eni orientaciji in dvema v drugi). Zanke so strukturni elementi, ki povezujejo dva G-kvarteta G-kvadrupleksnega jedra. [8]

G-kvadrupleks strukture pri transkripciji

Promotorske regije človeških onkogenov in regulacijskih elementov verjetno vsebujejo zaporedja, ki tvorijo G-kvadruplekse.[8] Te strukture lahko povzročijo zastoj v procesu replikacije DNK, ko so oblikovane iz osnovne verige.[8] Načeloma lahko, če so oblikovane na kodirajoči verigi, potencialno povečajo transkripcijo tako, da prispevajo k ohranjanju prepisane verige v enoverižni konformaciji.[8]

G-kvadrupleks strukture pri replikaciji

Motivi, ki tvorijo G-kvadruplekse, so povezani z večino izvorov replikacije. Replikativne helikaze ločujejo verige DNK med replikacijo DNK.[8] Vodilna veriga se sintetizira neprekinjeno, medtem ko se zaostala veriga sintetizira diskontinuirano in jo za kratek čas pusti enoverižno. Zlasti zaostala veriga lahko tvori strukture G-kvadrupleksa in zato ustavi replikacijski proces. Da DNK polimeraza uporabi verigo DNK kot osnovo, je treba najprej razrešiti G-kvadrupleks.[8]

G-kvadrupleksi kot nove tarče proti raku

Teorija pravi, da je za večino rakavih obolenj značilnih šest temeljnih sprememb v celični fiziologiji, ki imajo enake funkcionalne zmožnosti v svojem razvoju.[8] Neobčutljivost za signale, ki zavirajo rast, izogibanje apoptozi, samozadostnost pri signalih rasti, invazija v tkivo in metastaze, trajna angiogeneza in neomejen replikativni potencial. Strukture G-kvadrupleksa so odkrili v genih in kromosomskih regijah, ki so prisotne v vseh šestih funkcionalnih sposobnostih.[8]
Zaradi svoje strukturne raznolikosti in edinstvenih značilnosti molekularnega prepoznavanja so veziva G-kvadrupleksa primerna zdravila s potencialno visoko specifičnostjo za rakave celice.[8] Z vidika razvoja zdravil so G-kvadrupleksi bolj podobni proteinskemu molekularnemu receptorju kot običajnim tarčam, v obliki B-DNK.[8] B-DNK je bila prva tarča za vrsto zdravil, ki so bila uporabljena v terapiji proti raku.[8] Kljub nekaterim uspehom pri zdravljenju pa je klinični potencial dejavnikov, ki poškodujejo DNK, zmanjšan zaradi njihove splošne nespecifičnosti in poškodbe celic.[8]
Zaradi številnih oblik, ki jih lahko sprejmejo, G-kvadrupleksi zagotavljajo nov razred molekularnih tarč za spojine, ki medsebojno delujejo z DNK, in ponujajo nove priložnosti za izdelavo zdravil.[8] Zaenkrat je to znanje večinoma teoretično, saj je bil samo en G-kvadrupleksni ligand testiran na ljudeh.[8] Kljub temu so G-kvadrupleksni ligandi obetaven predmet raziskav pri zdravljenju raka.[8]

5. Receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR)

Receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR) je receptor, ki se nahaja na površini celice in ima ključno vlogo pri različnih vrstah raka pri ljudeh.[12] Spada v družino ErbB receptorskih protein kinaz in se fiziološko aktivira s sedmimi različnimi ligandi (molekulami, ki se lahko vežejo na receptorje).[12] EGFR uravnava normalno rast in proliferacijo celic (hitro podvajanje celic).[12] Prekomerna ekspresija EGFR in mutacije, ki vodijo v njegovo konstitutivno aktivacijo, so znani dejavniki onkogeneze. Rak dojke, nedrobnocelični pljučni rak in glioblastom so posledica teh nepravilnosti.[12] Trenutni terapevtski pristopi vključujejo zaviralce tirozin kinaz in monoklonska protitelesa, ki delujejo proti povečani ekspresiji EGFR.[12] Vendar pa njihovo učinkovitost omejujejo notranji ali pridobljeni mehanizmi rezistence. Težava nastane, ko mutacije postanejo specifične in prispevajo k odpornosti na terapevtske pristope.[12] Dokazano je, da se G-kvadrupleksne strukture lahko tvorijo v človeških celicah, predvsem v telomernih in promotorskih regijah onkogenov. Ker lahko te strukture v promotorskih regijah potencialno uravnavajo transkripcijo genov, njihova stabilizacija z majhnimi molekularnimi ligandi pogosto vodi v zaviranje genske ekspresije.[8,] [12] Spodbujanje tvorbe G-kvadrupleksov v promotorski regiji gena EGFR, kar bi povzročilo utišanje transkripcije EGFR, bi lahko predstavljalo novo, močno terapevtsko strategijo, ki bi presegla težave z odpornostjo in specifičnostjo.[12]

7. Cilji raziskave in hipoteze

Prvi cilj raziskave je bil oceniti teorijo, da lahko G-kvadrupleksne strukture nadzorujejo izražanje genov z formacijo stabilnih struktur, ki komunicirajo z prepisovalnimi in podvojevalnimi encimi.

Posebej smo se osredotočili na promotorsko regijo gena EGFR, ki je pri nekaterih vrstah raka pogosto mutiran ali prekomerno izražen. Promocijska regija tega gena vključuje osem zaporedij, bogatih z gvanini, ki lahko tvorijo strukture G-kvadrupleksa. Naš cilj je bil preizkusiti ta zaporedja, i) ali lahko tvorijo G-kvadruplekse in ii) ali tvorba G-kvadrupleksa ustavi proces podvajanja DNK z DNK polimerazo. Z uporabo NMR in CD spektroskopije smo ovrednotili sekundarne strukture štirih z gvaninom bogatih zaporedij iz promotorja EGFR in z *in vitro* testom zaustavitve DNK polimeraze raziskali njihov vpliv na procese podvajanja DNK. Naš drugi cilj je bil videti, kako temperatura vpliva na stabilnost G-kvadrupleksov iz regije promotorja EGFR. To smo dosegli tako, da smo v enakih časovnih intervalih izvedli test zaustavitve DNK polimeraze pri dveh različnih temperaturah (25 °C in nato pri 37 °C).

Hipoteze:

1. G-kvadrupleksi bodo ustavili proces podvajanja DNK in ustavili DNK polimerazo, da ne bo sintetizirala komplementarnih oligonukleotidov.

2. Pri višji temperaturi so G-kvadrupleksi manj stabilni in DNK polimeraza bo lahko sintetizirala daljše produkte.

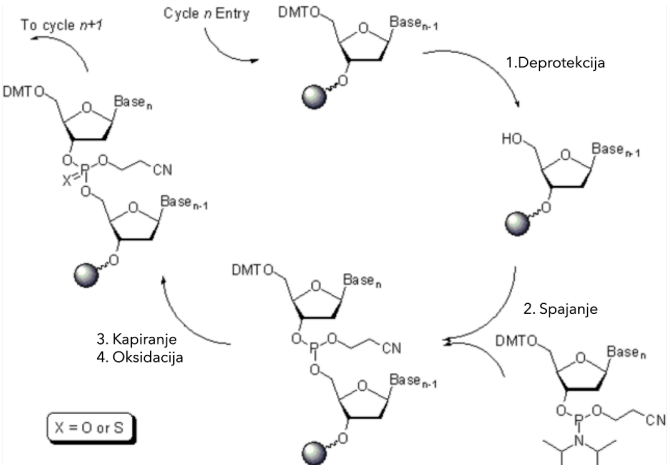
6. Metode

Sinteza DNK oligonukleotidov



Slika 8: DNK/RNA oligonukleotidni sintetizator na nacionalnem inštitutu Kemije, Slovenija.

Vsi oligonukleotidi, ki so bili uporabljeni pri preizkusu zaustavitve DNK-polimeraze ter pri NMR in CD eksperimentih, so bili pripravljeni s kemijsko sintezo, ki temelji na fosforamiditni kemiji na trdnem nosilcu. Fosforamiditi so modificirani nukleotidi, posebej zasnovani za uporabo v sodobni sintezi DNK. Proces sinteze DNK je avtomatiziran in se izvaja s pomočjo naprav, ki nukleotide zaporedno dodajajo začetnemu nukleotidu, pritrjenemu na trdni nosilec (Slika 8). Trdni nosilec je običajno steklo s kontroliranimi porami (CPG) ali polistirenske (PS) kroglice. Ker so fosforamiditi, uporabljeni pri sintezi DNK, zelo reaktivne molekule, mora sinteza potekati v brezvodnem okolju s popolno zaščito reaktivnih skupin, da se prepreči nastanek neželenih stranskih produktov. Opozoriti želimo na zaščitno skupino DMT (dimetiltriptamin), ki se nahaja na 5' položaju fosforamidita in se odstrani tik pred dodajanjem novega ostanka. Sintetizator je zasnovan tako, da meri sproščanje DMT skupine in s tem spremlja učinkovitost vsakega koraka sinteze DNK. Prvi ostanek je pritrjen na trdni nosilec, naslednje baze pa se dodajajo eno za drugo, pri čemer sinteza poteka v smeri 3' – 5' v štirih korakih: deprotekcija, spajanje, kapiranje in oksidacija (Slika 9).[13]

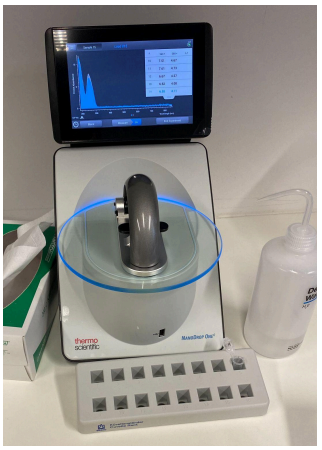


Slika 9: Shematski prikaz štirih stopenj sinteze oligonukleotidov z uporabo standardne fosforamiditne kemije na trdnem nosilcu.[21]

Po končani sintezi se oligonukleotid odcepi od trdnega nosilca in zaščitne skupine, ki ostanejo, se odstranijo z močno bazo; na primer amonijevim hidroksidom.[13]

Merjenje koncentracije DNK

Thermo Scientific NanoDrop spektrofotometer je naprava, ki se uporablja za kvantifikacijo DNK, RNK in proteinov iz majhnih količin tekočega vzorca (1–2 µL) (Slika 10). Uporablja se za merjenje koncentracije vzorca DNK/RNK na podlagi Beer-Lambertovega zakona z uporabo valovne dolžine svetlobe 260 nm.[14]



Slika 10: Spektrofotometer Thermo Scientific NanoDrop v laboratoriju na Kemijskem inštitutu, Slovenija.

NMR spektroskopija

NMR (jedrska magnetna resonanca) spektroskopija je postopek, ki se uporablja za preučevanje strukture, dinamike in kemijskih procesov različnih (bio)kemijskih sistemov. Ena izmed njenih najpomembnejših lastnosti je, da lahko zazna podrobna kemijska okolja in gibanje molekul v DNK, proteinih ter drugih (bio)polimerih. Razvite so različne NMR tehnike, ki omogočajo pridobivanje informacij o strukturi molekul, kot so razdalje med atomi, koti vezi ter orientacije delov ali celotnih biomolekul. Te informacije so ključne za izdelavo natančnih modelov strukture (bio)molekul.[15]

Molekule, ki vsebujejo magnetna jedra, postavimo v močno magnetno polje, kjer lahko absorbirajo in oddajajo radiofrekvenčno energijo (Slika 11). Različni atomi v molekulah resonirajo pri različnih frekvencah, kar omogoča natančno analizo njihove strukture. Jedra imajo lastnost, imenovano spin, ki ustvari magnetni moment.[15] Različni izotopi kemijskih elementov imajo različne spine, kar vpliva na njihove NMR lastnosti.[15] Ko se jedra elementov postavijo v zunanje magnetno polje, se njihovi magnetni momenti poravnajo, kar povzroči preklapljanje med različnimi energijskimi nivoji. Razlika v energiji teh nivojev je odvisna od jakosti magnetnega polja, tehnika pa meri resonančno frekvenco, ki povzroči te preklape. S tem pridobimo pomembne informacije o strukturi molekul.

