

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**„Deoksyrybozomy aktywne w obecności jonów kadmu
oraz w środowisku o niskiej wartości pH otrzymane
metodą selekcji *in vitro*”**

Aleksandra Kasprowicz

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii RNA
pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Ciesiołki

Poznań 2015

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu promotorowi
Panu prof. dr hab. Jerzemu Ciesiolce,
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę,
serdeczność i okazaną życzliwość*

*Wszystkim Współpracownikom
z Zakładu Biochemii RNA*

Dziękuję za ciepłą, przyjazną atmosferę oraz okazaną pomoc

*Pracę dedykuję osobom najbliższym memu sercu
Mojej Rodzinie*

*Tato,
dziękuję za niesłabnącą motywację
oraz za wiarę w moje możliwości*

*Dziękuję także Dawidowi
za Jego nieocenione wsparcie*

Praca została sfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu BioMed – „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” (POIG.01.01.02-02-003/08) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

**W trakcie wykonywania pracy doktorskiej brałam udział w realizacji
następujących projektów badawczych:**

1. Projekt „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” Nr POIG 01.01.02-02-003/08, finansowany ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Temat: Modułacja aktywności katalitycznej RNA. Rybozomy HDV jako potencjalny cel terapii przeciwwirusowej oraz użyteczne biosensory. Kierownik tematu: prof. dr hab. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk/prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka.
2. Projekt NCN Nr 2013/09/B/NZ1/01884 Temat: Rola regionów niekodujących 5'mRNA genu p53 syntetyzowanych z różnych promotorów transkrypcyjnych i wykorzystujących alternatywne miejsca inicjacji translacji w generowaniu izoform białka p53. Kierownik projektu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka.
3. Grant badawczy na realizację zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2013 (finansowanie MNiSzW). Temat: „Charakterystyka właściwości wariantów sekwencyjnych DNAzymów pH-zależnych”. Kierownik projektu: mgr inż. Aleksandra Kasproicz.
4. Grant badawczy na realizację zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2015 (finansowanie MNiSzW). Temat: „Deoksyrybozomy aktywne w obecności jonów kadmu oraz w środowisku o niskiej wartości pH otrzymane metodą selekcji *in vitro*”. Kierownik projektu: mgr inż. Aleksandra Kasproicz.

**Wyniki badań, w których uczestniczyłam w trakcie realizacji pracy doktorskiej,
opublikowane zostały w następujących artykułach:**

1. Milena Szafraniec, Kamila Stokowa-Sołtys, Justyna Nagaj, **Aleksandra Kasprowicz**, Jan Wrzesiński, Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, Jerzy Ciesiołka: *Capreomycin and hygromycin B modulate the catalytic activity of the delta ribozyme in a manner that depends on the protonation and complexation with Cu²⁺ ions of these antibiotics*. Dalton Transactions, 2012, 41, 9728–9736.
2. Jan Wrzesiński, Leszek Błaszczyk, Magdalena Wrońska, **Aleksandra Kasprowicz**, Kamila Stokowa-Sołtys, Justyna Nagaj, Milena Szafraniec, Tadeusz Kuliński, Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, Jerzy Ciesiołka: *Mapping the interactions of selected antibiotics and their Cu²⁺ complexes with the antigenomic delta ribozyme*. FEBS Journal, 2013, 280, 2652–2664.
3. Jerzy Ciesiołka, Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, Jan Wrzesiński, Justyna Nagaj, Kamila Stokowa-Sołtys, **Aleksandra Kasprowicz**, Leszek Błaszczyk, Wojciech Szczepanik: *Antibiotic bacitracin induces hydrolytic degradation of nucleic acids*. BBA-General Subjects, 2014, 1840, 1782–1789.
4. **Aleksandra Kasprowicz**, Kamila Stokowa-Sołtys, Jan Wrzesiński, Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, Jerzy Ciesiołka: *In vitro selection of deoxyribozymes active with Cd²⁺ ions resulting in variants of DNAzyme 8-17*. Dalton Transactions, 2015, 44, 8138–8149.
5. Kamila Stokowa-Sołtys, **Aleksandra Kasprowicz**, Jan Wrzesiński, Jerzy Ciesiołka, Nicola Gaggelli, Elena Gaggelli, Gianni Valensin, Małgorzata Jeżowska-Bojczuk: *Impact of Cu²⁺ ions on the structure of colistin and nucleic acids degradation properties of the antibiotic*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2015, doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.05.011
6. **Aleksandra Kasprowicz**, Aleksandra Kempieńska, Jan Wrzesiński, Jerzy Ciesiołka: *Application of fluorescently labeled trans-acting antigenomic HDV ribozyme to monitor antibiotic-RNA interactions*, 2015, praca wysłana do redakcji.

Zgłoszenie patentowe:

Zgłoszenie patentowe w trybie międzynarodowym PCT/IB2012/055059: *The use of the antibiotic bacitracin in the hydrolytic degradation of RNA*. Autorzy: J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzeński, J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk, W. Szczepanik.

Doniesienia konferencyjne:

J. Nagaj, J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzeński, K. Stokowa-Sołtys, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk: *Hydrolytyczna degradacja RNA przez bacytracynę*. Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 3–4.12.2011, Wrocław, Polska.

J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzeński, J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk, W. Szczepanik: *Antibiotic bacitracin which is isolated from *Bacillus subtilis* var Tracy induces degradation of nucleic acids*. The 2nd European Conference on Antimicrobial Resistance and Infection Prevention, 4–5.10.2012, Wilno, Litwa.

J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzeński, J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk, W. Szczepanik: *Antibiotic bacitracin induces degradation of nucleic acids*. International Conference, Structural Biology of Plants and Microbes, 22.05.2013, IBCH PAN Poznań, Polska; BioTechnologia, 2013, vol. 94(1), p.72.

J. Nagaj, **A. Kasprowicz**, J. Ciesiołka and M. Jeżowska-Bojczuk: *Coordination Pattern and Activity of the Copper(II) Complexes with Guanosine-derived Antiviral Drugs*. XXIV International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, 2–7.06.2013, Smolenice, Słowacja. *Recent Developments In Coordination, Bioinorganic And Applied Inorganic Chemistry, Book of Abstracts*, Press of Slovak University of Technology, Bratislava 2013.

J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesiński, J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk, W. Szczepanik: *Antibiotic bacitracin induces degradation of nucleic acids*. BIOCONNECT 2013 - Facilitating dialogue between business and academia, 15–16.05.2013 Poznań, Polska.

J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesiński, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, **A. Kasprowicz**, L. Błaszczuk, W. Szczepanik: *The use of the antibiotic bacitracin in the degradation of unwanted RNA*. Unusual ability of this drug to hydrolytic degradation of the RNA. 17th Moscow International Salon of Inventions and Innovation Technologies «Archimedes», 1–4.04.2014, Moskwa, Rosja.

K. Stokowa-Sołtys, N. Gaggelli, J. Ciesiołka, J. Wrzesiński, **A. Kasprowicz**, M. Jeżowska-Bojczuk: *Wpływ wiązania jonów miedzi(II) na strukturę kolistyny oraz zdolność degradacji kwasów nukleinowych przez ten antybiotyk*. II Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej, 7–10.09.2014, Wrocław, Polska.

Spis treści

Stosowane skróty	13
Streszczenie	15
Abstract	17
1. Wprowadzenie i cel pracy	19
2. Wstęp literaturowy	22
2.1. Cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego jako syntetyczne enzymy	22
2.2. Generowanie katalitycznych cząsteczek DNA – metoda selekcji <i>in vitro</i>	23
2.2.1. Oligonukleotydowe biblioteki kombinatoryczne	24
2.2.2. Selekcja i amplifikacja z wykorzystaniem bibliotek oligonukleotydowych	27
2.3. Deoksyrybozomy – katalizatory wielu reakcji chemicznych	29
2.3.1. DNAzomy katalizujące reakcję cięcia RNA	31
2.3.1.1. Jony metali, a aktywność katalityczna deoksyrybozymów	33
2.3.1.2. DNAzomy 8-17 i 10-23	35
2.4. DNAzomy vs. rybozomy i enzymy białkowe	40
2.5. Możliwości aplikacyjne deoksyrybozymów <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	41
2.5.1. DNAzomy jako selektywne biosensory	44
2.5.1.1. Detekcja związków niskocząsteczkowych	45
2.5.1.2. Detekcja modyfikacji chemicznych w cząsteczkach RNA	46
2.5.1.3. Wykrywanie jonów metali – fluorescencyjny system detekcji	46
2.5.1.4. DNAzomy metalozależne – kolorymetryczny system detekcji	51
2.5.2. DNAzomy – potencjalne terapeutyki	52
3. Wyniki	56
3.1. Otrzymywanie DNAzymów pH-zależnych metodą selekcji <i>in vitro</i>	56
3.1.1. Otrzymywanie biblioteki kombinatorycznej DNAzymów	56
3.1.2. Procedura selekcji DNAzymów prowadzona w obecności jonów Cd ²⁺	57
3.1.3. Identyfikacja otrzymanych wariantów DNAzymów, które okazały się aktywne w niskim pH środowiska	62
3.2. DNAzomy pH-zależne – charakterystyka wybranych wariantów sekwencyjnych działających w układzie jednocząsteczkowym (<i>in cis</i>)	68
3.2.1. Profil pH wybranych DNAzymów i ich specyficzność wobec jonów metali	68
3.2.2. Struktura drugorzędowa DNAzymu #15 i DNAzymu #27	73
3.3. Właściwości katalityczne wybranych wariantów DNAzymów aktywnych w niskim pH środowiska skróconych z końca 5' i 3'	78

3.3.1.	DNAzyny działające w układzie jednocząsteczkowym (<i>in cis</i>).....	78
3.3.1.1.	Określanie profilu pH wybranych DNAzymów.....	78
3.3.1.2.	Stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia DNAzymów	81
3.3.1.3.	Zmiany strukturalne w cząsteczkach DNAzymów obserwowane za pomocą spektroskopii UV i CD.....	83
3.3.2.	DNAzyny działające w układzie dwucząsteczkowym (<i>in trans</i>).....	88
3.4.	DNAzyny aktywne w obecności jonów Cd²⁺	90
3.4.1.	Synteza biblioteki kombinatorycznej	90
3.4.2.	Procedura selekcji <i>in vitro</i> i identyfikacja otrzymanych wariantów DNAzymów	91
3.5.	Właściwości katalityczne DNAzymów Cd²⁺-zależnych	99
3.6.	Przewidywanie struktury drugorzędowej DNAzemu 1/VII	102
3.7.	Charakterystyka wariantów DNAzymów metalozależnych działających w układzie jednocząsteczkowym (<i>in cis</i>) skróconych z końca 5' i 3'	107
3.7.1.	Preferencje DNAzymów wobec wybranych jonów metali dwuwartościowych	107
3.7.2.	Stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia wybranych wariantów DNAzymów w obecności jonów Cd ²⁺ , Zn ²⁺ i Mn ²⁺	111
3.7.3.	Badania spektroskopowe DNAzemu 1/VIIWS.....	114
3.7.4.	Ukierunkowana mutageneza, a zmieniona aktywność katalityczna wybranych DNAzymów	119
3.8.	Aktywność katalityczna DNAzymów metalozależnych działających w układzie dwucząsteczkowym (<i>in trans</i>)	124
4.	Dyskusja wyników	128
4.1.	Dlaczego deoksyrybozymy? Dlaczego jony Cd²⁺?	128
4.2.	W poszukiwaniu nowych DNAzymów – selekcja <i>in vitro</i>	129
4.3.	Lepszy wygrywa – DNAzyny pH-zależne	132
4.3.1.	Kataliza bez udziału jonów metali	133
4.3.2.	Struktura DNAzymów pH-zależnych, a mechanizm ich działania.....	136
4.4.	DNAzyny Cd²⁺-zależne	139
4.4.1.	Warianty DNAzemu 8-17, czyli skutek „ewolucji w próbówce”	139
4.4.2.	Jony metali dwuwartościowych, a aktywność katalityczna DNAzymów.....	143
4.4.3.	Zmiany w poziomie aktywności katalitycznej DNAzymów, czyli konsekwencje ukierunkowanej mutagenezy.....	145
5.	Podsumowanie	150
5.1.	DNAzyny pH-zależne	150
5.2.	DNAzyny Cd²⁺-zależne	152
6.	Materiały i metody	156

6.1.	Aparatura	156
6.2.	Odczynniki i materiały	156
6.2.1.	Związki promieniotwórcze.....	157
6.2.2.	Enzymy	157
6.2.3.	Zestawy odczynników.....	157
6.2.4.	Plazmidy.....	157
6.2.5.	Szczepy bakteryjne	157
6.2.6.	Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek	157
6.2.7.	Oligonukleotydy.....	157
6.2.8.	Bufory, roztwory i pożywki	159
6.3.	Metody standardowe	160
6.3.1.	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	160
6.3.2.	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	161
6.3.3.	Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego	161
6.3.4.	Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu	161
6.3.5.	Oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych	162
6.3.6.	Ekstrakcja fenolem.....	162
6.4.	Metody stosowane w badaniach własnych	162
6.4.1.	Otrzymywanie DNAzymów przecinających łańcuch RNA.....	163
6.4.1.1.	Konstrukcja wyjściowej biblioteki kombinatorycznej	163
6.4.1.2.	Selekcja <i>in vitro</i> DNAzymów pH-zależnych	164
6.4.1.3.	Selekcja <i>in vitro</i> DNAzymów metalozależnych	166
6.4.2.	Klonowanie matrycowej puli dsDNA kodującej DNAzymy	168
6.4.3.	Transformacja komórek <i>E. coli</i>	168
6.4.4.	Synteza wariantów	169
6.4.5.	Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ³² P	170
6.4.6.	Określanie struktury drugorzędowej DNAzymów	170
6.4.6.1.	Modyfikacja chemiczna DNA w pozycji N3 reszt cytozyny za pomocą siarczanu dimetylu	171
6.4.6.2.	Modyfikacja chemiczna DNA w pozycji N7 reszt guaniny za pomocą siarczanu dimetylu	171
6.4.6.3.	Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej DNA.....	172
6.4.6.4.	Przewidywanie struktury drugorzędowej DNA <i>in silico</i>	172
6.4.7.	Wyznaczanie aktywności katalitycznej DNAzymów	172
6.4.7.1.	Reakcja cięcia katalitycznego DNAzymów pH-zależnych.....	173

6.4.7.2. Reakcja cięcia katalitycznego DNAzymów metalozależnych	174
6.4.7.3. Analiza produktów reakcji cięcia.....	176
6.4.8. Badania spektroskopowe DNAzymów – spektroskopia CD i UV-vis.....	176
6.4.8.1. DNAzymy pH-zależne	176
6.4.8.2. DNAzymy metalozależne	177
7. Literatura	178

Stosowane skróty

ATP – adenozyntrifosforan

CMCT – 1-cyclohexyl-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluene sulfonate

cpm – zliczenia rozpadów promieniotwórczych na minutę (ang. *count per minute*)

DMS – siarczan dimetylu

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dCTP – trifosforan deoksycytydyny

dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

dsDNA – dwuniciowa cząsteczka DNA (ang. *double-stranded DNA*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

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

K_d – stała dysocjacji

K_M – stała Michaelisa-Menten

k_{kat} – stała szybkości katalizy

k_{obs} – obserwowana stała szybkości reakcji

kpz – tysiące par zasad

MES – ang. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*

mRNA – RNA matrycowy (ang. *messenger RNA*)

nt – nukleotyd

OD – jednostka optyczna

PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

pH – ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych

pK_a – ujemny logarytm ze stałej równowagi reakcji dysocjacji

pre-mRNA – mRNA prekursorowy (ang. *precursor mRNA*)

pz – pary zasad

RNA – kwas rybonukleinowy

rpm – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)

SELEX – ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*

SHAPE – acylacja grup 2'-hydroksyloowych analizowana za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)

ssDNA – jednoniciowa cząsteczka DNA (ang. *single-stranded DNA*)

Tris-HCl – chlorowodorek trishydroksymetyloaminometanu

XC – cyjanol ksylenowy

Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest katalitycznym cząsteczkom DNA – DNAzymom, które podobnie jak enzymy białkowe, wykazują właściwości katalityczne w szeregu reakcji biochemicznych. Jak dotychczas nie zidentyfikowano naturalnie występujących DNAzymów, a wszystkie dotychczas poznane otrzymano na drodze selekcji *in vitro*. DNAzymany znalazły swoje zastosowanie w medycynie jako potencjalne terapeutyki, a także w biochemii i biotechnologii jako specyficzne narzędzia molekularne. Obecnie, największy obszar ich wykorzystania stanowi analityka ilościowa i jakościowa. Ze względu na to, że większość DNAzymów do swojej aktywności katalitycznej wymaga kofaktorów w postaci jonów metali dwuwartościowych, z powodzeniem wykorzystuje się je do konstrukcji biosensorów wykrywających jony metali.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie DNAzymów aktywnych w obecności jonów kadmu. Kadm jest zaliczany do głównych zanieczyszczeń chemicznych środowiska. Jest pierwiastkiem o dużej toksyczności, nawet w bardzo małych stężeniach w organizmie. Ze względu na wysoką toksyczność stanowi on poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Do poszukiwania DNAzymów przecinających wiązanie fosfodiesterowe RNA w obecności jonów kadmu zastosowana została metoda selekcji *in vitro* z wykorzystaniem biblioteki kombinatorycznej oligonukleotydów z 23-nukleotydowym regionem typu *random*.

Niespodziewanie, w wyniku pierwszej selekcji otrzymano DNAzymany aktywne w niskim pH środowiska, z optimum działania przy pH 4,0–4,5. Eksperymenty selekcji *in vitro* związane są zawsze z ryzykiem, że nie otrzymamy wariantów o pożądanych właściwościach lub otrzymamy warianty o szerszym spektrum aktywności niż przez nas zakładane. Jak dotychczas, większość doniesień literaturowych odnoszących się do katalitycznych cząsteczek DNA dotyczy wariantów, które do aktywności katalitycznej wymagają kofaktorów w postaci jonów metali dwuwartościowych oraz fizjologicznego pH środowiska. Z uwagi na interesujące właściwości otrzymanych DNAzymów pH-zależnych, przeprowadzono szereg doświadczeń pozwalających na szczegółową charakterystykę ich właściwości katalitycznych. Co ciekawe, otrzymane DNAzymany do aktywności katalitycznej nie wymagają obecności jonów Cd^{2+} ani innych jonów metali. Wyniki przeprowadzonych badań spektroskopowych techniką CD i UV-vis sugerują, że w środowisku o pH 4,0–4,5 dochodzi do protonacji grup funkcyjnych nukleotydów tworzących centrum katalityczne DNAzymów oraz zwinięcia cząsteczek w odpowiednią strukturę drugorzędową, umożliwiającą katalizę reakcji cięcia. Jest

wielce prawdopodobne, że to zasady azotowe łańcucha fosfo-cukrowego deoksyrybozów ulegając protonacji, odgrywają zarówno rolę strukturalną, jak i uczestniczą bezpośrednio w katalizie. W oparciu o wyniki mapowania struktur drugorzędowych DNAzymów pH-zależnych za pomocą nukleazy S1 i siarczanu dimetylu zidentyfikowano elementy DNAzymów o zasadniczym znaczeniu dla reakcji katalizy. Wykazano, iż dystalne fragmenty z końca 5' i 3' cząsteczek, nie wpływają na ich właściwości katalityczne. Zaprojektowano również aktywne katalitycznie warianty pH-zależne działające w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*).

W wyniku drugiego eksperymentu selekcji *in vitro* uzyskano DNAzimy aktywne w obecności jonów Cd^{2+} , niemniej jednak otrzymane warianty wykazują szersze spektrum specyficzności i są również aktywne wobec niektórych innych jonów metali. Najwyższą aktywność katalityczną wykazują w obecności jonów Cd^{2+} , a niższą w obecności jonów Co^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} . Sugeruje to, że tworzenie kompleksu jon-DNAzym nie wymaga wysoce specyficznego sposobu koordynacji jonu metalu. Na podstawie wyników z chemicznego i enzymatycznego mapowania struktury drugorzędowej jednego z wybranych DNAzymów oraz porównania sekwencji wszystkich otrzymanych wariantów stwierdzono, iż należą one do DNAzymów typu 8-17. Do zachowania wysokiej aktywności katalitycznej otrzymane DNAzimy wymagają temperatury 25°C , co może być związane z odpowiednim zwinięciem cząsteczek w katalitycznie aktywną konformację. Badania z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenyzy wykazały, że obecność zasady purynowej w pozycji 12 regionu katalitycznego jest niezbędna dla zachowania aktywności katalitycznej. Natomiast skład nukleotydowy trzonu spinki obecnej w regionie katalitycznym wpływa na poziom aktywności katalitycznej otrzymanych DNAzymów oraz ich preferencje wobec jonów metali. Podjęto próbę uzyskania DNAzymów Cd^{2+} -zależnych działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*), niemniej jednak żaden spośród 6 zaprojektowanych wariantów nie wykazywał aktywności katalitycznej.

Abstract

This dissertation is devoted to DNAzymes, catalytic DNA molecules, which – similarly to protein-based enzymes – have the ability to catalyze many biochemical reactions. So far, no DNAzymes have been found in nature. Those which are known by now have been obtained using *in vitro* selection. DNAzymes are applied in medicine as potential therapeutics as well as in biotechnology as specific molecular tools. Nowadays, they are most commonly applied in qualitative and quantitative analysis. Since most DNAzymes require cofactors in the form of divalent metal ions for their catalytic activity, they have been successfully used for construction of biosensors which are capable of metal ions detection.

The aim of this thesis was to obtain DNAzymes which are catalytically active in the presence of cadmium ions. Cadmium is considered to be one of the main chemical pollutants in the environment. It is extremely toxic to living organisms, even at very low concentrations. Due to its high toxicity cadmium poses a serious threat to the health of humans and animals. Search for DNAzymes which are able to catalyze cleavage of the RNA phosphodiester bond in the presence of Cd^{2+} ions was performed by *in vitro* selection using the oligonucleotides combinatorial library with a 23-nucleotide random region.

Unexpectedly, the first selection yielded DNAzymes active in a low pH environment with the optimum activity at pH 4.0–4.5. *In vitro* selection experiments are always associated with a risk of not obtaining variants with the expected characteristics or obtaining variants with a broader spectrum of activity than we originally assumed. So far, a majority of literature reports refer to variants of catalytic DNA molecules which require cofactors in the form of divalent metal ions and a physiological pH environment. In view of the interesting features of the selected pH-dependent DNAzymes, a series of experiments were performed to better characterize their catalytic properties. Interestingly, the selected DNAzymes require neither Cd^{2+} ions nor other metal ions for their activity. The results of spectroscopic studies using CD and UV-vis spectroscopy suggest that in an environment of pH 4.0–4.5 there occur protonation of functional groups of nucleotides involved in the forming of the DNAzymes catalytic centre and the folding of molecules into an appropriate secondary structure. It is highly probable that nitrogen bases of the sugar-phosphate backbone of deoxyribozymes which undergo protonation do not only play a structural role but also directly participate in the catalysis. Based on the results of the secondary structures probing of pH-dependent DNAzymes by nuclease S1 and dimethyl sulfate, essential catalytic elements were defined.

Additionally, it was shown that the 5'- and 3'-terminal regions of these molecules have no effect on their catalytic properties. Catalytically active pH-dependent *trans*-acting variants were also designed.

As a result of the second experiment of *in vitro* selection, DNazymes active in the presence Cd^{2+} ions were obtained. However, the obtained variants showed broader specificity and were active also with other metal ions. They exhibited the highest catalytic activity in the presence of Cd^{2+} ions and lower in the presence of Co^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} ions. This suggests that forming of an ion–DNAzyme complex does not require a highly specific coordination mode of metal ions. Based on the results of the chemical and enzymatic mapping of the secondary structure of one of the selected DNazymes and a comparison of the sequence of all the obtained variants, it was found that they belong to the 8-17 type DNazymes. In order to maintain high catalytic activity, the obtained DNazymes required a temperature of 25°C, which may be needed to ensure the proper folding of the molecules into a catalytically active structure. Studies using directed mutagenesis have shown that the presence of a purine residue in position 12 of the catalytic core is essential for the catalytic activity. On the other hand, the nucleotide composition of the hairpin stem which is present in the catalytic region can affect the catalytic activity level of the DNazymes as well as their metal ions preferences. An attempt was made at obtaining Cd^{2+} -dependent *trans*-acting DNazymes, however none of the six engineered variants showed catalytic activity.

1. Wprowadzenie i cel pracy

Jeszcze 35 lat temu uważano, że wszystkie reakcje w obrębie żywej komórki zachodzą wyłącznie dzięki biokatalizatorom białkowym. Przełomem było odkrycie w drugiej połowie lat 80. ubiegłego wieku cząsteczek RNA – rybozymów, które mogą pełnić rolę biokatalizatorów bez konieczności udziału enzymów białkowych [1–2]. Natomiast w 1994 roku naukowcy Breaker i Joyce [3] otrzymali na drodze selekcji *in vitro* pierwszy deoksyrybozym (DNAzym), udowadniając tym samym, że cząsteczki DNA również mogą wykazywać właściwości katalityczne. Jak dotychczas nie zidentyfikowano naturalnie występujących DNAzymów. Wszystkie poznane katalityczne cząsteczki DNA otrzymano na drodze selekcji *in vitro* [4]. DNAzyny wykazują aktywność katalityczną w wielu reakcjach chemicznych, między innymi uczestniczą w: cięciu RNA lub DNA [5–9], ligacji RNA i DNA [10], fosforylacji DNA [11], metylacji porfiryn [12] czy tworzeniu wiązań węgiel-węgiel [13]. Większość katalitycznych cząsteczek DNA do swojej aktywności wymaga obecności kofaktorów w postaci jonów metali oraz fizjologicznego pH środowiska [14]. Odkrycie DNAzymów dało początek nadziejom na ich wykorzystanie w medycynie jako potencjalnych terapeutyków [15–17], a także w biotechnologii jako specyficznych narzędzi molekularnych [18–19] czy nowoczesnych biosensorów [20]. DNAzyny są częściej wykorzystywane do konstrukcji biosensorów niż rybozimy, gdyż są one znacznie bardziej odporne na niepożądaną degradację nukleolityczną czy hydrolizę zachodzącą pod wpływem działania czynników środowiskowych, ponadto mogą ulegać wielokrotnej denaturacji i renaturacji bez utraty aktywności katalitycznej [21]. W szczególności, z sukcesem zastosowano dotychczas DNAzyny do konstrukcji biosensorów wykrywających jony niektórych metali, np. jony Pb^{2+} , Cu^{2+} czy UO_2^{2+} [22].

Katalityczne kwasy nukleinowe – rybozimy oraz DNAzyny są głównym obszarem moich zainteresowań naukowych. Niniejszą pracę doktorską wykonałam w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN przy współpracy z Zespołem Chemii Bionieorganicznej i Biomedycyny Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Badania prowadziłam w ramach projektu badawczego „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” (nr projektu POIG 01.01.02-02-003/08), finansowanego ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. W Zakładzie Biochemii RNA IChB PAN od szeregu lat prowadzone są badania strukturalno-funkcjonalne cząsteczek RNA oraz badania oddziaływań RNA z jonami metali dwuwartościowych oraz innymi ligandami

niskocząsteczkowymi, między innymi z antybiotykami. Wcześniej prowadzone w Zakładzie prace nad katalitycznymi kwasami nukleinowymi m. in. nad rybozymbem HDV, a także doświadczenie w stosowaniu metody selekcji *in vitro*, umożliwiło mi podjęcie się w ramach pracy doktorskiej otrzymania nowych wariantów katalitycznych kwasów nukleinowych o pożądanych właściwościach.

Przystępując do realizacji niniejszej pracy postanowiłam otrzymać DNAzimy aktywne w obecności jonów Cd^{2+} i przeprowadzić dokładną charakterystykę ich właściwości katalitycznych. Kadm jest zaliczany do głównych zanieczyszczeń chemicznych środowiska. Jest pierwiastkiem o dużej toksyczności, nawet w bardzo małych stężeniach w organizmie. Ze względu na wysoką toksyczność stanowi on poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt [23]. W trakcie realizacji pracy, okazało się, że w wyniku pierwszego eksperymentu selekcji *in vitro* otrzymałam DNAzimy o nieoczekiwanych właściwościach, mianowicie aktywne w środowisku o niskich wartościach pH. W wyniku drugiej selekcji uzyskałam natomiast DNAzimy aktywne w obecności jonów Cd^{2+} . Przeprowadzona, szczegółowa charakterystyka właściwości biochemicznych oraz struktury i funkcjonalności wybranych wariantów z obydwu grup, metalozależnych oraz pH-zależnych, może posłużyć w przyszłości ich praktycznemu zastosowaniu jako modułów sekwencyjnych w konstrukcji nowoczesnych biosensorów.

Założony cel pracy realizowałam w następujących etapach:

1. Zaplanowanie syntezy biblioteki kombinatorycznej DNAzymów z regionem typu *random* o długości 23 nukleotydów, co odpowiada $0,7 \times 10^{13}$ różnych wariantów sekwencyjnych cząsteczek DNA.
2. Przeprowadzenie dwóch eksperymentów selekcji *in vitro* DNAzymów, w wyniku których otrzymano dwie wzbogacone biblioteki wariantów aktywnych w niskim pH środowiska oraz aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} .
3. Zbadanie aktywności katalitycznej kilkunastu DNAzymów z obydwóch eksperymentów selekcji w różnych warunkach pH oraz w obecności jonów Cd^{2+} i niektórych innych jonów metali dwuwartościowych.

4. Określenie struktury drugorzędowej wybranych DNAzymów z wykorzystaniem mapowania nukleazą S1 i siarczanem dimetylu oraz programu komputerowego do przewidywania struktur drugorzędowych *RNAstructure* 5.6.
5. Próba odpowiedzi na pytanie jak dalece można „upraszczać” cząsteczki otrzymanych DNAzymów, zachowując bądź poprawiając ich właściwości katalityczne. Skonstruowanie, na podstawie przewidzianej struktury drugorzędowej DNAzymów, ich skróconych wariantów poprzez usunięcie fragmentów sekwencji z końców 5' i 3' oraz określenie ich aktywności katalitycznej.
6. Scharakteryzowanie przebiegu kinetycznego reakcji przecinania się wybranych DNAzymów poprzez wyznaczenie stałych szybkości reakcji katalitycznego cięcia (k_{obs}) w różnych warunkach temperaturowych.
7. Przeprowadzenie badań spektroskopowych z wykorzystaniem techniki CD oraz UV-vis w celu monitorowania potencjalnych zmian konformacyjnych otrzymanych DNAzymów, zachodzących w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych oraz pod wpływem zmian pH środowiska.
8. Przygotowanie wariantów DNAzymów z mutacjami punktowymi w regionie katalitycznym, w celu zidentyfikowania elementów sekwencji wybranych DNAzymów o zasadniczym znaczeniu dla reakcji katalizy. Wyznaczenie ich aktywności w obecności jonów Cd^{2+} oraz wybranych innych jonów metali przejściowych.
9. Otrzymanie wariantów DNAzymów działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*), ważnych z punktu widzenia zastosowań praktycznych i zbadanie ich właściwości katalitycznych.

2. Wstęp literaturowy

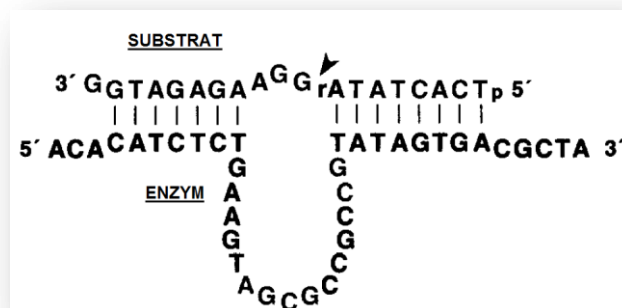
2.1. Cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego jako syntetyczne enzymy

Odkrycie cząsteczek kwasów nukleinowych (DNA i RNA), które oprócz przenoszenia informacji genetycznej, mogą podobnie jak enzymy białkowe brać udział w reakcjach biochemicznych jako katalizatory, otworzyło drzwi do nowego paradygmatu w chemii i biologii kwasów nukleinowych.

Cząsteczki RNA posiadające właściwości katalityczne zostały odkryte w latach 80. ubiegłego wieku przez Cech'a i Altman'a [1–2]. Prowadząc badania nad procesem splicingu, mające na celu wykrycie enzymu katalizującego wycinanie intronów RNA u jednokomórkowego eukarionta *Tetrahymena thermophila* Thomas Cech wykazał, że proces ten zachodzi bez udziału białek. Stanowiło to dowód na to, że cząsteczki RNA w specyficznych sytuacjach mogą wykazywać właściwości enzymantyczne [1]. Podobne wnioski wysnuł Sidney Altman podczas prowadzonych równoległe badań nad dojrzewaniem cząsteczek tRNA przy udziale RNazy P [2]. Cząsteczki kwasu rybonukleinowego o zdefiniowanej sekwencji i strukturze trzeciorzędowej zdolne do katalizowania określonych przemian chemicznych i biochemicznych określono mianem rybozymów. W kolejnych latach, biorąc pod uwagę szerokie spektrum reakcji katalizowanych przez RNA zaczęto zadawać sobie pytanie, czy cząsteczki DNA różniące się od cząsteczek RNA brakiem grupy 2'-hydroksylowej przy reszcie rybozy, mogą wykazywać podobne właściwości enzymatyczne. Występujące w komórkach żywych organizmów, cząsteczki DNA składają się z dwóch antyrównoległych nici tworzących strukturę dwuniciową helisy. Postać podwójnej helisy, jaką przyjmuje cząsteczka kwasu deoksyrybonukleinowego jest wysoce stabilną strukturą, niezwykle istotną dla fundamentalnej funkcji jaką cząsteczka ta pełni w komórce, czyli przechowywania i przenoszenia informacji genetycznej [24]. Jednak, czy helikalny dupleks DNA trwały termodynamicznie i relatywnie stabilny w komórce jest dobrym materiałem biologicznym mogącym pełnić funkcję biokatalizatora? Centra katalityczne enzymów muszą być „elastyczne”, aby odpowiednio związać cząsteczkę substratu, a tym samym zmniejszyć energię aktywacji reakcji [25]. Katalityczne cząsteczki RNA – rybozomy, zarówno te występujące w naturze [26–27] jak i otrzymane w laboratoriach [28–31], są jednoniciowymi cząsteczkami RNA. Cząsteczki RNA czy DNA w postaci jednoniciowej mogą posiadać w swojej strukturze różne motywy strukturalne np. motyw spinki do włosów, wewnętrzne wybrzuszenie jedno- bądź dwustronne czy pseudowęzły [32], które przyczyniają się do

tworzenia przez te cząsteczki bardziej złożonych struktur trzeciorzędowych decydujących o ich właściwościach katalitycznych. Co więcej, także inne, interesujące cząsteczki RNA, a także DNA – aptamery – to też jednoniciowe oligonukleotydy, wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania do ściśle określonych biomolekuł lub cząsteczek nieorganicznych [33– 35].

Wszelkie wątpliwości dotyczące możliwości wykazywania przez cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego właściwości katalitycznych zostały rozwiane w 1994 roku, kiedy to Breaker i Joyce [3] przy zastosowaniu metody selekcji *in vitro*, otrzymali pierwszą jednoniciową cząsteczkę DNA o takich właściwościach, określoną mianem deoksyrizozymu – DNAzemu.



Rysunek 1. DNAzym Pb^{2+} -zależny działający w układzie dwucząsteczkowym. Strzałka wskazuje miejsce katalitycznego cięcia, rA oznacza rybonukleotyd adeniny (na podstawie [3]).

Otrzymany 38-nukleotydowy DNAzym był zdolny do katalizowania reakcji cięcia pojedynczego wiązania rybonukleotydowego w obecności jonów Pb^{2+} . Centrum katalityczne DNAzemu stanowi 15-nukleotydowy fragment nie posiadający wyodrębnionych motywów strukturalnych, ograniczony z obydwu końców sekwencją odpowiadającą za rozpoznanie nici substratu (Rys. 1).

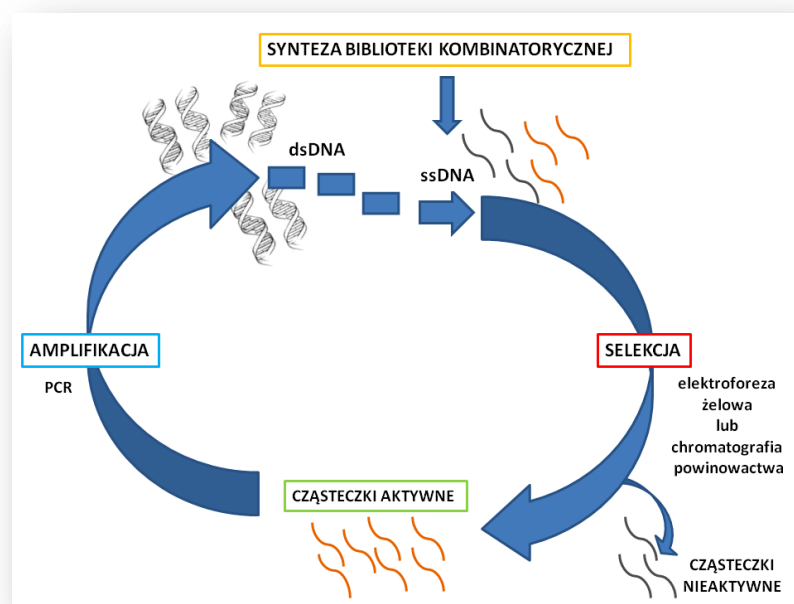
2.2. Generowanie katalitycznych cząsteczek DNA – metoda selekcji *in vitro*

Po odkryciu przez Breaker’a i Joyce’a deoksyrizozymu katalizującego reakcję cięcia wiązania fosfodiesterowego RNA w obecności jonów Pb^{2+} , wiele innych grup badawczych otrzymało szereg DNAzymów katalizujących różnorodne reakcje chemiczne [36]. Wszystkie otrzymane deoksyrizozymy uzyskano, wykorzystując do tego celu metodę selekcji *in vitro* (SELEX – ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Jak dotychczas, nie odkryto naturalnie występujących DNAzymów, w przeciwieństwie do rybozymów, które

występują zarówno w naturze np. rybozym HDV [37–39], *hammerhead* [40] czy *hairpin* [41], jak i które zostały wyselekcjonowane z syntetycznej puli oligonukleotydów np. rybozomy ulegające reakcji autoacylacji [42] czy też rybozomy biorące udział w metylacji porfiryń [43].

Metoda selekcji *in vitro* jest strategią badawczą, będącą przykładem zastosowań chemii kombinatorycznej [44–45]. Metodę opracowano w drugiej połowie lat osiemdziesiątych [33, 46–47] i z powodzeniem wykorzystano do badań cząsteczek kwasów nukleinowych, np. DNAzymów [3–7], wariantów rybozymów [48], aptazymów [49], aptamerów DNA [50–51] oraz aptamerów RNA [52].

Metoda selekcji *in vitro* polega na odseparowaniu spośród licznej puli cząsteczek biblioteki kombinatorycznej takich wariantów, które posiadają pożądane właściwości biochemiczne, w sposób analogiczny do naturalnych mechanizmów ewolucyjnych (Rys. 2) [44, 53].



Rysunek 2. Poglądowy schemat przedstawiający zastosowanie procesu selekcji *in vitro* do poszukiwania deoksyrybozymów z biblioteki jednociowych cząsteczek DNA (na podstawie [25]).

2.2.1. Oligonukleotydowe biblioteki kombinatoryczne

Początkowy, a zarazem kluczowy etap procesu selekcji *in vitro*, polega na skonstruowaniu na drodze syntezy chemicznej odpowiednio licznej biblioteki kombinatorycznej, w której obecne są warianty o pożądanych właściwościach. O liczbie wariantów tworzących daną bibliotekę decyduje liczba nukleotydów tworzących region o sekwencji zdegenerowanej, który określany jest także jako tzw. region *random*. Region

random jest to fragment sekwencji, w którym w każdej pozycji łańcucha oligonukleotydowego obecne są wszystkie cztery możliwe nukleotydy, np. jeżeli region ten liczy 25 pozycji to ilość wariantów tworzących bibliotekę wyjściową będzie odpowiadała $4^n = 4^{25} = 10^{15}$ cząsteczek [54]. Zróżnicowanie sekwencji oligonukleotydów tworzących bibliotekę obejmuje jedynie wspomniany region zdegenerowany, natomiast sekwencje terminalne na końcu 5' i 3' cząsteczek, są stałe i są miejscem przyłączenia starterów podczas etapu powielania – amplifikacji wariantów.

Liczebność bibliotek stosowanych w chemii kombinatorycznej oraz ich zróżnicowanie ograniczone jest istotnym warunkiem – poszczególne elementy biblioteki muszą być możliwe do zidentyfikowania. Biblioteki biopolimerów takich jak oligopeptydy czy oligonukleotydy w najlepszym stopniu spełniają ten warunek, a techniki biologii molekularnej pozwalają generować bardzo liczne biblioteki. Biblioteki kombinatoryczne oligonukleotydów charakteryzują się największą liczebnością (Tab. 1).

Tabela 1. Biblioteki kombinatoryczne (na podstawie [53]).

TYP BIBLIOTEKI	SYSTEM	PRAKTYCZNIE OSIĄGALNA LICZEBNOŚĆ
kwasy nukleinowe	biblioteki RNA biblioteki DNA	kwasy nukleinowe
aminokwasy	biblioteki fagowe -bakteriofag M13 syntetyczne peptydy bakteriofag γ	1×10^9 1×10^3 - 10^6 1×10^7
inne związki chemiczne	biblioteki syntetyczne biblioteki kodowane	1×10^4 - 10^6 1×10^4

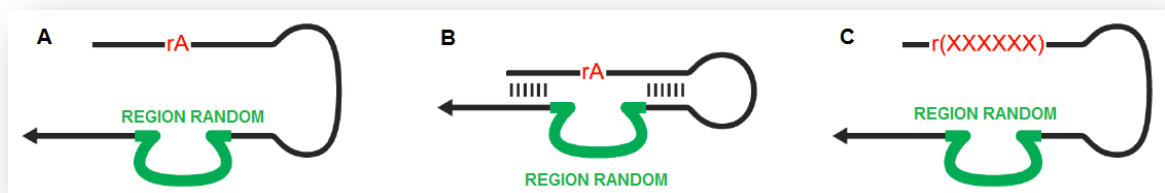
Otrzymywanie bibliotek oligomerów DNA jest relatywnie proste dzięki technice syntezy automatycznej, a zastosowanie metody transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem polimeraz fagowych umożliwi utworzenie tak samo licznej biblioteki oligomerów RNA. Liczba cząsteczek w bibliotece jest zatem ograniczona jedynie ze względu na ilość fizycznie dostępnego materiału oligonukleotydowego [44]. Region *random* w bibliotekach oligonukleotydowych zazwyczaj liczy od 20 do 220 nukleotydów [55]. W praktyce można otrzymać bibliotekę złożoną z 10^{15} cząsteczek, co odpowiada wszystkim możliwym wariantom oligomeru z regionem *random* o długości 25 nukleotydów [36, 56].

Praktycznie osiągalna liczebność w przypadku bibliotek oligopeptydowych wynosi od 10^3 do 10^6 dla syntetycznych oligopeptydów i 10^9 dla biblioteki kodowanej przez syntetyczny DNA, wprowadzony do genomu faga włókienkowatego (jednoniciowe DNA wirusów np.

faga M13 czy fd). Biblioteki niskocząsteczkowych związków chemicznych i syntetycznych polimerów są najmniej liczne i zawierają 10^4 – 10^6 elementów [53].

Istnieją trzy podstawowe strategie pozwalające na konstrukcję bibliotek kombinatorycznych oligonukleotydów DNA wyprowadzanych do etapu właściwej selekcji *in vitro* [56]. W celu otrzymania wariantów katalizujących reakcję cięcia RNA, należy wprowadzić miejsce potencjalnego cięcia w odpowiedniej pozycji we wszystkich oligonukleotydach DNA tworzących wyjściową pulę cząsteczek. Zwykle w reakcji PCR przy użyciu odpowiedniego startera włączane są rybonukleotydy [57–58], ewentualnie wprowadza się rybonukleotydy także za pomocą enzymatycznej ligacji [59–61].

Pierwsza strategia konstrukcji biblioteki kombinatorycznej (Rys. 3A) została zaproponowana przez Breaker'a i Joyce'a podczas selekcji DNAzymu, który wykazywał aktywność katalityczną w obecności jonów Pb^{2+} [3]. W podejściu tym, oligonukleotydowy substrat reakcji cięcia stanowi jednoniciowy DNA z wprowadzonym pojedynczym rybonukleotydem adeniny (rA). Rybonukleotyd adeniny stanowi miejsce katalitycznego cięcia.



Rysunek 3. Podstawowe strategie konstrukcji biblioteki kombinatorycznej deoksyrybozymów zastosowane podczas procesów selekcji *in vitro*. Miejsce katalitycznego cięcia oznaczono jako rA, czyli pojedynczy rybonukleotyd adeniny lub r(XXXXXX) czyli 12-nukleotydowy fragment RNA (na podstawie [56]).

Druga strategia konstrukcji biblioteki kombinatorycznej (Rys. 3B) została zaproponowana przez Breaker'a i Joyce'a podczas selekcji DNAzymu E2 aktywnego w obecności jonów Mg^{2+} [5]. Region sekwencji zdegenerowanej zlokalizowany był w przewidywanej strukturze drugorzędowej wariantów DNAzymów naprzeciw pojedynczego wiązania fosfodiestrowego typu rybo (rA), będącego miejscem katalitycznego cięcia i z obydwu stron ograniczony był segmentami dwuniciowymi DNA.

Trzeci model konstrukcji biblioteki kombinatorycznej (Rys. 3C) został zaproponowany przez Santoro i Joyce'a podczas selekcji wariantów aktywnych w obecności jonów Mg^{2+} , w wyniku której otrzymano DNAzymy 8-17 i 10-23 [6]. W tym przypadku nie

jest dokładnie przewidziane położenie regionu sekwencji zdegenerowanej wobec potencjalnego miejsca katalitycznego cięcia, tak jak miało to miejsce w przypadku DNAzemu Mg^{2+} -zależnego E2 [5]. Substrat reakcji cięcia stanowi jednoniciowy odcinek DNA z wprowadzonym 12-nukleotydowym regionem typu RNA oznaczonym na rysunku 3C jako r(XXXXXX). Miejscem katalitycznego cięcia jest dowolna pozycja w obrębie sekwencji RNA.

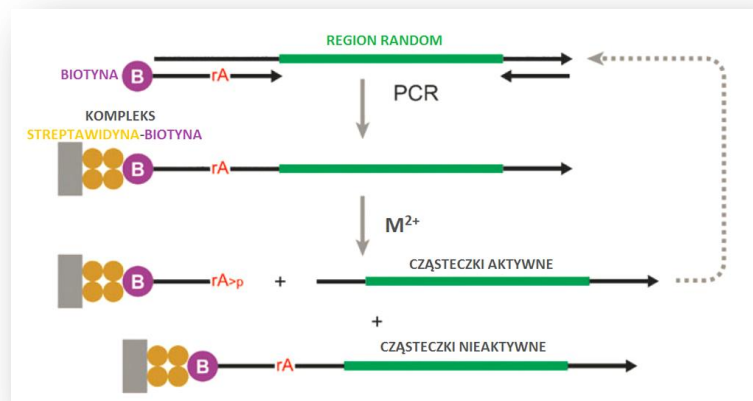
2.2.2. Selekcja i amplifikacja z wykorzystaniem bibliotek oligonukleotydowych

Eksperymenty selekcji *in vitro* z wykorzystaniem kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydowych można podzielić na dwie podstawowe grupy. Do pierwszej grupy można zaliczyć eksperymenty mające na celu otrzymanie aptamerów, czyli jednoniciowych oligonukleotydów RNA lub DNA, które wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania do ściśle określonych biomolekuł lub cząsteczek nieorganicznych [22]. Druga grupa eksperymentów obejmuje generowanie katalitycznych cząsteczek RNA – rybozymów oraz katalitycznych cząsteczek DNA – deoksyrybozymów.

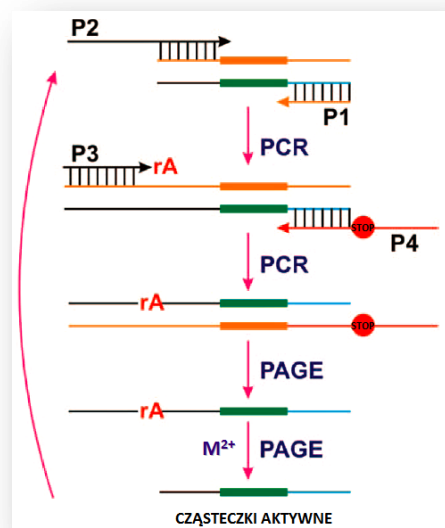
Podczas selekcji DNAzymów katalizujących reakcję cięcia RNA w obecności jonów metali, otrzymana biblioteka kombinatoryczna wprowadzona zostaje, jako wyjściowa pula cząsteczek DNA do pierwszego cyklu selekcji *in vitro* (Rys. 2) [62]. Pula cząsteczek poddawana jest inkubacji w ściśle określonych warunkach buforowych, przy zdefiniowanym stężeniu wybranych jonów metali jedno- i dwuwartościowych, jak również przy określonej temperaturze i czasie trwania reakcji katalitycznego cięcia [54]. Kluczowym etapem podczas procedury selekcji jest etap oddzielenia wariantów aktywnych od wariantów, które takiej aktywności nie wykazują. Separacja oligonukleotydów aktywnych katalitycznie od nieaktywnych może być dokonana za pomocą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym, filtracji membranowej, chromatografii powinowactwa czy elektroforezy kapilarnej [63]. W większości prac eksperymetalnych dotyczących selekcji DNAzymów metalozależnych powszechnie wykorzystywaną metodą separacji jest chromatografia powinowactwa z udziałem kompleksu streptawidyna–biotyna (Rys. 4A) [5–7, 64]. Oddzielenie aktywnych oligonukleotydów od nieaktywnych przez rozdział produktów reakcji katalitycznego cięcia w denaturującym żelu poliakryloamidowym, wykorzystane podczas selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów UO_2^{2+} [58, 65] wydaje się być metodą znacznie dokładniejszą. Po reakcji przecięcia warianty aktywne są krótsze od

nieprzeciętych wariantów nieaktywnych, w związku z tym znacznie szybciej migrują w żelu poliakryloamidowym (Rys. 4B).

A



B



Rysunek 4. Schemat procesu selekcji *in vitro* deoksyrybozymów. Separacja cząsteczek aktywnych katalitycznie za pomocą **A**) chromatografii powinowactwa (kompleks streptawidyna–biotyna) **B**) rozdziału w denaturującym żelu poliakryloamidowym. Miejsce katalitycznego cięcia – pojedynczy rybonukleotyd oznaczono jako rA, Me^{2+} – jon metalu (na podstawie [58, 66]).

Wyselekcjonowane cząsteczki o oczekiwanych właściwościach są powielane w reakcji PCR i wzbogacona, nowa biblioteka kombinatoryczna jest następnie wprowadzana do kolejnego cyklu selekcji. Przy czym, do kolejnej rundy selekcji wprowadzana powinna być pula jednoniciowych cząsteczek DNA. W związku z powyższym, w trakcie amplifikacji produktów katalitycznego cięcia przeprowadzanej za pomocą reakcji PCR wykorzystuje się zmodyfikowany starter oligonukleotydowy posiadający wewnętrzny łącznik w postaci glikolu

polietylenowego, który zatrzymuje polimerazę. Jednocześnie, obie nici ze względu na różnice w długości wykazują zróżnicowaną szybkość migracji w żelu (Rys. 4B; czerwony znak stop oznacza łącznik glikolowy) [58].

Eksperyment selekcji *in vitro* jest zwykle prowadzony przez 5–15 cykli do momentu, w którym stopień przecięcia puli wariantów jest na tyle wysoki, że pozwala na klonowanie i dalszą szczegółową charakterystykę poszczególnych wariantów. Cykliczne powtarzanie selekcji przez kilka czy kilkanaście rund jest konieczne do wzbogacenia wyjściowej puli cząsteczek w aktywne warianty. W trakcie prowadzenia selekcji należy zaostrzać warunki reakcji, aby „wygrały”/„przetrwały” najbardziej efektywnie działające DNAzomy. Powszechnymi sposobami zwiększania tzw. „ciśnienia selekcji” jest skracanie czasu inkubacji oraz obniżanie stężenia wprowadzanego jonu metalu, co wpływa na wzrost specyficzności i aktywności otrzymanych wariantów [36, 54]. Eksperyment selekcji zwykle kończy się wówczas, gdy przez kilka kolejnych rund nie oberwuje się dalszego wzrostu aktywności biblioteki, czyli kiedy osiągnięty został stan *plateau* [66].

2.3. Deoksyrybozomy – katalizatory wielu reakcji chemicznych

Cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego mogą wykazywać aktywność katalityczną w wielu reakcjach chemicznych (Tab. 2). Podobnie jak katalityczne cząsteczki RNA, DNAzomy uczestniczą między innymi w reakcjach, w których oligonukleotydowy substrat ulega katalitycznemu cięciu [5–9] bądź ligacji [10], a także reakcjom, w wyniku których dochodzi do modyfikacji w obrębie końca 5' substratu – fosforylacji [11], czy w obrębie jego końca 3' – adenylacji [67]. Katalizowane są także reakcje modyfikacji zasad azotowych substratu – deglikozylacja/depurynacja, w następstwie których dochodzi do rozerwania wiązań C-N [68–69]. Wyselekcjonowane zostały także deoksyrybozomy, dla których substratem nie jest oligonukleotyd DNA czy RNA, ale związki niskocząsteczkowe np. porfiryny [12].

Większość deoksyrybozomów otrzymanych z licznych oligonukleotydowych bibliotek kombinatorycznych do swojej aktywności katalitycznej wymaga obecności kofaktorów, głównie w postaci jonów metali dwuwartościowych (Tab. 2) [36].

Katalityczne cząsteczki DNA posiadają wiele potencjalnych miejsc wiązania/koordynacji dla dodatnio naładowanych jonów metali. Biorąc pod uwagę fakt, że DNA ma ujemnie naładowany łańcuch fosfo-cukrowy, jak również ujemny cząstkowy ładunek przy atomach N i O zasad azotowych, jony metali dwuwartościowych mogą brać

udział w zwijaniu cząsteczek deoksyrybozymów i przyjęciu przez nie struktur wyższego rzędu [25]. Naturalnie występujące katalityczne cząsteczki RNA również wymagają obecności jonów metali do zachowania aktywności katalitycznej. Wyniki początkowych badań dotyczących rybozymów sugerowały, że są one bezwarunkowymi metaloenzymami, które wymagają obecności jonów metali dwuwartościowych bądź trójwartościowych do katalizy [70–71].

Tabela 2. Różne typy reakcji chemicznych katalizowanych przez deoksyrybozimy (na podstawie [36]).

REAKCJA CHEMICZNA	TYP WIĄZANIA	REGION RANDOM [nt]	JON METALU
cięcie RNA	O–P	50	Pb ²⁺
cięcie RNA	O–P	50	Mg ²⁺
cięcie RNA	O–P	40	-
ligacja RNA (3'-5')	O–P	40	Mg ²⁺
ligacja RNA (3'-5')	O–P	40	Zn ²⁺
ligacja RNA (tworzenie miejsca rozgałęzionego)	O–P	40	Mn ²⁺
ligacja RNA (tworzenie miejsca rozgałęzionego)	O–P	40	Mg ²⁺
ligacja RNA (tworzenie struktury typu „lassa”)	O–P	40	Mn ²⁺
fosforylacja DNA	O–P	70	Mn ²⁺
adenylacja DNA	O–P	70	Mg ²⁺ i Cu ²⁺
ligacja DNA	O–P	116	Zn ²⁺ lub Cu ²⁺
ligacja DNA	O–P	150	Mn ²⁺
tworzenie wiązań nukleopeptydowych	O–P	40	Mg ²⁺ lub Mn ²⁺
oksydatywne cięcie DNA	C–O	50	Cu ²⁺
depurynacja DNA	C–N	85	Ca ²⁺
depurynacja DNA IO ₄ ⁻ -zależna	C–N	70	-
reakcja Dielsa-Aldera	C–C	36	Ca ²⁺
fotocięcie dimerów tyminy	C–C	40	-
metylacja porfiryn	Cu–N	228	Zn ²⁺ lub Cu ²⁺

Z upływem czasu i w wyniku dalszych doświadczeń okazało się, że istnieją rybozimy, które wykazują aktywność katalityczną przy wysokich stężeniach jonów metali jednowartościowych np. w obecności 4 M Li⁺ [72–73]. Podobnie zachowują się deoksyrybozimy. Po otrzymaniu DNAzemu katalizującego reakcję cięcia RNA w obecności jonów Pb²⁺ [3], wiele grup badawczych pracowało nad selekcją kolejnych deoksyrybozymów o określonej specyficzności względem jonów metali. Gryer i Sen [74] zidentyfikowali DNAzym Na8 przecinający RNA w obecności jednowartościowych jonów Na⁺, niezależnie

od obecności jonów metali dwuwartościowych. Co ciekawe, Roth i Breaker [75] otrzymali DNAzym HD2, który katalizował reakcję cięcia RNA w obecności histydyny, natomiast DNAzym 10FN10 do przeprowadzenia reakcji depurynacji przy terminalnym nukleotydzie z końca 5' wymagał obecności 40 mM nadjodanu sodu [69].

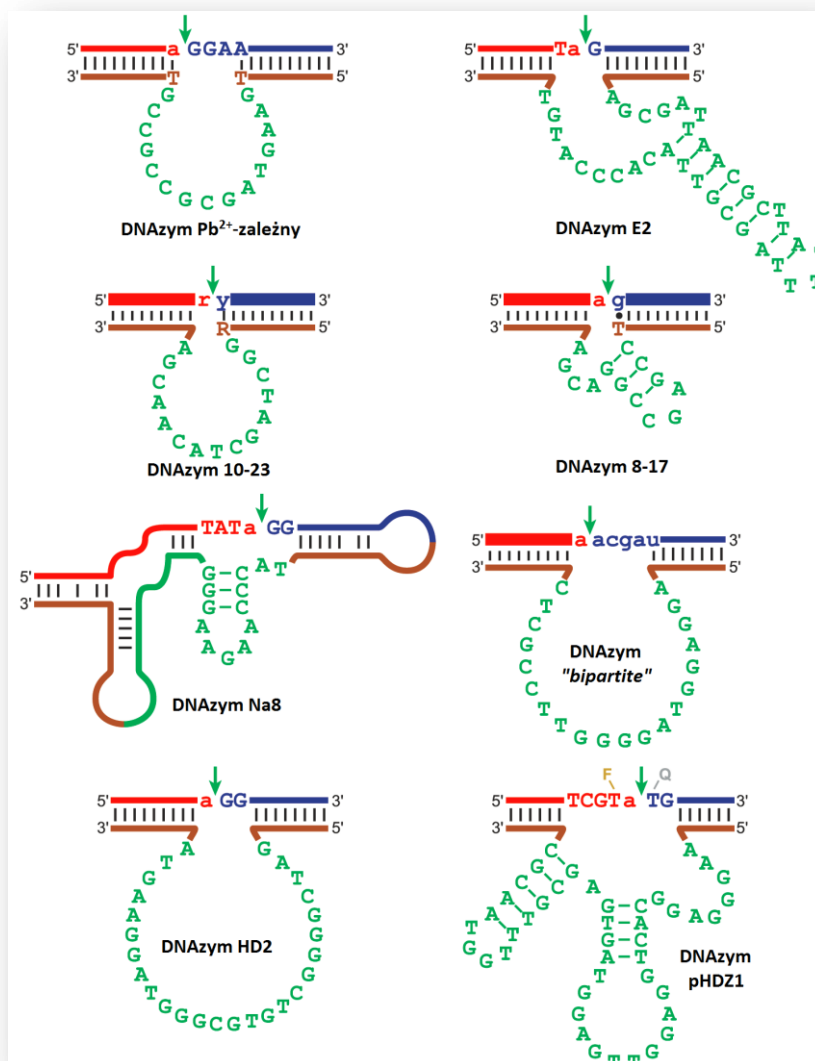
2.3.1. DNAzomy katalizujące reakcję cięcia RNA

DNAzomy hydrolizujące wiązanie fosfodiesterowe RNA są najszerzej zbadaną, a zarazem najliczniejszą grupą katalitycznych cząsteczek DNA. Na rysunku 5 przedstawione zostały podstawowe warianty sekwencyjne wybranych DNAzymów przecinających wiązanie fosfodiesterowe RNA w obecności jonów metali bądź związków niskocząsteczkowych. Po odkryciu pierwszego deoksyrybozemu działającego w obecności jonów Pb^{2+} , w wyniku kolejnych eksperymentów selekcji *in vitro* otrzymano nowe deoksyrybozemy o interesujących właściwościach.

Breaker i Joyce [5] po sześciu rundach selekcji z biblioteki oligomerów DNA zawierających 40-nukleotydowy region *random*, otrzymali DNAzym E2 zdolny do przecinania substratu z pojedynczym rybonukleotydem w obecności jonów Mg^{2+} (wykorzystano strategię przedstawioną na rys. 3B). Stała szybkości katalizowanej reakcji (k_{obs}) była na poziomie $0,002 \text{ min}^{-1}$ w obecności 1 mM stężenia jonów Mg^{2+} , przy czym po dodatkowej randomizacji części regionu katalitycznego i przeprowadzonym przez siedem kolejnych cykli procesie reSelekcji, wartość k_{obs} wzrosła do $0,01 \text{ min}^{-1}$.

Z kolei, Faulhammer i Famulok [76] zidentyfikowali Ca^{2+} -zależny deoksyrybozym Mg5, pomimo że jony Ca^{2+} nie były obecne podczas procesu selekcji. Pulę wariantów z 74-nukleotydowym regionem *random* inkubowano w obecności 50 mM histydyny i 0,5 mM jonów Mg^{2+} . Substrat zawierał pojedyncze wiązanie fosfodiesterowe typu rybo, będące miejscem cięcia (wykorzystano strategię przedstawioną na rys. 3A). W obecności jonów Ca^{2+} efektywność reakcji była o jeden rząd wielkości wyższa od efektywności reakcji prowadzonej w obecności jonów Mg^{2+} .

Dwa lata po „niepowodzeniu” Faulhammer’a i Famulok’a [76] DNAzym zależny od obecności aminokwasu – L-histydyny został otrzymany przez Roth’a i Breaker’a [75]. Wariant HD2 był pierwszym deoksyrybozymem, który katalizował reakcję cięcia RNA bez udziału jonów metali. Podczas 11 cykli selekcji bibliotekę DNAzymów inkubowano nie tylko w obecności histydyny, ale także EDTA, aby mieć pewność, że w środowisku reakcji nie ma jonów metali dwuwartościowych.



Rysunek 5. Struktury drugorzędowe wybranych deoksyrybozymów działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*) przecinających wiązanie fosfodiesterowe RNA w obecności jonów metali bądź związków niskocząsteczkowych. Linie o zwiększonej grubości i małe litery oznaczają RNA, natomiast cienkie linie i duże litery oznaczają DNA. Strzałka określa miejsce katalicznego cięcia, a regiony kataliczne oznaczono na zielono (na podstawie [56]).

Biorąc pod uwagę istotną rolę jonów metali dwuwartościowych – Mg^{2+} , Ca^{2+} czy Pb^{2+} w reakcjach katalizowanych przez cząsteczki DNA, Geyer i Sen [74] skupili się na otrzymaniu DNAzemu działającego niezależnie od jonów niektórych metali dwuwartościowych. Po 12 cyklach selekcji otrzymali DNAzym Na8 działający w obecności jonów Na^+ . Wprowadzenie do buforu zawierającego 0,5 M NaCl dodatkowo jonów niektórych metali dwuwartościowych, takich jak: Mg^{2+} , Ca^{2+} i Zn^{2+} nie zwiększało aktywności katalicznej DNAzemu. Co więcej, podczas reakcji prowadzonej wyłącznie w

obecności jonów metali dwuwartościowych DNAzym Na8 nie wykazywał aktywności katalitycznej.

Wiodącymi przedstawicielami grupy deoksyrybozymów zdolnych do hydrolizy wiązania fosfodiesterowego RNA są zależne od jonów Mg^{2+} DNAzym 8-17 i DNAzym 10-23, które zostały otrzymane przez Santoro i Joyce'a w 1997 roku [6]. DNAzomy te są najlepiej scharakteryzowane, zarówno pod kątem właściwości katalitycznych, biochemicznych oraz przyjmowanej struktury drugorzędowej. W związku z powyższym są katalitycznymi cząsteczkami DNA, które znalazły szerokie zastosowanie zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [25] DNAzomy 8-17 i 10-23 zostały szerzej opisane w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy.

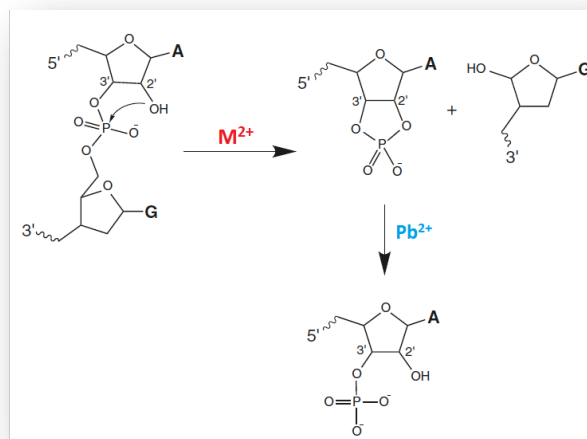
Wspólną cechą wszystkich poznanych dotąd deoksyrybozymów hydrolizujących wiązanie fosfodiesterowe, poza wymaganą obecnością kofaktorów takich jak jony metali czy związki niskocząsteczkowe, jest niesparowany rybonukleotyd w miejscu katalitycznego cięcia. Spekuluje się, że niesparowanie tego rybonukleotydu zapewnia elastyczność struktury DNAzemu, która jest prawdopodobnie niezbędna podczas wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego atomu tlenu grupy 2'-hydroksylowej rybozy na atom fosforu wiązania fosfodiesterowego [77–78].

2.3.1.1. Jony metali, a aktywność katalityczna deoksyrybozymów

Większość deoksyrybozymów katalizujących reakcję hydrolizy wiązania fosfodiesterowego do swojej aktywności wymaga obecności jonów metali dwuwartościowych. Jaka jest zatem rola jonów metali w reakcji katalitycznego cięcia RNA? Sugeruje się, że jon metalu odrywa proton od grupy 2'-hydroksylowej reszty rybozy znajdującej się w sąsiedztwie grupy fosforanowej w miejscu cięcia. Wytworzony anion alkoholany atakuje atom fosforu wiązania internukleotydowego z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-O5'. W wyniku reakcji tworzą się dwa produkty: oligonukleotyd posiadający na końcu 3' 2',3'-cykliczny fosforan oraz oligonukleotyd posiadający na końcu 5' wolną grupę 5'-OH (Rys. 6). Wobec tego reakcja cięcia wiązania fosfodiesterowego RNA katalizowana przez DNAzomy ma charakter transestryfikacji [57, 79–80]. Wydaje się, że reakcja transestryfikacji katalizowana jest według ogólnego mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej, co potwierdzają eksperymenty selekcji DNAzemu HD2 aktywnego w obecności L-histydyny [75], a także DNAzemu Na8 [74], który do osiągnięcia aktywności nie wymaga obecności jonów metali dwuwartościowych. Analogiczny mechanizm cięcia, z uwzględnieniem powstawania produktu posiadającego na końcu 3' 2',3'-cykliczny fosforan oraz produktu z wolną grupą

5'-OH został zaproponowany dla wielu katalitycznych cząsteczek RNA, takich jak: rybozym *hammerhead* [81], *hairpin* [82], *Neurospora* [83] czy HDV [84].