NMR izhaja iz teorije jedrskega zaslona, ki omogoča razumevanje molekularnih struktur.[15] Elektroni okoli jeder ustvarjajo magnetna polja, ki vplivajo na energijske nivoje jeder – ta pojav imenujemo zaslonitev. Razlike v kemijskih vezeh, aromatičnosti in prisotnosti različnih elektron-donor/akceptor skupin (kemijsko okolje) se izražajo v spremembah teh nivojev. Te rahle razlike lahko zaznamo z NMR, saj za vsak spin-flip

potrebujemo drugačno frekvenco. Te razlike se nato pojavijo kot ločeni vrhovi v NMR spektru, ki nam pomagajo ugotoviti kemijsko okolje okoli NMR-aktivnega jedra.[15]



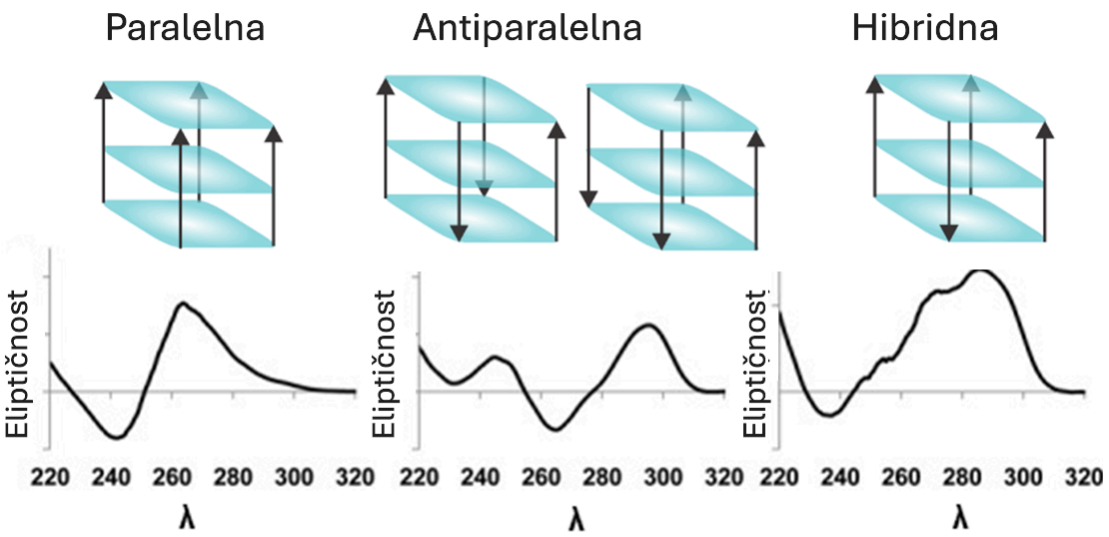
Slika 11: 600 MHz Brukerjev NMR spektrometer v Slovenskem centru za NMR, Kemijski inštitut, Slovenija.

Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je analitična tehnika, ki uporablja električno napetost za ločevanje nabitih molekul na podlagi njihove elektroforetske mobilnosti.[16] Elektroforetska mobilnost je odvisna od dejavnikov, kot so naboj molekule, viskoznost in oblika molekule. Hitrost gibanja delcev je neposredno sorazmerna z uporabljeno električno poljsko jakostjo, pri čemer večji naboj ali manjša velikost molekul povzroči hitrejše gibanje. Ta tehnika se uporablja predvsem zaradi hitrih rezultatov in ločevanja z visoko ločljivostjo.[16] Splošni sistem kapilarne elektroforeze je sestavljen iz visokonapetostnega napajanja, sistema za vnos vzorcev, kapilarne cevke, detektorja in izhodne naprave.[12] Elektrode, ki so priključene na napajanje, inducirajo električno polje in usmerjajo premike vzorca skozi kapilarno cevko.[12] Kapilara je namočena v vialo z elektrodami in elektrolitsko raztopino. Preden vzorec vbrizgamo v kapilaro, jo splaknemo z ustrezno pufersko raztopino. Fotopomnoževalna cev omogoča konstrukcijo spektrov, ki zagotavljajo informacije o razmerju med maso in nabojem ionske kategorije.[16]

CD spektroskopija

Spektroskopija s krožnim dikroizmom (CD) je optična spektroskopska metoda, ki izkorišča diferencialno absorpcijo levo- in desno-krožno polarizirane svetlobe z različnimi kromoforji in jo je mogoče uporabiti za pridobivanje strukturnih informacij o globalni sekundarni strukturi biomolekul.[17] Nepolarizirana svetloba je sestavljena iz valov z različnimi usmeritvami električnih in magnetnih komponent. Polarizacija se doseže z izbiro elektromagnetnih valov z eno samo usmeritvijo in fazo obeh komponent. Krožno polarizirana svetloba je lahko levo ali desno usmerjena glede na relativni fazni zamik. Absorpcija desno- in levosučne krožno polarizirane svetlobe s kiralnimi molekulami se razlikuje in razlika se imenuje CD. Stopnja CD je odvisna od valovne dolžine (baze DNK absorbirajo svetlobo v območju 180–300 nm) in ta odvisnost je prikazana v spektru CD. Količina, ki se uporablja za opis tega pojava, se imenuje eliptičnost in je izražena v stopinjah. CD spektroskopija je postala priljubljena metoda za ocenjevanje sekundarnih struktur molekul DNK. V primeru G-kvadrupleksov pričakujemo močan pozitivni pas pri ≈260 nm in negativen pas pri ≈245 nm za vzporedne G-kvadruplekse, antiparalelni G-kvadrupleksi imajo negativen pas pri 260 nm in pozitivni pas pri 295 nm, G-kvadrupleksi s hibridno topologijo imajo dva pozitivna pasova pri ≈295 in ≈260 ter negativni pas pri ≈245 (slika 12).[17]



Slika 12: G-kvadrupleksne strukture z paralelno, antiparalelno in hibridno topologijo (zgoraj) ter njihovi CD spektri (spodaj)

8. Postopek eksperimenta

Uporabljena zaporedja znotraj promotorja EGFR

Oligonukleotid[#]	1	5	10	15	20	25
EGFR-37	GGGAGGCAGGGCGGGAGGAGGAGGG					
EGFR-114	GGAGGAGGGAGG					
EGFR-143	GGCGGCCGCTGGCCTTGG					
EGFR-207	GGGAGTGGGGCGGCGCATGGGAGGG					

[#]Zaporedja so v smeri 5'-3'.

1. Sinteza DNK oligonukleotidov in priprava vzorcev

Za sintezo kratkih oligonukleotidov DNK smo uporabili standardno fosforamiditno kemijo na trdni podlagi z uporabo sintetizatorja K&A Laborgeraete GbR DNK/RNA. Uporabili smo kolone, v katerih je bila prva baza že pritrjena na trdno podlago, naslednje baze so bile pritrjene ena za drugo, sintetizirane na način DMT-on in prečiščene z uporabo kartuš Glen-Pak™ DNK Cartridges.[18] Skupina DMT, zadržana na 5' koncu oligonukleotida, omogoča vezavo oligonukleotidov polne dolžine na podlago v kartušah. V postopku čiščenja se izločijo neuspešna zaporedja (produkti ne polne dolžine), nato pa se odstrani DMT, kar omogoči izločanje prečiščenega produkta. Oligonukleotidi so bili deprotektirani v 1 ml amonijevega hidroksida/metilamina (AMA)/kolone 30 min pri 65 °C. Po deprotekciji smo vsakemu vzorcu dodali 1 ml 100 mg/ml raztopine NaCl. Glen-Pak™ DNK kartuše smo namestili na vakumski kolektor in jih aktivirali z 0,5 ml acetonitrila, ki mu je sledilo 1 ml 2M triaminskega acetata (TEAA) pri pH 7. TEAA deluje kot reagent za parjenje ionov, ki poveča vezavo oligonukleotida DMT-ON na smolo. Nato smo na kartušo nanesli mešanico oligo/soli v alikvotnih količinah po 1 ml in eluent zbrali kot odpadek. Kartušo speremo z 2 x 1 mL raztopine za izpiranje soli (5 % acetonitril v 100 mg/ml NaCl), s čimer smo s kartuše izprali preostanek neuspešnih zaporedij. Nato smo kartušo splaknili z 2 x 1 mL 2-odstotne raztopine trifluoroocetne kisline (TFA)/vode, s čimer smo odstranili skupino DMT z vezanega oligonukleotida polne dolžine. Za izpiranje TFA in odvečnih soli smo kartušo sprali z 2 x 1 ml deionizirane vode Milli-Q. Prečiščene oligonukleotide smo eluirali z 1 x 1 mL 50 % acetonitrila v vodi, ki vsebuje 0,5 % amonijevega hidroksida, in jih zbrali v sveže epruvete Falcon.
Po čiščenju so bili vzorci DNK razsoljeni. Pred razsoljevanjem smo raztopinam oligonukleotidov dodali 2 ml 2M LiCl. Odsoljevanje je bilo izvedeno z več krogi centrifugalne koncentracije z uporabo centrifugalnih filtrov Amicon Ultra-15 z mejo 3 kDa in deionizirane vode Milli-Q.
Po čiščenju in razsoljevanju vzorcev DNK smo izmerili njihove koncentracije z mikrospektrometrom NanoDrop. Vzorce smo pred merjenjem 50-krat razredčili. Na podstavek smo s pipeto odmerili 2 µL vzorca in potegnili roko navzdol. Meritve smo opravili v treh ponovitvah. [18]

Oligonukleotid	ε (l/mol x cm)	A	Koncentracija (mM)
EGFR-37	505600	3.08	0.31
EGFR-114	375500	6.42	0.86
EGFR-143	399800	5.10	0.64
EGFR-207*	492500	48.3	0.10

** Zaradi manjšega politja vzorca med čiščenjem, ta vzorec ni bil razredčen pred meritvijo z Nanodropom.*

Organske baze, ki sestavljajo DNK, absorbirajo svetlobo v ultravijoličnem (UV) spektru. Pri dovolj nizkih koncentracijah je absorbcija pri določeni valovni dolžini (A; negativni logaritem razmerja med prejeto in oddano jakostjo svetlobe) neposredno sorazmerna s koncentracijo vzorca (c) in dolžino poti (l; razdalja, ki jo mora UV žarek prepotovati skozi vzorec):

$A = \varepsilon c l$

Koeficient sorazmerja (ε; koeficient ekstinkcije) se lahko izračuna iz vnaprej določenih koeficientov za vsako bazo ali bazni par v oligonukleotidu pri dani temperaturi. Koeficienti ekstinkcije različnih struktur, ki lahko obstajajo v oligonukleotidih, se običajno razlikujejo. Na primer, ekstinkcijski koeficient zloženega oligonukleotida B-DNK, ki večinoma obstaja pri nižjih temperaturah, se razlikuje od ekstinkcijskega koeficienta razloženega oligonukleotida, ki večinoma obstaja pri višjih temperaturah. To pomeni, da se absorpcijske lastnosti raztopine oligonukleotida s segrevanjem spreminjajo, kar omogoča opredelitev stabilnosti strukture DNK in RNK.

2. NMR spektroskopija

NMR vzorci so bili pripravljeni iz osnovne raztopine oligonukleotidov z koncentracijami med 0.1 and 0.3 mM na sekvenco in 90%/10% mešanico $H_2O/^2H_2O$, 0-100 mM kalijevega fosfatnega buferja (pH 7.4) v prisotnosti 100 mM KCl pri 25 °C. Končni volumen vzorca je bil 500 µl. NMR spektri so bili zbrani na Bruker AVANCE NEO 600 MHz spektrometru z 5-mm trikanalno inverzno (TCI) kriogeno sondo. Rezultati so bili zbrani z Bruker Topspin in analizirani z MestReNova.

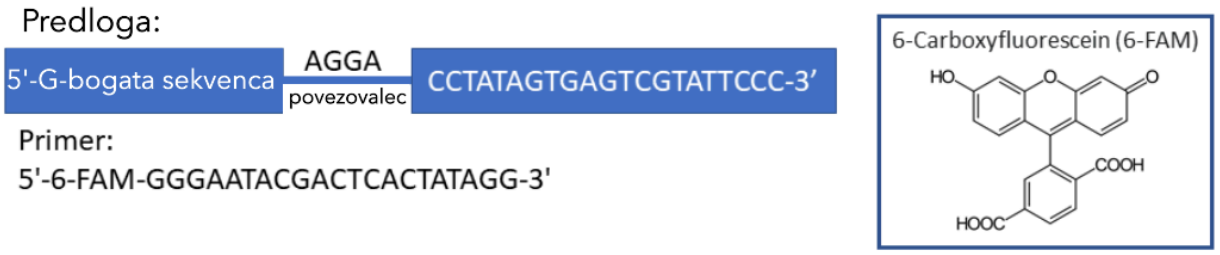
3. CD spektroskopija

Spektre cirkularnega dikroizma (CD) smo izmerili z uporabo spektropolarimetra JASCO J-810, opremljenega s Peltierjevim temperaturnim regulatorjem. CD-spektre smo zajeli v območju od 220 do 320 nm s hitrostjo skeniranja 100 nm/min, širino pasu 2 nm, intervalom podatkov 0,5 nm in odzivnim časom 2 s. Meritve smo izvedli v kremenovi kiveti s potjo dolžine 1 cm pri koncentraciji oligonukleotida približno 4 µM v 10 mM TRIS (pH 7,5). Titracije CD s KCl so bile izvedene pri temperaturi 25 °C.

4. In vitro test ustavitve DNK polimeraze

Predloge DNK so bile sestavljene iz zaporedja, bogatega z G, povezovalca AGGA in komplementarnega zaporedja za vezavo primerja (slika 13). Primer je bil označen s 5'-6-FAM. Predlogo in primer smo zmešali v razmerju 1:1 in z 1H NMR preverili pravilno komplementarno vezavo. Podaljševanje primerja je potekalo 20 minut pri 25 °C in 37 °C v 50 µl reakcijskega pufra, ki je vseboval 1 µM primerja-template, 0,2 mM dNTP (New England Biolabs, NEB), 16,7 U/µl Klenow fragmenta (KF) (NEB), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl in 10 mM MgCl2. Po podaljšanju primerja smo reakcije ugašali s 5 µl raztopine 7 M sečnine in 500 mM etilendiamin-tetraocetne kisline (EDTA), pH 8,5, pri 70 °C za 20 min. Produkte podaljšanja primerja smo razločili z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) in kapilarnim elektroforeznim sistemom Agilent 7100 CE. Za denaturacijski gel PAGE (14 %) smo uporabili vertikalni elektroforetični aparat in pufer TBE. Na gel smo naložili 10 µl vzorcev reakcijske raztopine in jih 30 min izvajali pri 220 V, DNK pa smo vizualizirali z barvanjem Stains-All (Sigma-Aldrich). Za kapilarno elektroforezo smo vzorcem dodali 1 ml

EtOH in jih čez noč ohladili na -80 °C. Nato smo DNK oborili s centrifugiranjem (pri 4 °C s 1500 vrtljaji na minuto za 15 minut). Oborjeni DNK smo raztopili v 100 µl deionizirane vode Milli-Q. 2 µl tega vzorca smo prenesli v 48 µl raztopine 60 % v/v dimetilsulfoksida/H2O, ki smo jo uporabili za analizo s kapilarno elektroforezo. Na sistemu za kapilarno elektroforezo smo uporabili 15 % (polietilen glikol)/20 % acetonitrilni gel in fluorescenčni detektor.

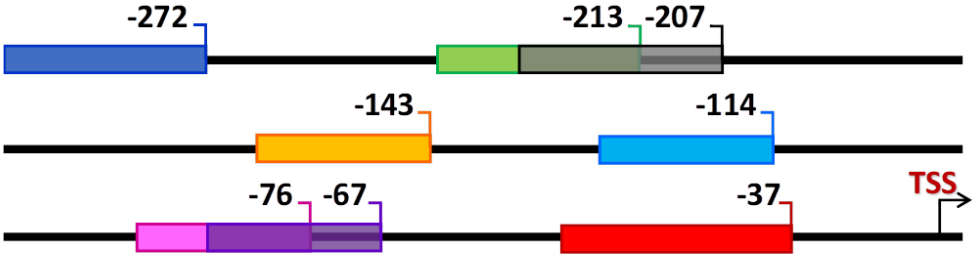


Slika 13: Shematski prikaz zasnove predloge, zaporedja primerja in kemijske strukture fluorescenčnega barvila 6-FAM (6-karboksifluorescein), ki ima absorpcijsko valovno dolžino 495 nm in emisijsko valovno dolžino 517 nm.

9. Rezultati

Strukturna analiza z gvaninom bogatih oligonukleotidov iz promotorske regije EGFR

Najbolj standarden motiv G-kvadrupleksa je d(G2-3NG2-3NG2-3NG2-3), ki je sestavljen iz štirih traktov z dvema ali tremi gvanini (G-trakt), ki so med seboj ločeni z N-območji (zankami) različnih dolžin. Podrobna analiza promotorske regije EGFR je razkrila osem domnevnih zaporedij, ki tvorijo G-kvadrupleks in se nahajajo do 301 bp pred začetnim mestom transkripcije (TSS) (slika 14). Omeniti velja, da ta regija že od prve funkcionalne študije tega promotorja velja za bistveno regijo za transkripcijo EGFR.[19]



- **EGFR-272:** **5' -GGG GAC CGG GTC CAG AGG GGC AGT GCT GGG- 3'**
- **EGFR-213:** **5' -GG GCG GCG CAT GGG AGG GGA GCG GG- 3'**
- **EGFR-207:** **5' -GGG AGT GGG GCG GCG CAT GGG AGG G- 3'**
- **EGFR-143:** **5' -GGC GGC CGC TGG CCT TGG- 3'**
- **EGFR-114:** **5' -GGA GGA GGG AGG- 3'**
- **EGFR-76:** **5' -GGAGGGATCGGGAGG- 3'**
- **EGFR-67:** **5' -GGC GGC GGA GGA GGG ATC GGG AGG- 3'**
- **EGFR-37:** **5' -GGG AGGCA GGG C GGG AGGAGGA GGG- 3'**

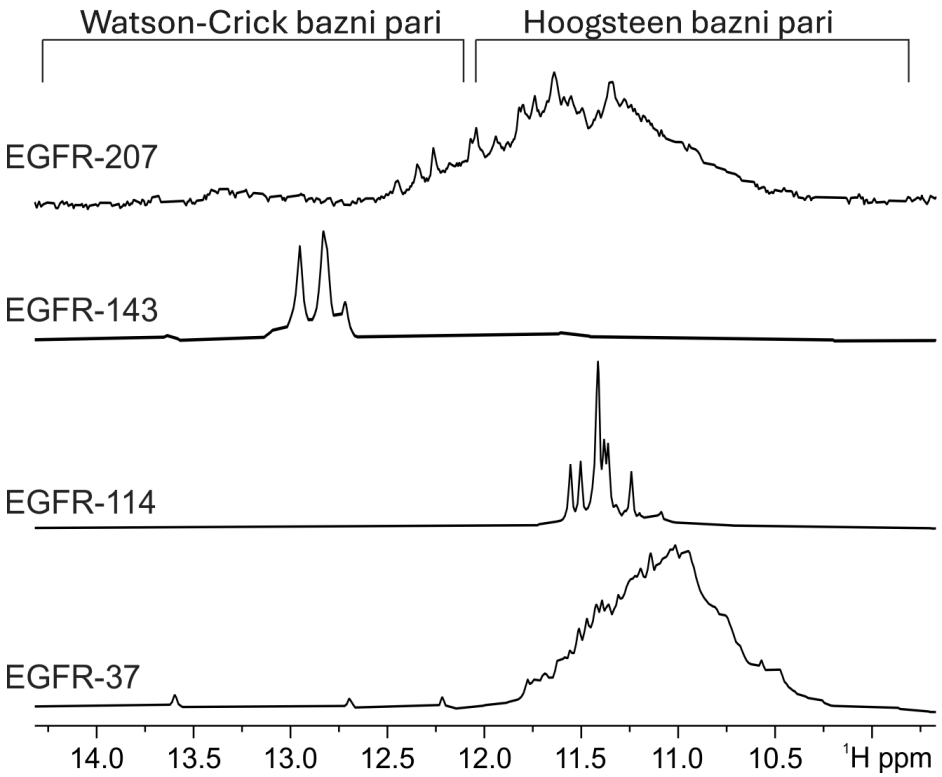
Slika 14: Shematski prikaz osmih domnevnih zaporedij, ki tvorijo G-kvadrupleks in se nahajajo pred začetnim mestom transkripcije (TSS) v promotorski regiji EGFR (zgoraj), z njihovimi oligonukleotidnimi zaporedji (spodaj).

V tej študiji smo za nadaljnjo analizo izbrali štiri zaporedja (EGFR-37, EGFR-114, EGFR-143, EGFR-207) glede na število gvaninov v G-traktih in dolžine območij zank (slika 14). EGFR-37 je sestavljen iz kombinacije dveh in treh gvaninov v G-traktih. EGFR-114 in EGFR-143 vsebujeta dva gvanina v G-traktih, EGFR-207 pa je sestavljen iz štirih G-traktov z vsaj tremi ostanki gvanina v traktih. EGFR-37, EGFR-114 in EGFR-143 imajo kratke zanke s samo enim ali dvema nukleotidoma, EGFR-207 pa ima daljše zanke s 3-8 nukleotidi. Za karakterizacijo izbranih oligonukleotidov je bil uporabljen niz komplementarnih NMR in CD spektroskopskih tehnik, da bi raziskali vrsto sekundarnih struktur, ki so jih tvorili, in njihovo strukturno odvisnost od prisotnosti K+ ionov.

Analiza sekundarnih struktur štirih oligonukleotidov s spektroskopijo NMR.