W przypadku, kiedy kofaktorem reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego RNA są jony Pb^{2+} obserwuje się dodatkowy etap w proponowanym mechanizmie reakcji cięcia, którym jest hydroliza 2',3'-cyklicznego fosforanu do monofosforanu (Rys. 6) [85], podobnie jak ma to miejsce w przypadku rybozymu zależnego od jonów Pb^{2+} – ang. *leadzyme*, a także rybonukleaz białkowych [14]. Brown i wsp. [85] wykazali, że w obecności jonów Pb^{2+} mechanizm reakcji ma charakter dwustopniowy, a w jego wyniku otrzymuje się dwa produkty: oligonukleotyd posiadający na końcu 3' monofosforan oraz oligonukleotyd posiadający na końcu 5' wolną grupę hydroksylową.



Rysunek 6. Proponowany mechanizm hydrolizy wiązania fosfodiesterowego substratu RNA podczas reakcji katalizowanej przez DNAzym w obecności jonów metali dwuwartościowych – M^{2+} oraz w obecności jonów Pb^{2+} (na podstawie [14]).

Wykazano, że jony metali biorą udział w zwinieniu cząsteczek deoksyrybozymów i przyjęciu konformacji, w której wykazują one właściwości katalityczne. W obecności jonów Mg^{2+} , a także w obecności jonów niektórych metali przejściowych najpierw dochodzi do zwinienia cząsteczki DNAzymu, a następnie ma miejsce hydroliza wiązania fosfodiesterowego RNA. Określa się, że w tym przypadku deoksyrybozomy działają w oparciu o model indukowanego dopasowania, czyli enzym posiada „elastyczną” strukturę, a jego centrum katalityczne podlega rearanżacjom podczas oddziaływania z substratem. Natomiast, kiedy kofaktorem reakcji są jony Pb^{2+} , nie obserwuje się pierwszego etapu, czyli zwinienia cząsteczki tylko bezpośrednio dochodzi do katalitycznego cięcia substratu RNA. DNAzomy Pb^{2+} -zależne działają zatem w oparciu o model klucza i zamka, tzn. że enzym i substrat są do siebie geometrycznie dopasowane [86–87].

Wszystkie dotychczasowe przypuszczenia i wnioski dotyczące prawdopodobnego mechanizmu działania deoksyrybozymów w obecności jonów metali zostały sformułowane na podstawie wyników badań biochemicznych. Niestety, w przeciwieństwie do rybozymów czy enzymów białkowych, nie rozwiązano krystalograficznej struktury żadnego z wyselekcjonowanych deoksyrybozymów [66, 88]. Wprawdzie Nowakowski i wsp. [89] podjęli próbę uzyskania struktury krystalicznej kompleksu DNAzemu 10-23 z substratem RNA, jednak otrzymana struktura nie reprezentuje katalitycznie aktywnej konformacji DNAzemu – badania wykazały istnienie dwóch nici DNA i dwóch nici RNA, o charakterystycznym złączeniu typu Holliday’a.

Chociaż właściwości biochemiczne oraz kinetyczne szeregu otrzymanych deoksyrybozymów zostały bardzo szczegółowo zbadane, to jednak mechanizm reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego RNA katalizowanej przez deoksyrybozimy jest w dużej mierze niepoznany.

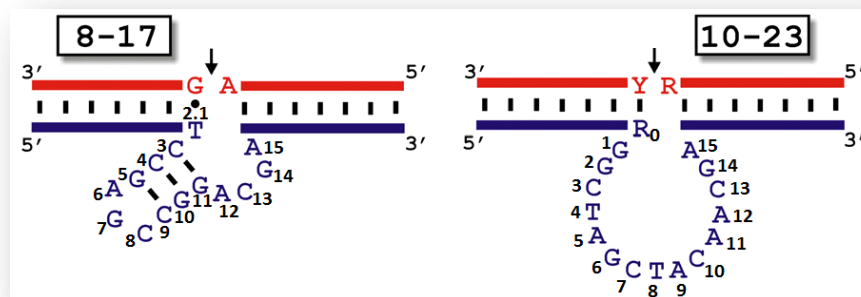
2.3.1.2. DNAzemy 8-17 i 10-23

DNAzym 8-17 oraz DNAzym 10-23 zostały wyselekcjonowane z oligonukleotydowej biblioteki kombinatorycznej zawierającej 50-nukleotydowy region *random*. Substrat stanowił 12-nukleotydowy odcinek RNA będący fragmentem potencjalnego deoksyrybozimu (wykorzystano strategię przedstawioną na rys. 3C). Selekcję *in vitro* prowadzono w obecności 10 mM stężenia jonów Mg^{2+} w temperaturze 37°C przy pH 7,5. Po 10 cyklach otrzymano cząsteczki DNA, zdolne do przyspieszania reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego około miliona razy w stosunku do reakcji niekatalizowanej [6, 88]. Z 62 wariantów, które poddano klonowaniu i sekwencjonowaniu, najbardziej aktywne okazały się dwa warianty – DNAzym 8-17, który jest 17 klonem wyodrębnionym po 8 cyklu selekcji oraz DNAzym 10-23, który jest 23 klonem wyselekcjonowanym po 10 cyklu selekcji [6].

Otrzymane DNAzemy, chociaż zostały uzyskane w tej samej selekcji, to istotnie różnią się strukturą drugorzędową. Podobnie jak rybozimy zawierają dwie domeny funkcjonalne – zmienną, odpowiadającą za rozpoznanie substratu oraz konserwatywną, zawierającą centrum katalityczne.

Domena rozpoznania substratu zawiera dwa ramiona komplementarne do sekwencji substratu o długości od 7 do 9 nukleotydów. Centrum katalityczne DNAzemu 10-23 składa się z 15 nukleotydów, nie tworzących wyodrębnionych motywów strukturalnych [80, 90]. Natomiast DNAzym 8-17 zawiera konserwatywną domenę złożoną również z 15

nukleotydów, z czego 9 nukleotydów tworzy motyw krótkiej spinki do włosów z trójnukleotydową pętlą apikalną, a kolejnych 4-5 nukleotydów jest fragmentem jednoniciowym. Dodatkowo, w DNAzymie 8-17 występuje para G•T typu *wobble* za miejscem katalitycznego cięcia (Rys. 7) [85, 88, 91]. Deoksyrybozomy 8-17 oraz 10-23, rozpoznając komplementarny substrat RNA poprzez tworzenie oddziaływań typu Watsona-Cricka, są zdolne do hydrolizy wiązania fosfodiesterowego RNA w symulowanych warunkach fizjologicznych. W przeciwieństwie do rybonukleazy T1, która przecina cząsteczkę RNA za każdą zasadą guaninową, DNAzym 10-23 hydrolizuje wiązanie typu puryna-pirymidyna w obrębie nici substratu [80, 92–93], natomiast DNAzym 8-17 jest zdolny do cięcia katalitycznego wszystkich 16 możliwych wiązań dwunukleotydowych [60, 94]. Schlosser i wsp. [95] wykazali, że DNAzym 8-17 zawierający w miejscu cięcia wiązanie typu rNG (rN oznacza dowolny rybonukleotyd), najszybciej katalizuje reakcję cięcia – stałe szybkości reakcji k_{obs} wynosiły od $0,1 \text{ min}^{-1}$ do nawet 5 min^{-1} . W przypadku wiązań typu rNA, rNC i rNT aktywność była przynajmniej o dwa rzędy wielkości niższa, a stałe k_{obs} nie przekraczały $0,001 \text{ min}^{-1}$. Co więcej, na aktywność katalityczną DNAzymu 8-17 wpływa także rodzaj zasady azotowej przy rybonukleotydzie – aktywność katalityczna wariantów 8-17 wzrasta w następującym porządku $rU < rC < rA < rG$.



Rysunek 7. Proponowane struktury drugorzędowe DNAzymu 8-17 oraz DNAzymu 10-23 z wyszczególnioną sekwencją regionu katalitycznego. Nić deoksyrybozomu zaznaczono na niebiesko, nić substratu na czerwono. Strzałka wskazuje miejsce katalitycznego cięcia, R – adenozyna lub guanozyna, Y – urydyna lub cytydyna (na podstawie [25]).

W tabeli 3 przedstawiona została aktywność katalityczna DNAzymu 10-23 oraz DNAzymu 8-17. Obydwa deoksyrybozomy bardzo efektywnie prowadzą hydrolizę wiązania fosfodiesterowego RNA, przy czym do swojej aktywności katalitycznej wymagają obecności określonych jonów metali dwuwartościowych.

Tabela 3. Aktywność katalityczna DNAzemu 10-23 oraz DNAzemu 8-17 otrzymanych na drodze selekcji *in vitro* w obecności różnych jonów metali dwuwartościowych. W tabeli pK_a oznacza wartość pK_a odpowiedniego hydratu jonu metalu (na podstawie [14]).

DNAzym	kofaktor	k_{obs} [min^{-1}]	pK_a
DNAzym 10-23	50 mM Mg^{2+}	3,4	11,4
	25 mM Mn^{2+}	1,19	10,6
	25 mM Ca^{2+}	0,863	12,9
	25 mM Mg^{2+}	0,961	11,4
	25 mM Ba^{2+}	0,101	13,5
	10 mM Mn^{2+}	> 4	10,6
	10 mM Mg^{2+}	0,28	11,4
	10 mM Ca^{2+}	0,12	12,9
	10 mM Sr^{2+}	0,026	13,2
	10 mM Ba^{2+}	0,015	13,5
DNAzym 8-17	2 mM Mg^{2+}	~ 0,01	11,4
	0,2 mM Pb^{2+}	0,47	7,8
	5 mM Zn^{2+}	12	9,96
	3 mM Mn^{2+}	~ 0,1	10,6
	3 mM Mg^{2+}	~ 0,002	11,4
	3 mM Ca^{2+}	~ 0,02	12,9
DNAzym 17E (wariant 8-17)	0,1 mM Pb^{2+}	5,75	7,8
	10 mM Zn^{2+}	1,35	8,96
	10 mM Mn^{2+}	0,24	10,6
	10 mM Mg^{2+}	0,017	11,4
	10 mM Ca^{2+}	0,015	12,9
DNAzym Mg5 (wariant 8-17)	0,2 mM Pb^{2+}	2,1	7,8
	5 mM Zn^{2+}	0,74	8,96
	3 mM Mn^{2+}	> 3	10,6
	3 mM Mg^{2+}	0,06	11,4
	3 mM Ca^{2+}	1	12,9

DNAzemy 10-23 jak i 8-17 wykazują szerokie spektrum tolerancji wobec kofaktorów w postaci wymienionych w tabeli 3 jonów metali. Co ciekawe, podczas niezależnych procesów selekcji *in vitro* prowadzonych w odmiennych warunkach tzn. gdy kofaktorem reakcji były jony metali dwuwartościowych inne niż jony Mg^{2+} lub wybrane związki niskocząsteczkowe, otrzymano warianty sekwencyjne DNAzemu 8-17. Dla przykładu, Faulhammer i Famulok [76] w wyniku selekcji przeprowadzonej w obecności 50 mM histydyny i 0,5 mM stężenia jonów Mg^{2+} , otrzymali deoksyrybozym Mg5, który najwyższą aktywność katalityczną wykazywał w obecności jonów Ca^{2+} . Co więcej, otrzymany DNAzym okazał się być wariantem sekwencyjnym deoksyrybozemu 8-17, gdyż w obrębie centrum katalitycznego posiadał charakterystyczne dla tego DNAzemu motywy strukturalne. Li i wsp.

[57] otrzymali natomiast deoksyrybozym 17E, będący także wariantem sekwencyjnym DNAzemu 8-17, który katalizował reakcję cięcia pojedynczego wiązania typu rybo w obecności jonów Zn^{2+} . Badacze wykorzystali do syntezy biblioteki kombinatorycznej strategię przedstawioną na rys. 3B. Aktywność katalityczna DNAzemu 17E w obecności jonów Zn^{2+} była o 98% wyższa od aktywności katalitycznej w obecności jonów Mg^{2+} . Cruz i wsp. [94] przeprowadzili 16 równoległych eksperymentów selekcji *in vitro*, w wyniku których otrzymali ponad 100 wariantów sekwencyjnych DNAzemu typu 8-17.

Bonnacio i wsp. [96] szczegółowo scharakteryzowali właściwości kinetyczne i termodynamiczne DNAzemu 8-17. Szybkość katalizy (k_{kat}) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych tj. w temperaturze $37^{\circ}C$, w obecności $3\text{ mM } Mg^{2+}$, przy pH 7,4 wyniosła $0,19\text{ min}^{-1}$, a stała K_M 50 nM , zatem efektywność katalityczna (k_{kat}/K_M) była na poziomie $4 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$. Efektywność katalityczna DNAzemu 10-23 wyznaczona przez Santoro i Joyce'a [6] w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, przy 2 mM stężeniu jonów Mg^{2+} , wyniosła $3,2 \times 10^8\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$, czyli była o trzy rzędy wielkości większa niż wyznaczona dla DNAzemu 8-17. Należy jednak podkreślić, że efektywność katalityczna (k_{kat}/K_M) danego deoksyrybozemu działającego w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*) w dużym stopniu zależy od stabilności kompleksu tworzonego przez nie DNAzemu i nie komplementarnego substratu, długości i sekwencji nukleotydowych ramion wiążących substrat, jak również od temperatury, w której prowadzona jest reakcja katalitycznego cięcia [96]. Na efektywność katalityczną (k_{kat}/K_M) wpływa głównie etap tworzenia kompleksu DNAzym–substrat. Stała szybkości wiązania substratu przez DNAzym 8-17 ($\sim 1,7 \times 10^7\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$) była podobna do szybkości wiązania substratu przez rybozym *hammerhead*. Rybozym *hammerhead* w obrębie regionu katalitycznego posiada charakterystyczny trzon zakończony pętlą apikalną, podobnie jak DNAzym 8-17. W przypadku DNAzemu 10-23 szybkość wiązania substratu była o jeden rząd wielkości większa w stosunku do wyznaczonej dla DNAzemu 8-17. Jest wielce prawdopodobne, że etap wiązania substratu przebiega z jednoczesną reorganizacją struktury w obrębie centrum katalitycznego danego deoksyrybozemu, co może być czynnikiem ograniczającym szybkość całego procesu [80, 88, 96]. Santoro i Joyce [6] wykazali, że efektywność katalityczna (k_{kat}/K_M) deoksyrybozymów określona w warunkach *in vitro*, gdy stężenie jonów Mg^{2+} wynosiło 50 mM , jest wyższa o 1–2 rzędy wielkości od efektywności katalitycznej rybozymów typu *hammerhead* czy *hairpin* oraz enzymu białkowego – rybonukleazy A (Tab. 4).

Tabela 4. Aktywność katalityczna wybranych enzymów przecinających RNA (na podstawie [6]).

ENZYM	$k_{\text{kat}}, \text{min}^{-1}$	K_M, M	$k_{\text{kat}} / K_M, \text{min}^{-1} \times \text{M}^{-1}$
Rybonukleaza A			
Substrat UpA	$8,4 \times 10^4$	$6,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^8$
Substrat poli(C)	$3,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^8$
Rybozym typu hammerhead	2,1	$2,8 \times 10^{-8}$	$7,5 \times 10^7$
Rybozym typu hairpin	1,4	$4,9 \times 10^{-8}$	$2,9 \times 10^7$
Enzym DNA „10-23”	3,4	$7,6 \times 10^{-10}$	$4,5 \times 10^9$

Poza szczegółową charakterystyką właściwości biochemicznych szeregu deoksyrybozymów, niektóre grupy badawcze skupiły swoją uwagę także na zależności między aktywnością katalityczną, a składem nukleotydowym wybranych regionów ich cząsteczek. Przeprowadzono szereg analiz z wykorzystaniem metody ukierunkowanej mutagenyzy, które wskazały konserwatywne elementy sekwencji oraz te nukleotydy, które są niezbędne do zachowania aktywności katalitycznej, zarówno przez DNAzym 10-23 [90, 92, 97], jak i DNAzym 8-17 [91, 98–99].

Systematyczna mutageniza centrum katalitycznego DNAzymu 10-23 prowadzona przez Zborowską i wsp. [90] wykazała, że nukleotydy znajdujące się bliżej domeny zmiennej odpowiadającej za rozpoznanie substratu (np. G1, G2, T4, A5, G6 czy C13, G14; Rys. 7) są bezpośrednio zaangażowane w tworzenie miejsca aktywnego. W 2010 roku Wang i wsp. [100] wprowadzili w domenę katalitycznej nukleotydy pozbawione cykliczych zasad azotowych. DNAzym 10-23 całkowicie utracił aktywność katalityczną podczas modyfikacji wprowadzanych w pozycji A5, G6, C13 oraz G14, co wskazuje, że te nukleotydy są niezbędne dla zachowania jego aktywności. Nukleotydy w pozostałych pozycjach regionu katalitycznego nie biorą bezpośredniego udziału w katalizie, ale najprawdopodobniej są „stabilizatorami”, które pomagają w odpowiednim usytuowaniu konserwatywnych nukleotydów odpowiedzialnych za aktywność katalityczną DNAzymu.

Pierwsze badania dotyczące DNAzymu 8-17 sugerowały, że wszystkie nukleotydy jego centrum katalitycznego – niekanoniczna para G•T, 9 nukleotydów tworzących motyw spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą apikalną typu AGC oraz 5- nukleotydowy fragment jednoniciowy WCGR(A) (W = A lub T; R = A lub G) – są istotne dla zachowania aktywności katalitycznej. Kolejne doświadczenia dowiodły, że jedynie cztery nukleotydy tego regionu są wysoce konserwatywne, mianowicie A6 i G7 w obrębie pętli apikalnej AGC oraz C13 i G14 w obrębie 5-nukleotydowego fragmentu jednoniciowego (Rys. 7) [85].

Peracchi i wsp. [99] przeprowadzili ukierunkowaną mutagenezę DNAzemu 8-17 podstawiając A6 oraz G7 nukleotydami z zasadami niewystępującymi naturalnie tzn. hipoksantyną, 2-aminopuryną, 7-deaza-guaniną czy 7-deaza-adeniną. Aktywność katalityczna DNAzemu istotnie spadła. Atom N7 nukleotydu adeninowego w pozycji 6 oraz atom O6 nukleotydu guaninowego w pozycji 7, są niezbędne dla zachowania wysokiej aktywności katalitycznej. Badacze sugerują, że A6 oraz G7 tworzą sieć wiązań wodorowych z innymi częściami kompleksu deoksyrybozym–substrat. Jest wielce prawdopodobne, że pętla apikalna AGC oddziałuje z 5-nukleotydowym regionem jednoniciowym domeny katalitycznej lub z jedną z helis utworzonych w wyniku asocjacji deoksyrybozemu z substratem. Oddziaływanie pomiędzy pętlą a regionem helikalnym może być uławione przez jon metalu dwuwartościowego. W obecności jonu dochodzi do zbliżenia trzonu spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą AGC i dwóch helis utworzonych przez deoksyrybozym, w wyniku czego struktura kompleksu DNAzym–substrat przyjmuje kształt trójnogu [101]. Podstawienie cytydyny w pozycji 13 oraz guanozyny w pozycji 14 innym nukleozydem skutkowało ponad 1000-krotnym spadkiem aktywności katalitycznej DNAzemu 8-17 [99]. Natomiast wprowadzenie w pozycji 13 lub 14 nukleozydu pozbawionego zasady azotowej powodowało całkowity zanik właściwości katalitycznych DNAzemu 8-17 [100].

2.4. DNAzemy vs. rybozemy i enzymy białkowe

Z praktycznego punktu widzenia wykorzystania katalitycznych cząsteczek DNA, po pierwsze są one znacznie bardziej odporne na niepożądaną degradację, zachodzącą pod wpływem działania czynników środowiskowych niż np. rybozemy czy enzymy białkowe. Brak grupy 2'-OH reszty rybozy powoduje, że cząsteczki DNA są ok. 100 000 razy bardziej odporne na hydrolizę niż cząsteczki RNA. Co więcej, wiązania fosfodiesterowe DNA są także 1000 razy bardziej odporne na hydrolizę niż wiązania peptydowe enzymów białkowych [25]. Po drugie, synteza DNA jest znacznie tańsza niż synteza cząsteczek RNA. Co więcej, DNA może być bezpośrednio powielane w reakcji PCR, podczas gdy RNA musi być poddany transkrypcji *in vitro* przed etapem amplifikacji. Jednak, czy z uwagi na brak grupy 2'-hydroksylowej, czyli potencjalnego akceptora/donora wiązań wodorowych, DNAzemy są gorszymi katalizatorami niż rybozemy? Wyniki badań sugerują, że katalityczne cząsteczki DNA i ich syntetyczne odpowiedniki w postaci rybozymów posiadają porównywalną efektywność działania [36].

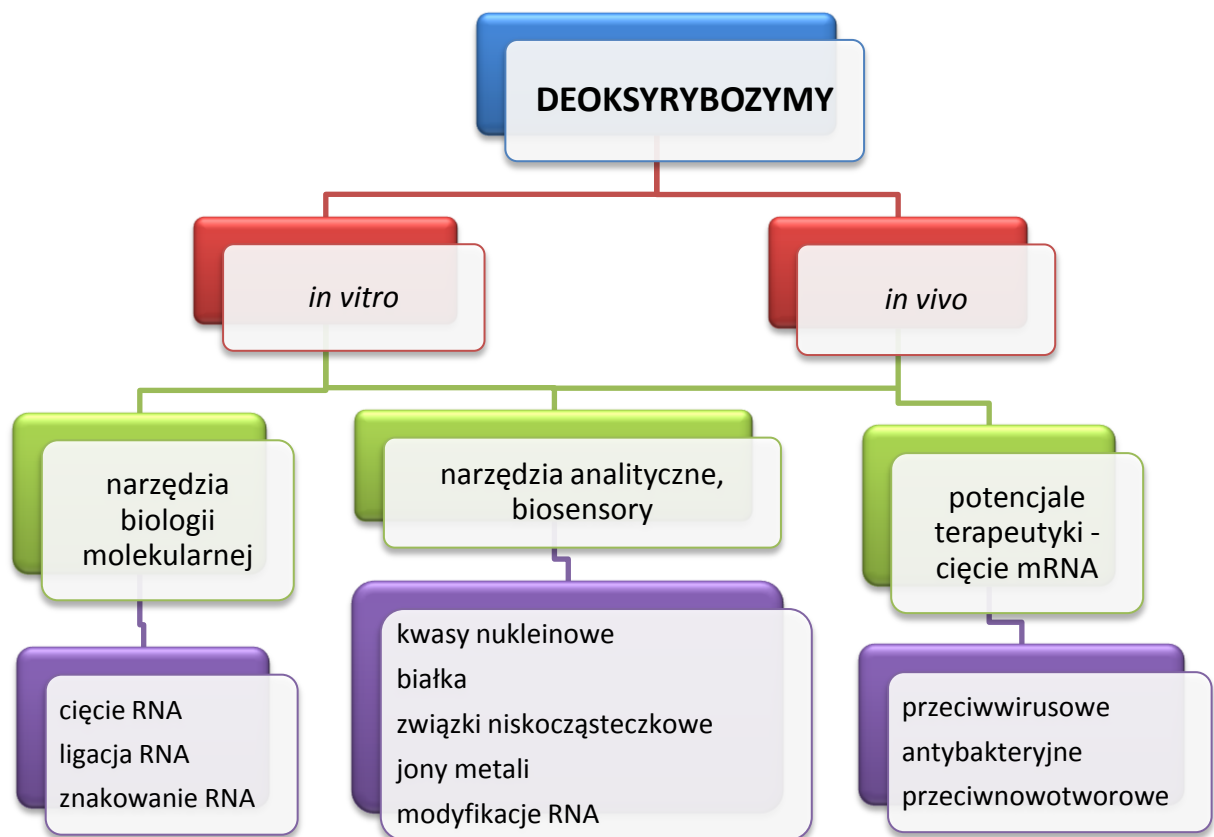
Różnice pomiędzy kwasami nukleinowymi, a białkami są znaczące, co powoduje, że biomolekuły te charakteryzują się innymi właściwościami funkcjonalnymi. Enzymy białkowe wykazują istotnie większą zdolność do katalizowania wielu reakcji. Niemniej jednak, Breaker i wsp. [102] wskazali, że katalityczne cząsteczki kwasów nukleinowych mogą przeprowadzać katalizę równie efektywnie jak enzymy białkowe. Badacze zasugerowali, że rybozomy oraz deoksyrybozomy prowadzą reakcję transestryfikacji wykorzystując kombinację dwóch lub nawet czterech strategii katalitycznych. Jednakże, dotychczas nie otrzymano DNAzymów przecinających cząsteczkę RNA, których aktywność katalityczną można by przyrównać do aktywności katalitycznej enzymów białkowych. Wyjątek stanowi DNAzym 10-23, którego efektywność katalityczna (k_{kat}/K_M) jest wyższa o jeden rząd wielkości od efektywności katalitycznej ryboznukleazy A – niemniej jednak wartość ta określona została w warunkach ściśle laboratoryjnych, gdzie stężenie jonów Mg^{2+} wynosiło 50 mM [6]. Istnieją natomiast deoksyrybozomy katalizujące reakcję metylacji porfiryn, dla których k_{kat} wynosi $3,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [12], natomiast dla przeciwciał katalizujących tą samą reakcję k_{kat} wynosi $2,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [103]. Przedstawione przykłady wskazują na możliwość wykazywania zbliżonej aktywności katalitycznej przez enzymy DNA i enzymy białkowe.

2.5. Możliwości aplikacyjne deoksyrybozymów *in vitro* i *in vivo*

Odkrycie katalitycznych cząsteczek kwasów nukleinowych – rybozymów [1–2] oraz DNAzymów [3] dało szereg możliwości ich praktycznego wykorzystania w wielu dziedzinach. Deoksyrybozomy są atrakcyjnymi kandydatami do zastosowań medycznych m. in. jako narzędzia molekularne o charakterze przeciwnowotworowym [17, 104–105] czy przeciwwirusowym [16, 106–107]. DNAzomy znalazły także szerokie zastosowanie w biotechnologii i nanotechnologii jako biosensory [20, 108–109], urządzenia obliczeniowe [110], tzw. bramki logiczne [111–112] oraz w inżynierii genetycznej i biologii jako specyficzne narzędzia molekularne [18–19].

Histogram przedstawiony na rysunku 8 ilustruje główne nurty potencjalnych możliwości aplikacyjnych deoksyrybozymów. Należy do nich wykorzystanie DNAzymów w systemach *in vitro*, jako narzędzi molekularnych, a także narzędzi analitycznych, pozwalających na detekcję wielu związków m.in. kwasów nukleinowych, białek, związków niskocząsteczkowych, takich jak: ATP, AMP oraz jonów metali [56]. DNAzomy jako narzędzia analityczne czy narzędzia biologii molekularnej mogą być wykorzystywane również w układzie żywej komórki. W systemach *in vivo* deoksyrybozomy konkurują z

rybozymami, enzymami białkowymi, antysensowymi oligonukleotydami oraz interferującymi RNA, jako potencjalne czynniki terapeutyczne charakteryzujące się potencjałem przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym czy antybakteryjnym [36, 113]. Niektóre DNAzy są wykorzystywane w praktyce np. w monitorowaniu skażenia środowiska jako biosensory wykrywające jony UO_2^{2+} [58, 65], czy w laboratoriach jako endorybonukleazy stosowane *in vitro* [18]. Szereg innych DNAzymów przechodzi testy potwierdzające poprawność ich działania.

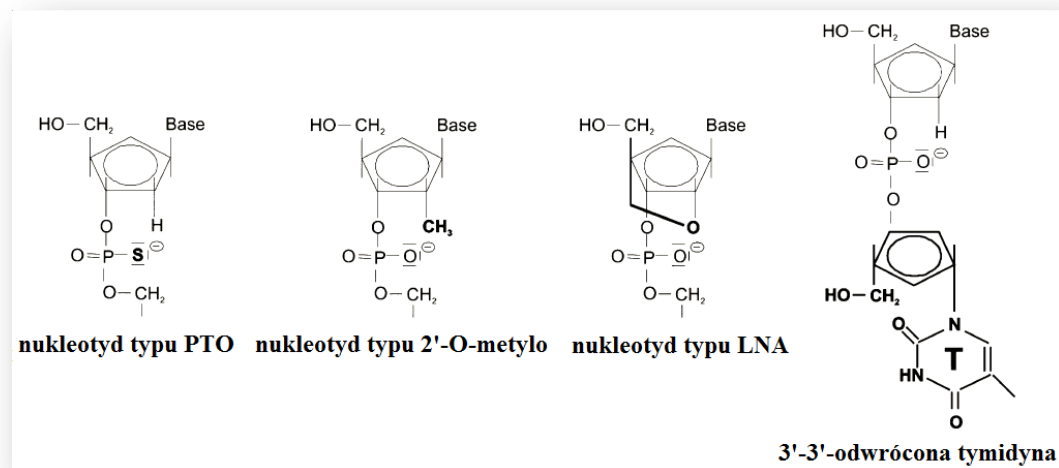


Rysunek 8. Schemat przedstawiający możliwości praktycznego wykorzystania katalitycznych cząsteczek DNA – deoksyrybozymów (na podstawie [25]).

Opisane w literaturze potencjalne możliwości aplikacyjne DNAzymów, począwszy od chemicznych i biochemicznych zastosowań *in vitro*, do ściśle medycznych zastosowań *in vivo*, odnoszą się przede wszystkim do cząsteczek katalizujących reakcję cięcia RNA bądź reakcję ligacji RNA [56, 114]. Większość grup badawczych wykorzystuje dobrze poznane DNAzy 8-17 oraz 10-23. Kilka praktycznych cech obu DNAzymów w znaczący sposób wpływa na ich rosnący potencjał aplikacyjny. Po pierwsze, są one niedużymi, liczącymi około 30 nukleotydów cząsteczkami kwasu deoksyrybonukleinowego, po drugie, wykazują

relatywnie wysoką aktywność katalityczną, a reakcję hydrolizy wiązania fosfodiesterowego prowadzą zarówno w warunkach pojedynczego, jak i wielokrotnego obrotu. Co więcej, w reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego substratem może być cząsteczka kwasu rybonukleinowego, jak również cząsteczka kwasu deoksyrybonukleinowego z wprowadzonym pojedynczym rybonukleotydem, stanowiącym miejsce katalitycznego cięcia. Domeny rozpoznania substratu, zarówno DNAzemu 8-17 i jego wariantów sekwencyjnych, jak i DNAzemu 10-23, tolerują zmiany wprowadzane w obrębie ich sekwencji. To znaczy, że ramiona deoksyrybozymów wiążące substrat mogą być dopasowywane na zasadzie komplementarności zasad do sekwencji potencjalnego substratu. Ponadto, Kurreck [115] wykazał, że wprowadzenie modyfikacji chemicznych w obrębie cząsteczki DNAzemu 10-13 nie tylko zwiększa jego aktywność biologiczną, ale może również obniżać toksyczność w układach *in vivo* (Rys. 9).

Aby zapobiec degradacji deoksyrybozemu przez nukleazy obecne w surowicy, a jednocześnie zwiększyć jego efektywność działania i powinowactwo do docelowego substratu najczęściej stosuje się następujące modyfikacje: wprowadzenie grupy tiofosforanowej PS, w wyniku czego otrzymuje się oligonukleotyd typu PTO (ang. *phosphorothioates*), wykorzystanie nukleotydów typu 2'-O-metylo czy LNA (ang. *locked nucleic acids*), a także 3'-3'-odwróconej tymidyny (Rys. 9).



Rysunek 9. Przykłady modyfikowanych nukleotydów wprowadzanych do łańcucha fosfo-cukrowego katalitycznych cząsteczek DNA (na podstawie [113]).

Grupa tiofosforanowa (PS) wprowadza atom siarki w miejsce niewiążącego atomu tlenu w szkieletcie fosfodiesterowym oligomeru. Sun i wsp. [116] wykazali, że wprowadzenie grupy PS w obrębie domeny wiążącej substrat i w obrębie reszt pirymidynowych trzonu

katalitycznego deoksyrybozemu, umożliwia obniżenie wzrostu komórek glejaka ludzkiego nawet o 90%. Natomiast Schubert i wsp. [117] zaobserwowali spadek szybkości reakcji cięcia katalizowanej przez DNAzym 10-23 po wprowadzeniu nukleotydów typu PTO w obrębie ramion wiążących substrat, tłumacząc to prawdopodobnym obniżeniem powinowactwa. Oligonukleotydy typu 2'-O-metylo są powszechnie stosowane w strategii antysensowej. Modyfikacja ta poza zwiększeniem odporności na degradację oligonukleotydu nukleazami, powoduje także wzrost stabilności dupleksów tworzonych podczas hybrydyzacji DNAzemu z docelowym substratem. Shoji i wsp. [118] po wprowadzeniu do sekwencji DNAzemu nukleotydów typu 2'-O-metylo zaobserwowali wzrost jego hydrofobowości oraz łatwiejszą dyfuzję przez błony komórkowe. Odnotowano także istotny wzrost powinowactwa DNAzemu DH5 do substratu oraz wzrost szybkości katalizowanej reakcji w warunkach pojedynczego obrotu, po wprowadzeniu nukleotydów typu 2'-O-metylo oraz nukleotydów typu LNA [117]. Sioud i Leirdal [119] wykazali, że wprowadzenie do sekwencji badanych DNAzymów 3'-3'-odwróconej tymidyny nie powoduje zmian w aktywności katalitycznej, natomiast skutkuje 6-krotnym wzrostem jego stabilności.

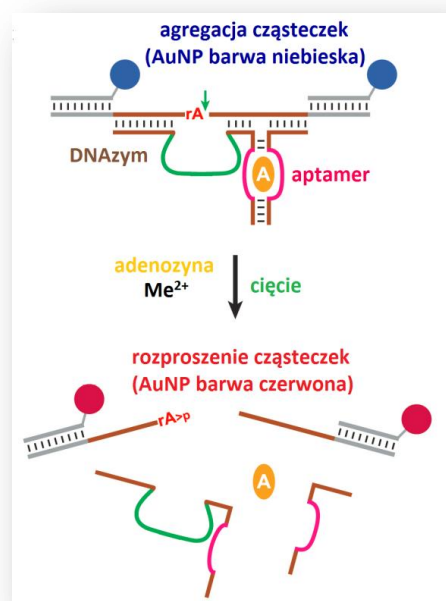
2.5.1. DNAzemy jako selektywne biosensory

Katalityczne cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego stanowią doskonały materiał do konstrukcji biosensorów. Wykazują wysoką specyficzną względem docelowej cząsteczki i tym samym mogą być wykorzystane jako element rozpoznający MRE (ang. *molecular recognition element*) sensora [79]. DNAzemy są konkurencyjne w stosunku do powszechnie wykorzystywanych w konstrukcji biosensorów enzymów białkowych czy przeciwciał. Wynika to nie tylko z wspomnianej wcześniej wysokiej specyficznosci wiązania docelowej cząsteczki, ale także z wysokiego powinowactwa, stabilności, niskiej zmienności, łatwości wprowadzania chemicznych modyfikacji oraz niskich kosztów produkcji. Limit detekcji DNAzymów sięga 45 pM, a selektywność wobec danego analitu, w tym przypadku wobec jonów UO_2^{2+} jest milion-krotnie większa niż wobec innych jonów metali [20]. Co więcej, aktywność katalityczna deoksyrybozymów może być regulowana przez różne cząsteczki, w zależności od tego jaki związek był czynnikiem selekcyjnym podczas otrzymywania DNAzemu w procesie selekcji *in vitro*. Z powodzeniem wykorzystano DNAzemy do wykrywania analitów takich jak kwasy nukleinowe [120], białka np. streptawidyna [121], czy związki niskocząsteczkowe np. ATP [122], adenozyyna [123].

2.5.1.1. Detekcja związków niskocząsteczkowych

Biosensory wykrywające związki niskocząsteczkowe powstały w wyniku połączenia sekwencji DNAzymu z cząsteczką aptameru. Uzyskano w ten sposób allosteryczne DNAzymy [123]. Allosteryczny biosensor pozwalający na oznaczenie obecności adenozyiny został skonstruowany przy wykorzystaniu DNAzymu 8-17 oraz aptameru wykazującego powinowactwo do adenozyiny (Rys. 10).

Aktywność allosterycznego DNAzymu jest regulowana przez kompleks aptamer – cząsteczka docelowa. Związanie ligandu powoduje zmiany w konformacji domeny aptamerowej co prowadzi do stabilizacji deoksyrybozymu [124]. Nic sekwencyjna DNAzymu wiąże nic sekwencyjną substratu tylko wówczas, gdy wprowadzona zostanie cząsteczka adenozyiny (oznaczona na pomarańczowo na rys. 10), która jest odpowiednio wiązana przez domenę aptamerową. Następnie, po wprowadzeniu jonów metali dochodzi do cięcia i rozpadu allosterycznego DNAzymu. Reakcję można monitorować na podstawie zmian koloru nanocząsteczek złota (AuNP – ang. *Au nanoparticles*), z niebieskiego (stan agregacji cząsteczek) na czerwony (stan rozproszenia cząsteczek), związanych nicią DNAzymu (Rys. 10) [123].



Rysunek 10. Allosteryczny biosensor wykrywający adenozyinę. Sensor działa w oparciu o kolorymetryczny system detekcji, który wykorzystuje nanocząsteczki złota – AuNP, zmieniające zabarwienie w wyniku zajścia hydrolizy wiązania fosfodiesterowego. Strzałka określa miejsce katalicznego cięcia, rA – rybonukleotyd adeniny, A – adenozyina (na podstawie [56]).

2.5.1.2. Detekcja modyfikacji chemicznych w cząsteczkach RNA

Co ciekawe, DNAzyny są także wykorzystywane jako narzędzia analityczne, pozwalające na detekcję różnego rodzaju modyfikacji chemicznych w cząsteczkach RNA. Bucchhaupt i wsp. [125] zaobserwowali, że 2'-O-metylowane reszty rybozy w miejscu cięcia uniemożliwiają zajście hydrolizy wiązania fosfodiesterowego katalizowanej przez DNAzym. Obserwację tą wykorzystano do jakościowej oceny obecności 2'-O-metylowanej rybozy w 18S rRNA oraz 25S rRNA *Saccharomyces cerevisiae*. Docelowe cząsteczki RNA stanowiące substrat dla wprowadzanego DNAzemu ulegały przecięciu tylko wtedy gdy pochodziły od mutantu *Saccharomyces cerevisiae*, który nie posiadał specyficznego małego jąderkowego RNA – snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) odpowiedzialnego za metylację RNA. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że deoksyrybozomy mogą służyć jako narzędzia identyfikujące 2'-O-metylowaną rybozę [114]. DNAzyny wykorzystywane są także do detekcji innych, modyfikowanych nukleotydów w RNA takich jak pseudourydyna (Ψ) czy C5- metylocytozyna (m^5C) [126].

2.5.1.3. Wykrywanie jonów metali – fluorescencyjny system detekcji

Większość dotychczas otrzymanych katalitycznych cząsteczek DNA do swojej aktywności katalitycznej wymaga kofaktorów w postaci jonów metali dwuwartościowych. Zatem zastosowanie DNAzymów jako elementu rozpoznającego (MRE) w konstrukcji biosensorów wykrywających toksyczne jony metali, jest jedną z najczęściej wykorzystywanych możliwości aplikacyjnych DNAzymów. Jony metali pełnią niezwykle ważną rolę biologiczną w środowisku i życiu człowieka. Wiele z nich uważa się za ważne mikro- oraz makroelementy na przykład jony: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} i Cr^{3+} , których zawartość w ciele człowieka ma wpływ na stan zdrowia danej osoby. Część jonów, szczególnie metali ciężkich, stanowi poważne zagrożenia dla środowiska. Jony metali ciężkich są wysoce toksyczne dla wszystkich organizmów żywych, a możliwości ich kumulacji w organizmie wielokrotnieją i nasilają ich toksyczne działanie. W miastach i przy drogach o wysokim natężeniu ruchu bada się przede wszystkim stężenie jonów Pb^{2+} . Wysoce toksycznymi jonami są również Hg^{2+} , UO_2^{2+} oraz Cd^{2+} . Zatem kontrola obecności i ilości jonów metali w środowisku jest konieczna. Obecnie, większość analiz dotycząca oznaczeń jonów metali wykonywana jest w oparciu o techniki takie jak: absorpcyjna spektrometria atomowa, anodowa voltamperometria strippingowa, spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną, spektrometria fluorescencji rentgenowskiej czy mikrosondowanie. Wymaga to laboratoriów

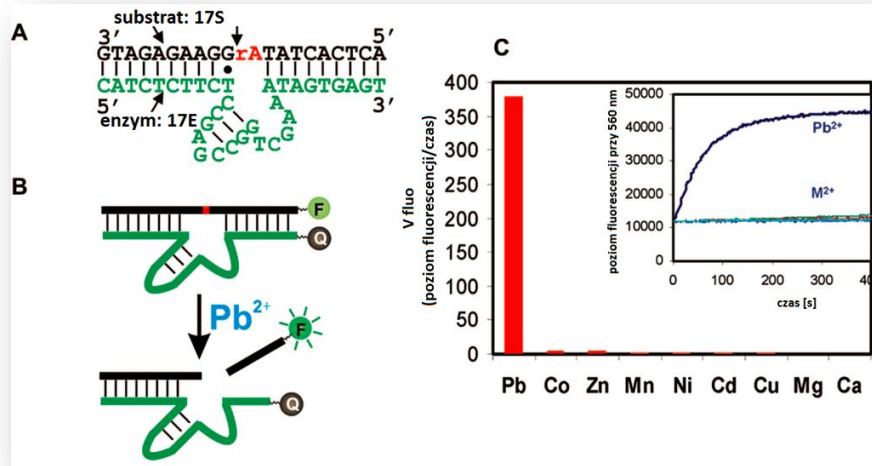
wyposażonych w odpowiedni sprzęt i wykwalifikowanych pracowników [7]. Mimo, że powyższe techniki wykazują wysoki stopień czułości i umożliwiają detekcję jonów metali nawet na poziomie niższym niż poziom ppb (ang. *parts per billion*), to wymagają odpowiedniego przygotowania próbki i co najistotniejsze, nie pozwalają na wykonanie pomiaru w miejscu poboru próbki i w czasie rzeczywistym [14].

W związku z powyższym, w wielu dziedzinach, w tym w monitorowaniu środowiska, kontroli jakości żywności i farmaceutyków, zarządzaniu ściekami oraz toksykologii klinicznej wzrosło zapotrzebowanie na nowoczesne, proste w użyciu biosensory o wysokiej selektywności wykrywające jony metali w czasie rzeczywistym [25]. Biosensory, których element rozpoznający (MRE) stanowią sztucznie otrzymane katalityczne cząsteczki DNA stanowią relatywnie nową grupę sensorów pozwalających na detekcję jonów metali.

Biosensor 17E wykrywający jony Pb^{2+}

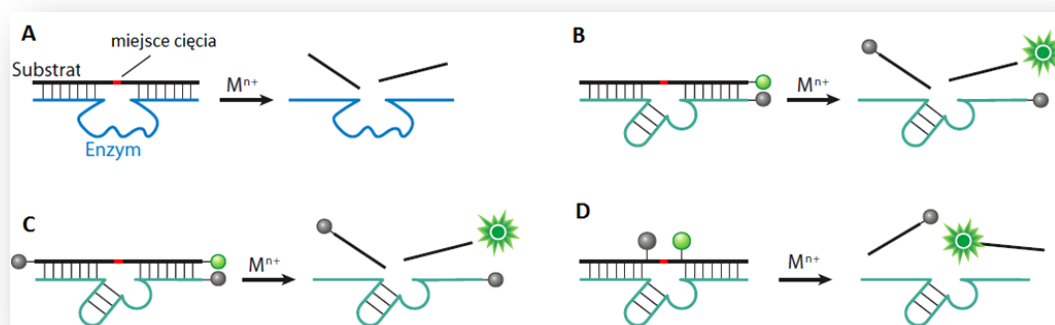
Do konstrukcji pierwszego biosensora metalozależnego opartego o DNAzym Li i Lu [127] wykorzystali DNAzym 17E, będący wariantem sekwencyjnym typu 8-17 aktywnym w obecności jonów Pb^{2+} (Rys. 11A). System detekcji aktywności biosensora oparty był o pomiar zmian fluorescencji. Do końca 5' substratu 17S przyłączony został kowalencyjnie fluorofor (F): 6-carboksytetrametylrodamina (TAMRA), natomiast do końca 3' nici DNAzymu 17E wygaszacz (Q): Dabcyl. Sensory wyznakowane w taki sposób określane są jako sondy MB (ang. *molecular beacon*). Kiedy znacznik fluorescencyjny znajdował się w niewielkiej odległości od wygaszacza, następowało wygaszanie fluorescencji emitowanej przez fluorofor na skutek zjawiska FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). Taka sytuacja miała miejsce w momencie, gdy nić sekwencyjna substratu pozostawała związana z nieaktywnym deoksyrybozymem. Natomiast po dodaniu jonów Pb^{2+} , DNAzym ulegał aktywacji i następowała hydroliza wiązania fosfodiestrowego substratu. Dochodziło wówczas do zwiększenia odległości pomiędzy znacznikiem fluorescencyjnym a wygaszaczem, wynikiem czego była mierzalna emisja światła fluorescencji przez fluorofor (Rys. 11B i 12B). Obserwowany w wyniku reakcji wzrost fluorescencji w obecności jonów Pb^{2+} w temperaturze 4°C wyniósł ok. 300%. Limit detekcji był w granicach 10 nM czyli był 7-krotnie niższy od dopuszczalnego poziomu jonów Pb^{2+} w wodzie pitnej według Agencji Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych (EPA – ang. *Environmental Protection Agency*). Co więcej, otrzymany biosensor wykazywał 80-krotnie niższą selektywność wobec jonów Zn^{2+} i Co^{2+} oraz 1000-krotnie niższą wobec innych jonów metali, np. Mg^{2+} czy Ca^{2+} (Rys. 11C) [22].

Niemniej jednak, podczas pomiarów prowadzonych w temperaturze 4°C dochodziło do istotnego wzrostu fluorescencji tła, a wzrost poziomu fluorescencji pochodzącej z przecięcia substratu odpowiadał 60%.



Rysunek 11. Katalityczny biosensor Pb²⁺-zależny typu sondy MB (ang. *molecular beacon*) **A)** Struktura drugorzędowa DNAzymu **B)** Sposób powstawania sygnału analitycznego **C)** Selektywność biosensora Pb²⁺-zależnego (na podstawie [22]).

Aby zminimalizować sygnał pochodzący od tła Liu i Lu [128] wprowadzili dodatkową czasteczkę wygaszacza na końcu 3' substratu (Rys. 12C). Zmodyfikowany w ten sposób biosensor wykazywał 10-krotny wzrost fluorescencji wynikający z przecięcia substratu w stosunku do poziomu fluorescencji osiągniętego przez sensor pierwszej generacji (Rys. 12B) w temperaturze pokojowej. Nowy biosensor z podwójnym wygaszaczem wykrywał jony Pb²⁺ o stężeniu 6 μM, w obecności których odnotowywano 600% wzrost poziomu fluorescencji.

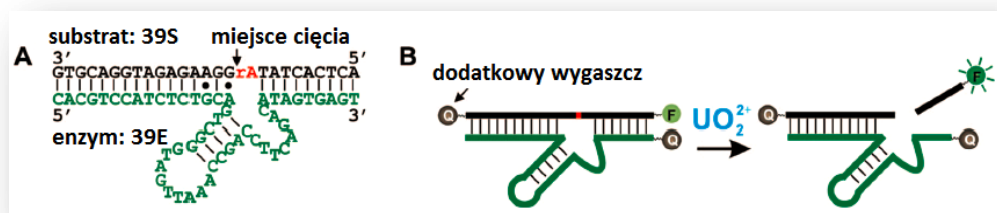


Rysunek 12. Modele DNAzymów, jako fluorescencyjnych biosensorów wykrywających jony metali **A)** Ogólny schemat reakcji cięcia RNA katalizowanej przez DNAzymy **B–D)** Schematy przedstawiające możliwości rozmieszczenia fluoroforu (oznaczony na zielono) oraz wygaszacza (oznaczony na szaro) (na podstawie [20]).

Detekcja optyczna z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji jest jednym z najczęściej stosowanych podejść eksperymentalnych, pozwalających na otrzymanie mierzalnego sygnału analitycznego [129]. Mechanizm funkcjonowania fluorescencyjnego systemu optycznego oparty na zjawisku FRET jest stosunkowo prosty i pozwala na konstruowanie różnych biosensorów charakteryzujących się odmiennym położeniem znaczników fluorescencyjnych oraz wygaszaczy (Rys. 12B–D).

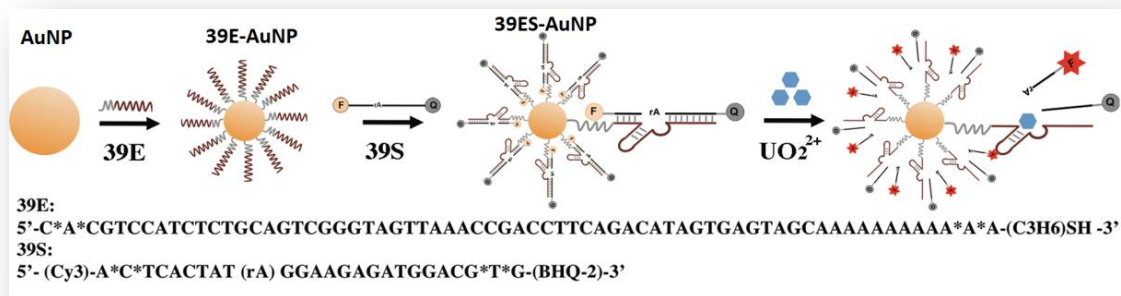
DNAzym UO_2^{2+} -zależny, biosensor o wysokiej czułości

Liu i współpracownicy [58] otrzymali wysoce czuły biosensor wykrywający jony UO_2^{2+} na poziomie 45 pM w roztworze (Rys. 13). Limit detekcji otrzymanego biosensora był ok. 10-krotnie niższy od limitu detekcji jonów UO_2^{2+} w metodzie instrumentalnej – spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS – ang. *inductively coupled plasma - mass spectrometry*) [14]. Poza wysoką czułością, sensor ten wykazuje milionkrotnie wyższą selektywność w stosunku do jonów UO_2^{2+} niż do innych jonów metali [65].



Rysunek 13. Katalityczny biosensor UO_2^{2+} -zależny typu sondy MB (ang. *molecular beacon*) z podwójnym wygaszaczem **A**) Struktura drugorzędowa DNAzymy **B**) Sposób powstawania sygnału analitycznego; Q – wygaszcz, F – fluorofor (na podstawie [22]).

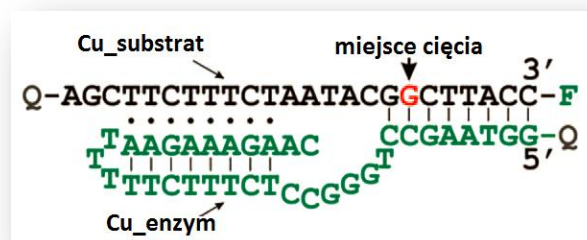
Do konstrukcji biosensora wykorzystano DNAzym 39E, który posiada asymetryczne ramiona wiążące substrat. Nić sekwencyjna DNAzymy posiadała na końcu 3' wygaszcz, natomiast nić sekwencyjna substratu na końcu 5' fluorofor zaś na końcu 3' posiadała drugi wygaszcz (Rys. 13). System z użyciem podwójnego wygaszacza zapewniał obniżenie sygnałów pochodzących od tła. Biosensor 39E został wykorzystany do oznaczeń zawartości jonów UO_2^{2+} w skażonych próbkach gleby [58]. Co więcej, Wu i wsp. [130] unieruchomili katalityczny biosensor UO_2^{2+} -zależny na 13 nm nanocząsteczkach złota – AuNP, co pozwoliło na detekcję jonów UO_2^{2+} w linii komórkowej HeLa (Rys. 14).



Rysunek 14. Katalityczny biosensor UO_2^{2+} -zależny immobilizowany na nanocząsteczkach złota działający w systemie *in vivo* (na podstawie [130])

Detekcja jonów Cu^{2+} – biosensor typu *molecular beacon*

Jednym z większych wyzwań było otrzymanie biosensora aktywnego w obecności jonów paramagnetycznych np. jonów Cu^{2+} . Jony tego typu posiadają zdolność do wygaszania fluorescencji. Jednym ze sposobów pozwalających na otrzymanie biosensora aktywnego w obecności jonów Cu^{2+} było przestrzenne odseparowanie miejsca wiązania jonu od miejsca związania fluoroforu [22]. Liu i Lu [131] otrzymali biosensor typu MB (ang. *molecular beacon*) o wysokiej selektywności i czułości wobec jonów Cu^{2+} (Rys. 15). Biosensor wykazywał 13-krotny wzrost poziomu fluorescencji podczas inkubacji z jonami Cu^{2+} . Selektywność w obecności jonów Fe^{2+} i UO_2^{2+} była ponad 2000-razy mniejsza od selektywności wobec jonów Cu^{2+} (Rys. 15). Limit detekcji na poziomie 35 nM pozwala na dokładne oznaczanie zawartości jonów Cu^{2+} , których dopuszczalny poziom określony przez Agencję Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych (EPA) wynosi 20 μM [20].



Rysunek 15. Selektywność katalitycznego biosensora Cu^{2+} -zależnego. Q – oznacza wygaszacz, F – oznacza fluorofor. Na czerwono oznaczono miejsce katalitycznego cięcia (na podstawie [131]).

Większość opisanych sensorów działających w oparciu o fluorescencyjny system detekcji wykorzystuje schemat z podwójnym wygaszaczem w celu minimalizacji sygnałów tła. Niemniej jednak, Chiuman i Li [132] aby wyeliminować problem wysokiego tła

wprowadzili wygaszacz oraz fluorofor bezpośrednio przy miejscu cięcia. Rozwiązanie to pozwoliło uzyskać 85-krotny wzrost poziomu fluorescencji przy 75% stopniu przecięcia substratu, aczkolwiek szybkość katalizowanej reakcji spadła. Grupa badawcza Li i wsp. [133] otrzymała DNAzomy aktywne w niskim pH środowiska, wymagające do aktywności katalitycznej także wybranych jonów metali, już na etapie prowadzonego eksperymentu selekcji *in vitro* wprowadzała znacznik fluorescencyjny oraz wygaszacz bezpośrednio przy miejscu katalitycznego cięcia.

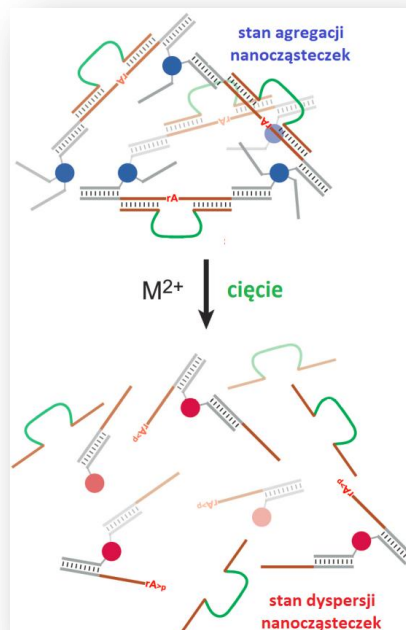
Na przestrzeni ostatnich kilku lat pojawiły się coraz to nowe, ulepszone biosensory wykorzystujące katalityczne cząsteczki DNA jako element rozpoznający (MRE). DNAzomy katalizujące reakcję hydrolizy wiązania fosfodiesterowego RNA są najczęściej wykorzystywane w konstrukcji biosensorów. Niemniej jednak, DNAzomy katalizujące reakcję ligacji RNA, a także DNAzomy o aktywności peroksydazy czy też inne warianty przyjmujące strukturę G-kwadrupleksów również znalazły zastosowanie w systemach detekcji opartych o biosensory [134].

2.5.1.4. DNAzomy metalozależne – kolorymetryczny system detekcji

Obok fluorescencyjnego systemu detekcji, który charakteryzuje się wysoką czułością oraz pozwala na odczyt w czasie rzeczywistym czy obrazowanie *in vivo*, szerokie zastosowanie w konstrukcji biosensorów wykorzystujących DNAzomy znalazł także system optyczny oparty o przetworniki kolorymetryczne [20]. System kolorymetryczny charakteryzuje się przede wszystkim prostotą pomiaru, wysoką czułością oraz niskimi kosztami prowadzonej analizy. Co więcej, jest niezwykle praktyczny, gdyż pomiar można wykonać w miejscu pobrania próbki. Wymogiem tego typu analizy jest konieczność użycia cząsteczek, które dają barwną reakcję w wyniku związania docelowej cząsteczki z biosensorem np. nanocząsteczek złota (AuNP). Nanocząsteczki złota posiadają charakterystyczne właściwości optyczne ulegające zmianom w wyniku ich agregacji bądź dyspersji [14, 56]. Na rysunku 16 przedstawiony został ogólny schemat działania biosensora kolorymetrycznego.

Nici docelowego substratu zostaje wydłużona z obydwu końców o fragmenty komplementarne do 12-nukleotydowych odcinków DNA immobilizowanych na nanocząsteczkach złota. Następnie ma miejsce hybrydyzacja AuNP do nici substratu, który wiąże się także z nicią sekwencyjną deoksyrybozemu na zasadzie komplementarności. W wyniku utworzenia kompleksu enzym–substrat dochodzi do agregacji nanocząsteczek złota,

objawiające się niebieskim zabarwieniem próby. Po wprowadzeniu jonu metalu, np. jonów Pb^{2+} dochodzi do hydrolizy substratu w miejscu katalitycznego cięcia, a tym samym do rozproszenia agregatu oraz zmiany koloru próby z niebieskiej na czerwoną, charakterystycznej dla stanu dyspersji nanocząsteczek złota [22]. Kolorymetryczny system detekcji został wykorzystany w konstrukcji biosensorów aktywnych w obecności jonów Pb^{2+} , Cu^{2+} czy UO_2^{2+} [20].



Rysunek 16. Mechanizm działania biosensorów metalozależnych wykorzystujących nanocząsteczki złota (AuNP), jako elementy kolorymetrycznego systemu detekcji (na podstawie [56]).

2.5.2. DNAzyny – potencjalne terapeutyki

Zdolność deoksyrybozymów do specyficznej hydrolizy wiązania fosfodiesterowego cząsteczek RNA w symulowanych warunkach fizjologicznych sprawiła, że DNAzyny stały się potencjalnymi narzędziami terapeutycznymi. Mogą one pełnić funkcję enzymów restrykcyjnych oraz nukleaz, zaprojektowanych w celu hamowania ekspresji genów niepożądanych białek na poziomie mRNA [56, 88].

Większość dotychczas opisanych możliwości aplikacyjnych w systemach *in vivo* dotyczy deoksyrybozymu 10-23 [6]. Wiąże się to przede wszystkim z faktem, że jest to jeden z najszerzej opisanych i szczegółowo scharakteryzowanych, pod kątem właściwości katalitycznych, struktury i funkcji DNAzymów. Co istotne, jego efektywność katalityczna w warunkach, w których stężenie jonów Mg^{2+} było na poziomie 2 mM, czyli zbliżone do

stężenia panującego w komórce, wyniosła $3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Pozostałe cechy DNAzemu 10-23 przemawiające za jego wykorzystaniem jako potencjalnego terapeutyka, zostały opisane w rozdziale 2.5 (strony 42–43). Niestety, DNAzym ten hydrolizuje tylko wiązanie typu puryna–pirymidyna w obrębie nici substratu [80, 92–93], co może narzucać pewne ograniczenia w przypadku niektórych zastosowań funkcjonalnych. Niemniej jednak, z roku na rok rośnie liczba doniesień literaturowych, które wskazują na duży potencjał katalitycznych cząsteczek DNA w działaniu antybakteryjnym, przeciwnowotworowym oraz przeciwwirusowym. Efektywność działania DNAzymów oceniana jest zazwyczaj na podstawie testów z wykorzystaniem linii komórkowych, jak również testów prowadzonych na modelach zwierzęcych [56]. W tabeli 5 przedstawiony został szeroki zakres zastosowań DNAzymów do hamowania ekspresji genów w kontekście działań terapeutycznych [36, 113].

Tabela 5. Zastosowanie deoksyrybozymów jako potencjalnych terapeutyków (na podstawie [36, 113]).

GENY KODUJĄCE DOCELOWE CZĄSTECZKI RNA ULEGAJĄCE KATALITYCZNEMU CIĘCIU W OBECNOŚCI DNAzymów
gen białka Egr1, czynnika transkrypcyjnego z domeną „palca cynkowego”
gen letalnego białka transbłonowego – wirus Epstein-Barr
gen białka X – HBV
gen białek antygenowych HBs i HBe – HBV
gen białka rdzeniowego – HCV
gen <i>gag</i> białka kapsydu – HIV-1
gen białka Tat – HIV-1
gen białka PB2 – wirus grypy typu A
gen białka N nukleokapsydu – syncycjalny wirus układu oddechowego
gen fuzyjny białka PML/RAR α – ostra białaczka promielocytowa
gen ludzkiej telomerazy działającej jako odwrotna transkryptaza
gen liazy izocytrynianowej <i>M. tuberculosis</i>
gen β -laktamazy
gen białka kodującego penicylinę (PBP)
gen 12-lipooksygenazy
gen białka Twist, czynnika transkrypcyjnego z motywem „helisa-pętla-helisa”
gen białka c-Jun, czynnika transkrypcyjnego z motywem „zamka leucynowego”

Spośród wielu kierunków badań prowadzonych z wykorzystaniem deoksyrybozymów hydrolizujących wiązanie fosfodiesterowe w RNA kluczową rolę odgrywają te, które dotyczą hamowania ekspresji genów białek wirusowych m. in. wirusa zapalenia wątroby typu B i C, wirusa grypy, wirusa HIV1, a także białek związanych z procesami kancerogenezy.

W przypadku procesu nowotworzenia, DNAzyny mogą być wykorzystywane pod kątem inhibicji proliferacji komórek nowotworowych, modulacji procesu apoptozy, inhibicji procesu adhezji komórek i angiogenezy oraz zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na radioterapię [15].

Pierwszy deoksyrybozym skierowany przeciwko komórkom nowotworowym, który hamował proces ich proliferacji, został opisany w 1999 przez Wu i wsp. [135]. Badacze wykorzystali trzy warianty DNAzyny 10-23 komplementarne do dwóch wariantów mRNA genu *p210-bcr-alb* oraz do mRNA genu *p190* w komórkach K562. Obecność genu *bcr-alb* została potwierdzona u ponad 95% pacjentów z chroniczną białaczką szpikową. DNAzyny inhibowały ekspresję genu *p210bcr-alb* w 40% oraz ograniczały wzrost komórek w 50% przez okres 6 dni. Wprowadzenie pojedynczej mutacji w obrębie konserwatywnego nukleotydu regionu katalitycznego DNAzyny powodowało utratę jego zdolności hamujących ekspresję genu *bcr-alb* [104]. Potwierdziło to wysoką specyficzność działania zaprojektowanych deoksyrybozymów.

Zaburzenia w procesie apoptozy odgrywają kluczową rolę w kancerogenezie. Białkami kontrolującymi proces apoptozy są kaspazy, rodzina białek Bcl-2 oraz białka inhibujące proces apoptozy np. surwiwina. Liang i wsp. [136] zaobserwowali wyraźny wzrost apoptozy oraz istotną inhibicję wzrostu komórek linii nowotworu trzustki po wprowadzeniu DNAzyny nakierowanego na surwiwinę.

Wzrost litego guza oraz powstawanie odległych przerzutów wymaga ciągłej angiogenezy. Proces angiogenezy jest stymulowany przez czynniki wzrostu – cytokiny angiogenne, m.in. czynnik wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). Deoksyrybozym nakierowany na substrat – receptor VEGFR-2 efektywnie go przecinał, co powodowało zahamowanie proliferacji komórek śródbłonna i wzrostu guza [137]. Oprócz tego, DNAzym Dz13 nakierowany na mRNA genu *c-jun*, także znacząco inhibował proliferację komórek śródbłonna i migrację, co ograniczało angiogenezę nowotworową oraz dalszy wzrost guza litego [138].

Potencjalne, terapeutyczne właściwości deoksyrybozymów nie ograniczają się tylko do inhibicji ekspresji genów białek związanych z procesem nowotworzenia. Zarówno

DNAzym 10-23 jak i DNAzym 8-17 efektywnie hamowały ekspresję genu *gag*, kodującego białka kapsydu HIV-1 [139]. Potwierdzona została także aktywność DNAzymu 10-23 skierowana na gen białka Env w systemie *in vitro*. DNAzym tego typu komplementarny do sekwencji pętli V3 mRNA kodującego białko Env wirusa powodował zahamowanie replikacji wirusa oraz procesu infekcji [140]. Deoksyrybozomy wykorzystano także do inhibicji ekspresji genów fuzyjnych białek wirusa żółtaczkę typu B (HBV) z lucyferazą [141]. Inne DNAzomy wykazywały także zdolność 30% inhibicji translacji genów HCV, zależnej od elementu IRES (ang. *internal ribosome entry site*), w komórkach Huh-7 [142].

Podczas badań dotyczących antybiotykooporności *Staphylococcus aureus* wykazano, że DNAzym 10-23 nakierowany na mRNA genu kodującego enzym – β -laktamazę, hydrolizujący wiązanie β -laktamowe w cząsteczce antybiotyku oraz nakierowany na mRNA genu kodującego białko wiążące penicylinę – PBP (ang. *penicillin binding protein*), biorące udział w syntezie ściany komórkowej, obniża poziom docelowych cząsteczek mRNA, jak również liczbę jednostek tworzących kolonie – CFUs (ang. *colony forming units*) [36].

Powyżej opisane zostały jedynie wybrane przykłady wykorzystania deoksyrybozymów do hamowania ekspresji genów związanych z różnego typu infekcjami wirusowymi czy kancerogenezą. Niemniej jednak, spektrum możliwości aplikacyjnych DNAzymów jako potencjalnych terapeutyków jest znacznie szersze, o czym świadczą dane zamieszczone w tabeli 5.

3. Wyniki

3.1. Otrzymywanie DNAzymów pH-zależnych metodą selekcji *in vitro*

Metoda selekcji *in vitro* (SELEX – ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) jest strategią badawczą, która została opracowana w drugiej połowie lat osiemdziesiątych. Z powodzeniem wykorzystywana jest do badań cząsteczek biopolimerów: kwasów nukleinowych, oligopeptydów, a także niskocząsteczkowych związków chemicznych. Metoda selekcji *in vitro*, inaczej mówiąc selekcji kombinatorycznej, polega na wydzieleniu spośród licznej puli cząsteczek takich wariantów, które posiadają oczekiwane właściwości biochemiczne, w sposób analogiczny do naturalnych mechanizmów ewolucyjnych [44, 53]. Początkowy, a zarazem kluczowy etap procesu selekcji kombinatorycznej, polega na skonstruowaniu na drodze syntezy chemicznej odpowiednio licznej biblioteki cząsteczek, w której obecne są warianty o pożądanym właściwościach. Kolejny etap to właściwa selekcja, według ustalonego kryterium, prowadząca do oddzielenia cząsteczek aktywnych, wykazujących oczekiwane właściwości, od nieaktywnych. Wyselekcjonowane cząsteczki są powielane i wzbogacona, nowa biblioteka kombinatoryczna jest wprowadzana do kolejnego cyklu. Po kilku-, kilkunastu powtórzonych cyklach selekcji, warianty obecne w otrzymanej puli cząsteczek są identyfikowane. Następnie, przeprowadzane są badania wybranych wariantów pozwalające na określenie ich właściwości, a przede wszystkim stopnia w jakim spełniają ustalone wcześniej kryterium selekcji [62].