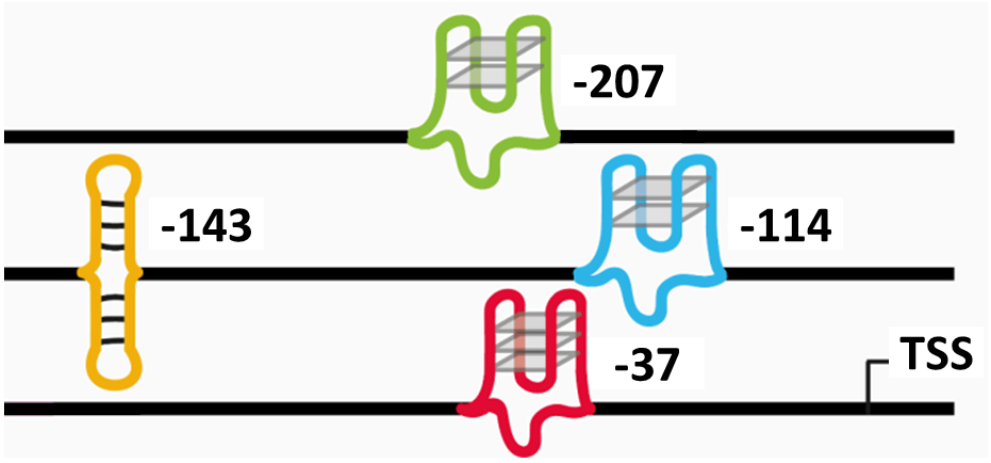
Podrobna analiza imino področij ^{1}H NMR spektrov, ki so zelo informativni za parjenje baz v preučevanih oligonukleotidih, je pokazala, da vsi štirje oligonukleotidi tvorijo sekundarne strukture (Slika 15). Signali v območju med δ 10-12 ppm so zelo značilni za nastanek G-kvadrupleksnih struktur, kjer lahko opazimo signale gvaninskih imino protonov, ki sodelujejo pri Hoogsteenovi vodikovi vezi, prisotni v G-kvadrupleksih. Število signalov v tem območju kaže na število gvaninov, vključenih v G-kvartete. Naši rezultati kažejo, da lahko EGFR-37, EGFR-114 in EGFR-207 tvorijo G-kvadrupleksne strukture v prisotnosti 100 mM KCl. Število signalov in grbina v osnovni črti kažeta, da EGFR-37 in EGFR-207 tvorita več G-kvadrupleksov s po tremi G-kvadrupleksi, vendar najverjetneje z različnimi topologijami. Pri obeh smo opazili tudi signale v območju med δ 12-14 ppm, kjer pričakujemo signale imino protonov gvaninskih in timinskih ostankov, vključenih v kanonične Watson-Crickove GC oziroma AT bazne pare. GC in AT bazni pari najverjetneje nastanejo med ostanki znotraj območij zank. ^{1}H NMR spekter EGFR-114 v prisotnosti 100 mM KCl kaže osem ozkih in dobro ločenih imino signalov med δ 11,3 in 11,7 ppm, kar kaže na prisotnost ene same dobro definirane G-kvadrupleksne strukture. Osem imino signalov v ^{1}H NMR spektru EGFR-114 lahko pripišemo nastanku

monomerne G-kvadrupleksne strukture z dvema G-kvartetoma oziroma popolnoma simetričnega multimernega G-kvadrupleksa.



Slika 15: Imino področje ^{1}H NMR spektrov štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR. Spektri NMR so bili posneti pri koncentraciji ~0,3 mM oligonukleotidov na nit, 100 mM KCl, pH 7,4, 25 °C na 600 MHz NMR-spektrometru.

V nasprotju z oligonukleotidi EGFR-37, EGFR-114 in EGFR-207, ki v prisotnosti 100 mM KCl tvorijo G-kvadrupleksne strukture (Slika 16), pri EGFR-143 nismo opazili imino signalov med δ 10-12 ppm, kar bi kazalo na tvorbo G-kvadrupleksne strukture. V ^{1}H NMR spektru EGFR-143 je med δ 12,6-13,1 ppm opaziti skupino imino signalov, značilnih za GC bazne pare, medtem ko ni imino signalov, povezanih z Hoogsteenovimi baznimi pari. Ti Watson-Crickovi bazni pari bi lahko nastali zaradi medmolekulske ali znotrajmolekulske ureditve DNK, kar kaže na to, da EGFR-143 zavzema lasasto strukturo, ki temelji na GC Watson-Crickovih baznih parih (slika 16).



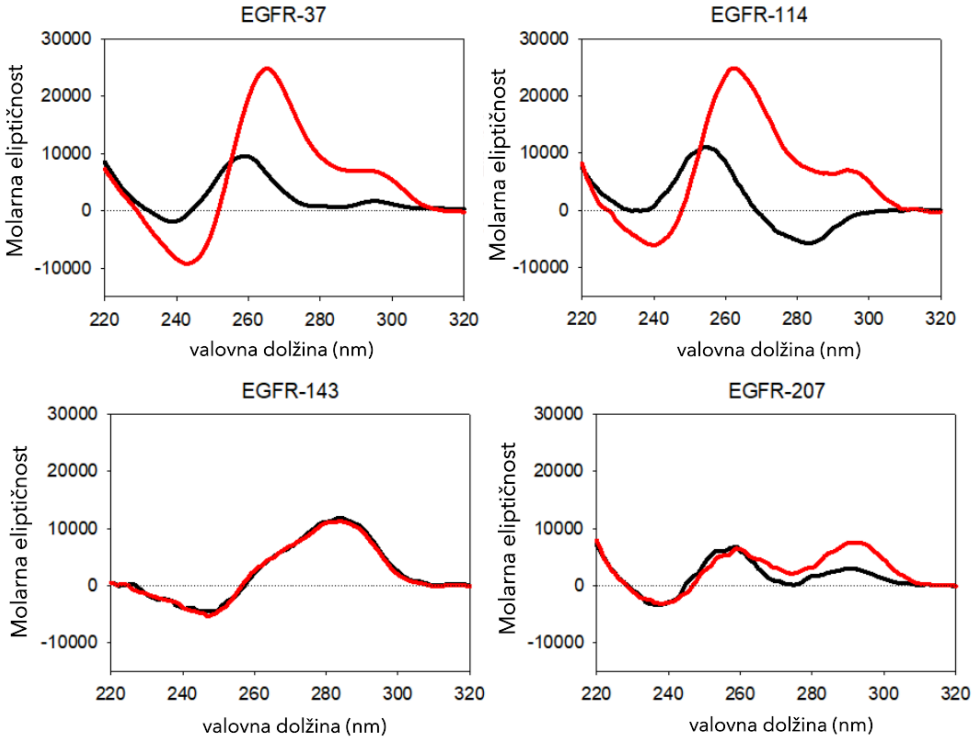
Slika 16: Shema sekundarnih struktur, ki jih tvorijo EGFR-37, EGFR-114, EGFR-143, in EGFR-207 oligonukleotidi

Vpliv K^+ ionov na strukturo prikazan z CD spektroskopijo

G-kvadrupleksne strukture so močno stabilizirane z (monovalenčnimi) kationi, med katerimi imajo K+ ioni največjo sposobnost stabilizacije G-kvadrupleksnih struktur. Poleg tega je zlaganje G-kvadrupleksov odvisno od prisotnosti K+ ionov v vzorcih. Zato smo analizirali, kako se CD spektri štirih oligonukleotidov spremenijo po dodatku 100 mM KCl v vzorce, da smo podrobneje raziskali značilnosti zlaganja teh oligonukleotidov (Slika 17). CD spektroskopija je zelo pomembna dopolnilna tehnika k NMR spektroskopiji, saj razlike v zlaganju G-kvartetov, orientaciji segmentov verige in razporeditvi zank privedejo do edinstvenih CD spektralnih podpisov. G-kvadrupleksne topologije (paralelna, antiparalelna in hibridna) lahko zelo preprosto ločimo glede na značilne profile v CD spektrih (paralelna topologija ima maksimum pri ≈264 nm in minimum pri ≈245 nm; antiparalelna ima maksimum pri ≈295 nm in minimum pri ≈260 nm; hibridna topologija ima dva pozitivna pasova pri maksimumih ≈295 nm in ≈260 nm ter minimum pri ≈245 nm).

Oligonukleotidi EGFR-37, EGFR-114 in EGFR-207 doživijo konformacijske spremembe v prisotnosti ionov K+, kar nakazuje, da so se po dodatku ionov K+ v vzorce tvorile G-kvadrupleksne strukture. Ti podatki se dobro ujemajo tudi z opazovanji v NMR spektrih, kjer smo opazili signale v območju δ 10–12 ppm, kar je značilno za tvorbo G-kvadrupleksov. EGFR-37 in EGFR-114 v prisotnosti ionov K+ kažeta pozitiven vrh med 262 in 265 nm, še en pozitiven vrh okoli 295 nm ter negativni prispevek okoli 243 nm v CD spektrih. Te značilnosti kažejo na tvorbo G-kvadrupleksov s paralelno ali hibridno topologijo.

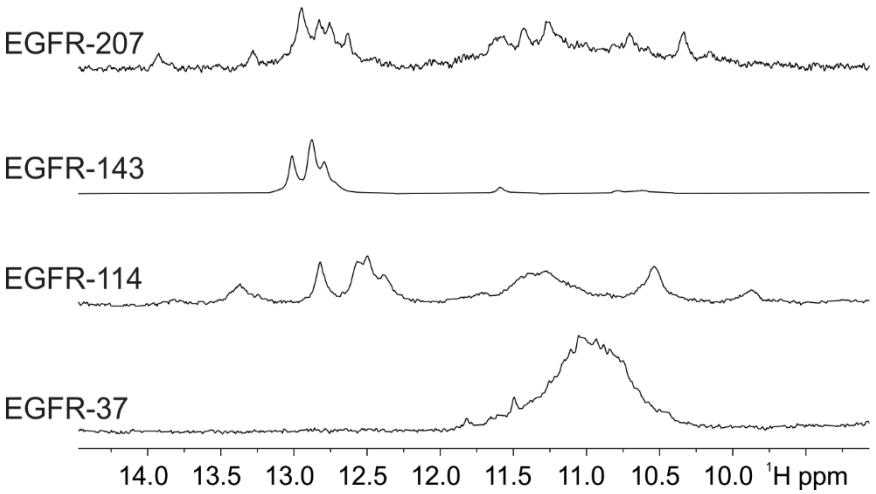
Konformacijske spremembe pri EGFR-207 so manj izražene, kar kaže na manjše dihroične variacije, zato je težko določiti njegovo zloženo topologijo. CD spekter EGFR-143 kaže pozitiven vrh pri 280 nm, negativen vrh pri 245 nm, pri 258 nm pa CD signal doseže vrednost nič, kar je skladno s tvorbo inter- ali intramolekularne dvojnovijačne DNK, podobne strukturi sponke za lase (“hairpin”). Pri EGFR-143 nismo opazili nobenih sprememb v profilu CD spektra pred in po dodatku KCl v vzorec. To se zelo dobro ujema tudi z NMR podatki, ki kažejo, da EGFR-143 ne tvori G-kvadrupleksne strukture.



Slika 17: CD spektri štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR, posneti v odsotnosti (črne črte) ali v prisotnosti (rdeče črte) 100 mM KCl v 10 mM TRIS, pufer pH 7,4 pri 25 °C.

Vloga sekundarnih struktur EGFR promotorja pri izražanju genov

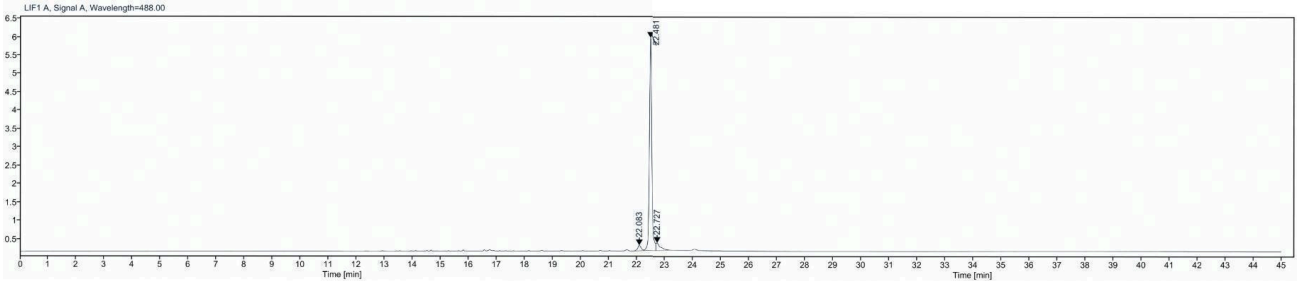
Ker štirje oligonukleotidi tvorijo različne sekundarne strukture G-kvadrupleksov (EGFR-37, EGFR-114 in EGFR-207) ter hairpin strukturo (EGFR-143), sklepamo, da so odlični za preučevanje vpliva strukture DNK na proces replikacije z uporabo testa zaustavitve DNK polimeraze. Sekundarne strukture (G-kvadrupleks ali hairpin strukture) v podani verigi DNK lahko zavirajo DNK polimerazo pri sintezi komplementarne DNK verige. To je pomembno pri ciljanju na promotor EGFR z namenom uravnavanja izražanja genov. Oblikovali smo štiri DNK sekvence, ki vsebujejo zaporedja EGFR-37, EGFR-114, EGFR-143 ali EGFR-207, povezovalno regijo in komplementarno regijo za vezavo s FAM-označenim začetnikom. Z beleženjem 1H NMR spektrov smo preverili, ali se sekundarne strukture oligonukleotidov ohranijo tudi v daljših DNK verigah (slika 18). Signali v 1H NMR spektrih so pokazali, da preučevani štirje oligonukleotidi tvorijo enake tipe sekundarnih struktur tudi v daljših sekvencah. Največje spremembe so bile v iminski regiji 1H NMR spektrov opažene pri EGFR-114, kjer smo zaznali tudi signale, značilne za Watson-Crickove GC in AT bazne pare, ki jih v 1H NMR spektrih kratkega oligonukleotida EGFR-114 nismo opazili. Kljub temu še vedno zaznamo signale v regiji, značilni za tvorbo struktur G-kvadrupleksa.