3.1.1. Otrzymywanie biblioteki kombinatorycznej DNAzymów

Pierwszy etap moich badań miał na celu otrzymanie wyjściowej biblioteki kombinatorycznej DNAzymów. Przeanalizowałam trzy różne strategie konstrukcji bibliotek kombinatorycznych stosowanych do otrzymywania DNAzymów [56]. Wybrana została strategia, w której region sekwencji zdegenerowanej (tzw. region *random*; w którym w każdej pozycji łańcucha oligonukleotydowego obecne są wszystkie cztery podstawowe nukleotydy) zlokalizowany jest w przewidywanej strukturze drugorzędowej DNAzymów naprzeciw pojedynczego wiązania fosfodiesterowego typu rybo, będącego miejscem katalitycznego cięcia. Region ten z obydwu stron ograniczony jest segmentami dwuniciowymi DNA (Rys. 17). Zaplanowałam syntezę biblioteki kombinatorycznej z regionem *random* o długości 23 nukleotydów, co odpowiada $0,7 \times 10^{13}$ różnych wariantów sekwencyjnych cząsteczek DNA.

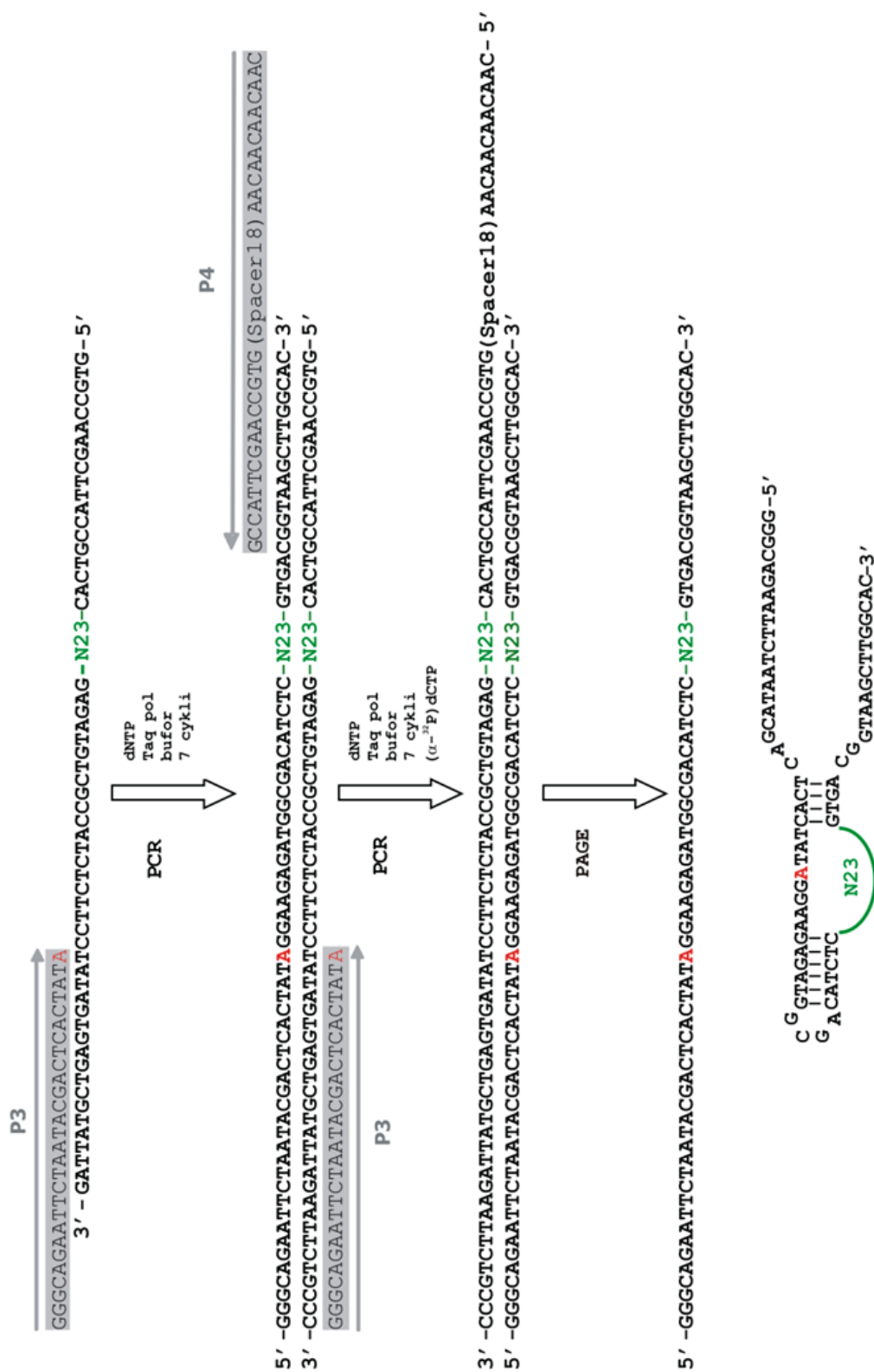
Na rysunku 17 przedstawiony został schemat syntezy biblioteki kombinatorycznej. W pierwszym etapie otrzymałam dsDNA odpowiadający pełnej długości DNAzymom poprzez wykorzystanie wypełniającej reakcji PCR z użyciem dwóch oligomerów otrzymanych na drodze syntezy chemicznej, jednego zawierającego odcinek sekwencji *random* oraz komplementarnego do jego końca 3' oligomeru P3 zawierającego rybonukleotyd adeniny, jako miejsce katalicznego cięcia. Następnie, pulę DNAzymów poddawałam znakowaniu izotopem ^{32}P w kolejnej reakcji PCR z wykorzystaniem oligomerów P3 i P4 oraz radioaktywnego deoksyrybonukleotydu $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Jednoniciowe warianty otrzymałam poprzez rozdzielenie nici DNA za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Oligomer P4 zawiera łącznik składający się z 18 reszt glikolu etylenowego, zatem łatwo było wybrać krótszą, 90-nukleotydową nić DNA o sekwencji DNAzymu, wykorzystując różnice w mobilności elektroforetycznej obydwu nici DNA. Po wycięciu z żelu, pulę DNAzymów odzyskiwałam na drodze elucji.

3.1.2. Procedura selekcji DNAzymów prowadzona w obecności jonów Cd^{2+}

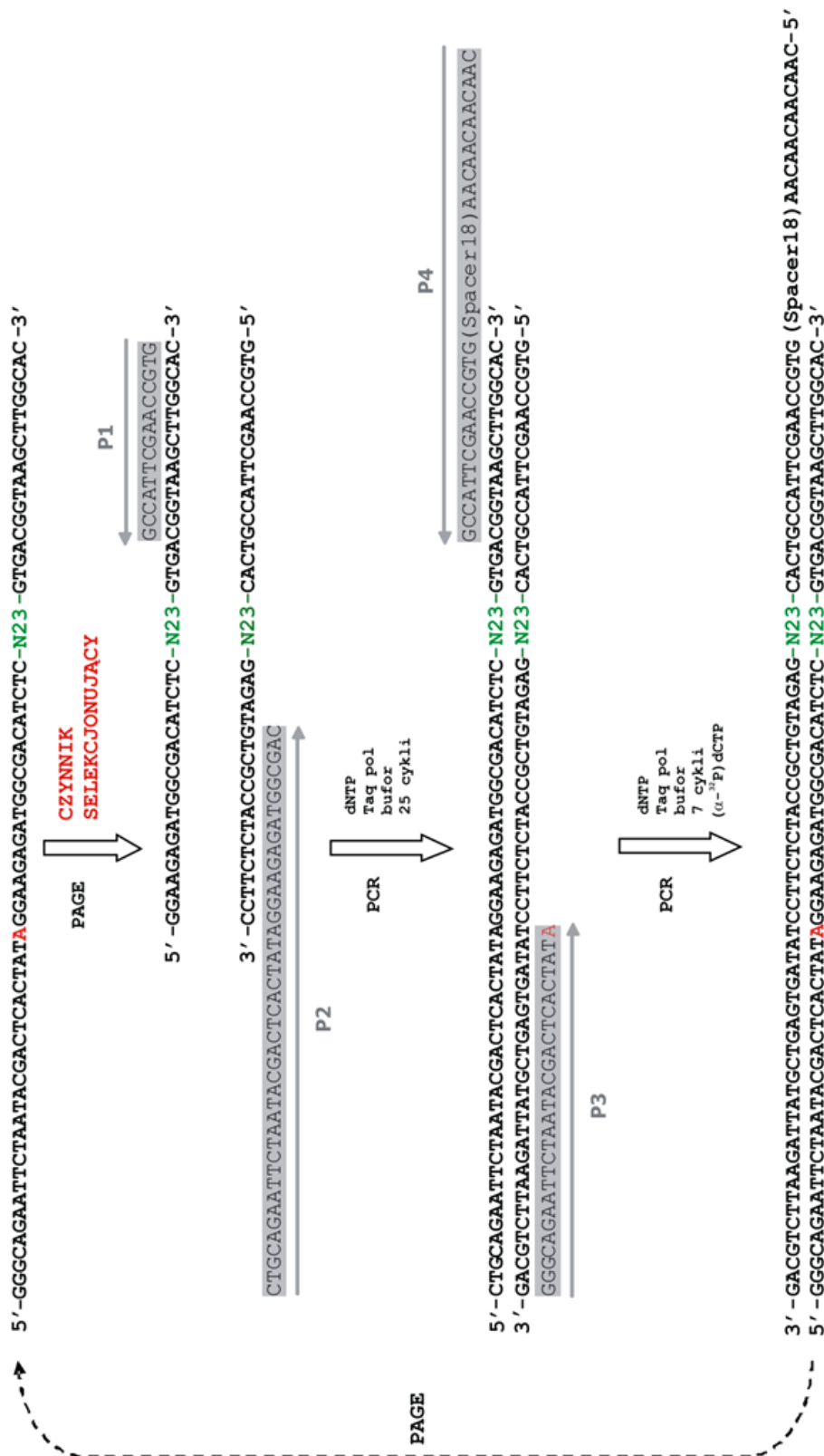
Otrzymaną bibliotekę kombinatoryczną wykorzystałam, jako wyjściową pulę cząsteczek DNA w pierwszym cyklu selekcji *in vitro*. Zaplanowany schemat selekcji *in vitro* DNAzymów przedstawiono na rysunku 18. Skonstruowany on został w oparciu o procedury stosowane wcześniej przez innych badaczy do selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów Mg^{2+} [5] czy jonów UO_2^{2+} [58].

Cykl I

W pierwszym etapie selekcji otrzymaną bibliotekę kombinatoryczną DNAzymów poddałam reakcji katalicznego cięcia w obecności 1 mM stężenia jonów Cd^{2+} , będących zaplanowanym czynnikiem selekcyjnym. Reakcję cięcia prowadziłam przez 60 minut w buforze o składzie: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl. Produkty reakcji rozdzieliłam na żelu poliakryloamidowym (Rys. 19). Mierząc radioaktywność wyjściowej biblioteki DNAzymów, wariantów które nie uległy przecięciu oraz produktów po reakcji, odzyskanych z żelu poliakryloamidowego obliczyłam, że przecięciu ulegało 0,10% ogólnej puli cząsteczek (Tab. 6)



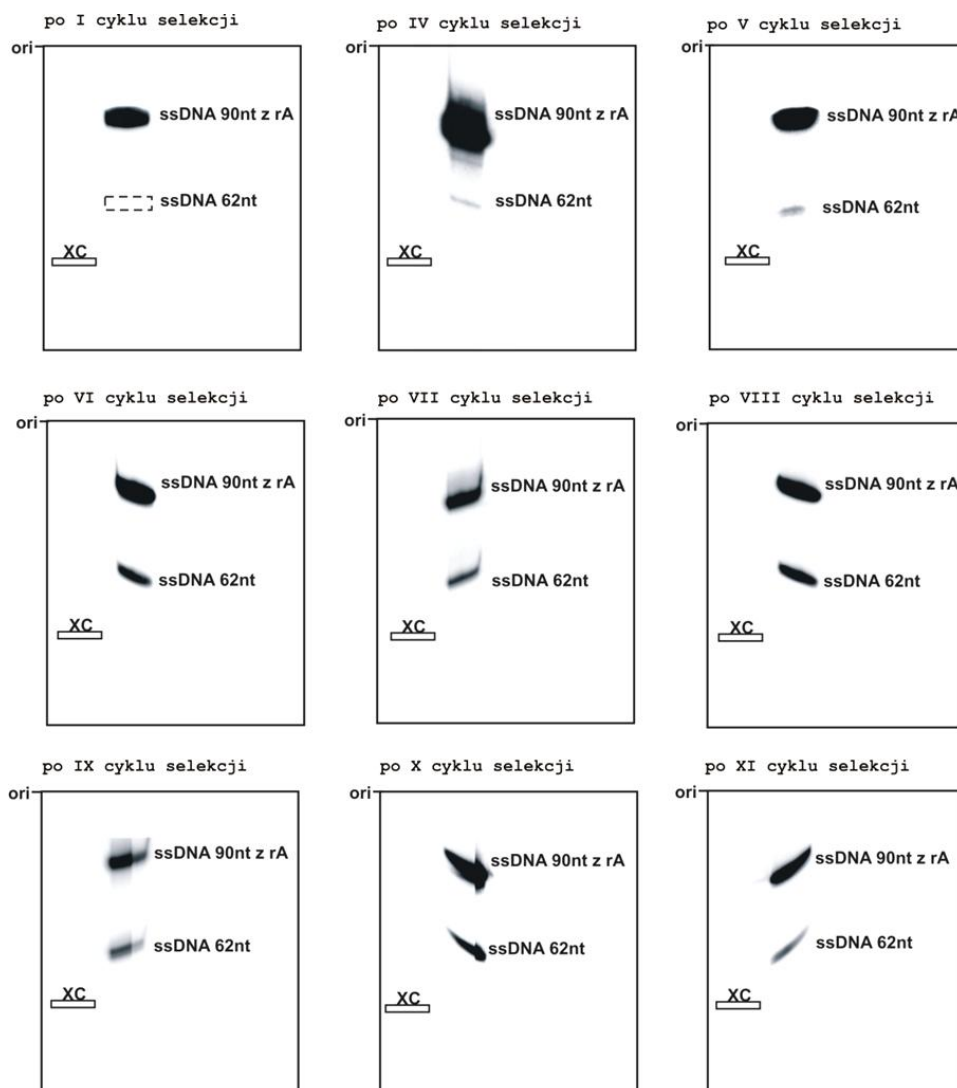
Rysunek 17. Schemat syntezy biblioteki kombinatorycznej do selekcji DNAzymów. Przedstawiono sekwencje oligonukleotydów użytych do konstrukcji biblioteki. N23 oznacza 23-nukleotydowy odcinek typu *random*. Czerwona czcionką oznaczono rybonukleotyd adeniny, miejsce przewidywanego katalitycznego cięcia. Spacer18 oznacza łącznik złożony z 18 reszt glikolu etylenowego.



Rysunek 18. Schemat eksperymentu selekcji *in vitro*. Przedstawiono sekwencje oligonukleotydów użytych w trakcie selekcji. N23 oznacza 23-nukleotydowy odcinek typu *random*. Czerwoną czcionką oznaczono rybonukleotyd adeniny, miejsce przewidywanego katalitycznego cięcia. Spacer18 oznacza łącznik złożony z 18 reszt glikolu etylenowego.

Cykl II–IV

Odzyskany z żelu po cyklu I produkt reakcji cięcia użyty został w reakcji PCR do uzyskania pełnej długości biblioteki DNAzymów z wykorzystaniem starterów P1 i P2. Po wyznakowaniu biblioteki izotopem ^{32}P w reakcji PCR z użyciem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ oraz starterów P3 i P4, pulę DNAzymów poddawałam kolejnej reakcji cięcia (Rys. 18). Reakcję cięcia przeprowadzałam w warunkach identycznych jak opisane dla cyklu I. Przecięciu ulegało 0,12% wariantów DNAzymów. W podobny sposób przeprowadziłam kolejne cykle selekcji III i IV, jedynie zmniejszając 5-krotnie stężenie jonów Cd^{2+} do 0,2 mM w cyklu IV, w celu selekcji wariantów aktywnych przy niższym stężeniu jonów Cd^{2+} . Obliczona efektywność reakcji cięcia bibliotek DNAzymów w obecności jonów Cd^{2+} wynosiła 0,11% w cyklu III i 0,17% w cyklu IV (Tab. 6).



Rysunek 19. Autoradiogramy przedstawiające rozdział produktów w żelu poliakryloamidowym po reakcji cięcia biblioteki DNAzymów w kolejnych cyklach selekcji.

Selekcja negatywna po cyklu IV

Celem prowadzonego eksperymentu selekcji *in vitro* było otrzymanie DNAzymów specyficznych dla jonów Cd^{2+} , dlatego do procedury włączyłam tzw. selekcję negatywną. Aby z biblioteki DNAzymów wyeliminować warianty aktywne w obecności jonów Zn^{2+} przeprowadziłam reakcję cięcia w obecności 0,2 mM stężenia jonów Zn^{2+} w czasie 60 min. Za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym rozdzieliłam frakcje wariantów aktywnych i nieaktywnych katalitycznie w tych warunkach, a wyeluowane z żelu warianty nieprzecięte (o długości 90 nukleotydów) użyłam w następnym cyklu selekcji.

Tabela 6. Warunki reakcji cięcia biblioteki DNAzymów w obecności jonów Cd^{2+} .

cykl	czas inkubacji [min]	stężenie Cd^{2+} [mM]	stopień przecięcia [%]
1	60	1	0,10
2	60	1	0,12
3	60	1	0,11
4 ^[a]	60	0,2	0,17
5 ^[b]	30	0,2	0,41
6	30	0,1	11,8
7	10	0,1	15,4
8	5	0,1	22,1
9	1	0,1	11,4
10	1	0,1	16,4
11	1	0,1	8,2

[a] selekcja negatywna przeprowadzona w obecności 200 μM Zn(II) po czwartym cyklu; czas inkubacji 60 minut

[b] selekcja negatywna przeprowadzona w obecności 100 μM Mg(II) oraz 50 μM Ca(II) , Co(II) Ni(II) , Sr(II) , Mn(II) i Zn(II) po piątym cyklu; czas inkubacji 30 minut

Cykl V oraz selekcja negatywna po cyklu V

W kolejnym cyklu selekcji reakcję cięcia prowadziłam przy 0,2 mM stężeniu jonów Cd^{2+} , skracając dwukrotnie czas inkubacji do 30 minut. Efektywność cięcia wynosiła 0,41% (Rys. 19, Tab. 6). Następnie przeprowadziłam kolejną selekcję negatywną wariantów, podobnie jak po cyklu IV, ale tym razem w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych: 100 μM Mg^{2+} oraz 50 μM każdego z jonów: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} , stosując czas inkubacji 30 min. DNAzyny aktywne w obecności tych jonów usunęłam z biblioteki wariantów za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach

denaturujących. Pulę nieprzeciętych DNAzymów odzyskałam poprzez elucję z żelu i skierowałam do kolejnego cyklu selekcji.

Cykl VI, VII i VIII

W cyklu VI bibliotekę wariantów DNAzymów poddałam reakcji cięcia stosując 0,1 mM stężenie jonów Cd^{2+} , czyli dwukrotnie niższe niż w cyklu poprzednim oraz 30-minutowy czas inkubacji. Zanotowałam znaczny, ponad 28-krotny wzrost efektywności reakcji cięcia (Tab. 6). W podobny sposób przeprowadziłam kolejne cykle selekcji VII i VIII, zmniejszając jedynie czas reakcji z 30 minut do 10 minut w cyklu VII oraz do 5 minut w cyklu VIII. Efektywność reakcji cięcia wzrosła do ponad 15% w cyklu VII i 22% w cyklu VIII (Rys. 19, Tab. 6).

Cykl IX, X i XI

Dla cykli IX–XI selekcji *in vitro* w reakcji cięcia zastosowałam 0,1 mM stężenie jonów Cd^{2+} inkubując próbę przez 1 minutę w 25°C. Efektywność reakcji cięcia po tym czasie wynosiła ponad 11% w cyklu IX i 16% po cyklu X, natomiast w cyklu XI zaobserwowałam dwukrotny spadek stopnia przecięcia wyselekcjonowanej biblioteki DNAzymów do 8% (Rys. 19, Tab. 6). Po etapie XI postanowiłam zatrzymać eksperyment selekcji.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych 11 cykli selekcji *in vitro* wyjściowa biblioteka DNAzymów została wzbogacona w warianty aktywne katalitycznie, tak że w obecności 0,1 mM jonów Cd^{2+} w cyklu VIII ulegało przecięciu 22% cząsteczek w czasie 5 minut, a w cyklu 10 było to 16% cząsteczek, przy czasie inkubacji skróconym do 1 minuty.

3.1.3. Identyfikacja otrzymanych wariantów DNAzymów, które okazały się aktywne w niskim pH środowiska

Po przeprowadzonych 11 cyklach selekcji *in vitro* do dalszych badań wybrałam pulę wariantów uzyskaną w X cyklu, jako najbardziej aktywną w obecności 0,1 mM stężenia jonów Cd^{2+} przy najkrótszym z zastosowanych czasie inkubacji wynoszącym 1 minutę. Bibliotekę kombinatoryczną DNAzymów poddałam reamplifikacji z wykorzystaniem starterów P1 i P2 (standardowo stosowanych w trakcie procesu selekcji), a następnie otrzymane produkty reakcji PCR oczyściłam na kolumie QIAquick Spin (QIAGEN®). Tak przygotowaną bibliotekę DNAzymów poddałam klonowaniu przy użyciu zestawu TOPO

TA Cloning® Kit (Invitrogen). Sekwencjonowanie wybranych wariantów przeprowadzone zostało w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Uzyskałam kilka grup-rodzin klonów, posiadających charakterystyczne motywy sekwencyjne w regionie odpowiadającym regionowi *random* w bibliotece wyjściowej (Rys. 20). Wyróżniono cztery główne rodziny klonów. W rodzinie pierwszej, złożonej z 23 klonów, 20 klonów ma identyczną sekwencję w regionie odpowiadającym regionowi typu *random* w bibliotece wyjściowej, przy czym 18 klonów posiada także mutację A/G w tej samej pozycji regionu stałego. Jednakże, pozycja ta położona jest poza regionem starterów, co tłumaczy możliwość pojawienia się tej zmiany. Druga rodzina składa się z 5 klonów, a sekwencja odpowiadająca regionowi *random* jest w tym przypadku trochę bardziej zróżnicowana. W trzeciej rodzinie tą samą sekwencję odcinka *random* w wyjściowej bibliotece ma 8 z 9 klonów. Rodzina czwarta składa się z 8 klonów, a sekwencje odpowiadające regionowi *random* są identyczne w przypadku 7 klonów. Jeden z wariantów – #42 nie został przypisany do żadnej z rodzin. W zestawieniu sekwencji DNazymów szczególną uwagę zwraca pojawienie się w regionie odpowiadającym regionowi *random* w bibliotece wyjściowej motywów sekwencji złożonych z dwóch, trzech i czterech tych samych nukleotydów. W rodzinie pierwszej są to motywy: CCC, AA i TT, w rodzinie drugiej: CCC, AA, CCCC, AAA, CCC i TT, w trzeciej: CCC, AA, CCCC, AAA, CC, TT i CC, a w czwartej: TT, AAA, CCCC, AAA, CC, TT i TT (Rys. 20).

W kolejnym etapie sprawdziłam, w jakich warunkach wybrane DNazy z czterech otrzymanych rodzin wykazują aktywność katalityczną, czy działają zgodnie z oczekiwaniem tj. są aktywne w obecności jonów Cd^{2+} .

Wstępne badanie pozwalające na określenie aktywności katalitycznej wybranych wariantów DNazymów rozpoczęłam od przeprowadzenia ich znakowania w reakcji PCR z użyciem radioaktywnego $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ oraz starterów P3 i P4. Jednoniciowe DNazy otrzymałam poprzez rozdzielenie nici DNA za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Po wycięciu z żelu DNazy eluowałam, następnie strącałam etanolem i po rozpuszczeniu badałam ich aktywność katalityczną.

1 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTGACGGTAAGCTTGGCAC 90 WT

15 30 48 75

grupa I

6 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGACGGTAAGCTTGGCAC

7 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGG AGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

8 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

9 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

49 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGA GAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGACGGTAAGCTTGGCAC

16 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

39 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGCTGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

26 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

27 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

34 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

35 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

41 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

44 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

46 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

48 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

55 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

57 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

59 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

28 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

60 CT CACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCCTCAAGCGACTTCTCTCGGTGCGGTAAGCTTGGCAC

52 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGAGTCTCTTACCCCTAAATCGACTTCTCTTGTGACGGTAAGCTTGGCAC

2 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCAACCCCTTATCGACATCTCTCTCGTGAACGGTAAGCTTGGCAC

22 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCCAACCCCTTATCGACATCTCTCTCGTGAACGGTAAGCTTGGCAC

grupa II

21 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCGTCCCAACCCCAACCCCTTCTCAGTGS CGGTAAGCTTGGCAC

24 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCGTCCCAACCCCAACCCCTTCTCAGTGS CGGTAAGCTTGGCAC

18 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCGTCCCAACCCCAAAATCTTCTCCGTGCGGTAAGCTTGGCAC

54 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCGTCCCAACCCCAAAATCTTCTCCGTGCGGTAAGCTTGGCAC

43 CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGAGATGGCGACATCTCGTCCCAACCCCAACCCCTTCTCTGTGACGGTAAGCTTGGCAC

grupa III

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 29

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 45

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 47

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 50

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 56

CTGCAGAAATTC AATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 20

ATTCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 13

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 40

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 12

grupa IV

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 30

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 1

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 15

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 5

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 32

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 38

CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACGTCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 23

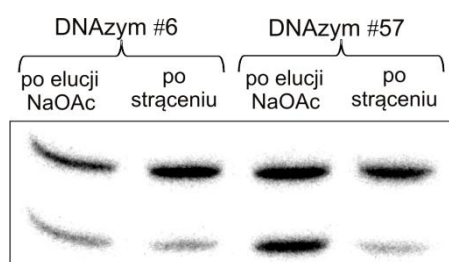
CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACGTCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGGCGGTAAGCTTTGGCAC 25

niesklasyfikowane

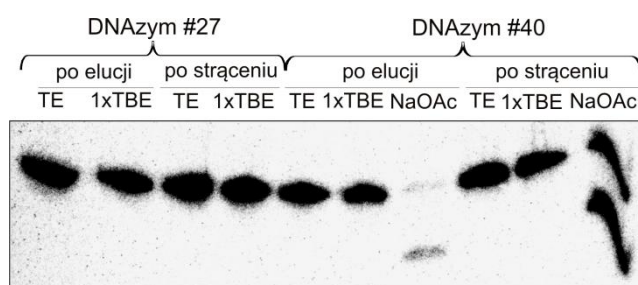
CTGCAGAAATTCCTAATACGACTCACTATrAGGAAGA GATGGCGACATCTTACC AACCCCAAAATCCTTCTCCGTGACGGTAAGCTTTGGCAC 42

Rysunek 20. Sekwencje uzyskanych wariantów DNazymów. Liczbami oznaczono numery klonów. Pozycje stałe w bibliotece kombinatorycznej oznaczono literami czarnymi, a typu *random* zielonymi, mutacje punktowe oznaczono zaś literami niebieskimi. Miejsce katalitycznego cięcia oznaczono na czerwono.

W trakcie prowadzonych doświadczeń zaobserwowałam, że podczas elucji DNAzymów z grupy I (#6, #57; posiadają one tę samą sekwencję nukleotydów w obrębie regionu odpowiadającego regionowi *random* w wyjściowej bibliotece) i grupy II (#40), prowadzonej w obecności 0,3 M octanu sodu pH 5,2 przez 3 godziny w temperaturze 25°C dochodziło do przecinania się tych wariantów bez udziału jonów Cd^{2+} . Efektu takiego nie zaobserwowałam dla DNAzymów #27 i #40, które eluowałam buforem TE, czy buforem 1xTBE (Rys. 21 i 22). Wobec powyższych obserwacji z pewnością mogłam odrzucić przypuszczenie o możliwości niespecyficznego degradacji nici DNAzymu – gdyby degradacja miała miejsce obserwowałabym produkty degradacji w ścieżkach odpowiadających elucji we wszystkich stosowanych warunkach. Stwierdziłam zatem, że warianty z grupy I i II najprawdopodobniej ulegają specyficznemu cięciu w miejscu pojedynczego wiązania fosfodiesterowego typu rybo (rA), albo w obecności jonów monowalentnych takich jak jony Na^+ , albo czynnikiem decydującym o ich aktywności katalitycznej jest środowisko o niskim pH.



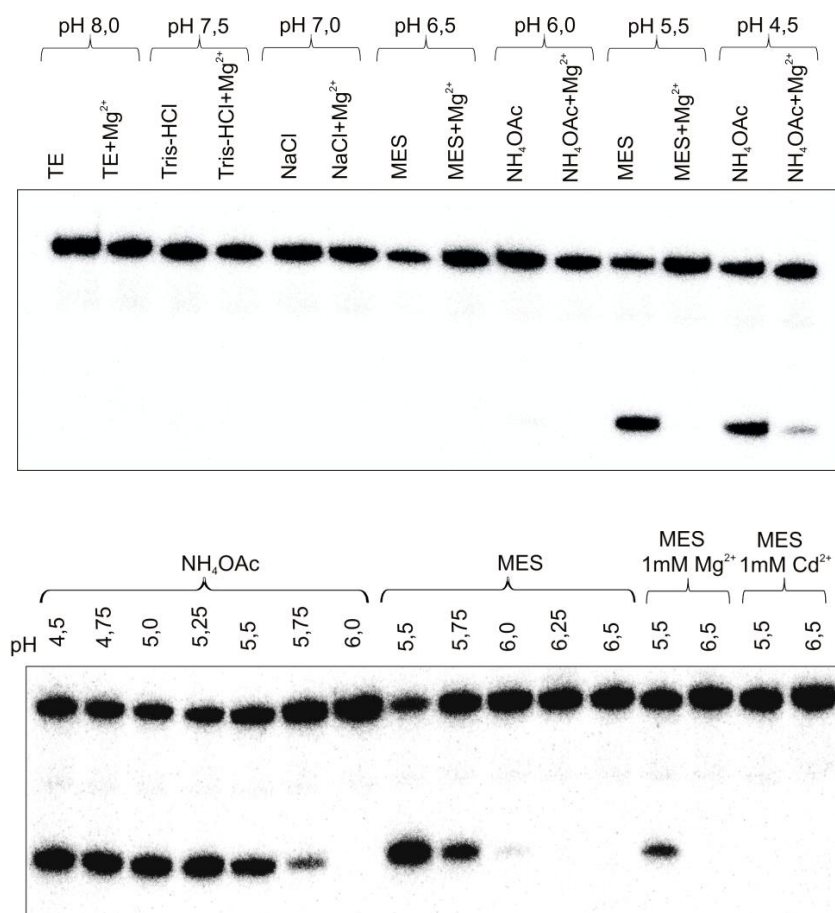
Rysunek 21. Wpływ warunków elucji z żelu poliakryloamidowego po oczyszczeniu DNAzymów z grupy I: #6 i #57 na ich aktywność katalityczną. DNAzymy eluowano 0,3 M octanem sodu pH 5,2 w temperaturze 25°C.



Rysunek 22. Wpływ warunków elucji z żelu poliakryloamidowego na aktywność katalityczną DNAzymów z grupy I – #27 i grupy II – #40. DNAzymy eluowano buforem TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA), buforem 1xTBE (100 mM Tris pH 8, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA) lub 0,3 M octanem sodu pH 5,2 w temperaturze 25°C.

Wobec wstępnych, dość nieoczekiwanych obserwacji dotyczących właściwości otrzymanych DNAzymów postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ na aktywność katalityczną jednego z nich – DNAzymu #27 mają różne warunki pH, soli buforujących oraz obecność jonów metali. Jak wynika z przedstawionych autoradiogramów (Rys. 23) DNAzym #27 wykazywał aktywność katalityczną w buforze 50 mM MES o $\text{pH} \leq 5,75$, a także w buforze 50 mM NH_4OAc $\text{pH} \leq 5,75$ (Rys. 23, dolny panel). W buforach o pH wyższym niż 6,0 DNAzym #27 nie wykazywał aktywności katalitycznej. Ponadto, jony Na^+ nie są kofaktorem reakcji cięcia, jak wstępnie przypuszczano, gdyż w obecności chlorku sodu o pH 7,0 nie dochodzi do przecinania się DNAzymu #27. Również anion CH_3COO^- octanu sodu w obecności którego prowadzono elucję i podczas której dochodziło do specyficznego cięcia DNAzymu #27, nie bierze udziału w reakcji cięcia tego wariantu, gdyż nie obserwowano cięcia w obecności octanu amonu o pH 6,0 (Rys. 23, górny panel). Jednoznacznie mogłam stwierdzić, iż na aktywność katalityczną otrzymanych DNAzymów wpływa pH środowiska reakcji. Ponadto, obecność jonów Mg^{2+} o stężeniu 10 mM całkowicie inhibowała reakcję przecinania się DNAzymu #27 w buforach o pH 5,5, zaś 1 mM stężenie tych jonów w niewielkim stopniu hamowało reakcję cięcia. Nieoczekiwanie, jony Cd^{2+} , które z założenia powinny być kofaktorem reakcji cięcia, wykazywały zdolność całkowitej inhibicji aktywności katalitycznej DNAzymu #27 (Rys. 23, dolny panel).

Założonym celem przeprowadzonego eksperymentu selekcji *in vitro* było uzyskanie DNAzymów aktywnych w obecności Cd^{2+} . Stąd czynnikiem selekcyjnym była obecność i zmniejszające się stężenie jonów Cd^{2+} , a nie niskie pH środowiska. Otrzymałam jednak DNAzymy aktywne w niskim pH środowiska (szczegółowy opis aktywności katalitycznej wybranych wariantów znajduje się w rozdz. 3.2 i 3.3). Eksperymenty selekcji *in vitro* związane są zawsze z ryzykiem, że nie otrzymamy wariantów o pożądanym właściwościach. Do takiego wyniku selekcji mogły przyczynić się dwa czynniki: 1/ 23-nukleotydowy region *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej mógł być za krótki do utworzenia centrum katalitycznego zależnego od wiązania jonów Cd^{2+} oraz 2/ procedura selekcji ze standardowym etapem strącania DNA w pH 5,2, obniżonym w stosunku do pH 7,0 stosowanego podczas selekcji wariantów, mogła spowodować, że w konsekwencji otrzymałam DNAzymy „ pH -zależne”.



Rysunek 23. Aktywność katalityczna DNAzemu #27 w różnych warunkach pH, buforu oraz w obecności jonów Mg²⁺ o stężeniu 10 mM (górny panel) i 1 mM (dolny panel), a także jonów Cd²⁺ o stężeniu 1 mM (dolny panel). Reakcje prowadzono w temperaturze 25°C przez 60 minut w 50 mM buforach: TE, Tris-HCl, MES, NH₄OAc oraz w 50 mM NaCl.

3.2. DNAzemy pH-zależne – charakterystyka wybranych wariantów sekwencyjnych działających w układzie jednocząsteczkowym (*in cis*)

3.2.1. Profil pH wybranych DNAzymów i ich specyficzność wobec jonów metali

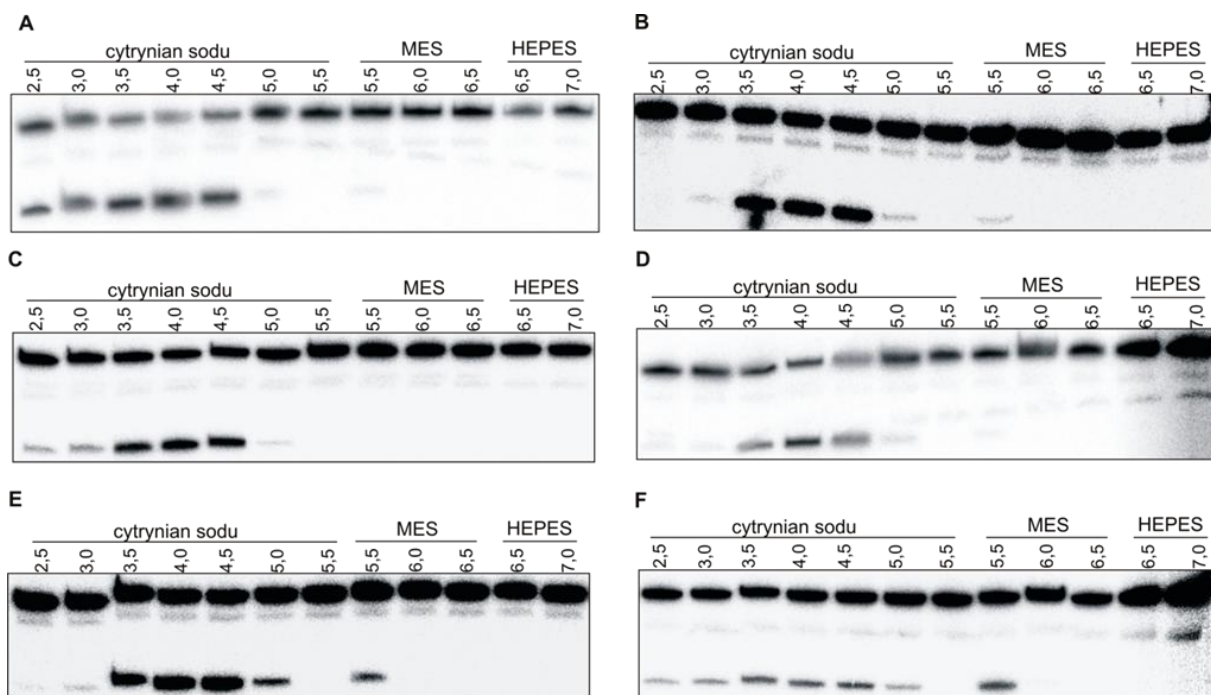
W wyniku przeprowadzonej selekcji *in vitro* otrzymałam DNAzemy aktywowane w wyniku obniżenia pH środowiska do wartości około 5,5. Przeprowadziłam zatem doświadczenia mające na celu wyznaczenie profilu pH wybranych wariantów DNAzymów „pH-zależnych”. Sprawdziłam, w jakich warunkach pH DNAzemy, przedstawiciele czterech otrzymanych rodzin, wykazują najwyższą aktywność katalityczną, a także, jaki wpływ na wykazywaną aktywność mają jony metali. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie specyficzności działania DNAzymów otrzymanych na drodze selekcji *in vitro*.

Badanie aktywności katalitycznej rozpocząłam od przeprowadzenia znakowania wybranych DNAzymów izotopem ³²P w reakcji PCR z użyciem radioaktywnego [α -³²P]dCTP

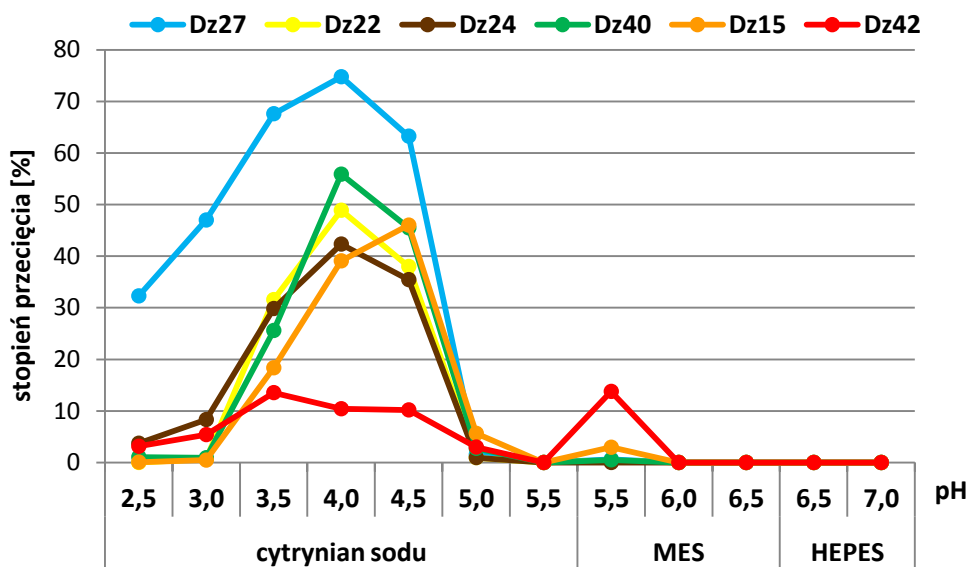
oraz starterów P3 i P4. Jednoniciowe DNAzemy otrzymałam poprzez rozdzielanie nici DNA za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. W kolejnym etapie zbadalam aktywność katalityczną DNAzymów przy różnych wartościach pH 2,5–7,0 soli buforujących. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń określiłam profil pH wariantów DNAzymów reprezentujących każdą z wyselekcjonowanych rodzin (Rys. 24).

Histogram na rysunku 25 ilustruje wpływ pH środowiska na aktywność katalityczną wybranych DNAzymów. DNAzym #27 (Dz27) z rodziny I uległ przecięciu w 75% podczas 60-minutowej inkubacji w 50 mM cytrynianie sodu o pH 4,0. Wraz z obniżaniem wartości pH do 2,5 stopień przecięcia tego wariantu spadł do 30%, zaś w pH bliskim 6,0–7,0 nie wykazywał on aktywności katalitycznej (Rys. 24 i 25). Inny wariant z rodziny I – DNAzym #22 (Dz22) wykazywał aktywność katalityczną w środowisku o pH 3,5–4,5, przy czym najwyższy stopień przecięcia wynosił 49% w pH 4,0. Należy jednak zauważyć, że wariant ten wykazuje aktywność katalityczną w węższym zakresie pH niż DNAzym #27, mimo że obydwa warianty należą do rodziny I. Ponadto, stopień przecięcia Dz22 w pH 4,0 był o 25% niższy niż Dz27. Zróznicowany poziom aktywności obu wariantów może być wynikiem różnego składu nukleotydowego w obrębie 3' końca regionu katalitycznego. Różnice w sekwencji nukleotydowej obu DNAzymów mogą wpływać na stabilność termodynamiczną cząsteczek oraz na sposób ich zwijania się – tym samym może to skutkować różną strukturą drugorzędową obu DNAzymów.

DNAzemy #24 i #40, przedstawiciele rodzin II i III, podobnie jak warianty z rodziny I w najwyższym stopniu ulegały przecięciu w pH 4,0, przy czym stopień przecięcia dla Dz24, Dz40 był odpowiednio o 30% i 20% niższy od obserwowanego dla Dz27. DNAzym #15 z rodziny IV, w przeciwieństwie do wariantów z pozostałych grup, maksymalną aktywność katalityczną osiągał w pH 4,5, a nie w pH 4,0. Stopień przecięcia Dz15 w 50 mM cytrynianie sodu o pH 4,5 wyniósł około 50%. W pH > 5,0 wariant Dz15 nie ulegał przecięciu. DNAzym #42, który nie został zakwalifikowany do żadnej z otrzymanych rodzin, nie wykazywał wysokiej aktywności katalitycznej w żadnym z badanych wartości pH (Rys. 25). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że otrzymane DNAzemy wykazują najwyższy stopień przecięcia w pH mieszczącym się w zakresie 4,0–4,5.



Rysunek 24. Autoradiogramy ilustrujące aktywność katalityczną DNAzymów pH-zależnych: A) Dz27 B) Dz22 C) Dz24 D) Dz40 E) Dz15 F) Dz 42 przy różnym pH środowiska. Reakcje prowadzono w buforach o stężeniu 50 mM w temperaturze 25°C przez 60 minut.

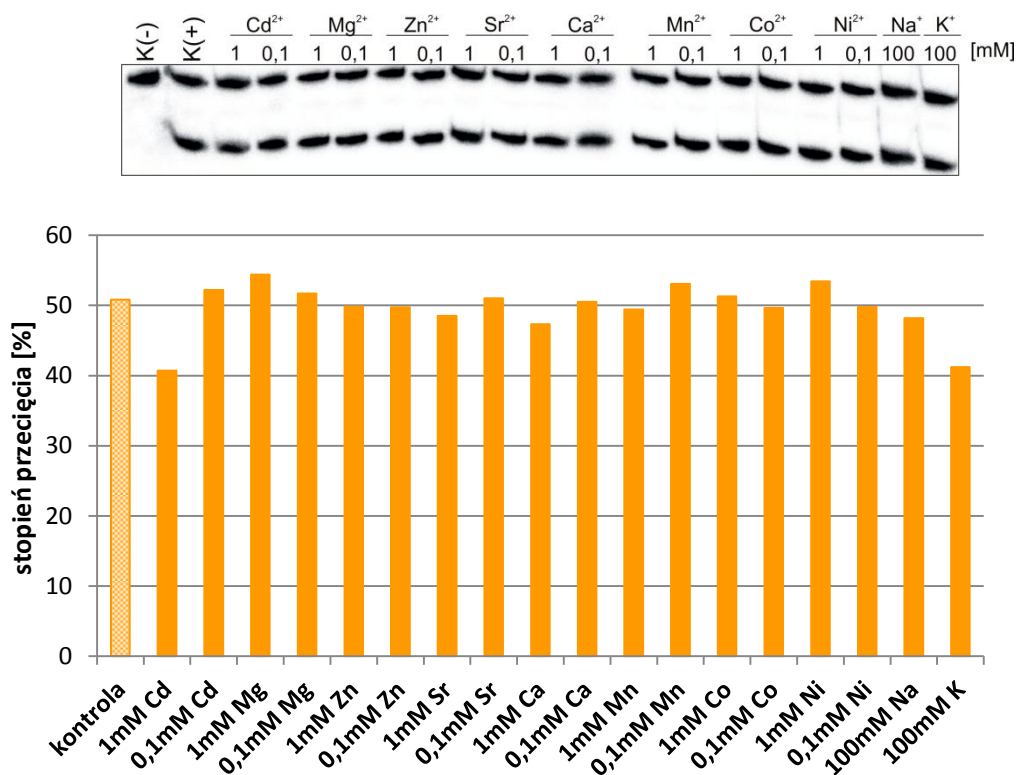


Rysunek 25. Profil pH DNAzymów pH-zależnych. Na wykresie przedstawiono stopień przecięcia DNAzymów z grupy I (Dz27, Dz22), grupy II (Dz24), grupy III (Dz40), grupy IV (Dz15) oraz DNAzymu niezaklasyfikowanego do żadnej z tych grupy (Dz42), w różnych warunkach pH i soli buforujących. Wykres sporządzono na podstawie danych przedstawionych na rysunku 24.

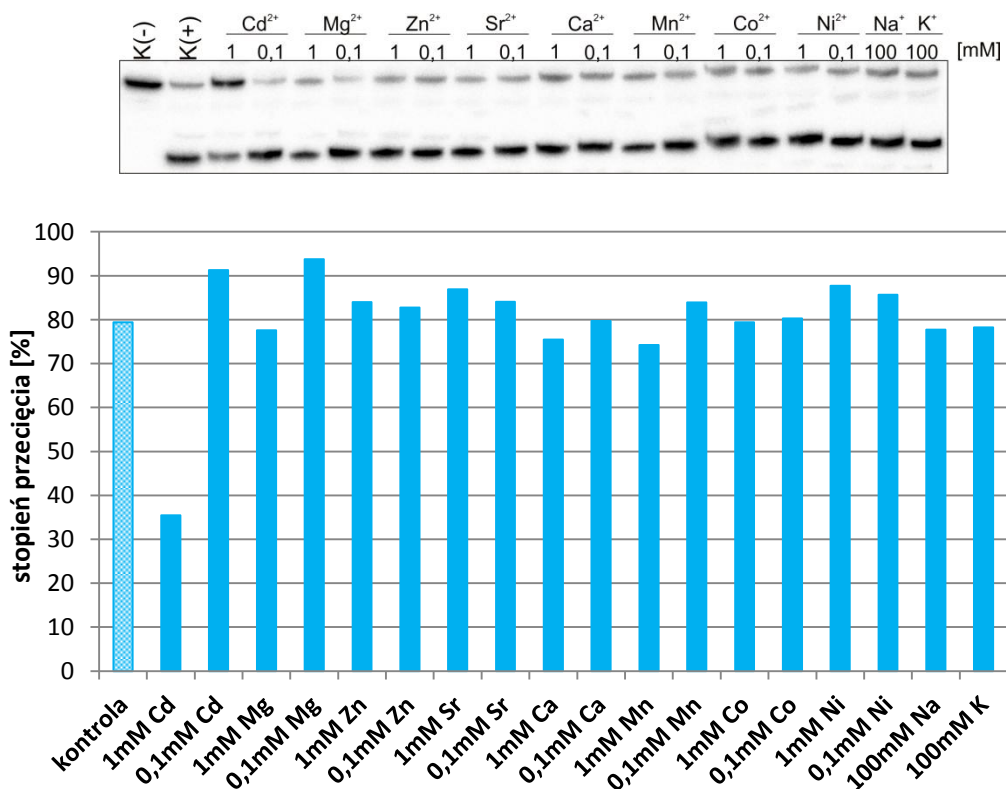
Większość opisanych dotychczas w literaturze DNAzymów do swojej aktywności katalitycznej wymaga kofaktorów w postaci jonów metali. Grupa badawcza Li i wsp. [133] otrzymała DNAzyny aktywne w niskim pH środowiska, które do swojej aktywności katalitycznej wymagają nie tylko kwaśnego środowiska reakcji, ale także obecności wybranych jonów metali. Wobec powyższego postanowiłam zbadać specyficzność działania wariantów Dz15 i Dz27 w obecności wybranych jonów metali przy optymalnych dla ich aktywności wartościach pH tj. dla Dz27 pH 4,0, dla Dz15 pH 4,5 (Rys. 26 i 27).

Wariant Dz15 w buforze o pH 4,5 ulegał 50% przecięciu bez udziału jonów metali. Obecność jonów Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} o stężeniu 1 mM lub 0,1 mM oraz 100 mM Na^+ nie wpłynęła istotnie na aktywność katalityczną tego wariantu. Jony Cd^{2+} o stężeniu 1 mM oraz jony K^+ o stężeniu 100 mM obniżały aktywność Dz15 o ok. 10% (Rys. 26). Testowane jony metali nie wpływały także na zwiększenie aktywności katalitycznej wariantu Dz27. W buforze o pH 4,0 wariant Dz27 ulegał przecięciu w 80% bez udziału jonów metali. Obecność jonów metali nie zwiększała istotnie stopnia przecięcia DNAzemu #27, natomiast 1 mM stężenie jonów Cd^{2+} inhibowało reakcję katalitycznego cięcia o ok. 40% (Rys. 27).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wyznaczyłam profil pH DNAzymów reprezentujących każdą z wyselekcjonowanych rodzin. Z sześciu testowanych DNAzymów do dalszych badań wybrałam dwa warianty: Dz15 oraz Dz27, które wykazywały najwyższą aktywność katalityczną. Warianty te okazały się być DNAzymami działającymi w środowisku kwaśnym, z optimum przy pH 4,0–4,5, a do osiągnięcia wysokiej aktywności katalitycznej nie wymagały obecności jonów metali.



Rysunek 26. Wpływ wybranych jonów metali na stopień przecięcia DNAzemu pH-zależnego Dz15. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM cytrynian sodu pH 4,5 w temperaturze 25°C przez 60 minut. K(+) linia kontrolna pH 4,5, brak jonów metali; K(-) linia kontrolna pH 7,0, brak jonów metali.



Rysunek 27. Wpływ wybranych jonów metali na stopień przecięcia DNAzemu pH-zależnego Dz27. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM cytrynian sodu pH 4,0 w temperaturze 25°C przez 60 minut. K(+) linia kontrolna pH 4,0, brak jonów metali; K(-) linia kontrolna pH 7,0, brak jonów metali.

3.2.2. Struktura drugorzędowa DNAzemu #15 i DNAzemu #27

Do badań mających na celu scharakteryzowanie struktury drugorzędowej DNAzymów pH-zależnych wybrałam dwa warianty – DNAzemu #15 oraz DNAzemu #27, ulegające reakcji katalitycznego cięcia, odpowiednio w optymalnych warunkach pH 4,0 oraz 4,5. Ze względu na charakter cząsteczek – są to oligomery DNA – możliwość analizy ich struktury drugorzędowej w oparciu o dostępne techniki eksperymentalne była ograniczona. Większość metod przeznaczonych do analizy struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych np. technika SHAPE, metoda modyfikacji chemicznej z wykorzystaniem ketoksalu czy CMCT, mapowanie enzymatyczne przy użyciu nukleaz T1, V1 oraz A, czy stosowana w naszym laboratorium od szeregu lat metoda cięć indukowanych jonami ołowiu [143] mają zastosowanie wyłącznie dla cząsteczek RNA. W związku z powyższymi ograniczeniami, do realizacji postawionego celu wykorzystałam metodę mapowania struktury drugorzędowej DNA przy użyciu nukleazy S1 oraz odczynnika chemicznego siarczanu dimetylu (DMS). Do badania struktury drugorzędowej DNAzymów skonstruowałam ich warianty nieulegające przecięciu, które zamiast rybonukleotydu adeniny w miejscu katalitycznego cięcia, posiadały deoksyrybonukleotyd adeniny (synteza wariantów rozdz. 6.4.4).

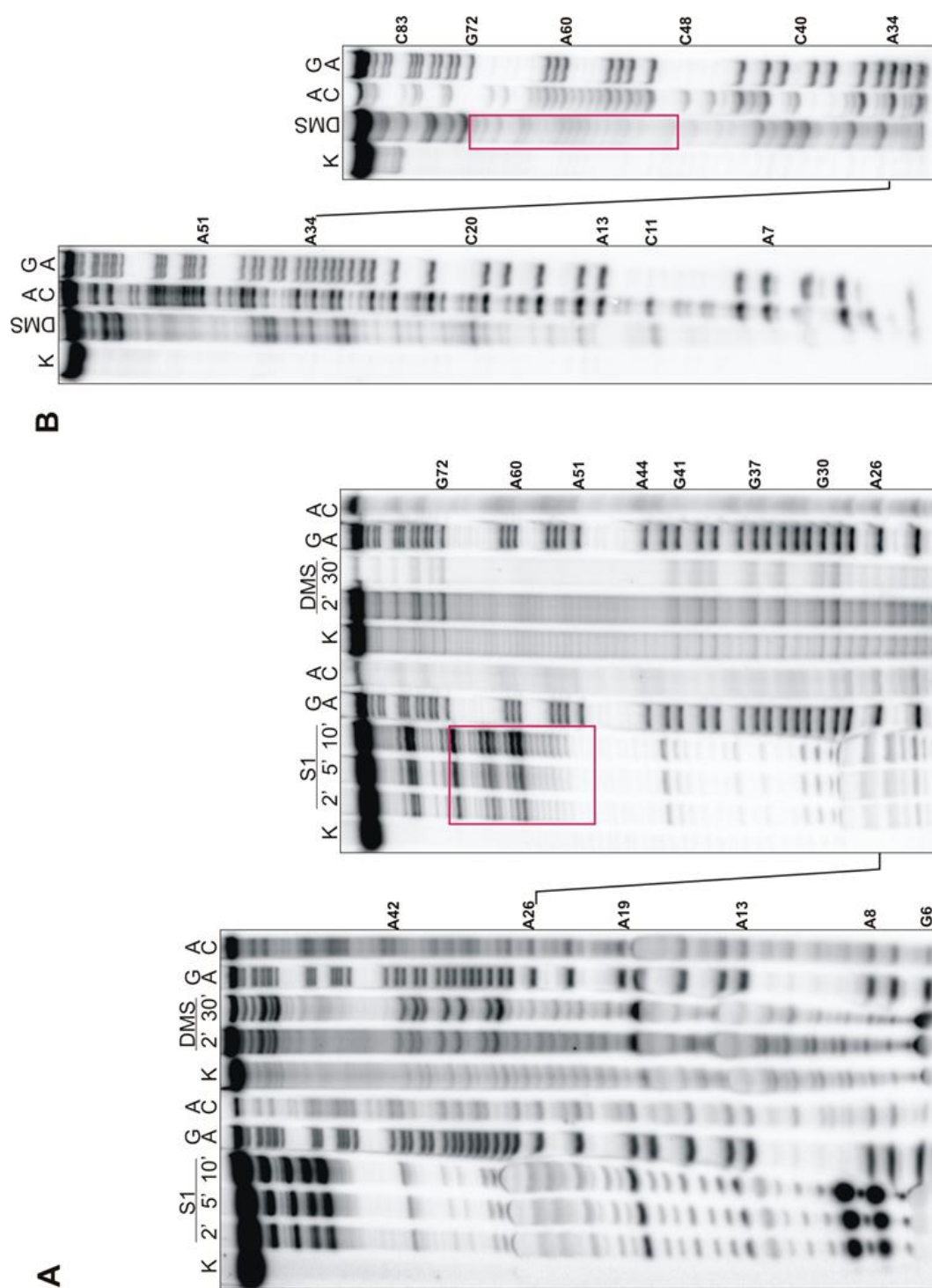
Endonukleaza S1 wykazuje aktywność nukleolityczną zarówno wobec jednoniciowego DNA jak i RNA, jednak w stosunku do DNA aktywność enzymu jest znacznie wyższa. Znakowane izotopem ^{32}P z końca 5' DNAzemy pH-zależne poddawałam reakcji trawienia nukleazą S1 w temperaturze 25°C w czasie 2, 5 i 10 minut (Rys. 28A i 29A). Po rozdziale elektroforetycznym produktów trawienia zaobserwowałam cięcia w obrębie nukleotydów 1–30 z końca 5' (szczególnie silne cięcia przy nukleotydach A7 i A8) i w obrębie nukleotydów 75–85 z końca 3' nici sekwencyjnych obu DNAzymów pH-zależnych. Ponadto, w przypadku wariantu Dz15 cięcia zaobserwowałam także w obrębie regionu katalitycznego T49–T71. W związku z powyższym można przypuszczać, że wspomniane regiony DNA mają charakter jednoniciowy. Region katalityczny DNAzemu #27 (C49–G71) wydaje się być mniej dostępny dla działania nukleazy S1. Wyraźny zanik cięć można zauważyć natomiast dla regionów A31–G38 oraz C43–C52 obu wariantów DNAzymów (Rys. 28A i 29A).

DNAzemy #15 i #27 poddałam także analizie strukturalnej za pomocą metody modyfikacji chemicznej z wykorzystaniem DMS w obecności hydrazyny. W tych warunkach modyfikacji ulega reszta cytozyny w pozycji N3. Ponadto, reakcji ulegają wyłącznie cytozyny niezaangażowane w tworzenie par typu Watsona-Cricka. Po reakcji z hydrazyną,

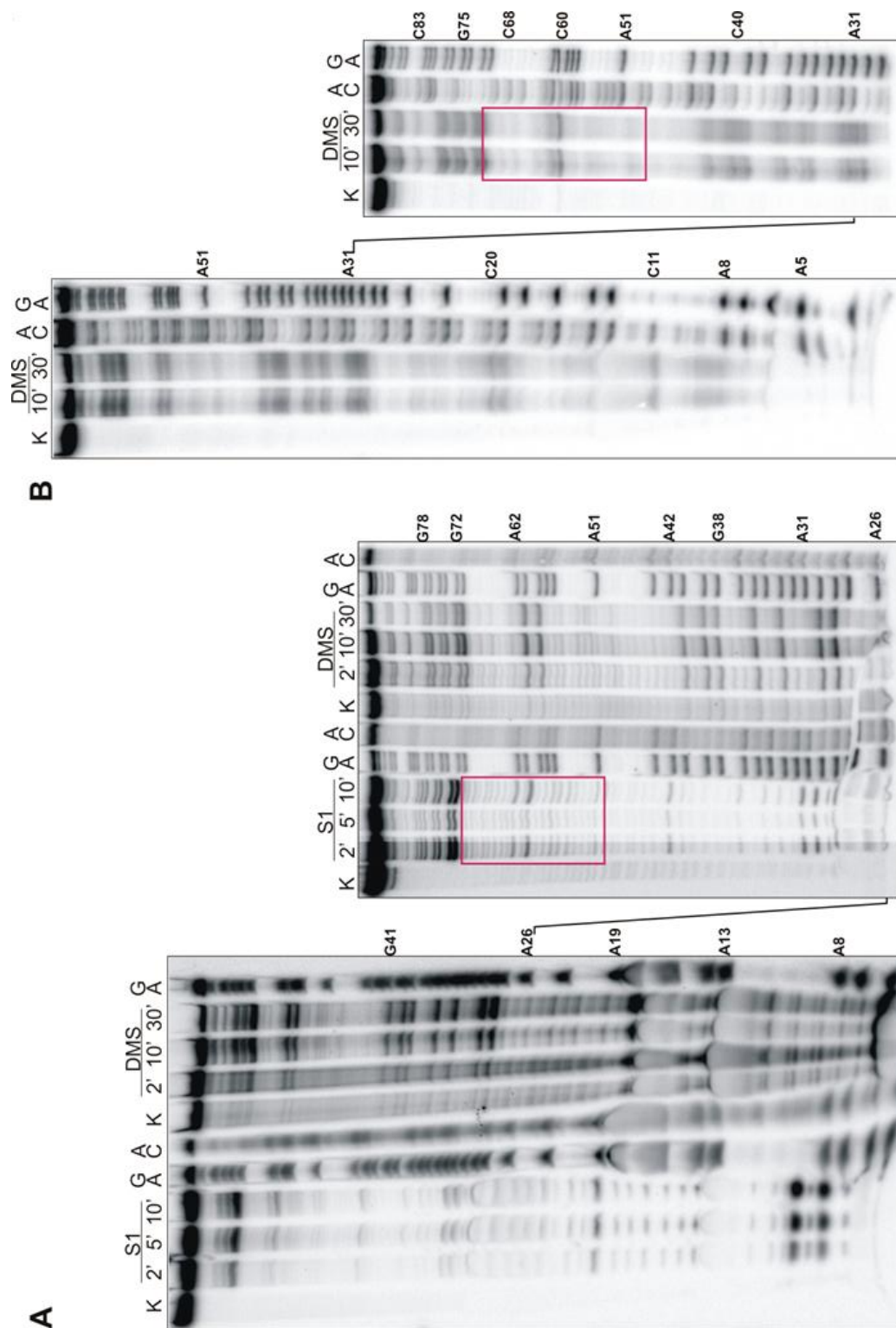
rozszczepiałam wiązania fosfodiesterowe DNA w miejscach modyfikacji za pomocą piperydyny [144]. Następnie, produkty rozdzielałam elektroforetycznie i identyfikowałam miejsca modyfikacji. Zaobserwowałam istotną modyfikację niektórych reszt cytozyny zlokalizowanych poza regionem katalitycznym. Interesujące, że regiony katalityczne obu cząsteczek DNAzymów (T49–T71 w Dz15 oraz C49–G71 w Dz27) nie były dostępne dla modyfikacji za pomocą DMS w tych warunkach (Rys. 28B i 29B).

W celu uzyskania dodatkowych informacji, do analizy struktury drugorzędowej otrzymanych DNAzymów do badań włączyłam także metodę modyfikacji chemicznej DMS w warunkach gdy metylacji ulegają reszty guaniny w pozycji N7 [145]. Wiązanie glikozydowe metylowanej przez DMS reszty puryny jest stosunkowo słabe i łatwo ją wyszczepić z łańcucha polinukleotydowego, a łańcuch przeciąć za pomocą piperydyny. Po rozdiale elektroforetycznym zidentyfikowałam miejsca modyfikacji chemicznej w DNAzymach w obrębie regionów bogatych w guanozyny, co z kolei może wskazywać, iż regiony te prawdopodobnie nie są zaangażowane w tworzenie niekanonicznych par zasad i struktur trzeciorzędowych tych cząsteczek (Rys. 28A i 29A).

Uzyskane dane eksperymentalne (najsilniejsze cięcia nukleazą S1 oraz najintensywniejsze modyfikacje siarczanem dimetylu) zostały wprowadzone do programu *RNAstructure 5.6* [146], który pozwala na wygenerowanie prawdopodobnych struktur drugorzędowych cząsteczek kwasów nukleinowych. Dla DNAzymu #15 program zaproponował dwie struktury drugorzędowe o energii swobodnej odpowiadającej około -11 kcal/mol. Obie struktury posiadają charakterystyczną spinkę w obrębie nukleotydów A31–T50 zakończoną czteronukleotydową pętlą apikalną typu GNRA (N – dowolny nukleotyd, R – puryna), która, podobnie jak w RNA, mogłaby stabilizować termodynamicznie strukturę szpilki. Region katalityczny (T49–T71) nie posiada wyodrębnionych żadnych motywów strukturalnych i przypomina region katalityczny powszechnie znanego DNAzymu 10-23 [6]. Na końcu 3' cząsteczki pojawia się spinka, która powstaje wskutek oddziaływań nukleotydów dystalnej części regionu 3' (reszty G72–C90), zakończona 7-nukleotydową pętlą. W obrębie trzonu spinki występuje pojedyncze niesparowanie typu A-G mogące działać destabilizująco (Rys. 30A). Spinaka obecna na końcu 3' cząsteczki jest charakterystycznym motywem strukturalnym pojawiającym się w pracach Liu i wsp. [58], dotyczących DNAzymu aktywnego w obecności jonów UO_2^{2+} . Natomiast w przypadku DNAzymu #27 w obrębie regionu katalitycznego tworzy się motyw strukturalny typu spiniki z dużą pętlą 14-nukleotydową bądź spiniki z pętlą 6-nukleotydową.

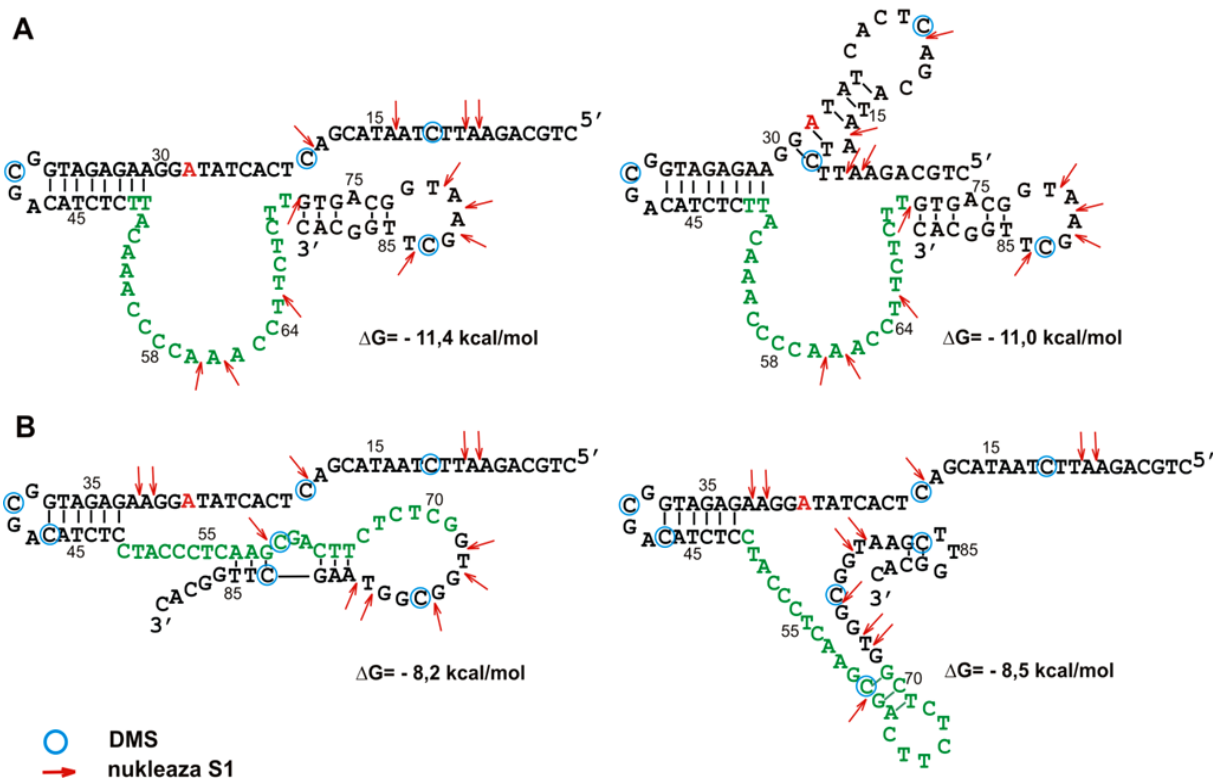


Rysunek 28. Analiza struktury drugorzędowej DNAzymu #15 za pomocą **A**) trawień enzymatycznych nukleazą S1 oraz modyfikacji chemicznej w pozycji N7-G oraz **B**) w pozycji N3-C z wykorzystaniem siarczynu dimetylu. K – linia kontrolna, S1 – ograniczone trawienie nukleazą S1, DMS – chemiczna modyfikacja DMS, G+A i A+C – linie sekwencyjne. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano niektóre pozycje reszt cytozyny, guaniny i adeniny. Czerwona ramką zaznaczono prawdopodobny region katalityczny DNAzymu #15.