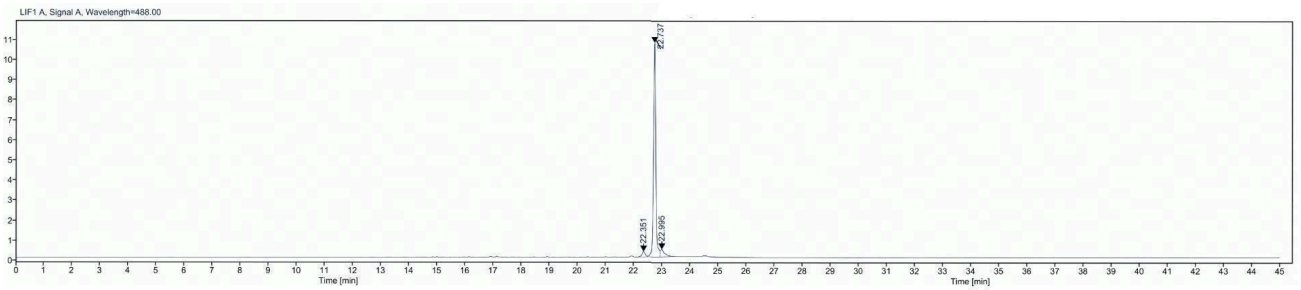
Slika 18: Iminska regija 1H NMR spektrov štirih oligonukleotidov iz promotorja EGFR v daljših DNK sekvencah. NMR spektri so bili posneti pri koncentraciji oligonukleotidov približno 0,2 mM na verigo, v 100 mM KCl, pH 7,4, pri temperaturi 25 °C, na 600 MHz spektrometru

Da bi ugotovili, ali lahko štirje oligonukleotidi iz regije promotorja EGFR blokirajo podvajanje DNK, smo izvedli test zaustavitve DNK polimeraze pri 25 °C in 37 °C ter podatke analizirali z kapilarno elektroforezo. Najprej smo analizirali elektroferograme samih sekvenc, da bi jih uporabili kot kontrolne vzorce. Ti vzorci so bili pripravljeni na enak način kot ostale reakcije, le da vanje nismo dodali DNK polimeraze. Tako smo pridobili retencijske čase za vsako reakcijo ter ugotovili, ali se je reakcija z DNK polimerazo sploh začela. Po dodatku DNK polimeraze v vzorec smo reakcijo ustavili po 20 minutah in primerjali rezultate pri 25°C in 37°C.

EGFR-37. Pri 25 °C so na elektroferogramu kontrole EGFR-37 vidni trije vrhovi z retencijskimi časi (RT) 22,1, 22,5 in 22,7 min, ki smo jih prepoznali kot naš primer (Slika 19). Najvišji z 90,8-odstotnim odstotkom površine pod vrhom ima RT 22,5 min. Zaradi majhnega nihanja gibljivosti v kapilari je bilo mogoče opaziti dva znatno manjša vrha primerja, kar smo opazili kot ločitev vrha primerja. Podobno so pri 37 °C vidni trije vrhovi, vendar so njihovi retencijski časi daljši (22,4, 22,7 in 23,0 min) (slika 20). Odstotek površine najbolj intenzivnega vrha je 90,4 %.

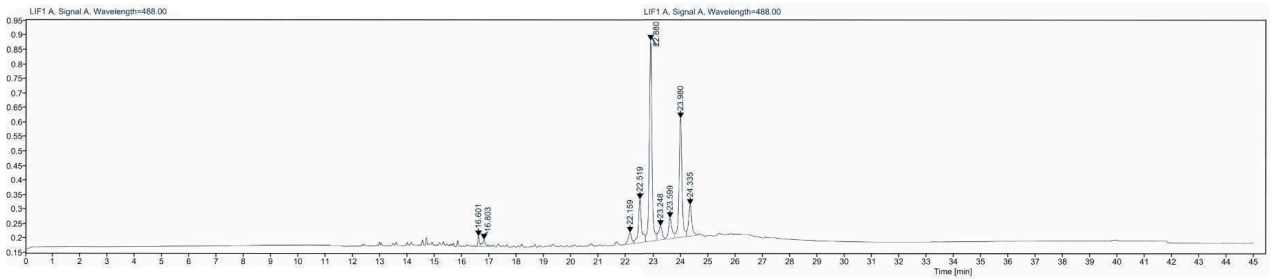


Slika 19: Elektroferogram EGFR-37 pri kontroli pri 25 °C.

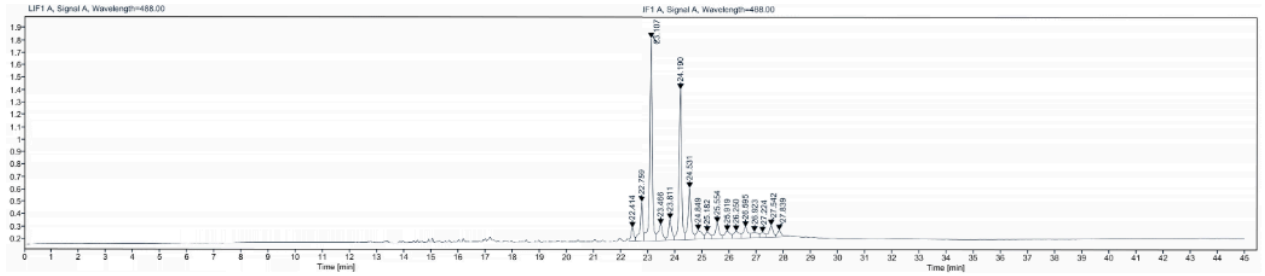


Slika 20: Elektroferogram EGFR-37 pri kontroli pri 37 °C.

Pri 25 °C po 20 minutah reakcije je od RT 12 do 27 minut vidnih več vrhov, kar je prvi pokazatelj, da se je reakcija uspešno začela (Slika 21). Drugi pokazatelj je intenzivnost signala primerja, ki je bistveno nižja kot pri kontroli. Višina signala primerja v kontroli je bila 5,77, medtem ko je bila po 20-minutni reakciji 0,14. Opozoriti je treba, da so manjši vrhovi, opaženi med RT 12 in 22 min, najverjetneje posledica razgradnih produktov primerja ali nekaterih nečistoč pri sintezi oligonukleotida in niso pomembni pri analizi EGFR-37 kot tudi pri reakcijah drugih treh oligonukleotidov, zato jih ne bomo obravnavali naprej. Od RT 22,9 do 24,3 min je pet dobro opredeljenih vrhov z višinami 0,69, 0,05, 0,07, 0,41, 0,11, ki kažejo, da je DNK polimeraza začela reakcijo, vendar se je nato ustavila na drugem G-traktu EGFR-37 (s 3' strani). Vendar je pri RT 40 min viden zelo majhen in zelo širok vrh, ki najverjetneje ustreza produktu polne dolžine.

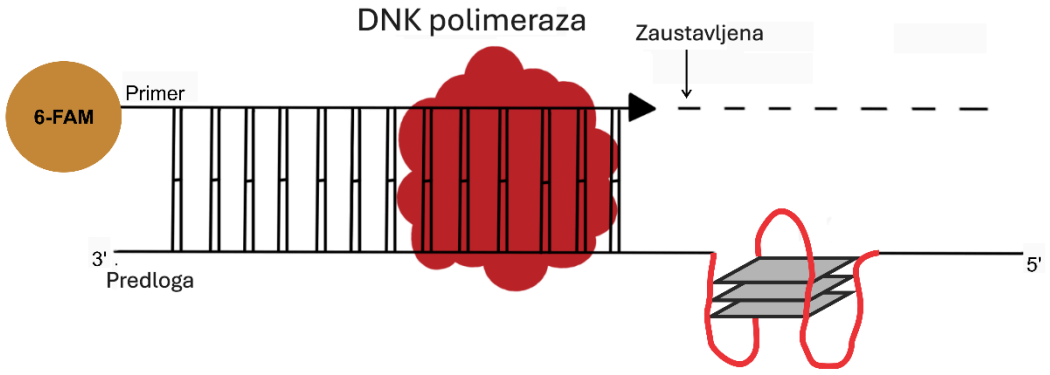


Slika 21: Elektroferogram EGFR-37 pri 25 °C po 20 min reakcije.



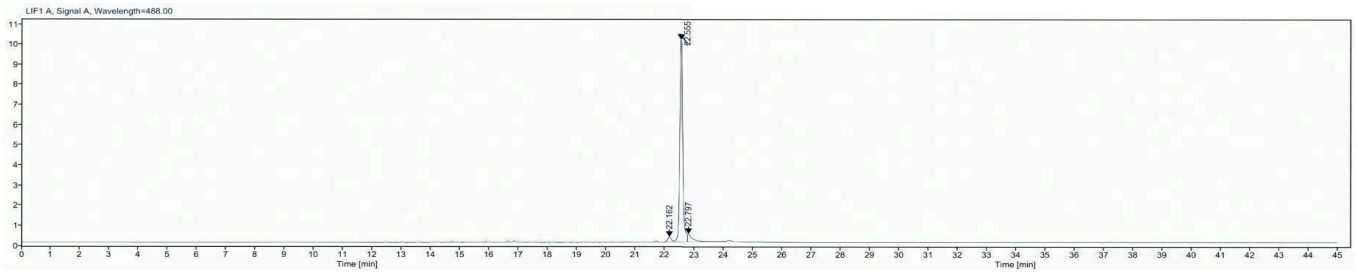
Slika 22: Elektroferogram EGFR-37 pri 37 °C po 20 min reakcije.

Pri 37 °C po 20 min reakcije je vidnih več vrhov od RT 22 do 28 minut (slika 22). Retencijski časi so nekoliko daljši pri 37 °C v primerjavi s 25 °C. Glavni signal primerja opazimo pri RT 22,7 min in ima višino 0,31, kar je precej manj kot pri kontroli (z višino 10,65). To pomeni, da se je reakcija uspešno začela in da je DNK polimeraza uporabila primer za sintezo komplementarnih verig DNK. Opazimo 15 dobro definiranih vrhov med RT 23,1 in 27,8 min z višinami med 0,04 in 1,63. Zanimivo je, da na osnovni črti nismo opazili nobene grbine, za razliko od grafa pri 25 °C. Ti rezultati kažejo, da je pri visokih temperaturah G-kvadrupleks vzorca EGFR-37 najverjetneje manj stabilen, kar DNK polimerazi omogoča izdelavo daljših produktov. Reakcija se je ustavila pri petem G-traktu EGFR-37 (s 3' strani). Vendar nismo zaznali nobenih signalov, ki bi ustrezali celemu končnemu produktu. Ker se reakcija ustavi lahko rečemo, da EGFR-37 tvori stabilno strukturo G-kvadrupleksa, ki je sposobna zaustaviti DNK polimerazo in lahko uravnava podvajanje DNK (Slika 23).