Rysunek 29. Analiza struktury drugorzędowej DNAzymu #27 za pomocą **A)** trawień enzymatycznych nukleazą S1 oraz modyfikacji chemicznych w pozycji N7-G oraz **B)** w pozycji N3-C z wykorzystaniem siarczanu dimetylu. K – linia kontrolna, S1 – ograniczone trawienie nukleazą S1, DMS – chemiczna modyfikacja DMS, G+A i A+C – linie sekwencyjne. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano niektóre pozycje cytozyny, guaniny i adeniny. Czerwoną ramką zaznaczono przypuszczalny region katalityczny DNAzymu #27.

Wariant ten również posiada w obrębie nukleotydów G33–C48 spinkę zakończoną czteronukleotydomą pętlą apikalną typu GNRA (N – dowolny nukleotyd, R – puryna). Na rysunku 30B przedstawione zostały dwie prawdopodobne struktury drugorzędowe DNAzemu #27, dla których wartość ΔG wynosi -8,0 kcal/mol.



Rysunek 30. Proponowane struktury drugorzędowe DNAzymów pH-zależnych: **A)** Dz15 **B)** Dz27 wygenerowane przy pomocy programu *RNAstructure* 5.6 z zaznaczonymi miejscami trawień nukleazą S1 oraz modyfikacji chemicznej reszt cytozyny przy użyciu siarczanu dimetylu. Na zielono zaznaczono region typu *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej DNAzymów. Czerwoną czcionką oznaczono miejsce katalicznego cięcia.

Przeprowadziłam także analizę *in silico* w celu znalezienia możliwych struktur drugorzędowych otrzymanych DNAzymów wykorzystując programy *Mfold* [147] i *RNAfold* [148], które generują strukturę drugorzędową DNA w oparciu o algorytm MFE (ang. *minimum free energy*), a także program *KineFold* [149], który posiada zdolność zwijania DNA z uwzględnieniem pseudowęzłów. Aranżacje struktur drugorzędowych zaproponowane przez wyżej wspomniane programy były podobne do tych, które wygenerował program *RNAstructure*. Mianowicie, posiadały w obrębie nukleotydów A31–T50 strukturę spinki zakończoną czteronukleotydomą pętlą apikalną typu GNRA (N – dowolny nukleotyd, R – puryna), region kataliczny DNAzemu #15 nie posiadał żadnych motywów strukturalnych bądź był częściowo zaangażowany w tworzenie struktury spinkowej na końcu 3' cząsteczki, a

w obrębie regionu katalitycznego DNAzemu #27 tworzył się motyw strukturalny typu spinki (C60–G71) z pętlą 6-nukleotydomową oraz niedużym trzonem złożonym z trzech par zasad. Kolejne doświadczenia postanowiłam planować w oparciu o struktury drugorzędowe DNAzymów wygenerowane przez program *RNAstructure*.

Należy jednak zauważyć, iż struktury wygenerowane przez program *RNAstructure* nie są całkowicie zgodne z danymi eksperymentalnymi przedstawionymi na załączonych autoradiogramach. Na przykład, program przedstawia region katalityczny Dz15 jako fragment jednoniciowy niezaangażowany w tworzenie żadnych motywów struktury drugorzędowej, co dobrze koreluje z danymi z mapowania nukleazą S1, dla której region ten był dostępny. Jednakże, reszty cytozyny obecne w tym regionie nie ulegają modyfikacji za pomocą DMS, co sugeruje, że mogą być one zaangażowane w tworzenie wiązań np. dalekiego zasięgu. Co istotne, w przypadku DNAzymów działających w niskim pH środowiska jest wielce prawdopodobne, że w ich strukturach obecne są nietypowe oddziaływania z zaangażowaniem protonowanej reszty cytozyny np. $C^+ \cdot C$ czy $C^+ \cdot CG$, bądź protonowanej reszty adeniny $A^+ \cdot A^+$. Obecności takich oddziaływań nie potwierdzają dostępne metody analizy mapowania struktury drugorzędowej cząsteczek [150].

3.3. Właściwości katalityczne wybranych wariantów DNAzymów aktywnych w niskim pH środowiska skróconych z końca 5' i 3'

3.3.1. DNAzyny działające w układzie jednocząsteczkowym (*in cis*)

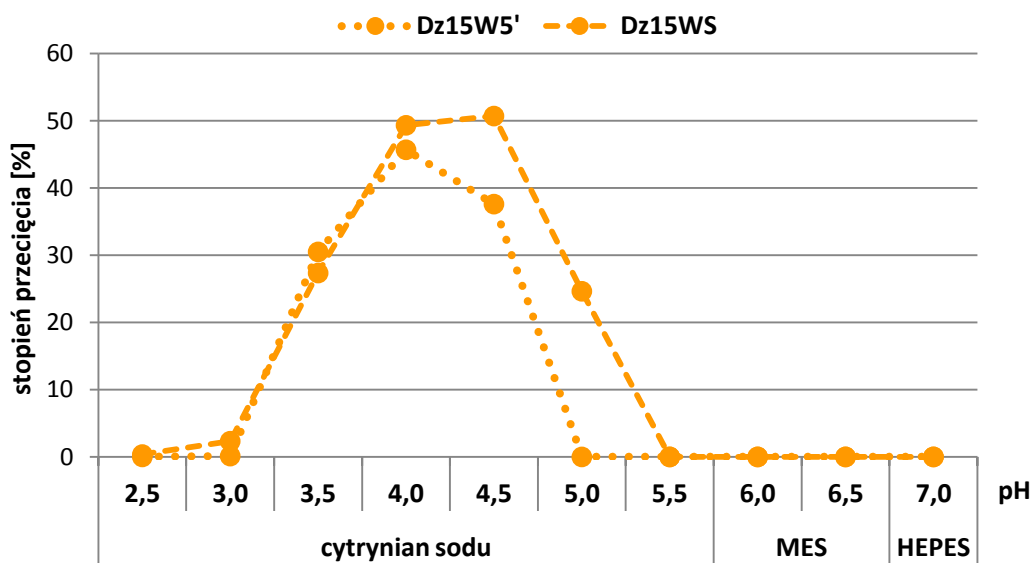
3.3.1.1. Określanie profilu pH wybranych DNAzymów

W oparciu o wyniki mapowania struktur drugorzędowych DNAzymów pH-zależnych, postanowiłam określić rolę ich elementów dystalnych tj. końców 5' i 3' w reakcji katalizy. Zaprojektowałam dwa rodzaje wariantów DNAzymów pH-zależnych. Pierwszy rodzaj, to DNAzyny skrócone o 19 nukleotydów z końca 5', które otrzymałam w reakcji PCR z użyciem starterów P4 i P3.2. Drugi rodzaj, DNAzymów to cząsteczki skrócone o 19 nukleotydów zarówno z końca 5', jak i z końca 3'. Warianty skrócone z obu końców uzyskane zostały na drodze syntezy chemicznej.

Aktywność katalityczną skróconych wariantów DNAzemu #15 określiłam przy różnych wartościach pH środowiska reakcji w zakresie 2,5–7,0 oraz w obecności różnych soli buforujących (Rys. 31). DNAzym #15 skrócony z końca 5' – Dz15W5' nie wykazywał aktywności katalitycznej w $pH \leq 3,0$ oraz w $pH \geq 5,0$. Stopień przecięcia tego wariantu w pH

3,5 wynosił 30% zaś w pH 4,0–4,5 ok. 40–45%. W stosunku do aktywności katalitycznej DNAzemu #15 pełnej długości (Rys. 25), aktywność katalityczna wariantu skróconego z końca 5' w pH 3,5 i 4,0 była wyższa odpowiednio o 15% i 7%. Natomiast w środowisku o pH 4,5 stopień przecięcia Dz15W5' był na poziomie 38% i był niższy o ok. 10% od stopnia przecięcia wariantu pełnej długości (Rys. 25 i 31)

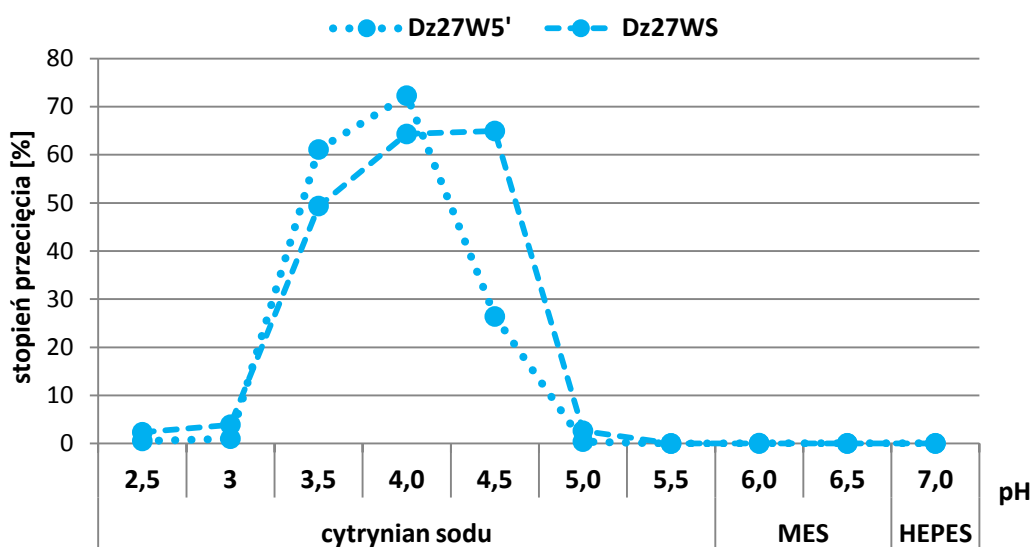
Usunięcie 19 nukleotydów jednocześnie z końca 5' i 3' DNAzemu #15 – Dz15WS nieznacznie poprawiło jego właściwości katalityczne. Wariant ten uległ przecięciu w 50% przy 60-minutowej inkubacji w 50 mM cytrynianie sodu o pH 4,0–4,5. Niższy stopień przecięcia, na poziomie około 30%, wariant Dz15WS wykazywał w pH 3,5. Co ciekawe, usunięcie 19 nukleotydów jednocześnie z końca 5' i 3' DNAzemu spowodowało 3-krotny wzrost stopnia jego przecięcia w pH 5,0, w stosunku do obserwowanego dla wariantu pełnej długości. Ponadto, Dz15WS nie wykazywał istotnej aktywności katalitycznej w pozostałych z badanych wartościach pH tj. w $\text{pH} \leq 3,0$ oraz $\text{pH} \geq 5,5$ (Rys. 31).



Rysunek 31. Profil pH DNAzemu pH-zależnego #15. Na wykresie przedstawiono stopień przecięcia DNAzemu skróconego z końca 5' – Dz15W5' oraz DNAzemu skróconego z obu końców 5' i 3' – Dz15WS w różnych warunkach pH i soli buforujących. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 60 minut.

Określiłam także aktywność katalityczną skróconych wariantów pH-zależnego DNAzemu #27 (Rys. 32). Zaobserwowałam praktycznie całkowity spadek aktywności DNAzemu skróconego z końca 5' – Dz27W5' w stosunku do aktywności DNAzemu pełnej długości w zakresie pH 2,5–3,0 (Rys. 25 i 32). Wariant Dz27W5' wykazywał 60–70% stopień przecięcia w pH 3,5–4,0, podobnie jak wariant pełnej długości. Ponadto, DNAzym

skrócony z końca 5' był praktycznie nieaktywny w $\text{pH} \geq 5,0$. Natomiast skrócenie DNAzemu #27 z obu końców 5' i 3' skutkowało znaczącym spadkiem aktywności w $\text{pH} 2,5\text{--}3,0$ do poziomu 2–4%. Wariant Dz27WS uległ 65% przecięciu przy 60-minutowej inkubacji w 50 mM cytrynianie sodu o $\text{pH} 4,0\text{--}4,5$, natomiast nie wykazywał aktywności katalitycznej w $\text{pH} \geq 5,5$. Zatem profil pH działania DNAzemu #27 po skróceniu z obu końców 5' i 3' uległ zawężeniu; wariant Dz27WS był wysoce aktywny w $\text{pH} 3,5\text{--}4,5$, podczas gdy pełnej długości DNAzem #27 był aktywny w środowisku o pH w zakresie 2,5–4,5, z optimum aktywności przypadającym w $\text{pH} 4,0$ (Rys. 25 i 32).



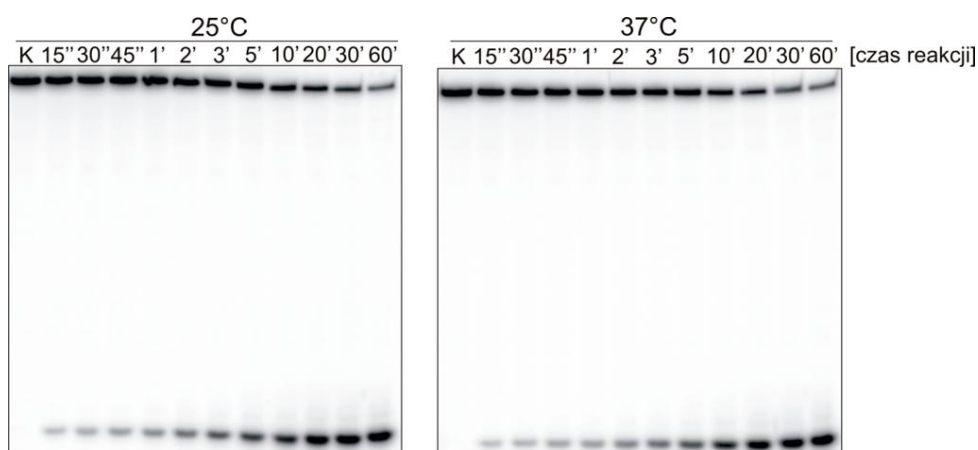
Rysunek 32. Profil pH DNAzemu pH -zależnego #27. Na wykresie przedstawiono stopień przecięcia DNAzemu #27 skróconego z końca 5' – Dz27W5' oraz DNAzem skróconego z obu końców 5' i 3' – Dz27WS w różnych warunkach pH i soli buforujących. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 60 minut.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń wyznaczono profil pH „uproszczonych” wariantów dwóch DNAzymów pH -zależnych, co pozwoliło na określenie roli elementów dystalnych tj. końca 5' i 3' cząsteczek w reakcji katalizy. Wykazano, iż odcięcie 19 nukleotydowych fragmentów z końca 5', jak i z końca 3' nie pogarsza ich właściwości katalitycznych. Aktywność DNAzemu #15 skróconego z obu końców 5' i 3' – Dz15WS w $\text{pH} 4,0\text{--}4,5$ uległa zwiększeniu w stosunku do cząsteczki o pełnej długości. Natomiast aktywność DNAzemu #27 skróconego z obu końców 5' i 3' – Dz27WS nieznacznie spadła w $\text{pH} 4,0$ oraz nieznacznie wzrosła w $\text{pH} 4,5$. Zatem skrócone warianty DNAzymów pH -zależnych są aktywne katalitycznie i wykazują optimum działania w zakresie $\text{pH} 4,0\text{--}4,5$.

3.3.1.2. Stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia DNAzymów

Po wstępnej charakterystyce właściwości katalitycznych i specyficzności działania DNAzymów pH-zależnych skróconych z końca 5' i 3' określiłam stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia Dz15WS oraz Dz27WS w buforze o pH optymalnym dla zachowania ich wysokiej aktywności katalitycznej.

Do zbadania aktywności katalitycznej wykorzystałam metodę znakowania izotopem ^{32}P wybranego wariantu DNAzymu z końca 5' z użyciem radioaktywnego $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oraz kinazy polinukleotydowej. Po elektroforezie w żelu poliakryloamidowym, DNAzym był eluowany w pH 7,0, strącony etanolem i po rozpuszczeniu użyty do określania stałych szybkości reakcji (k_{obs}). Reakcję prowadzono w obecności 50 mM cytrynianu sodu o pH 4,0, w dwóch temperaturach, w 25°C oraz w 37°C, w celu określenia wpływu temperatury na szybkość katalizowanej reakcji, a pośrednio na strukturę drugorzędową badanych cząsteczek (Rys. 33 i 34).



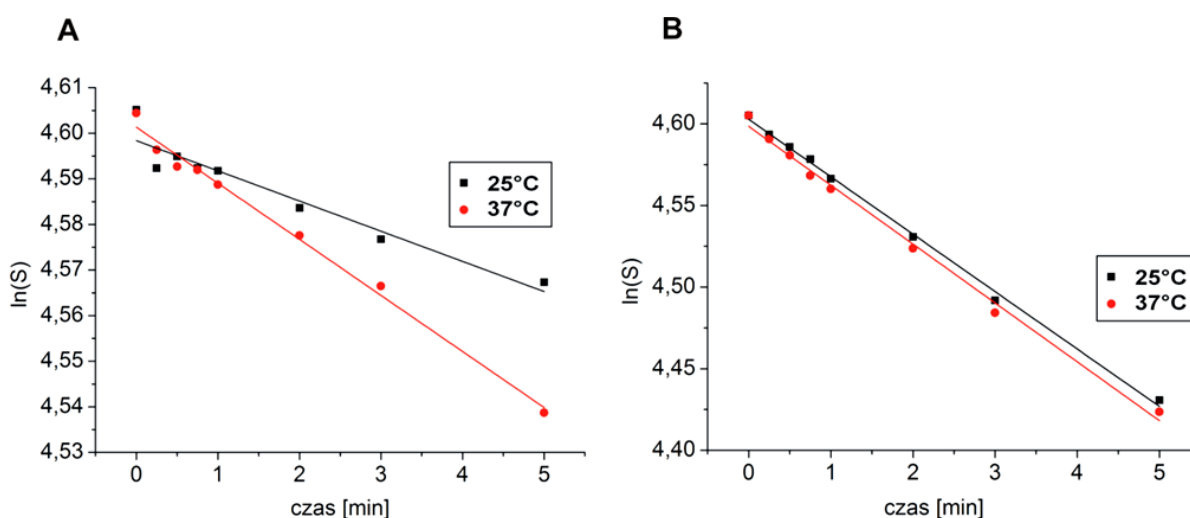
Rysunek 33. Przykładowe autoradiogramy przedstawiające przebieg reakcji cięcia DNAzymu Dz27WS prowadzonej w temperaturze 25°C i 37°C w obecności 50 mM cytrynianu sodu o pH 4,0. K – linia kontrolna, pH 7,0.

Badane DNAzyny są wariantami wolnotnącymi, gdyż przyrost ilości produktu przebiegał relatywnie wolno, a reakcja cięcia nawet po godzinie nie osiągała stanu *plateau*. W tej sytuacji, dla otrzymania rzetelnych wartości stałych szybkości reakcji (k_{obs}), konieczne było wykonanie wykresu zależności $y = f(x)$, gdzie $y = \ln(S)$ oraz $x = t$. Wykorzystano równanie prostej:

$$\ln(S) = a \cdot t + b$$

gdzie: $a - k_{obs}$, S – ubytek substratu w czasie t oraz b – miejsce przecięcia z osią OY. Do wyznaczenia prostej wybierano przedział argumentów t , zaczynając od $t = 0$, odpowiadający prostoliniowemu odcinkowi wykresu wykładniczego (Rys. 34).

Reakcja katalitycznego przecinania się wariantu Dz15WS prowadzona w temperaturze 25°C przebiegała ze stałą szybkością wynoszącą ok. 0,007 min⁻¹. W reakcji prowadzonej w temperaturze 37°C DNAzym 15WS wykazywał 2-krotnie wyższą aktywność katalityczną niż w 25°C, a stała k_{obs} wynosiła wówczas 0,012 min⁻¹ (Rys. 35). Reakcja katalitycznego przecinania się wariantu Dz27WS prowadzona w temperaturze 25°C i w temperaturze 37°C przebiegała ze zbliżoną szybkością w środowisku o pH 4,0, stałe k_{obs} wynosiły odpowiednio 0,0352 min⁻¹ i 0,0361 min⁻¹ (Rys. 35).

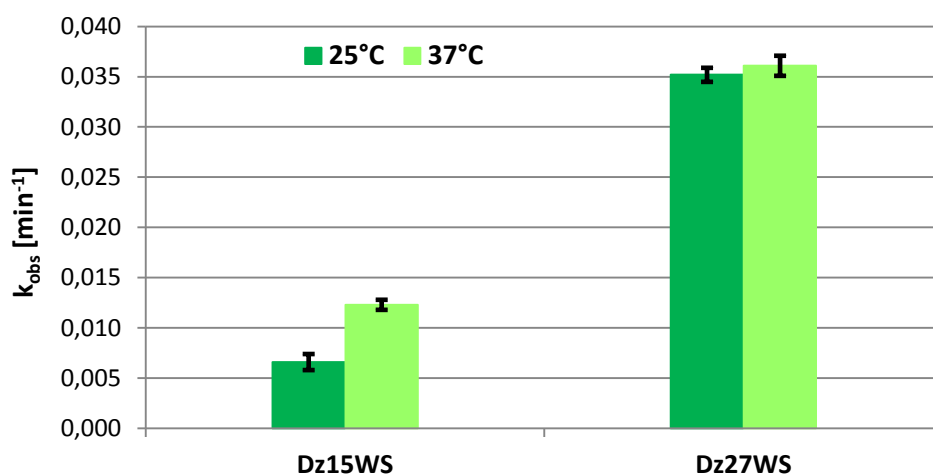


Rysunek 34. Wykresy zależności logarytmu naturalnego ubytku substratu od czasu dla reakcji cięcia **A)** DNAzymu Dz15WS oraz **B)** DNAzymu Dz27WS, prowadzonej w pH 4,0.

Warto zauważyć, że obydwie DNAzemy katalizowały reakcję cięcia z różną szybkością. Wariant Dz27WS, jako przedstawiciel grupy I wariantów otrzymanych w procesie selekcji, wykazywał istotnie wyższą aktywność katalityczną w stosunku do wariantu Dz15WS, będącego przedstawicielem grupy IV. Stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia wariantu Dz27WS, w zależności od temperatury reakcji były 3- i 5-krotnie wyższe niż k_{obs} wariantu Dz15WS (Rys. 35).

Postulujemy, że efekt niższej aktywności katalitycznej DNAzymu 15WS może być związany ze specyficznym składem nukleotydowym regionu katalitycznego. Region katalityczny tego wariantu zawiera sekwencję złożoną z ciągów dwóch, trzech i czterech tych samych nukleotydów: TTacAAACCCCAAACCTTctcTT, co może skutkować zwinięciem

cząsteczki DNAzemu w formę wykazującą niższą aktywność katalityczną w środowisku o niskiej wartości pH.



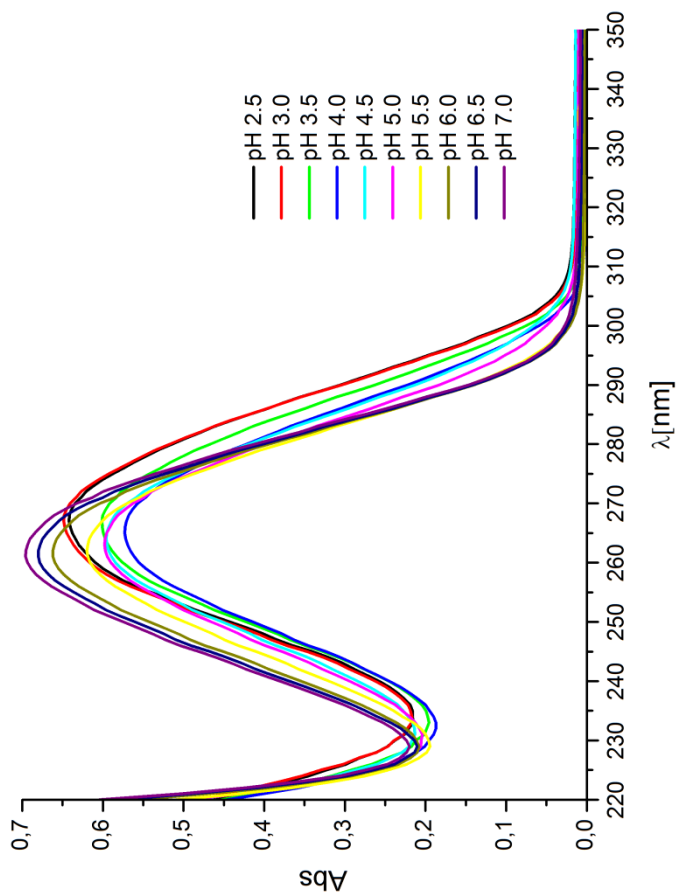
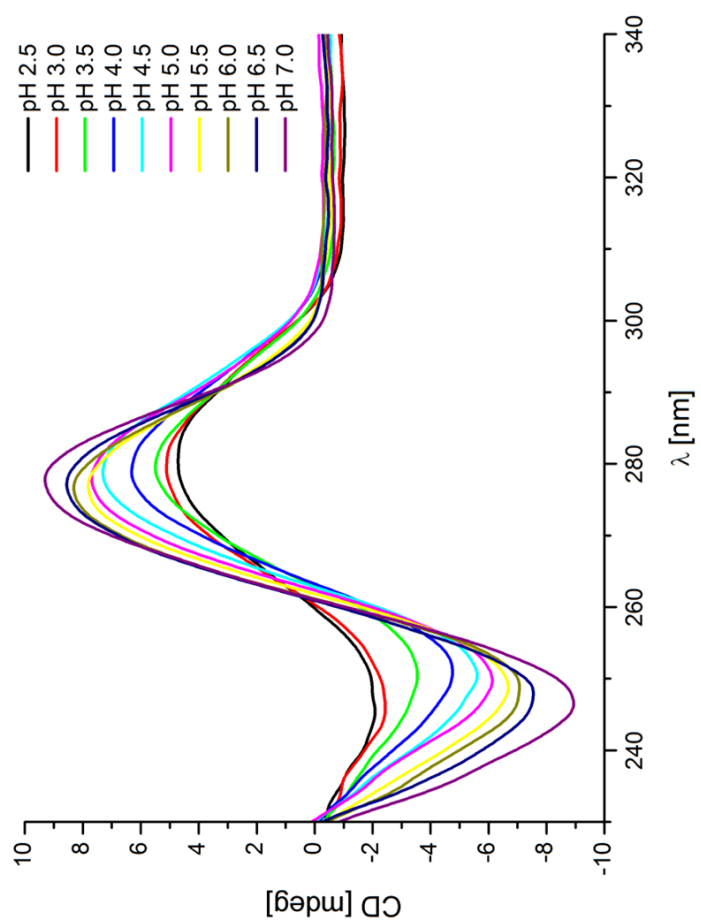
Rysunek 35. Porównanie wpływu temperatury na szybkość reakcji cięcia DNAzemu Dz15WS oraz DNAzemu Dz27WS. Reakcję prowadzono w obecności 50 mM cytrynianu sodu o pH 4,0 w czasie 60 minut.

3.3.1.3. Zmiany strukturalne w cząsteczkach DNAzymów obserwowane za pomocą spektroskopii UV i CD

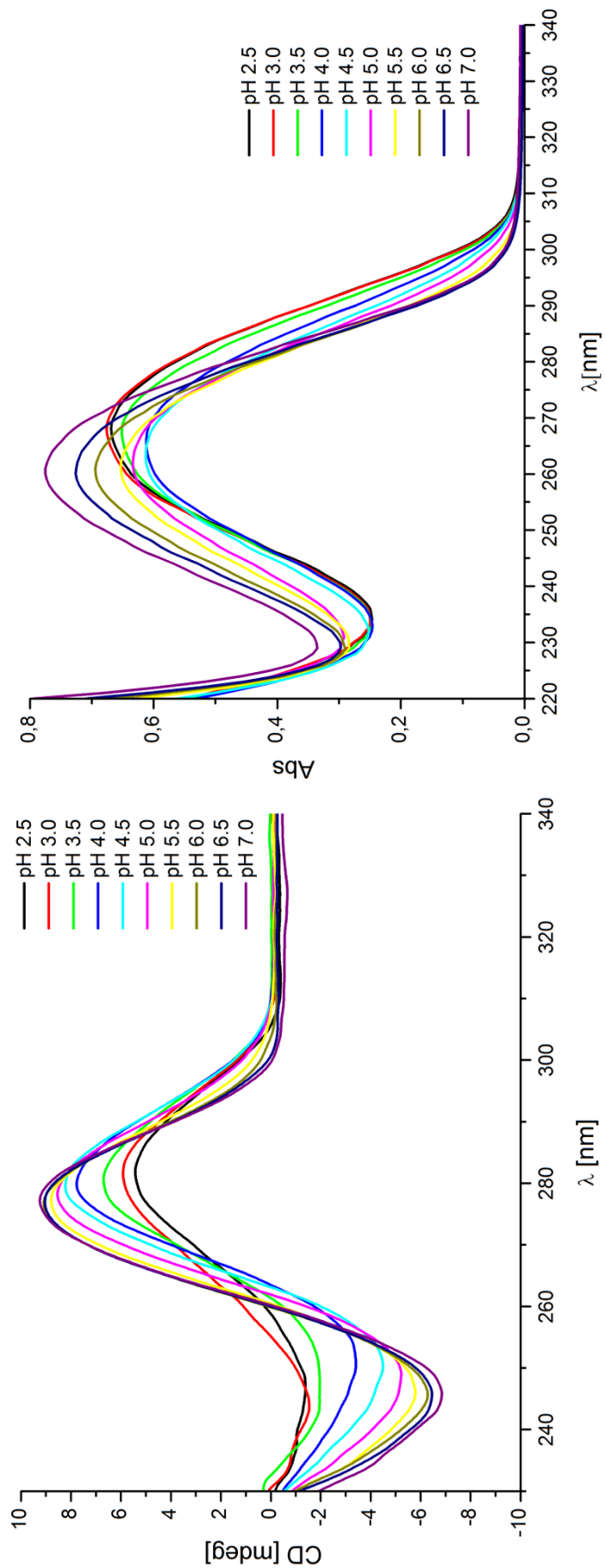
W wyniku przeprowadzonego eksperymentu selekcji *in vitro* otrzymałam DNAzemy pH-zależne, których region katalityczny złożony jest z powtarzających się motywów typu TT, AAA, CCCC, AAA, CC i które do swojej aktywności katalitycznej wymagają ściśle określonych warunków pH środowiska. Gray i wsp. [151] wykazali, że jednoniciowe kwasy nukleinowe bogate w powtarzające się reszty pirymidynowe czy purynowe mogą ulegać istotnym rearanżacjom strukturalnym w niskim pH środowiska w wyniku tworzenia się nietypowych par zasad z protonowaną resztą cytozyny np. pary $C^+ \cdot C$ czy $C^+ \cdot CG$ bądź protonowaną resztą adeniny $A^+ \cdot A^+$. Postanowiłam zatem wykorzystać spektroskopię UV-vis oraz dichroizmu kołowego do monitorowania potencjalnych zmian konformacyjnych związanych ze zmianą pH środowiska.

W doświadczeniach użyłam nieprzecinające się DNAzemy 15WS oraz 27WS, gdzie rybonukleotyd adeniny, będący miejscem katalitycznego cięcia, zastąpiono deoksyrybonukleotydem (Dz15WS-dA oraz Dz27WS-dA). Po etapie denaturacji, do próby z odpowiednim DNAzemy o stężeniu 10 μ M, wprowadzano 50 mM cytrynian sodu o pH w zakresie 2,5–7,0. Długość drogi optycznej podczas pomiarów spektroskopii CD jak i spektroskopii UV-vis wynosiła 1 mm.

A

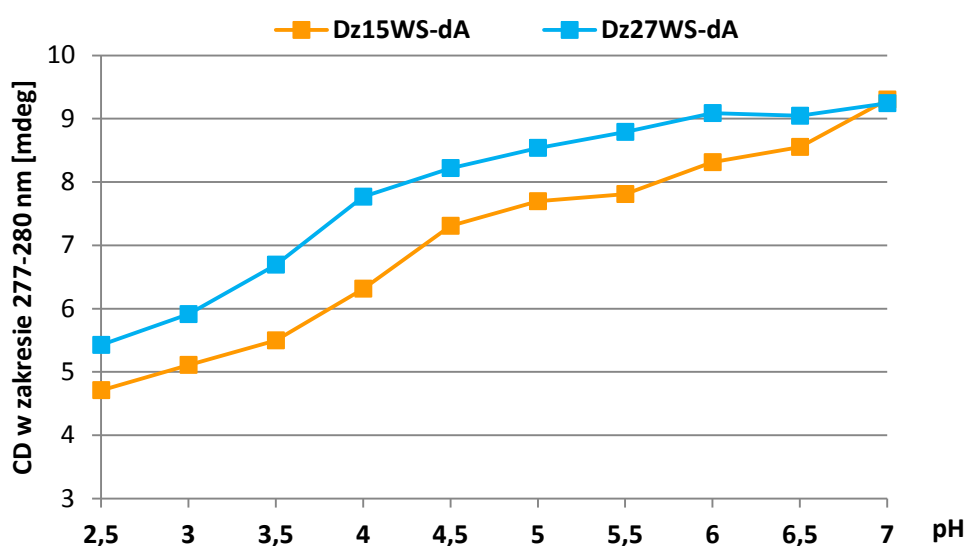


B



Rysunek 36. Widma CD i UV-vis: **A)** DNazymu 15WS-dA **B)** DNazymu 27WS-dA w różnym pH środowiska reakcji. Pomiar wykonano w 50 mM cytrynianie sodu w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej $l = 1$ mm.

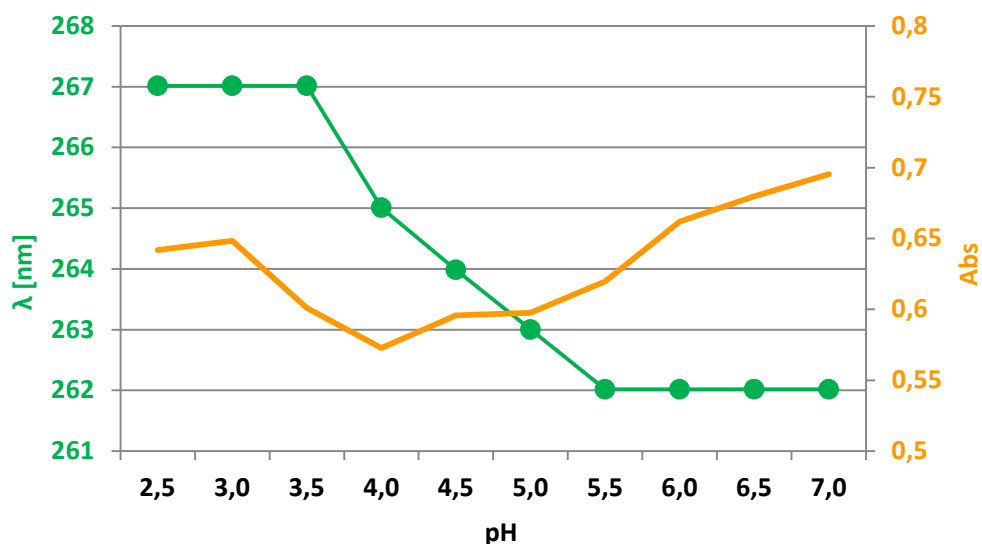
Widma CD wskazują na obecność formy B-DNA, o czym świadczy pozytywny efekt Cottona przy ~ 277 nm oraz negatywny efekt Cottona przy ~ 250 nm [152]. Wraz ze spadkiem pH od 7,0 do 2,5 dochodzi natomiast do istotnego spadku intensywności pozytywnego sygnału przy 277–280 nm (Rys. 36 i 37), co może być związane z próbą przejścia formy B-DNA do Z-DNA. Nie obserwowano jednak negatywnego sygnału przy 294 nm, świadczącego o tym, że DNAzemy pH-zależne ulegają przekształceniu w formę Z-DNA w danych warunkach prowadzenia reakcji (Rys. 36, lewy panel).



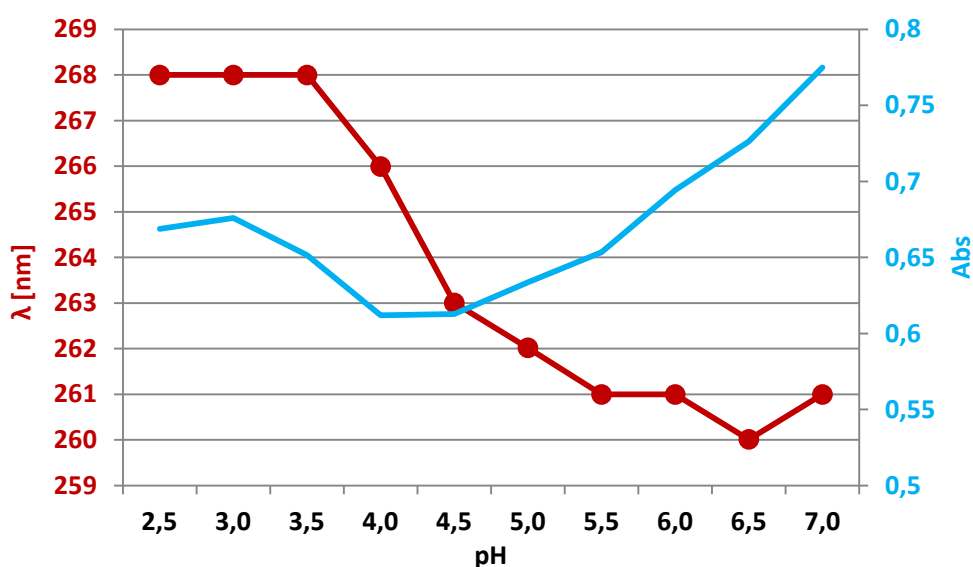
Rysunek 37. Zmiany intensywności absorpcji DNAzymów 15WS-dA oraz 27WS-dA przy długości fali 277–280 w zależności pH. Pomiary wykonano w 50 mM cytrynianie sodu w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej $l = 1$ mm. Wykresy sporządzono na podstawie widm CD przedstawionych na rysunku 36.

Widma UV-vis przedstawione na rys. 36 (prawy panel) pokazują zmiany intensywności absorpcji DNAzemu 15WS-dA, jak i DNAzemu 27WS-dA. W obu przypadkach można zaobserwować istotny spadek natężenia pasma absorpcji przy ~ 265 nm (efekt hipochromowy) wraz ze spadkiem pH do 4,5–4,0 (Rys. 36, 38 i 39). Obserwacja ta może wskazywać na tworzenie struktur dwuniciowych wraz z obniżaniem pH z 7,0 do 4,0–4,5 – obniżona absorbancja jest wynikiem tego, że elektrony z aromatycznego pierścienia zasad zaangażowane są w oddziaływania warstwowe i nie są tak podatne na wzbudzenie UV. Co więcej, przy pH ok. 4,0 dochodzi do przesunięcia pasm absorpcyjnych w kierunku fal dłuższych (przesunięcie batochromowe) (Rys. 36, 38 i 39). Efekt batochromowy występuje w przypadku cząsteczek charakteryzujących się obecnością wiązań podwójnych lub wolnych par elektronowych. Przy pH 3,0–2,5 dochodzi do zaniku oddziaływań między nietypowymi

parami zasad z udziałem protonowanej reszty cytozyny np. $C^+ \cdot C$ czy $C^+ \cdot CG$, bądź protonowanej reszty adeniny $A^+ \cdot A^+$, o czym świadczy wzrost natężenia pasma absorpcji (Rys. 36, 38 i 39).



Rysunek 38. Histogram ilustrujący zmianę maksymalnego natężenia pasm absorpcyjnych (—) Dz15WS-dA oraz przesunięcie tych pasm w zakresie długości fali od 261 do 268 nm (●) w zależności od pH środowiska. Pomiary wykonano w 50 mM cytrynianie sodu w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej $l = 1$ mm. Wykresy sporządzono na podstawie widm UV-vis przedstawionych na rysunku 36A.



Rysunek 39. Histogram ilustrujący zmianę maksymalnego natężenia pasm absorpcyjnych (—) Dz27WS-dA oraz przesunięcie tych pasm w zakresie długości fali od 261 do 268 nm (●) w zależności od pH środowiska. Pomiary wykonano w 50 mM cytrynianie sodu w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej $l = 1$ mm. Wykresy sporządzono na podstawie widm UV-vis przedstawionych na rysunku 36B.

Wyniki badań spektroskopowych (CD i UV-vis) wskazują, że w środowisku o pH 3,5–5,0 natężenie absorpcji światła spada. Największy spadek intensywności pasm absorpcyjnych odnotowano w pH 4,0–4,5. Najprawdopodobniej, dochodzi wówczas do zmian w strukturze drugorzędowej DNAzymów pH-zależnych, co z kolei powoduje, że DNAzimy wykazują najwyższą aktywność katalityczną w tych warunkach.

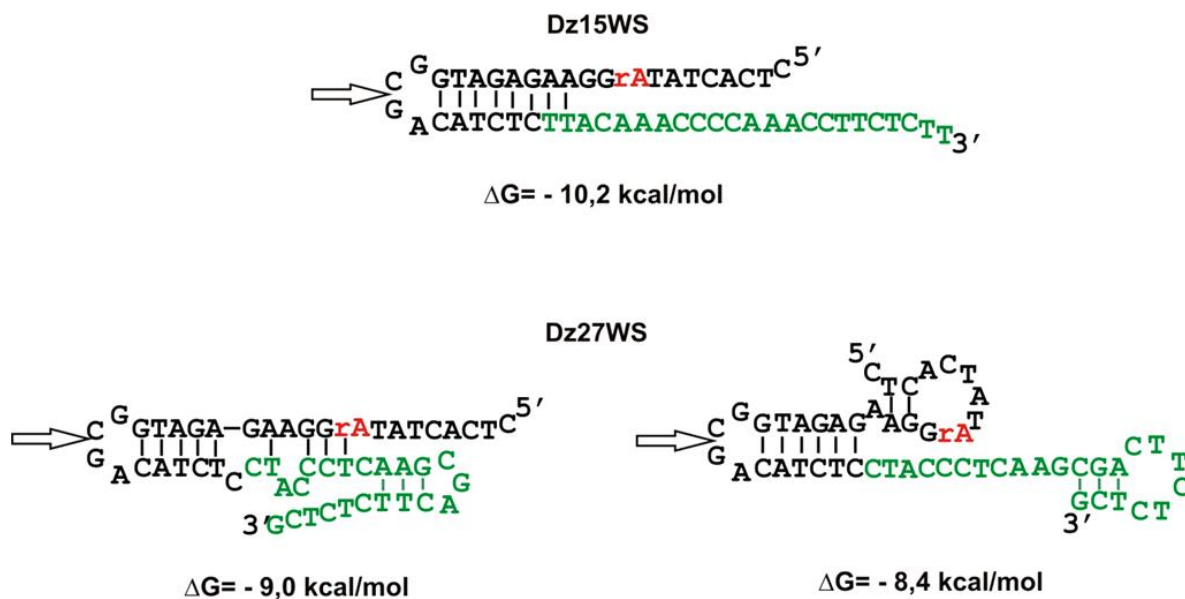
3.3.2. DNAzimy działające w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*)

Niezależnie od badań aktywności katalitycznej DNAzymów pH-zależnych działających w układzie jednocząsteczkowym (*in cis*), podjęłam także próbę uzyskania DNAzymów działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*). W tym celu zaprojektowałam odpowiednie warianty DNAzimu 15WS oraz DNAzimu 27WS. Warianty działające w układzie dwucząsteczkowym powstały w wyniku przecięcia pętli apikalnej typu GNRA DNAzymów Dz15WS i Dz27WS (Rys. 40).

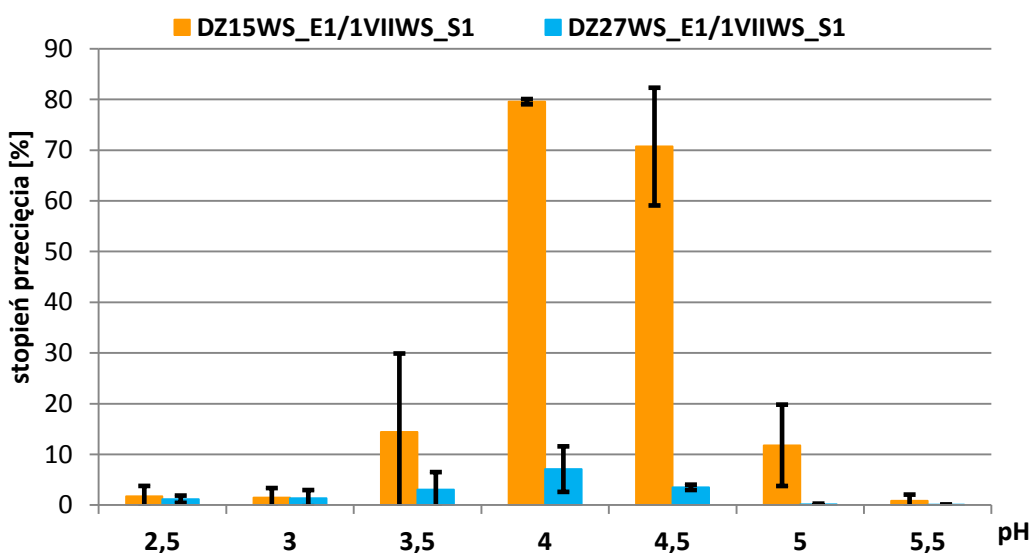
DNAzimy działające *in trans* przygotowałam przez zmieszanie znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' substratu 1/VIIWS_S1 (5'-CTCACTATrAGGAAGAGATGGC-3') z oligonukleotydem Dz15WS_E1 (5'-GACATCTCTTACAAACCCCAAACCTTCTCTT-3') lub z oligonukleotydem Dz27WS_E1 (5'-GACATCTCCTACCCTCAAGCGACTTCTCTCG-3'). DNAzimy wprowadzane były do reakcji w 100-krotnym nadmiarze w stosunku do substratu 1VIIWS_S1. Reakcję cięcia inicjowałam poprzez dodanie 50 mM cytrynianu sodu o pH w zakresie od 2,5 do 5,5.

DNAzym 15WS *trans*, działający w układzie dwucząsteczkowym najwyższą aktywność katalityczną wykazywał podczas inkubacji w 50 mM cytrynianie sodu o pH 4,0–4,5. Oligonukleotydowy substrat 1VIIWS_S1 uległ przecięciu w pH 4 w 80%, zaś w pH 4,5 w 70%. Ponadto, DNAzym 15WS *trans*, podobnie jak DNAzym 15WS działający w układzie jednocząsteczkowym, był praktycznie nieaktywny w środowisku o pH $\leq 3,0$ oraz pH $\geq 5,5$ (Rys. 41 i 31). Co ciekawe, aktywność katalityczna DNAzimu 27WS *trans*, działającego w układzie dwucząsteczkowym była istotnie niższa niż aktywność tego wariantu działającego w układzie jednocząsteczkowym. Po trzygodzinnej inkubacji w buforze o pH 4,0–4,5 stopień przecięcia substratu 1VIIWS_S1 był na poziomie niespełna 10%, podczas gdy wariant działający w układzie jednocząsteczkowym wykazywał 65% stopień przecięcia podczas godzinnej inkubacji w buforze o pH 4,0 (Rys. 41 i 32). Można zatem sądzić, że w przypadku DNAzimu 27WS czteronukleotydowa pętla apikalna typu GNRC jest konieczna do przyjęcia

przez cząsteczkę DNAzemu odpowiedniej struktury, a tym samym do zachowania jego wysokiej aktywności katalitycznej.



Rysunek 40. Proponowane struktury drugorzędowe DNAzymów pH-zależnych skróconych z końców 5' i 3' wygenerowane przy pomocy programu *RNAstructure 5.6*. Na zielono zaznaczono region typu *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej użytej podczas selekcji *in vitro*. Czerwoną czcionką oznaczono miejsce katalitycznego cięcia. Strzałka wskazuje miejsce przecięcia DNAzemu działającego w układzie jednocząsteczkowym w celu otrzymania układu dwucząsteczkowego.



Rysunek 41. Histogram przedstawia wyniki analizy aktywności katalitycznej DNAzymów pH-zależnych działających w układzie dwucząsteczkowym. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM cytrynian sodu pH 2,5–5,5, przez 3 godziny w temperaturze 37°C.

Przedstawione wyniki badań dotyczące DNAzymów aktywowanych w niskim pH środowiska działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*) wymagają przeprowadzenia dalszych eksperymentów i analiz. Badania te zamierzam kontynuować w celu dokonania szczegółowej charakterystyki właściwości katalitycznych oraz specyficzności działania otrzymanych DNAzymów.

3.4. DNAzimy aktywne w obecności jonów Cd^{2+}

Otrzymanie w 1994 roku katalitycznych cząsteczek DNA metodą selekcji *in vitro* dało początek nadziejom na ich szerokie wykorzystanie. Ze względu na to, że DNAzimy są znacznie bardziej odporne niż np. rybozomy czy enzymy białkowe na niepożądaną degradację, zachodzącą pod wpływem działania czynników środowiskowych, wykorzystywane są głównie do konstrukcji biosensorów. W szczególności, z sukcesem zastosowano DNAzimy do konstrukcji biosensorów wykrywających jony metali np. jony Pb^{2+} [153], Cu^{2+} [154], czy UO_2^{2+} [58].

W związku z powyższym, po pierwszej próbie otrzymania DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} przy zastosowaniu metody selekcji *in vitro*, w wyniku której otrzymałam DNAzimy aktywne w niskim pH środowiska, postanowiłam eksperyment selekcji powtórzyć stosując zmienioną procedurę selekcji.

3.4.1. Synteza biblioteki kombinatorycznej

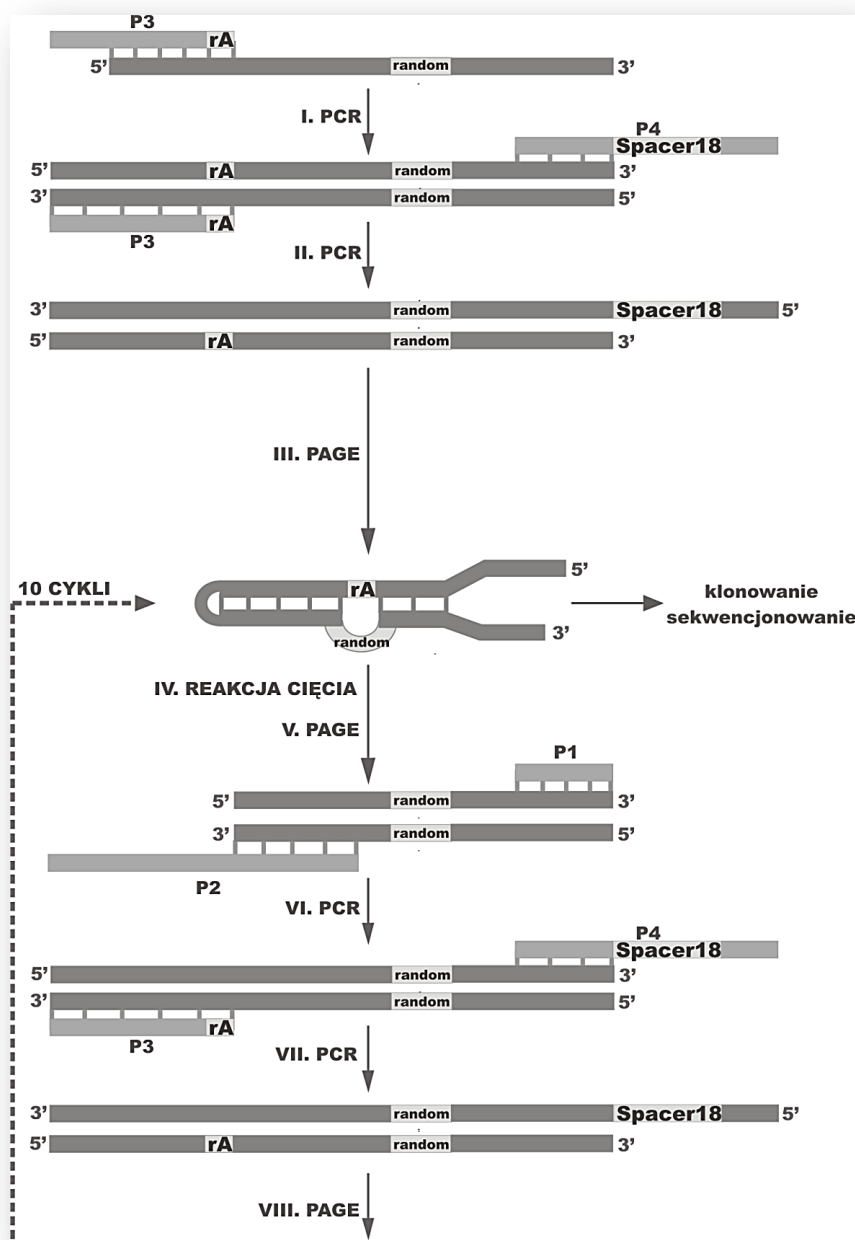
W wyniku pierwszego eksperymentu selekcji *in vitro*, którego celem było uzyskanie DNAzymów Cd^{2+} -zależnych, otrzymałam warianty aktywowane w wyniku obniżenia pH środowiska do wartości $\leq 5,0$. Jak wspomniałam wcześniej, do takiego wyniku selekcji mogły przyczynić się dwa czynniki: 1/ 23-nukleotydowy region *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej mógł być za krótki do utworzenia centrum katalitycznego zależnego od wiązania jonów Cd^{2+} oraz 2/ procedura selekcji ze standardowym etapem strącania DNA w pH 5,2, obniżonym w stosunku do pH 7,0 podczas selekcji wariantów, mogła spowodować, że w konsekwencji otrzymałam DNAzimy pH-zależne. Wykorzystując zdobyte doświadczenie metodyczne, postanowiłam przeprowadzić kolejny eksperyment selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} . Wprowadziłam istotną modyfikację w procedurze selekcji – na wszystkich etapach zmieniłam warunki strącania DNA z roztworu etanolem z pH 5,2 na pH 7,0. Ponadto, selekcję *in vitro* rozpocząłam wykorzystując dwie biblioteki kombinatoryczne: bibliotekę DNAzymów zawierającą 23-nukleotydowy odcinek

random, co odpowiada $0,7 \times 10^{13}$ różnych cząsteczek DNA oraz bibliotekę DNAzymów z regionem *random* o długości 40 nukleotydów, gdzie teoretyczna liczba wariantów wynosiła $1,2 \times 10^{24}$. Zaletą biblioteki z dłuższym regionem *random* jest możliwość zwinięcia się wariantów w bardziej skomplikowane struktury drugo- i trzeciorzędowe [55]. Zwiększa to prawdopodobieństwo wystąpienia wśród nich wariantów o pożądanym, lecz rzadko występującym właściwościach. Wadą takiej biblioteki jest brak fizycznej możliwości użycia w eksperymencie takiej ilości DNA, która zapewniałaby obecność w próbce wszystkich teoretycznie możliwych wariantów sekwencji. Uzyskanie pełnej reprezentatywności biblioteki było natomiast możliwe w przypadku 23-nukleotydowego regionu *random*. Warianty o tej długości mogą tworzyć jednakże stosunkowo nieskomplikowane motywy strukturalne [155].

Syntezę dwóch zaplanowanych bibliotek kombinatorycznych przeprowadziłam zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 42 (krok I–III). Pulę dsDNA odpowiadającą DNAzymom pełnej długości, zarówno z 23-nukleotydowym jak i 40-nukleotydowym regionem *random*, otrzymałam poprzez wykorzystanie wypełniającej reakcji PCR. Do reakcji użyłam dwóch zsyntetyzowanych chemicznie oligomerów DNA. Jeden z oligomerów, oligomer P3 zawierał resztę adeniny, jako miejsc cięcia indukowanego jonami Cd^{2+} natomiast drugi zawierał odcinek typu *random*. Do kolejnej reakcji PCR wprowadzałam startery P4 i P3. Użycie startera P4 było bardzo ważne w syntezie bibliotek kombinatorycznych. Starter P4 wydłużał jedną z nici DNA o łącznik składający się z 18 reszt glikolu etylenowego i dodatkowo o 12 dodatkowych nukleotydów z końca 5'. Skutkowało to zróżnicowaną mobilnością elektroforetyczną obydwu nici DNA i pozwoliło na precyzyjne zidentyfikowanie na żelu poliakryloamidowym krótszej nici o sekwencji nukleotydowej DNAzymu. Po wycięciu z żelu, warianty obydwu bibliotek DNAzymów eluowałam, strącałam w obecności buforu o pH 7,0, a następnie wprowadzałam do właściwego etapu selekcji *in vitro*.

3.4.2. Procedura selekcji *in vitro* i identyfikacja otrzymanych wariantów DNAzymów

Bibliotekę kombinatoryczną z 23-nukleotydowym regionem *random* oraz bibliotekę kombinatoryczną z 40-nukleotydowym regionem *random* wykorzystałam, jako wyjściowe pule DNAzymów, w dwóch niezależnych procesach selekcji *in vitro*. Poglądowy schemat procedury selekcji *in vitro* DNAzymów przedstawia rysunek 42 (krok IV–VIII).



Rysunek 42. Schemat syntezy biblioteki kombinatorycznej (krok I–III) oraz selekcji *in vitro* DNAzymów (krok IV–VIII). *Random* oznacza odcinek sekwencji nukleotydowej, w którym w każdej pozycji występuje każdy z czterech możliwych nukleotydów A, C, T lub G; rA jest to rybonukleotyd adeniny, czyli miejsce katalicznego cięcia; Spacer18 oznacza łącznik złożony z 18 reszt glikolu etylenowego.

Cykl I–IV

Otrzymane dwie biblioteki kombinatoryczne DNAzymów poddałam pierwszej reakcji katalicznego cięcia w obecności jonów Cd^{2+} . Reakcję cięcia prowadziłam w buforze o składzie: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, czas reakcji wynosił 60 minut, a stężenie

jonów Cd^{2+} wynosiło 1 mM. Produkty reakcji rozdzieliłam w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 43). Mierząc radioaktywność biblioteki DNAzymów, wariantów które nie uległy przecięciu oraz produktów po reakcji odzyskanych z żelu poliakrylamidowego obliczyłam, że w przypadku biblioteki kombinatorycznej z 23-nukleotydowym regionem *random* przecięciu ulegało 0,08% ogólnej puli wariantów, natomiast w przypadku biblioteki kombinatorycznej z 40-nukleotydowym regionem *random* było to 0,15% (Rys. 44).

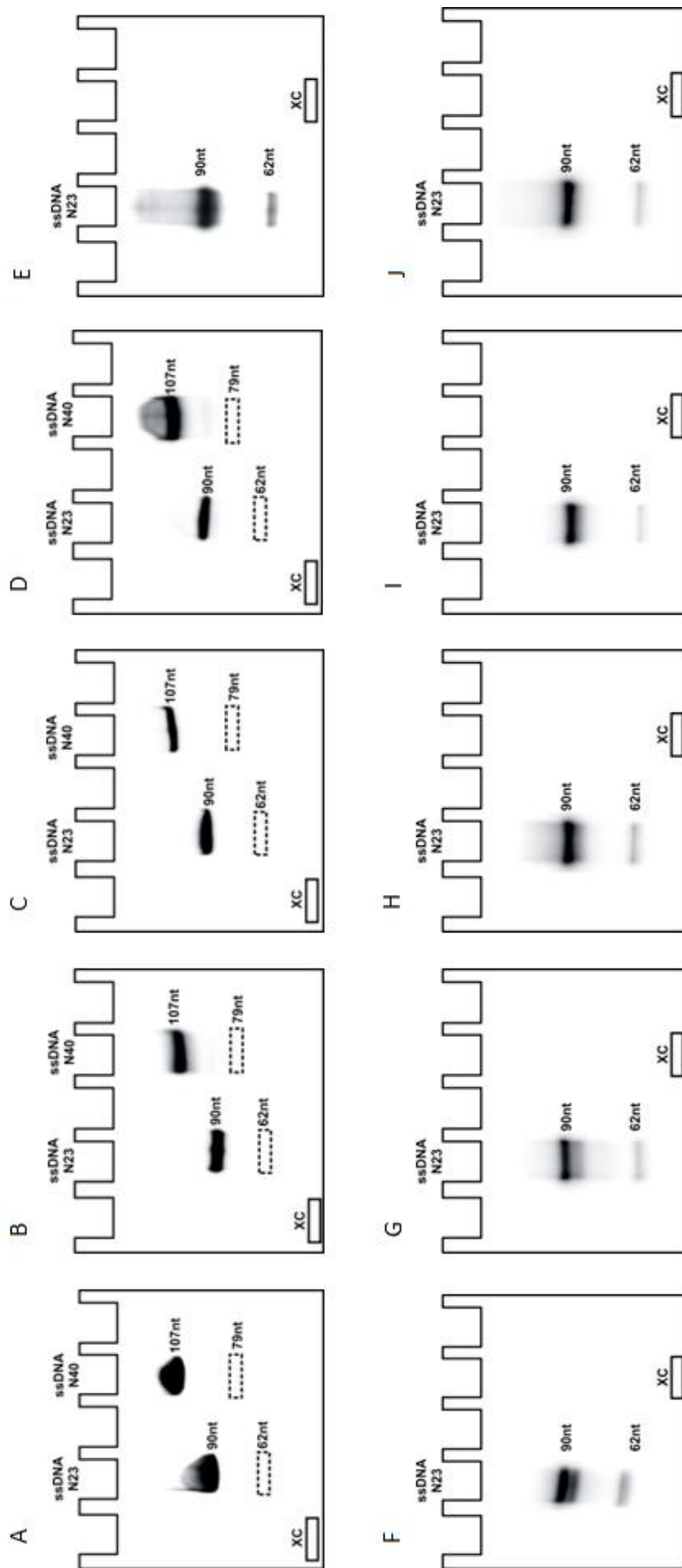
Produkty reakcji cięcia były powielane do pełnej długości DNAzymów w dwóch następujących po sobie reakcjach PCR z użyciem starterów P1 i P2 oraz starterów P3 i P4. Następnie, obydwie pule wariantów poddawałam kolejnym reakcjom cięcia. W cyklu II i cyklu III reakcję cięcia przeprowadzałam w warunkach identycznych jak opisane dla cyklu I tzn. w obecności 1 mM stężenia jonów Cd^{2+} przy godzinnej inkubacji. Przecięciu ulegało 0,12–0,16% puli wariantów z 23-nukleotydowym regionem *random* i 0,2–0,37% puli wariantów z 40-nukleotydowym regionem *random*. Po 5-krotnym obniżeniu stężenia jonów Cd^{2+} do 0,2 mM w cyklu IV efektywność reakcji cięcia puli DNAzymów z krótszym regionem *random* wynosiła 0,21%, zaś w przypadku puli wariantów z dłuższym regionem *random* stopień przecięcia był 2-krotnie większy (Rys. 43 i 44).

Selekcja negatywna po cyklu IV

Aby z obu bibliotek DNAzymów wyeliminować warianty aktywne w obecności jonów metali dwuwartościowych innych niż jony Cd^{2+} przeprowadziłam reakcję cięcia w obecności mieszaniny jonów: 100 μM Mg^{2+} oraz 50 μM Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} , w czasie 60 min. Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym rozdzieliłam frakcje wariantów aktywnych i nieaktywnych katalitycznie, a wyeluowane z żelu warianty nieprzecięte (odpowiednio, o długości 90 i 107 nukleotydów) zostały użyte w kolejnym cyklu selekcji.

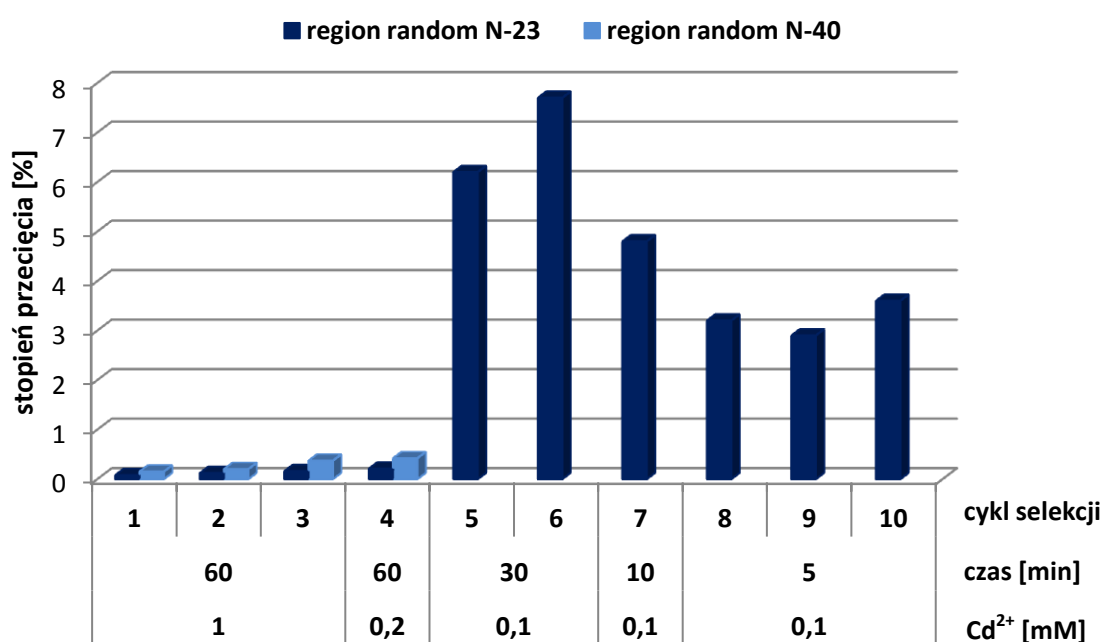
Cykl V–X

Z niewyjaśnionych przyczyn nie zdołałam powielić wariantów biblioteki DNAzymów z 40-nukleotydowym regionem *random* uzyskanych po selekcji negatywnej przeprowadzonej po IV cyklu selekcji. Zatem eksperyment z tą biblioteką postanowiłam czasowo wstrzymać. Bibliotekę tą można otrzymać raz jeszcze, powtarzając procedurę amplifikacji produktów reakcji cięcia otrzymanych po III cyklu selekcji do pełnej długości DNAzymów i ewentualnie użyć w następnych eksperymentach.



Rysunek 43. A)–J) Autoradiogramy przedstawiające rozdzielone produkty w żelu poliakryloamidowym po reakcji cięcia biblioteki DNAzymów z 23-nukleotydowym i 40-nukleotydowym regionem typu *random* w obecności jonów Cd^{2+} , odpowiednio po I–X cyklu selekcji

W następnych etapach skoncentrowałam się na kontynuacji eksperymentu z biblioteką z 23-nukleotydowym regionem *random*. W kolejnych cyklach selekcji reakcję cięcia prowadziłam obniżając stężenie jonów Cd^{2+} z 0,2 mM w cyklu V do 0,1 mM w kolejnych cyklach oraz skracając czas inkubacji do 30 minut w trakcie cyklu V i VI, 10 minut w cyklu VII oraz 5 minut w cyklach VIII–X. Stopień przecięcia wzrósł maksymalnie do ok. 8% w VI cyklu selekcji (Rys. 24 i 25). Po 6-krotnym skrócenia czasu inkubacji do 5 minut stopień przecięcia puli wariantów w obecności 100 μM stężenia jonów Cd^{2+} wyniósł 3–3,5% (Rys. 44).



Rysunek 44. Histogram przedstawiający efektywność reakcji cięcia biblioteki DNAzymów z 23-nukleotydowym regionem typu *random* oraz biblioteki DNAzymów z 40-nukleotydowym regionem typu *random* w obecności jonów Cd^{2+} , po kolejnych cyklach selekcji *in vitro*.

Podsumowując, przebieg eksperymentu selekcji *in vitro* DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} zakończył się wzbogaceniem wyjściowej biblioteki z 23-nukleotydowym regionem *random* w warianty o pożądanych właściwościach, tak że w obecności 0,1 mM jonów Cd^{2+} ulegało przecięciu 3-8% cząsteczek w czasie 5–30 minut, w cyklach selekcji VI–X.

Po przeprowadzonych 10 cyklach selekcji *in vitro* pule wariantów uzyskane w cyklu VII i X poddałam klonowaniu, a następnie wybrane klony zostały zsekwencjonowane. Do klonowania wykorzystałam wektor pCR2.1-TOPO oraz bakterie *E.coli*. Natomiast

sekwencjonowanie zostało wykonane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Otrzymane DNAzomy pogrupowałam w pięć rodzin na podstawie podobieństw w ich sekwencji nukleotydowej (Rys. 45). W rodzinie pierwszej, złożonej z 28 klonów, 24 klonów ma identyczną sekwencję w regionie odpowiadającym regionowi typu *random* w bibliotece wyjściowej, przy czym 25 klonów posiada także mutację A75/G75 w tej samej pozycji regionu stałego. W drugiej rodzinie, tą samą sekwencję regionu *random* ma wszystkie 9 klonów. Rodzina trzecia składa się z 6 klonów, z czego 2 posiadają pojedynczą substytucję w regionie odpowiadającym regionowi typu *random*, natomiast rodzina czwarta i piąta składają się, odpowiednio z 4 i 2, klonów o identycznej sekwencji w regionie odpowiadającym regionowi typu *random*. Co ciekawe, jeden wariant z grupy trzeciej, trzy warianty z grupy czwartej oraz dwa warianty z grupy piątej posiadały charakterystyczną dla większości wariantów z grupy pierwszej transwersję A75/G75 w tej samej pozycji regionu stałego. Natomiast wszystkie warianty z grupy drugiej posiadają delecję w pozycji A75 oraz delecję w pozycji T47 (Rys. 45).

WT	15	30	48	75	90		
WT	CTGCAGAAATCTTAATACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NTGACGGTAAAGCTTGGCAC		
grupa I	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	1/VII 28% 35%	
	GTGCAGAATTC	ACTACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	2/VII 10% 25%
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	3/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	4/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	5/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	6/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	11/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	12/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	16/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	17/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	18/VII	
	CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	19/VII	
	CTGCAGA	TTTTAAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	22/VII 24% 26%
CTG	AGAAATCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTC	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	23/VII	
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	26/VII		
	ATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	27/VII	
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	28/VII		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	1/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	4/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTC	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	6/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	7/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	9/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	11/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	14/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	16/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	20/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	25/X		
CTGCAGAATTCTAATAACGACTC	ACTATr	AGGAAGAGATGGCGACATCTCA	TCTAACAGCGTTACGAAATAGC	TGTGGCGGTAAGCTTGGCAC	28/X		

3.5. Właściwości katalityczne DNAzymów Cd²⁺-zależnych

Po określeniu sekwencji nukleotydowych otrzymanych na drodze selekcji *in vitro* DNAzymów, postanowiłam zbadać aktywność katalityczną wybranych wariantów w identycznych warunkach eksperymentalnych. Celem była wstępna ocena, jakie znaczenie dla reakcji katalitycznego cięcia mają określone motywy sekwencji obecne w obrębie regionu *random*, a także zbadanie roli jonów metali w katalizie. Doświadczenia rozpoczęłam od przeprowadzenia znakowania wybranych wariantów DNAzymów z grup 1–5 w reakcji PCR z użyciem radioaktywnego [α -³²P]dCTP oraz starterów P3 i P4. Jednoniciowe DNAzyny otrzymałam poprzez rozdzielenie nici DNA za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Po wycięciu z żelu DNAzyny eluowano w pH 7,0, a następnie strącano z roztworu etanolem. Aktywność katalityczną kilku DNAzymów, reprezentujących każdą z 5 grup, określałam w obecności 100 μ M stężenia jonów Cd²⁺ oraz w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych: 100 μ M Mg²⁺ oraz 50 μ M każdego z jonów: Sr²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ i Zn²⁺. Reakcję prowadziłam przez 30 minut w temperaturze 25°C. Okazało się, że w obecności jonów Cd²⁺ badane warianty: 1/VII, 3/VII, 19/VII, 22/VII i 6/X z grupy 1, 2/X i 5/X z grupy 3 oraz 15/X z grupy 4 wykazywały wysoką aktywność katalityczną. Stopień ich przecięcia był na poziomie od 10% do 54%. DNAzyny były aktywne także w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych, niezawierającej jonów Cd²⁺. Stopień przecięcia większości wariantów w obecności mieszaniny jonów dwuwartościowych wynosił od 25% do 80%. Ponadto zaobserwowałam, że podczas 30-minutowej inkubacji w obecności jonów Cd²⁺ lub mieszaniny jonów metali dwuwartościowych, warianty z grupy 1 wykazują zbliżony stopień przecięcia ok. 30%, podczas gdy warianty z grupy 3 (np. Dz5/X) czy z grupy 4 (np. Dz15/X) około 2-krotnie silniej ulegają przecięciu w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych niż w obecności jonów Cd²⁺, co sugeruje, iż działają one mniej wybiórczo (Rys. 45). Co ciekawe, dwa warianty 7/VII oraz 13/X, reprezentujące odpowiednio grupę 2 oraz grupę 5, nie wykazywały aktywności katalitycznej. Nie jest jasne, czy DNAzyny te wykazywały bardzo niski, marginalny stopień przecięcia, czy też są one nieaktywne, ale przetrwały proces selekcji (Rys. 45).

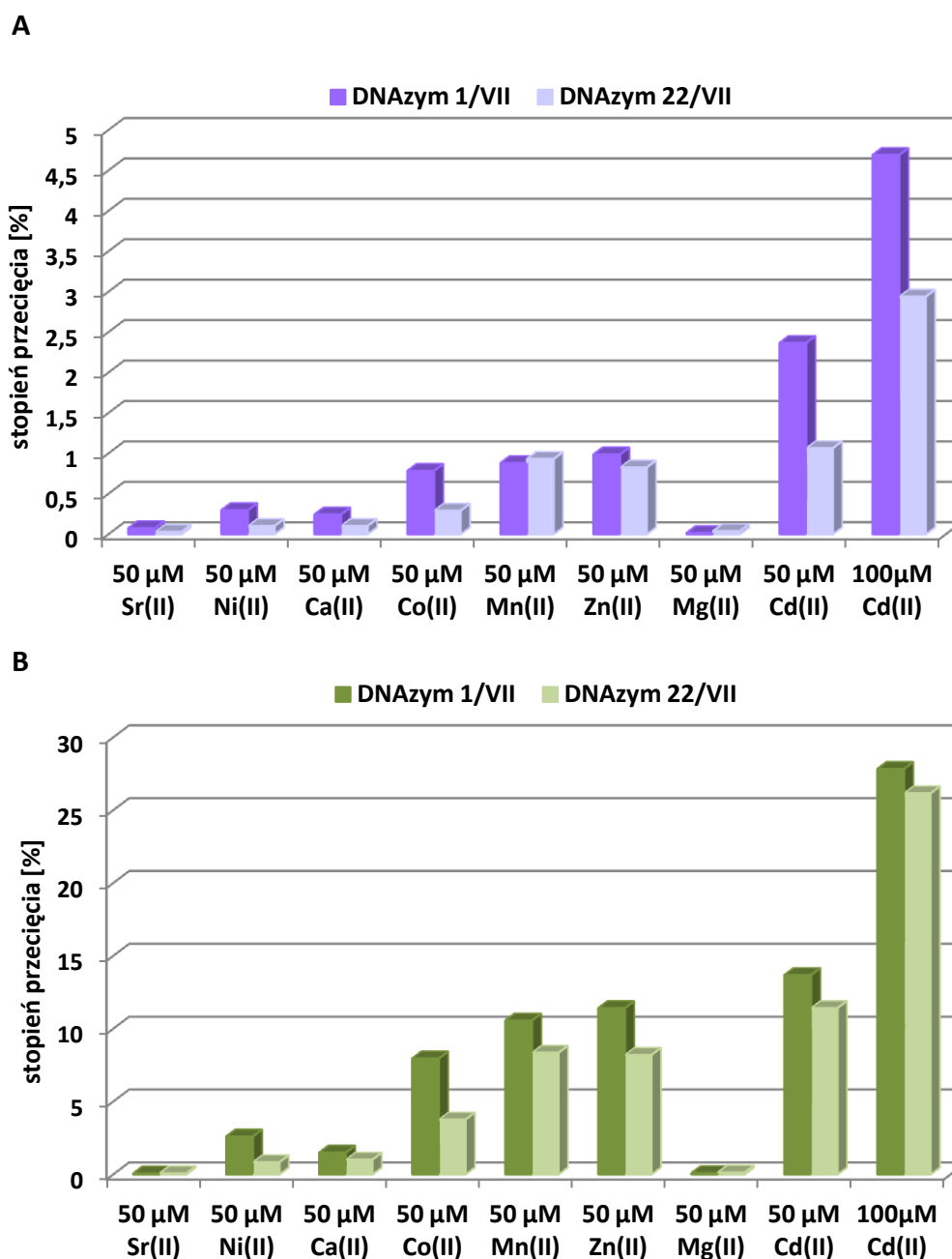
Z uwagi na fakt, iż celem przeprowadzonego eksperymentu selekcji *in vitro* było otrzymanie wariantów aktywnych w obecności jonów Cd²⁺ postanowiłam szczegółowo określić właściwości katalityczne DNAzymów z grupy 1, jako tych, które w porównaniu do

wariantów z innych rodzin (grupa 3 oraz 4) wykazują istotnie niższą specyficzność wobec mieszaniny innych jonów metali dwuwartościowych (Rys. 45).

Porównałam aktywność katalityczną dwóch wariantów z grupy 1 – DNAzemu 1/VII oraz DNAzemu 22/VII w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych: Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+} . Stopień przecięcia był mierzony po 5 minutach i 30 minutach prowadzenia reakcji (Rys. 46). Porównanie stopnia przecięcia w dwóch punktach czasowych pozwoliło ocenić, czy obserwowane różnice są wynikiem zróżnicowanych szybkości reakcji cięcia obu DNAzymów, czy też są wynikają ze zróżnicowanego poziomu końcowego stopienia przecięcia DNAzymów w danych warunkach prowadzenia reakcji. Dla przykładu, stopień przecięcia wariantów Dz1/VII oraz Dz22/VII w czasie 30-minutowej inkubacji w obecności $50 \mu\text{M}$ stężenia jonów Zn^{2+} oraz jonów Cd^{2+} wyniósł ok. 13% (Rys. 46B), podczas gdy przy 5-minutowej inkubacji DNAzym 1/VII wykazywał 2-krotnie wyższy stopień przecięcia w obecności jonów Cd^{2+} niż w obecności jonów Zn^{2+} , natomiast DNAzym 22/VII ulegał przecięciu na poziomie 1%, zarówno w obecności jonów Cd^{2+} jak i jonów Zn^{2+} (Rys. 46A). Powyższe obserwacje sugerują, że DNAzym 1/VII wykazuje wyższą aktywność katalityczną w obecności jonów Cd^{2+} niż DNAzym 22/VII. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdziłam także, że wariant 1/VII podczas 5-minutowej inkubacji w buforze o pH 7,0, wykazywał 1,5 razy wyższy stopień przecięcia w obecności $100 \mu\text{M}$ stężenia jonów Cd^{2+} i o ok. 60% wyższy stopień przecięcia w obecności $50 \mu\text{M}$ stężenia jonów Cd^{2+} , niż wariant 22/VII. Wariant 1/VII wykazywał 2,5% stopień przecięcia w obecności $50 \mu\text{M}$ stężenia jonów Cd^{2+} i niespełna 0,9% stopień przecięcia w obecności takich jonów metali, jak: Co^{2+} , Mn^{2+} czy Zn^{2+} o stężeniu $50 \mu\text{M}$ przy 5-minutowej inkubacji. Natomiast stopień przecięcia wariantu 22/VII w tych samych warunkach w obecności jonów Cd^{2+} , jak i jonów Zn^{2+} , Co^{2+} czy Mn^{2+} wyniósł ok. 1% (Rys. 46A). Przy 30-minutowej inkubacji stopień przecięcia obu wariantów był zbliżony - w przypadku jonów Cd^{2+} o stężeniu $50 \mu\text{M}$ był około 12–13%, zaś przy $100 \mu\text{M}$ stężeniu Cd^{2+} na poziomie 27% (Rys. 46B). Co istotne, w obecności $50 \mu\text{M}$ stężenia jonów Sr^{2+} oraz Mg^{2+} obydwa warianty z grupy 1 praktycznie nie wykazały aktywności katalitycznej, gdyż stopień ich przecięcia po 30 minutach inkubacji był na poziomie 0,05-0,1% (Rys. 46B).

Na histogramie zamieszczonym na rysunku 47 przedstawione zostały wyznaczone stałe szybkości reakcji cięcia (k_{obs}) DNAzemu 1/VII w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych. Wyznaczenie tych wartości pozwoliło na szczegółowe określenie

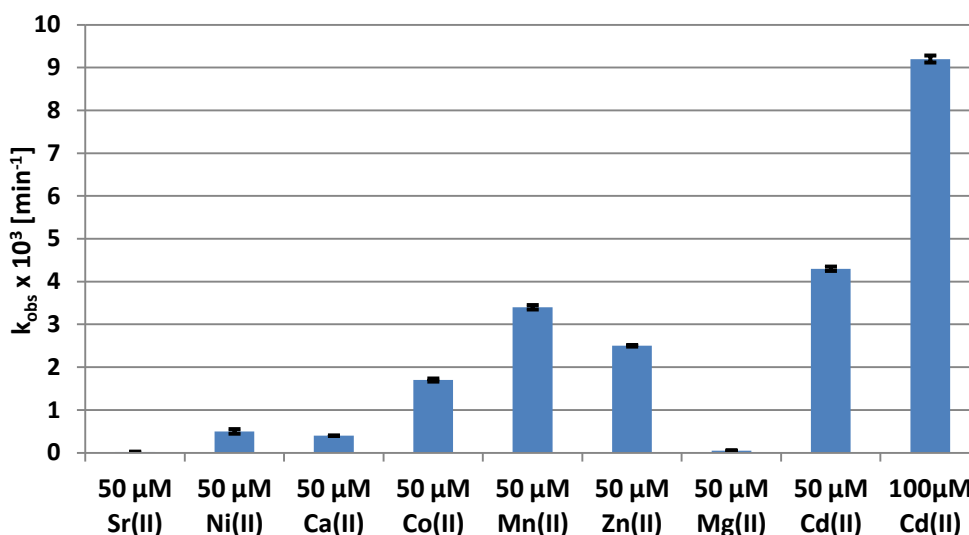
właściwości katalitycznych wariantu 1/VII i wskazanie, które jony metali indukują aktywność katalityczną badanego wariantu.



Rysunek 46. Aktywność katalityczna DNAzymów 1/VII i 22/VII z rodziny 1 w obecności jonów: Cd^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} o stężeniu 100 μM lub 50 μM . Reakcje prowadzono w 50 mM buforze: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl w temperaturze 25°C przez: **A)** 5 minut **B)** 30 minut.

Reakcja katalitycznego przecinania się DNAzymu 1/VII przebiegała najszybciej w obecności 100 μM jonów Cd^{2+} , a wyznaczona stała k_{obs} wyniosła 0,009 min^{-1} . Obniżenie stężenia jonów Cd^{2+} do 50 μM powodowało ponad 50% spadek stałej k_{obs} do ok. 0,004 min^{-1}

(Rys. 47). W obecności 50 μM jonów Mn^{2+} , Zn^{2+} oraz Co^{2+} stałe k_{obs} dla Dz1/VII były, odpowiednio o 15%, 40% i 60%, niższe niż w obecności 50 μM jonów Cd^{2+} . Pozostałe testowane jony metali Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} oraz Mg^{2+} nie miały istotnego wpływu na reakcję autokatalitycznego cięcia DNAzemu 1/VII (Rys. 47).



Rysunek 47. Wpływ wybranych jonów metali dwuwartościowych na szybkość reakcji katalitycznego przecinania się DNAzemu Dz1/VII. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl w temperaturze 25°C, próby pobierano w 10'', 20'', 30'', 40'', 1', 2', 3', 5', 10', 20' oraz 30' trwania reakcji.

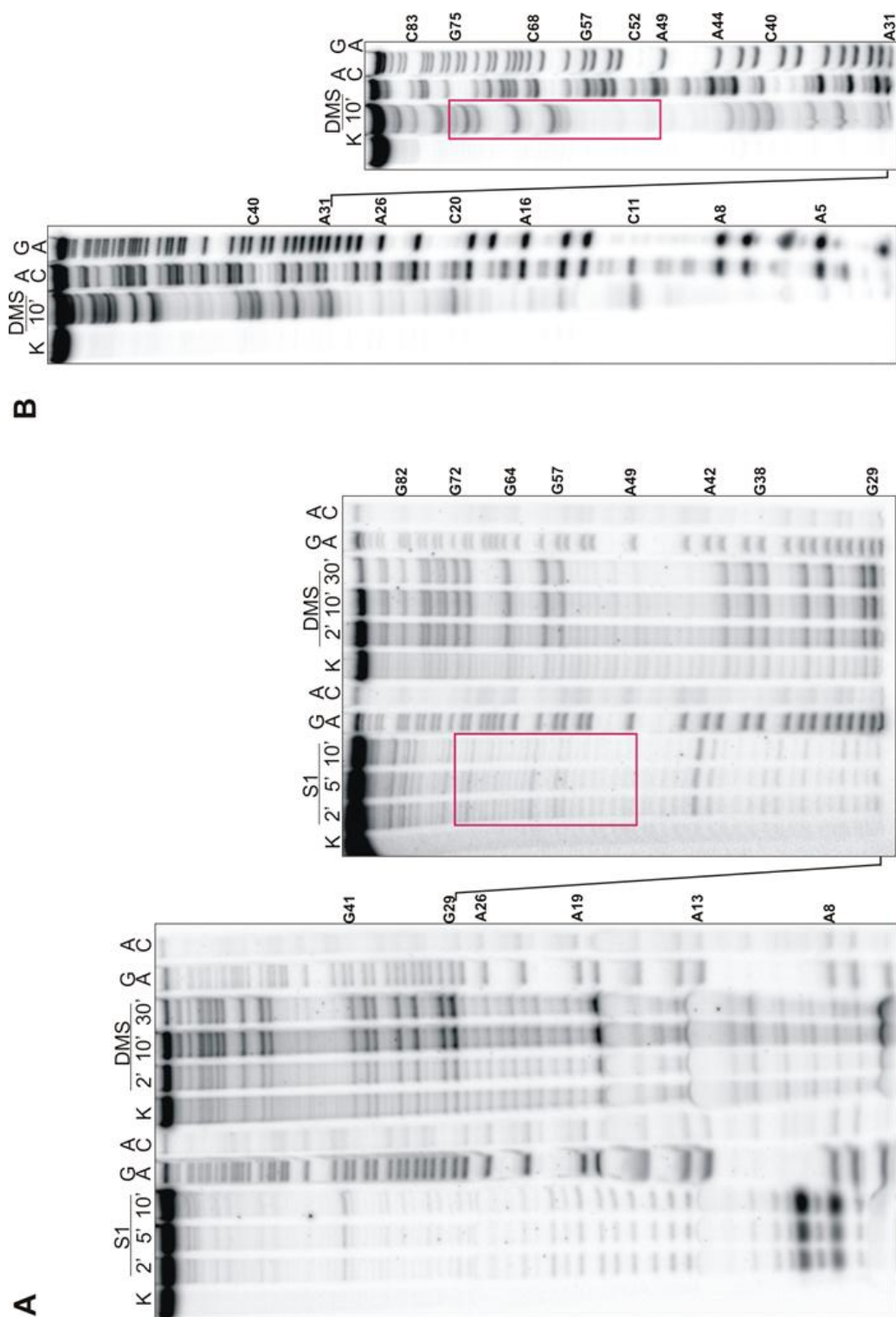
3.6. Przewidywanie struktury drugorzędowej DNAzemu 1/VII

Strukturę drugorzędową DNAzemu 1/VII, ulegającego reakcji katalitycznego cięcia w pH 7,0 wyłącznie w obecności jonów niektórych metali dwuwartościowych, określiłam podobnie jak strukturę drugorzędową DNAzymów pH-zależnych (rozd. 3.2.2) tj. w oparciu o analizę *in silico* przeprowadzoną za pomocą programu *RNAstructure 5.6* [146]. W analizie uwzględniłam wyniki otrzymane z enzymatycznego oraz chemicznego mapowania struktury drugorzędowej DNA. Do badań tych skonstruowałam nieprzecinający się wariant DNAzemu 1/VII, który zamiast rybonukleotydu adeniny w miejscu katalitycznego cięcia, posiadał deoksyrybonukleotyd adeniny (synteza wariantów rozdz. 6.4.4). Mapowanie struktury drugorzędowej DNAzemu 1/VII przeprowadziłam z wykorzystaniem metody modyfikacji chemicznej reszt guaniny w pozycji N7 przy użyciu siarczanu dimetylu (DMS) oraz reszt cytozyny w pozycji N3 przy użyciu DMS w obecności hydrazyny. Modyfikacja chemiczna DMS wykazała, że wszystkie reszty guaninowe były dostępne dla tego reagenta, co sugeruje, że nie biorą one udziału w tworzeniu niekanonicznych par zasad i oddziaływaniach

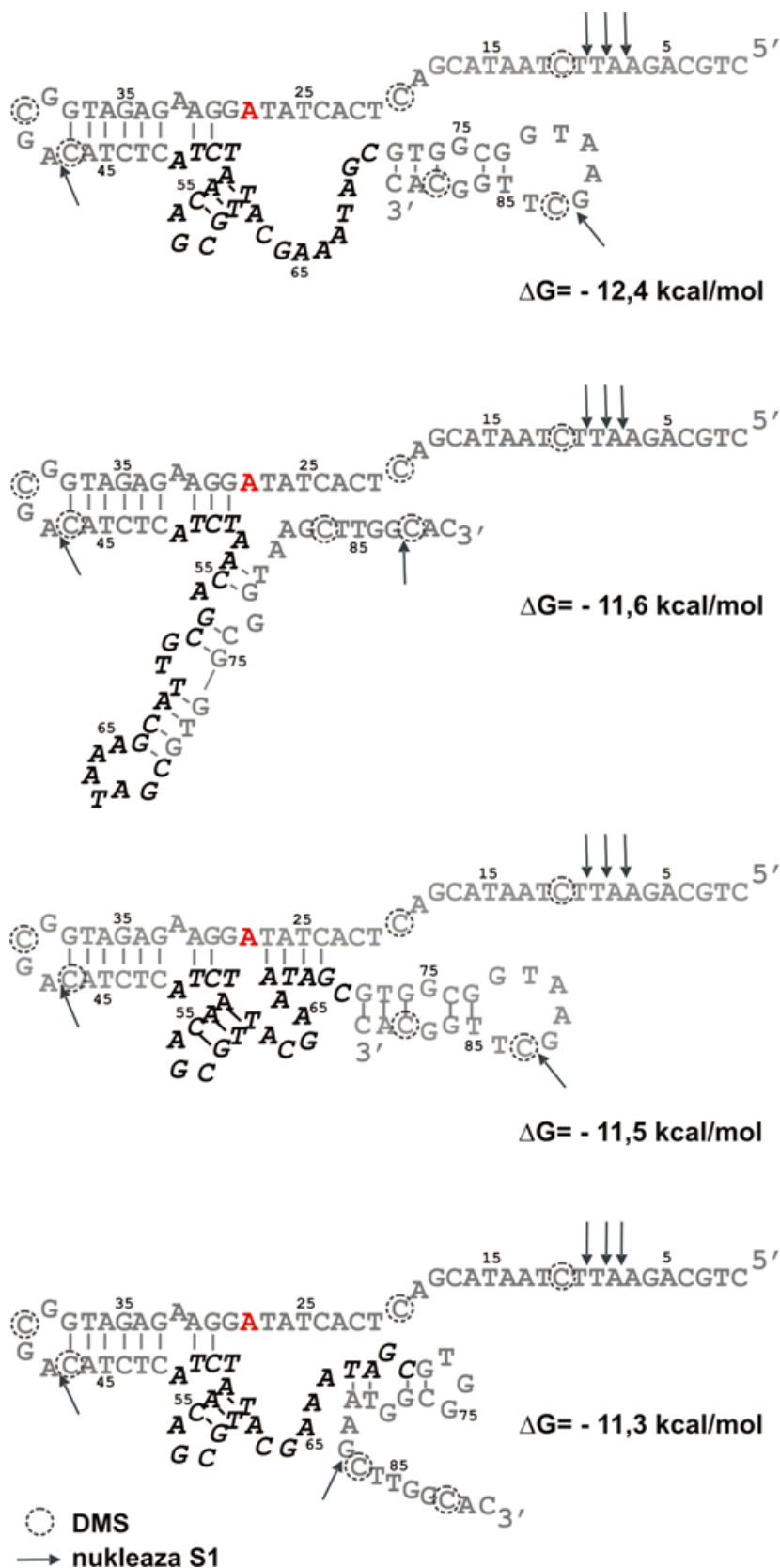
trzeciorzędowych (Rys. 48A). Natomiast nie zaobserwowałam modyfikacji reszt cytozyny w pozycji N3 w obrębie regionu katalitycznego A49–C71, co wskazuje na tworzenie się w tym regionie par typu Watsona-Cricka. Cytozyny ulegające metylacji zaobserwowałam głównie w regionach przyłączania się starterów oraz w pozycji C40 i C43 w pętli apikalnej (Rys. 48B).

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat struktury drugorzędowej otrzymanych DNAzymów do badań włączyłam metodę enzymatycznego mapowania struktury drugorzędowej DNA przy użyciu nukleazy S1. Znakowany izotopem ^{32}P z końca 5' DNAzym 1/VII poddawałam reakcji trawienia enzymatycznego nukleazą S1 w temperaturze 25°C w czasie 2, 5 i 10 minut. Po rozdziale elektroforetycznym produktów trawienia zaobserwowałam silne cięcia w obrębie końca 5' (T9, A8 i A7) oraz przy A42 i G82 DNAzemu 1/VII, co wskazuje na jednoniciowy charakter tego regionu (Rys. 48A).

Analiza komputerowa prawdopodobnej struktury DNAzemu 1/VII, którą przeprowadziłam przy wykorzystaniu programu *RNAstructure 5.6* [146] z uwzględnieniem danych eksperymentalnych z mapowania chemicznego i enzymatycznego pozwoliła na uzyskanie czterech modeli struktury drugorzędowej o zbliżonej energii swobodnej w zakresie od -11,3 do -12,6 kcal/mol (Rys. 49). Trzy spośród wygenerowanych struktur posiadają charakterystyczną spinkę w obrębie regionu katalitycznego, zbliżoną do spinki obecnej w regionie katalitycznym DNAzemu 8-17 [6], czy też DNAzemu 17E aktywnego w obecności jonów Zn^{2+} [57]. Dwie z tych struktur mają dodatkowo wspólny motyw strukturalny na końcu 3' w postaci charakterystycznej spinki zakończonej 7-nukleotydom pętlą. Spinka na końcu 3' jest charakterystycznym motywem pojawiającym się w pracach Liu i wsp. [58], dotyczących DNAzemu aktywnego w obecności jonów UO_2^{2+} . We wszystkich zaproponowanych strukturach pojawia się także spinka w regionie G30–C51 z czteronukleotydom pętlą apikalną typu GNRC (N – dowolny nukleotyd, R – puryna) (Rys. 49).

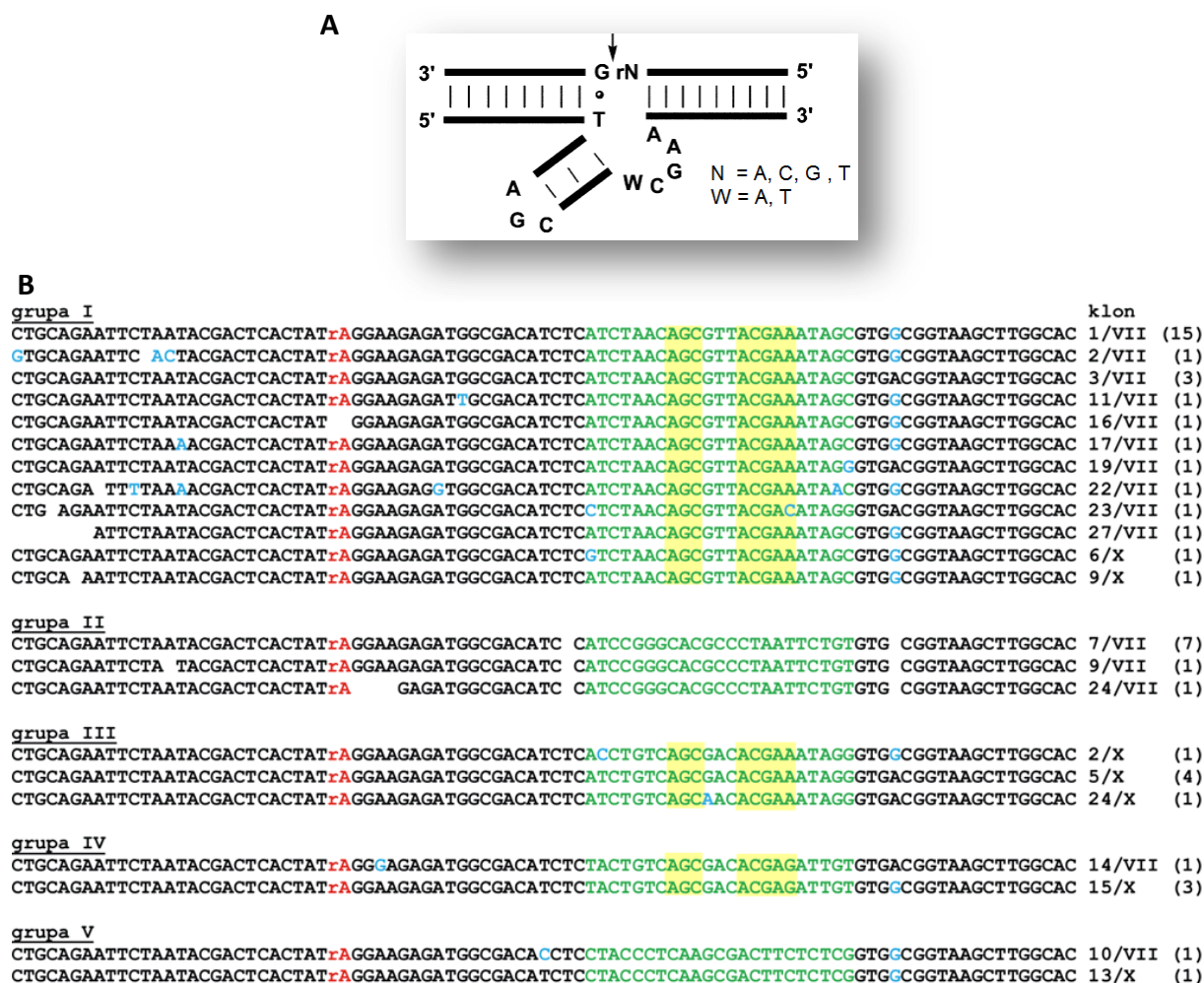


Rysunek 48. Analiza struktury drugorzędowej DNAzymy Dz1/VII za pomocą **A)** trawień enzymatycznych nukleazą S1 oraz modyfikacji chemicznej w pozycji N7-G oraz **B)** w pozycji N3-C z wykorzystaniem siarczanu dimetylu. K – linia kontrolna, S1 – ograniczone trawienie nukleazą S1, DMS – chemiczna modyfikacja DMS, G+A i A+C – linie sekwencyjne. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano niektóre pozycje reszt cytozyny, guaniny i adeniny. Czerwoną ramką zaznaczono region katalityczny DNAzymy 1/VII.



Rysunek 49. Proponowane struktury drugorzędowe DNAzemu 1/VII wygenerowane przy pomocy programu *RNAstructure 5.6* z zaznaczonymi miejscami trawień nukleazą S1 oraz modyfikacji chemicznej reszt cytozyny przy użyciu siarczanu dimetylu. Na czarno zaznaczono region typu *random* w bibliotece kombinatorycznej użytej w selekcji *in vitro*. Czerwoną czcionką oznaczono miejsce katalicznego cięcia.

Po zestawieniu sekwencji klonów otrzymanych w wyniku przeprowadzonego procesu selekcji *in vitro* zaobserwowałam, że nie tylko DNAzym 1/VII z grupy 1, ale także warianty z grupy 3 i 4 posiadają motywy strukturalne w obrębie regionu katalitycznego charakterystyczne dla opisanego w literaturze DNAzemu 8-17. Motywy te to nieduża spinka z krótkim trzonem złożonym z trzech par zasad oraz trójnukleotydomową pętlą apikalną (AGC-loop) oraz 5-nukleotydomowy fragment jednoniciowy o sekwencji WCGAA (gdzie W: A lub T). Dodatkowo, wszystkie warianty posiadają w obrębie wspomnianego 5-nukleotydomowego fragmentu jednoniciowego dwa konserwatywne nukleotydy cytozynowy i guaninowy (Rys. 50). Można zatem stwierdzić, że wyselekcjonowane przeze mnie DNAzemy należą do grupy wariantów typu 8-17.



Rysunek 50. DNAzym 8-17 oraz sekwencje nukleotydomowe DNAzymów Cd^{2+} -zależnych **A**) Struktura drugorzędowa DNAzemu 8-17 [85] **B**) Grupy DNAzymów Cd^{2+} -zależnych otrzymanych na drodze selekcji *in vitro*; region katalityczny oznaczono na zielono, mutacje punktowe oznaczono zaś niebieskimi literami, miejsce cięcia katalitycznego cięcia oznaczono na czerwono. Żółtymi prostokątami oznaczono pozycje tworzące w regionie katalitycznym pętlę apikalną AGC oraz 5-nukleotydomowy region jednoniciowy WCGAA. W nawiasach podano liczbę klonów posiadających daną sekwencję nukleotydomową.

3.7. Charakterystyka wariantów DNAzymów metalozależnych działających w układzie jednocząsteczkowym (*in cis*) skróconych z końca 5' i 3'

Biorąc pod uwagę fakt, że wyselekcjonowane przeze mnie DNAzymy najprawdopodobniej należą do grupy wariantów typu 8-17, postanowiłam odpowiedzieć na pytanie, jak dalece możemy „upraszczać” cząsteczki wybranych DNAzymów, zachowując ich właściwości katalityczne.

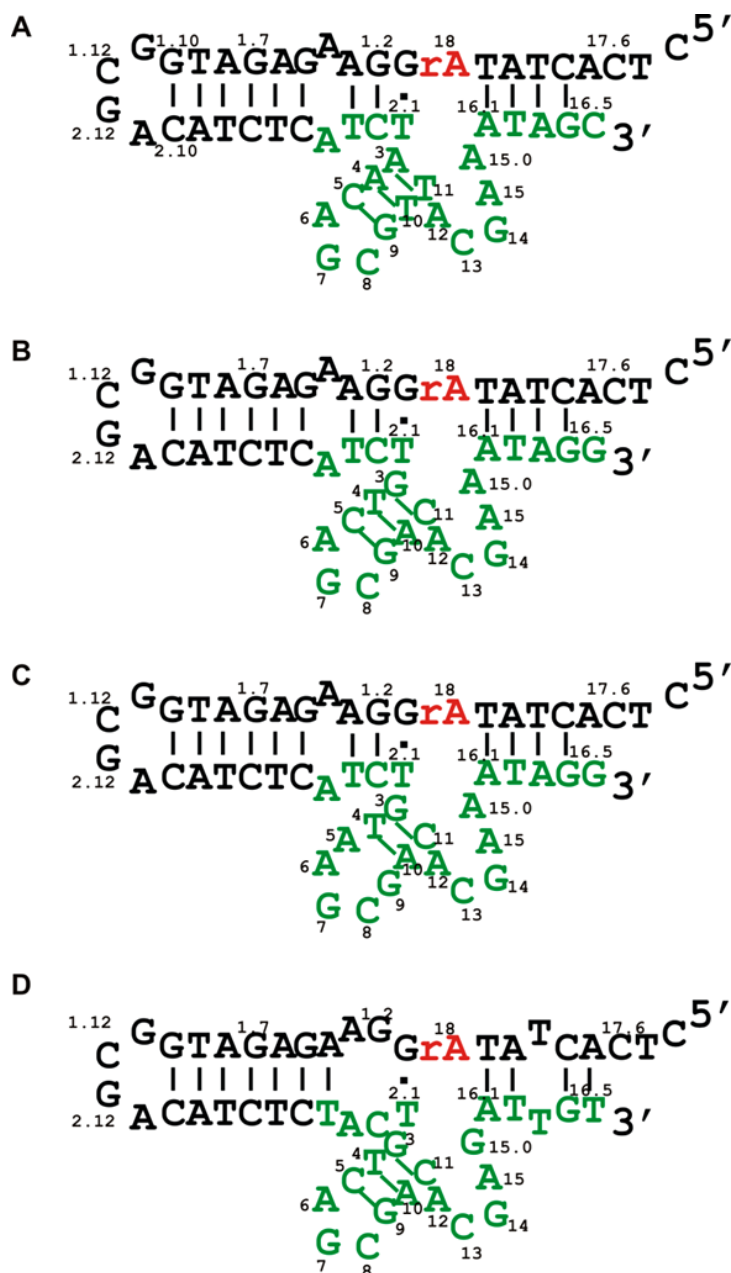
Skonstruowane zostały warianty DNAzymów 1/VII, 5/X, 15/X oraz 24/X skrócone z końca 5' i 3' poprzez usunięcie 19-nukleotydowych fragmentów. Warianty te uzyskałam na drodze syntezy chemicznej. Na rysunku 51 przedstawione zostały struktury drugorzędowe wariantów DNAzymów 1/VII, 5/X, 15/X oraz 24/X skróconych z końca 5' i 3' otrzymane *in silico*. Energia swobodna wygenerowanych przez program *RNAstructure 5.6* [146] struktur drugorzędowych wyniosła ok. -10 kcal/mol.

3.7.1. Preferencje DNAzymów wobec wybranych jonów metali dwuwartościowych

Porównałam aktywność katalityczną DNAzymów – Dz1/VIIWS, Dz5/XWS, Dz15/XWS i Dz24/XWS (Rys. 51), które charakteryzują się zróżnicowanym składem nukleotydowym w obrębie trzonu spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą typu AGC, zaangażowanej w tworzenie regionu katalitycznego. Aktywność DNAzymów wyznaczona została w obecności jonów metali dwuwartościowych: Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} w pH 7,0.

Wariant Dz24/XWS z grupy 3, posiadający spinkę zakończoną pięcionukleotydową pętlą, nie przejawiał aktywności katalitycznej w obecności testowanych jonów metali. Natomiast warianty z trójnukleotydową pętlą i trzonem zbudowanym z trzech par zasad – Dz1/VIIWS z grupy 1, Dz5/XWS z grupy 3 i Dz15/XWS z grupy 4, wykazywały zróżnicowany poziom aktywności (Rys. 52). DNAzym 1/VIIWS, najwyższy, około 9,5% stopień przecięcia wykazywał w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 100 μM podczas 30-minutowej inkubacji. W obecności jonów Mn^{2+} i Cd^{2+} o stężeniu 50 μM wariant ten wykazywał odpowiednio 8- i 5-krotnie niższy stopień przecięcia, natomiast w obecności jonów Zn^{2+} wyniósł on ok. 1% (Rys. 52A). Okazało się także, że stopień przecięcia Dz1/VIIWS po 5 minutach inkubacji w 50 μM roztworze Cd^{2+} był 8-krotnie niższy, a w 100 μM roztworze Cd^{2+} o 36% niższy, w porównaniu do stopnia przecięcia pełnej długości DNAzymu 1/VII (Rys. 46 i 53). Usunięcie 19 nukleotydów z końca 5' oraz 3' DNAzymu 1/VII skutkowało obniżeniem aktywności katalitycznej, natomiast nie powodowało

całkowitego jej zaniku. Możemy zatem przypuszczać, iż 19-nukleotydowe fragmenty terminalne 5' i 3' nie odgrywają kluczowej roli w katalizie.

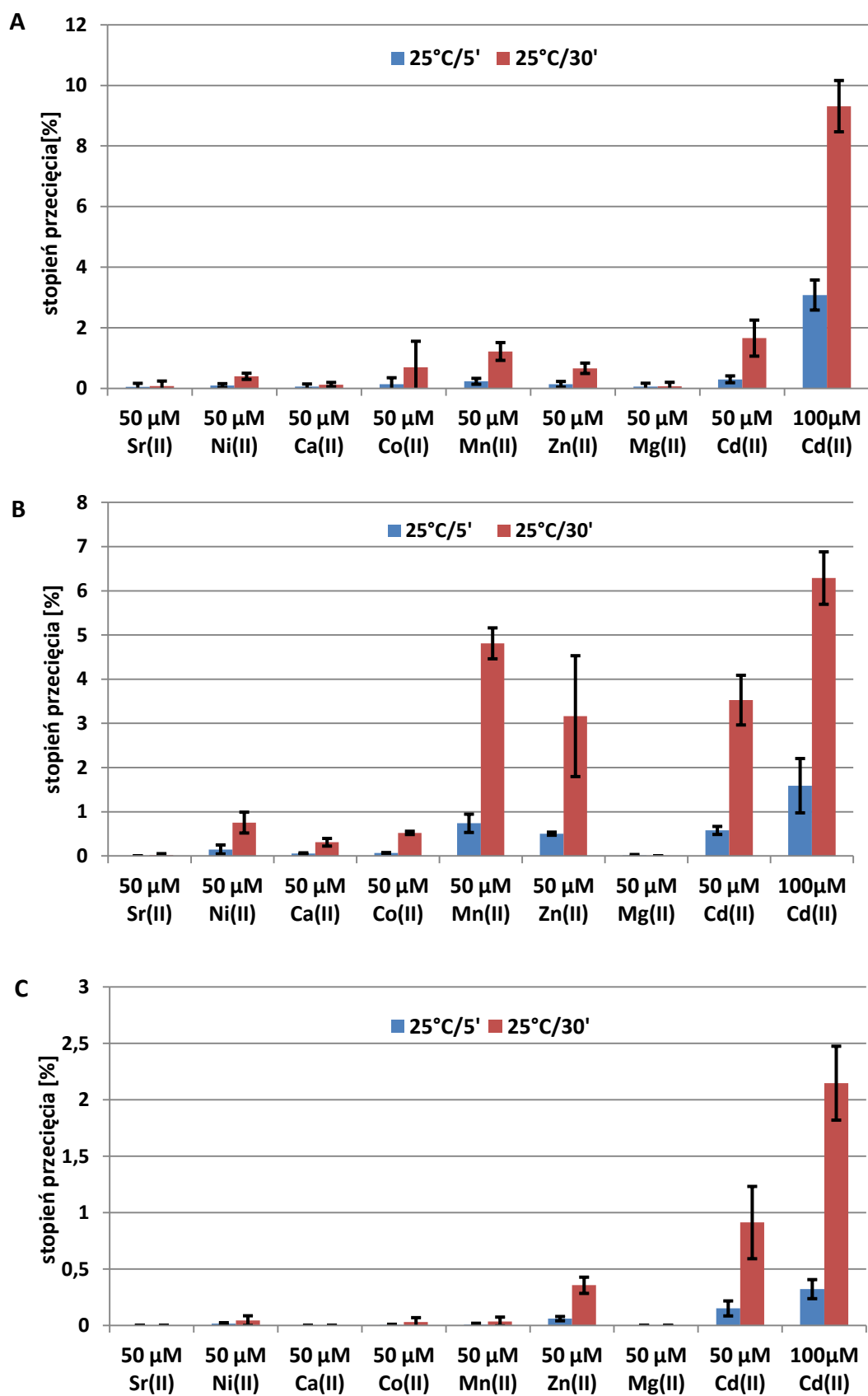


Rysunek 51. Proponowane struktury drugorzędowe skróconych z końców 5' i 3' DNAzymów metalozależnych: **A)** Dz1/VIIWS **B)** Dz5/XWS **C)** Dz24/XWS **D)** Dz15/XWS wygenerowane przy pomocy programu *RNAstructure* 5.6. Na zielono zaznaczono region typu *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej użytej w selekcji *in vitro*. Czerwoną czcionką oznaczono miejsce katalicznego cięcia.

DNAzym 5/XWS wydaje się działać mniej specyficznie niż DNAzym1/VIIWS, gdyż wykazywał zbliżony stopień przecięcia ok. 3–5% w obecności kilku jonów metali takich jak: Zn²⁺, Mn²⁺ i Cd²⁺ podczas 30 minutowej inkubacji (Rys. 52B). Wariant 15/XWS wykazywał

najwyższą aktywność katalityczną w obecności jonów Zn^{2+} i Cd^{2+} . Przy obniżeniu stężenia jonów Cd^{2+} do $50 \mu M$ stopień przecięcia spadł do ok. 1% przy 30-minutowej inkubacji. W obecności $50 \mu M$ stężenia jonów Zn^{2+} aktywność katalityczna Dz15/XWS była o 60% niższa od jego aktywności w obecności jonów Cd^{2+} podczas 30-minutowej inkubacji. W porównaniu do wariantów z grupy 1 (Dz1/VIWS) i z grupy 3 (Dz5/XWS), wariant Dz15/XWS reprezentujący grupę 4 wykazywał istotnie niższy poziom aktywności katalitycznej w obecności użytych jonów metali dwuwartościowych (Rys. 52C).

Wariant Dz15/XWS posiada podobny skład nukleotydowy w obrębie regionu katalitycznego do opisywanego wariantu Dz5/XWS z rodziny 3. Obydwa DNAzyny różnią się m. in. nukleotydem w pozycji 15.0, ponieważ Dz5/XWS posiada w tej pozycji resztę A zaś Dz15/XWS posiada resztę G (Rys. 51). Jest wielce prawdopodobne, że różnica ta jest odpowiedzialna za zróżnicowany poziom aktywności katalitycznej oraz preferencji wobec jonów metali wariantów obu DNAzymów. Peracchi i wsp. [99] wykazali, iż zmiana nukleotydu A15.0 na G15.0 wywołuje 5-krotny spadek aktywności katalitycznej DNAzymu 8-17 w obecności jonów Mn^{2+} , podczas gdy po wprowadzeniu w tą pozycję łańcucha reszt C lub T nie obserwowano tak dużego spadku aktywności. Warto podkreślić, że badane przeze mnie warianty DNAzymów wykazywały znikomy stopień przecięcia w obecności jonów Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} oraz Ca^{2+} (Rys. 52).



Rysunek 52. Aktywność katalityczna DNAzymów: A) Dz1/VIIWS B) Dz5/XWS i C) Dz15/XWS w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl przez 5 minut i 30 minut w temperaturze 25°C.

3.7.2. Stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia wybranych wariantów DNAzymów w obecności jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+}

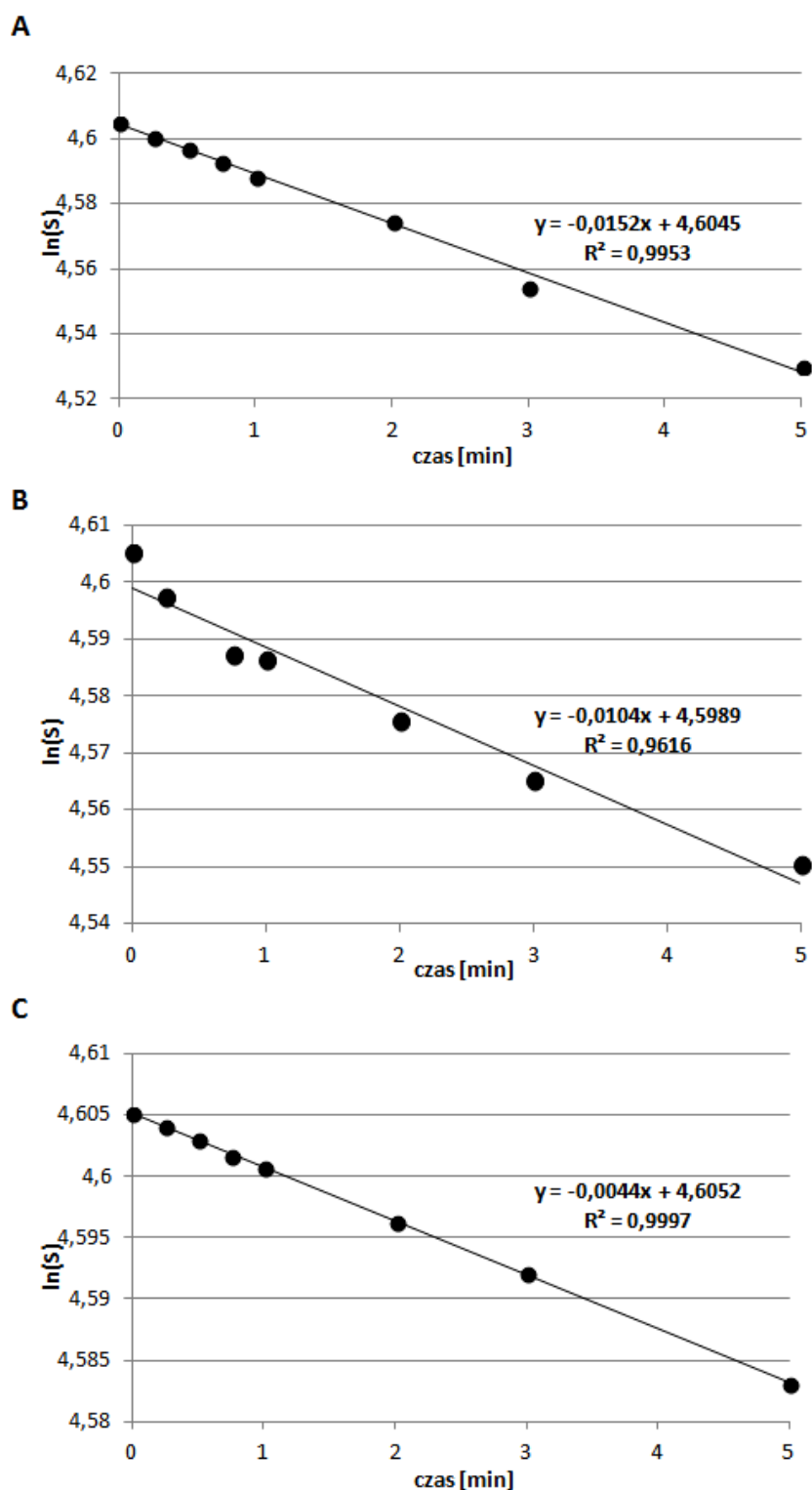
Opisane w poprzednim rozdziale badania, w których określony został stopień przecięcia skróconych z końca 5' i 3' wariantów reprezentujących każdą z otrzymanych grup DNAzymów miały charakter półilościowy. Otrzymane wyniki wykazały, iż badane warianty posiadają zróżnicowane preferencje wobec jonów metali dwuwartościowych niezbędnych dla reakcji katalitycznego cięcia. Postanowiłam zatem szczegółowo określić stałe szybkości reakcji katalitycznego cięcia wybranych DNAzymów z rodziny 1 (Dz1/VIIWS), 3 (Dz5/XWS) i 4 (Dz15/XWS) w obecności tych jonów metali dwuwartościowych, dla których zaobserwowano najwyższy stopień przecięcia tj. w obecności Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} .

Do zbadania aktywności katalitycznej DNAzymów zaznakowałam cząsteczki izotopem ^{32}P na końcu 5' z użyciem radioaktywnego $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ i kinazy polinukleotydowej. Po oczyszczeniu za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, DNAzomy eluowano z żelu w pH 7,0, strącano etanolem i po rozpuszczeniu użyto w reakcji katalizy. Reakcje prowadzono w obecności jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} o stężeniu 50 μM . Reakcje prowadzono w dwóch temperaturach 25°C oraz 37°C. Buforem reakcyjnym był 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl.

Badane DNAzomy, podobnie jak opisane we wcześniejszych rozdziałach DNAzomy pH-zależne, są wariantami wolnotnącym, gdyż przyrost ilości produktu przebiegał stosunkowo wolno, a reakcja cięcia nawet po godzinie nie osiągała stanu *plateau*. W tej sytuacji, dla wyznaczenia stałych szybkości reakcji (k_{obs}), sporządzono wykresy zależności $y = f(x)$, gdzie $y = \ln(S)$ oraz $x = t$. Wykorzystano równanie prostej:

$$\ln(S) = a \cdot t + b$$

gdzie: $a = k_{\text{obs}} \cdot S$ – ubytek substratu w czasie t oraz b – miejsce przecięcia z osią OY. Do wyznaczenia prostej wybierano przedział argumentów t , zaczynając od $t = 0$, odpowiadający prostoliniowemu odcinkowi wykresu wykładniczego (Rys. 53).



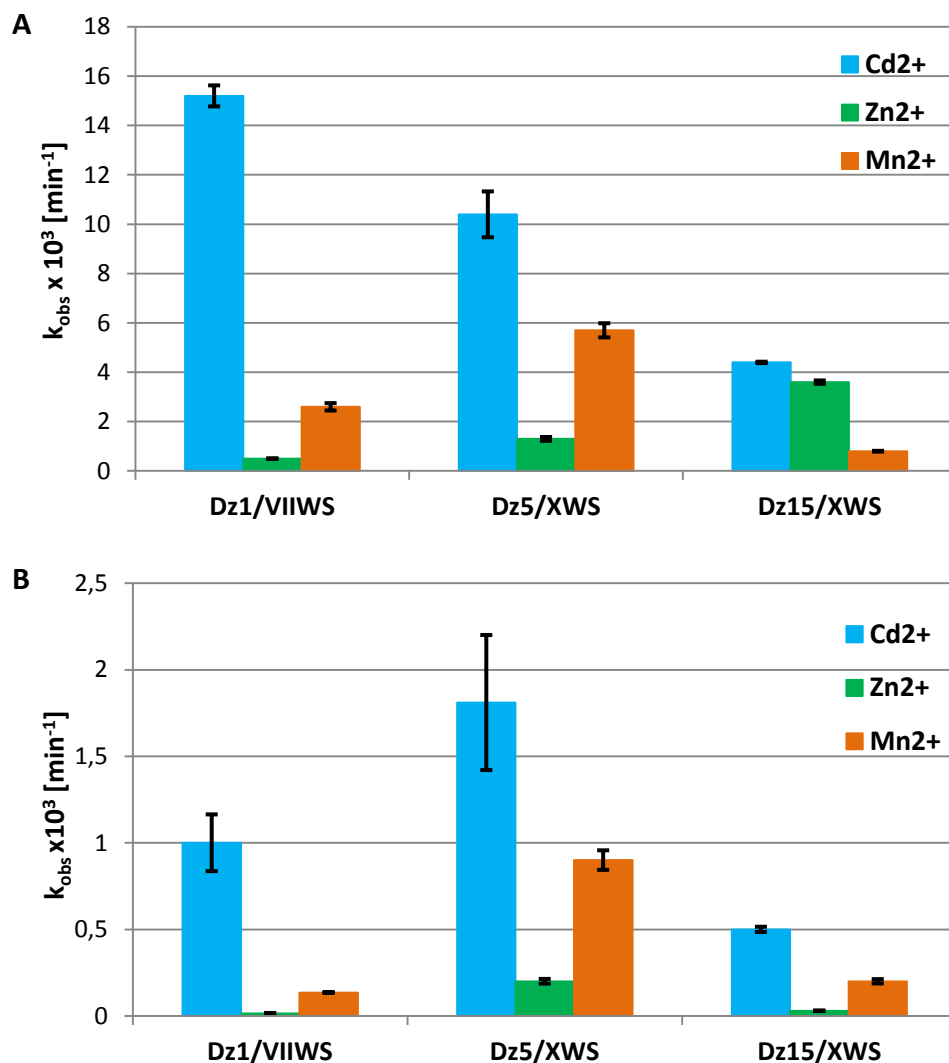
Rysunek 53. Wykresy zależności logarytmu naturalnego ubytku substratu od czasu dla reakcji cięcia DNAzymów: A) Dz1/VIIWS B) Dz5/XWS i C) Dz15/XWS, prowadzonej w obecności $50 \mu\text{M}$ stężenia jonów Cd^{2+} w temperaturze 25°C .

Reakcja katalitycznego przecinania się wariantu Dz1/VIIWS prowadzona w temperaturze 25°C najszybciej przebiegała w obecności 50 μM jonów Cd^{2+} , stała szybkości reakcji (k_{obs}) wyniosła ok. 0,015 min^{-1} . W obecności 50 μM jonów Mn^{2+} oraz Zn^{2+} stała k_{obs} była odpowiednio 8-krotnie i 15-krotnie niższa niż w obecności 50 μM jonów Cd^{2+} (Rys. 54A). Co ciekawe, w temperaturze 37°C w obecności jonów Zn^{2+} oraz jonów Mn^{2+} DNAzym 1/VIIWS praktycznie nie wykazywał aktywności katalitycznej, natomiast w obecności jonów Cd^{2+} stała k_{obs} wyniosła 0,001 min^{-1} (Rys. 54B). Wariant Dz5/XWS, podobnie jak Dz1/VIIWS, najszybciej ulegał przecięciu w obecności jonów Cd^{2+} w temperaturze 25°C, ponadto wykazywał wysoką aktywność katalityczną w obecności jonów Mn^{2+} , a stała k_{obs} wyniosła ok. 0,006 min^{-1} (Rys. 54A). Reakcja katalitycznego przecinania się wariantu Dz15/XWS prowadzona w temperaturze 25°C przebiegała ze zbliżoną szybkością w obecności jonów Cd^{2+} jak i w obecności jonów Zn^{2+} , wyznaczone stałe k_{obs} wyniosły odpowiednio 0,0044 min^{-1} i 0,0036 min^{-1} (Rys. 54A).

Warto zauważyć, że badane DNAzymany metalozależne w temperaturze 37°C katalizowały reakcję cięcia w obecności jonów Zn^{2+} , Mn^{2+} czy Cd^{2+} istotnie wolniej (od 5 do 15-razy) w porównaniu do reakcji w temperaturze 25°C (Rys. 54B). Podczas gdy dane literaturowe donoszą, że DNAzym 8-17 wykazywał 2-krotnie wyższą aktywność w temperaturze 37°C w obecności Mg^{2+} , Mn^{2+} czy Ca^{2+} niż w temperaturze 25°C [96]. Najwyższy spadek aktywności katalitycznej zaobserwowałam dla DNAzymu 1/VIIWS – w obecności jonów Cd^{2+} w temperaturze 37°C wariant ten działał 15 razy wolniej niż w temperaturze 25°C. Co więcej, podczas prowadzenia reakcji w temperaturze 37°C poza spadkiem aktywności katalitycznej wariantów Dz1/VIIWS, Dz5/XWS, Dz15/XWS, doszło także do zmiany preferencji DNAzymu 15/XWS wobec jonów metali – wariant ten wykazywał wyższą aktywność w obecności jonów Mn^{2+} niż w obecności jonów Zn^{2+} (Rys. 54B). Nieoczekiwany efekt spadku aktywności katalitycznej badanych przeze mnie DNAzymów w temperaturze 37°C w porównaniu do temperatury 25°C może być związany ze zmianami jakie zaszły w ich strukturze drugorzędowej, a w konsekwencji zwinięciem DNAzymów w formy nieaktywne.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń określona została aktywność katalityczna wariantów DNAzymów: Dz1/VII, Dz5/X, Dz15/X skróconych z końca 5' i 3'. Okazało się, że otrzymane warianty są DNAzymami metalozależnymi, nie wykazującymi wysokiej specyficzności wobec jonów metali dwuwartościowych niezbędnych do reakcji katalizy. Chociaż badane warianty są najbardziej aktywne w obecności jonów Cd^{2+} , to działają także w obecności jonów Zn^{2+} i Mn^{2+} . Sugeruje to, że tworzenie aktywnego katalitycznie kompleksu

jon metalu–DNAzym nie wymaga wysoce specyficznego sposobu koordynacji jonu. Wniosek ten jest zbieżny z wcześniejszą sugestią, że różne warianty DNAzymów wykazują zróżnicowane powinowactwo wobec jonów metali bądź jony metali wiążą się z DNAzymami w sposób bardziej lub mniej specyficzny, co wpływa na efektywność reakcji cięcia.



Rysunek 54. Wpływ jonów metali Cd^{2+} , Zn^{2+} oraz Mn^{2+} o stężeniu $50 \mu\text{M}$ na szybkość reakcji cięcia DNAzymów: Dz1/VIIWS, Dz5/XWS i Dz15/XWS. Reakcję prowadzono w obecności buforu: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl w czasie 60 minut w temperaturze: **A)** 25°C **B)** 37°C .

3.7.3. Badania spektroskopowe DNAzymu 1/VIIWS

W celu określenia powinowactwa i specyficzności wiązania wybranych jonów metali dwuwartościowych przez DNAzym 1/VIIWS przeprowadziłam badania spektroskopowe z wykorzystaniem spektroskopii UV-vis oraz dichroizmu kołowego. Doświadczenia wykonałam dla nieprzecinającego się wariantu DNAzymu, gdzie rybonukleotyd adeniny

zastąpiono deoksyrybonukleotydem (Dz1/VIIWS-dA). DNAzym o stężeniu 10 μM , inkubowano w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 0–2000 μM , jonów Zn^{2+} o stężeniu 0–2000 μM oraz jonów Mg^{2+} o stężeniu 0–10 mM.

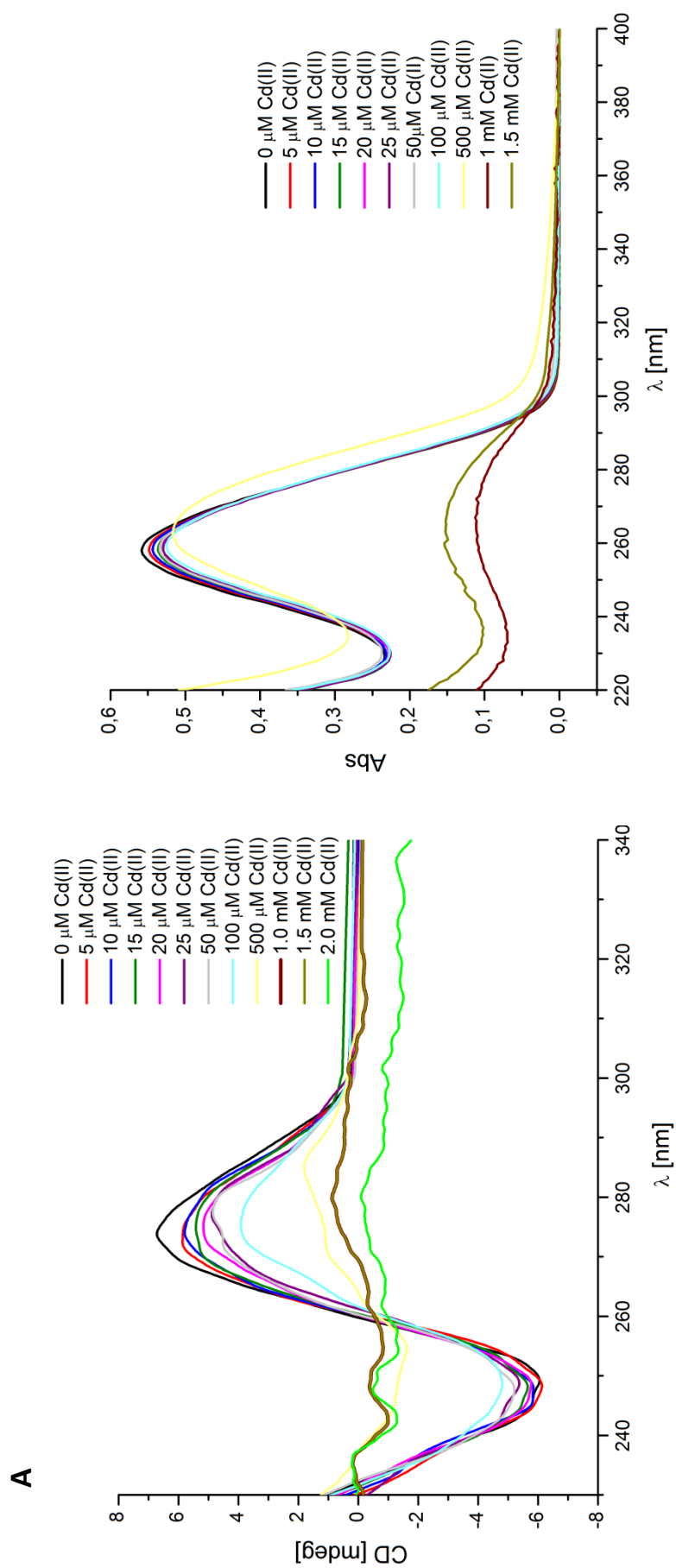
Widma UV-vis przedstawione na rysunku 55 pokazują spadek absorbancji wraz ze wzrostem stężenia jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} – obserwacja ta sugeruje stabilizację struktur dwuniciowych DNAzymu przez zwiększoną ilość jonów. Przy zastosowaniu stężenia jonów Cd^{2+} 1000–1500 μM ma miejsce dalszy, znaczący spadek absorbancji spowodowany agregacją DNA i wytrącaniem z roztworu. Podobnego efektu nie obserwowano natomiast przy zastosowaniu wysokich stężeń jonów Zn^{2+} 1–2 mM bądź jonów Mg^{2+} 1–10 mM.