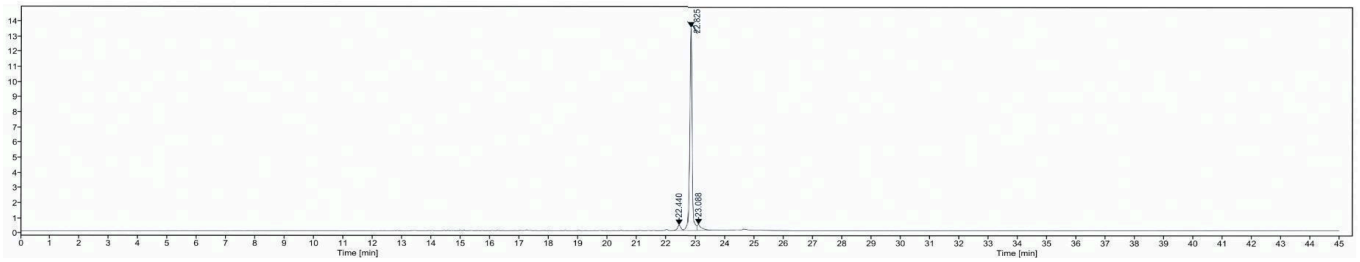


Slika 23: Shema G-kvadrupleksa, ki ustavlja DNK polimerazo v vzorcu EGFR-37.

EGFR 207. Pri 25 °C so v elektroferogramu kontrole EGFR-207 vidni trije vrhovi z RT 22,2, 22,6 in 22,8 min (Slika 24). Opredelili smo jih kot naš primer. Najvišji ima RT 22,6 min in 90,8-odstotni delež površine. Pri 37 °C prav tako opazimo tri vrhove, vendar z nekoliko daljšimi retencijskimi časi (22,4, 22,8 in 23,1 min) (slika 25). Najintenzivnejši vrh ima RT 22,8 in odstotek površine pod vrhom 91,3 %.

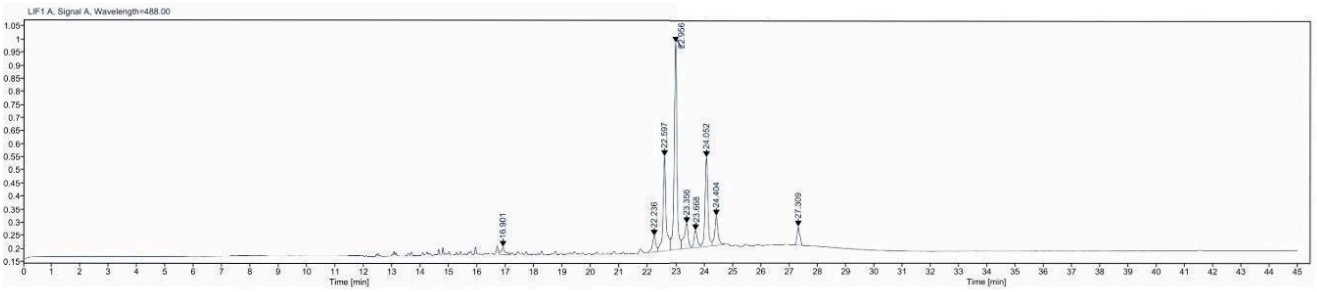


Slika 24: Elektroferogram kontrole EGFR-207 pri 25 °C.

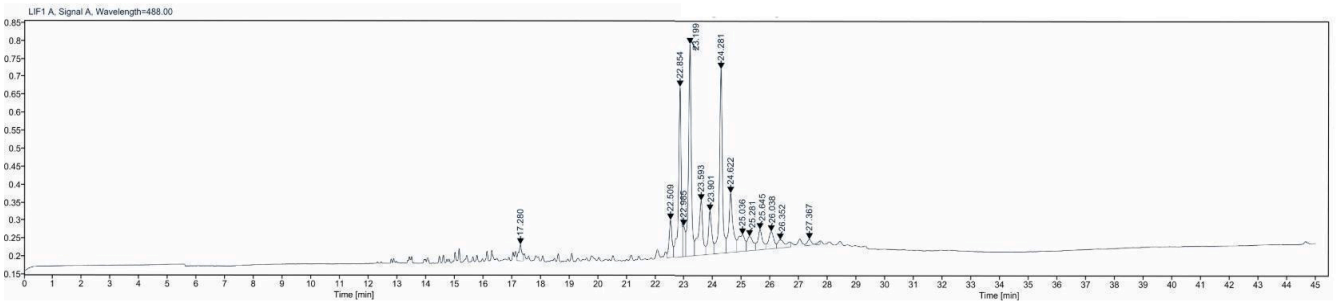


Slika 25: Elektroferogram kontrole EGFR-207 pri 37 °C.

Pri 25 °C po 20 minutah reakcije so vidni številni vrhovi od RT 22 do 27,3 minute, kar je prvi znak, da se je reakcija s polimerazo DNK uspešno začela (Slika 26). Drugi znak je intenzivnost glavnega signala primerja, ki je bistveno nižja kot pri kontroli. Pri 20 min je 0,36, medtem ko je v kontroli 10,03. Od RT 23 do 27,3 min je vidnih šest dobro opredeljenih vrhov, ki kažejo, da je polimeraza DNK začela reakcijo, vendar se je ustavila pri drugem G-traktu EGFR-207 (s 3' strani).

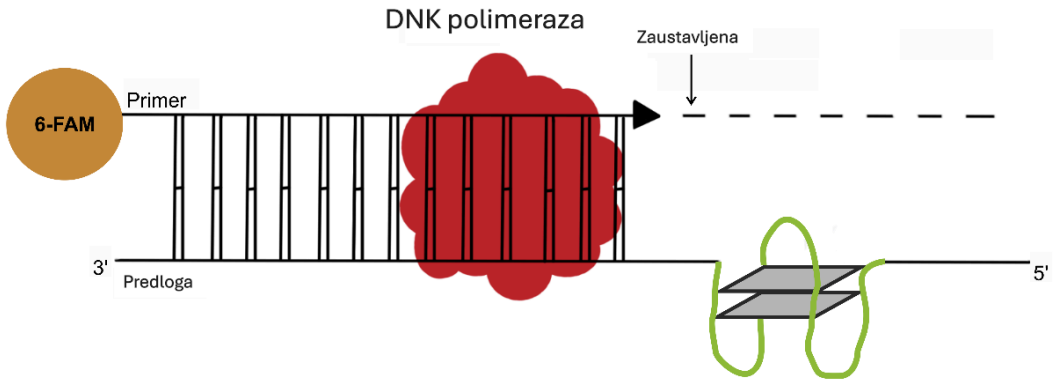


Slika 26: Elektroferogram EGFR-207 pri 25 °C po 20 min reakcije.



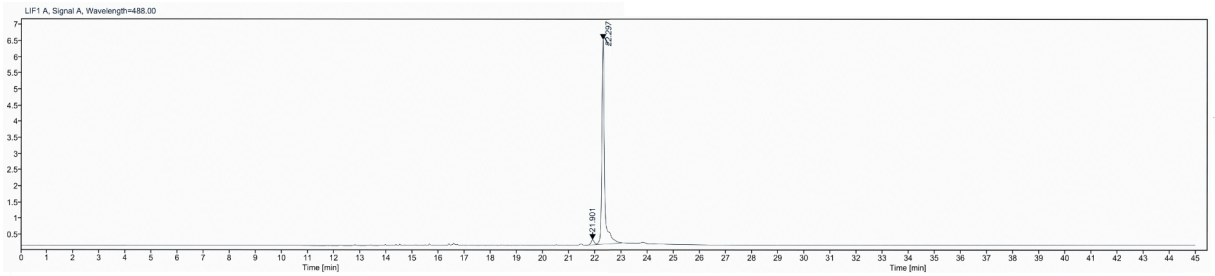
Slika 27: Elektroferogram EGFR-207 pri 37 ° po 20 minutah reakcije.

Pri 37 °C po 20 minutah reakcije je vidnih več vrhov od RT 22 do 27,4 minute (Slika 27). Retencijski časi so nekoliko daljši pri 37 °C v primerjavi s 25 °C. Glavni signal primerja je opazen pri RT 22,9 min in ima višino 0,5, kar je veliko manj kot pri kontroli (z višino 13,4). To pokaže, da se je reakcija uspešno začela. Med RT 23 in 27,4 min opazimo 12 dobro opredeljenih vrhov. Večje število vrhov pri višji temperaturi kaže, da je G-kvadrupleks pri 37 °C manj stabilen kot pri 25 °C, kar DNK polimerazi omogoča izdelavo daljših produktov. Reakcija se je ustavila pri tretjem G-traktu EGFR-207 (s 3' strani), kar je en trakt dlje v primerjavi s 25 °C. Pri obeh temperaturah nismo zaznali vrha, ki bi ustrezal produktu polne dolžine, kar kaže, da je G-kvadrupleks EGFR-207 dovolj stabilen, da učinkovito ustavi reakcijo DNK polimeraze , in je zato zelo obetavna tarča, kadar je treba regulirati podvajanje DNK (slika 28).

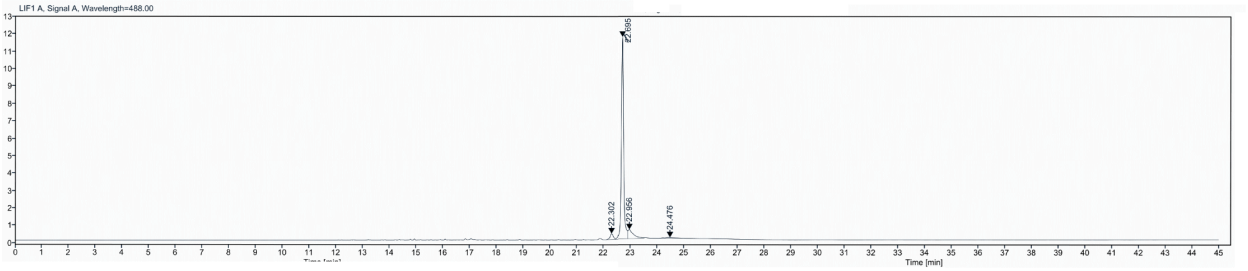


Slika 28: Shema G-kvadrupleksa, ki zaustavlja DNK polimerazo pri EGFR-207.

EGFR-143. Pri 25 °C sta v elektroferogramu EGFR-143 pri RT 21,9 in 22,3 min vidna dva vrhova, ki ju prepoznamo kot naš primer (Slika 29). Odstotek površine pod signalom najintenzivnejšega je 97,2 % in ima RT 22,3 min. Pri 37 °C so vidni štirje vrhovi z RT 22,3, 22,7, 23,9 in 24,5 min (slika 30). Najintenzivnejši vrh je viden pri RT 22,7 in ima 86,4-odstotni odstotek površine pod vrhom.

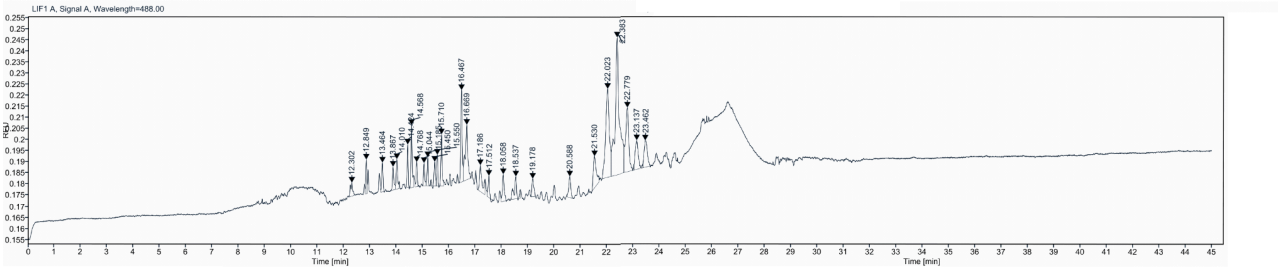


Slika 29: Elektroferogram kontrole EGFR-143 pri 25 °C.