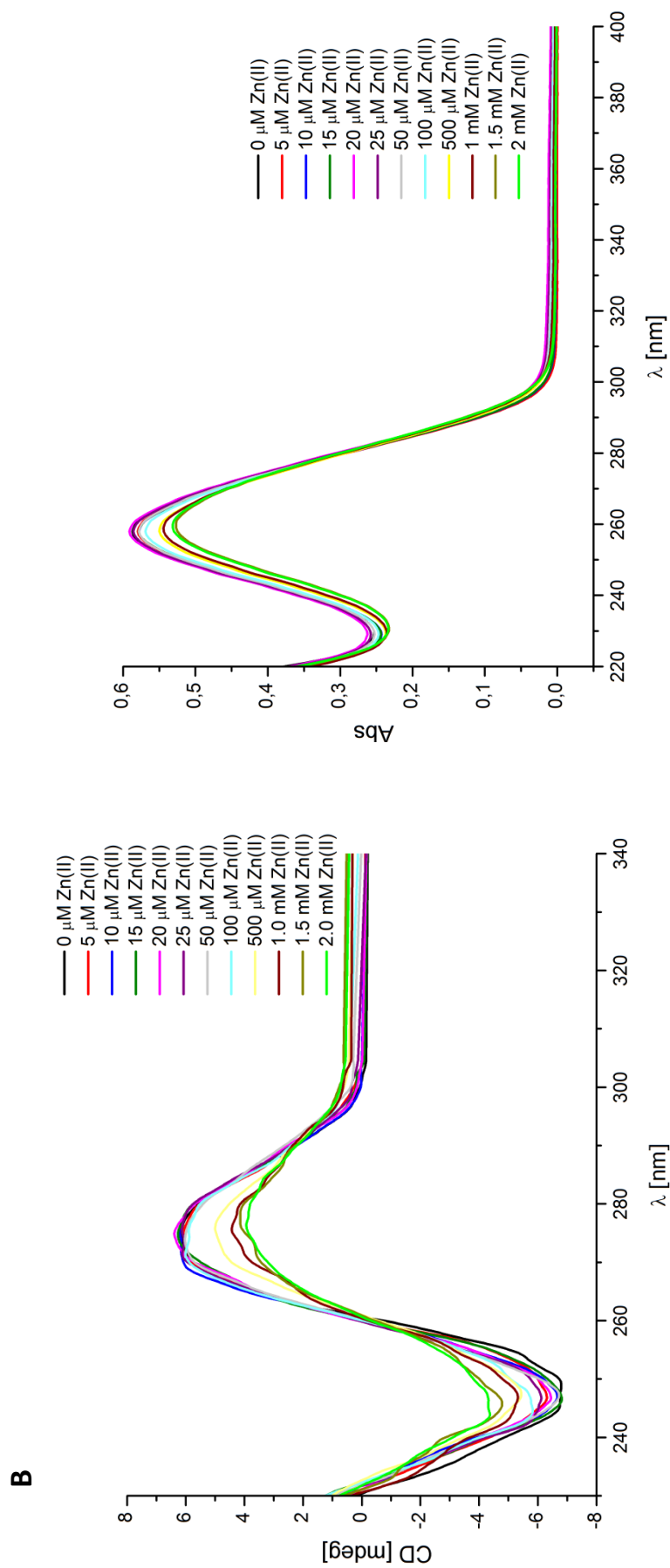
Widma CD wskazują na obecność formy B-DNA, o czym świadczy pozytywny efekt Cottona przy ~ 277 nm oraz negatywny sygnał przy ~ 250 nm (Rys. 55). Wraz ze wzrostem stężenia jonów Cd^{2+} dochodzi do znaczącego spadku intensywności sygnału przy 277 nm, co może być związane z próbą przejścia formy B-DNA do Z-DNA, formy uważanej za istotną dla aktywności katalitycznej DNAzymów [156]. Niestety, nie zaobserwowałam negatywnego sygnału przy 294 nm świadczącego o tym, że DNAzym 1VIIWS-dA w obecności jonów Cd^{2+} przekształca się w formę Z-DNA (Rys. 55A). Widma CD wygenerowane dla Dz1/VIIWS w obecności jonów Zn^{2+} czy Mg^{2+} wskazały na nieznaczne zmiany struktury czasteczki wywołane dodaniem jonów do roztworu (Rys. 55A–C)

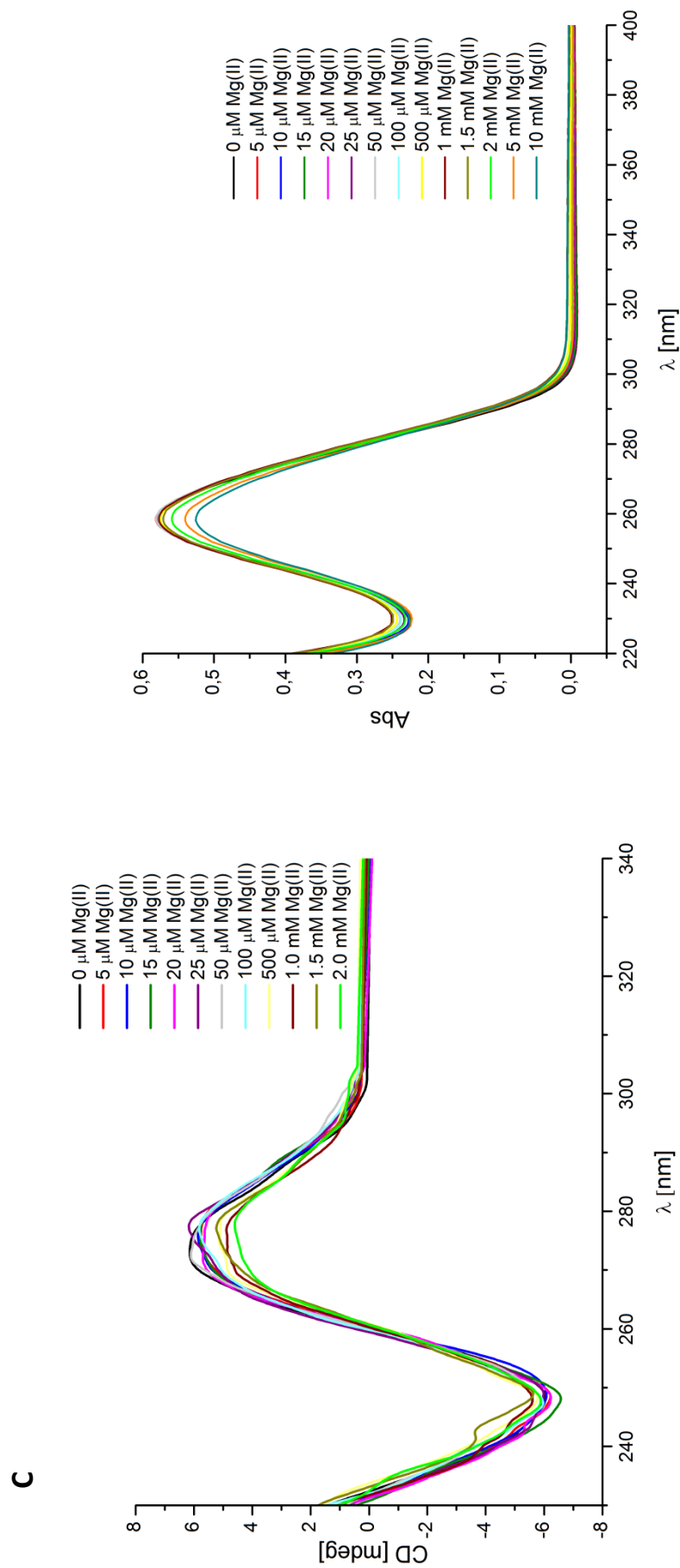
Na podstawie danych pozyskanych przy wykorzystaniu dichroizmu kołowego wyznaczono stałe dysocjacji (K_d) DNAzymu 1/VIIWS-dA i jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+} . Dane eksperymentalne podstawiano do równania hiperboli:

$$\text{CD}_{277} = \frac{c(\text{Me}^{2+})}{K_d + (\text{Me}^{2+})}$$

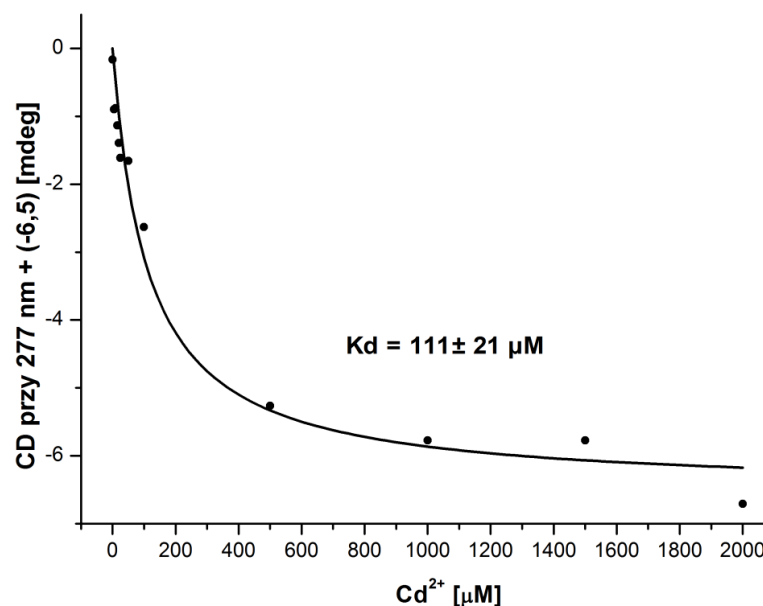
gdzie K_d jest stałą dysocjacji, CD_{277} oznacza intensywność absorpcji przy długości fali 277 nm dla jonów Cd^{2+} , dla jonów Zn^{2+} i Mg^{2+} odczytywana maksymalna wartość absorpcji była przy 275 nm, (Me^{2+}) oznacza stężenie jonu metalu dwuwartościowego. Wartości te były obliczane z wykorzystaniem oprogramowania OriginPro 8.5 lub PeakFit (Rys. 56). Stałe dysocjacji K_d dla DNAzymu 1/VIIWS-dA i jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+} wyniosły, odpowiednio 111 μM , 400 μM i 330 μM . Niemniej jednak, podczas wykreślenia zależności zmian absorpcji jako funkcji stężenia jonów Zn^{2+} i Mg^{2+} oraz wyznaczania parametrów hiperboli, pojawiły się problemy z dokładnym dopasowaniem krzywych do danych eksperymentalnych. W związku z tym stałe K_d dla Dz1/VIIWS-dA oraz jonów Zn^{2+} i Mg^{2+} należy traktować jako wartości wymagające potwierdzenia innymi metodami.







Rysunek 55. Zmiany widmach CD (prawy panel) i UV-vis (lewy panel) DNAzemu I/VIIWS-dA [10 μM] w obecności wzrastającego stężenia jonów: A) Cd^{2+} B) Zn^{2+} C) Mg^{2+} . Pomiar wykonano w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej l = mm.



Rysunek 56. Relatywna zmiana sygnału CD DNAzymu 1/VIIWS-dA przy długości fali 277 nm jako funkcja stężenia jonów Cd²⁺ i wyznaczenie wartości K_d. Pomiary wykonano w buforze: 50 mM HEPES 7,0 i 100 mM NaCl w temperaturze 25°C; długość drogi optycznej l = 1mm.

3.7.4. Ukierunkowana mutageneza, a zmieniona aktywność katalityczna wybranych

DNAzymów

Po scharakteryzowaniu właściwości biochemicznych wybranych wariantów DNAzymów Cd²⁺-zależnych (skróconych z końca 5' i 3') postanowiłam sprawdzić, jak zmiany pojedynczych nukleotydów w obrębie sekwencji ważnej dla ich tworzenia struktury oraz prawdopodobnie uczestniczących w mechanizmie reakcji cięcia wpłyną na aktywność katalityczną DNAzymów.

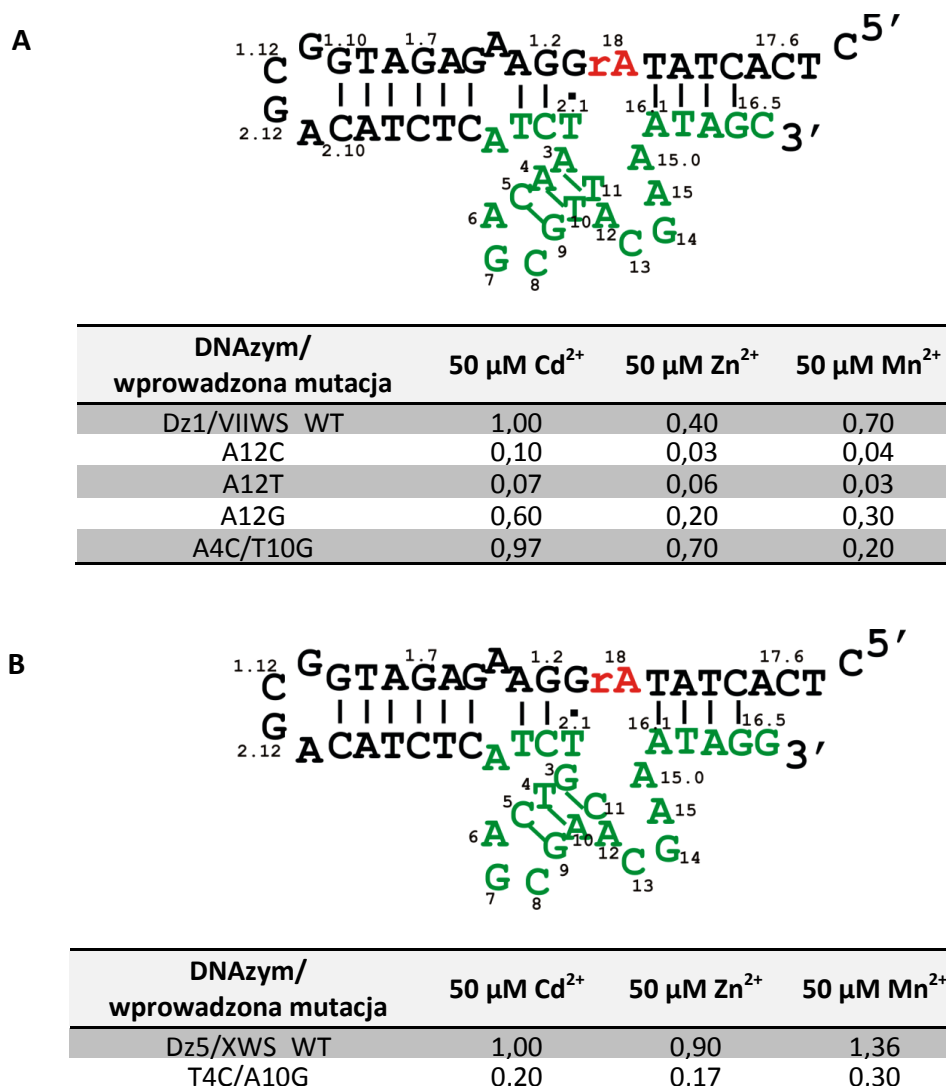
Jak wspominałam wcześniej (rozdz. 3.6), po zestawieniu sekwencji klonów otrzymanych w procesie selekcji *in vitro* zaobserwowałam, że otrzymane DNAzyny posiadają charakterystyczne dla opisanego w literaturze DNAzymu 8-17 motywy strukturalne w obrębie regionu katalitycznego. Jest to motyw niedużej spinki z krótkim trzonem złożonym z trzech par zasad oraz trójnukleotydową pętlą apikalną AGC oraz 5-nukleotydowy fragment jednoniciowy o sekwencji WCGAA (gdzie W: A lub T). Dodatkowo, wszystkie warianty posiadają w obrębie wspomnianej pętli konserwatywne nukleotydy A6 i G7 oraz w obrębie 5-nukleotydowego fragmentu jednoniciowego konserwatywne nukleotydy C13 i G14. Można zatem sądzić, że wyselekcjonowane przeze mnie DNAzyny należą do grupy DNAzymów typu 8-17.

W związku z powyższymi obserwacjami postanowiłam skupić swoją uwagę na nukleotydzie w pozycji 12 oraz na trzonie niedużej spinki złożonym z trzech par zasad (Rys.

57). W pierwszej kolejności, z wykorzystaniem metody ukierunkowanej mutagenety, przygotowane zostały trzy warianty DNAzemu 1/VIIWS, posiadające mutację w pozycji 12 łańcucha polinukleotydowego. Wang i wsp. [100] sugerują, że nukleotyd w tej pozycji może pełnić dwie funkcje istotne dla zachowania aktywności katalitycznej DNAzemu – może działać jako swego rodzaju „stabilizator”, który zapewnia odpowiednie usytuowanie sąsiedniego, konserwatywnego nukleotydu C13 oraz może pełnić funkcję elementu „chaperonowego”, istotnego dla odpowiedniego zwinięcia DNAzemu w formę aktywną katalitycznie.

Aktywność katalityczną wariantów DNAzemu 1/VIIWS z mutacją w pozycji 12 łańcucha polinukleotydowego wyznaczałam w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych w pH 7,0. Okazało się, że podstawienie w pozycji 12 reszty adeniny guaniną skutkowało 1,7-krotnym spadkiem aktywności w obecności 50 μM jonów Cd^{2+} oraz ok. 50% spadkiem aktywności w obecności 50 μM jonów Zn^{2+} i jonów Mn^{2+} po 30-minutowej inkubacji w 25°C. Wprowadzenie w pozycję 12 łańcucha zasady pirymidynowej (tyminy lub cytozyny) skutkowało bardzo dużym spadkiem aktywności katalitycznej. Mutant Dz1/VIIWS_12C wykazywał w obecności jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} , odpowiednio, 10-krotny, 13-krotny i 23-krotny spadek aktywności katalitycznej. Mutant Dz1/VIIWS_12T w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 50 μM wykazywał o ok. 93% niższy stopień przecięcia od DNAzemu 1/VIIWS. Podczas gdy kofaktorem reakcji cięcia były jony Zn^{2+} bądź Mn^{2+} aktywność katalityczna Dz1/VIIWS_12T spadła, odpowiednio, 7- i 23-krotnie (Rys. 57A). W obecności innych jonów metali dwuwartościowych, takich jak: Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} i Mg^{2+} trzy warianty DNAzemu 1/VIIWS posiadające mutację w pozycji 12 łańcucha polinukleotydowego były praktycznie nieaktywne.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że obecność zasady purynowej w pozycji 12 jest konieczna do zachowania aktywności katalitycznej DNAzemu 1/VIIWS. Prawdopodobnie, zarówno stopień protonacji puryn, ich budowa, struktura oraz siła tworzonych wiązań wpływają na odpowiednie zwinięcie się DNAzymów w strukturę aktywną katalitycznie.



Rysunek 57. Zależność aktywności katalitycznej DNAzymów **A)** Dz1/VIIWS **B)** Dz5/XWS od zmienności składu nukleotydowego i modyfikacji wprowadzonych w regionie katalitycznym. W tabelach podano relatywny stopień przecięcia (Y_m). Wartości Y_m dla DNAzymów typu dzikiego tj. Dz1/VIIWS oraz Dz5/XWS w obecności jonów Cd²⁺ przyjęto jako 1 i do tej wartości porównywano Y_m uzyskane podczas reakcji z jonami Zn²⁺ i Mn²⁺. Wartości Y_m dla wariantów z mutacjami obliczono jako stosunek (Y_m)_{mutant}/ (Y_m) _{typ dziki}. Reakcję prowadzono w obecności buforu: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl w czasie 30 minut w temperaturze 25°C.

Innym elementem strukturalnym, który został poddany ukierunkowanej mutageniezie była środkowa para zasad trzonu niedużej spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą AGC. Peracchi i współpracownicy [98–99] wykazali, że nukleotydy tworzące środkową, kanoniczną parę zasad trzonu spinki mają istotny wpływ na aktywność katalityczną DNAzymu 8-17. Zmiana pary C4-G10 na parę A4-T10 powodowała 5-krotny spadek aktywności DNAzymu 17E aktywnego w obecności jonów Zn²⁺ [85]. Określiłam zatem aktywność katalityczną dwóch DNAzymów (Dz1/VIIWS i Dz5/XWS) z wprowadzonymi mutacjami w obrębie

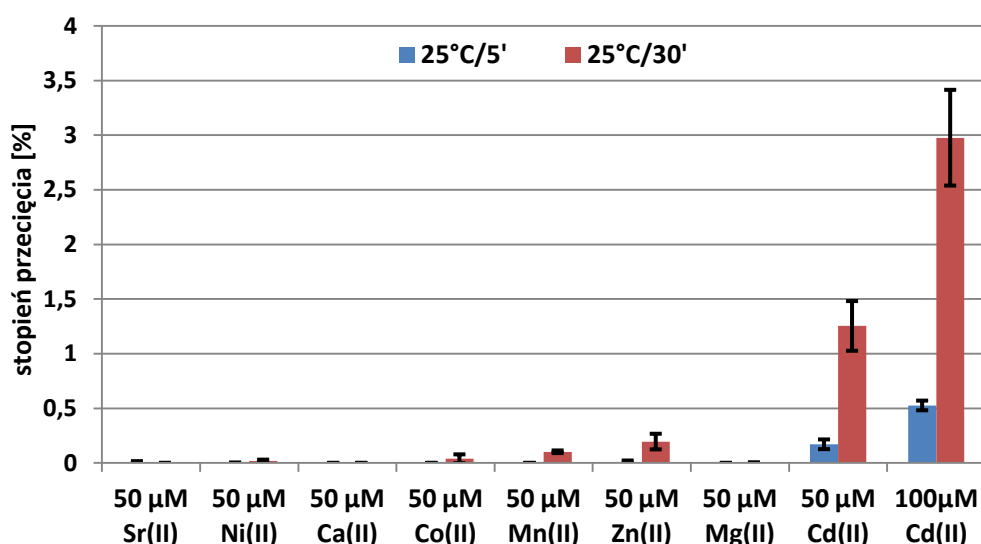
trzonu spinki zaangażowanej w tworzenie struktury regionu katalitycznego. DNAzym 1/VIIWS posiada trzon zbudowany z dwóch par typu A-T oraz jednej pary C-G. Dane literaturowe sugerują, iż aby DNAzym 8-17 zachowywał wysoką aktywność katalityczną niezbędne są przynajmniej dwie pary typu C-G w obrębie trzonu spinki [57]. Zastąpiłam zatem środkową parę zasad A4-C10 parą C4-G10. Zmutowany DNAzym wykazywał zbliżony stopień przecięcia do wariantu typu dzikiego w obecności 50 μM stężenia jonów Cd^{2+} podczas 30-minutowej inkubacji, natomiast zmieniły się jego preferencje wobec jonów Zn^{2+} i Mn^{2+} . Wprowadzenie mutacji A4C/T10G spowodowało ponad 3-krotnie niższy i o 75% wyższy stopień przecięcia w obecności 50 μM stężenia, odpowiednio jonów Mn^{2+} i Zn^{2+} (Rys. 57A).

W przypadku DNAzymu 5/XWS, który wykazywał niższą aktywność katalityczną niż DNAzym 1/VIIWS (Rys. 57B), po zamianie pary zasad w trzonie spinki T4-A10 na C4-G10 zaobserwowałam ok. 5-krotny spadek aktywności katalitycznej w obecności jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} oraz Mn^{2+} o stężeniu 50 μM podczas 30-minutowej inkubacji, w stosunku do aktywności Dz5/XWS typu dzikiego. Przy czym wprowadzenie mutacji nie wpłynęło na zmianę preferencji DNAzymu 5/XWS wobec jonów metali (Rys. 57B). Należy podkreślić, że zarówno mutant Dz5/XWS, jak i mutant Dz1/VIIWS były praktycznie nieaktywne w obecności jonów Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} i Mg^{2+} (Rys. 57).

Powyższe wyniki wskazują, że skład nukleotydowy trzonu spinki obecnej w regionie katalitycznym wpływa na aktywność katalityczną DNAzymów 1/VIIWS i 5X/WS oraz ich preferencje wobec jonów metali. Ponadto, ilość par zasad typu C-G nie decyduje o właściwościach katalitycznych otrzymanych przeze mnie wariantów, w przeciwieństwie do obserwacji literaturowych dotyczących DNAzymu 8-17 [57]. Również obecność środkowej pary zasad w trzonie spinki DNAzymów w konfiguracji C4-G10 nie zwiększa aktywności katalitycznej badanych wariantów. Wydaje się, iż trzon spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą AGC, usytuowany w obrębie regionu katalitycznego może uczestniczyć w wiązaniu jonu metalu. Może być także zaangażowany w tworzenie oddziaływań dalekiego zasięgu, istotnych dla przyjęcia przez DNAzym odpowiedniej struktury drugorzędowej, decydującej o jego właściwościach katalitycznych.

Poza określeniem wpływu mutacji wprowadzanych w obrębie 5-nukleotydowego fragmentu jednoniciowego (pozycja 12) oraz w obrębie trzonu spinki, zaangażowanych w tworzenie struktury regionu katalitycznego, zbadano także aktywność katalityczną DNAzymu 1/VIIWS z modyfikacją w postaci grupy tiofosforanowej w miejscu cięcia. Huang i Liu [157] wykazali, że wprowadzenie grupy tiofosforanowej (PS) w miejscu cięcia DNAzymu Ce13d

wpłynęło na zmianę jego preferencji wobec jonów metali niezbędnych do aktywności katalitycznej z jonów lantanowców na jony Cd^{2+} czy Hg^{2+} . Ponieważ niektóre jony metali dwuwartościowych, w tym jony Cd^{2+} , wykazują silne powinowactwo do ligandów zawierających siarkę, niewiążący atom tlenu grupy fosforanowej w miejscu cięcia katalitycznego DNAzemu 1/VIIWS zastąpiono atomem siarki. Aktywność katalityczną DNAzemu z tą modyfikacją, Dz1/VIIWS_PS, zbadano w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych. DNAzym Dz1/VII_PS wykazywał 3% stopień przecięcia w obecności 100 μM stężenia jonów Cd^{2+} podczas 30-minutowej inkubacji (Rys. 58). DNAzym bez modyfikacji Dz1/VIIWS wykazywał 9% stopień przecięcia w tych warunkach (Rys. 52A).



Rysunek 58. Aktywność katalityczna DNAzemu Dz1/VIIWS_PS w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl przez 5 minut i 30 minut w temperaturze 25°C.

W obecności 50 μM stężenia jonów Cd^{2+} stopień przecięcia zarówno modyfikowanego, jak i niemodyfikowanego DNAzemu wyniósł ok. 2% podczas 30-minutowej inkubacji (Rys. 58). Bardzo istotny, ponad 10-krotny spadek aktywności wariantu Dz1/VIIWS_PS miał miejsce w obecności 50 μM stężenia jonów Mn^{2+} , zaś w obecności jonów Zn^{2+} stopień przecięcia był na poziomie niespełna 0,2%, czyli był 3-krotnie niższy niż stopień przecięcia DNAzemu bez modyfikacji tiofosforanowej (Rys. 52A).

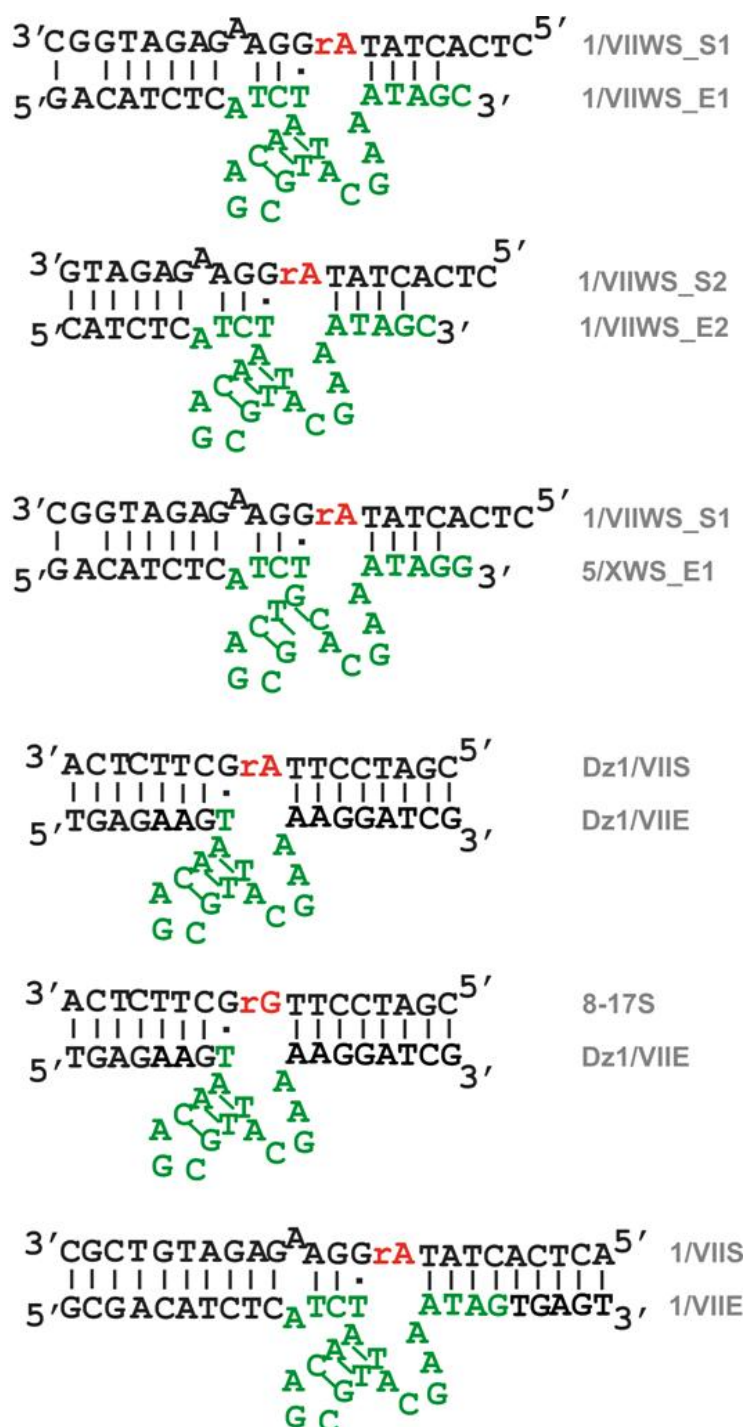
Wprowadzenie grupy tiofosforanowej w miejsce cięcia katalitycznego DNAzemu 1/VIIWS nie poprawiło jego aktywności katalitycznej w obecności jonów Cd^{2+} , ale istotnie obniżyło jego aktywność katalityczną w obecności jonów Zn^{2+} i Mn^{2+} .

3.8. Aktywność katalityczna DNAzymów metalozależnych działających w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*)

W kolejnym etapie podjęłam próbę uzyskania DNAzymów metalozależnych zdolnych do działania w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*). Większość opisywanych w literaturze katalitycznych kwasów deoksyrybonukleinowych wykorzystywanych w praktyce działa w układzie dwucząsteczkowym, przy czym często DNAzym występuje w dużym nadmiarze w stosunku do substratu.

W pierwszej kolejności zaprojektowałam dwa warianty DNAzymu 1/VIIWS w układzie dwucząsteczkowym (Rys. 59). Pierwszy wariant otrzymałam poprzez przecięcie cząsteczki DNAzymu 1/VIIWS pomiędzy resztą G1.10 i C2.10 natomiast drugi, krótszy wariant w wyniku odcięcia 4-nukleotydu pętli GCGA w miejscu C1.12 i G.2.12 (Rys. 51, rozdz. 3.6). Badanie aktywności katalitycznej otrzymanych wariantów prowadziłam w buforze 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 0,1, 1 i 10 mM. DNAzym wprowadzany był do reakcji w 100-, 1000- i 10000-krotnym nadmiarze w stosunku do oligonukleotydowego substratu. Nie zaobserwowałam produktów reakcji katalitycznego cięcia, co wskazuje, iż żaden z badanych wariantów 1/VIIWS_E1 i 1/VIIWS_E2 nie wykazywał aktywności katalitycznej w obecności jonów Cd^{2+} . Sprawdziłam także, czy wariant DNAzymu 5/XWS o innej sekwencji regionu katalitycznego niż Dz1/VIIWS będzie aktywny w układzie *in trans*. Reakcję prowadziłam w identycznych warunkach jak w przypadku wariantów 1/VIIWS_E1. DNAzym 5/XWS_E1 (Rys. 59) również nie wykazywał aktywności katalitycznej w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 0,1, 1 i 10 mM.

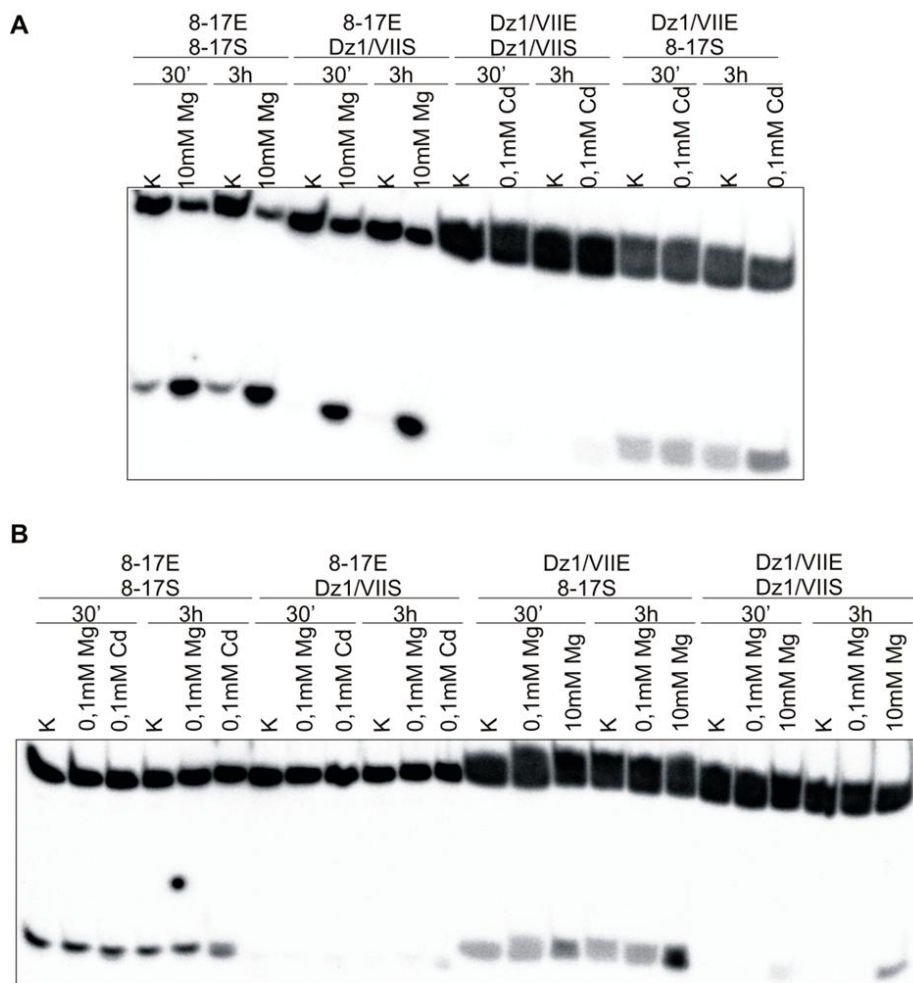
Następnie postanowiłam zaprojektować wariant DNAzymu 1/VIIWS działający w układzie dwucząsteczkowym w taki sposób, aby sprawdzić czy skład nukleotydowy i długość segmentów dwuniciowych, okalających region katalityczny, ma znaczenie dla jego właściwości katalitycznych. Zaprojektowałam wariant Dz1/VIIIE, którego centrum katalityczne było identyczne pod względem składu nukleotydowego z centrum katalitycznym DNAzymu 1/VIIWS, zaś sekwencja segmentów okalających ten region była identyczna jak w DNAzymie 8-17, który jest aktywny przy wysokich stężeniach jonów magnezu (Rys. 59). Ponadto, zastosowałam w reakcji dwa substraty oligonukleotydowe różniące się zasadą przy rybonukleotydzie będącym miejscem cięcia katalitycznego.



Rysunek 59. Warianty DNAzymów metalozależnych w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*). Na zielono zaznaczono region typu *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej użytej w selekcji *in vitro*. Czerwoną czcionką oznaczono miejsce katalicznego cięcia.

Wariant Dz1/VIIE nie wykazywał aktywności katalitycznej zarówno w obecności jonów Cd^{2+} jak i Mg^{2+} o stężeniu 100 μM . W nieznacznym stopniu Dz1/VIIE przecinał substrat Dz1/VIIS z rybonukleotydem adeniny po 3 godzinach inkubacji w obecności 10 mM

stężenia jonów Mg^{2+} . Nieco silniejszemu cięciu ulegał substrat 8-17S z rybonukleotydem guaniny. DNAzym 8-17E stanowił pozytywną kontrolę reakcji przebiegającej w układzie dwucząsteczkowym. Zgodnie z oczekiwaniem, DNAzym 8-17E przecinał oligonukleotydowy substrat zarówno z rybonukleotydem adeniny jak i guaniny w obecności 10 mM stężenia jonów magnezu, natomiast był nieaktywny w obecności 100 μM stężenia tych jonów (Rys. 60).



Rysunek 60. Autoradiogramy przedstawiające wyniki analizy aktywności katalitycznej skonstruowanych DNAzymów działających w układzie dwucząsteczkowym: **A)** w obecności jonów Cd^{2+} i Mg^{2+} o stężeniu, odpowiednio 0,1 mM oraz 10 mM, **B)** w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 0,1 mM, jonów Mg^{2+} o stężeniu 0,1 mM dla 8-17E oraz jonów Mg^{2+} o stężeniu 0,1 mM i 10 mM dla Dz1/VIIIE. Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl. K, linie kontrolne.

Kolejny układ dwucząsteczkowy stanowił DNAzym 1/VIIIE z substratem 1/VIIS. Wariant 1/VIIIE *trans* powstał w wyniku przecięcia cząsteczki DNAzymu 1/VIIIS między G1.10 i G1.11 (Rys. 51). Wydłużyłam nić odpowiadającą substratowi o 4 nukleotydy komplementarne do nukleotydów pochodzących z przecięcia pętli apikalnej u podstawy

trzonu DNAzemu zyskując tym samym segment dwuniciowy o długości 10 par zasad. Natomiast na końcu 3' zaprojektowałam segment dwuniciowy złożony z 9 par zasad (Rys. 59). DNAzym wprowadzany był do reakcji w 100-krotnym nadmiarze w stosunku do oligonukleotydowego substratu. Reakcję cięcia inicjowano poprzez dodanie jonów Cd^{2+} lub Mg^{2+} do końcowego stężenia, odpowiednio, 100 μM i 1 mM. Mimo wydłużenia dwuniciowych segmentów okalających region katalityczny DNAzemu 1/VIIE, nie wykazywał on aktywności w obecności jonów Cd^{2+} i Mg^{2+} .

4. Dyskusja wyników

4.1. Dlaczego deoksyrybozymy? Dlaczego jony Cd^{2+} ?

Kwasy nukleinowe obok białek, hormonów, węglowodanów czy lipidów są związkami chemicznymi będącymi przedmiotem szczególnie intensywnych badań biochemicznych. Do największych osiągnięć biochemii zalicza się m. in.: odkrycie struktur, jakie tworzą kwasy nukleinowe i roli jaką pełnią w procesie przekazywania informacji genetycznej. W latach późniejszych odkryto, że kwasy nukleinowe podobnie jak enzymy białkowe mogą brać udział w reakcjach biochemicznych, jako katalizatory. Cząsteczki RNA pełniące taką funkcję określono mianem rybozymów [1–2], a cząsteczki DNA – deoksyrybozymów [3], wskazując tym samym na ich podobieństwo do enzymów białkowych. DNAazy, sztucznie otrzymane cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego, które wykazują aktywność katalityczną w reakcji przecinania łańcucha RNA stanowią przedmiot badań mojej rozprawy doktorskiej.

Dlaczego deoksyrybozymy? Obecnie, największy obszar aplikacji deoksyrybozymów stanowi analityka ilościowa i jakościowa. Ze względu na to, że większość DNAzymów do swojej aktywności katalitycznej wymaga kofaktorów w postaci jonów metali dwuwartościowych, z powodzeniem wykorzystuje się te cząsteczki DNA do konstrukcji biosensorów wykrywających jony metali np. jony Pb^{2+} [127, 153], Cu^{2+} [131, 154], czy UO_2^{2+} [58, 65, 130]. Co dodatkowo przemawia za DNAzymami, jako atrakcyjnymi obiektami badawczymi i potencjalnymi narzędziami molekularnymi? Są one znacznie bardziej odporne na niepożądaną degradację, zachodzącą pod wpływem działania czynników środowiskowych niż np. rybozymy czy enzymy białkowe. Brak grupy 2'-OH przy wiązaniu fosfodiesterowym powoduje, że cząsteczki DNA są ok. 100 000 razy bardziej odporne na hydrolizę niż cząsteczki RNA. Natomiast wiązania peptydowe enzymów białkowych są 1000 razy słabsze niż wiązania fosfodiesterowe DNA [25]. Postanowiłam zatem, podjąć próbę otrzymania DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} przy zastosowaniu metody selekcji *in vitro*. Badania, które przeprowadziłam w ramach realizacji pracy doktorskiej, skupiały się przede wszystkim na szczegółowej charakterystyce aktywności katalitycznej oraz właściwości biochemicznych, struktury, a także funkcjonalności otrzymanych na drodze selekcji *in vitro* DNAzymów.

Dlaczego jony kadmu? Kadm jest zaliczany do głównych zanieczyszczeń chemicznych środowiska. Jest pierwiastkiem o dużej toksyczności, nawet w bardzo małych

stężeniach. Z tego względu stanowi on poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Właściwością kadmu, która zwielokrotnia i nasila jego toksyczne działanie, jest zdolność do kumulowania się w organizmie [23]. Toksyczność jonów kadmu wynika przede wszystkim z jego powinowactwa do grup sulfhydrylowych białek. W komórkach dochodzi do wiązania grup –SH przez metal w tych miejscach, które uczestniczą w katalizie enzymatycznej lub transporcie jonów. Oddziaływania te mogą być tak silne, że powodują zmiany konformacji cząsteczek, rozerwanie wiązań wodorowych lub przesunięcia kationów z miejsc ich działania [158]. Obecnie większość analiz dotycząca oznaczeń jonów metali jest wykonywana w oparciu o techniki takie jak: absorpcyjna spektrometria atomowa, anodowa woltamperometria strippingowa czy mikrosondowanie, w laboratoriach wyposażonych w drogi sprzęt analityczny i zatrudniających wysoko wykwalifikowanych pracowników [7]. Kim i wsp. [159] przedstawili szereg fluorescencyjnych i kolorymetrycznych sensorów wykrywających jony Cd^{2+} , przy czym większość z zaproponowanych metod detekcji wymaga chemicznej syntezy małych, cyklicznych cząsteczek organicznych, zawierających w swojej strukturze pierścienie benzenu. Poszukując nowych sposobów oznaczeń jonów metali, Wu i wsp. [51] otrzymali metodą selekcji *in vitro* aptamery DNA o wysokim powinowactwie wobec jonów Cd^{2+} , które są potencjalnie użyteczne jako biosensory. Nie było natomiast doniesień literaturowych o tym, by otrzymano DNAzimy specyficzne wobec jonów Cd^{2+} . Pomimo, że na drodze selekcji *in vitro* otrzymano szereg deoksyrybozymów aktywnych w obecności innych jonów metali jak jony Zn^{2+} [57], Mg^{2+} [5–6], Ca^{2+} [76, 98] czy Hg^{2+} [160].

Sądziłam zatem, że realizacja postawionego celu pracy doktorskiej może dostarczać informacji, niezbędnych podczas praktycznego zastosowania wyselekcjonowanych DNAzymów, jako prostych modułów sekwencyjnych w konstrukcji nowoczesnych biosensorów.

4.2. W poszukiwaniu nowych DNAzymów – selekcja *in vitro*

W poszukiwaniu DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} wykorzystałam metodę selekcji *in vitro*, która jest strategią badawczą umożliwiającą znajdowanie m. in. DNAzymów [3], wariantów rybozymów [48], aptazymów [49], czy aptamerów DNA [50–51] oraz aptamerów RNA [52] o pożądanym właściwościach funkcjonalnych wśród licznej puli przypadkowych sekwencji, w sposób analogiczny do naturalnych mechanizmów ewolucyjnych. Co ważne, metoda selekcji *in vitro* – w odróżnieniu od metody ukierunkowanej mutagenety – nie wymaga żadnej wstępnej wiedzy na temat struktury poszukiwanych cząsteczek [53, 62]. Przeprowadziłam dwa niezależne eksperymenty selekcji

in vitro w poszukiwaniu DNAzymów aktywnych w obecności jonów kadmu. Pierwszym etapem obu przeprowadzonych procesów było stworzenie wyjściowej biblioteki kombinatorycznej oligonukleotydowych matryc DNA na drodze syntezy chemicznej. Każdy oligonukleotyd zbudowany był z odcinka o sekwencji typu *random* oraz dwóch odcinków o ustalonej sekwencji zlokalizowanych na końcu 5' i 3'. W trakcie syntezy regionu typu *random* stężenia monomerów A, T, G i C były równomolowe, aby prawdopodobieństwo wystąpienia każdej kombinacji nukleotydów było jednakowe. Do konstrukcji biblioteki kombinatorycznej DNAzymów wykorzystałam strategię zaproponowaną przez Breaker'a i Joyce'a [5] podczas selekcji DNAzymu aktywnego w obecności jonów Mg^{2+} . W tej strategii region *random* zlokalizowany jest w przewidywanej strukturze drugorzędowej wariantów DNAzymów naprzeciw pojedynczego wiązania fosfodiestrowego typu rybo, będącego miejscem katalitycznego cięcia i z obydwu stron ograniczony jest segmentami dwuniciowymi DNA (Rys. 17). Tego typu podejście z góry określa sposób interakcji między nicią substratu zawierającą wiązanie typu rybo, a nicią pełniącą funkcję enzymu. Strategia syntezy biblioteki kombinatorycznej według Breaker'a i Joyce'a [5] została z powodzeniem wykorzystana w szeregu innych eksperymentów selekcji *in vitro* DNAzymów [74–75]. Wśród różnych bibliotek stosowanych w chemii kombinatorycznej, biblioteki oligonukleotyde charakteryzują się największą liczebnością. Region *random* zazwyczaj liczy od 20 do 200 nukleotydów [55]. Dla pierwszego eksperymentu selekcji *in vitro*, zaplanowałam – podobnie jak Schlosser i wsp. [59] podczas selekcji DNAzymów przecinających wiązanie typu pirymidyna-pirymidyna – syntezę biblioteki kombinatorycznej o krótkim 23-nukleotydowym regionie *random*, co odpowiada 7×10^{13} różnych cząsteczek DNA. Zdecydowałam się na konstrukcję biblioteki z krótkim regionem zdegenerowanym ponieważ jej zaletą jest możliwość uzyskania pełnej reprezentatywności biblioteki tzn. istnieje możliwość użycia w eksperymencie takiej ilości DNA, która zapewnia obecność w próbce wszystkich teoretycznie możliwych wariantów sekwencji [44, 48]. Velez i wsp. [155] sugerują natomiast, iż wadą krótkich bibliotek kombinatorycznych katalitycznych cząsteczek DNA są stosunkowo proste motywy w strukturze drugo- i trzeciorzędowej cząsteczek, a zatem mniejsze prawdopodobieństwo otrzymania wariantów DNAzymów o pożądanym, unikalnym właściwościach. Biblioteki z dłuższym regionem *random* liczącym 40–50 nukleotydów były najczęściej wykorzystywane do otrzymywania DNAzymów metalozależnych [57–58, 160]. W drugim, przeprowadzonym eksperymencie selekcji *in vitro* wykorzystałam dwie biblioteki kombinatoryczne: zawierającą 23-nukleotydowy odcinek *random* oraz z regionem typu *random* o długości 40 nukleotydów, gdzie teoretyczna liczba wariantów wynosiła 4^{40} , czyli $1,2 \times 10^{24}$. Wadą tej drugiej biblioteki

jest brak praktycznej możliwości użycia w eksperymencie 10^{24} cząsteczek DNA, co zapewniłoby uzyskanie pełnej reprezentatywności biblioteki [155]. Natomiast istotną zaletą bibliotek o dużej liczebności jest możliwość zwinienia się wariantów w bardziej skomplikowane struktury drugo- i trzeciorzędowe [55, 161–162], większe jest zatem prawdopodobieństwo wystąpienia wśród nich wariantów o pożądanym właściwościach [163].

Zastosowany przeze mnie schemat selekcji *in vitro* DNAzymów (Rys. 18 i 42) skonstruowany został w oparciu o procedury stosowane wcześniej do selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów Mg^{2+} [5], Zn^{2+} [57] czy jonów UO_2^{2+} [58]. Zsyntetyzowane chemicznie oligonukleotydy, w dwóch następujących po sobie reakcjach PCR, prowadziły do otrzymania biblioteki dwuniciowego DNA. Co jest bardzo istotne, obydwie nici różniły się mobilnością elektroforetyczną dzięki użyciu w drugiej reakcji PCR startera P4, zawierającego "spacer18" – łącznik złożony z 18 reszt glikolu etylenowego. Możliwe było zatem rozdzielanie obydwu nici w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących i otrzymanie biblioteki jednoniciowych oligomerów DNA (Rys. 17 i 42). Otrzymane biblioteki kombinatoryczne DNAzymów poddawałam procesowi właściwej selekcji, według ustalonego kryterium, co prowadziło do oddzielenia cząsteczek aktywnych, wykazujących oczekiwane właściwości, od nieaktywnych. Wyselekcjonowane cząsteczki były powielane w reakcji PCR i wzbogacona, nowa biblioteka kombinatoryczna była wprowadzana do kolejnego cyklu [45]. Kluczowym etapem selekcji był etap oddzielenia wariantów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} od wariantów, które takiej aktywności nie wykazują. Separacja oligonukleotydów aktywnych katalitycznie od nieaktywnych możliwa jest m. in. na drodze filtracji membranowej, chromatografii powinowactwa czy elektroforezy kapilarnej [63]. W większości prac eksperymentalnych dotyczących selekcji DNAzymów metalozależnych powszechnie wykorzystywaną i zalecaną metodą separacji wariantów jest chromatografia powinowactwa z udziałem kompleksu streptawidyna–biotyna [5–7, 57, 64]. W doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy do separacji aktywnych katalitycznie oligonukleotydów od nieaktywnych wykorzystywałam metodę rozdziału produktów reakcji katalitycznego cięcia w denaturującym żelu poliakryloamidowym, która z powodzeniem została wykorzystana podczas selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów UO_2^{2+} [58, 65]. Warianty aktywne ulegające przecięciu w obecności jonów Cd^{2+} były krótsze (62–79 nt) od wariantów nieaktywnych (90–102 nt), zatem w żelu poliakryloamidowym migrowały szybciej (Rys. 19 i 43). Odzyskany z żelu poliakryloamidowego produkt reakcji cięcia był

powielany w reakcji PCR w celu uzyskania wzbogaconej w aktywne warianty biblioteki DNAzymów, którą następnie poddawałam kolejnej reakcji cięcia.

W ramach realizacji pracy doktorskiej przeprowadziłam dwa niezależne eksperymenty selekcji *in vitro*. W wyniku pierwszej selekcji zamiast DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} otrzymałam DNAzimy pH-zależne, które posiadały jednakże interesujące właściwości biochemiczne. Natomiast w wyniku drugiego eksperymentu otrzymałam katalityczne cząsteczki DNA, należące do klasy znanego z literatury DNAzemu 8-17 [6, 57, 94, 164], które są zdolne do cięcia RNA w obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych, przy czym najszybciej katalizują reakcję cięcia w obecności jonów Cd^{2+} .

4.3. Lepszy wygrywa – DNAzimy pH-zależne

Zakładanym celem pierwszego eksperymentu selekcji *in vitro* z wykorzystaniem biblioteki DNAzymów zawierającej 23-nukleotydowy odcinek *random* było uzyskanie DNAzymów aktywnych w obecności Cd^{2+} . Przeprowadziłam 11 cykli selekcji, gdzie czynnikiem selekcyjnym było zmniejszające się stężenie jonów Cd^{2+} od 1 mM do 100 μM . Czas inkubacji zmieniał się od 60 minut do 60 sekund (Tab. 6). Zwykle proces selekcji *in vitro* katalitycznych cząsteczek DNA trwa od 5 do 15 cykli. Wymagana jest więcej niż jedna runda selekcji ponieważ warianty nieaktywne bądź warianty o innej specyficzności działania mogą z niewyjaśnionych przyczyn „przetrwać” warunki selekcji [36]. Dla przykładu, Li i wsp. [57] przeprowadzili 12 cykli selekcji *in vitro* w celu otrzymania DNAzymów aktywnych w obecności jonów Zn^{2+} . Stężenie jonów Zn^{2+} zmieniało się od 1 mM do 100 μM , zaś czas inkubacji puli cząsteczek z jonami metalu stopniowo malał od 60 minut dla pierwszego cyklu do 30 sekund podczas ostatniego cyklu prowadzonej selekcji. W przypadku otrzymywania katalitycznych cząsteczek DNA aktywnych w obecności jonów UO_2^{2+} , Brown i wsp. [65] przeprowadzili 11 cykli selekcji, rozpoczynając od 5-godzinnej inkubacji puli DNAzymów z jonami UO_2^{2+} , a kończąc na inkubacji 15-minutowej w obecności 100 μM stężenia jonów UO_2^{2+} , co pozwoliło na stworzenie biosensora o wysokiej czułości i specyficzności działania [130]. Proces selekcji *in vitro* należy prowadzić do momentu, kiedy aktywność puli generowanych cząsteczek będzie wystarczająco wysoka by móc przejść do etapu klonowania i identyfikacji poszczególnych wariantów sekwencyjnych.

W przeprowadzonym przeze mnie procesie selekcji *in vitro* w pierwszych czterech cyklach stopień przecięcia biblioteki DNAzymów był znikomy, nieco powyżej 0,1%. Dopiero po piątym cyklu zaobserwowałam znaczący wzrost stopnia przecięcia, nawet do 22% w

ósmym cyklu, przy 100 μM stężeniu jonów Cd^{2+} i czasie inkubacji 5 minut. W kolejnych cyklach, przy 5-krotnym skróceniu czasu inkubacji, stopień przecięcia spadł praktycznie o połowę do poziomu 8-16% (Tab. 6, Rys. 19). Jako, że celem prowadzonego eksperymentu selekcji było otrzymanie DNAzymów specyficznych dla jonów Cd^{2+} do procedury dwukrotnie włączono tzw. selekcję negatywną, która miała za zadanie wyeliminować z puli wariantów te, które wykazywały aktywność katalityczną w obecności innych jonów metali: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} . Bruesehoff i wsp. [165] wykazali, że w wyniku selekcji DNAzymów aktywnych w obecności jonów Co^{2+} , prowadzonej bez włączenia procedury selekcji negatywnej, stosunek aktywności katalitycznej w obecności jonów Co^{2+} do aktywności w obecności jonów Zn^{2+} dla wariantu Co-11 wynosił 0,448, natomiast po wprowadzeniu trzech rund selekcji negatywnej stosunek ten dla wspomnianego wariantu wynosił 1,52. Wprowadzenie etapu selekcji negatywnej, pozwalające na wyeliminowanie katalitycznych cząsteczek DNA/RNA o „niepożądaną” specyficzności działania, było stosowane przez wiele innych grup badawczych [166–167].

Po przeprowadzonych 11 cyklach selekcji *in vitro* do dalszych badań wybrałam pulę wariantów uzyskaną w cyklu X, jako najbardziej aktywną w „bardziej wymagających” warunkach selekcji tj. obecności 0,1 mM stężenia jonów Cd^{2+} i najkrótszym czasie inkubacji wynoszącym 1 minutę. Po etapie klonowania i sekwencjonowania zidentyfikowałam kilka grup-rodzin klonów, posiadających charakterystyczne motywy sekwencyjne w regionie odpowiadającym regionowi *random* w bibliotece wyjściowej. Zaskakujące było pojawienie się w tym regionie motywów sekwencji złożonych powtarzających się z dwóch, trzech i czterech tych samych nukleotydów (Rys. 20).

4.3.1. Kataliza bez udziału jonów metali

Po wstępnych badaniach aktywności katalitycznej wybranych wariantów sekwencyjnych okazało się, że DNAzy, które otrzymałam nie wykazują aktywności w obecności jonów Cd^{2+} , natomiast są aktywne w niskim pH środowiska (Rys. 21–25). Eksperymenty selekcji *in vitro* związane są zawsze z ryzykiem, że nie otrzymamy wariantów o pożądanym właściwościach lub otrzymamy warianty o szerszym spektrum aktywności niż przez nas zakładane. Ciesiołka i wsp. [144] otrzymali aptamery RNA wiążące jony Zn^{2+} , które jak się okazało wiążą także jony Ni^{2+} i Co^{2+} . Innym przykładem swego rodzaju nieprzewidywalności wyniku procesu selekcji *in vitro* była selekcja wariantów intronów grupy I [168] oraz wariantów RNazy P [169] w obecności jonów Ca^{2+} , gdzie otrzymane warianty wykazywały również wysoką aktywność w obecności jonów Mg^{2+} ,

charakterystyczną dla naturalnie występujących rybozymów. Przypuszczałam, że do tak nieoczekiwanego wyniku przeprowadzonego przeze mnie pierwszego eksperymentu selekcji *in vitro* mogły przyczynić się dwa czynniki: 1/ 23-nukleotydowy region *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej mógł być za krótki do utworzenia centrum katalitycznego zależnego od wiązania jonów Cd^{2+} oraz 2/ procedura selekcji ze standardowym etapem strącania DNA w pH 5,2, obniżonym w stosunku do pH 7,0 podczas selekcji wariantów, mogła spowodować, że w konsekwencji otrzymałam DNAzymy „pH-zależne”. Niemniej jednak, pomimo swego rodzaju „niepowodzenia” w przeprowadzonym procesie selekcji *in vitro*, której zakładany początkowo cel nie został osiągnięty, postanowiłam bliżej przyjrzeć się właściwościom katalitycznym otrzymanych DNAzymów.

Jak dotychczas, większość doniesień literaturowych odnoszących się do katalitycznych cząsteczek DNA dotyczy wariantów, które do aktywności katalitycznej wymagają kofaktorów w postaci jonów metali dwuwartościowych oraz fizjologicznego pH środowiska. Co prawda, Gryer i Sen [74] zidentyfikowali DNAzym Na8 przecinający RNA w obecności monowalentnych jonów Na^+ , niezależnie od obecności jonów metali diwalentnych, zaś Roth i Breaker [75] otrzymali wariant HD2, który do swojej aktywności katalitycznej wymaga histydyny. Stosunkowo niewiele jest natomiast informacji na temat cząsteczek DNA, które do swojej aktywności katalitycznej wymagają niskiego pH środowiska [133, 170–174]. W związku z tym, scharakteryzowanie właściwości otrzymanych przez mnie DNAzymów pH-zależnych wydawało się być niezwykle interesujące.

Zbadałam kilka wariantów DNAzymów reprezentujących każdą z otrzymanych rodzin, różniących się między sobą składem nukleotydowym w obrębie regionu odpowiadającego regionowi *random* w bibliotece wyjściowej. Podczas pierwszych doświadczeń zaobserwowałam, że otrzymane DNAzymy ulegają przecięciu w miejscu rybonukleotydu adeniny w buforach, których pH jest $< 6,0$ bez udziału jonów metali. DNAzym #27 wykazywał aktywność katalityczną w buforze 50 mM MES-NaOH o $\text{pH} \leq 5,75$, oraz w buforze 50 mM NH_4OAc w $\text{pH} \leq 5,75$. W buforach o pH wyższym niż 6,0 DNAzym ten był nieaktywny (Rys. 23). Jayasena i Gold [175] otrzymali na drodze selekcji *in vitro* cząsteczki RNA, które również wykazywały aktywność katalityczną w niskim pH środowiska, przy czym silniejsze cięcia obserwowali dla reakcji prowadzonej w buforze Na-MES niż np. octanie sodu czy kakodylanie sodu o tej samej wartości pH. Podczas szczegółowej analizy właściwości katalitycznych otrzymanych przez mnie DNAzymów, reprezentantów czterech rodzin, wyznaczyłam profil ich aktywności jako funkcję zależności od zmian pH. Wyniki potwierdziły, że wyselekcjonowane DNAzymy do swojej aktywności

katalitycznej wymagają niskiego pH środowiska (Rys. 24), ze wskazaniem pH ok. 4,0 jako optymalnego dla ich działania. DNAzym #27 z rodziny I uległ 75% przecięciu w miejscu rA w 50 mM cytrynianie sodu o pH 4,0, natomiast inny wariant z tej samej rodziny – DNAzym #22 w 49%. Stopień przecięcia wariantów z rodzin II i III był odpowiednio o ok. 20–30% niższy od stopnia przecięcia DNAzymu #27 z rodziny I. DNAzym #15 z rodziny IV w przeciwieństwie do wariantów z pozostałych grup, maksymalny ok. 50% stopień przecięcia osiągał w pH 4,5, a nie w pH 4,0. Wraz z obniżaniem wartości pH do 2,5 stopień przecięcia badanych wariantów istotnie spadał, zaś w pH bliskim 6,0–7,0 nie wykazywały one aktywności katalitycznej (Rys. 24 i 25). Zróżnicowany poziom aktywności katalitycznej poszczególnych wariantów wynika zapewne ze zróżnicowanego składu nukleotydowego, a tym samym z możliwości przyjmowania różnej konformacji. Zmienione nukleotydy w obrębie 3' końca regionu katalitycznego DNAzymu #22 w stosunku do DNAzymu #27 (Rys. 20), spowodowały 25% spadek jego aktywności katalitycznej przy pH 4,0, chociaż obydwa warianty należą do rodziny I. Ponadto, zakres wartości pH przy jakim Dz22 wykazywał aktywność katalityczną był istotnie węższy od spektrum działania Dz27 (Rys. 25). Różnice w sekwencji w obrębie regionu katalitycznego DNAzymów mogą wpływać na stabilność termiczną cząsteczek oraz na sposób ich zwijania się – tym samym różną strukturę drugorzędową. Co istotne, większość poznanych dotychczas DNAzymów do swojej aktywności wymaga kofaktorów w postaci jonów metali. Uważa się, że jony metali biorą bezpośredni udział w reakcji katalitycznego cięcia RNA [14] oraz odpowiedzialne są za odpowiednie zwinięcie cząsteczki DNAzymu i przyjęcie przez nią konformacji, niezbędnej do wysokiej aktywności katalitycznej [86–87, 176]. Grupa badawcza profesora Li i wsp. [133], otrzymała DNAzymy aktywne w niskim pH środowiska, które do swojej aktywności katalitycznej wymagają także obecności wybranych jonów metali. Na przykład, DNAzym pH4DZ1 najwyższą aktywność katalityczną wykazywał w pH 4,0 i wymagał obecności jonów Mn^{2+} czy Cd^{2+} , natomiast w obecności jonów Na^+ i K^+ był nieaktywny. Natomiast inny wariant, pH3DZ1, był aktywny zarówno w obecności jonów mono- jak i diwalentnych w środowisku o pH 3,0. Żaden z opisanych wariantów nie katalizował reakcji cięcia RNA tylko w wyniku obniżenia pH, obecność kofaktorów w postaci jonów metali była konieczna do zajścia reakcji [133]. Właściwości otrzymanych przeze mnie wariantów DNAzymów #15 i #27 w obecności wybranych jonów metali przy optymalnych dla nich wartościach pH, odpowiednio pH 4,0, i 4,5, były zaskakujące. Wariant Dz15 w pH 4,5 ulegał 50% przecięciu bez udziału jonów metali, a obecność 1 mM bądź 0,1 mM jonów Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} oraz 100 mM Na^+ nie wpłynęła istotnie na jego aktywność katalityczną.

Jony Cd^{2+} o stężeniu 1 mM oraz jony K^+ o stężeniu 100 mM obniżały aktywność Dz15 do poziomu ok. 40% (Rys. 26). Podobny efekt uzyskano przy 100-krotnie wyższym stężeniu jonów jednowartościowych od stężenia jonów dwuwartościowych, co potwierdza większą zdolność tych ostatnich do stabilizacji struktury kwasów nukleinowych. Testowane jony metali nie wpływały także na aktywność katalityczną wariantu Dz27. W pH 4,0 wariant Dz27 ulegał 80% przecięciu bez udziału jonów metali. Wprowadzenie do reakcji szeregu wybranych jonów metali nie zwiększało istotnie stopnia jego przecięcia. Co ciekawe, w obecności 100 μM stężenia jonów Cd^{2+} stopień przecięcia Dz27 wzrósł do ok. 90%, zaś 1 mM stężenie tych jonów zmniejszyło go o ponad 40% (Rys. 27). Jayasena i Gold [175] podczas badań wariantu 8 RNA działającego w niskim pH środowiska, zaobserwowali także, że wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} czy Co^{2+} dochodzi do całkowitej inhibicji reakcji cięcia. Prawdopodobnie, zwiększone stężenie jonów zubożniało ładunki łańcucha polinukleotydowego, powodując zmiany w zwinięciu cząsteczek i przyjęcie przez nie konformacji, w której były nieaktywne katalitycznie.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia sugerują zależność aktywności katalitycznej deoksurybozymów pH-zależnych od przyjmowanej przez nie konformacji. Otrzymane warianty najwyższą aktywność wykazują w środowisku o pH 4,0–4,5, co wskazuje, iż właśnie w tych warunkach dochodzi do zwinięcia DNAzymów w „aktywne” formy. Co bardzo istotne, a zarazem dosyć nietypowe, DNAzyny pH-zależne nie wymagają obecności jonów metali w katalizie. Oznacza to, że jony metali nie biorą bezpośredniego udziału w reakcji cięcia RNA. W wyniku obniżenia pH prawdopodobnie dochodzi do protonacji wybranych grup funkcyjnych w obrębie sekwencji nukleotydowej tworzącej centrum katalityczne. W tych warunkach potencjalnymi akceptorami protonu są atomy azotu reszt adeniny i cytozyny, odpowiednio N1 i N3. Co ciekawe, wartość pK_a dla N1 adeniny wynosi 3,5, zaś dla N3 cytozyny 4,2 i przypadają one w zakresie pH w jakim warianty pH-zależne wykazują najwyższą aktywność. Jest zatem prawdopodobne, że to zasady azotowe łańcucha polinukleotydowego ulegając protonacji, odgrywają zarówno rolę strukturalną, jak i katalityczną w działaniu tych DNAzymów [150].

4.3.2. Struktura DNAzymów pH-zależnych, a mechanizm ich działania

Scharakteryzowałam strukturę drugorzędową dwóch DNAzymów pH-zależnych – DNAzymu #15 oraz DNAzymu #27 metodą mapowania struktury drugorzędowej DNA przy użyciu nukleazy S1 oraz odczynnika chemicznego siarczanu dimetylu (DMS) (Rys. 28 i 29). Uzyskane dane eksperymentalne zostały wprowadzone do programu *RNAstructure 5.6* [146].

W przypadku DNAzemu #27 w obrębie regionu katalitycznego tworzy się motyw strukturalny typu spinki z dużą pętlą 14-nukleotydową bądź spinki z pętlą 6-nukleotydową (Rys. 30B). Dla DNAzemu #15 program zaproponował dwie prawdopodobne struktury drugorzędowe, w których region katalityczny nie posiada wyodrębnionych żadnych motywów strukturalnych i przypomina region katalityczny powszechnie znanego DNAzemu 10-23 [6] (Rys. 40A). Co istotne, w niskim pH mogą tworzyć się nietypowe oddziaływania z zaangażowaniem protonowanych reszt zasad azotowych; jest to prawdopodobne, tym bardziej, że regiony katalityczne otrzymanych wariantów złożone są z dwóch, trzech i czterech tych samych nukleotydów np. TT, AAA, CCCC, AAA, CC [150]. Struktura jednoniciowych cząsteczek kwasów nukleinowych bogatych w powtarzające się reszty pirymidynowe czy purynowe może ulegać istotnym rearanżacjom w niskim pH środowiska w wyniku tworzenia nietypowych par zasad z protonowaną resztą cytozyny np. pary $C^+ \cdot C$ czy $C^+ \cdot CG$ bądź protonowaną resztą adeniny $A^+ \cdot A^+$ [151]. Grupa badawcza Li i współpracowników wykazała, iż DNAzemy działające w pH 5,0 [172], pH 4,0 [170] czy pH 3,0 [174] prawdopodobnie nie posiadają w swojej strukturze wiązań typu Watsona-Cricka, a zwinięcie cząsteczki DNAzemu następuje w wyniku oddziaływań innego typu. Przeprowadzone przeze mnie badania spektroskopowe z wykorzystaniem spektroskopii UV-vis oraz dichroizmu kołowego, potwierdziły, że wraz ze zmianą pH dochodzi do zmian w strukturze wariantów DNAzymów pH-zależnych skróconych z końca 5' i 3' (Rys. 36). Kandadai i wsp. [172] spekulują, że w przypadku otrzymanych przez nich DNAzymów pH-zależnych (pH3DZ1, pH4DZ1, pH5DZ1) brak oddziaływań typu Watsona-Cricka musi być kompensowany długością danego wariantu (ilością nukleotydów), pozwalającą na zwinięcie cząsteczki w odpowiednią strukturę trzeciorzędową. W przypadku otrzymanych przez mnie DNAzymów odcięcie 19 nukleotydowych fragmentów z końca 5', jak i z końca 3' wariantu #15 i wariantu #27 nie wpłynęło istotnie na ich właściwości katalityczne, gdyż stopień przecięcia nie uległ istotnej zmianie (Rys. 31 i 32). Jednocześnie, wyznaczone stałe szybkości katalizowanej reakcji (k_{obs}) potwierdziły, że aktywność katalityczna badanych DNAzymów jest zależna od struktury jaką przyjmuje dany wariant w określonych warunkach – wartości k_{obs} dla Dz15WS w zależności od temperatury, w której prowadzono reakcję, były 3- i 5-krotnie niższe od k_{obs} wyznaczonych dla Dz27WS (Rys. 35).