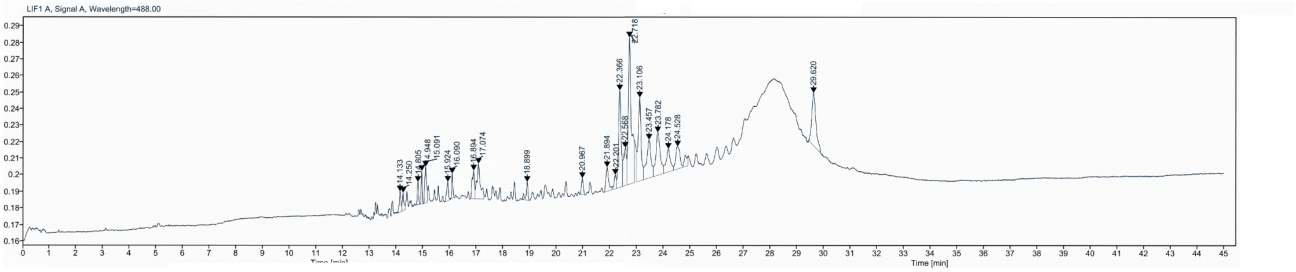
Slika 30: Elektroferogram kontrole EGFR-143 pri 37 °C.

Pri 25 °C po 20 minutah reakcije opazimo več vrhov od RT 22 do 23,5 minute (Slika 31). Višina glavnega signala primerja (0,06) je po 20 min reakcije nižja kot pri kontroli (6,33). Ti podatki kažejo, da se je reakcija uspešno začela in da je bil primer uporabljen za sintezo komplementarnih verig DNK. Pri retencijskih časih 22,8 in 23,5 min opazimo tri dobro definirane vrhove, ki kažejo, da se je reakcija ustavila po prvem G-traktu EGFR-143 (s 3' strani). Poleg tega je v osnovni liniji od 25. do 29. minute opazna grbina. To bi lahko razložili tako, da polimeraza DNK s težavo zaključi reakcijo in se pojavi veliko različnih produktov, ki jih na elektroferogramu ni mogoče dobro ločiti. Vendar ne opazimo nobenih vrhov, ki bi ustrezali produktu polne dolžine.

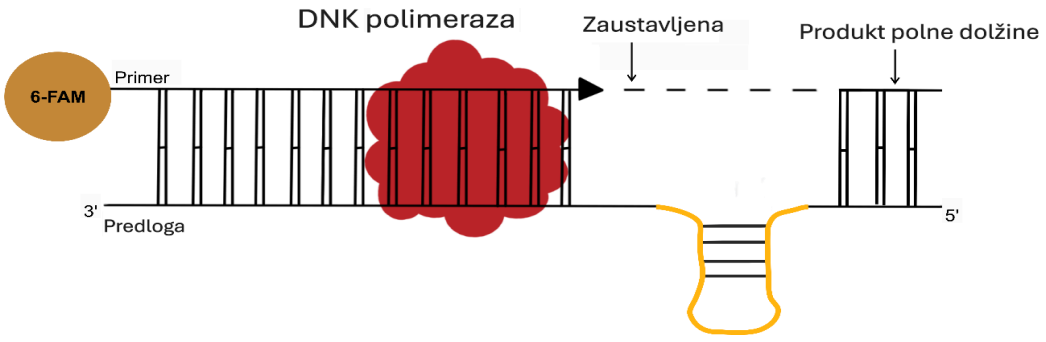


Slika 31: Elektroferogram EGFR-143 pri 25 °C po 20 min reakcije.

Pri 37 °C po 20 minutah reakcije je vidnih več vrhov od RT 22 do 29,6 minute (Slika 32). Retencijski časi so nekoliko daljši pri 37 °C v primerjavi s 25 °C. Signal glavnega primerja je opazen pri RT 22,7 min in ima višino 0,09, kar je bistveno manj od višine signala glavnega primerja v kontroli (11,59). To pomeni, da se je reakcija uspešno začela. Od RT 23,1 do 27 min opazimo 13 dobro opredeljenih vrhov. Med RT 24,5 in 29,6 min opazimo grbo, ki kaže, da se pojavi veliko različnih produktov, ki jih na elektroferogramu ni mogoče dobro ločiti. Vendar pa smo pri RT 29,6 min opazili dobro opredeljen vrh, kar kaže na to, da je DNK polimeraza po boju, na katerega kaže grbina v osnovni liniji, zaključila reakcijo in da se je sintetiziral produkt polne dolžine. Zanimivo je, da je lasna struktura, ki jo tvori EGFR-143, bolj dinamična pri 37 °C kot pri 25 °C, kar DNK polimerazi omogoči, da razvije strukturo in zaključi reakcijo (slika 33).

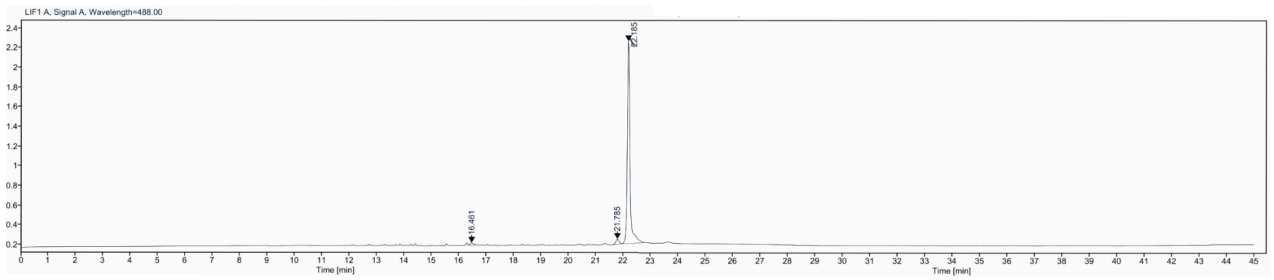


Slika 32: Elektroferogram EGFR-143 pri 37 °C po 20 min reakcije.

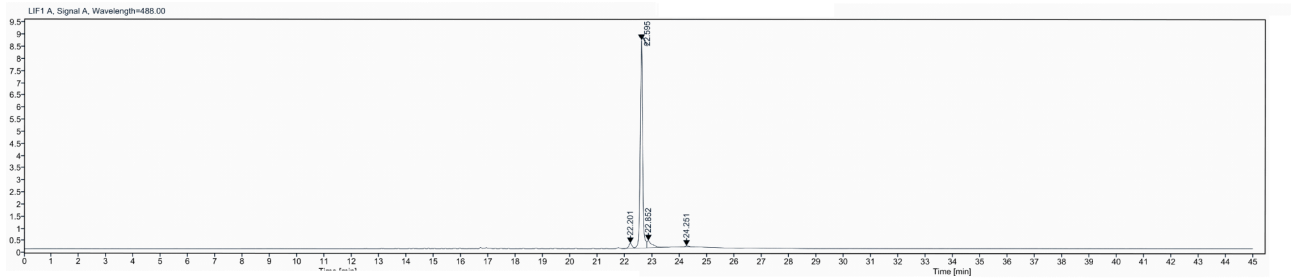


Slika 33: Shema lasne strukture, ki zaustavlja DNK polimerazo v EGFR-143.

EGFR-114. Pri 25 °C so v elektroferogramu kontrole EGFR-114 pri RT 16,5, 21,8 in 22,2 min vidni trije vrhovi, ki jih prepoznamo kot naš primer (Slika 34). Najvišji signal s 95,6-odstotnim odstotkom površine pod vrhom ima RT 22,2 min. Pri 37 °C so vidni štirje vrhovi s retencijskimi časi 22,2, 22,6, 22,9 in 24,3 min (slika 35). Odstotek površine najbolj intenzivnega vrha je 89,1 %, njegov RT pa je 22,6 min.

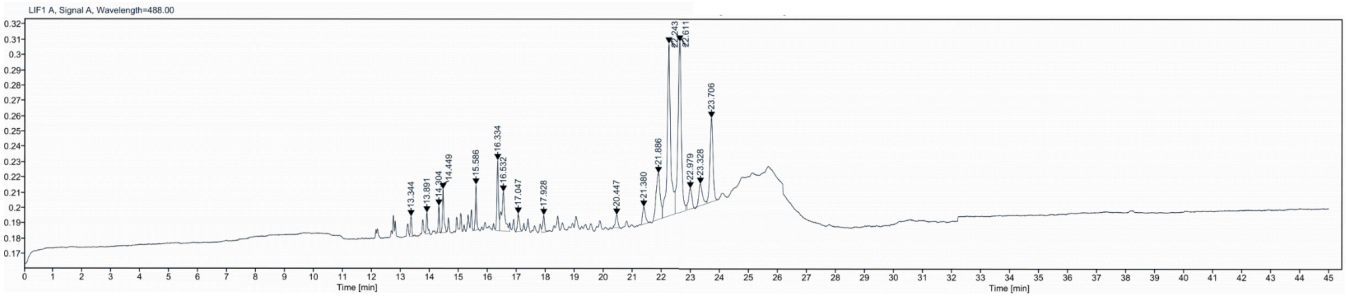


Slika 34: Elektroferogram kontrole EGFR-114 pri 25 °C.

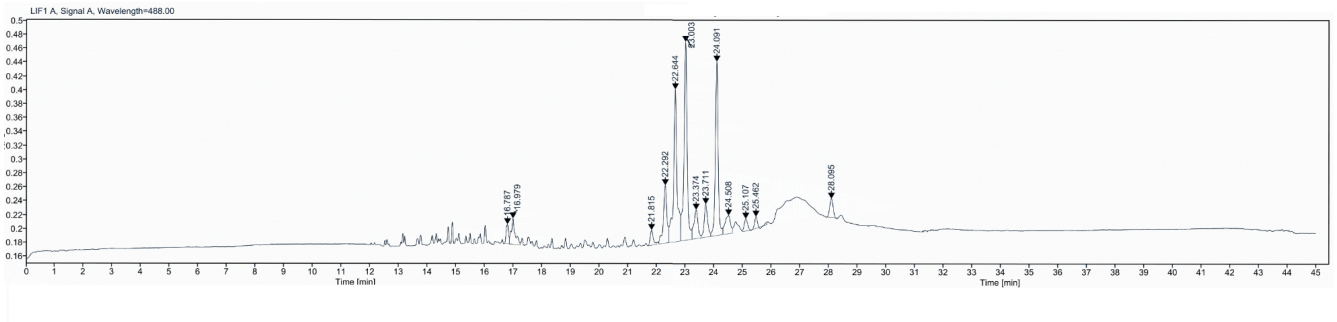


Slika 35: Elektroferogram kontrole EGFR-114 pri 37 °C.

Pri 25 °C po 20 minutah reakcije lahko opazimo več vrhov od RT 22 do 23,7 min (Slika 36). Poleg tega je intenzivnost signala primerja (višina vrha 0,11) bistveno manjša kot pri kontroli (višina vrha 2,06). Na podlagi tega lahko sklepamo, da se je reakcija uspešno začela in da se je primer uporabil za sintezo komplementarnih verig DNK. Med RT 22,6 in 23,7 min opazimo štiri dobro definirane vrhove z višinami 0,1116, 0,0135, 0,0141 in 0,0548, kar pomeni, da se je reakcija uspešno začela. Poleg tega je od RT 23,7 do 28 min na osnovni črti grba, ki kaže na nastanek številnih različnih produktov, ki jih na elektroferogramu ni mogoče dobro ločiti. Pri približno 28 min se na elektroferogramu EGFR-114 pojavi širok in šibek vrh, ki bi lahko bil signal, ki ustreza produktu polne dolžine. Relativno kratek RT produkta polne dolžine oligonukleotida EGFR-114 ni presenetljiv, saj je EGFR-114 dolg le 12 nukleotidov.