Badania DNAzymów wykonane za pomocą dichroizmu kołowego sugerują obecność formy B-DNA, o czym świadczy pozytywny efekt Cottona przy ~ 277 nm oraz negatywny efekt Cottona przy ~ 250 nm. Co więcej, brak pozytywnego sygnału przy 290 nm oraz negatywnego przy ok. 260 nm wskazuje, że badane cząsteczki nie tworzą

charakterystycznych dla sekwencji bogatych w cytozynę tzw. kwadrupleksów cytozynowych, inaczej określanych jako i-tetrapleksy (Rys. 36, panel lewy) [177–178]. Zarówno dla DNAzemu 15WS-dA, jak i dla DNAzemu 27WS-dA można natomiast zaobserwować istotny spadek natężenia pasma absorpcji wraz ze spadkiem pH do 4,0, podczas pomiarów prowadzonych z wykorzystaniem spektroskopii UV-vis (Rys. 38 i 39). Obserwacja ta może wskazywać na tworzenie struktur dwuniciowych wraz z obniżaniem pH. Przy pH ok. 4,0 dochodzi do przesunięcia pasm absorpcyjnych w kierunku fal dłuższych (przesunięcie batochromowe). Efekt batochromowy występuje w przypadku cząsteczek charakteryzujących się obecnością wiązań podwójnych lub wolnych par elektronowych. Przy pH 3,0–2,5 dochodzi natomiast do wzrostu natężenia pasma absorpcji (Rys. 36, panel prawy), co wskazuje na proces rozplatania fragmentów dwuniciowych struktury DNAzymów pH-zależnych. Podwyższenie absorbancji jest wynikiem tego, że elektrony z aromatycznego pierścienia zasad nie są zaangażowane w oddziaływania warstwowe i stają się podatne na wzbudzenie UV. Przeprowadzone badania spektroskopowe (spektroskopia CD, UV-vis) wskazały, że w środowisku o pH 4,0–4,5 najprawdopodobniej dochodzi do istotnych rearanżacji w strukturze DNAzymów pH-zależnych i wówczas warianty te wykazują najwyższą aktywność katalityczną (Rys. 37–39). Aby potwierdzić zmiany w strukturze, w dalszych badaniach możnaby wyznaczyć przebieg temperaturowego topnienia wybranych DNAzymów pH-zależnych. Denaturacja cząsteczek DNA w wyniku działania wysokiej temperatury prowadzi do zniszczenia ich struktury drugo- i trzeciorzędowej. Procesowi temu towarzyszy zwiększenie pochłaniania światła w nadfiolecie – czyli efekt hiperchromowy. Wielkość tego efektu jest proporcjonalna do ilości nukleotydów znajdujących się w helikalnych fragmentach cząsteczki. Pod wpływem wzrostu temperatury struktury dupleksów DNA:DNA ulegają zniszczeniu i rozpadają się na pojedyncze nici. Monitorowanie przebiegu temperaturowego topnienia określonego DNAzemu w różnych warunkach pH pozwoliłoby scharakteryzować stabilność fragmentów helikalnych, jeśli takowe dany wariant posiada.

Otrzymane wyniki sugerują, że reakcja cięcia katalizowana przez DNAzemy pH-zależne zachodząca w optymalnym zakresie pH 4,0–4,5 przebiega dzięki protonacji wybranych grup funkcyjnych w obrębie centrum katalitycznego, a następnie zwinięcia cząsteczek i przyjęcia przez nie konformacji odpowiedniej dla katalizy. Właściwości biochemiczne otrzymanych DNAzymów pH-zależnych – aktywność w ściśle określonych warunkach pH przy braku konieczności wprowadzania jonów metali jako kofaktorów reakcji katalitycznego cięcia – na tle dotychczasowych informacji literaturowych wydają się być nietypowe i unikalne. Kontynuacja tych badań z zastosowaniem technik wysokorozdzielczych

typu spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego czy krystalografia rentgenowska, pozwoliłaby na szczegółowe określenie, w jaki sposób zmienia się struktura DNAzymów pH-zależnych podczas obniżania pH środowiska i jakie regiony zaangażowane są w tworzenie centrum katalitycznego. Takie informacje byłyby bardzo przydatne dla potencjalnego wykorzystania otrzymanych wariantów jako kaset przełącznikowych (stan ON/stan OFF) w konstrukcji biosensorów. Tego typu DNAzimy mogą być bardzo pomocnymi modułami strukturalnymi, gdyż można kontrolować ich aktywność przez zmianę pH środowiska.

4.4. DNAzimy Cd^{2+} -zależne

4.4.1. Warianty DNAzymu 8-17, czyli skutek „ewolucji w probówce”

Podczas drugiego eksperymentu selekcji *in vitro* wykorzystałam dwie biblioteki kombinatoryczne DNAzymów – jedną z 23-nukleotydowym, a drugą z 40-nukleotydowym regionem *random*. Po czterech cyklach selekcji nie udało się powielić biblioteki DNAzymów z dłuższym regionem *random*. Wiele doniesień literaturowych sugeruje, że biblioteki z długim regionem *random* ze względu na złożoność przyjmowanych struktur zapewniają otrzymanie wariantów o wysokiej aktywności katalitycznej [55]. Jednak Łęgiewicz i wsp. [179] badając wpływ użycia bibliotek kombinatorycznych o zróżnicowanej długości regionu *random* na wyniki selekcji aptamerów RNA wiążących izoleucynę, wykazali, że funkcjonalne motywy strukturalne mogą być uzyskane z wykorzystaniem biblioteki kombinatorycznej o krótkim regionie *random*. Poza tym, opisano w literaturze, że pomimo zastosowania dłuższych regionów *random*, liczących około 40-50 nukleotydów, w szeregu przypadkach otrzymywano DNAzimy posiadające stosunkowo proste motywy strukturalne, które decydowały o ich właściwościach katalitycznych [5–6, 57–58].

Kontynuowałam zatem selekcję wariantów z 23-nukleotydowym regionem *random* w bibliotece wyjściowej przez 10 cykli, przy zmieniającym się czasie inkubacji od 60 minut w pierwszym cyklu do 5 minut w dziesiątym cyklu, a także zmieniającym się stężeniu jonów Cd^{2+} z 1 mM do 100 μM . Proces selekcji zakończył się wzbogaceniem wyjściowej biblioteki w warianty o pożądanych właściwościach, tak że podczas 5 minutowej inkubacji w obecności 0,1 mM jonów Cd^{2+} ulegało przecięciu około 3% cząsteczek (Rys. 44). Wcześniej, Santoro i Joyce [6] przeprowadzili także 10 cykli selekcji i do etapu klonowania wykorzystali pule wariantów uzyskane po 8 i 10 cyklu, wykazujące najwyższy stopień przecięcia. Wśród DNAzymów, które otrzymali pojawiły się warianty o zróżnicowanej strukturze – wariant 17 z 8 cyklu posiadał charakterystyczną spinkę w obrębie regionu katalitycznego, zaś region

katalityczny wariantu 23 z 10 cyklu nie tworzył żadnych motywów strukturalnych. W związku z powyższymi doniesieniami, po przeprowadzonych 10 cyklach selekcji do etapu klonowania i sekwencjonowania wybrałam także dwie pule wariantów, uzyskane po 7 i 10 cyklu selekcji. Zidentyfikowane sekwencje klonów pogrupowałam w 5 rodzin na podstawie podobieństwa w obrębie regionu odpowiadającego regionowi *random* w bibliotece wyjściowej (Rys. 45). Co interesujące, zaobserwowałam, że warianty z grupy 1, 3 i 4 posiadają charakterystyczne motywy sekwencyjne w obrębie przypuszczalnego regionu katalitycznego, a mianowicie trójnukleotydomy motyw AGC oraz pięcionukleotydomy fragment o sekwencji ACGAA (Rys. 50). DNAzymy z tych rodzin wykazywały w obecności jonów metali dwuwartościowych wysoką aktywność katalityczną. Stopień przecięcia w obecności jonów Cd^{2+} był na poziomie 10–54%, natomiast w obecności mieszaniny jonów dwuwartościowych na poziomie 25%–80% (Rys. 45). Przy czym, co istotne, warianty z grupy 1 wykazywały zbliżony stopień przecięcia w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych (Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+}) i w obecności jonów Cd^{2+} , natomiast warianty z grupy 3 czy z grupy 4 ulegały przecięciu istotnie silniej w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych. Powyższe obserwacje wskazują, iż warianty z dwóch ostatnich rodziny są mniej wybiórcze w stosunku do jonów metali niż warianty z grupy 1. Zatem można przypuszczać, że motywy sekwencyjne AGC i ACGAA nie decydują o specyficzności wobec jonów metali, natomiast mogą decydować o aktywności katalitycznej. Warianty z rodziny 2 i 5, które nie posiadają wspomnianych motywów sekwencyjnych nie wykazywały aktywności, bądź stopień ich przecięcia w zastosowanych warunkach był tak niski, że nie udało się go zmierzyć (Rys. 45).

W toku kolejnych doświadczeń okazało się, że obecność motywów sekwencyjnych AGC i ACGAA nie była przypadkowa. W wyniku analizy *in silico* prawdopodobnej struktury drugorzędowej DNAzymu 1/VII, przeprowadzonej za pomocą programu *RNAstructure 5.6* [146], z uwzględnieniem danych eksperymentalnych z mapowania chemicznego siarczanem dimetylu i enzymatycznego nukleazą S1, otrzymałam cztery modele strukturalne DNAzymu 1/VII (Rys. 49). Trzy spośród wygenerowanych struktur posiadają w obrębie regionu katalitycznego motywy strukturalne charakterystyczne dla opisanego w literaturze DNAzymu 8-17 [6], a mianowicie motyw niedużej spinki z krótkim trzonem złożonym z trzech par zasad oraz trójnukleotydomą pętlą apikalną AGC oraz 5-nukleotydomy fragment jednoniciowy o sekwencji WCGAA (gdzie W: A lub T). Dodatkowo, wszystkie warianty posiadają cztery konserwatywne nukleotydy, mianowicie nukleotydy cytozynowy i guaninowy w obrębie wspomnianego 5-nukleotydomy fragmentu jednoniciowego oraz w obrębie pętli apikalnej

nukleotydy adeninowy i guaninowy [85, 95, 98–99]. Analiza *in silico* możliwych aranżacji struktury skróconych z końca 5' i 3' wariantów DNAzymów z rodziny 1 (Dz1/VIIWS), rodziny 3 (Dz15/XWS) oraz rodziny 4 (Dz5/XWS) wykazała, że wygenerowane struktury posiadają także motywy charakterystyczne dla DNAzymu 8-17 (Rys. 51). Podczas szeregu opisanych w literaturze selekcji *in vitro*, kilka niezależnych grup badawczych również otrzymało warianty typu 8-17 pomimo, że warunki selekcji były zróżnicowane, zarówno pod względem długości oligonukleotydów tworzących wyjściową pulę wariantów, jak również wykorzystania różnych czynników selekcyjnych np. kofaktorem reakcji były jony Ca^{2+} [98], jony Zn^{2+} [57], mieszanina jonów $\text{Cu}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ [164] czy związki niskocząsteczkowe np. histydyna [76–77]. Otrzymanie wariantów DNAzymu 8-17 podczas szeregu niezależnych selekcji, prowadzonych w zróżnicowanych warunkach, jest niezwykle przykładowym przykładem ewolucji konwergentnej. Zjawisko powtórnego występowania katalitycznych kwasów nukleinowych podczas prowadzonych selekcji zostało odnotowane również dla rybozymów. Dla przykładu, rybozym *hammerhead* odkryty jako samozwijający się fragment genomowego RNA roślinnych wiroidów i wirusoidów [180], występujący naturalnie, jak się później okazało, także w wielu organizmach nie tylko roślinnych, np. u płazów czy świerszczy [181–182] został otrzymany na drodze selekcji *in vitro* w trzech niezależnych eksperymentach [183–185]. Innym przykładem jest występowanie kluczowych dla zachowania aktywności katalitycznej nukleotydów w przypadku syntetycznych wariantów rybozymów ligujących klasy I, pochodzących z trzynastu odrębnych selekcji [186]. Powyższe wyniki i obserwacje sugerują, że otrzymywanie określonych motywów katalitycznych wariantów sekwencyjnych DNAzymów i rybozymów w szeregu prowadzonych niezależnie procesach selekcji *in vitro* jest dosyć często odnotowywanym zjawiskiem.

Santoro i Joyce [6] otrzymali DNAzym 8-17 z wykorzystaniem biblioteki kombinatorycznej z 50-nukleotydowym regionem *random*, a miejsce katalitycznego cięcia stanowił 12-nukleotydowy fragment RNA. W większości prowadzonych eksperymentów selekcji *in vitro*, w wyniku których otrzymano motywy 8-17, wykorzystano nie w pełni reprezentatywne biblioteki kombinatoryczne, posiadające długie regiony *random*. W przeprowadzonym przez mnie eksperymencie selekcji do konstrukcji biblioteki kombinatorycznej wybrana została strategia, w której możliwe było uzyskanie wszystkich możliwych wariantów w wyjściowej puli cząsteczek. Krótki, 23-nukleotydowy region *random* odpowiadał ok. $0,7 \times 10^{13}$ różnych cząsteczek DNA i zlokalizowany był naprzeciw pojedynczego wiązania fosfodiesterowego typu rybo, będącego miejscem katalitycznego cięcia, a z obydwu stron ograniczony był segmentami dwuniciowymi DNA. Pomimo

istotnych różnic pomiędzy strategią dotyczącą konstrukcji wyjściowej biblioteki kombinatorycznej zaproponowaną przez Santoro i Joyce [6], a strategią wybraną przeze mnie do uzyskania DNAzymów Cd^{2+} -zależnych, jak również pomimo wyraźnych różnic dotyczących procedury selekcji (wariant 8-17: MgCl_2 , 1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 37°C; wariant Cd^{2+} -zależny 1/VII: CdCl_2 , 100 mM NaCl, 50 mM HEPES-NaOH, pH 7,0, 25°C) w jej wyniku otrzymałam warianty DNAzymu 8-17. Wydaje się zatem, że tylko warianty typu 8-17 były zdolne do spełnienia wymaganych kryteriów selekcji. Przy czym żaden wariant nie wykazywał podobieństwa do DNAzymu typu 10-23 [6, 80, 90]. Również w kilku innych eksperymentach selekcji, w wyniku których otrzymano warianty DNAzymu 8-17, nie odnotowano obecności wariantów DNAzymu 10-23. Jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę taką samą długość regionów katalitycznych obu DNAzymów. Jest prawdopodobne, iż DNAzym 10-23 jest zdolny tylko do przecinania substratu jakim jest cząsteczka RNA, zaś DNAzym 8-17 może przecinać substrat w postaci łańcucha RNA, jak i substrat DNA z pojedynczym wiązaniem typu rybo (DNA/RNA) [94].

Co zatem jest przyczyną, iż w wyniku szeregu przeprowadzonych selekcji *in vitro* generowane są kolejne warianty DNAzymu 8-17? Wiele grup badawczych spekuluje, że istnieje kilka czynników mających na to wpływ, między innymi: 1/ mały rozmiar – centrum katalityczne stanowi 15-nukleotydowy fragment, w związku z tym występowanie zróżnicowanych motywów strukturalnych w jego obrębie jest mało prawdopodobne 2/ unikalne cechy strukturalne pozwalające na odpowiednie ustawienie, ułożenie grup funkcjonalnych w miejscu wiązania jonu metalu oraz 3/ powszechnie wykorzystywana strategia rozdziału cząsteczek aktywnych od nieaktywnych na kolumnach, stosowana podczas eksperymentów selekcji *in vitro* [85]. Wydaje się jednak, że sam sposób separacji oligonukleotydów aktywnych katalitycznie od nieaktywnych na drodze chromatografii powinowactwa z udziałem kompleksu streptawidyna–biotyna [5–7, 57] nie ma wpływu na otrzymywanie w wyniku selekcji wariantów DNAzymu 8-17. W swoich eksperymentach, podobnie jak Cruz i wsp. [94], do rozdziału wariantów aktywnych i nieaktywnych wykorzystywałam elektroforezę w denaturującym żelu poliakryloamidowym, a mimo to otrzymałam warianty Cd^{2+} -zależne DNAzymu 8-17. Można zatem spekulować, że najistotniejszym czynnikiem powodującym izolowanie wariantów typu 8-17 z określonej puli cząsteczek jest mały rozmiar regionu katalitycznego oraz duża zmienność jego sekwencji – tylko cztery nukleotydy są wysoce konserwatywne i niezbędne do osiągnięcia aktywności katalitycznej [85, 91, 100].

4.4.2. Jony metali dwuwartościowych, a aktywność katalityczna DNAzymów

Kwasy nukleinowe są biopolimerami, których łańcuch fosfo-cukrowy obdarzony jest ujemnym ładunkiem elektrycznym, stąd kationy metali biorą udział w stabilizacji funkcjonalnej konformacji cząsteczki DNA czy RNA. Większość katalitycznych kwasów nukleinowych do swojej aktywności wymaga obecności jonów metali. Wiązanie się jonów metali jest konieczne do zwinięcia cząsteczki i przyjęcia katalitycznie aktywnej konformacji. Ponadto, niektóre jony metali dwuwartościowych prawdopodobnie bezpośrednio uczestniczą w reakcjach katalizy [14, 187]. Spekuluje się także, że jony metali wpływają na przyjmowaną strukturę trzeciorzędową DNAzymów czy rybozymów. W przeciwieństwie do enzymów białkowych czy rybozymów, stosunkowo niewiele wiadomo na temat czynników decydujących o selektywności DNAzymów wobec jonów metali. Jest to związane z brakiem informacji na temat struktury trzeciorzędowej tych cząsteczek w katalitycznie aktywnej konformacji [188]. Jedynie Plashkevych i Chattopadhyaya [189] w oparciu o wyniki badań dotyczących mapowania funkcjonalnych grup fosforanowych w regionie katalitycznym DNAzemu 10-23, prowadzonych przez Nawrot i wsp. [93], przeprowadzili symulacje komputerowe struktury DNAzemu 10-23 i uzyskali model cząsteczki w katalitycznie aktywnej konformacji.

DNAzemy, które otrzymałam, są wariantami metalozależnymi, które najwyższą aktywność wykazują w obecności jonów Cd^{2+} , niższą w obecności jonów Co^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} , natomiast w obecności jonów Mg^{2+} i Sr^{2+} są praktycznie nieaktywne (Rys. 46). Reakcja przecinania się DNAzemu 1/VII przebiegała najszybciej w obecności $100 \mu\text{M}$ jonów Cd^{2+} . Obniżenie stężenia tych jonów do $50 \mu\text{M}$ powodowało ponad 50% spadek stałej szybkości reakcji cięcia k_{obs} do ok. $0,004 \text{ min}^{-1}$. W obecności $50 \mu\text{M}$ jonów Mn^{2+} , Zn^{2+} oraz Co^{2+} stałe k_{obs} były odpowiednio o 15%, 40% i 60% niższe niż w obecności $50 \mu\text{M}$ jonów Cd^{2+} (Rys. 47). Usunięcie 19 nukleotydów z końca 5' oraz 3' skutkowało obniżeniem stopnia przecięcia DNAzemu 1/VII. Po 30 minutach inkubacji w obecności $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} wyniósł on 9%, podczas gdy dla wariantu pełnej długości był na poziomie 27% (Rys. 46 i 52). Nelson i wsp. [188] wskazali na istotną rolę w reakcji katalizy elementów dystalnych tj. końca 5' i 3' cząsteczki DNAzemu aktywnego w obecności jonów Co^{2+} . Po ich usunięciu nastąpiła zmiana preferencji wobec jonów metali – stała szybkości dla reakcji prowadzonej w obecności jonów Co^{2+} była prawie dwukrotnie niższa niż dla jonów Zn^{2+} . W przypadku DNAzemu 1/VII 19-nukleotydowe fragmenty końca 5' i 3' nie są wymagane do reakcji katalizy. Mimo, iż stopień przecięcia skróconego wariantu Dz1/VIIWS mierzony po 30 minutach trwania reakcji był 3-krotnie niższy od stopnia przecięcia pełnej długości DNAzemu, to jednak wyznaczone

wartości stałych k_{obs} wykazały, że skrócenie DNAzemu 1/VII z obu końców nie obniżyło szybkości reakcji – w obecności $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ stała k_{obs} dla wariantu skróconego była 4-krotnie wyższa niż dla DNAzemu pełnej długości. Co więcej, wariant skrócony wykazywał niższe powinowactwo do jonów Zn^{2+} , gdyż po usunięciu dystalnych elementów sekwencji wartość stałej k_{obs} uległa obniżeniu prawie o 40% (Rys. 47 i 54).

Inne warianty, skrócone o 19 nukleotydów z końca 3' i 5' – Dz5/XWS, Dz15/XWS, o zróżnicowanym składzie nukleotydowym w obrębie trzonu spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą typu AGC, zaangażowanej w tworzenie struktury regionu katalitycznego, nie są wysoce selektywne wobec jonów metali dwuwartościowych, podobnie jak wariant 1/VIIWS. Badane warianty są aktywne nie tylko w obecności jonów Cd^{2+} , ale także Zn^{2+} i Mn^{2+} w temperaturze 25°C (Rys. 54), co sugeruje, że tworzenie kompleksu jon–DNAzem nie wymaga wysoce specyficznego sposobu koordynacji jonu. Co ciekawe, gdy reakcja prowadzona była w temperaturze 37°C nastąpił znaczący spadek aktywności wariantów Dz1/VIIWS, Dz5/XWS, Dz15/XWS, doszło także do zmiany preferencji DNAzemu 15/XWS wobec jonów metali – wariant ten wykazywał wyższą aktywność w obecności jonów Mn^{2+} niż w obecności jonów Zn^{2+} (Rys. 54).

Wydaje się, że w przypadku DNAzymów optimum temperatury działania zależy od temperatury stosowanej podczas ich selekcji. Selekcja DNAzymów Mg^{2+} -zależnych przeprowadzona w temperaturze 37°C doprowadziła do otrzymania dwóch klas DNAzymów: 10-23 oraz 8-17 najbardziej aktywnych w temperaturze 37°C [6]. Natomiast selekcje przeprowadzone w temperaturze pokojowej, DNAzymów o aktywności fosfoesterazy [5] czy też opisanych w tej dysertacji Cd^{2+} -zależnych, pozwoliły na otrzymanie DNAzymów aktywnych w temperaturze pokojowej. Można sądzić, że nieoczekiwany efekt niższej aktywności badanych przez mnie DNAzymów w temperaturze 37°C może być związany ze zmianami w ich strukturze drugorzędowej, a co za tym idzie przyjęciem konformacji katalitycznie nieaktywnej. Ponadto, jest prawdopodobne, że różne warianty wykazują zróżnicowane powinowactwo wobec jonów metali bądź jony metali wiążą się z DNAzymami bardziej lub mniej poprawnie, co wpływa na efektywność reakcji cięcia.

Większość dotychczas otrzymanych wariantów DNAzemu 8-17 wykazuje szerokie spektrum tolerancji w stosunku do jonów metali dwuwartościowych jako kofaktorów reakcji katalitycznego cięcia. Wariant 17E najszybciej katalizuje reakcję cięcia w obecności jonów Zn^{2+} , aczkolwiek aktywność katalityczną wykazuje także w obecności innych jonów metali: $\text{Mn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ba}^{2+}$ [57]. DNAzem Mg5 otrzymany na drodze selekcji *in vitro* prowadzonej w obecności jonów Mg^{2+} oraz histydyny, wykazuje

znacznie wyższy stopień przecięcia w obecności jonów Ca^{2+} czy Mn^{2+} [98–99]. Jony metali przejściowych są znacznie częściej kofaktorami reakcji cięcia wariantów DNAzemu 8-17 niż jony metali ziem alkalicznych. Na zróżnicowane preferencje i powinowactwo wobec tych jonów wpływać może odmienna długość promienia jonowego, geometria cząsteczki jonu czy schemat koordynacyjny [57]. Otrzymane w toku realizacji tej pracy DNAzemy metalozależne, zarówno pełnej długości jak i skrócone z końca 5' i 3', są praktycznie nieaktywne w obecności jonów Mg^{2+} , Sr^{2+} i nieznacznie aktywne w obecności jonów Ca^{2+} czy Ni^{2+} (Rys. 52). Otrzymane przez innych badaczy warianty DNAzemu 8-17 przecinające substrat z pojedynczym wiązaniem typu rybo są aktywne w obecności jonów Mn^{2+} , Co^{2+} czy Zn^{2+} , natomiast nie wykazują aktywności w obecności jonów Mg^{2+} czy Ca^{2+} . Z kolei, substrat zawierający fragment nici RNA ulega wydajnemu przecięciu zarówno w obecności jonów Mg^{2+} czy Mn^{2+} [64]. Większe powinowactwo w stosunku do jonów metali przejściowych, takich jak np. jony Mn^{2+} niż do jonów Mg^{2+} czy Ca^{2+} wykazują także DNAzym 10-23 [80], rybozym *hammerhead* [190–191] czy rybozym HDV [192].

4.4.3. Zmiany w poziomie aktywności katalitycznej DNAzymów, czyli konsekwencje ukierunkowanej mutagenezy

Jak dotąd, DNAzemy katalizujące reakcję cięcia RNA są najlepiej poznanymi spośród katalitycznych cząsteczek DNA. Wiele grup badawczych koncentrowało się na szczegółowej analizie funkcji jaką pełnią poszczególne jednostki nukleotydowe w domenie katalitycznej DNAzemu 8-17 w kontekście oddziaływań z jonami metali, a także zwinięcia cząsteczki i przyjęcia przez nią konformacji aktywnej katalitycznie [86–87, 95, 101, 156]. Zastosowanie metody ukierunkowanej mutagenezy pozwoliło wskazać nukleotydy, które są wysoce konserwatywne. Kluczową rolę dla aktywności odgrywają cztery nukleotydy, mianowicie nukleotydy C13 i G14 w obrębie 5-nukleotydowego fragmentu jednoniciowego oraz w obrębie pętli apikalnej AGC nukleotydy A6 i G7 (Rys. 7 i 50) [85, 91, 94–95]. Sugeruje się, że zasady azotowe nukleotydów w wyżej wymienionych pozycjach cząsteczki DNAzemu 8-17 biorą udział w formowaniu centrum katalitycznego oraz mogą bezpośrednio uczestniczyć w mechanizmie katalizy [32, 100]. Pozostałe jednostki nukleotydowe regionu katalitycznego nie są wysoce zachowawcze i nie mają fundamentalnego znaczenia dla aktywności katalitycznej DNAzemu [85, 95].

DNAzemy Cd^{2+} -zależne, które otrzymałam w wyniku przeprowadzonego procesu selekcji *in vitro* posiadają charakterystyczne dla wariantów DNAzemu 8-17 motywy

strukturalne w obrębie regionu katalitycznego, z uwzględnieniem czterech konstytutywnych nukleotydów (A6, G7, C13 i G14). Podczas doświadczeń prowadzonych przy wykorzystaniu ukierunkowanej mutagenyzy skupiłam się przede wszystkim na tych elementach regionu katalitycznego, którymi otrzymane przeze mnie warianty różniły się od innych wcześniej wygenerowanych wariantów DNAzemu 8-17. Były to: nukleotyd adenozynowy w pozycji 12 oraz tworzące pary Watsona-Cricka nukleotydy trzonu spinki zakończonej trójnukleotydom pętlą apikalną AGC (Rys. 57).

Okazało się, że obecność zasady purynowej w pozycji 12 jest konieczna do zachowania aktywności katalitycznej DNAzemu 1/VII skróconego z końca 5' i 3' (Dz1/VIIWS). Podstawienie w tej pozycji zasady pirymidynowej, tyminy lub cytozyny skutkowało dużym spadkiem aktywności katalitycznej. Po 30 minutach inkubacji mutanty Dz1/VIIWS_12C oraz Dz1/VIIWS_12T wykazywały w obecności jonów Cd^{2+} , odpowiednio 10-krotny i 14-krotny spadek aktywności. Natomiast wprowadzenie w tą pozycję reszty guaniny skutkowało tylko 1,7-krotnym spadkiem aktywności w obecności 50 μM jonów Cd^{2+} (Rys. 57A). Można przypuszczać, że zarówno stopień protonacji puryn, ich budowa, struktura, jak i siła tworzonych przy ich udziale wiązań, wpływają na przyjęcie przez DNAzemy aktywnej katalitycznie konformacji. Być może obecność puryn pozwala na lepsze związanie jonów metali z grupami funkcyjnymi tworzącymi kieszeń katalityczną.

Wang i wsp. [100] wykazali, że nukleotyd w pozycji 12 może pełnić dwie funkcje istotne dla zachowania aktywności katalitycznej DNAzemu. Po pierwsze, może działać jako swego rodzaju „stabilizator”, który zapewnia odpowiednie usytuowanie konserwatywnego nukleotydu C13 odpowiedzialnego za zachowanie aktywności DNAzemu. Delecja nukleotydu w pozycji 12 może wpływać na sieć wiązań wodorowych czy oddziaływania warstwowe, co z kolei skutkuje zmianami w ułożeniu C13 w centrum katalitycznym i spadkiem bądź utratą aktywności. Po drugie, może pełnić funkcję elementu „chaperonowego”, który jest istotny dla odpowiedniego zwinięcia DNAzemu w formę aktywną katalitycznie.

Wcześniejsze badania dotyczące DNAzemu 8-17 wykazały, że zastąpienie reszty tyminy w pozycji 12 inną zasadą azotową skutkowało spadkiem aktywności katalitycznej w obecności jonów Mg^{2+} , Ca^{2+} i Mn^{2+} , przy czym wprowadzenie cytozyny powodowało, iż aktywność katalityczna uległa zmniejszeniu w najniższym stopniu podczas reakcji cięcia prowadzonej w obecności jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Natomiast wprowadzenie adeniny i guaniny powodowało, iż aktywność najmniej spadła podczas reakcji cięcia prowadzonej w obecności jonów Mn^{2+} [99]. W innych doświadczeniach poziom aktywności katalitycznej DNAzemu

Zn²⁺-zależnego uległ 8-krotnemu spadkowi kiedy w pozycji 12 zamiast tyminy podstawiono adeninę. Co ciekawe, wprowadzenie adeniny z jednoczesną zmianą trzech par zasad tworzących trzon spinki (pozycje 3–5 oraz 9–11) skutkowało obniżeniem aktywności DNAzemu jedynie o 25% [85]. Możemy zatem przypuszczać, że zarówno nukleotydy budujące trzon spinki, a także nukleotyd w pozycji 12 mogą brać razem udział w wyznaczaniu preferencji wariantów DNAzemu 8-17 w stosunku do jonów metali, a również w pewnym stopniu wpływać na ich aktywność katalityczną.

Mutageneza nukleotydów w obrębie drugiej pary zasad trzonu spinki obecnej w regionie katalitycznym wariantu Dz1/VIIWS oraz wariantu Dz5/XWS potwierdziła, że trzon spinki może wpływać na aktywność katalityczną obydwu DNAzymów oraz ich preferencje wobec jonów metali. Wariant Dz1/VIIWS z mutacją A4C/T10G wykazywał zbliżony stopień przecięcia do wariantu typu dzikiego w obecności jonów Cd²⁺ oraz ponad 3-krotnie niższy i o 75% wyższy stopień przecięcia w obecności odpowiednio jonów Mn²⁺ i Zn²⁺ (Rys. 57A). Natomiast poziom aktywności katalitycznej wariantu Dz5/XWS z mutacją T4C/A10G w obecności jonów Cd²⁺, Zn²⁺ oraz Mn²⁺ był około 5-krotnie niższy w stosunku do aktywności Dz5/XWS typu dzikiego (Rys. 57B). Zatem obecność środkowej pary zasad trzonu C4-G10 nie zwiększa aktywności katalitycznej badanych wariantów, jak sugerowano wcześniej. Peracchi i wsp. [99] stwierdzili, że wszystkie warianty posiadające środkową parę zasad inną niż kanoniczna para C4-G10, wykazują istotnie niższą aktywność katalityczną. Ponadto, ilość par zasad typu C-G w obrębie trzonu spinki nie decyduje o właściwościach katalitycznych otrzymanych przez mnie wariantów DNAzymów skróconych z końca 5' i 3'. Cruz i wsp. [94], wykazali iż warianty 8-17 nie posiadające w obrębie trzonu spinki par typu C-G posiadają właściwości katalityczne. Co więcej, również warianty posiadające wybrzuszenie czy niesparowanie w trzonie spinki pozostają aktywne. Co ciekawe, wariant Dz24/XWS z grupy 3 ze spinką zakończoną pięcionukleotydową pętlą, czyli posiadający trzon zbudowany z dwóch par zasad, nie przejawiał aktywności katalitycznej (Rys. 51).

Wydaje się że, trzon spinki złożony z trzech par zasad, usytuowany w obrębie regionu katalitycznego DNAzemu może uczestniczyć w wiązaniu jonu metalu, a także może być zaangażowany w tworzenie oddziaływań dalekiego zasięgu, które istotne są dla przyjęcia przez DNAzym odpowiedniej struktury decydującej o jego właściwościach katalitycznych.

W toku doświadczeń mających na celu otrzymanie DNAzemu 1/VIIWS działającego w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*), zaobserwowałam, że charakterystyczna dla wszystkich otrzymanych przez mnie wariantów pętla typu GNRC (N-dowolny nukleotyd, R-puryna), (Rys. 49 i 51) jest niezbędna do zachowania aktywności katalitycznej. Większość

opisywanych w literaturze DNAzymów działa w układzie dwucząsteczkowym. Warianty dwucząsteczkowe, które zaprojektowałam poprzez przecięcie pętli GNRC nie wykazywały właściwości katalitycznych (Rys. 59 i 60). Nelson i wsp. [188] stwierdzili, iż odcięcie pętli łączącej nic substratu z nicią DNAzymu istotnie wpłynęło na obniżenie selektywności DNAzymu aktywnego w obecności jonów Co^{2+} . Można przypuszczać, że w wyniku odcięcia pętli dochodzi do zablokowania formowania się charakterystycznych dla danych jonów metali kieszeni wiążących, obecnych gdy DNAzym działa w układzie jednocząsteczkowym. W ramach kontynuacji badań zmierzających do otrzymania DNAzymu działającego w układzie *in trans* można pokusić się o wprowadzenie modyfikacji w postaci nukleotydów 2'-O-metylowanych bądź nukleotydów LNA (ang. *locked nucleic acid*) w obrębie nukleotydów ramion wiążących substrat [117, 193].

Zbadano także aktywność katalityczną DNAzymu 1/VIIWS z modyfikacją w postaci grupy tiofosforanowej w miejscu cięcia. Ponieważ szereg jonów metali dwuwartościowych, w tym jony Cd^{2+} , wykazuje silne powinowactwo do ligandów zawierających siarkę, niewiązący atom tlenu grupy fosforanowej w miejscu cięcia katalitycznego zastąpiono atomem siarki. Nawrot i wsp. [93] zbadali aktywność DNAzymu 10-23 wprowadzając w poszczególne pozycje grupy tiofosforanowe, przy czym obecność tiofosforanu w pozycjach P1, P8 i P15 zwiększała aktywność DNAzymu. Huang i Liu [157] wykazali, że grupa tiofosforanowa w miejscu cięcia DNAzymu Ce13d zmieniła preferencje wobec jonów metali, z jonów lantanowców - ceru na jony kadmu czy rtęci. Podobne zjawisko zaobserwowano dla rybozomu *hammerhead* [194] czy rybozomu HDV [195] – modyfikacja w postaci grupy tiofosforanowej inhibowała aktywność katalityczną w obecności jonów Mg^{2+} , którą odzyskiwano wobec jonów tiofilowych (tzw. *rescue effect*). Natomiast inny DNAzym aktywny w obecności jonów lantanowców, takich jak: tul, erb czy holm po wprowadzeniu grupy tiofosforanowej w miejsce cięcia tracił właściwości katalityczne w obecności lantanowców, których nie odzyskiwał wobec jonów tiofilowych [196]. Wprowadzenie grupy tiofosforanowej w miejsce cięcia katalitycznego otrzymanego przeze mnie DNAzymu 1/VIIWS nie wpłynęło znacząco na jego właściwości katalityczne w obecności 50 μM stężenia jonów Cd^{2+} , ale istotnie obniżyło aktywność w obecności jonów Zn^{2+} i Mn^{2+} (Rys. 52A i 58). Co więcej, wariant z grupą tiofosforanową, w przeciwieństwie do DNAzymu bez modyfikacji, wykazywał wyższy stopień przecięcia w obecności jonów Zn^{2+} niż Mn^{2+} . Podobne zjawisko zaobserwowano dla DNAzymu Zn^{2+} -zależnego – modyfikacja w postaci grupy tiofosforanowej w miejscu cięcia powodowała istotny spadek jego aktywności katalitycznej [157]. Natomiast po wprowadzeniu nukleotydów z modyfikacją w postaci grupy

tiofosforanowej w obrębie sekwencji ramion wiążących substrat odnotowano spadek aktywności katalitycznej DNAzemu 10-23, tłumacząc to obniżeniem jego powinowactwa w stosunku do cząsteczki substratu [117].

5. Podsumowanie

Przystępując do realizacji niniejszej pracy postanowiłam otrzymać DNAzyny aktywne w obecności jonów Cd^{2+} . Do tego celu wykorzystałam chemicznie zsyntetyzowaną bibliotekę kombinatoryczną wariantów DNAzymów z 23-nukleotydowym odcinkiem typu *random* oraz metodę selekcji *in vitro*. Nieoczekiwanie, w wyniku pierwszej selekcji otrzymałam warianty sekwencyjne DNAzymów aktywnych w niskim pH środowiska, z optimum działania przy pH 4,0–4,5. Eksperymenty selekcji *in vitro* związane są zawsze z ryzykiem, że nie otrzymamy wariantów o pożądanych właściwościach. Do takiego wyniku selekcji mogły przyczynić się dwa czynniki: 1/ w zastosowanych warunkach selekcji 23-nukleotydowy region *random* w wyjściowej bibliotece kombinatorycznej mógł być za krótki do utworzenia centrum katalitycznego zależnego od wiązania jonów Cd^{2+} oraz 2/ procedura selekcji ze standardowym etapem strącania DNA w pH 5,2, obniżonym w stosunku do pH 7,0 podczas selekcji wariantów, mogła spowodować, że w konsekwencji otrzymałam DNAzyny „pH-zależne”. Po zmodyfikowaniu procedury selekcji, w kolejnym eksperymencie otrzymałam DNAzyny aktywne w obecności jonów Cd^{2+} . Z uwagi na interesujące właściwości, wybrane DNAzyny z obu eksperymentów selekcji poddałam szczegółowym badaniom.

5.1. DNAzyny pH-zależne

W wyniku przeprowadzonych 11 cykli selekcji *in vitro*, klonowania wzbogaconej biblioteki i sekwencjonowania wybranych klonów uzyskano 46 wariantów DNAzymów, które zostały pogrupowane w 4 rodziny na podstawie podobieństwa motywów sekwencyjnych w regionie odpowiadającym regionowi *random* w bibliotece wyjściowej. Zaskakujące było pojawienie się w tym regionie motywów sekwencji złożonych powtarzających się z dwóch, trzech i czterech tych samych nukleotydów.

Przeprowadzone testy aktywności katalitycznej wykazały, że otrzymano DNAzyny, które aktywowane są w wyniku obniżenia pH środowiska. Określono profil pH sześciu wybranych wariantów DNAzymów, będących przedstawicielami czterech uzyskanych rodzin. Otrzymane DNAzyny wykazywały najwyższy stopień przecięcia w pH mieszczącym się w zakresie 4,0–4,5, natomiast w pH bliskim 6,0–7,0 były nieaktywne. Z sześciu testowanych DNAzymów

dwa warianty: Dz15 oraz Dz27 wykazywały najwyższą aktywność katalityczną, odpowiednio w pH 4,5 oraz 4,0.

Zbadano wpływ wybranych jonów metali: Cd^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ oraz K^+ na właściwości katalityczne dwóch DNAzymów pH-zależnych: Dz15 oraz Dz27. Stwierdzono, że do aktywności katalitycznej nie wymagają one obecności jonów metali, w przeciwieństwie do znanych z literatury DNAzymów 8-17, 10-23 czy pH6DZ1. Oznacza to, że w tym przypadku jony metali nie biorą bezpośredniego udziału w reakcji cięcia RNA. DNAzym #15 w buforze o pH 4,5 uległ 50% przecięciu, natomiast DNAzym #27 w buforze o pH 4,0 uległ 80% przecięciu bez udziału jonów metali.

Wykazano, iż odcięcie 19 nukleotydowych fragmentów z końca 5', jak i z końca 3' DNAzymów #15 i #27 nie pogorszyło ich właściwości katalitycznych. Stopień przecięcia skróconego DNAzmu #15 w pH 4,0–4,5 uległ zwiększeniu w stosunku do cząsteczki o pełnej długości, natomiast stopień przecięcia skróconego DNAzmu #27 nieznacznie spadł w pH 4,0 oraz nieznacznie wzrósł w pH 4,5. Zatem skrócone warianty DNAzymów pH-zależnych są aktywne katalitycznie i wykazują optimum działania w zakresie pH 4,0–4,5. Wariant Dz27WS, jako przedstawiciel grupy I wariantów otrzymanych w procesie selekcji, wykazywał istotnie wyższą aktywność katalityczną w stosunku do wariantu Dz15WS, będącego przedstawicielem grupy IV. Stałe szybkości reakcji cięcia (k_{obs}) wariantu Dz27WS, w zależności od temperatury reakcji, były 3- i 5-krotnie wyższe.

Określono strukturę drugorzędową wybranych DNAzymów z wykorzystaniem mapowania nukleazą S1 i siarczanem dimetylu oraz programu do przewidywania struktur drugorzędowych *RNAstructure* 5.6. Region katalityczny DNAzmu #15 nie posiada wyodrębnionych żadnych motywów strukturalnych i przypomina region katalityczny powszechnie znanego DNAzmu 10-23, natomiast w przypadku DNAzmu #27 w obrębie tego regionu tworzy się motyw strukturalny typu spinki z dużą pętlą 14-nukleotydową bądź spinki z pętlą 6-nukleotydową. W przypadku DNAzymów działających w niskim pH środowiska jest wielce prawdopodobne, że tworzą się nietypowe pary zasad z protonowaną resztą cytozyny np. pary $\text{C}^+\cdot\text{C}$ czy $\text{C}^+\cdot\text{CG}$ bądź protonowaną resztą adeniny $\text{A}^+\cdot\text{A}^+$.

Przeprowadzono badania spektroskopowe (techniką CD i UV-vis), które wykazały, że w środowisku o pH 3,5–5,0 natężenie absorpcji światła dla wariantów Dz15WS-dA oraz

Dz27WS-dA spada. Największy spadek intensywności pasm absorpcyjnych odnotowano w zakresie pH 4,0–4,5. Otrzymane wyniki sugerują, że w środowisku o pH 4,0–4,5 dochodzi do protonacji wybranych grup funkcyjnych w obrębie sekwencji tworzącej centrum katalityczne, a następnie zwinięcia cząsteczek DNAzymów i przyjęcia konformacji umożliwiającej katalizę reakcji cięcia.

Możliwy mechanizm katalizy zakłada, że w wyniku obniżenia pH dochodzi do protonacji wybranych grup funkcyjnych w obrębie sekwencji tworzącej centrum katalityczne. W kwaśnym pH środowiska potencjalnymi akceptorami protonu w cząsteczce DNAzymów są atomy azotu adenozyne i cytydyny odpowiednio N1 i N3. Co ciekawe, wartość pKa dla N1 adenozyne wynosi 3,5, zaś dla N3 cytydyny 4,2 i przypadają one w zakresie pH w jakim warianty pH-zależne wykazują najwyższy stopień przecięcia. Jest zatem wielce prawdopodobne, że to zasady azotowe łańcucha fosfo-cukrowego deoksyrybozymów ulegając protonacji, odgrywają zarówno rolę strukturalną, jak i katalityczną.

Zaprojektowano, ważne z punktu widzenia praktycznych zastosowań, warianty DNAzymów pH-zależnych działające w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*). Oligonukleotydowy substrat ulegał 70–80% przecięciu w obecności DNAzymu 15WS *trans* i niespełna 10% przecięciu w obecności DNAzymu 27WS *trans* w pH 4,0–4,5.

Otrzymane podczas realizacji niniejszej pracy DNAzimy pH-zależne, w odróżnieniu od opisanych wcześniej w literaturze, posiadają zdolność prowadzenia katalizy bez udziału jonów metali. Z tego względu, mogą być szczególnie użyteczne w konstrukcji narzędzi molekularnych wykorzystywanych w biologii i biotechnologii. W szczególności, DNAzym mógłby zostać użyty jako moduł strukturalny – kasetę przełącznikową (stan ON/stan OFF), w konstrukcji biosensorów służących do detekcji jonów metali. Biosensor taki można by „włączać” bądź „wyłączać” w kontrolowanych warunkach pH, a kasetę przełącznikową działałaby niezależnie od innych elementów biosensora.

5.2. DNAzimy Cd²⁺-zależne

Eksperyment selekcji *in vitro* DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd²⁺ prowadzony przez 10 cykli zakończył się wzbogaceniem wyjściowej biblioteki z 23-nukleotydowym regionem *random* w warianty o pożądanym właściwościach. W obecności 0,1 mM jonów

Cd^{2+} ulegało przecięciu 3–5% cząsteczek biblioteki w czasie od 5 minut do 1 minut, w cyklach selekcji VII–X. Po etapie klonowania i sekwencjonowania otrzymano 49 DNAzymów, które zostały pogrupowane w 5 rodzin na podstawie podobieństw w ich sekwencji nukleotydowej.

Zbadano aktywność katalityczną jedenastu wybranych DNAzymów stwierdzając, że wysoką aktywność katalityczną wykazują w obecności jonów Cd^{2+} , chociaż są także aktywne w obecności jonów Co^{2+} , Mn^{2+} czy Zn^{2+} . Można zatem sądzić, że tworzenie kompleksu jon – DNAzym nie wymaga wysoce specyficznego sposobu koordynacji jonu metalu. Otrzymane DNAzomy metalozależne, zarówno pełnej długości jak i skrócone z końca 5' i 3', były praktycznie nieaktywne w obecności jonów Mg^{2+} , Sr^{2+} i nieznacznie aktywne w obecności jonów Ca^{2+} czy Ni^{2+} . Spośród sześciu wariantów DNAzymów skonstruowanych w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*) żaden nie wykazywał aktywności katalitycznej.

Wysoką aktywność katalityczną warianty: Dz1/VIIWS, Dz5/XWS oraz Dz15/XWS wykazywały w temperaturze 25°C, co może być związane z odpowiednim zwinięciem cząsteczek w katalitycznie aktywną konformację. W temperaturze 37°C obserwowano znaczący spadek aktywności, a także zmianę preferencji DNAzymów wobec jonów metali. Badane DNAzomy w temperaturze 37°C katalizowały reakcję cięcia w obecności jonów Zn^{2+} , Mn^{2+} czy Cd^{2+} od 5 do 15-razy wolniej, w porównaniu do reakcji w temperaturze 25°C. Uogólniając, wydaje się, że w przypadku DNAzymów optimum temperatury ich działania zależy od temperatury stosowanej podczas ich otrzymywania w procesie selekcji *in vitro*.

Określono strukturę drugorzędową DNAzymu 1/VII z wykorzystaniem mapowania nukleazą S1 i siarczanem dimetylu oraz programu komputerowego do przewidywania struktur drugorzędowych *RNAstructure* 5.6. Na podstawie uzyskanych wyników, a także porównania sekwencji wszystkich otrzymanych w procesie selekcji wariantów stwierdzono, iż należą one do DNAzymów typu 8-17, gdyż region katalityczny posiada charakterystyczny motyw spinki z trójnukleotydową pętlą apikalną typu AGC oraz 5-nukleotydowy fragment jednoniciowy o sekwencji ACGAA. Dodatkowo, wszystkie warianty posiadają cztery konserwatywne nukleotydy, mianowicie C13 i G14 w obrębie wspomnianego 5-nukleotydowego fragmentu jednoniciowego oraz w obrębie pętli apikalnej A6 i G7.

Zbadano aktywność katalityczną DNAzemu 1/VII skróconego z końca 5' i 3' z modyfikacją w postaci grupy tiofosforanowej w miejscu cięcia. Ponieważ szereg jonów metali dwuwartościowych, w tym jony Cd^{2+} , wykazuje silne powinowactwo do ligandów zawierających siarkę, oczekiwano, że zastąpienie niewiążącego atomu tlenu grupy fosforanowej w miejscu cięcia atomem siarki zmieni właściwości DNAzemu. Okazało się, że wprowadzona grupa tiofosforanowa w DNAzymie 1/VIIWS nie poprawiła jednak jego właściwości katalitycznych w obecności jonów Cd^{2+} , ale istotnie obniżyła specyficzność wobec jonów Zn^{2+} i Mn^{2+} .

Obecność zasady purynowej (adeniny lub guaniny) w pozycji 12 DNAzemu 1/VIIWS okazała się niezbędna dla zachowania jego aktywności katalitycznej. Wprowadzenie w tą pozycję zasady pirymidynowej (tyminy lub cytozyny) skutkowało dużym spadkiem aktywności. Po 30 minutach inkubacji mutanty Dz1/VIIWS_12C oraz Dz1/VIIWS_12T wykazywały w obecności jonów Cd^{2+} , odpowiednio 10-krotny i 14-krotny spadek aktywności katalitycznej. Prawdopodobnie zarówno stopień protonacji puryn, ich budowa i siła tworzonych wiązań wpływają na odpowiednie zwinienie się DNAzymów w aktywne katalityczne warianty.

Wykazano, że skład nukleotydowy trzonu spinki obecnej w regionie katalitycznym DNAzymów skróconych z końca 5' i 3' – Dz1/VIIWS i Dz5/XWS wpływa na poziom ich aktywności katalitycznej oraz preferencje wobec jonów metali. Ponadto, ilość par zasad typu C-G w trzonie spinki nie decyduje o właściwościach katalitycznych otrzymanych przez DNAzymów, inaczej niż sugerowano w literaturze dotyczącej innych wariantów 8-17. Również obecność środkowej pary zasad budującej trzon C4-G10 nie zwiększa aktywności katalitycznej. Wariant Dz1/VIIWS z mutacją A4C/T10G wykazywał zbliżony stopień przecięcia do wariantu typu dzikiego w obecności jonów Cd^{2+} , natomiast poziom aktywności katalitycznej cząsteczki zmutowanej Dz5/XWS_T4C/A10G w obecności jonów Cd^{2+} był 5-krotnie niższy niż aktywność Dz5/XWS. Wydaje się, że trzon spinki zakończonej trójnukleotydową pętlą AGC, usytuowanej w obrębie regionu katalitycznego, może uczestniczyć w wiązaniu jonu metalu. Może być także zaangażowany w tworzenie oddziaływań dalekiego zasięgu, istotnych dla przyjęcia przez DNAzym odpowiedniej struktury, decydującej o jego właściwościach katalitycznych.

W wyniku przeprowadzonej selekcji *in vitro* otrzymano szereg wariantów DNAzymów preferujących w katalizie jony Cd^{2+} . Szczegółowa analiza ich właściwości dostarczyła

nowych informacji dotyczących znaczenia określonych elementów struktury DNAzymów dla wykazywanej przez nie aktywności katalitycznej oraz specyficzności działania. Wyselekcjonowane DNAzyny mogą zostać użyte w dalszych badaniach, opartych o metodę częściowej mutagenyzy i re-selekcję *in vitro* aktywnych wariantów, mających na celu polepszenie właściwości DNAzymów pod kątem ich praktycznego zastosowania.

6. Materiały i metody

6.1. Aparatura

Zestaw do elektroforezy płytowej S2 (Life Technologies)

Mały zestaw do elektroforezy płytowej

Zasilacz E863 (Consort)

Zasilacz PS 3003 (Apelex)

Zasilacz PS 3002 (Apelex)

Termocykler UNO II (Biometra)

Termocykler T-Gradient (Biometra)

S20 SevenEasy pH metr (Mettler Toledo)

Waga laboratoryjna WPT 1 (Radwag)

Waga laboratoryjna BP 2215 (Sartorius)

Lampa UV (Camag)

Wirówka 5415D (Eppendorf)

Wirówka Universal 32R (Hettich)

Cieplarka do hodowli bakterii (Mettler)

Inkubator Heidolph 1000

Termowstrząsarka Comfort (Eppendorf)

Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop (Thermo Scientific)

Licznik scyntylacyjny MicroplateCounter 2450 (PerkinElmer)

Zestaw do wizualizacji żeli UVP2000

Skaner radioaktywności FLA-5100 (Fuji-Film)

Suszarka do żeli GelDryer 583 (Bio-Rad)

Pompa próżniowa (Laboport)

Komora laminarna Aura mini (BioAir)

Spektrofotometr Cary 50 Bio (Varian Inc.)

Spektropolarymetr Jasco J-715 (JASCO, Japan Spectroscopic Co.)

6.2. Odczynniki i materiały

Odczynniki pochodziły z firm: Sigma-Aldrich, Life Technologies, Serva, Thermo Scientific lub Fluca. Filtry strzykawkowe Milex GP pochodziły z firmy Merck Millipore. IPTG zakupiono w firmie Lab Empire.

6.2.1. Związki promieniotwórcze

- [γ ³²P]ATP (4000-5000 Ci/mmol) Hartmann Analytic
- [α ³²P]dCTP (4000-5000 Ci/mmol) Hartmann Analytic

6.2.2. Enzymy

Taq DNA polimeraza, T4 kinaza polinukleotydomowa, nukleaza S1 (MBI Fermentas)

6.2.3. Zestawy odczynników

- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii (Bio Basic i Qiagen)
- Zestaw do oczyszczania produktów PCR QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Zestaw do klonowania produktów PCR TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies)

6.2.4. Plazmidy

Plazmid pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

6.2.5. Szczepy bakteryjne

E. coli TOP10 oraz *E. coli* TOP10F' (Invitrogen)

6.2.6. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek

- Marker do analizy długości fragmentów DNA (0,1–10 kb) na podstawie migracji podczas elektroforezy w żelach agarozowych GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)
- Marker do analizy długości fragmentów DNA (0,01–0,3kb) na podstawie migracji podczas elektroforezy w żelach agarozowych GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific)

6.2.7. Oligonukleotydy

Wszystkie oligomery DNA użyte w toku wykonywania pracy doktorskiej zostały zakupione w Future Synthesis Poznań, IDT Leuven lub IBB Warszawa (www.oligo.pl). Zsyntetyzowane chemicznie oligomery DNA oczyszczano stosując elektroforezę w 8% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących. Po wizualizacji metodą wygaszania fluorescencji, z żelu wycinano pasma zawierające oligomery o pożądanej długości. Wycięte z żelu pasma umieszczano w buforze do elucji, następnie eluowano, wytrącano etanolem i

odwirowywano (wymienione metody i zastosowane bufory zostały opisane w kolejnych podrozdziałach).

Tabela 7. Zestawienie oligodeoksyrybonukleotydów stosowanych w pracy

Nazwa cząsteczki DNA	Sekwencja w orientacji 5'-3'		
M1	GTGCCAAGCTTACCGTCACN 23 GAGATGTCGCCATCTTCTTCTATAGTGAGTCGTATTAG		
M2	GTGCCAAGCTTACCGTCACN 40 GAGATGTCGCCATCTTCTTCTATAGTGAGTCGTATTAG		
P1	GTGCCAAGCTTACCG		
P2	CTGCAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAAGAGATGGCGAC		
P3	GGGCAGAATTCTAATACGACTCACTATr A		
P3.1	GGGCAGAATTCTAATACGACTCACTATA		
P3.2	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGAC		
P4	CAACAACAACAA(Spacer18)GTGCCAAGCTTACCG		
Dz1/VIIWS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGC		
Dz1/VIIWS-dA	CTCACTAT AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGC		
Dz1/VIIWS_A12C	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTCCGAAATAGC		
Dz1/VIIWS_A12T	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTTCGAAATAGC		
Dz1/VIIWS_A12G	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTGCGAAATAGC		
Dz1/VIIWS_A4C/T10G	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTACCAGCGGTACGAAATAGC		
Dz1/VIIWS_PS	CTCACTATr A *GGAAGAGATGGCGACATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGC		
Dz15/XWS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCTACTGTCTAGCGACACGAGATTGT		
Dz24/XWS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTGTCTAGCAACACGAAATAGG		
Dz5/XWS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTGTCTAGCGACACGAAATAGG		
Dz5/XWS_T4C/A10G	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCATCTGCCAGCGGCACGAAATAGG		
Dz15WS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTTTACAAACCCCAAACCTTCTCTT		
Dz27WS	CTCACTATr AGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCTCAAGCGACTTCTCTCG		
Dz15WS-dA	CTCACTAT AGGAAGAGATGGCGACATCTTTACAAACCCCAAACCTTCTCTT		
Dz27WS-dA	CTCACTAT AGGAAGAGATGGCGACATCTCCTACCCTCAAGCGACTTCTCTCG		
1/VIIS	CGCTGTAGAGAAGGr ATATCACTCA		
1/VIIIE	GCGACATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGTGAGT		
1/VIIWS_S1	CTCACTATr AGGAAGAGATGGC		
1/VIIWS_E1	GACATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGC		
5/XWS_E1	GACATCTCATCTGTCTAGCGACACGAAATAGG		
Dz15WS_E1	GACATCTTTACAAACCCCAAACCTTCTCTT		
Dz27WS_E1	GACATCTCCTACCCTCAAGCGACTTCTCTCG		
1/VIIWS_S2	CTCACTATr AGGAAGAGATG		
1/VIIWS_E2	CATCTCATCTAACAGCGTTACGAAATAGC		
8-17S	CGATCCTTr GGCTTCTCA		
8-17E	TGAGAAGTGTCTAGCGACACGAAAAGGATCG		
Dz1/VIIS	CGATCCTTr AGCTTCTCA		
Dz1/VIIIE	TGAGAAGTAACAGCGTTACGAAAAGGATCG		
N23; N40	23- i 40-nukleotydy region <i>random</i>	rA	rybonukleotyd adeniny
Spacer 18	18 jednostek glikolu etylenowego	rA*	rybonukleotyd adeniny z tiofosforanem
		rG	rybonukleotyd guaniny

6.2.8. Bufory, roztwory i pożywki

Bufory do rozpuszczania DNA

- TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA;
- 50 mM HEPES-NaOH pH 7,0, 100 mM NaCl

Bufor do elektroforezy 1xTBE

100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 29:1 (w/w)

38,67 g akryloamidu, 1,33 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

Roztwory do nakładania na żel próbek zawierających DNA

- Elektroforeza w warunkach denaturujących:
8 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol
- Elektroforeza w żelu agarozowym w warunkach „natywnych”:
10 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol, 60 mM EDTA

Bufor „stop”

8 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol

Bufor do reakcji katalitycznego cięcia

50 mM HEPES-NaOH pH 7,0, 100 mM NaCl

Bufor do trawienia nukleazą S1

40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂

Bufor do modyfikacji chemicznej za pomocą siarczany dimetylu (DMS)

80 mM HEPES-NaOH pH 7,0, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

- 300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA; stosowany dla oligomerów wykorzystywanych w doświadczeniach dotyczących DNAzymów pH-zależnych

- 50 mM HEPES-NaOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA; stosowany dla oligomerów wykorzystywanych w doświadczeniach dotyczących DNAzymów metalozależnych

Pożywka stała LB do hodowli bakteryjnych

5 g tryptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 7,5 g agaru, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Pożywka płynna LB do hodowli bakteryjnych

5 g tryptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Antybiotyki

Ampicylina – 50 mg/ml w H₂O; stężenie końcowe antybiotyku w pożywce do hodowli bakteryjnej wynosiło 50 µg/ml pożywki.

6.3. Metody standardowe

6.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę wykorzystywano m.in. w trakcie syntezy biblioteki kombinatorycznej DNAzymów, do odseparowania z dsDNA pojedynczych nici DNA o sekwencji deoksyrybozymów, a także śledzenia zmian stopnia przereagowania puli DNAzymów w trakcie eksperymentu selekcji *in vitro* oraz analizy produktów reakcji katalitycznego cięcia wybranych deoksyrybozymów. Ponadto, metodę tę wykorzystano do oczyszczania oligomerów DNA po syntezie chemicznej, jak również cząsteczek DNA po znakowaniu radioizotopowym oraz do analizy produktów otrzymanych po badaniu struktury drugorzędowej DNAzymów metodami enzymatycznymi i chemicznymi.

Do elektroforezy stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 8,3 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1xTBE. Procentowość żelu uzależniona była od długości rozdzielanych fragmentów i wahała się od 8 do 12%. Przed nałożeniem na żel, próbki mieszano z roztworem 8 M mocznika z barwnikami elektroforetycznymi w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzano preelektroforezą prowadzoną przy natężeniu prądu 10 mA, aż do ustalenia parametrów prądowych. Podczas rozdziału elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 20 mA (żel

20x20 cm) lub 40 mA (żel 30x40 cm). Do wizualizacji wyników wykorzystywano: znakowanie radioizotopowe oligomerów, oczyszczanie produktów reakcji PCR – autoradiografię; oczyszczanie oligomerów DNA po syntezie chemicznej – wygaszanie światła UV; mapowanie struktury drugorzędowej DNA, określanie aktywności katalitycznej DNAzymów – ekrany odwzorowujące i skaner radioaktywności.

6.3.2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforezę w żelu agarozowym stosowano do analizy fragmentów DNA otrzymanych metodą PCR. W zależności od długości rozdzielanych fragmentów stosowano 1–2% (w/v) żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (0,1 µg/ml), a jako bufor elektroforetyczny 1xTBE. Przed nałożeniem na żel próbki DNA mieszano z roztworem do nakładania próbek DNA, w stosunku 6:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy stałym natężeniu prądu 60 mA. Fragmenty DNA obserwowano w świetle UV.

6.3.3. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

Po elektroforezie prążki odpowiadające oligomerom DNA wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu inkubowano w buforze do elucji przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z okresowym wytrząsaniem. Podczas eksperymentu selekcji *in vitro* DNAzymów pH-zależnych elucję cząsteczek DNA prowadzono w buforze: 300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA, natomiast do elucji cząsteczek DNA w trakcie i po selekcji DNAzymów metalozależnych stosowano bufor 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

6.3.4. Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu

Wyeluowane z żelu poliakryloamidowego oligomery DNA wytrącano z roztworu za pomocą trzech objętości 96% etanolu w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2 – w przypadku cząsteczek DNA podczas selekcji *in vitro* DNAzymów pH-zależnych, bądź w obecności 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl – w przypadku cząsteczek DNA podczas i po selekcji *in vitro* DNAzymów metalozależnych. Przed strąceniem dodawano także glikogen do stężenia 20 µg/ml roztworu. Próbki strącano przez 20 minut w suchym lodzie lub w temperaturze -20°C przez noc. Osad odwirowywano.

Wszystkie wytrącone próbki DNA, jeśli nie zaznaczono inaczej, wirowano w tych samych warunkach: 14000 rpm w temperaturze 4°C przez 20 minut. Supernatant usuwano, a osad suszono i rozpuszczano:

- w buforze TE, w przypadku oligomerów DNA
- w wodzie sterylnej, w przypadku oligomerów DNA/RNA wykorzystywanych w reakcjach PCR
- w 5-krotnie rozcieńczonym buforze TE, w przypadku produktów PCR – DNAzymów pH-zależnych
- w 50 mM HEPES pH 7,0/100 mM NaCl, w przypadku produktów PCR – DNAzymów metalozależnych oraz w przypadku synetyzowanych chemicznie skróconych wariantów DNAzymów pH-zależnych i metalozależnych.

6.3.5. Oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych

Stężenie kwasu nukleinowego w próbce oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 260$ nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop. Stosowano następujące przeliczniki:

ssDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 33 \mu\text{g}/\text{ml}$,

dsDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$

6.3.6. Ekstrakcja fenolem

Procedurę wykorzystywano do oczyszczania produktów po reakcji PCR. Próbkę zawierającą DNA wytrząsano 2 minuty z jedną objętością fenolu (nasyconego buforem TE, pH 8,0) w temperaturze pokojowej i wirowano 1 minutę przy 10000 rpm w celu separacji faz. Następnie, aby usunąć resztki fenolu, do zebranej fazy wodnej dodawano jedną objętość mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy w stosunku 24:1 (v/v) i wytrząsano 1 minutę w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 minutę przy 10000 rpm. Zbierano fazę wodną i wytrącano DNA.

6.4. Metody stosowane w badaniach własnych

W toku realizacji niniejszej pracy przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty selekcji *in vitro*, w wyniku których otrzymano dwa zestawy DNAzymów o odmiennej aktywności katalitycznej. W związku z powyższym, każda selekcja została opisana oddzielnie w celu przedstawienia różnic w obydwu procedurach eksperymentalnych.

6.4.1. Otrzymywanie DNAzymów przecinających łańcuch RNA

6.4.1.1. Konstrukcja wyjściowej biblioteki kombinatorycznej

Bibliotekę kombinatoryczną DNAzymów działające w układzie jednocząsteczkowym (*in cis*) otrzymano poprzez wykorzystanie wypełniającej reakcji PCR z użyciem chemicznie zsyntetyzowanych oligomerów, jednego zawierającego 23-nukleotydowy odcinek *random*, oznaczonego jako M1 (5'-GTGCAAGCTTACCGTCAC-N23-AGATGTCGCCATCTCTTCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3') oraz komplementarnego do jego końca 3' oligomeru P3 (5'-GGGCAGAATTCTAATACGACTCACTATrA-3'), zawierającego rybonukleotyd adeniny jako przewidywane miejsce cięcia katalitycznego. Reakcję prowadzono w 300 μ l buforu zawierającego 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/ μ l Taq DNA polimerazę, 10 μ l [α -³²P]dCTP oraz 0,2 mM każdego z dNTP, przez siedem cykli (po 1 min w 92°C, 52°C i 72°C); wstępną denaturację prowadzono w 95°C, a końcowe wydłużanie w 72°C przez 2 minuty. Następnie, do reakcji wprowadzono równomolowe ilości (1 nmol) startera P3 oraz startera P4 (5'-CAACAACAA CAA(Spacer18)GTGCCAAGCTTACCG-3') i wykonano 7 cykli PCR. Produkty reakcji PCR, czyli matrycową pulę dsDNA kodującą DNAzimy, strącano za pomocą trzech objętości 96% etanolu w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2 – w przypadku matrycowych cząsteczek dsDNA kodujących DNAzimy pH-zależne, bądź w obecności 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl w przypadku matrycowych cząsteczek dsDNA kodujących DNAzimy metalozależne. Osad odwirowywano i rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy. Jednociowe cząsteczki DNA otrzymano poprzez rozdzielenie obu nici dsDNA za pomocą elektroforezy w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym (PAGE). Ponieważ oligomer P4 zawiera łącznik składający się z 18 reszt glikolu etylenowego, zatem łatwo wybrać krótszą, 90-nukleotydową nić DNA o sekwencji DNAzymu, wykorzystując różnice w mobilności elektroforetycznej obydwu nici. Po wycięciu z żelu, pulę DNAzymów pH-zależnych eluowano w buforze: 300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA, strącano etanolem i rozpuszczono w 5-krotnie rozcieńczonym buforze TE. Natomiast pulę DNAzymów metalozależnych eluowano w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, dwukrotnie strącano etanolem i rozpuszczano w buforze zawierającym 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl. Tak przygotowane wyjściowe biblioteki kombinatoryczne DNAzymów użyto w procesie selekcji *in vitro*.

Bibliotekę kombinatoryczną DNAzymów z 40-nukleotydowym regionem *random* otrzymano w identyczny sposób jak bibliotekę kombinatoryczną DNAzymów z 23-nukleotydowym regionem *random*, przy czym w pierwszej wypełniającej reakcji PCR użyto

zamiast oligomeru M1, chemicznie zsyntetyzowany oligomer zawierający 40-nukleotydowy odcinek *random*, oznaczony jako M2 (5'-GTGCAAGCTTACCGTCAC-N40-AGATGTCGCCATCTCTTCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3').

6.4.1.2. Selekcja *in vitro* DNAzymów pH-zależnych

Reakcja katalitycznego cięcia

Selekcję *in vitro* wariantów DNAzymów aktywnych w niskim pH środowiska rozpoczęto z wykorzystaniem biblioteki DNAzymów zawierającej pojedynczy rybonukleotyd adeniny oraz 23-nukleotydowy odcinek *random*, co odpowiada $0,7 \times 10^{13}$ różnych cząsteczek DNA. Pulę otrzymanych DNAzymów poddano reakcji katalitycznego cięcia w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 1 mM. Reakcję prowadzono w buforze o składzie 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl przez 1 godzinę w temperaturze 25°C. W celu selekcji wariantów o wysokiej aktywności katalitycznej, w kolejnych rundach selekcji skracano czas reakcji od 60 minut do 1 minuty. Obniżano także stężenie jonów Cd^{2+} od 1 do 0,1 mM (Tab. 8).

Produkty po reakcji cięcia rozdzielano w 12% żelu poliakryloamidowym. Wycięty z żelu 62-nukleotydowy oligomer DNA odpowiadający produktowi reakcji cięcia oraz 90-nukleotydowy oligomer odpowiadający nieprzeciętej puli DNAzymów eluowano w buforze zawierającym 300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA, strącano 3 objętościami etanolu i rozpuszczano w 20 μl buforu TE. Mierząc radioaktywność biblioteki DNAzymów, która nie uległa przecięciu oraz produktów po reakcji cięcia odzyskanych z żelu poliakryloamidowego obliczano stopień przecięcia ogólnej puli wariantów.

Tabela 8. Warunki stosowane w kolejnych cyklach selekcji DNAzymów pH-zależnych.

cykl selekcji	czas inkubacji [min]	stężenie jonów Cd^{2+} [mM]
1	60	1
2	60	1
3	60	1
4	60	0,2
5	30	0,2
6	30	0,1
7	10	0,1
8	5	0,1
9	1	0,1
10	1	0,1
11	1	0,1

Reakcja amplifikacji wariantów obecnych w puli DNAzymów

Odzyskany z żelu po I cyklu selekcji produkt reakcji cięcia użyty został w następujących po sobie reakcjach PCR w celu odzyskania wariantów biblioteki DNAzymów o pełnej długości. Pierwszą reakcję PCR prowadzono z użyciem starterów: P1 (5'-GTGCCAAGCTTACCG-3') i P2 (5'-CTGCAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAAGGATGGCGAC-3') o stężeniu 0,5 µM każdy, w 300 µl buforu zawierającego 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/µl Taq DNA polimerazę, 0,2 mM każdego z dNTP oraz 12 µl mieszaniny oligomerów 62-nukleotydowych produktów reakcji cięcia. Warunki reakcji PCR były następujące: po 1 min w 92°C, 52°C i 72°C przez 25 cykli. Otrzymane matrycowe dsDNA wytrącano etanolem w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2. Osad odwirowywano i rozpuszczano w 40 µl buforu TE. Reakcje PCR w skali preparatywnej poprzedzone były reakcjami testowymi prowadzonymi w 6-krotnie mniejszej objętości przy różnej ilości cykli, w celu ustalenia optymalnych warunków amplifikacji. Po określonej liczbie cykli pobierano 7 µl próbki i produkty rozdzielano w 1% żelu agarozowym, jak opisano w rozdziale 6.3.2.

Jedną trzecią objętości tj. ok 13 µl matrycowej puli dsDNA otrzymanej jak opisano powyżej, wprowadzano wraz z równomolowymi ilościami startera P3 (5'-GGGC AGAATTCTAATACGACTCACTATrA-3') oraz startera P4 (5'-CAACAACAACAA (Spacer18)GTGCCAAGCTTACCG-3') do kolejnej reakcji PCR. Objętość mieszaniny wynosiła 300 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/µl Taq DNA polimerazę, 10 µl [α -³²P]dCTP, 0,2 mM każdego z dNTP oraz 13 µl dsDNA i po 1 nmolu startera P3 oraz startera P4. Stosowano następujące warunki temperaturowe reakcji PCR: 95°C przez 3 minuty i 7 cykli: 92°C, 52°C i 72°C po 1 minucie, po czym w 72°C przez 5 minut. Produkty reakcji PCR strącano za pomocą trzech objętości 96% etanolu w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2. Osad odwirowywano i rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym. Po wycięciu z żelu prążka odpowiadającego nici sekwencyjnej DNAzymu o długości 90 nukleotydów, pulę wariantów eluowano w buforze: 300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA, strącano etanolem i rozpuszczano w 5-krotnie rozcieńczonym buforze TE. Otrzymaną w ten sposób wzbogaconą pulę cząsteczek ssDNA wprowadzano do kolejnego cyklu selekcji – poddano kolejnej reakcji katalitycznego cięcia, a następnie amplifikowano.

Selekcja negatywna

Pulę DNAzymów otrzymaną po IV cyklu poddano procedurze tzw. selekcji negatywnej. Reakcję prowadzono w buforze o składzie 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl w obecności 0,2 mM stężenia jonów Zn^{2+} w czasie 60 minut. Za pomocą elektroforezy w 12 % żelu poliakryloamidowym rozdzielono frakcje wariantów aktywnych i nieaktywnych katalitycznie w tych warunkach, a wyeluowane z żelu warianty nieprzecięte (o długości 90-nukleotydów) użyto w kolejnym cyklu selekcji. Kolejną selekcję negatywną przeprowadzono po V cyklu selekcji w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych: 100 μM Mg^{2+} oraz 50 μM każdego z jonów: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} , stosując czas inkubacji 30 minut. Warianty nieprzecięte użyto w VI cyklu selekcji.

6.4.1.3. Selekcja *in vitro* DNAzymów metalozależnych**Reakcja katalitycznego cięcia**

Selekcję *in vitro* wariantów DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} rozpoczęto stosując równolegle dwie biblioteki kombinatoryczne DNAzymów, zawierające 23- oraz 40-nukleotydowy region typu *random*. Zmodyfikowano procedurę selekcji w stosunku do użytej w pierwszym eksperymencie, zmieniając warunki elucji i strącania DNA z roztworu z pH 5,2 na pH 7,0. Pulę otrzymanych DNAzymów poddano reakcji katalitycznego cięcia w obecności jonów Cd^{2+} . Reakcję prowadzono w buforze o składzie 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl w temperaturze 25°C. Tabela 9 przedstawia warunki jakie stosowano w kolejnych cyklach selekcji.

Tabela 9. Warunki stosowane w kolejnych cyklach selekcji DNAzymów metalozależnych.

cykl selekcji	czas inkubacji [min]	stężenie jonów Cd^{2+} [mM]
1	60	1
2	60	1
3	60	1
4	60	0,2
5	30	0,2
6	30	0,1
7	10	0,1
8	5	0,1
9	5	0,1
10	5	0,1

Produkty po reakcji cięcia rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Wycięte z żelu oligomery DNA odpowiadające produktom reakcji cięcia (62-nukleotydomy oraz 79-nukleotydomy) oraz oligomery odpowiadające nieprzeciętej puli DNAzymów (90-nukleotydomy i 107-nukleotydomy) eluowano w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, strącano etanolem i rozpuszczano w 20 µl buforu TE. Mierząc radioaktywność biblioteki DNAzymów, która nie uległa przecięciu oraz produktów po reakcji cięcia odzyskanych z żelu poliakryloamidowego obliczano stopień przecięcia ogólnej puli wariantów.

Amplifikacja puli DNAzymów

Odzyskane z żelu po I cyklu selekcji produkty reakcji cięcia wprowadzono do reakcji PCR w celu uzyskania pełnej długości wariantów biblioteki DNAzymów. Mieszanina reakcyjna zawierała po 150 pmol startera P1 (5'-GTGCCAAGCTTACCG-3') oraz startera P2 (5'-CTGCAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAAGGATGGCGAC-3'), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/µl Taq DNA polimerazę, 0,2 mM każdego z dNTP oraz 12 µl oligomerów stanowiących 62- lub 79-nukleotydomy produkty reakcji cięcia. Objętość mieszaniny wynosiła 300 µl. Stosowano następujące warunki temperaturowe reakcji PCR: 95°C przez 3 minuty i 25 cykli: 92°C, 52°C i 72°C po 1 minucie, po czym w temperaturze 72°C przez 5 minut. Produkty reakcji PCR strącano za pomocą trzech objętości 96% etanolu w obecności buforu 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl. Osad odwirowywano i rozpuszczano w 40 µl buforu TE. W celu ustalenia optymalnej liczby wymaganych cykli właściwą reakcję PCR poprzedzano reakcjami testowymi prowadzonymi w zmniejszonej skali. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 50 µl. Produkty rozdzielano w 1,5 % żelu agarozowym, jak opisano w rozdziale 6.3.2

Kolejną reakcję PCR prowadzono z użyciem starterów P3 (5'-GGGCAGAATTCTAATACGACTCACTATrA-3') i P4 (5'-CAACAACAACAA(Spacer18)GTGCCAAGCTTACCG-3') o stężeniu 3,3 µM każdy w 300 µl buforu zawierającego 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/µl Taq DNA polimerazę, 10 µl [α -³²P]dCTP, 0,2 mM każdego z dNTP oraz 13 µl otrzymanej w opisanej powyżej, pierwszej reakcji PCR matrycowej puli dsDNA. Warunki reakcji PCR były następujące: po 1 min w 92°C, 52°C i 72°C przez 7 cykli. Otrzymane matrycowe dsDNA wytrącano 3 objętościami etanolu w obecności 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl. Osad odwirowywano i rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym. Pulę wariantów

DNAzemu o długości 90 nukleotydów oraz pulę wariantów DNAzemu o długości 107 nukleotydów eluowano w buforze: 50 mM HEPES pH 5,2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA i strącano 3 objętościami 96% etanolu. Wzbogaconą pulę cząsteczek ssDNA rozpuszczano w 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, a następnie wprowadzano do kolejnego cyklu selekcji.

Selekcja negatywna

Selekcję negatywną przeprowadzono po IV cyklu selekcji w obecności mieszaniny jonów metali dwuwartościowych: 100 μM Mg^{2+} oraz 50 μM każdego z jonów: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} . Reakcję prowadzono w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl przez 60 minut w temperaturze 25°C. Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym rozdzielono frakcje wariantów aktywnych i nieaktywnych katalitycznie w tych warunkach, a wyeluowane z żelu warianty nieprzecięte (odpowiednio, o długości 90 i 107 nukleotydów dla obu bibliotek) użyto w kolejnym cyklu selekcji.

6.4.2. Klonowanie matrycowej puli dsDNA kodującej DNAzemy

Pulę DNAzymów pH-zależnych z 10 cyklu selekcji oraz pulę DNAzymów metalozależnych z 7 i 10 cyklu poddano reamplifikacji. Reakcja PCR zawierała: dwa startery P1 i P2 o stężeniu 0,5 μM , 12 μl matrycowego DNA z odpowiedniego cyklu selekcji, 0,05 U/ μl Taq DNA polimerazę, 2 mM MgCl_2 , 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8 at 25°C), 0,01% Tween 20 oraz 0,2 mM każdego z dNTP. Stosowano następujące warunki temperaturowe reakcji PCR: 95°C przez 2 minuty, a następnie 10 cykli: 92°C, 52°C i 72°C po 60 s, po czym w temperaturze 72°C przez 10 minut. Produkty reakcji PCR, czyli matrycowe pule dsDNA kodujące DNAzemy oczyszczano z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit firmy Qiagen.

Matrycowe pule dsDNA kodujące DNAzemy z odpowiedniego cyklu selekcji i wektor pCR2.1-TOPO mieszano w stosunku molowym 2:1. Do reakcji dodawano roztwór soli (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl_2) i prowadzono inkubację w temperaturze pokojowej (22°C) przez 20 minut. Mieszaniną reakcyjną bez oczyszczania transformowano komórki *E. coli*.

6.4.3. Transformacja komórek *E. coli*

Plazmidowy DNA wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 lub *E. coli* TOP10' metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 min. Następnie dodawano 3 μl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano przez 30 min na lodzie.

Zawiesinę bakteryjną umieszczano na 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 minuty do lodu, dodawano 250 µl pożywki SOC i komórki hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (200 rpm). Komórki bakteryjne nierozcieńczone, 5x i 25x rozcieńczone rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB i ampicyliną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji wybierano wyraźnie oddzielone kolonie bakteryjne i przeprowadzano test na obecność insertu. Minimalną ilość każdej kolonii przeniesiono do probówki z 30 µl wody i inkubowano 10 minut w 95°C, z czego pobierano po 5 µl jako matrycę do reakcji PCR. Warunki temperaturowe reakcji były następujące: 95°C–3 minuty oraz 30 cykli: 95°C–30 s, 55°C–30 s, 72°C–1 min. Mieszanina reakcyjna PCR zawierała dwa startery: M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') i M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') o stężeniu 0,5 µM, 0,03 U/µl Taq DNA polimerazę, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 oraz 0,2 mM każdego z dNTP. W przypadku uzyskania pozytywnej reakcji PCR pozostałe bakterie pochodzące z pojedynczej koloni, zawierające insert zawieszano w 3 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C przy 220 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Bio Basic. Otrzymane plazmidy sekwencjonowano.

6.4.4. Synteza wariantów

Do otrzymania DNAzymów do badań aktywności katalitycznej i struktury drugorzędowej wykorzystano plazmidowe dsDNA kodujące określone warianty pełnej długości tj. 90-nukleotydowe wariant działające w układzie *in cis*. Wybrane DNAzomy z poszczególnych rodzin były powielane metodą PCR z wykorzystaniem starterów P3 (5'-GGGCAGAAT TCTAATACGACTCACTATrA-3') i P4 (5'-CAACAACAACAA(Spacer18)GTGCCAAGC TTACCG-3').

Przy syntezie nieprzecinającego się wariantu DNAzemu do reakcji PCR wprowadzano zamiast startera P3 jego odpowiednik – starter P3.1 (5'-GGGCAGAATTCTAATACGACT CACTATA-3'), który na końcu 3' zamiast rybonukleotydu posiadał deoksyrybonukleotyd. Mieszanina reakcyjna zawierała 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,05 U/µl Taq DNA polimerazę, 10 µl [α -³²P]dCTP, 0,2 mM każdego z dNTP, 60 ng dsDNA oraz po 150 pmoli startera P3 lub P3.1 oraz startera P4. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 300 µl. Stosowano następujące warunki temperaturowe reakcji PCR: 95°C przez 3 minuty i 25 cykli: 92°C, 52°C i 72°C po 1 minucie, po czym inkubacja w 72°C przez 5 minut. Produkty reakcji PCR strącano etanolem. Osad

odwirowywano i rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym. Po wycięciu z żelu prążka odpowiadającego nici sekwencyjnej DNAzymu, DNA eluowano i strącano etanolem, zgodnie z protokołem opisanym w rozdziałach 6.3.3–6.3.4. Osad odwirowywano i rozpuszczano w buforze 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl. Skrócone z końca 5' warianty DNAzymów otrzymywano w reakcji PCR w identyczny sposób jak warianty pełnej długości, stosując zamiast startera P3, starter P3.2 (5'-CTCACTATrAGGAAGAGATGG CGAC-3').

Skrócone z końca 3' i 5' warianty DNAzymów, działające w układzie jednocząsteczkowym (usunięto 19-nukleotydowe fragmenty sekwencji z końca 3' i 5' cząsteczek) oraz warianty DNAzymów działających w układzie dwucząsteczkowym zostały zsyntetyzowane przez firmę FutureSynthesis z Poznania. Zsyntetyzowane chemicznie DNAzyny oczyszczano stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących bądź wysokosprawną chromatografię cieczą – HPLC.

6.4.5. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ^{32}P

Mieszanina reakcyjna zawierała 100 pmoli oligomeru DNA będącego DNAzymem działającym w układzie *in cis* lub 10 pmoli oligomeru DNA stanowiącego substrat dla DNAzymu w układzie *in trans*, 2 μl [γ - ^{32}P]ATP o aktywności 4000-5000 Ci/mmol, bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,1 mM spermidyna) oraz 10 U T4 kinazy polinukleotydowej. Po dodaniu enzymu reakcję prowadzono przez 30–40 minut w temperaturze 37°C. Znakowane oligomery DNA oczyszczano w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Wyznakowane izotopem ^{32}P na końcu 5' cząsteczki wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano etanolem, a osad wirowano i suszono. Poziom radioaktywności wyznakowanych cząsteczek DNA mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

6.4.6. Określanie struktury drugorzędowej DNAzymów

Wszystkie prezentowane wyniki doświadczeń mapowania struktury drugorzędowej DNAzymów były wizualizowane z wykorzystaniem autoradiografii lub ekranów odwzorowujących i skanera FLA-5100 z oprogramowaniem MultiGauge (FujiFilm). Syntezę wybranych wariantów prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6.4.4.

6.4.6.1. Modyfikacja chemiczna DNA w pozycji N3 reszt cytozyny za pomocą siarczanu dimetylu

Mapowanie struktury DNAzymów znakowanych na końcu 5' izotopem ^{32}P (50000 cpm) poprzedzono ich renaturacją w buforze zawierającym: 80 mM HEPES (pH 7,0), 40 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 oraz nośnikowy tRNA, którego końcowe stężenie wynosiło $2 A_{260}/\text{ml}$ tj. $0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Warunki renaturacji były następujące: inkubacja w 65°C przez 5 minut i schładzanie w czasie 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano $10 \mu\text{l}$ roztworu siarczanu dimetylu (DMS) w etanolu (1:12, v/v) do końcowego stężenia 0,4%. Reakcję prowadzono przez 10 minut lub 30 minut w temperaturze pokojowej i zatrzymywano poprzez umieszczenie próbki na lodzie i dodanie 3 objętości 96% etanolu. DNA strącano dwukrotnie etanolem w obecności 0,3 M octanu sodu i glikogenu. Osad odwirowywano i rozpuszczano w $10 \mu\text{l}$ schłodzonego roztworu hydrazyny w wodzie (1:1, v/v). Próbę inkubowano 10 minut na lodzie, a następnie dwukrotnie strącano 96% etanolem w obecności 0,3 mM octanu sodu i glikogenu. Po odwirowaniu osad rozpuszczano w $20 \mu\text{l}$ 10-krotnie rozcieńczonej piperydyny i inkubowano 15 minut w 60°C . Po dwukrotnym wytrąceniu 3 objętościami 96% etanolu osad rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy. Produkty reakcji rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

6.4.6.2. Modyfikacja chemiczna DNA w pozycji N7 reszt guaniny za pomocą siarczanu dimetylu

Mapowanie struktury DNAzymów znakowanych na końcu 5' izotopem ^{32}P (50000 cpm) poprzedzono ich renaturacją: 100°C przez 1 minutę, 0°C przez 10 minut, a następnie 25°C przez 10 minut w buforze zawierającym: 50 mM HEPES (pH 7,0) oraz nośnikowy tRNA o stężeniu $2 A_{260}/\text{ml}$. Po etapie renaturacji dodawano roztwór siarczanu dimetylu (DMS) do końcowego stężenia 0,2%. Reakcję prowadzono przez 2, 10 lub 30 minut w temperaturze pokojowej i zatrzymywano poprzez umieszczenie na lodzie i wytrącenie w obecności butanolu. Osad odwirowywano i rozpuszczano w $150 \mu\text{l}$ 10-krotnie rozcieńczonej piperydyny. Próbę inkubowano 30 minut w 90°C . Po wytrąceniu w obecności butanolu, osad odwirowano i rozpuszczano w $150 \mu\text{l}$ 1% SDS. Po powtórnym wytrąceniu próby w obecności butanolu, otrzymany osad rozpuszczano w roztworze do nakładania prób na żel poliakryloamidowy.

6.4.6.3. Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej DNA

Mieszanina reakcyjna zawierała znakowany izotopem ^{32}P na końcu 5' DNAzym (50000 cpm), 40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl_2 oraz 2 A_{260}/ml nośnikowego tRNA. Bezpośrednio przed reakcją DNAzym poddawano renaturacji w temperaturze 100°C przez 2 minuty i schłodzenie w temperaturze 0°C przez 5 minut. Następnie dodawano 100-krotnie rozcieńczoną nukleazę S1 do końcowego stężenia 275 U/ml i próby inkubowano w temperaturze 25°C przez 2, 5 lub 10 minut. Reakcję trawienia zatrzymywano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1 i zamrażając mieszaninę na suchym lodzie. Produkty trawienia analizowano w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

6.4.6.4. Przewidywanie struktury drugorzędowej DNA *in silico*

Do przewidywania struktur drugorzędowych DNAzymów użyto program *RNAstructure* w wersji 5.6 [146]. Do programu wprowadzono dane eksperymentalne pochodzące z enzymatycznego mapowania struktury drugorzędowej oraz wyniki z mapowania chemicznego DNA. Struktury drugorzędowe przewidywano także w programach *Kinefold* [149], *Mfold* [147] oraz *RNAfold* [148], przy czym te programy nie umożliwiają wprowadzenie danych eksperymentalnych.

6.4.7. Wyznaczanie aktywności katalitycznej DNAzymów

Badanie aktywności katalitycznej DNAzymów rozpoczynano od przygotowania wybranych wariantów DNAzymów zgodnie z procedurą przedstawioną w rozdziale 6.4.4. DNAzymy wyznakowane wewnątrznie izotopem ^{32}P pełnej długości tzn. warianty 90-nukleotydowe otrzymywano w reakcji PCR z użyciem radioaktywnego $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ oraz starterów P3 i P4. Natomiast syntetyzowane chemicznie, skrócone z końca 3' i 5' warianty DNAzymów działające w układzie *in cis* (52-nukleotydowe cząsteczki) oraz substraty oligonukleotydowe dla DNAzymów działających *in trans*, znakowano izotopem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na końcu 5' zgodnie z procedurą przedstawioną w rozdziale 6.4.5. Sekwencje nukleotydowe skróconych z końca 3' i 5' wariantów DNAzymów działających w układzie *in cis*, DNAzymów działających *in trans* oraz odpowiednich substratów przedstawiono w tabeli 7. w rozdziale 6.2.7.

6.4.7.1. Reakcja cięcia katalitycznego DNAzymów pH-zależnych

Wyznaczanie profilu pH

Aktywność katalityczną wybranych DNAzymów pełnej długości jak i ich wariantów skróconych z końca 5' oraz wariantów skróconych z końca 5' i 3' określano przy różnych wartościach pH stosując następujące bufony: cytrynian sodu pH 2,5–5,5; MES-NaOH pH 5,5–6,5 oraz HEPES-NaOH pH 6,5–7,0. Podczas wstępnej charakterystyki biochemicznej DNAzymów (rozdz. 3.1.3) wykorzystywano także bufony: TE pH 8,0; Tris-HCl pH 7,5; NaCl pH 7,0; octan amonu pH 4,5–6,0. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej znakowany radioizotopowo DNAzym (10000–30000 cpm) wprowadzano bufor o odpowiednim pH do końcowego stężenia 50 mM. Reakcję prowadzono przez 60 minut w temperaturze 25°C, którą następnie wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1.

Określanie specyficzności DNAzymów pełnej długości wobec wybranych jonów metali

Specyficzność DNAzymów wobec jonów metali badano w obecności następujących jonów: Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} , których końcowe stężenie wynosiło 1 mM lub 100 μ M, oraz w obecności 100 mM stężenia jonów K^+ i Na^+ . Mieszanina reakcyjna zawierała DNAzym znakowany wewnątrznie z użyciem radioaktywnego $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 50 mM cytrynian sodu o pH 4,0 lub pH 4,5 oraz wybrany jon metalu. Reakcję prowadzono przez 60 minut w temperaturze 25°C, a następnie wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1. Podczas wstępnej charakterystyki biochemicznej DNAzymów (rozdz. 3.1.3) wykorzystywano jony Mg^{2+} o stężeniu 10 mM.

Wyznaczanie stałych szybkości reakcji cięcia katalitycznego DNAzymów skróconych z końca 5' i 3'

Do zbadania aktywności katalitycznej DNAzymów wybrane warianty znakowano na końcu 5' z użyciem radioaktywnego $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Bezpośrednio przed reakcją DNAzymy (30000 cpm) – Dz15WS oraz Dz27WS poddawano procedurze denaturacji-renaturacji stosując 1-minutową inkubację w 65°C, powolne schładzanie do 35°C w tempie 0,5°C/minutę, a następnie 10-minutową inkubację w 25°C. W przypadku wyznaczania stałych szybkości reakcji cięcia (k_{obs}) przebiegających w 37°C, etap powolnego schładzania prowadzono do 37°C w tempie 0,5°C/minutę. Następnie dodawano 50 mM cytrynian sodu o pH 4,0 i próby inkubowano w temperaturze 25°C lub 37°C. Z mieszaniny reakcyjnej pobierano próbki po czasie 15", 30", 45", 1', 2', 3', 5', 10', 20', 30' oraz 60' trwania reakcji i wygaszano dodając bufor „stop” w

stosunku 1:1. Na podstawie danych eksperymentalnych wyznaczano stałą szybkości reakcji katalitycznego cięcia (k_{obs}).

Aktywność katalityczna DNAzymów w układzie dwucząsteczkowym (*in trans*)

DNAzomy w układzie *trans* przygotowano przez zmieszanie znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' substratu 1/VIIWS_S1 z oligomerem Dz15WS_E1 lub oligomerem Dz27WS_E1, do końcowego stężenia 5 nM substratu i 500 nM DNAzymu. Mieszaninę inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Reakcję cięcia inicjowano poprzez dodanie 50 mM cytrynianu sodu o pH od 2,5 do 5,5. Reakcję prowadzono przez trzy godziny w temperaturze 37°C, a następnie wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1.

6.4.7.2. Reakcja cięcia katalitycznego DNAzymów metalozależnych

Określanie specyficzności wobec wybranych jonów metali

Aktywność katalityczną DNAzymów pełnej długości jak i wariantów skróconych z końca 5' oraz wariantów skróconych z końca 5' i 3' – Dz1/VIIWS, Dz1/VIIWS_A4C/T10G, Dz1/VIIWS_A12C, Dz1/VIIWS_A12G, Dz1/VIIWS_A12T, Dz1/VIIWS_PS, Dz5/XWS, Dz5/XWS_T4C/A10G, Dz15/XWS oraz Dz24/XWS określano w obecności następujących jonów metali dwuwartościowych: Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} . DNAzomy znakowane izotopem ^{32}P (10000–30000 cpm) poddawano procedurze denaturacji-renaturacji w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl stosując 1-minutową inkubację w 65°C, powolne schładzanie do 35°C w tempie 0,5°C/minutę, a następnie 10-minutową inkubację w 25°C. Następnie do prób wprowadzano jony metali dwuwartościowych do końcowego stężenia 50 μM lub 100 μM . Reakcje prowadzono przez 5 i 30 minut w temperaturze 25°C, a następnie wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1. Podczas wstępnej analizy specyficzności działania wariantów 90-nukleotydowych stosowano jony Cd^{2+} o stężeniu 100 μM oraz mieszaninę jonów metali: 100 μM Mg^{2+} i 50 μM Sr^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} (rozdz. 3.5).

Wyznaczanie stałych szybkości reakcji cięcia katalitycznego

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji katalitycznego cięcia (k_{obs}) dla DNAzymów pełnej długości przeprowadzono w obecności jonów: Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} , natomiast dla skróconych wariantów – Dz1/VIIWS, Dz5/XWS, Dz15/XWS w obecności jonów Zn^{2+} , Mn^{2+} i Cd^{2+} . Przed reakcją, znakowane izotopem ^{32}P DNAzomy (10000–30000

cpm) poddawano procedurze denaturacji-renaturacji w buforze zawierającym 50 mM HEPES pH 7,0 oraz 100 mM NaCl. Próbkę inkubowano przez 1 minutę w 65°C, schładzano do 35°C w tempie 0,5°C/minutę, a następnie przeprowadzano 10-minutową inkubację w 25°C. W przypadku wyznaczenia stałych k_{obs} dla reakcji przebiegających w 37°C, etap powolnego schładzania prowadzono do 37°C w tempie 0,5°C/minutę. Reakcje cięcia inicjowano poprzez dodanie roztworu wybranego jonu metalu dwuwartościowego do końcowego stężenia 50 μ M lub 100 μ M. Próby inkubowano w temperaturze 25°C lub 37°C. Z mieszaniny reakcyjnej pobierano próbki po odpowiednim czasie trwania reakcji (10", 20", 30", 40", 1', 2', 3', 5', 10', 20', 30' – dla DNAzymów pełnej długości; 15", 30", 45", 1', 2', 3', 5', 10', 20', 30', 60' – dla skróconych wariantów DNAzymów) i wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1. Na podstawie danych eksperymentalnych wyznaczano stałą szybkości reakcji katalitycznego cięcia (k_{obs}).

Aktywność katalityczna DNAzymów działających *in trans*

Zsyntetyzowano dwa warianty DNAzymu 1/VIIWS działające w układzie dwucząsteczkowym: 1/VIIWS_E1–1/VIIWS_S1 oraz 1/VIIWS_E2–1/VIIWS_S2. Oznaczenie ich aktywności katalitycznej prowadzono w buforze 50 mM HEPES pH 7,0/100 mM NaCl w obecności jonów Cd^{2+} o stężeniu 0,1, 1 i 10 mM. DNAzym wprowadzany był do reakcji w 100-, 1000- i 10000-krotnym nadmiarze w stosunku do oligonukleotydowego substratu znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5'. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 30 minut, a następnie wygaszano poprzez dodanie buforu „stop” w stosunku 1:1.

Kolejny układ dwucząsteczkowy DNAzymu stanowił znakowany izotopem ^{32}P na końcu 5' substrat 1/VIIIS wraz z DNAzymem 1/VIIIE w buforze reakcyjnym o składzie: 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl. Końcowe stężenie DNAzymu wynosiło 500 nM. DNAzym wprowadzano w 100-krotnym nadmiarze w stosunku do oligonukleotydowego substratu. Mieszaninę inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Reakcję cięcia inicjowano poprzez dodanie jonów Cd^{2+} lub Mg^{2+} do końcowego stężenia, odpowiednio, 100 μ M i 1 mM. Reakcję prowadzono przez 30 minut oraz 3 godziny w temperaturze 37°C, a następnie wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1.

W przypadku wariantu DNAzymu w układzie *in trans*, w którym centrum katalityczne DNAzymu 1/VIIWS zostało wprowadzone w miejsce centrum katalitycznego DNAzymu 8-17, podczas badania jego aktywności mieszanina reakcyjna zawierała substrat Dz1/VIIIS lub 8-17S, znakowane z końca 5' z użyciem radioaktywnego [γ - ^{32}P]ATP, DNAzym Dz1/VIIIE, 50 mM HEPES pH 7,0 i 100 mM NaCl. DNAzym wprowadzany był do reakcji w 100-krotnym

nadmiarze w stosunku do oligonukleotydowego substratu. Mieszaninę inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Reakcję cięcia inicjowano poprzez dodanie jonów Cd²⁺ lub Mg²⁺ do końcowego stężenia 100 μM lub 1 mM, a następnie prowadzono w temperaturze 25°C oraz 37°C. Reakcję wygaszano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1 po 30 minutach oraz po 3 godzinach jej trwania. Kontrolę pozytywną reakcji stanowił układ dwucząsteczkowy DNAzemu 8-17 aktywnego w obecności jonów Mg²⁺: 8-17E/8-17S.

6.4.7.3. Analiza produktów reakcji cięcia

Produkty reakcji katalitycznego cięcia DNAzymów analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Do oznaczeń ilościowych wykorzystywano skaner radioaktywności FLA-5100 (Fuji-Film) wraz z oprogramowaniem MultiGuage 3.0 firmy (Fuji-Film).

Aby obliczyć maksymalny stopień przereagowania danego wariantu DNAzemu dane eksperymentalne podstawiano do następującego równania:

$$Y_m[\%] = \frac{P_t * 100\%}{(P_t + S_t)}$$

gdzie: Y_m – oznacza maksymalny stopień przereagowania w czasie t , P_t – oznacza frakcję DNAzemu przeciętą w czasie t , S_t – oznacza frakcję DNAzemu, która nie uległa przecięciu w czasie t .

Badane DNAzemy są wariantami wolnotnącym, gdyż przyrost ilości produktu przebiega bardzo wolno, a reakcja cięcia nawet po godzinie nie osiąga stanu *plateau*. W tej sytuacji, dla otrzymania rzetelnych wartości stałych szybkości reakcji, konieczne było podstawienie danych eksperymentalnych do równania linowego:

$$\ln(S) = k_{obs} * t + b$$

gdzie: k_{obs} – stała szybkości reakcji, S oznacza ubytek substratu w czasie t oraz b – miejsce przecięcia z osią OY. Do wyznaczenia prostej wybierano przedział argumentów t , zaczynając od $t = 0$, odpowiadający prostoliniowemu odcinkowi wykresu wykładniczego. Wartości te były obliczane z wykorzystaniem oprogramowania OriginPro 8.5.

6.4.8. Badania spektroskopowe DNAzymów – spektroskopia CD i UV-vis

6.4.8.1. DNAzemy pH-zależne

Do badań spektroskopowych wykorzystano dwa nieprzecinające się DNAzemy Dz15WS-dA oraz Dz27WS-dA, które w miejscu potencjalnego cięcia, zamiast rybonukleotydu adeniny posiadają deoksyrybonukleotyd adeniny. DNAzemy poddawano

renaturacji: 65°C przez 1 minutę, powolne schładzanie do 35°C (w tempie 0,5°C/minutę), 25°C przez 10 minut. Renaturację prowadzono w objętości 250 µl, a końcowe stężenie DNAzemu wynosiło 10 µM. Następnie, do próby wprowadzano 50 mM cytrynian sodu o pH w zakresie 2,5–7,0. Długość drogi optycznej podczas pomiarów techniką spektroskopii CD jak i spektroskopii UV-vis wynosiła 1 mm. Uzyskane widma są średnią z pięciu pomiarów, których dokonywano w zakresie długości fali światła od 220 do 400 nm. Do analizy danych wykorzystywano oprogramowanie JASCO SpectraManager.

6.4.8.2. DNAzemy metalozależne

Do badań spektroskopowych wykorzystano DNAzym Dz1/VIIWS-dA, który w miejscu rybonukleotydu adeniny – miejscu cięcia posiadał deoksyrybonukleotyd adeniny (wariant nieprzecinający się). DNAzym poddawano renaturacji w buforze: 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl stosując 1-minutową inkubację w 65°C, powolne schładzanie do 35°C w tempie 0,5°C/minutę, a następnie 10-minutową inkubację w 25°C. Objętość mieszaniny wynosiła 250 µl, a końcowe stężenie DNAzemu odpowiadało 10 µM. Po etapie renaturacji do próby wprowadzano jony metali dwuwartościowych: Cd²⁺ (końcowe stężenia 5–2000 µM), Zn²⁺ (końcowe stężenia 5–2000 µM) oraz Mg²⁺ (końcowe stężenia 5 µM–10 mM). Przed pomiarem próby inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Długość drogi optycznej podczas pomiarów spektroskopii CD jak i spektroskopii UV-vis wynosiła 1 mm. Uzyskane widma są średnią z pięciu odczytów, których dokonywano w zakresie długości fali światła od 220 do 400 nm. Do analizy danych wykorzystywano oprogramowanie JASCO SpectraManager oraz OriginPro 8.5.

W celu wyznaczenia stałych dysocjacji jonów (K_d) do cząsteczki DNAzemu, dane eksperymentalne podstawiano do równania hiperboli:

$$CD_{277} = \frac{C(\text{Me}^{2+})}{K_d + (\text{Me}^{2+})},$$

gdzie K_d jest stałą dysocjacji, CD_{277} oznacza intensywność absorpcji przy długości fali 277 nm dla jonów Cd²⁺, dla jonów Zn²⁺ i Mg²⁺ odczytywana maksymalna wartość absorpcji była przy 275 nm, (Me^{2+}) oznacza stężenie jonu metalu dwuwartościowego. Wartości te były obliczane z wykorzystaniem oprogramowania OriginPro 8.5.

7. Literatura

- [1] Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling E, Cech: TR Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena. *Cell*, 1982, 31, 147–157.
- [2] Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, 35, 849–857.
- [3] Breaker RR, Joyce GF: A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem.Biol.*, 1994, 1, 223–229.
- [4] Wang W, Billen LP, Li Y: Sequence diversity, metal specificity and catalytic proficiency of metal-dependent phosphorylating DNA enzymes. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 507–517.
- [5] Breaker RR, Joyce GF: A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem. Biol.*, 1995, 2, 655–660.
- [6] Santoro SW, Joyce GF: A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94, 4262–4266.
- [7] Lu Y, Liu J, Li, Bruesehoff PJ, Pavot CM, Brown AK: New highly sensitive and selective catalytic DNA biosensors for metal ions. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 18, 529–540.
- [8] Carmi N, Breaker RR: Characterization of a DNA-Cleaving Deoxyribozyme. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2001, 9, 2589–2600.
- [9] Gu H, Furukawa K, Weinberg Z, Berenson DF: Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 9121–9129.
- [10] Sreedhara A, Li Y, Breaker RR: Ligating DNA with DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 3454–3460.
- [11] Li Y, Breaker RR: Phosphorylating DNA with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 2746–2751.
- [12] Li Y, Sen D: A catalytic DNA for porphyrin metallation. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, 3, 743–747.
- [13] Chandr M, Silverman SK: DNA and RNA can be equally efficient catalysts for carbon-carbon bond formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 2936–2937.
- [14] Lan T, Lu Y: Metal ion-dependent DNazymes and their applications as biosensors. *Met. Ions Life Sci.*, 2012, 10, 217–248.
- [15] ZhiJie X, LiFang Y, LunQuan S, Ya C: Use of DNazymes for cancer research and therapy. *Chinese Sci. Bull.*, 2012, 57, 3404–3408.

- [16] Ryoo SR, Jang H, Kim KS, Lee B, Kim KB, Kim YK, Yeo WS, Lee Y, Kim DE, Min DH: Functional delivery of DNAzyme with iron oxide nanoparticles for hepatitis C virus gene knockdown. *Biomaterials*, 2012, 33, 2754–2761.
- [17] Yu SH, Wang TH, Au LC: Specific repression of mutant K-RAS by 10–23 DNAzyme: sensitizing cancer cell to anti-cancer therapies. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2009, 379, 230–234.
- [18] Pyle AM, Chu VT, Jankowsky E, Boudvillain M: Using DNAzymes to cut, process, and map RNA molecules for structural studies or modification. *Methods Enzymol.*, 2000, 317, 140–146.
- [19] Sando S, Narita A, Sasaki T, Aoyama Y: Locked TASC probes for homogeneous sensing of nucleic acids and imaging of fixed *E. coli* cells. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1002–1007.
- [20] Zhang XB, Kong RM, Lu Y: Metal Ion Sensors Based on DNAzymes and Related DNA Molecules. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2011, 4, 105–112.
- [21] Schubert S, Kurreck J: Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr. Drug Targets*, 2004, 5, 667–681.
- [22] Liu J, Cao Z, Lu Y: Functional Nucleic Acid Sensor. *Chem. Rev.*, 2009, 109, 1948–1998.
- [23] Mlynek V, Skoczyńska A: Prozapalne działanie kadmu. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2005, 59, 1–8.
- [24] Bukowiecka-Matusiak M, Woźniak LA: Struktura DNA od A do Z. Biologiczne implikacje różnorodności strukturalnej DNA. *Postępy Biochem.*, 2006, 52, 229–238.
- [25] Schlosser K, Li Y: Biologically inspired synthetic enzymes made from DNA. *Chem. Biol.*, 2009, 16, 311–322.
- [26] Cech TR: Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, 2000, 289, 878–879.
- [27] Doudna AJ, Cech TR: The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*, 2002, 418, 222–228.
- [28] Bartel DP, Szostak JW: Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science*, 1993, 261, 1411–1418.
- [29] Pani T, Uhlenbeck OC: In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb^{2+} . *Biochemistry*, 1992, 31, 3887–3895.
- [30] Williams KP, Ciafre S, Tocchini-Valentini GP: Selection of novel Mg^{2+} -dependent self-cleaving ribozymes. *EMBO J.*, 1995, 14, 4551–4557.

- [31] Huang H, Yang Z, Yarus M: RNA enzymes with two small-molecule substrates. *Chem. Biol.*, 1998, 5, 669–678.
- [32] Breaker RR: DNA enzymes. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, 427–431.
- [33] Ellington AD, Szostak JW: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346, 818–822.
- [34] Famulok M, Hartig JS, Mayer G: Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chem. Rev.*, 2007, 107, 3715–3743.
- [35] Lee YJ, Lee SW: In vitro selection of cancer-specific RNA aptamers. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 16, 1149–1153.
- [36] Baum DA, Silverman SK: Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, 65, 2156–2174.
- [37] Been MD, Wickham GS: The self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus. *Eur. J. Biochem.*, 1997, 247, 741–753.
- [38] Ciesiołka J, Wrzesiński J, Łęgiewicz M, Smólska B, Dutkiewicz M: Ribozymes of hepatitis delta virus: recent findings on their structure, mechanism of catalysis and possible applications. *Acta Biochim. Pol.*, 2001, 48, 409–418.
- [39] Shih I, Been MD: Catalytic strategies of the hepatitis delta virus ribozymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 2002, 71, 887–917.
- [40] Eckstein F: The hammerhead ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 601–604.
- [41] Fedor MJ: Structure and function of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.*, 2000, 297, 269–291.
- [42] Illangasekare M, Yarus M: A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis. *RNA*, 1999, 5, 1482–1489.
- [43] Conn MM, Prudent JR, Schultz PG: Porphyrin metalation catalyzed by a small RNA molecule. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7012–7013.
- [44] Ciesiołka J, Illangasekare M, Majerfeld I, Nickles T, Welch M, Yarus Y, Zinnen S: Affinity selection-amplification from randomized ribooligonucleotide pools. *Method. Enzymol.*, 1996, 267, 315–335.
- [45] Wilson DS, Szostak JW: In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, 68, 611–647.
- [46] Tuerk C, Gold L: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249, 505–510.
- [47] Robertson DL, Joyce GF: Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 1990, 344, 467–468.

- [48] Łęgiewicz M, Wichłacz A, Brzezicha B, Ciesiołka J: Antigenomic delta ribozyme variants with mutations in the catalytic core obtained by the in vitro selection method. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 1270–1280.
- [49] Tang J, Breaker RR: Rational design of allosteric ribozymes. *Chem. Biol.*, 1997, 4, 453–459.
- [50] Huizenga DE, Szostak JW: A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, 1995, 34, 656–665.
- [51] Wu Y, Zhan S, Wang L, Zhou P: Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles. *Analyst*, 2014, 139, 1550–1561.
- [52] Wrzeński J, Ciesiołka J: Characterization of structure and metal ions specificity of Co^{2+} -binding RNA aptamers. *Biochemistry*, 2005, 44, 6257–6268.
- [53] Ciesiołka J: Selekcja RNA in vitro: motywy strukturalne wiążące specyficznie jony metali dwuwartościowych, w: *Na pograniczu chemii i biologii*, 1998, red. J. Barciszewki, H. Koroniak, W. Markiewicz, K. Ziemiński, t. II, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 325–336.
- [54] Silverman SK: Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2, 2701–2706.
- [55] Sabeti PC, Unrau PJ, Bartel DP: Accessing rare activities from random RNA sequences: the importance of the length of molecules in the starting pool. *Chem. Biol.*, 1997, 4, 767–774.
- [56] Silverman SK: SURVEY AND SUMMARY In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, 6151–6163.
- [57] Li J, Zheng W, Kwon AH, Lu Y: In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNAcleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 481–488.
- [58] Liu J, Brown AK, Meng X, Cropek DM, Istok JD, Watson BD, Lu Y: A catalytic beacon sensor for uranium with parts-per-trillion sensitivity and millionfold selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104, 2056–2061.
- [59] Schlosser K, Gu J, Lam JCF, Li Y: In vitro selection of small RNA-cleaving deoxyribozyme that cleave pyrimidine–pyrimidine junctions. *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 4768–4777.
- [60] Lam JC, Withers JB, Li Y: A complex RNA-cleaving DNzyme that can efficiently cleave a pyrimidine–pyrimidine junction., *J. Mol. Biol.*, 2010, 400, 689–701.

- [61] Lam JC, Kwan SO, Li Y: Characterization of non-8-17 sequences uncovers structurally diverse RNA-cleaving deoxyribozymes. *Mol. BioSys.*, 2011, 7, 2139–2146.
- [62] Brzezicha B, Ciesiołka J: Wykorzystanie metody selekcji RNA in vitro do otrzymywania wariantów naturalnie występujących rybozymów, w: *Na pograniczu chemii i biologii*, 2003, red. J. Barciszewki, H. Koroniak, t. VII, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 117–143.
- [63] Lee JF, Stovall GM, Ellington AD: Aptamer therapeutic advance. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 282–289.
- [64] Feldman AR, Sen D: A new and efficient DNA enzyme for the sequence-specific cleavage of RNA. *J. Mol. Biol.*, 2001, 313, 283–294.
- [65] Brown AK, Liu J, He Y, Lu Y: Biochemical characterization of a uranyl ion-specific DNAzyme. *Chem. Bio. Chem.*, 2009, 10, 486–492.
- [66] Silverman SK: Catalytic DNA (deoxyribozymes) for sythetic applications – current abilities and future prospects. *Chem. Commun.*, 2008, 30, 3467–3467.
- [67] Li Y, Liu Y, Breaker RR: Capping DNA with DNA. *Biochemistry*, 2000, 39, 3106–3114.
- [68] Sheppard TL, Ordoukhanian P, Joyce GF: A DNA enzyme with N-glycosylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 7802–7807.
- [69] Höbartner C, Pradeepkumar PI, Silverman SK: Site-selective depurination by a periodate-dependent deoxyribozym. *Chem. Commun.*, 2007, 2255–2257.
- [70] Pyle AM: Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science*, 1993, 61, 709–714.
- [71] Yarus M: How many catalytic RNAs? Ions and the cheshire cat conjecture. *FASEB J.*, 1993, 7, 31–39.
- [72] Curtis EA, Bartel DP: The hammerhead cleavage reaction in monovalent cations. *RNA*, 2001, 7, 546–552.
- [73] O’Rear JL, Wang S, Feig AL, Beigelman L, Uhlenbeck OC, Herschlag D: Comparison of the hammerhead cleavage reactions stimulated by monovalent and divalent cations. *RNA*, 2001, 7, 537–545.
- [74] Geyer CR, Sen D: Evidence for the metal-cofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme. *Chem. Biol.*, 1997, 4, 579–593.
- [75] Roth A, Breaker RR: An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 6027–6031.

- [76] Faulhammer D, Famulok M: The Ca^{2+} ion as a cofactor for a novel RNA-cleaving deoxyribozyme. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, 35, 2837–2841.
- [77] Faulhammer D, Famulok M: Characterization and divalent metal-ion dependence of in vitro selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides. *J. Mol. Biol.*, 1997, 269, 188–202.
- [78] Soukup GA, Breaker RR: Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA*, 1999, 5, 1308–1325.
- [79] Tram K, Kanda P, Li Y: Lighting up RNA-cleaving DNazymes for biosensing. *J. Nucleic Acids.*, 2012, 2012, Article ID 958683, 1–8.
- [80] Santoro SW, Joyce GF: Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*, 1998, 37, 13330–13342.
- [81] Uhlenbeck OC: A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 1987, 328, 596–600.
- [82] Hampel A, Tritz R: RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, 1989, 28, 4929–4933.
- [83] Saville BJ, Collins RA: A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell*, 1990, 61, 685–696.
- [84] Thill G, Vasseur M, Tanner NK: Structural and sequence elements required for the self-cleaving activity of the hepatitis delta virus ribozyme. *Biochemistry*, 1993, 32, 4254–4262.
- [85] Brown AK, Li J, Pavot CM, Lu Y: Lead-dependent DNzyme with a two-step mechanism. *Biochemistry*, 2003, 42, 7152–716.
- [86] Kim HK, Rasnik I, Liu J, Ha T, Lu Y: Dissecting metal ion-dependent folding and catalysis of a single DNzyme. *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3, 763–768.
- [87] Kim HK, Liu J, Li J, Nagraj N, Li M, Pavot CM, Lu Y: Metal-dependent global folding and activity of the 8-17 DNzyme studied by fluorescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 6896–6902.
- [88] Nawrot B: Katalityczne DNA – deoksyrybozomy. *Postępy Biochem.*, 2002, 43, 20–33.
- [89] Nowakowski J, Shim PJ, Prasad GS, Stout CD, Joyce GF: Crystal structure of an 82-nucleotide RNA-DNA complex formed by the 10-23 DNA enzyme. *Nat. Struct. Biol.*, 1999, 6, 151–156.
- [90] Zaborowska Ź, Fürste PJ, Erdmann VA, Kurreck J: Sequence requirements in the catalytic core of the “10-23” DNA Enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 40617–40622.

- [91] Rong W, Xu L, Liu Y, Yu J, Zhou Y, Liu K, He J: 8–17 DNAzyme modified with purine analogs in its catalytic core: The conservation of the five-membered moieties of purine residues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 4238–4241.
- [92] Cairns MJ, King A, Sun LQ: Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 2883–2889.
- [93] Nawrot B, Widera K, Wojcik M, Rebowska B, Nowak G, Stec WJ: Mapping of the functional phosphate groups in the catalytic core of deoxyribozyme 10–23. *FEBS J.*, 2007, 274, 1062–1072.
- [94] Cruz RP, Withers JB, Li Y: Dinucleotide junction cleavage versatility of 8–17 deoxyribozyme. *Chem Biol.*, 2004, 11, 57–67.
- [95] Schlosser K, Gu J, Sule L, Li Y: Sequence-function relationships provide new insight into the cleavage site selectivity of the 8–17 RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 1472–1481.
- [96] Bonaccio M, Credali A, Peracchi A: Kinetic and thermodynamic characterization of the RNA-cleaving 8-17 deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 916–925.
- [97] Zaborowska Ż, Schubert S, Kurreck J, Erdmann VA: Deletion analysis in the catalytic region of the 10-23 DNA enzyme. *FEBS Lett.*, 2005, 579, 554–558.
- [98] Peracchi A: Preferential activation of the 8-17 deoxyribozyme by Ca²⁺ ions. Evidence for the identity of 8-17 with the catalytic domain of the Mg5 deoxyribozyme. *J Biol Chem.*, 2000, 275, 11693–11697.
- [99] Peracchi A, Bonaccio M, Clerici M: A Mutational analysis of the 8–17 deoxyribozyme core. *J. Mol. Biol.*, 2005, 352, 783–794.
- [100] Wang B, Cao L, Chiuman W, Li Y, Xi Z: Probing the function of nucleotides in the catalytic cores of the 8-17 and 10-23 DNAzymes by abasic nucleotide and C3 spacer substitutions. *Biochemistry*, 2010, 49, 7553–7562.
- [101] Liu J, Lu Y: FRET study of a trifluorophore-labeled DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 15208–15216.
- [102] Breaker RR, Emilsson GM, Lazarev D, Nakamura S, Puskarz IJ, Roth A, Sudarsan N: A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. *RNA*, 2003, 9, 949–957.
- [103] Cochran AG, Schultz PG: Antibody-catalyzed porphyrin metallation. *Science*, 1990, 249, 781–783.
- [104] Dass CR, Choong PF, Khachigian LM: DNAzyme technology and cancer therapy: cleave and let die. *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 243–251.

- [105] Chen J, Zhang J, Guo Y, Li J, Fu F, Yang HH, Chen G: An ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of DNA species related to oral cancer based on nuclease-assisted target recycling and amplification of DNAzyme. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2011, 47, 8004–8006.
- [106] Chakraborti S, Banerjee AC: Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol. Ther.*, 2003, 7, 817–826.
- [107] Toyoda T, Imamura Y, Takaku H, Kashiwagi T, Hara K, Iwahashi J, Ohtsu Y, Tsumura N, Kato H, Hamada N: Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett.*, 2000, 48, 113–116.
- [108] Li H, Wu Z, Qiu L, Liu J, Wang C, Shen G, Yu R: Ultrasensitive label-free amplified colorimetric detection of p53 based on G-quadruplex Mbzymes. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 50, 180–185.
- [109] Chen Y, Corn RM: DNAzyme Footprinting: Detecting protein-aptamer complexation on surfaces by blocking DNAzyme cleavage activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 2072–2075
- [110] Elbaz J, Lioubashevski O, Wang F, Remacle F, Levine RD, Willner I: DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits. *Nat. Nanotechnol.*, 2010, 5, 417–422.
- [111] Willner I, Shlyahovsky B, Zayats M, Willner B: DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 1153–1165.
- [112] Stojanovic MN, Mitchell TE, Stefanovic D: Deoxyribozyme-based logic gates. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 3555–3561.
- [113] Grimpe B: Deoxyribozymes and bioinformatics: complementary tools to investigate axon regeneration. *Cell Tissue Res.*, 2012, 349, 181–200.
- [114] Höbartner C, Silverman SK: Recent advances in DNA catalysis. *Biopolymers*, 2007, 87, 279–92.
- [115] Kurreck J: Antisense technologies: improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 1628–1644.
- [116] Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, Withrington C, Wang L, King A: Suppression of smooth muscle cell proliferation by a cmyc RNA-cleaving deoxyribozyme. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 17236–17241.
- [117] Schubert S, Gul DC, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, Kurreck J: RNA cleaving “10-23” DNAzymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 5982–5992.

- [118] Shoji Y, Akhtar S, Periasamy A, Herman B, Juliano RL: Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5543–5550.
- [119] Sioud M, Leirdal M: Design of nuclease resistant protein kinase C-alpha DNA enzyme with potential therapeutic application. *J. Mol. Biol.*, 2000, 296, 937–947.
- [120] Sando S, Sasaki T, Kanatani K, Aoyama Y: Amplified nucleic acid sensing using programmed self-cleaving DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 15720–15721.
- [121] Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW: Homogeneous assays based on deoxyribozyme catalysis. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 2915–2918.
- [122] Levy M, Ellington AD: ATP-dependent allosteric DNA enzymes. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 417–426.
- [123] Liu J, Lu Y: Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Anal. Chem.*, 2004, 76, 1627–1632.
- [124] Breaker RR: Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 31–39.
- [125] Buchhaupt M, Peifer C, Entian KD: Analysis of 2'-O-methylated nucleosides and pseudouridines in ribosomal RNAs using DNAzymes. *Anal. Biochem.*, 2007, 361, 102–108.
- [126] Hengesbach M, Meusburger M, Lyko F, Helm M: Use of DNAzymes for site-specific analysis of ribonucleotidemodifications. *RNA*, 2008, 14, 180–187.
- [127] Li J, Lu Y: A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 10466–10467.
- [128] Liu J, Lu Y: Improving fluorescent DNAzyme biosensors by combining inter- and intramolecular quenchers. *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6666–6672.
- [129] Palchetti I, Mascini M: Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst*, 2008, 133, 846–854.
- [130] Wu P, Hwang K, Lan T, Lu Y: A DNAzyme-gold nanoparticle probe for uranyl ion in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 5254–5257.
- [131] Liu J, Lu Y: A DNAzyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu²⁺ ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 9838–9839.
- [132] Chiuman W, Li Y: Efficient signaling platforms built from a small catalytic DNA and doubly labeled fluorogenic substrates. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35, 401–405.

- [133] Liu Z, Mei SH, Brennan JD, Li Y: Assemblage of signaling DNA enzymes with intriguing metal-ion specificities and pH dependences. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 7539–7545.
- [134] Juskowiak B: Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 3157–3176.
- [135] Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS: Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 2847–2857.
- [136] Liang ZY, Wei SZ, Guan J, Luo Y, Gao J, Zhu H, Wu S, Liu T: DNAzyme-mediated cleavage of survivin mRNA and inhibition of the growth of PANC-1 cells. *J Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, 20, 1595–1602.
- [137] Zhang L, Gasper WJ, Stass SA, Ioffe OB, Davis MA, Mixson AJ: Angiogenic inhibition mediated by a DNAzyme that targets vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res.*, 2002, 62, 5463–5469.
- [138] Zhang GS, Dass CR, Sumithran E, Di Girolamo N, Sun LQ, Khachigian LM: Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, 96, 683–696.
- [139] Sood V, Gupta N, Bano AS, Banerjea AC: DNA-enzyme-mediated cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Gag RNA is significantly augmented by antisense-DNA molecules targeted to hybridize close to the cleavage site. *Oligonucleotides*, 2007, 17, 113–121.
- [140] Zhang X, Xu Y, Ling H, Hattori T: Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett.*, 1999, 458, 151–156.
- [141] Asahina Y, Ito Y, Wu CH, Wu GY: DNA ribonucleases that are active against intracellular hepatitis B viral RNA targets. *Hepatology.*, 1998, 28, 547–554.
- [142] Roy S, Gupta N, Subramanian N, Mondal T, Banerjea AC, Das S: Sequence-specific cleavage of hepatitis C virus RNA by DNAzymes: inhibition of viral RNA translation and replication. *J. Gen. Virol.*, 2008, 89, 1579–1586.
- [143] Kirsebom LA, Ciesiołka J: Pb²⁺-induced cleavage of RNA, in: *Handbook of RNA Biochemistry*, 2nd Edition, 2012, edited by R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof. WILEY-VCH Verlag, ISBN: 978-3-527-32764-5.
- [144] Ciesiołka J, Górski J, Yarus M: Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. *RNA*, 1995, 1, 538–550.
- [145] Ehresmann C, Baudin F, Mougél M, Romby P, Ebel JP, Ehresmann B: Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 9109–9128.
- [146] Reuter JS, Mathews DH: RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11, 129–137.

- [147] Zuker M: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 3406–3415.
- [148] Hofacker IL, Fontana W, Stadler PF, Bonhoeffer S, Tacker M, Schuster P: Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. *Monatsh. Chem.*, 1994, 125, 167–188.
- [149] Xayaphoummine A, Bucher T, Isambert H: Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 (Web Server issue), W605–610.
- [150] McManus SA, Li Y: The structural diversity of deoxyribozymes. *Molecules*, 2010, 15, 6269–6284.
- [151] Gray DM, Liu JJ, Ratliff RL, Antao VP, Gray CW: CD spectroscopy of acid-induced structures of polydeoxyribonucleotides: Importance of CC⁺ base pair. *Struct. Express.*, 1987, 2, 147–166.
- [152] Kypr J, Kejnovská I, Renciuk D, Vorlícková M: Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 1713–1725.
- [153] Wang H, Kim Y, Liu H, Zhu Z, Bamrungsap S, Tan W: Engineering a unimolecular DNA-catalytic probe for single lead ion monitoring. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 8221–8226.
- [154] Zuo P, Yin BC, Ye BC: DNAzyme-based microarray for highly sensitive determination of metal ions. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25, 935–939.
- [155] Velez TE, Singh J, Xiao Y, Allen EC, Wong OY, Chandra M, Kwon SC, Silverman SK: Systematic evaluation of the dependence of deoxyribozyme catalysis on random region length. *ACS Comb. Sci.*, 2012, 14, 680–687.
- [156] Mazumdar D, Nagraj N, Kim HK, Meng X, Brown AK, Sun Q, Li W, Lu Y: Activity, folding and Z-DNA formation of the 8-17 DNAzyme in the presence of monovalent ions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 5506–5515.
- [157] Huang PJ, Liu J: Sensing Parts-per-Trillion Cd²⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺ collectively and individually using phosphorothioate DNAzymes. *Anal. Chem.*, 2014, 86, 5999–6005.
- [158] Czeczot H, Skrzycki M: Kadm – pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2010, 64, 38–49.
- [159] Kim HN, Ren WX, Kim JS, Yoon J: Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 3210–3244.
- [160] Hollenstein M, Hipolito C, Lam C, Dietrich D, Perrin DM: A highly selective DNAzyme sensor for mercuric ions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 4346–4350.

- [161] Knight R, Yarus M: Finding specific RNA motifs: function in a zeptomole world? *RNA*, 2003, 9, 218–230.
- [162] Knight R, De Sterck H, Markel R, Smit S, Oshmyansky A, Yarus M: Abundance of correctly folded RNA motifs in sequence space, calculated on computational grids. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 3, 5924–5930.
- [163] Carothers JM, Oestreich SC, Davis JH, Szostak JW: Informational complexity and functional activity of RNA structures. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 5130–5137.
- [164] Schlosser K, Li Y: Tracing sequence diversity change of RNA-cleaving deoxyribozymes under increasing selection pressure during in vitro selection. *Biochemistry*, 2004, 43, 9695–9707.
- [165] Bruesehoff PJ, Li J, Augustine AJ, Lu Y: Improving metal ion specificity during in vitro selection of catalytic DNA. *Comb. Chem. High T. Scr.*, 2002, 5, 327–335.
- [166] Soukup GA, Breaker RR: Engineering precision RNA molecular switches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 3584–3589.
- [167] Jhaveri S, Rajendran M, Ellington AD: In vitro selection of signaling aptamers. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18, 1293–1297.
- [168] Lehman N, Joyce GF: Evolution in vitro of an RNA enzyme with altered metal dependence. *Nature*, 1993, 361, 182–185.
- [169] Frank DN, Pace NR: In vitro selection for altered divalent metal specificity in the RNase P RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94, 14355–14360.
- [170] Kandadai SA, Li Y: Characterization of a catalytically efficient acidic RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, 7164–7175.
- [171] Kandadai SA, Chiuman W, Li Y: Phosphoester-transfer mechanism of an RNA-cleaving acidic deoxyribozyme revealed by radioactivity tracking and enzymatic digestion. *Chem. Commun.*, 2006, 2359–2361.
- [172] Kandadai SA, Mok WW, Ali MM, Li Y: Characterization of an RNA-cleaving deoxyribozyme with optimal activity at pH 5. *Biochemistry*, 2009, 48, 7383–7391.
- [173] Shen Y, Brennan JD, Li Y: Characterizing the secondary structure and identifying functionally essential nucleotides of pH6DZ1, a fluorescence-signaling and RNA-cleaving deoxyribozyme. *Biochemistry*, 2005, 44, 12066–12076.
- [174] Ali MM, Kandadai SA, Li Y: Characterization of pH3DZ1 – an RNA-cleaving deoxyribozyme with optimal activity at pH 3. *Can. J. Chem.*, 2007, 85, 261–273.
- [175] Jayasena VK, Gold L: In vitro selection of self-cleaving RNAs with a low pH optimum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94, 10612–10617.

- [176] Feldman AR, Leung EK, Bennet AJ, Sen D: The RNA-cleaving bipartite DNAzyme is a distinctive metalloenzyme. *Chem. Bio. Chem.*, 2006, 7, 98–105.
- [177] Manzini G, Yathindra N, Xodo LE: Evidence for intramolecularly folded i-DNA structures in biologically relevant CCC-repeat sequences. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 4634–4640.
- [178] Gueron M, Leroy JL: The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2000, 10, 326–331
- [179] Łęgiewicz M, Lozupone C, Knight R, Yarus M: Size, constant sequences, and optimal selection. *RNA*, 2005, 11, 1701–1709.
- [180] Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G: Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, 1985, 23, 1577–1580.
- [181] Zhang Y, Epstein LM: Cloning and characterization of extended hammerheads from a diverse set of caudate amphibians. *Gene*, 1996, 172, 183–190.
- [182] Rojas AA, Vazquez-Tello, A, Ferbeyre G, Venanzetti F, Bachmann L, Paquin B, Sbordoni V, Cedergren R: Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 4037–4043.
- [183] Tang J, Breaker RR: Structural diversity of self-cleaving ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 5784–5789.
- [184] Salehi-Ashtiani K, Szostak JW: In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature*, 2001, 414, 82–84.
- [185] Conaty J, Hendry P, Lockett T: Selected classes minimised hammerhead ribozyme have very high cleavage rates at low Mg^{2+} concentration. *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2400–2407.
- [186] Lehman N: Assessing the likelihood of recurrence during RNA evolution in vitro. *Artif. Life.*, 2004, 10, 1–22.
- [187] Pasternak K, Wrzesiński J, Ciesiołka J: Aptamery RNA wiążące ligandy niskocząsteczkowe. *Na pograniczu chemii i biologii*, 2004, red. J. Barciszewki, H. Koroniak, t. X, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 29–49.
- [188] Nelson KE, Ihms HE, Mazumdar D, Bruesehoff PJ, Lu Y: The importance of peripheral sequences in determining the metal selectivity of an in vitro-selected Co^{2+} -dependent DNAzyme. *Chembiochem.*, 2012, 13, 381–391.
- [189] Plashkevych O, Chattopadhyaya J: Structure of 10-23 DNAzyme in complex with the target RNA in silico – a progress report on the mechanism of RNA cleavage by DNA enzyme. *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids*, 1st Edition, 2011, edited by L.H. Zhang, Z. Xi, J. Chattopadhyaya. John Wiley & Sons, Inc, 272–291.

-
- [190] Wrzesiński J, Legiewicz M, Smólska B, Ciesiołka J: Catalytic cleavage of cis- and trans-acting antigenomic delta ribozymes in the presence of various divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 4482–4492.
- [191] Hansen MR, Simorre JP, Hanson P, Mokler V, Bellon L, Beigelman L, Pardi A: Identification and characterization of a novel high affinity metal-binding site in the hammerhead ribozyme. *RNA*, 1999, 5, 1099–1104.
- [192] Suh YA, Kumar PK, Taira K, Nishikawa S: Self-cleavage activity of the genomic HDV ribozyme in the presence of various divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 3277–3280.
- [193] Tram K, Xia J, Gysbers R, Li Y: An Efficient Catalytic DNA that Cleaves L-RNA. *PloS One*, 2015, 10(5):e0126402.
- [194] Wang S, Karbstein K, Peracchi A, Beigelman L, Herschlag D: Identification of the hammerhead ribozyme metal ion binding site responsible for rescue of the deleterious effect of a cleavage site phosphorothioate. *Biochemistry*, 1999, 38, 14363–14378.
- [195] Thaplyal P, Ganguly A, Golden BL, Hammes-Schiffer S, Bevilacqua PC: Thio effects and an unconventional metal ion rescue in the genomic hepatitis delta virus ribozyme. *Biochemistry*, 2013, 52, 6499–6514.
- [196] Huang PJ, Vazin M, Matuszek Ż, Liu J: A new heavy lanthanide-dependent DNAzyme displaying strong metal cooperativity and unrescuable phosphorothioate effect. *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43, 461–469.