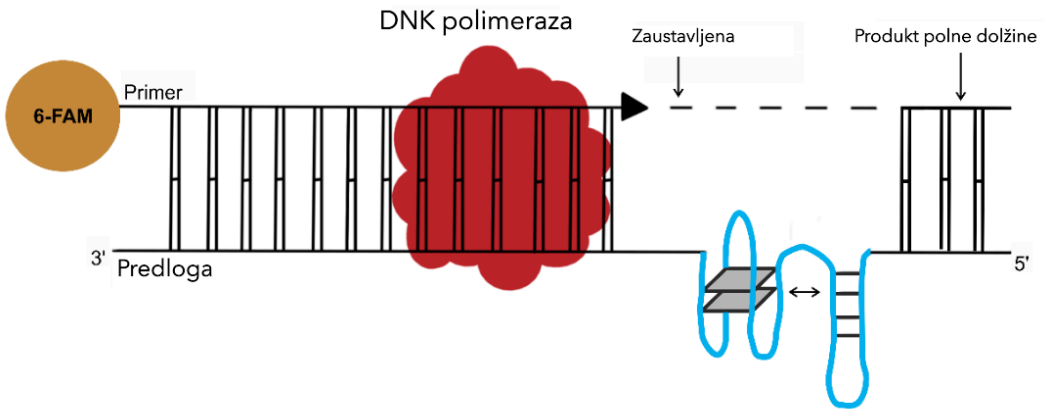


Slika 36: Elektroferogram EGFR-114 pri 25 °C po 20 min reakcije.



Slika 37: Elektroferogram EGFR-114 pri 37 °C po 20 min reakcije.

Pri 37 °C po 20 min reakcije so vidni različni vrhi od RT 22 do 28 min (slika 37). Retencijski časi so nekoliko daljši pri temperaturi 37 °C v primerjavi z temperaturo 25 °C. Glavni signal primerja ima višino 0.2, medtem ko ima v kontroli višino 8.6. Povečano število vrhov in nižja višina primerja nam povesta, da se je reakcija uspešno začela. Opazimo vsaj 8 lepo definiranih vrhov med retencijskimi časi 23 in 28.1 min. Med RT 25.5 in 28.1 min, lahko vidimo grbo v osnovni liniji, ki je podobna grbi pri 25 °C. To bi spet lahko razložili kot trud DNK polimeraze, da konča reakcijo in sintetizirani so mnogi različni produkti, ki jih elektroferogram ne more ločiti. V primerjavi z 25 °C, je pri 37 °C signal z RT 28.1 min mnogo bolj intenziven in viden je nov signal z RT 28.5 min. To nam pove da EGFR-114 pri višji temperaturi postane manj stabilen in dinamičen, kar omogoča DNK polimerazi, da sintetizira daljše produkte, saj lažje odvije sekundarne strukture EGFR-114. .



Slika 38: Shema G-kvadrupleksa/hairpina pri ustavljanju DNK polimeraze v EGFR-114.

Pri primerjavi rezultatov testa zaustavitve DNK polimeraze za vse štiri oligonukleotide, EGFR-37, EGFR-114, EGFR-143 in EGFR-207, smo opazili, da so bili pri 37 °C sintetizirani daljši produkti v primerjavi s produkti pri temperaturi 25 °C. Sklepamo, da to ni le posledica dejstva, da je 37 °C bolj optimalna temperatura za delovanje DNK polimeraze ampak tudi posledica bolj dinamičnih in manj stabilnih sekundarnih struktur oligonukleotidov, ki omogočajo DNK polimerazi sintezo daljših produktov. Zanimivo je, da opazimo jasen vzorec, po katerem struktura G-kvadrupleksa pri EGFR-37 in EGFR-207 močno ovira napredovanje DNK polimeraze med procesom podvajanja. Naši rezultati celo kažejo, da je EGFR-207 učinkovitejši pri zaustavljanju DNK polimeraze v primerjavi z EGFR-37, kjer je bil opažen tudi del celotnega produkta.

Medtem ko EGFR-114 ni uspešno zaustavil DNK polimeraze, čeprav lahko tvori strukturo G-kvadrupleksa. Zanimivo je, da se v testu zaustavitve DNK polimeraze obnaša bolj kot hairpin struktura (EGFR-143) kot pa G-kvadrupleks (EGFR-207 in EGFR-37). To je še posebej očitno pri zaznavi izboklin v osnovnih linijah elektroferogramov EGFR-143 in EGFR-114 ter tudi pri nastanku celotnih produktov. Verjetnost tvorbe hairpin strukture v dolgi DNK sekvenci EGFR-114 je razvidna tudi iz spektralnih podatkov 1H NMR, kjer smo opazili signale, značilne za Watson-Crickove GC in AT bazne pare v dolgi DNK sekvenci EGFR-114.

Naši rezultati jasno kažejo, da so strukture G-kvadrupleksa boljše pri zaustavljanju DNK polimeraze med procesom podvajanja v primerjavi z hairpin strukturami. Poleg tega pomembno vlogo pri zaustavljanju DNK polimeraze igra tudi stabilnost strukture G-kvadrupleksa. EGFR-207, ki vsebuje najdaljše zankaste regije in najširše G-trakte med štirimi oligonukleotidi, je najučinkovitejši pri zaustavljanju DNK polimeraze. Ta strukturna analiza nam omogoča globlje razumevanje celotne konformacijske ureditve promotorja EGFR.

10. Zaključek

V raziskovalni nalogi smo preizkusili zmožnost G-kvadrupleksnih in “hairpin” struktur, ki jih tvorijo štiri z gvaninom bogate sekvence promotorske regije EGFR gena, da ustavijo proces podvajanja DNK vijačnice. Naši rezultati so razkrili, da DNK polimeraza začne postopek sintetiziranja komplementarnih oligonukleotidov, vendar se ustavi, ko pride do specifičnih G-traktov kjer se tvorijo G-kvadrupleksi. Medtem ko lažje razreši “hairpin” strukture in tvori celoten končni produkt. Glede na rezultate lahko potrdimo našo hipotezo, da so G-kvadrupleksi sposobni ustaviti DNK replikacijo.

Izmed štirih testiranih oligonukleotidov, najbolje ustavlja DNK polimerazo ta, ki ima najdaljše regije zank in najširše G-trakte. To se dobro sklada z že obstoječimi raziskavami, ki kažejo, da so G-kvadrupleksi vpleteni v regulacijo različnih celičnih procesov.

Zaradi povečanega števila vrhov na elektroferogramih vidnih pri temperaturi 37°C in zamaknjenem ustavljanju duplikacije lahko potrdimo tudi drugo hipotezo, saj so G-kvadrupleksi manj stabilni pri višji temperaturi (37 °C) kot pri manjši temperaturi (25°C). Reakcija pri višji temperaturi se je ustavila na kasnejšem G-traktu kot pri nižji temperaturi in DNK polimeraza je lahko sintetizirala daljše produkte

Praktične posledice našega dela so potencialni razvoj inovativnega načina zdravljenja raka. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da so G-kvadrupleksne strukture sposobne vplivati na procese podvojevanja DNK vijačnice. Z ustavljanjem reakcij encimov, ki obdelujejo DNK lahko G-kvadrupleksi potencialno nadzorujejo izražanje genov in igrajo pomembno vlogo pri novem načinu zdravljenja raka. Tak drugačen pristop bi lahko tekmoval z trenutnimi načini zdravljenja in se soočil z problemi specifičnosti in razvite odpornosti na terapije. Strukturna analiza raziskave nam poda globlje razumevanje konformacijskega zlaganja EGFR promotorja in bo primeren začetek za racionalno oblikovanje ligandov po meri, ki bodo modulirali izražanje EGFR gena. Prav tako je vredno razširiti znanje o sekvencah, ki potencialno tvorijo G-kvadruplekse v genih, ki so vključeni v razvoj raka. Nadaljne raziskave G-kvadrupleksnih struktur povezanih z rakom so ključne za odkritje in uporabo njihovega polnega potenciala.

11. Viri

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660
2. Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, *01*(02), i–iv. https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2
3. Doll, R., & Pető, R. (1981). The Causes of Cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *66*(6), 1192–1308. https://doi.org/10.1093/jnci/66.6.1192
4. Popescu, R., Schäfer, R., Califano, R., Eckert, R., Coleman, R. E., Jy, D., Cervantes, A., Casali, P. G., Sessa, C., Van Cutsem, É., De Vries, E. G., Pavlidis, N., Fumasoli, K., Wörmann, B., Samonigg, H., Cascinu, S., Hernández, J. J. C., Howard, A., Ciardiello, F., . . . Piccart, M. (2014). The current and future role of the medical oncologist in the professional care for cancer patients: a position paper by the European Society for Medical Oncology (ESMO). *Annals of Oncology*, *25*(1), 9–15. https://doi.org/10.1093/annonc/mdt522
5. Liu, Y., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., Chen, J., Bian, Y., Xia, Y., Yang, M., Zheng, K., Wang, K., & Kong, L. (2023). Structure of the Major G-Quadruplex in the Human EGFR Oncogene Promoter Adopts a Unique Folding Topology with a Distinctive Snap-Back Loop. *Journal of the American Chemical Society*, *145*(29), 16228–16237. https://doi.org/10.1021/jacs.3c05214
6. Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany*, *91*(3), 401. https://doi.org/10.1093/aob/mcg023
7. Watson, J. D., & Crick, F. (1953). THE STRUCTURE OF DNK. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *18*(0), 123–131. https://doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020
8. Irene Bessi, I.B. 2016. *NMR investigations of G-quadruplex structures.* Department of biochemistry, chemistry and pharmacy at Johann Wolfgang Goethe University
9. Jissy, A. K., & Datta, A. (2013). Design and applications of noncanonical DNK base pairs. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *5*(1), 154–166. https://doi.org/10.1021/jz402352d
10. Chagin VO, Stear JH, Cardoso MC. Organization of DNK replication. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Apr;2(4): a000737. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000737.
11. Jarillo J, Ibarra B, Cao-García FJ (2021). "DNK replication: *In vitro* single-molecule manipulation data analysis and models". *Computational and Structural Biotechnology Journal*. **19**: 3765–3778. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.032
12. Greco, M. L., Kotar, A., Rigo, R., Cristofari, C., Plavec, J., & Sissi, C. (2017). Coexistence of two main folded G-quadruplexes within a single G-rich domain in the EGFR promoter. *Nucleic Acids Research*, *45*(17), 10132–10142. https://doi.org/10.1093/nar/gkx678
13. Hughes, R. A., & Ellington, A. D. (2017). Synthetic DNK synthesis and assembly: Putting the synthetic in synthetic biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(1), a023812. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023812
14. Thermo Scientific. DNK Concentration Measurement (Protocol for Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) v1. 2016. available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf
15. Atta-Ur-Rahman. (1986). Nuclear magnetic resonance. In *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4894-1
16. Altria, K. D. (1995). Capillary Electrophoresis Guidebook. In *Humana Press eBooks*. https://doi.org/10.1385/0896033155
17. Zhou J, Fleming AM, Averill AM, Burrows CJ, Wallace SS: The NEIL glycosylases remove oxidized guanine lesions from telomeric and promoter quadruplex DNK structures. Nucleic Acids Res 2015; 43 (8): 4039-4054
18. Glen research. (2018). Products for DNK Research User Guide to Glen-Pak™ Purification. VA, USA, available at: https://www.glenresearch.com/media/folio3/productattachments/application_guides/glen-pak_2022_2.pdf
19. Haley, J. D., Whittle, N., Bennet, P., Kinchington, D., Ullrich, A., & Waterfield, M. D. (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *PubMed*, *1*(4), 375–396. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3329716
20. Wheeler R. 2007. B-DNK. Wikimedia Commons. Accessed 12.Feb.2024. Available at: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A-DNK,_B-DNK_and_Z-DNK.png
21. Unknown author, 2009, Synthetic cycle in preparation of oligonucleotides by phosphoramidite method. Wikimedia Commons. Accessed 15.Feb.2024. Available at: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=dna+synthesis&title=Special:MediaSearch&go=Go&type=image